

133. グリアネットワーク変調が来たす疼痛形成機序の解明

繁富 英治

Key words: アストロサイト, カルシウム,
神経障害性疼痛, GECI, *in vivo* イメージング

山梨大学 医学部 薬理学講座

緒言

グリア細胞の1種のアストロサイトは、単なる神経細胞の支持細胞ではなく、シグナル伝達物質の放出・取込を介して神経細胞機能を直接的に制御する。アストロサイトはアストロサイト同士でネットワークを形成し、そのアストロサイトネットワークを介して神経細胞機能を調節すると考えられている。様々な中枢神経系疾患において、アストロサイトネットワーク変調が起こり、これらが病態形成の一因とも指摘されている。しかしながら、アストロサイトネットワークの変調が中枢神経系疾患の発症にどの程度寄与するのか不明なままである。これは、中枢神経系疾患の発症時に、アストロサイトが、どのタイミングで、どのように変化して、どのような影響をニューロンに与えるのかといった細胞メカニズム及びその時空間特性が不明な点であることが一因となっている。この問題を克服するためには、覚醒下における慢性的 *in vivo* カルシウムイメージング法が必須となる¹⁾。慢性的にイメージングを行うためには、定常時における蛍光強度の安定したカルシウム蛍光測定法が必要となり、genetically encoded calcium indicator (GECI) は有用なツールの1つである。

アストロサイトの活動が慢性疼痛の形成及び維持において重要な役割を果たしている可能性が指摘されている一次体性感覚野後肢領域²⁾に着目し、慢性疼痛により惹起されるアストロサイトのカルシウム応答及び形態学的変化を、GECIの1つである GCaMP3 を用いて「覚醒下」でかつ「経日的」に単一細胞レベル及びネットワークレベルで解析した。

方法および結果

アストロサイト特異的 GCaMP3 発現マウスは、Glast-CreERT2 マウスと Rosa26-CAG-floxed-GCaMP3 (Ai38, JAX)³⁾ を交配させ、得られたマウスにタモキシフェンを投与することにより得た (Glast-CreERT2::Flx-GCaMP3 マウス)。細胞特異的なマーカーを用いた免疫組織化学法を用いて、アストロサイトにおける GCaMP3 発現を確認した (図無し)。アストロサイトにカルシウム結合タンパク質である GCaMP3 を発現誘導させることがマウスの機械刺激応答に影響しないか検討するために、von Frey test を行った。Glast-CreERT2::Flx-GCaMP3 マウスは、その遺伝的背景となっている C57Bl6/J マウスと比較して機械刺激に対する有意な応答性の違いを認めなかった (図 1A)。タモキシフェンによって GCaMP3 を発現誘導すると、機械刺激に対する応答性が増加する傾向にあったが、有意な差は認めなかった。プランターテストを行い、熱刺激に対する応答性を検討したところ、C57Bl6/J マウスと Glast-CreERT2::Flx-GCaMP3 マウスとの間において有意な差は認めなかった (図 1B)。以上により、アストロサイト特異的 GCaMP3 発現マウスは、機械的及び熱刺激に対する応答性に異常は認められず、神経障害性疼痛モデルによる慢性疼痛形成機序を解析するツールとなると考えられた。

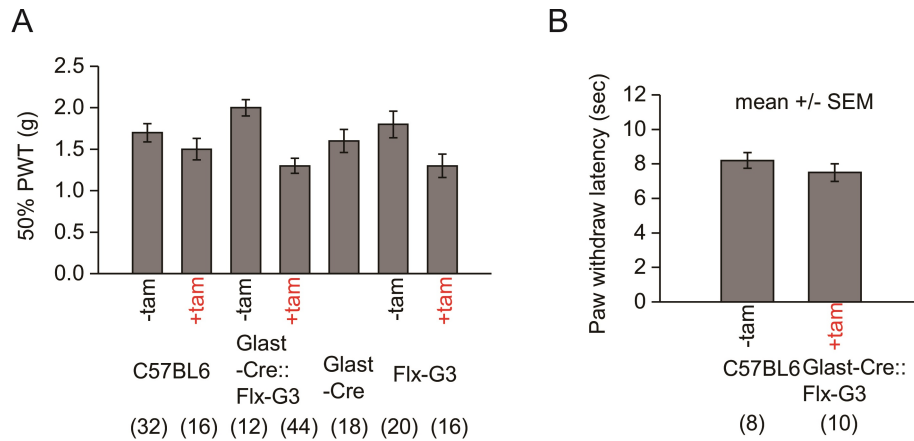


図1. アstrocyte特異的 GCaMP3 発現マウスの機械的及び熱刺激応答性.

A) 種々の遺伝子改変動物に対して von Frey test を行ったときの 50%足引き込み閾値. 全ての群間で有意な差は認められなかった. B) プランターテストの結果. 縦軸は熱刺激に対して回避行動を示すまでの時間.

神経障害性疼痛の形成がastrocyteのカルシウム応答に及ぼす影響を解析するために、一次体性感覚野後肢領域 (SIHL) に開頭手術し観察窓を作製した. 3週間の回復期間後にマウスを実験環境に馴化させるため、2光子励起レーザー顕微鏡を用いた *in vivo* カルシウムイメージングを行い、SIHL の2/3層のastrocyteのカルシウム活動を経日的に観察した. 観察初日においては、複数の細胞間で同期する広範なカルシウム応答が観察された (図 2B). 広範なカルシウム応答は、比較的大きな応答が視野のほぼ全域にわたって起こるものであった. これらのカルシウム応答は多くの細胞間で同期しており、カルシウム応答の相関性は、空間的に近いものほど強い傾向にあった (図 2C, D). この広範なカルシウム応答は、観察開始直後数日間は顕著に観察され、次第に減弱した. およそ1週間の馴化後には、広範なカルシウム応答は殆ど観察されなかった (図 4). おそらく、この広範なカルシウム応答は覚醒したマウスが顕微鏡下に頭部を固定されたことに対して示した驚愕反応により惹起されたものと考えられ⁴⁶⁾、マウスの馴化によって驚愕反応が消失した結果、広範なカルシウム応答も消失したと考えられた.

カルシウム応答はastrocyte突起においても顕著に観察された (図 3).

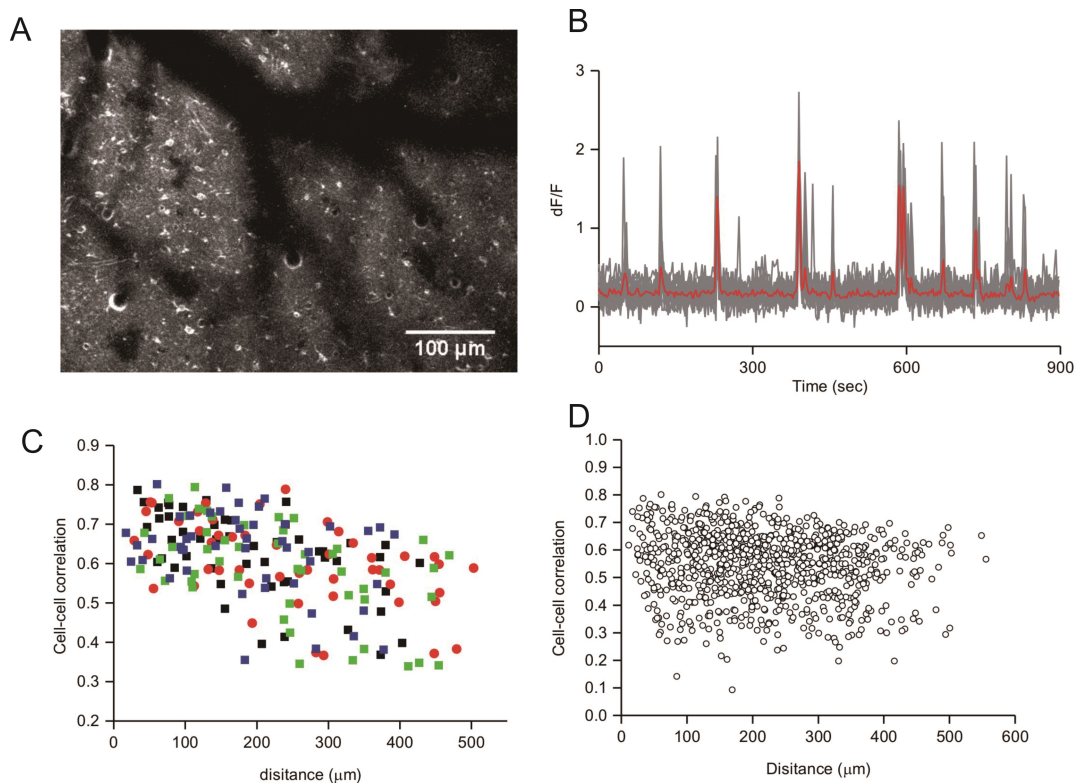


図2. *In vivo* 覚醒下マウスにおける一次体性感覚野後肢領域アストロサイトの自発カルシウム応答（無処置マウス）.
 A) 2光子励起レーザー顕微鏡を用いて撮像したGCaMP3発現アストロサイトの蛍光画像. B) 蛍光変化の時間経過. 多くの細胞で大きなカルシウムシグナルがほぼ同時に起きた. 灰色線は個々の細胞を示し, 赤線は平均波形を示す. C) 任意の2つの細胞間におけるカルシウムダイナミクスの相関とその細胞間距離の関係性. 異なる色は, 異なる細胞のカルシウム応答を基準としたときの相関を表す. D) 同一視野内全ての細胞において, 任意の2つの細胞間におけるカルシウムダイナミクスの相関とその細胞間距離との間の関係性. 細胞間距離が近いほど強い相関性を示す.

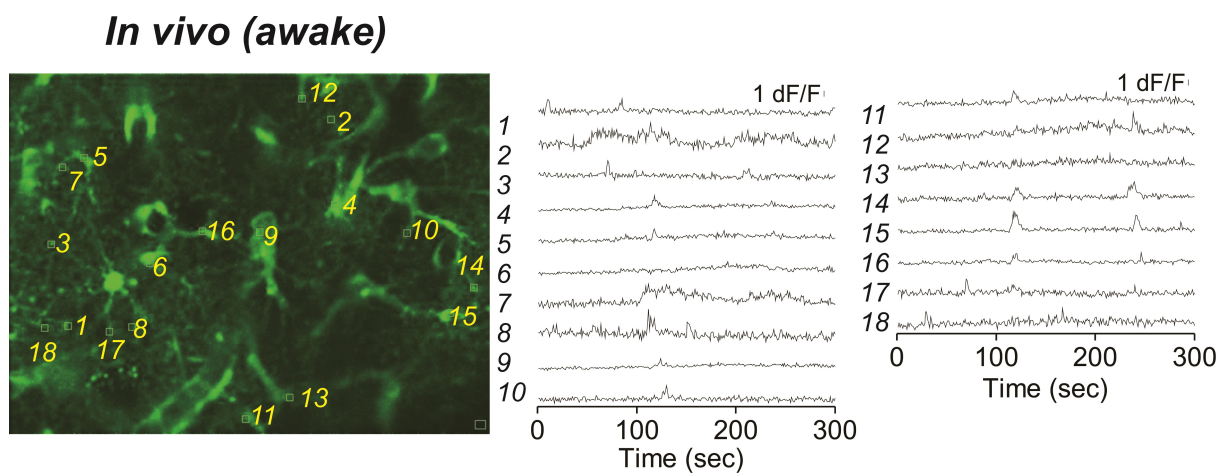


図3. *In vivo* 覚醒下マウスにおける一次体性感覚野アストロサイトの局所カルシウム応答（無処置マウス）.
 GCaMP3発現アストロサイトの蛍光画像及び蛍光変化の時間経過.

馴化したマウスの坐骨神経を1/3 - 1/2程度縫合糸にて結紮し神経障害性疼痛モデル (Seltzer モデル) を作製した。その後、再びアストロサイトのカルシウム活動を経日的に観察した。坐骨神経結紮 (PSNL) 1日後には、カルシウム応答が一部の細胞で増加した。またアストロサイト突起における局所カルシウム応答も一過性に増加した(図無し)。しかし、1.5日後においては、細胞体におけるカルシウム応答は顕著な変化は示さなかった。慢性疼痛形成期から慢性疼痛維持期の移行期にあたる3.5日においては細胞体におけるカルシウム応答が多く観察された(図4)。しかしこのカルシウム応答は7.5日においては殆ど観察されなかった。アストロサイトの形態に顕著な変化はどの時点においても観察されなかった。

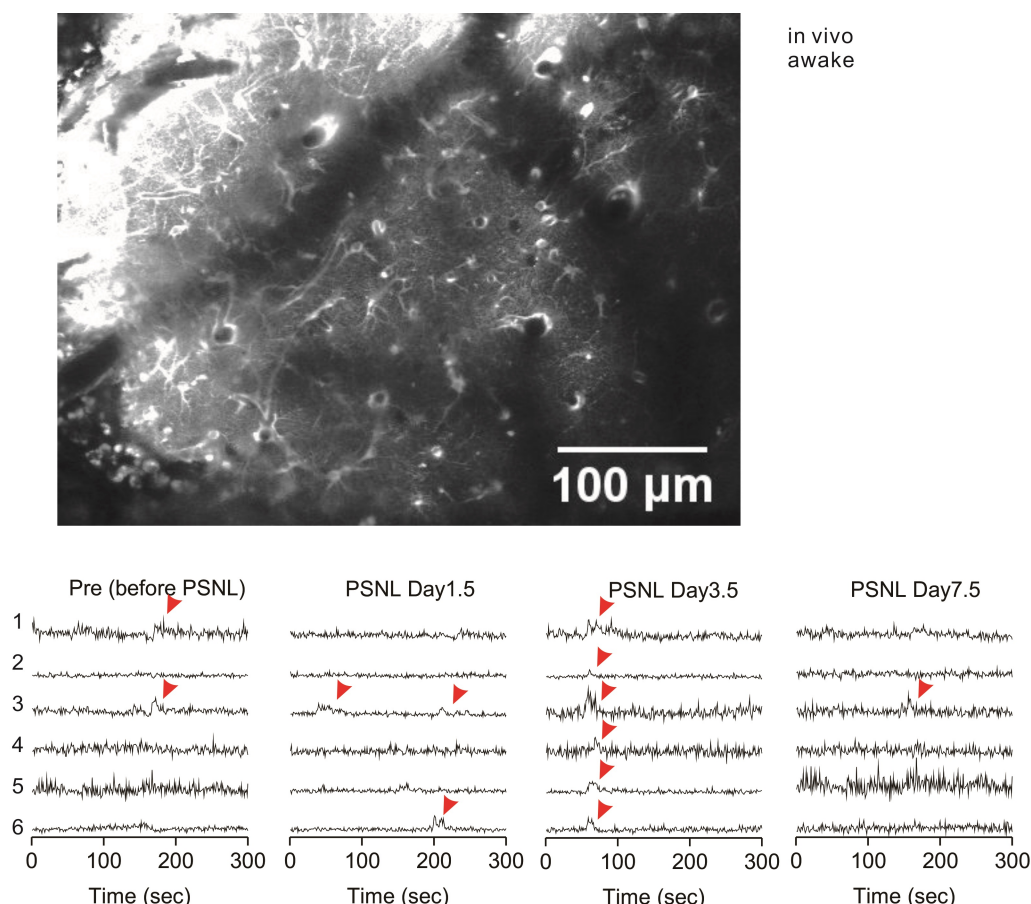


図4. *In vivo* 覚醒下マウスにおける一次体性感覚野アストロサイトの神経障害性疼痛前後における自発カルシウム応答。

GCaMP3 発現アストロサイトの蛍光画像 (上段) とカルシウム応答の時間経過 (下段)。坐骨神経結紮 3.5 日後において多くの細胞でカルシウム応答が観察された。矢頭はカルシウム応答を示す。

慢性疼痛形成期において増加したカルシウム応答の発生メカニズムを明らかにするために、脳スライス切片を用いた *in situ* カルシウムイメージングを行った。PSNL から 3 - 4 日後に、厚さ 300 μ m の急性脳スライス切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡により 1 層から 2/3 層アストロサイトのカルシウム応答を観察した。その結果、予想通り細胞体レベルにおけるカルシウム応答が、無処置群と比較して有意に増加していた ($P < 0.05$, ANOVA)。増加したカルシウム応答は cyclopiazonic acid (CPA: 20 μ M) により有意に減弱した ($P < 0.05$, ANOVA)。これらの結果から、カルシウム応答の多くは細胞内カルシウムストアからのカルシウム遊離を介していたと解釈された。PSNL において一部のカルシウム応答は CPA 存在下においても残存した。

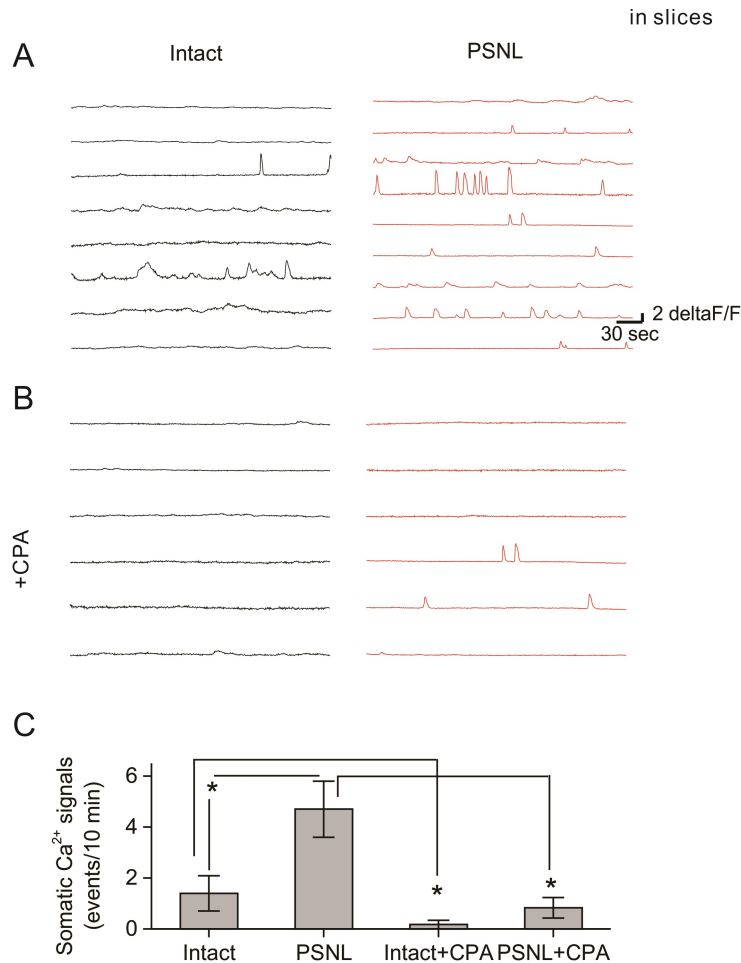


Fig. 5. 神経障害性疼痛モデルマウスにおける一次体性感覚野アストロサイトの自発カルシウム応答－急性スライス標本による解析－。

A) 一次体性感覚野後肢領域アストロサイトの細胞体におけるカルシウム応答. 右が神経障害性疼痛モデル群 (PSNL) で, 左が無処置群. B) CPA 存在下におけるアストロサイト細胞体のカルシウム応答. C) カルシウム応答の頻度のまとめ. 平均値 ± 標準誤差. *P < 0.05.

考 察

本研究結果より, *Glast-CreERT2::Flx-GCaMP3* マウスは, 疼痛形成機序におけるアストロサイトのカルシウム応答を解析する上で重要なツールとなり得ることが示された. 一次体性感覚野におけるアストロサイトのカルシウム応答は慢性疼痛形成期において一時的に増加する可能性が示された. アストロサイトの細胞体におけるカルシウム応答は神経障害直後から一過性に増加した. 特に疼痛形成期から疼痛維持期に移行する障害後 3.5 日に比較的大きな増加が見られた. 一方, アストロサイト突起におけるカルシウム応答は, 神経障害直後 (1 日後) に一過性に起こる可能性が示された. 薬理的な実験から, 細胞内カルシウムストアからのカルシウム遊離機構の亢進が, 細胞体におけるアストロサイトのカルシウム応答の一過的な増加の原因となる可能性が示された.

最近の IP₃ 受容体 2 型欠損マウス (IP₃R2KO) を用いた研究で, アストロサイトのカルシウムシグナルの発生機序は, 細胞体と突起部で異なり, 細胞体においては IP₃ 受容体 2 型を介しているが, 突起部では IP₃ 受容体 2 型非依存のカルシウム応答も多く存在することが示された⁹. 本研究におけるアストロサイト細胞体で起こるカルシウム応答は, 細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出に由来していたことは, 上述の IP₃R2KO の報告と矛盾しない. しかし, 細

胞内カルシウムストア枯渇させても、細胞体において大きなカルシウム応答が一部残存した (図 4B)。これは、IP₃ 受容体 2 型を介さない別のカルシウム応答の発生機序が存在することを示唆している。

本研究により、神経障害性疼痛モデルの疼痛形成期におけるアストロサイトの活動を慢性的に追跡する方法を確立した。今後、一過性に増加する細胞体及び突起カルシウム応答が発生する機序を詳細に解析し、これらのカルシウム応答が神経活動に及ぼす影響を明らかにする予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、山梨大学大学院・総合研究部の小泉修一である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Thrane, A. S., Rangroo Thrane, V., Zeppenfeld, D., Lou, N., Xu, Q., Nagelhus, E. A. & Nedergaard, M. : General anesthesia selectively disrupts astrocyte calcium signaling in the awake mouse cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109** : 18974-18979, 2012.
- 2) Kim, S. K., Kato, G., Ishikawa, T. & Nabekura, J. : Phase-specific plasticity of synaptic structures in the somatosensory cortex of living mice during neuropathic pain. *Molecular pain*, **7** : 87, 2011.
- 3) Zariwala, H. A., Borghuis, B. G., Hoogland, T. M., Madisen, L., Tian, L., De Zeeuw, C. I., Zeng, H., Looger, L. L., Svoboda, K. & Chen, T. W. : A Cre-dependent GCaMP3 reporter mouse for neuronal imaging *in vivo*. *J. Neurosci.*, **32** : 3131-3141, 2012.
- 4) Ding, F., O'Donnell, J., Thrane, A. S., Zeppenfeld, D., Kang, H., Xie, L., Wang, F. & Nedergaard, M. : alpha1-Adrenergic receptors mediate coordinated Ca²⁺ signaling of cortical astrocytes in awake, behaving mice. *Cell Calcium*, **54** : 387-394, 2013.
- 5) Paukert, M., Agarwal, A., Cha, J., Doze, V. A., Kang, J. U. & Bergles, D. E. : Norepinephrine controls astroglial responsiveness to local circuit activity. *Neuron*, **82** : 1263-1270, 2014.
- 6) Srinivasan, R., Huang, B. S., Venugopal, S., Johnston, A. D., Chai, H., Zeng, H., Golshani, P. & Khakh, B. S. : Ca²⁺ signaling in astrocytes from Ip3r2^{-/-} mice in brain slices and during startle responses *in vivo*. *Nat. Neurosci.*, **18** : 708-717, 2015.