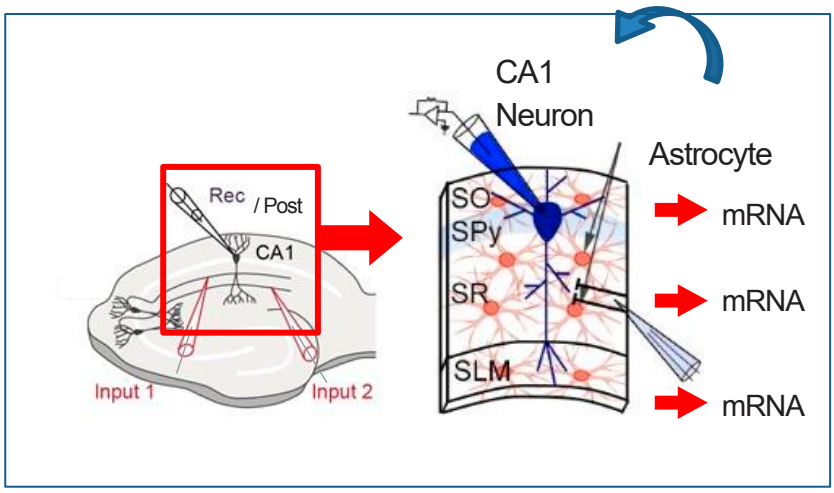
32　アストロサイトによる双方向性シナプス制御機構の解明	合田　裕紀子

【目的】脳ではグリア細胞の一種であるアストロサイトが神経細胞間のシナプス伝達制御に関わる。アストロサイトの細胞体からは多くの突起が伸びて、その細かく分岐した末端が個々のシナプスと密に接触することで、アストロサイトが局所的にシナプスを制御すると考えられる。ただし、アストロサイトはギャップ結合により 100 個ほどから成る合胞体を形成しており、かつアストロサイトは多様で、その形状や遺伝子発現パターンなどが脳部位で異なることが報告されている。アストロサイト多様性と脳部位や経路特異性との相関関係、およびそれらによる神経回路制御の仕組み、またアストロサイトがいつどのようにして統合的なシナプス制御へ動作するのか、あるいは個々のシナプスを局所的に制御するのか、などは未解明である。記憶と学習に重要な役割を持つ海馬神経回路においても、アストロサイトがシナプス制御に関与する。本研究では 3 層からなる CA1 部位に着目し、それぞれの層に特異的な入力をターゲットとした、アストロサイトによるシナプス制御の分子・細胞メカニズムを解析した。

【方法】8〜16 週齢の Bl/6J コントロールマウス、あるいは海馬 CA1 部位アストロサイトに発現する NMDA 受容体 GluN1 サブユニットをノックダウンしたマウス脳から海馬急性切片を作製し、電気生理学の手法で CA1pyramidal ニューロンよりシナプス応答を記録した。海馬 CA1 ニューロンおよび *stratum oriens*（SO）、*stratum radiatum*（SR）、*stratum lacunosum moleculare*（SLM）に局在するアストロサイトをパッチクランプして RNA を採取して、NMDA 受容体サブタイプの qRT-PCR 解析を行い、さらにはシングルセル RNA 解析（patch-RNAseq）のパイロット実験を実施した。

【結果】海馬 CA1 ニューロンへ入力するシナプス前終末強度分布のアストロサイトによる制御へは GluN2C サブユニットからなる NMDA 受容体が関与することを突き止めた。ニューロンでは GluN2A、GluN2B サブユニットが多く発現しているのに対してアストロサイトでは GluN2C の発現量が高いことを確認した。また、アストロサイト NMDA 受容体によるシナプス前終末強度制御は SR への入力に特異的であった。興味深いことに、GluN2C 自体は SO、SR、SLM 3 層に渡って局在しているものの、NMDA 受容体機能に必須な GluN1 サブユニットに依存的なアストロサイトシグナリングは SR のアストロサイトでは顕著に見られるが SO、SLM のアストロサイトでは見られなかった。これらの結果は海馬 CA1 部位のアストロサイトは各層で異なることを示唆しており、シングルセル RNA 解析も 3 層のアストロサイトは種類が異なることを裏付けた。

海馬 CA1 部位 3 層にわたるアストロサイトによる CA1 ニューロンのシナプス強度制御の解析



32. アストロサイトによる双方向性シナプス制御機構の解明

合田　裕紀子

理化学研究所 脳神経科学研究センター シナプス可塑性・回路制御研究チーム

Key words：シナプス強度，アストロサイト，海馬 CA1 ニューロン，NMDA 受容体，GluN2C

緒　言

脳には神経細胞よりさらに多数のグリア細胞が存在する。グリア細胞は神経細胞への栄養の補給、細胞外マトリックスのイオンバランスの調整など、主に脳内環境維持の役割を担っているとされてきた。しかし近年では、グリア細胞の一種であるアストロサイトがあらゆる脳部位において主導的に情報伝達を制御することが示唆されている［1〜3］。その大まかな原理としては神経細胞の活動に応じてアストロサイト内から伝達物質が放出され、シナプス強度を制御していると考えられる［4］。興味深いことに、アストロサイトはシナプスへ密に接触して［5］、場合によってはアストロサイトの突起がシナプス間隙へ侵入することも見出されている［6］。そのような密接なシナプスとの接触が、アストロサイトによる局所的なシナプス制御を可能にすると想定される。その反面、ギャップ結合によりアストロサイトは 100 個ほどから成る合胞体を形成している。個々のアストロサイトは数千から数万のシナプスと接触するため、アストロサイトの合胞体はシナプスの統合的な制御へも適している。さらにはアストロサイトも多様で、幾つかの脳領域でアストロサイトの形状や遺伝子発現パターンなどが異なることが報告されている［7］。しかしながらアストロサイト多様性と合胞体構成の関係とその脳部位・経路特異性との相関関係、およびそれらによる神経回路制御の仕組み、またアストロサイトがいつどのようにして統合的なシナプス制御を作動するのか、あるいは個々のシナプスを局所的に制御するのか、などは未解明である。

記憶と学習に重要な役割を持つ海馬神経回路においても、アストロサイトがシナプス強度制御に関与する。海馬の主な情報経路は dentate gyrus、CA3、CA1 の部位にある興奮性ニューロンのリレーから成る。我々はこれまでの研究で、CA3 部位から CA1 ニューロンへ入力する基底状態のシナプス強度設定にアストロサイトが作用していることを新しく見出し、さらにはアストロサイト NMDA 受容体の重要な役割を発見した［8］。CA3 の他に CA1 ニューロンへは CA2 と嗅内野などからの入力がそれぞれ層を形成していて、CA1 ニューロン樹状突起では各入力のシナプス活動が統合され、互いに協奏的に記憶情報が処理される。本研究では、海馬アストロサイトの多様性について 3 層からなる CA1 部位に着目し、それぞれの層に特異的な入力をターゲットとした、アストロサイトによるシナプス制御の分子・細胞メカニズムを探究した。

方　法

1. アストロサイト NMDA 受容体による海馬 CA1 へ入力するシナプス前終末強度分布制御の電気生理学的解析

8〜16 週齢の Bl/6J 野生型マウス、あるいは *Grin1* fl/fl マウスを使い GFAP-Cre リコンビナーゼ組換えアデノウイルス（AAV）を注入することで CA1 部位のアストロサイト NMDA 受容体 GluN1 サブユニットを欠損したマウス脳から海馬急性切片を作製し、電気生理学の手法で CA1 ニューロンよりシナプス応答を記録した。組換え AAV は脳切片を用いた実験の 3 週間前に注入した。連続したシナプス刺激に対するシナプス応答比、paired-pulse ratio（PPR）はシナプス前終末強度と逆比例する。したがって、シナプス前終末強度の推定値として CA3 から入力する *stratum radiatum*（SR）、嗅内野から入力する *stratum lacunosum moleculare*（SLM）、CA3 および CA2 から入力する *stratum oriens*（SO）を 50 ms 間隔で刺激して CA1 ニューロンから PPR を測定した。アストロサイトの NMDA 受容体機能を調べるために

CA1 ニューロンのスパイン（シナプス後部）に局在する NMDA 受容体を前もって阻害した。use-dependent アンタゴニストである MK-801（1 mM）をパッチクランプ電極から CA1 ニューロンへ注入して 10〜15 分以上経過した後、シナプスを最低 45 回、0.1 Hz で刺激して NMDA 受容体によるシナプス応答のブロックを確認した。NMDA 受容体の薬理学的解析には AP5（50 μM）、MK-801（50 μM）、あるいは QNZ46（25 μM）を含む細胞外溶液を用いた。

2. アストロサイト NMDA 受容体サブタイプの発現の評価とシングルセル RNA 解析

8〜16 週齢の野生型マウス脳から海馬急性切片を作製して CA1 部位の錐体細胞および SR、SO、SLM に局在するアストロサイトをパッチクランプして RNA を採取した。NMDA 受容体のサブタイプの qRT-PCR 解析を行い、さらにはシングルセル RNA 解析（patch-RNAseq）を実施した。Patch-RNAseq 解析には各層ごとに 60 個のアストロサイトより採取した RNA を合わせた。cDNA は SMART-Seq v4（タカラバイオ）ユーザーマニュアルに従って作製した。Nextera XT DNA ライブラリー調製キット（イルミナ）は、イルミナシーケンシングに適した cDNA ライブラリーを作る際に使用した。シーケンシングは MiSeq または HiSeq にて実施した。GluN2C のアストロサイトへの局在を確認するために GluN2C-Cre マウス［9］を Td-Tomato レポーターマウスと交配して灌流固定した後、海馬切片で免疫染色実験を行った。

結果および考察

1. アストロサイト NMDA 受容体による海馬 CA1 へ入力するシナプス前終末強度分布制御の電気生理学的解析

海馬 CA3 ニューロンから CA1 ニューロンへ入力する SR 層のシナプスの PPR 分布をモニタリングした（図 1）。細胞外溶液を NMDA 受容体アンタゴニストの AP5 または MK801 を含有する溶液に切り替えると PPR 分布幅が狭くなり、想定したとおり、シナプス前終末強度のバラツキの減少を確認した。次に PPR 分布を制御する NMDA 受容体サブタイプを同定する目的で、GluN2B-NMDA 受容体サブユニットに依存的な阻害薬、Ro25-6981（10 μM）とコントロールの条件で記録した PPR 分布を比較したが有意差は認められなかった。しかしながら、GluN2C/D に依存的な阻害薬、QNZ46（25 μM）では AP5 と MK801 の場合と同様に PPR 分布幅が狭くなった。したがって、通常では GluN2C/D がシナプス前終末強度分布幅を増大していると考えられる。さらには NMDA 受容体活性に必須な GluN1 サブユニットをアストロサイトからノックダウンすると PPR 分布幅への AP5 および QNZ46 の影響がブロックされた。これらの結果によりアストロサイトに局在する GluN2C/D サブタイプを持つ NMDA 受容体がシナプス前終末強度調整に関与すると考察する。

2. アストロサイト NMDA 受容体サブタイプの発現の評価とシングルセル RNA 解析

次に GluN2C/D が海馬 CA1 アストロサイトで発現しているかどうかを調べるために、SO、SR、SLM 層のアストロサイトおよび CA1 ニューロンから RNA を採取して qRT-PCR の手法で NMDA 受容体サブタイプ mRNA の発現量を比較した（図 2A、B）。ニューロンでは GluN1、GluN2A、GluN2B mRNA（*Grin1*、*Grin2A*、*Grin2B* ）が多く、アストロサイト 3 層では GluN2C mRNA（*Grin2C* ）が多くみられた。GluN2D mRNA（*Grin2D* ）のプローブの効率はコントロール実験で確認できたものの、海馬 CA1 ニューロンとアストロサイト双方のサンプルでは *Grin2D* は検出されなかった。したがって海馬 CA1 アストロサイトでは GluN2C サブタイプの NMDA 受容体がシナプス前終末強度調整に関わることが示唆された。NMDA 受容体に必須な GluN1 mRNA の発現量はアストロサイトでは低かったが、電気生理学的には NMDA 受容体の活性がアストロサイトで確認されたため、アストロサイトから得られる mRNA 採取量はニューロンと比べて一般的に低いこと、またアストロサイト GluN1 mRNA の発現量が低いことが影響したと思われる。今後、アストロサイト GluN1 サブタイプの直接的な確認について最適な検出方法を検討していく。GluN2C についてはレポーターマウスを用いた実験を行い、タンパクレベルでアストロサイト特異的な局在を確認した（図 2C）。

アストロサイトにおける NMDA 受容体活性度を電気生理学的に調べた際、アストロサイト GluN1 ノックダウンに依存的な反応は SR アストロサイトでは確認できたが、SO、SLM のアストロサイトでは有意差が見られなかった。したがって、GluN2C は 3 層にわたって CA1 アストロサイトで発現されるものの、GluN2C によるシナプス前終末強度制御は SR 層のアストロサイトに限定的であると想定された。この仮説を検証するために、SO 層と SLM 層のシナプ

ス入力をそれぞれ刺激して、NMDA 受容体依存的な PPR 分布幅をモニタリングした。SR 層と異なり、SO 層と SLM 層では、AP5 または MK801 を含む細胞外溶液に切り替えても、PPR 分布幅に顕著な変化は見られなかった。さらには、SR、SO、SLM のアストロサイトから採取した mRNA を用いて RNA 解析を行ったところ、各層のアストロサイトに特徴的な RNA 発現パターンが確認され、アストロサイトタイプが各層で異なることを示唆する結果が得られた。

本研究ではアストロサイト GluN2C がシナプス制御に関わることを新たに見出した。また、アストロサイト NMDA 受容体によるシナプス前終末強度制御は SR 層で顕著におこり、海馬 CA1 部位 3 層のアストロサイトがそれぞれ異なる細胞タイプであることを示唆した。今後はアストロサイトによる層特異的なシナプス制御の分子メカニズムと海馬機能への関わりをさらに深く追究したい。

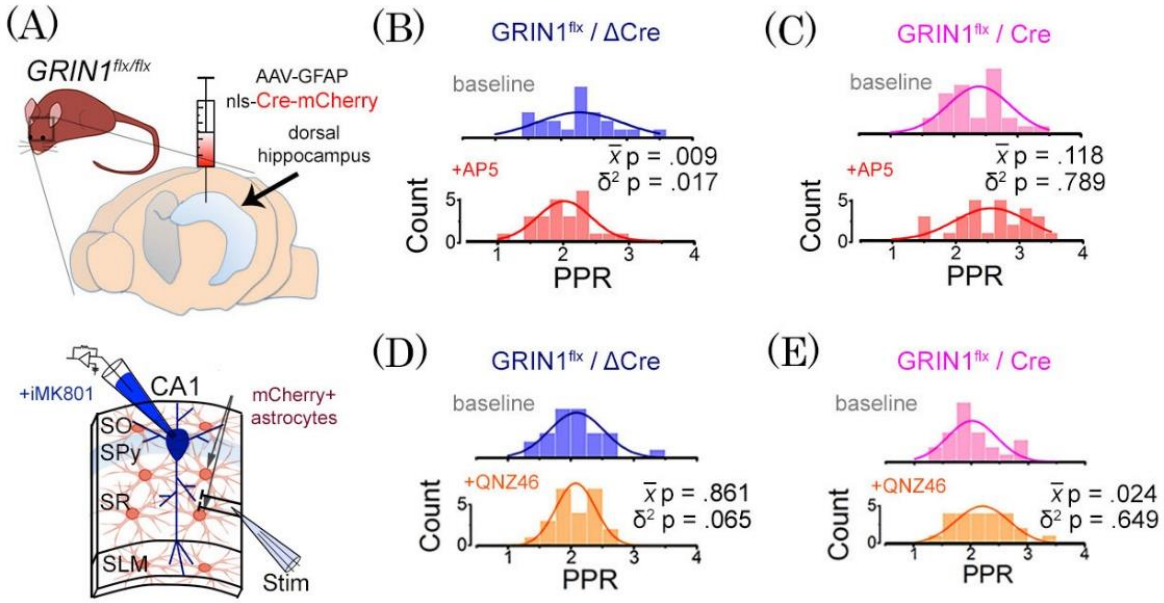


図1. アストロサイトGluN2C-NMDA受容体によるPPR分布の制御

A) 上、*Grin1*fl/fl マウスの海馬へ AAV-GFAP-nlsCre-mCherry（Cre）または Cre のシーケンスを除いた AAV-GFAP-nls-mCherry コントロール（ΔCre）の組換えアデノウイルスを注入した。下、海馬急性切片を作製し、MK801 で NMDA 受容体を阻害された CA1 ニューロンから SR を刺激してシナプス応答をモニタリングした。

B、C）ベースライン記録の後、AP5（50μM）を含有した細胞外溶液で記録を続けて、ベースラインと AP5 で得たそれぞれの PPR 分布の比較をコントロール（B）あるいは GluN1 をアストロサイトからノックダウンした切片（C）で示している。コントロール条件では AP5 は PPR 分布幅を小さくするが、アストロサイトから NMDA 受容体が欠損した状態ではベースラインでも PPR 分布幅は狭く、AP5 の効果は見られない。

D、E）B、C と同じ条件で QNZ46（25μM）の細胞外溶液をパーフューズした。AP5 と同様な結果が見られた。

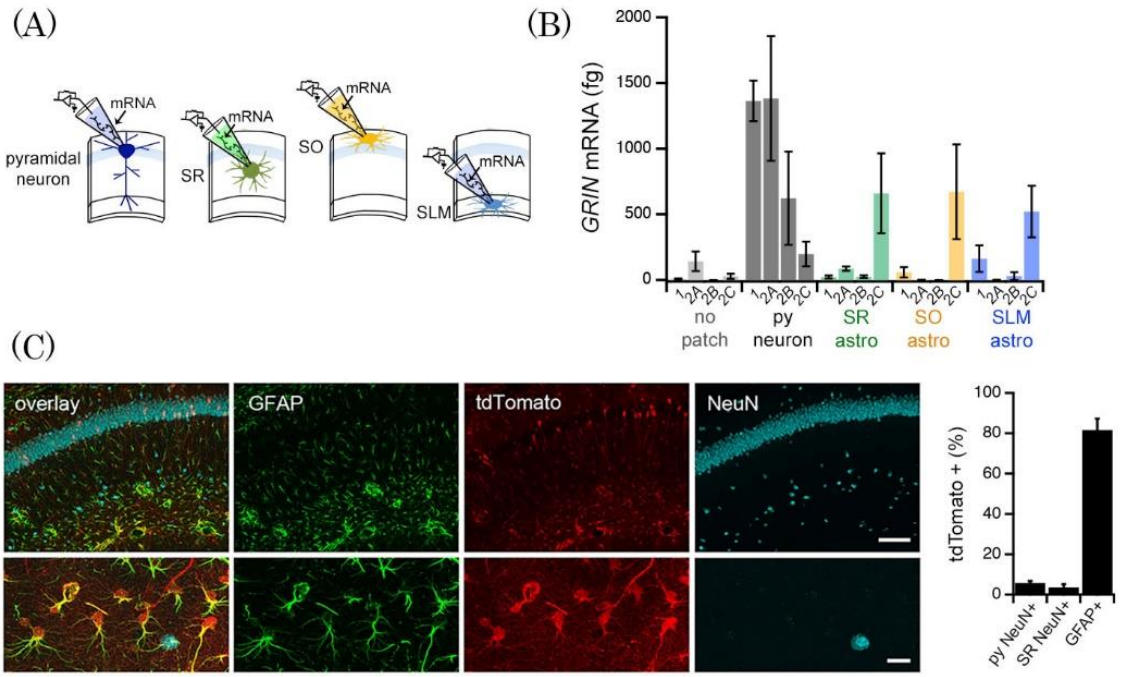


図2. アストロサイトNMDA受容体サブタイプ発現の解析

A) 海馬 CA1 錐体ニューロンおよびSR、SO、SLM 層のアストロサイトをパッチクランプしてそれぞれの細胞から RNA を採取した。

B) qRT-PCR で推定した *Grin1*、*Grin2A*、*Grin2B*、*Grin2C* の mRNA 量。「No patch」はパッチクランプの電極を切片へ突き刺しただけのコントロールサンプル。

C) GluN2C のアストロサイトへの局在を確認するために GluN2C-Cre マウスと Td-Tomato レポーターマウスを交配したマウスを使い、灌流固定した後、海馬切片をアストロサイトマーカーである GFAP(緑)、tdTomato (赤)、ニューロンの核マーカーである NeuN (青) と三重免疫染色した。(スケールバー : 上、160 μm ; 下、25 μm) 右 : tdTomato ラベルを持つ pyramidal 層のニューロン、SR 層のニューロン、アストロサイトの率。GluN2C は主にアストロサイトに発現する。

謝　辞

本研究は、理化学研究所脳神経科学研究センター シナプス可塑性・回路制御研究チームにて行われたものである。

文　献

1) Cui Y, Yang Y, Ni Z, Dong Y, Cai G, Foncelle A, Ma S, Sang K, Tang S, Li Y, Shen Y, Berry H, Wu S, Hu H. Astroglial Kir4.1 in the lateral habenula drives neuronal bursts in depression. Nature. 2018 Feb 14;554(7692):323-327. doi: 10.1038/nature25752. PMID: 29446379

2) Kim SK, Hayashi H, Ishikawa T, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Inada H, Roh SE, Kim SJ, Lee G, Bae H, Moorhouse AJ, Mikoshiba K, Fukazawa Y, Koizumi S, Nabekura J. Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain. J Clin Invest 2016 May 2;126(5):1983-97. doi: 10.1172/JCI82859. Epub 2016 Apr 11.PMID: 27064281

3) Martín R, Bajo-Grañeras R, Moratalla R, Perea G, Araque A. Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. Science. 2015 Aug 14;349(6249):730-4. doi: 10.1126/science.aaa7945. PMID: 26273054

4) Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A. Gliotransmitters travel in time and space. Neuron. 2014 Feb 19;81(4):728-39. doi: 10.1016/j.neuron.2014.02.007.PMID: 24559669

5) Nishida H, Okabe S. Direct astrocytic contacts regulate local maturation of dendritic spines. J Neurosci. 2007 Jan 10;27(2):331-40. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4466-06.2007.PMID: 17215394

6) Pannasch U, Freche D, Dallérac G, Ghézali G, Escartin C, Ezan P, Cohen-Salmon M, Benchenane K, Abudara V, Dufour A, Lübke JH, Déglon N, Knott G, Holcman D, Rouach N. Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. Nat Neurosci. 2014 Apr;17(4):549-58. doi: 10.1038/nn.3662. Epub 2014 Mar 2.PMID: 24584052

7) Ben Haim L, Rowitch DH. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. Nat Rev Neurosci. 2017 Jan;18(1):31-41. doi: 10.1038/nrn.2016.159. Epub 2016 Dec 1.PMID: 27904142

8) Letellier M, Park YK, Chater TE, Chipman PH, Gautam SG, Oshima-Takago T, Goda Y. Astrocytes regulate heterogeneity of presynaptic strengths in hippocampal networks. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 May 10;113(19):E2685-94. doi: 10.1073/pnas.1523717113. Epub 2016 Apr 26.PMID: 27118849

9) Miyazaki, T., Yamasaki, M., Hashimoto, K., Yamazaki, M., Abe, M., Usui, H., Kano, M., Sakimura, K., and Watanabe, M. Cav2.1 in cerebellar Purkinje cells regulates competitive excitatory synaptic wiring, cell survival, and cerebellar biochemical compartmentalization. J Neurosci. 2012 *32*, 1311-1328. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2755-11.2012.PMID: 22279216