

97. 光遺伝学を用いた脳内モード切替回路の探索

松井 広

Key words: 神経科学, グリア細胞, グルタミン酸, 脳虚血, てんかん

東北大学 大学院医学系研究科
附属創生応用医学研究センター
新医学領域創生分野

緒 言

脳内のグリア細胞は、神経細胞の活動状態に対して絶大な影響力を持っており、脳内情報処理のモードを切替える能力があることを本研究では明らかにした。脳の中には、神経細胞のほかに、脳の容積の半分程度を占めるグリア細胞という細胞があるが、ほとんど電気的な活動を示さないことから、脳内情報処理には関与しない細胞だと考えられてきた。しかし、細胞の示す活動とは、何も電気的な活動だけとは限らない。細胞内イオン濃度変化も細胞活動とみなすことができ、イオン濃度が変わるに従って、様々な細胞機能が影響を受け、周囲の他の細胞への作用が生まれると考えられる。ところが、これまで、グリア細胞の活動を特異的に操作する手段がなかったため、グリア細胞の脳内機能を推し量ることは不可能であった。本研究では、グリア細胞の活動を光で操作するという新技术（光遺伝学）を用いた¹⁾。実験を通して、グリア細胞が興奮性伝達物質であるグルタミン酸を放出すること、また、その放出メカニズムがこれまで発見されていない新規なものであることが明らかになった²⁾。このグリアの作用は、学習や記憶といった高次脳機能に関わることが示される一方³⁾、脳虚血時などの病態時に、グリア活動が暴走すると、脳組織を破壊してしまうほどの強力な作用を持つことが分かった。引き続き行った実験を通して、過剰な神経興奮が原因のてんかんにも、虚血時と同様に、グリア細胞の働きが関わっている可能性が示唆された。同じ刺激に対して、てんかん発作が生じにくくなる、抗てんかん回路を動物において作り出すことにも成功したが、この抗てんかん性を持つ抑制機能の形成にも、グリア細胞が関わっていることが示された。グリア細胞の持つ興奮作用は、適度であれば、脳の高次機能を促進し、過剰になれば、てんかんや脳障害へと導く。また、一方では、グリア細胞の発揮する抑制作用もあり、これを賦活化すれば、障害やてんかんの起こりにくい脳を作り上げることができる。まさに、グリア細胞は、脳内活動に多様なモードをもたらすことのできる存在であることが解明された。

方法および結果

これまで、神経細胞からグリア細胞に向かう信号伝達の経路は発見されており^{4,6)}、グリア細胞の機能としては、シナプス間隙から溢れ出た伝達物質を^{7,8)}、トランスポーターを使って回収することなどは指摘されていた⁹⁾。しかし、主要なグリア細胞のひとつであるアストロサイトの膜抵抗は、非常に低いため、細胞体に刺した電極から、細胞全体の膜電位をコントロールすることは適わず、アストロサイトだけを電極で刺激することは困難であった。また、アストロサイトには、膜電位依存性のチャネルの発現もほとんど認められていないため、膜電位情報がアストロサイトに活用されているのかどうかは疑問であった。

そこで、細胞を興奮させる作用を持つ光感受性分子 channelrhodopsin-2 (ChR2) をアストロサイト特異的に発現させた遺伝子改変マウスを作製した¹⁾。この分子は、細胞の隅々まで発現するので、脳組織標本に光をあてれば、アストロサイトだけを刺激することができる。このように、光感受性分子を使った細胞機能操作のことは、光遺伝学（オプトジェネティクス）と呼ぶが、この手法をグリア細胞研究に使った例は、未だ少なく、本研究は世界に先駆けたものと言える。

小脳の急性スライス標本作製し、光を用いてアストロサイトを刺激したところ、アストロサイトから興奮性の伝達物質であるグルタミン酸が放出され、小脳の唯一の出力神経細胞であるプルキニエ細胞に、興奮性の膜電流が誘起され

た(図1)³⁾。また、小脳の平行線維とプルキニエ細胞間のシナプス伝達を調べたところ、たった一度のアstrocytからのグルタミン酸放出によって、シナプス伝達が長期的に抑圧されることが明らかになった。小脳のこのシナプスにおける可塑性は、運動学習に関わることが知られている。そこで、生きているマウスの小脳に光ファイバーを差し込み、小脳依存性の眼球運動学習課題を行っている最中に、小脳のアstrocytを光刺激した。すると、マウスは、眼前のスクリーンの動きをより良く追従できるようになった(図1)³⁾。つまり、Astrocytの活動が学習や記憶といった脳の高次機能に関わることが示唆されたわけである。

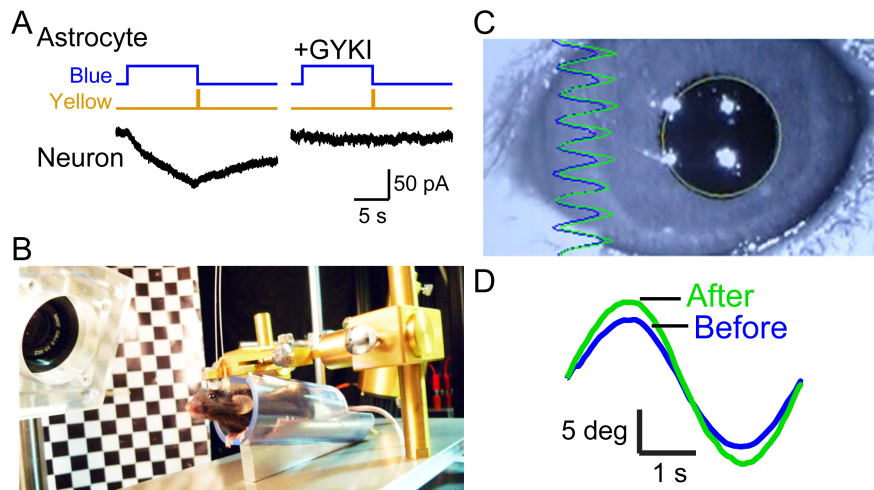


図1. Astrocytからのグルタミン酸放出とその作用。

A) グリア細胞のうち、Astrocytに選択的にChR2を発現させた遺伝子改変マウスを使用。小脳急性スライス標本を用いて、小脳の実出力神経細胞であるプルキニエ細胞から記録。Astrocytを光刺激すると、神経細胞から興奮性内向き電流が記録され、AMPA型グルタミン酸受容体の阻害剤(GYKI)を投与すると、応答が消失したことから、Astrocytからグルタミン酸が放出されることが分かった。発現させたのは、改変型ChR2であり、青色光で活性化され、黄色光で活性化が止まることが知られているタイプである。B) AstrocytにChR2を発現するマウスの小脳に光ファイバーを刺入。眼前のスクリーンの動きに対する眼の動きを赤外線カメラで記録。C) 左右に振れるスクリーンの動きを追従する眼の動き。D) 小脳Astrocytを刺激する前に比べて、刺激後のほうが、眼球運動の振幅が増大し、スクリーンをより良く追従するようになった。図は、文献3)より、改変。

Astrocytがグルタミン酸を放出できることは分かったが、引き続き、どのようなメカニズムで放出が生じるのかを調べることにした。神経細胞の場合は、刺激を受けて、細胞が脱分極すると、膜電位依存性のカルシウムチャンネルが開き、細胞内部にカルシウムが流入する。細胞内カルシウム濃度が十分に上がると、細胞内に保持しているグルタミン酸の詰まった小胞が、細胞膜に融合して、細胞外へとグルタミン酸が放出される。ところが、Astrocytには、シナプス小胞のような細胞内小器官が希薄で、膜電位依存性カルシウムチャンネルの存在も疑問視されている。そこで、陰イオンチャンネルの阻害剤を投与したところ、Astrocytからのグルタミン酸放出が完全に阻害された。グルタミン酸は陰イオンであり、細胞内にはある程度の濃度のグルタミン酸が蓄えられている。グルタミン酸を通すような陰イオンチャンネルの存在は知られており、今回、Astrocytでは、陰イオンチャンネルを介して、細胞内から細胞外へとグルタミン酸が放出されることが明らかになった。

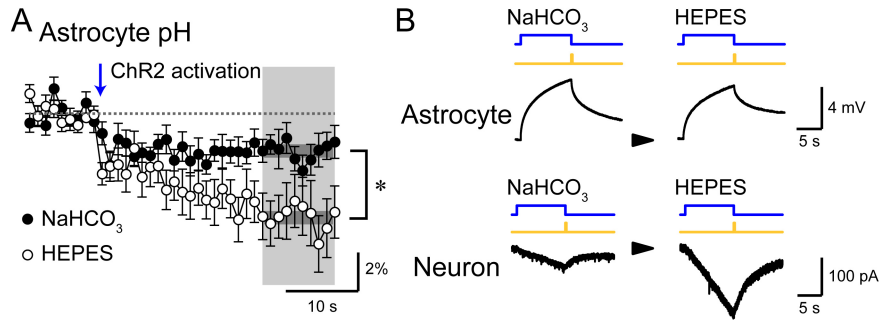


図2. 放出のメカニズム.

A) 小脳アストロサイトのバグマングリア細胞内 pH を蛍光イメージングした. ChR2 光刺激にともない, 細胞内に水素イオンが流入して, 細胞内が酸性化した. 細胞外液の pH 緩衝剤を NaHCO₃ から HEPES に置換すると, 細胞内 HCO₃⁻ イオンが流出して, 細胞内 pH 緩衝能力が下がることが知られている. 同じ光刺激に対して, 細胞内はより酸性化することが明らかになった (error bar, SEM; t-test; *p < 0.05). B) 上段, アストロサイトの膜電位記録. 下段, 神経細胞 (プルキニエ細胞) からの膜電流記録. アストロサイトの ChR2 を光刺激すると, アストロサイトは脱分極するが, 細胞内 pH 緩衝能力を下げる操作をしても, 脱分極の程度は変わらなかった. 一方, 神経細胞から記録される興奮性内向き電流は増大した. アストロサイトからのグルタミン酸放出は, 細胞内 pH に依存することを示唆する. 図は, 文献 2) より改変.

それでは, なぜ, アストロサイトに発現させた光感受性の ChR2 を光刺激すると, アストロサイトからグルタミン酸が放出されるのか. 実験を重ねた結果, ChR2 は光に応じて陽イオンを通すチャネルであるが, 陽イオンの中でも, 水素イオンを良く通すことが明らかになった. そこで, 細胞内の pH をイメージングしたところ, アストロサイトの ChR2 を光刺激すると, 細胞内が酸性化することが明らかになった. 細胞内外の pH は, ほぼ同じであると考えられるが, 細胞内は負の電位に過分極しているため, 陽イオンチャネルが開けば, 水素イオンは, 細胞外から細胞内へと流れ込み, 細胞内は酸性化するという仕組みであった (図 2). 引き続き, 細胞内の pH 緩衝能力を人為的に引き下げる操作を行ったところ, アストロサイトの ChR2 光刺激にともない, 細胞内がより酸性化した. そこで, アストロサイトから放出されるグルタミン酸を, プルキニエ細胞の反応を使って測定したところ, 細胞内がより酸性化する条件で, より多くのグルタミン酸が放出されることが分かった (図 2) 2). すなわち, アストロサイトからのグルタミン酸放出は, カルシウムイオン濃度¹⁰⁾ではなく, 水素イオン濃度 (pH) に依存することが示されたわけである. 同じグルタミン酸を放出するのに, 神経細胞とは全く異なるメカニズムが働いていることが, 明らかになった. 神経細胞からグルタミン酸が放出される基本メカニズムが提唱されてから, 50 年経つが, 今ここで, グリア細胞からの放出メカニズムが, 新しく発見されたわけである.

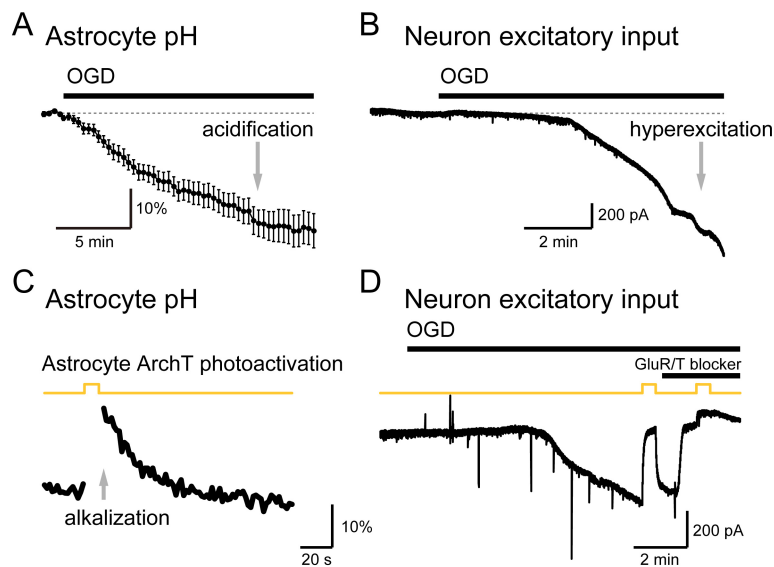


図3. 脳虚血時におけるアストロサイトの作用.

A) 小脳急性スライス標本を用いて、脳虚血を模擬 (OGD) すると、アストロサイトの細胞内が急速に酸性化した。B) 虚血模擬にともない、プルキニエ細胞からは、大きな内向き電流が記録され、過剰な興奮による細胞死への前兆が認められた。C) アストロサイト特異的に、光で駆動する水素イオンポンプ (ArchT) を発現させた。黄色光刺激にともない、細胞内がアルカリ化されることが明らかになった。D) 虚血模擬にともない、プルキニエ細胞では大きな興奮性内向き電流が生じたが、アストロサイトの ArchT を光刺激して、アストロサイトの細胞内をアルカリ化すると、興奮性内向き電流が大幅に抑制された。グルタミン酸受容体の阻害剤を投与しても、内向き電流が阻害されることから、ArchT 光刺激によって、アストロサイトからのグルタミン酸放出が抑制されたことが示唆された。図は、文献2) より改変。

ところで、脳梗塞などの脳虚血時には、脳組織は極端な酸性化 (アシドーシス) に陥る。また、脳虚血時に大量のグルタミン酸が放出され、興奮性神経毒性により脳細胞死が起きることは、従来から知られていた。しかし、このグルタミン酸がどこから放出されるのか、また、どんな仕組みで放出されるのか、不明のままであった。本研究は、この疑問にも答え、脳内の酸性化がアストロサイト内で特に速く進行すること、そして、その酸性化そのものがアストロサイトのグルタミン酸放出を促していることを示した (図3)。さらに、マウスのアストロサイトに、光に反応して細胞内をアルカリ化する archaerhodopsin-T (ArchT) という物質を発現させ、脳虚血が起こっている最中に光を用いてグリア細胞をアルカリ化したところ、グルタミン酸放出が抑制され、脳組織の破壊を食い止めることができた (図3)²⁾。

考 察

現在、虚血研究を通して見出されたグリアの作用が、他の病態時にも機能するのではないかと考え、てんかん病態の解明にも研究を進展させている。てんかんとは、局所で始まった神経の過興奮が脳全体に伝播して、激しい発作が現れる病態である。しかし、神経細胞を伝わる信号は、通常はミリ秒単位で変化するものであり、十数分以上にわたって過興奮が維持される機構は、神経細胞そのものではなく、グリア細胞が関与しているのではないかと考えられる。また、これまで動物に人為的にてんかん発作を繰り返させると、キンドリングという現象が生じて、過興奮を局所に留めることができない、てんかん脳が作り出されることが知られている。一方、光遺伝学を駆使して、刺激方法に工夫を施したところ、同じ刺激に対して、てんかん発作の生じにくい動物を作り出すことにも成功した。キンドリングとは異なる、脳回路の可塑性な変化が起きたことを意味する。キンドリングにせよ、抗てんかん回路の形成にせよ、同じ入力に対して、出力が異なるモードがあり、このモードを切替えているのは、グリア細胞であることが示唆された。考察で述べたこれらの研究の発展については、現在、論文を作成しており、近日中に投稿する予定である。

文 献

- 1) Tanaka, K. F., Matsui, K., Sasaki, T., Sano, H., Sugio, S., Fan, K., Hen, R., Nakai, J., Yanagawa, Y., Hasuwa, H., Okabe, M., Deisseroth, K., Ikenaka, K. & Yamanaka, A. : Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. *Cell Reports*, **2** : 397-406, 2012.
- 2) Beppu, K., Sasaki, T., Tanaka, K. F., Yamanaka, A., Fukazawa, Y., Shigemoto, R. & Matsui, K. : Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron*, **81** : 314-320, 2014.
- 3) Sasaki, T., Beppu, K., Tanaka, K. F., Fukazawa, Y., Shigemoto, R. & Matsui, K. : Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109** : 20720-20725, 2012.
- 4) Matsui, K., Jahr, C. E. & Rubio, M. E. : High concentration rapid transients of glutamate mediate neural-glial communication via ectopic release. *J. Neurosci.*, **25** : 7538-7547, 2005.
- 5) Matsui, K. & Jahr, C. E. : Differential control of synaptic and ectopic vesicular release of glutamate. *J. Neurosci.*, **24** : 8932-8939, 2004.
- 6) Matsui, K. & Jahr, C. E. : Ectopic release of synaptic vesicles. *Neuron*, **40** : 1173-1183, 2003.
- 7) Budisantoso, T., Matsui, K., Kamasawa, N., Fukazawa, Y. & Shigemoto, R. : Mechanisms underlying signal filtering at a multi-synapse contact. *J. Neurosci.*, **32** : 2357-2376, 2012.
- 8) Matsui, K., Hosoi, N. & Tachibana, M. : Excitatory synaptic transmission in the inner retina: paired recordings of bipolar cells and neurons of the ganglion cell layer. *J. Neurosci.*, **18** : 4500-4510, 1998.
- 9) Matsui, K., Hosoi, N. & Tachibana, M. : Active role of glutamate uptake in the synaptic transmission from retinal nonspiking neurons. *J. Neurosci.*, **19** : 6755-6766, 1999.
- 10) Kanemaru, K., Sekiya, H., Xu, M., Satoh, K., Kitajima, N., Yoshida, K., Okubo, Y., Sasaki, T., Moritoh, S., Hasuwa, H., Mimura, M., Horikawa, K., Matsui, K., Nagai, T., Iino, M. & Tanaka, K. F. : *In vivo* visualization of subtle, transient, and local activity of astrocytes using an ultrasensitive Ca²⁺ indicator. *Cell Reports*, **8** : 311-318, 2014.