

特定領域研究「グリア-ニューロン回路網による情報処理機構の解明」
第三回 サマー・ワークショップ「グリア研究の新しい展開を求めて」

日時：平成18年7月13日（木）12:00開始

場所：KKRホテル熱海

7月13日（木）

総司会：森本高子（東京薬科大学・生命科学部）

13:00 - 13:10 工藤佳久（東京薬科大学）

グリア研究の新しい展開に臨む班員への期待

第1部 グリア細胞機能のin vivo研究法の実際

座長：宮川博義（東京薬科大学・生命科学部）

13:10 - 13:40 平瀬 肇（理化学研究所 脳科学総合研究センター）（新公募班員）

多点電極によるin vivo グリア・ニューロン回路網の評価

13:40 - 14:10 根本知己¹、和氣弘明²、鍋倉淳一²（自然科学研究機構生理学研究所・1脳機能計測センター、2生体恒常機能発達機構部門）

二光子顕微鏡を用いた細胞機能画像解析法—その原理と大脳皮質in vivoイメージングへの応用—

14:10 - 14:50 **Takahiro Takano (高野隆弘)** (University of Rochester Medical Center)

Cerebrovascular tone control by astrocytes in vivo

第2部 グリア-ニューロン相互作用から生まれる構造と機能

座長：重本隆一（自然科学研究機構・生理学研究所）

15:00 - 15:30 村上富士夫（大阪大学大学院 生命機能研究科 脳神経工学）

脳の神経核形成における"ラディアルグリア"の役割

15:30 - 16:00 岡部繁男（東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科）

幼弱スパイン近傍でのアストログリアの動態とシナプス成熟への関与

16:00 - 16:30 田中光一（東京医科歯科大学 大学院疾患生命科学部分子神経科学）

広範性発達障害におけるグリア細胞の役割

第3部 精神神経疾患発症におけるグリア細胞の関与

座長：和田圭司（国立精神・神経センター・神経研究所）

16:40 - 17:10 貫名信行（理化学研究所 病因遺伝子研究グループ）

異常蛋白蓄積と神経変性

17:10 - 17:40 尾崎紀夫（名古屋大学大学院 医学系研究科精神医学・精神生物学分野）（新公募班員）

グリア系遺伝子を標的とした精神障害のゲノム解析

17:40 - 18:10 西川 徹（東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 精神行動医科学）

脳内D-セリンの代謝・機能の分子機構と病態—グリアとの関連に注目して

19:00 - 20:00 夕食

第4部 討論会「脳科学のフロンティアとしてのグリア研究への熱き思い」—グリアの機能をどのように攻めるか—

20:00 - 21:00

司 会：加藤宏司（山形大学・医学部）

パネリスト：若手研究者

Takahiro Takano（University of Rochester Medical Center）In vivo解析

南 雅文（北海道大学大学院薬学系研究科）in vitro 解析

加藤総夫（東京慈恵会医科大学）機能解析（新公募班員）

宮川 剛（京都大学大学院医学研究科）遺伝子改変動物の行動解析（新公募班員）

榎戸 靖（東京医科歯科大学難治疾患研究所）グリアの病態解析

21:00～深夜 自由討論

7月14日（金）**第5部 特別講演：マルチアニオンチャンネル**

座長：高坂新一（国立精神・神経センター・神経研究所）

9:00 - 10:00 岡田 泰伸（自然科学研究機構・生理学研究所）（新公募班員）
グリア細胞の虚血性グルタミン酸・ATP放出とアニオンチャンネルの役割

第6部 新規公募班員のプレゼンテーション（前半）

座長：池中一裕（自然科学研究機構・生理学研究所）

10:10 - 10:25 深谷昌弘（北海道大学大学院薬学研究科）
バグマングリアに発現するグルタミン酸受容体結合分子の機能的役割

10:25 - 10:40 加藤総夫（東京慈恵会医科大学医学部）
ATPからアデノシンへの細胞外変換を介したアストロサイトによるシナプス前抑制機構

10:40 - 10:55 大久保洋平（東京大学大学院医学系研究科）
神経細胞の成長におけるアストロサイト自発カルシウムシグナルの役割

10:55 - 11:10 米田幸雄（金沢大学大学院自然科学研究科）
新規シグナル分子によるグリア・ニューロン相互回路網構築の可能性探究

第6部 新規公募班員のプレゼンテーション（後半）

座長：木山博資（大阪市立大学大学院医学研究科）

11:20 - 11:35 齋藤尚亮（神戸大学・バイオシグナル研究センター）
性ホルモンの神経保護作用におけるグリア・ニューロン内情報伝達クロストーク機構

11:35 - 11:50 古市貞一（独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・分子神経形成）
中枢ミエリン特異的膜タンパク質オパリンの有髄神経軸索における機能解析

11:50 - 12:05 平田普三（名古屋大学大学院理学系研究科）
グリア神経回路網の破綻による行動異常の分子メカニズム

グリア研究の新しい展開に臨む班員への期待

領域代表 工藤佳久

東京薬科大学

平成15年度に発足した我々の特定領域研究班「神経－グリア回路網」も四年目を迎えた。これまで三年間の班員の研究業績は量的にも質的にも予想をはるかに超えており、昨年9月に行われた三年目の中間評価においてはわずか15分間の持ち時間でいかにその成果を表現するか、大いに悩まされた。おかげで、高い評価をいただくことができ、残りの二年間を現体制で続けることを認められた。1月に行った公開シンポジウムでもグリア細胞の生理学的機能と神経疾患発症へのグリア細胞の関与などの独自性の高い成果が報告され、グリア研究の重要性和面白さを伝えることができたと自負している。この公開シンポジウムに先立って行われた成果報告会でも班内で進められた効果的な共同研究の成果や、レベルの高い研究成果が次々と報告され、グリア研究の確かな進展を感じさせられた。しかし、20世紀末までに、ニューロンネットワークこそが脳機能発現の源であるとの認識が定着しており、脳における情報処理へのグリア細胞の直接的な関与という考え方は現在に至ってもまだマイナーである。もちろん状況証拠はたくさんある。しかし、ニューロン中心で進められてきた脳機能の解釈を覆すほどの決定的な証拠はまだ十分にそろっているわけではない。しかし、この状況こそが、まさに本領域研究班の存在意義を示すところである。何とか我々の研究で、グリア細胞を脳機能発現の主役として認めさせてやろうじゃないか、と挑戦的な気持ちになるのは私ばかりではないはずである。長く研究の分野に従事してきたが、これほどわくわくする研究対象に出会えたのは初めてである。これまで三年間の領域研究の中で、本研究に参加している研究者の一人ひとりが感じ方は違っても同じような気持ちを持っていることを感じている。本領域研究に残された時間はあと二年である。しかし、あと二年しかないのではなく、あと二年もある。平成15年度から本領域研究に参加している計画班員、平成16年度からの公募班員、そして、このたび新たに加わった公募班員の能力を十分に発揮していただき、さらに、領域内の共同研究を発展させることによって、グリア研究において世界をリードするグループにできるはずであると信じている。その成果をもってすれば、ニューロン・グリア中心の脳機能研究の意義をすべての脳研究者に認知させることが可能である。この認知を受けてからがグリア研究の本格的なスタートになる。この先、本当の意味での脳機能研究が発展するためにも、グリア研究は必須である。班員一人ひとりにこの熱い思いを継承していただきたいと心から願っている。

多点電極によるin vivo グリア・ニューロン回路網の評価

平瀬 肇

理化学研究所 脳科学総合研究センター

グリア・神経回路内での情報処理を理解するには、回路の入力および出力を計測することが重要である。原皮質の海馬体では、主細胞（錐体細胞・顆粒細胞）が細胞層に密集して配置されており、組織的に層状の構造をしているため、振幅の大きい脳波が計測できる。無麻酔行動中の動物の海馬からは行動パターンによって特徴的な脳波が出現する。例えば、周波数6～12Hzのシータ（ θ ）波は、ラットが能動的に移動している時及びレム（REM）睡眠時に出現する。海馬では層によって入力繊維が異なるので、脳波波形が層ごとに異なる。例えば、海馬鋭波（sharp waves）は θ 波不在時に、放線層（str. radiatum）に散発的に発生するが、海馬鋭波発生時に錐体細胞層では、130～200Hzのリプル波が観測される。このような特徴的な脳波パターンは、ウレタン及びケタミン麻酔下の実験動物でも観測できる。

近年の電極製作技術の進歩により、定期的に記録電極が配置されているシリコンプローブが容易に入手できるようになった。100 μm 毎に記録位置が配置されている電極を用いると、大脳皮質及び海馬の各層での脳波の同時計測が可能である。また、電極間距離が25 μm に配置されているテトラード状の電極を用いると記録された多細胞発火活動（multi-unit activity）から単一細胞発火活動（single unit activity）を抽出でき、複数のニューロンの活動電位の発火タイミングの関係を検討できる。

多点同時記録は、神経細胞の集団的活動を計測するのに適した方法である。さらに、遺伝子改変動物の神経活動を計測し、野生型と比較することで、遺伝子操作が神経回路ダイナミクスに与えるインパクトを測定できる。グリアが神経活動に能動的に影響を及ぼすことが近年提唱されており、多点同時記録とグリア特有遺伝子改変動物を用いてグリアー神経回路網を評価できると考えられる。我々は、最近S100 β ノックアウト動物より記録を試行しているが、その知見を含めて、多点同時記録の可能性と有用性について検討してゆきたい。

2光子顕微鏡を用いた細胞機能画像解析法—その原理と大脳皮質in vivo イメージングへの応用

根本知己^A、和氣弘明^B、鍋倉淳一^B

A自然科学研究機構・生理学研究所・脳機能計測センター・生体情報解析室、B自然科学研究機構・生理学研究所・生体恒常機能発達研究部門

多光子励起過程を用いた細胞機能の可視化解析（2光子顕微鏡）は、中枢神経系を中心に様々な組織の細胞生理学的研究に用いられるようになってきた。ここでは本顕微鏡法の原理、特徴と大脳皮質のin vivo イメージングへの応用について、最近我々の構築した個体用in vivo 2光子顕微鏡のデータを交え、

議論する。この2光子顕微鏡の利用の著しい増大の理由は、組織的標本深部において高い空間分解を維持したまま断層イメージングが可能なことにある。これは、多光子励起過程では励起光が近赤外領域にあるため、生体標本に対し低吸収低散乱性であることに原因する。さらに、この低吸収性は生体試料に対する侵襲性が低いことをも意味し、長時間に渡って安定的なライブイメージングを可能たらしめている。また、多光子励起過程においては、1光子励起では励起スペクトラムのオーバーラップの少ないような複数の蛍光色素を、1つのレーザー光で同時に励起することが可能である場合が増加する。これらの特徴を利用することで、我々は、外分泌腺において生理的なCa²⁺濃度上昇の定量的測定と単一の融合細胞形成の可視化を初めて同時に可能とし逐次開口放出という新たな分泌様式を発見した。一方、この高い組織透過性と低い侵襲性を活用し、最近、我々は麻酔下のマウスにおいて、表面から0.9mm以上もの大脳新皮質深部のEYFP発現錐体細胞の全層における微細構造の可視化に成功した。さらに様々な遺伝子改変動物において、その微細構造を同一個体において経時的に観察をおこなった。またレーザー光を用いた様々なアプリケーションを利用し、その条件下で大脳皮質細胞変化を検討することにより、神経細胞の構造的可塑性の観察への有用性を示す。

Cerebrovascular tone control by astrocytes in vivo

Takahiro Takano

University of Rochester Medical Center

Cerebral blood flow is dynamically coupled to the regional neuronal activity, but the mechanism by which local microcirculation is controlled remains unclear. Astrocytes have tight association with neurons and their endfeet cover vasculature in brain. Recent studies suggest that astrocytes can change vessel tone, but observations in slice preparations have been contradictory. Here we show that cortical astrocytes in vivo possess a powerful mechanism for rapid vasodilation, using two-photon microscope to visualize perfusion in single vessel in exposed cortex of live animals. Cranial window was made at somatosensory cortex of adult mice and blood vessels were visualized by systemic injection of fluorescent dye conjugated with dextran. Concentration of calcium in astrocytic endfeet surrounding penetrating arteries was monitored after loading with the calcium indicator dye. To selectively stimulate astrocytic endfeet, we triggered calcium increases by photolysis of DMNP-EDTA AM. UV photolysis resulted in rapid increase of calcium in astrocytic endfeet and arterial dilation. Vasodilation occurred with a latency of only 1-2 seconds. The effect is limited to arteries, and stimulating astrocytic Ca²⁺ signaling in vascular endfeet surrounding veins or capillaries did not trigger the changes in vessel diameters. Inhibiting cyclooxygenase-1 activity by either indomethacin or SC-560 blocked the photolysis-induced hyperemia, while antagonists of other vasomodulators failed to influence it. These observations implicate that astrocytes is in control of local microcirculation, and suggest that one of their physiological roles is to mediate vasodilation in response to increased neural activity.

第2部 グリアーニューロン相互関係から生まれる構造と機能

神経核形成とラディアルグリア

村上富士夫

大阪大学大学院生命機能研究科

層構造や神経核は脳を形態学的に特長づけるとともに、脳の複雑な機能を支える重要な機能単位でもある。これらの構造が正しく形成されるためには神経細胞が生まれた後に定められた場所へ正しくと移動していく必要がある。発生期には、神経管の脳室層付近では盛んに細胞分裂がおこり、神経管の成長がおこる。比較的最近までの知見では、分裂を終えた神経細胞は、神経管の脳室面から表面に亘ってその突起を伸ばしているラディアルグリアと呼ばれる細胞の突起を基質として利用して移動してゆくものと考えられてきた。しかし我々のグループを含む複数のグループの研究から、少なくともげっ歯類の大脳皮質ではいるラディアルグリアと呼ばれていた細胞は、神経細胞の前駆細胞としての役割を果たしていることが明らかになり、その役割の重要性の認識が一段と高まった。

最近我々はラディアルグリアが神経核形成においても重要な役割を果たしていることを示す証拠を得た。後脳には小脳前核群とよばれる神経核群があり、脊髄や大脳から小脳への信号の中継を行っている。我々は後脳背側部の菱脳唇に片側性に exo utero 電気穿孔で enhanced yellow fluorescent protein の遺伝子を導入することによって菱脳唇由来の小脳前核細胞の前駆細胞を in vivo で標識し、その運命を追うことにより、橋と延髄において4つ小脳前核を形成するの神経細胞の移動と核形成の過程を可視化することに成功した。その結果、これまでの報告に反して、橋核と橋被蓋網様核の神経細胞の一部は正中線を交叉して移動することが明らかになった。また外側網様核と外楔状核の神経細胞が正中線を越えて移動することも確認された。意外なことに、移動中の小脳前核細胞は何れも移動の最終段階において方向転換をし、脳室方向に向かって移動する様子が観察された。これらの細胞はその後移動を停止し、細胞の集合、すなわち神経核を形成した。ラディアルグリアの線維を選択的に染める抗ネスチン抗体を用いて染色したところ、脳室方向に向かって移動する細胞はネスチン陽性繊維に沿って分布していた。また電子顕微鏡を用いて観察をおこなったところ、ラディアルグリアの線維に移動細胞が直接接触している様子が観察された。これらの観察結果はラディアルグリアが神経核の形成にも関与していることを示している。

以上のようにラディアルグリア細胞と呼ばれてきた細胞は、脳の発生において少なくとも3つの役割を果たす極めて重要な細胞であることが明らかになってきた。

別項 1

別項 2

別項 3

別項 4

別項 5

別項 6

別項 7

別項 8

別項 9

別項 10

幼弱スパイン近傍でのアストログリアの動態とシナプス成熟への関与

岡部 繁男

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科

グリア細胞、特にアストログリア細胞が成熟シナプス近傍にその突起を伸展させて、シナプス機能の調節を行う事は近年の多くの研究結果によって明らかになった。一方でグリア細胞の分泌する拡散性の因子によって、シナプス形成・成熟過程が促進されることもいくつかの報告によって示されている。しかしながら、シナプス形成過程にアストログリアの突起が直接的に軸索あるいは樹状突起に接触することによって、局所的なシナプスの成熟が誘導される可能性についてはこれまで報告がない。この問題にアプローチするために、海馬スライス培養系においてCA1およびCA3領域の錐体細胞をrhodamine-dextranで、またアストログリアをGFPによって標識し、二光子顕微鏡によるタイムラプス観察を行い、樹状突起に形成されるフィロポディア・スパイン構造とアストロサイトの微小突起の相互作用について解析した。フィロポディア・スパインの中で、タイムラプス観察中にアストログリアとの接触を行ったもの、行わなかったものについて、その寿命を測定すると、アストログリアとの接触を持ったものが有意に長い寿命を持つ事が明らかになった。更にアストログリアとの接触を持つフィロポディア・スパインは、その形態をスパインへと変化させるものが有意に多かった。タイムラプス像を解析すると、フィロポディア・スパインとアストログリアの接触時間は、極めて短い場合（1時間以内）と、非常に長い場合（5時間以上）の2群に分けられ、特に非常に長い接触時間を保つ場合に、スパインへの形態変化を高い頻度で起こす傾向が見られた。

フィロポディア・スパインの寿命および形態学的な成熟が、アストログリアの接触と因果関係を持つことを示すため、まずアストログリアの運動性をRac1のdominant negative変異体を発現させることで慢性的に抑制した。二光子顕微鏡によるタイムラプス観察で、アストログリアの運動性の低下により、フィロポディア・スパインとアストログリアの接触が低下している事を確認した。このような比較的長期のアストログリアの運動性の抑制により、フィロポディア・スパインの形態は球状の頭部を持たない、フィロポディア型のものへと変化した。Ephrin-A3/EphA4系は、海馬においてアストログリアからのスパイン形態制御シグナルとして働く事が報告されている。そこで次にEphA4/Fcおよびephrin-A3/Fcを投与して、特定の接触依存的なシグナルを急性に阻害することを試みた。EphA4/Fcおよびephrin-A3/Fcの存在下でも、アストロサイトとフィロポディア・スパインの接触自体は対照群と同様に観察されたが、アストログリアとの接触を受けたフィロポディア・スパインにおいてその寿命が特異的に短縮した。

以上の結果はアストログリアの直接的な接触が、局所的にフィロポディア・スパインの維持・成熟を制御することを示している。アストログリアはお互いに排他的な領域を持ち、その領域内で複雑な突起を発達させて多数のシナプスと接触を持つ。従って、液性因子によるシナプス成熟の非選択的な

促進機能だけでなく、アストログリアは自己の排他的領域内に存在する多数の興奮性シナプスの維持・成熟を、単一シナプスレベルで制御する機能を持っている。

広汎性発達障害におけるグリア細胞の役割

田中光一

東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部

広汎性発達障害の代表的疾患である自閉症は、脳の発達障害の一つで、社会性の欠如・言語発達の遅延を主症状とする疾患である。1000人に5-8人の割合で発生し、5人のうち4人は男性である。双生児研究から自閉症の発症には遺伝要因が大きいことが明らかになっているが、複数の遺伝的要因と環境要因によって発症にいたる多因子性疾患であるため、従来の遺伝研究だけでは限界がある。しかし、原因にかかわらず、自閉症には共通の病態が存在し、それを再現する病態モデル動物を作成し解析することは、自閉症の研究にとって重要である。

我々の研究室では、グリア型グルタミン酸トランスポーターを欠損させることにより、脳内の興奮性・抑制性のバランスを崩したマウスを作成し、そのマウスが自閉症の症状と酷似した行動異常・脳の形態異常を示し、現時点で最も完全に近い自閉症のモデル動物であることを見つけた。このマウスを用いることにより、自閉症の病態解明・新規治療法の開発が促進されると期待される。

最近になり、うつ病患者の脳内でグリア型グルタミン酸トランスポーターの発現が減少していることが報告された。我々の作成した新規モデル動物は、広汎性脳発達障害のみならず、うつ病・統合失調症などの精神疾患の病態を統一的に解明できる可能性を秘めている。

第3部 精神神経疾患発症におけるグリア細胞の関与

異常蛋白蓄積と神経変性

貫名 信行

理化学研究所 病因遺伝子研究グループ

多くの神経変性疾患においてタンパク質蓄積がその主要な病態であることが注目されている。タンパク質蓄積は細胞外（ β 蛋白、プリオン蛋白）、細胞内（タウタンパク、シヌクレイン、ポリグルタミン）など蓄積部位も異なり、さらに細胞内でもその分布が異なる（ポリグルタミン病の核内封入体）。さらに主なタンパク質蓄積はオリゴデンドログリアに認められるにもかかわらず、その病変が神経細胞に認められる疾患も存在する（多系統萎縮症）。このような事実は蛋白蓄積が神経変性をもたらすという「仮説」に統一的な基盤があるのかどうかという疑問を生じさせる面もある。本講演では1) 異常蛋白蓄積の構造特性、2) 異常蛋白の神経毒性についてのいくつかの仮説、3) 多系統萎縮症モデルマウスなどの検討からオリゴデンドログリアの異常が神経変性を生ずる可能性などについて、考察を述べたい。

グリア系遺伝子を標的とした精神障害のゲノム解析

尾崎紀夫

名古屋大学大学院 医学系研究科精神医学・精神生物学分野

統合失調症、双極性障害（躁うつ病）、覚醒剤使用障害患者は幻覚・妄想といった精神病症状を臨床症状とし、治療薬剤においても共通性があるが、同一家族内で発症することから遺伝的素因の共通性が着目されてきた。近年、全ゲノム解析の結果、共通の染色体部位に存在する遺伝子が発症に関与している可能性が示唆されていることに加えて、動物、細胞レベルの解析でも、死後脳、神経画像の解析結果でも、これら精神病性障害いずれの病態においてもオリゴデンドロサイト、アストロサイトおよびミクログリア関連遺伝子が関与していることが想定されている。

そこで、chromogranin A, organic cation transporter 3 (OCT3), myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), SRY (sex determining region Y)-box 10 (SOX10), Transferrin, CNP, OLIG2といったグリア関連遺伝子を候補遺伝子として精神病性障害のゲノム解析を行い、その病態解明を目指した研究を行っている。方法論としては、各遺伝子上に存在するSNPをSNPデータベースから選択し、HapMapデータと連鎖不平衡地図をもとに標識となるtagSNPを決定し、tagSNPによる関連解析を統合失調症、双極性障害、覚醒剤使用障害患者のゲノムを用いて行っている。これまでに終了した結果では、chromogranin Aと統合失調症、OCT3と覚醒剤使用障害との有意な検出されている。今回は、研究に至った背景、これまでの方法論と結果を報告し、今後、拡大予定の候補遺伝子、発症に関わる多型の検索方法、関連解析の生物学的意味の検証の方向性などについて、紹介することとする。

脳内D-セリンの代謝・機能の分子機構と病態—グリアとの関連に注目して—

西川 徹

東京医科歯科大学大学院精神行動医科学分野

D-セリンは、グリシンやD-アラニンとともに、NMDA型グルタミン酸受容体に対してグリシン調節部位に結合しコ・アゴニストとして作用する。演者らは、NMDA受容体遮断薬が統合失調症様の異常を引き起こすことに着目し、以上のコ・アゴニストを用いて統合失調症の病態や新しい治療法の研究を進める過程で、D-セリンが抗精神病作用をもち、D-アミノ酸としては例外的に、哺乳類脳の内在性物質であることを見出した。さらに、遊離型D-セリンは、脳優位に検出され、脳の組織および細胞外液のD-セリンの分布とその発達による変化がNMDA受容体NR2BサブユニットmRNAと酷似しており、NMDA受容体の内在性コ・アゴニストと推測された。実際に、D-セリンを選択的に分解した条件におけるNMDA受容体機能の低下が報告されている。

脳において、D-セリンは、L-セリンまたはグリシンの濃度上昇により増加し、グリシン開裂酵素の急性阻害後に減少することから、L-セリンやグリシンと関連した合成系をもつと考えられる。最近、セリンデヒドラターゼ・セリンラセマーゼ双方の活性をもつ酵素が単離され、D-セリンの生合成と分解への関与が注目されている。また、D-アミノ酸酸化酵素も生理的にD-セリンを分解する可能性がある。生理的NMDA受容体調節に不可欠と推察される細胞外液中D-セリンは、in vivoダイアリスを用いた測定において、1)脱分極刺激による減少、2)神経インパルス遮断や細胞外カルシウム除去後の軽度増加、3)可逆性グリア毒灌流中の減少、4)神経細胞体の選択的破壊部位での著明な低下等の特徴をもつことがわかり、D-セリン様免疫反応がアストロサイト、ニューロン等に見られるとの報告と考え合わせると、古典的神経伝達物質とは異なる機序により、神経—グリア回路の制御下に放出されることが示唆された。さらに、ラット脳では、Na⁺依存正および非依存性のD-セリン取り込み活性が認められた。その分子機構は不明だが、D-セリンに高親和性を示すNa⁺非依存性中性アミノ酸トランスポーターasc-1や、演者らがD-セリン類似の脳内分布を示すことを明らかにしたdsm-1やdsr-2の関与が注目される。

一方、脳のD-セリンと精神神経疾患の病態との関係を支持する所見がある。すなわち、グリシン開裂酵素活性を欠き多彩な中枢神経症状を呈する非ケトーシス型高グリシン血漿患者の死後大脳新皮質では、大脳新皮質のD-セリン濃度が著明に低下している。統合失調症患者死後脳においては、非精神神経疾患患者との間にD-セリン濃度の有意な差異は認められなかったが、統合失調症ではD-セリンが結合するNMDA受容体グリシン調節部位の増加が報告されており、D-セリンシグナルが低下している可能性がある。また、D-アミノ酸酸化酵素およびその調節蛋白の遺伝子多型と統合失調症との相関も最近発表された。さらに、D-セリンおよびD-セリンと同様にNMDA受容体賦活作用をもつ物質が、統合失調症の難治性症状あるいは小脳失調症状を改善するという臨床試験結果も蓄積されつつある。したがって、D-セリンの代謝・機能の分子機構解明は、精神神経疾患の病態の理解や新規治療薬開発にも結びつくことが期待される。

別項1

別項2

別項3

別項4

別項5

別項6

別項7

別項8

別項9

別項10

グリアの機能をどのように攻めるか

司会：加藤宏司（山形大学・医学部）

パネリスト

高野隆弘（University of Rochester Medical Center）（in vivo 解析）

南 雅文（北海道大学大学院薬学系研究科）（in vitro 解析）

加藤総夫（東京慈恵会医科大学）（機能解析）

宮川 剛（京都大学大学院医学研究科）（遺伝子改変動物の行動解析）

榎戸 靖（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

グリア細胞の虚血性グルタミン酸・ATP放出とアニオンチャンネルの役割

岡田 泰伸, LIU Hongtao, SABIROV Ravshan

自然科学研究機構生理学研究所・細胞器研究系・機能協同研究部門

グリアはニューロンに構造的・機能的なサポートを与えると共に、他のグリア細胞やニューロンとの間に精巧なネットワークを構築して、双方向的な情報伝達を行っている。このグリアーニューロン間情報伝達には、両細胞から放出されるグルタミン酸やATPが重要な役割を果たしている。最近私達は、虚血時や細胞膨張時におけるアストロサイトからのグルタミン酸やATPの放出に、アニオンチャンネルがその通路を与えていることを明らかにした。

細胞膨張時には多くの細胞で主として次の2種のアニオンチャンネルが活性化することが知られている。まず第1は弱い外向整流性を示し、高陽電圧下でのみ不活性化を示す中間型単一チャンネルコンダクタンス（数10 pS）を持った容積感受性・外向整流性（VSOR）アニオンチャンネルであり、これは主として細胞容積調節やアポトーシス誘導に関与する。第2は整流性を示さず、陰陽両電圧下で不活性化（ベル型開確率）を示す大型単一チャンネルコンダクタンス（数100 pS）を持ったマキシアニオンチャンネルであり、その機能は長く不明であったが、最近私達は乳腺線維芽細胞、心室筋細胞、腎マクラデンサ細胞においてATP放出を担うATPチャンネルであることを明らかにした。VSORアニオンチャンネルのポアのサイズは半径約0.6 nmであるのに対し、マキシアニオンチャンネルのそれは約1.3 nmであると測定された。VSOR分子の候補としてはCIC-3が、マキシアニオンチャンネルの候補としてはpI-Vれも正しくないことを証明し、現在いずれの分子実体も不明である。

マウスアストロサイトにはVSOR、マキシアニオンチャンネルのいずれもが発現しており、グルタミン酸（有効半径0.35 nm）とATP（有効半径約0.6 nm）のサイズは、それらのDAC（ミトコンドリアVDAC形質膜型アイソフォーム）が長い間信じられてきたが、最近私達はいずれもアニオンチャンネルのポアサイズより小さいかコンパラブルであるので、グルタミン酸やATPの放出への関与の可能性を検討した。

アストロサイトは低浸透圧液投与による浸透圧性膨張刺激や代謝阻害剤投与による化学的虚血刺激に対してグルタミン酸放出応答を示した。これまでグリアからのグルタミン酸放出はグルタミン酸トランスポーター逆回転やコネキシンヘミチャンネルやエクソサイトーシスの関与が報告されてきたが、これらに対するブロッカーは無効であった。一方、マキシアニオンチャンネルのブロッカーは最も強くグルタミン酸放出を抑制し、VSORブロッカーも弱いながらも有意に抑制した。アストロサイトのマキシアニオンチャンネルは比較的高いグルタミン酸透過性（Pglutamate/PCl=0.2）を示し、VSORアニオンチャンネルも有意のグルタミン酸透過性（Pglutamate/PCl=0.15）を示した。以上の結果より、アストロサイトの虚血性及び細胞膨張性のグルタミン酸放出の通路に主としてマキシアニオンチャンネルが、そしてマイナーながらVSORアニオンチャンネルも関与することが明らかとなった。

マウスアストロサイトは酸素・グルコース除去（OGD）による虚血刺激に対してATP放出で応答した。その際のアストロサイト表面のATP濃度をバイオセンサー法で測定したところ4 μ M近くにまで上昇することが判明した。このATP放出は、コネキシンヘミチャンネルやエクソサイトーシスのブロッカーに対してのみならず、VSORアニオンチャンネルのブロッカーに対しても感受性を示さず、マキシアニオンチャンネルのブロッカーによってのみ抑制された。アストロサイトのマキシアニオンチャンネルは有意のATP4-透過性（PATP/PCI = 0.1）を示した。これらの結果から、アストロサイトの虚血性ATP放出は、主としてマキシアニオンチャンネルによってその通路が与えられることが明らかとなった。

アニオンチャンネルの機能としては、興奮性細胞膜安定化機能と上皮細胞Cl⁻輸送機能が古典的に知られている。近年これらに加えて、細胞容積調節機能、細胞増殖制御機能や細胞死誘導機能が知られるようになった。今回の私達の研究の結果、アニオンチャンネルの機能として、細胞外情報伝達シグナルで働くATPやグルタミン酸の放出への関与が新たに加えられた。

第6部 新規公募班員のプレゼンテーション

遺伝子改変マウスの網羅的行動解析

宮川 剛

京都大学大学院医学研究科

ポストゲノムシークエンス時代の中心的な課題は、遺伝子の個体レベルでの機能を調べることでありとされている。マウスの遺伝子の99%は、ヒトでそのホモログを持っており、マウスにおいて個体レベルで機能を持つような遺伝子は、ヒトにおいても機能を持っている可能性が高いと考えられる。そこで、遺伝子の個体レベルでの機能を調べるため、欧米を中心にマウスのすべての遺伝子についてノックアウトマウスを作成するという大規模プロジェクトが進んでいる。一方、全ての遺伝子の半分以上は脳で発現しているので、これらの機能を調べるためには、遺伝子の脳での機能を網羅的に調べる必要がある。演者らは、「脳で発現する遺伝子の機能の最終アウトプットレベルは行動である」という発想から、多くの遺伝子改変マウスの系統について「網羅的行動テストバッテリー」を行うことにより、脳で発現する遺伝子の機能探索を行ってきた。演者の研究室では、2003年の発足以来、国内外33の研究室との共同研究で、43の異なる系統のマウスに対して既に一通りの網羅的行動テストバッテリーを行っており、遺伝子改変マウスの行動表現型の網羅的解析について国内で突出した最大の拠点となっているだけでなく、世界でも有数の研究室となっている。得られた大量のデータ（43系統約2400匹）の網羅的行動データは、申請者がトップダウン的にリレーショナルデータベースとして一括管理しているので、どの系統のマウスの行動表現型がどの程度異常なのか、どのマウスが精神疾患モデルマウスと呼ぶにふさわしいかなどは一目瞭然である。本特定領域研究「グリア-ニューロン回路網による情報処理機構の解明」の班員が作成した遺伝子改変マウスについて、「網羅的行動テストバッテリー」による解析の希望を募り解析支援を行う。

バーグマングリアに発現するグルタミン酸受容体結合分子の機能的役割

深谷昌弘

北海道大学大学院医学研究科解剖発生学分野

小脳バーグマングリアに発現するAMPA型グルタミン酸受容体（AMPA受容体）は、神経終末からのグルタミン酸を受容し、細胞内のCa²⁺濃度を上昇させることで小脳回路の維持に重要な役割を果たすことが知られている。しかしながら、バーグマングリアにおけるAMPA受容体の局在とその制御機構には不明な点が多い。本研究では、AMPA受容体結合調節分子であるTransmembrane AMPA receptor Regulatory Proteins (TARPs) に着目し、バーグマングリアに発現するAMPA受容体とTARPsの局在解析およびTARPsノックアウトマウスを用いた解剖学、生化学、生理学的解析を行い、TARPsのバーグマングリアにおける機能的役割を解明することを目標としている。これまでに我々は、バーグマングリアに発現するAMPA受容体が発現する興奮性シナプスのシナ

別項1

別項2

別項3

別項4

別項5

別項6

別項7

別項8

別項9

別項10

プス間隙に面する細胞膜に集積すること、バグマングリアにはTARPsのうち γ -4、(γ -5)が発現することを明らかにしてきた。これらの結果から、バグマングリアに発現するAMPA受容体は、 γ -4、(γ -5)によって機能・局在制御を受けている可能性が考えられた。今後これらのTARPs ノックアウトマウスの解析を進める予定である。

グリオトランスミッターATPによる脳内ネットワーク・シナプス伝達制御の时空ダイナミクス

加藤総夫¹、井村泰子¹、繁富英治^{1,2}

¹東京慈恵会医科大学・神経生理学、²日本学術振興会特別研究員

延髄孤束核は、生体内環境に関する感覚情報が収斂する神経核であり、低酸素や視床下部刺激によってATPもしくはアデノシンの放出が生じ、また、それらの受容体およびトランスporterが高密度に発現しているため、ニューロン回路の活動制御におけるグリオトランスミッターATPおよびその代謝産物アデノシンの役割と機構を同定する目的に適した領域である。我々は脳スライスパッチクランプ法を用いて、孤束核シナプス前カルシウム透過性P2X受容体が、グルタミン酸開口放出を誘発するCa²⁺チャンネルとして機能し、その活性化がシナプス前ニューロンの興奮なしにシナプス後ニューロンの興奮（活動電位発生）を誘発する事実を証明した（J Physiol 530:469-, 2001; J Neurosci 24:3125-, 2004）。孤束核には特徴的な突起伸張パターンを示すGFAP陽性グリア細胞が高密度に発現し、樹状突起近傍に突起を伸ばしている事実が確認された。シナプス近傍における細胞外ATP濃度上昇の影響を検討するため、細胞外DMNPE-caged ATP存在下、光束径3 μ mのlaser beamを樹状突起近傍に照射してuncageし、即座に灌流（"Flash and Flush"）したところ、200-1000 ms以内という短潜時で時間・空間限局的な著しいグルタミン酸開口放出頻度の増加が観察された。今後、GFAP-GFPマウスを用いて、局所的アストロサイト内Ca²⁺上昇が近傍のシナプスからのグルタミン酸放出に及ぼす影響を検討する。

神経細胞の成長におけるアストロサイト自発カルシウムシグナルの役割

金丸和典、大久保洋平

東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理学教室

アストロサイトにおいては自発的かつダイナミックなCa²⁺動態が報告されている。またアストロサイトの重要な機能の一つとして、神経細胞成長の促進機能が報告されている。そこで本研究では、アストロサイト自発Ca²⁺シグナル系が神経成長促進機能を担うという作業仮説を立て、その検証を行った。IP3脱リン酸化酵素であるIP3 5-phosphataseの安定導入により自発Ca²⁺シグナルが欠損したアストロサイト株を作製することに成功し、これと共培養した単離海馬ニューロンの成長を評価した。多数の神経細胞形態の網羅的解析により、Ca²⁺シグナル欠損アストロサイト上においては神経突起長が有意に減少することを確認した。そして神経突起先端のタイムラプス・イメージングにより、Ca²⁺シグナル欠損アストロサイト上では突起先端の伸展速度が減少することが観察された。また神経突起がCa²⁺シグナル欠損アストロサイトを避け、正常アストロサイト上を好んで伸展することも観察された。これらの結果から、アストロサイトの自発的Ca²⁺シグナルはアストロサイト細胞膜表面の状態を調整することにより、神経細胞成長に関与することが示された。

新規シグナル分子によるグリア・ニューロン相互回路網構築の可能性探究

米田幸雄、宝田剛志、黒川晋太郎

金沢大学大学院自然科学研究科

我々は、脳内におけるグルタミン酸シグナル伝達に必要な、①出力系、②入力系および③停止系に関連する分子装置がすべて、骨形成能を有する骨芽細胞に機能的に発現する事実を見出した。骨格を構成する骨組織には、骨形成を担う骨芽細胞、骨吸収を担う破骨細胞および軟骨細胞が主に存在するが、これらの細胞における分化・成熟過程は、Runx2, Osterix, Sox9, RANKおよびRANKL等の各種シグナル分子により制御されることが知られている。したがって、今回我々はこれら骨組織のシグナル伝達分子群について、中枢神経系における機能的発現の可能性を探究した。胎生15日目および8週令ddY系マウス全脳を用いて、Runx2, Osterix, Sox9, RANKおよびRANKLの発現をRT-PCR法を用いて検討した結果、発達脳および成熟脳ともにRunx2, OsterixおよびSox9のmRNA発現が認められた。以上の結果より、骨組織において分化と成熟を制御するシグナル分子が、脳内においても発現する事実が明らかとなった。今後は、これらシグナル分子の中枢神経系における生理学的および病態生理学的意義を追究する予定である。

性ホルモンの神経保護作用におけるグリア・ニューロン内情報伝達クロストーク機構

齋藤尚亮、上山健彦

神戸大学・バイオシグナル研究センター・分子薬理分野

脳虚血障害は発症後、現有の最高の治療法を用いても重度の障害を残す例は多くあり、新たな治療法の開発が期待されている。我々は、エストロゲンが細胞膜型エストロゲン受容体を介して神経細胞特異的なプロテインキナーゼCである γ PKCを活性化することにより、虚血後においても神経保護作用を示すことを見出した。一方、グリア細胞に発現する δ PKCは、そのノックアウトマウスにおいて明らかな虚血巣の縮小が見られることから、 γ PKCと異なり神経障害作用を示すと考えられている。本研究では、これら相反する作用を有する2種類のPKCサブタイプの虚血時の神経保護（障害）における役割を明らかにすることによって、脳虚血時のニューロン・グリアのネットワークを解析することを目的としている。

我々はすでに γ PKC-KO マウスおよび δ PKC-KO マウスを入手し、脳内へのPKC分子の発現のための種々のウイルスの作製を行っている。さらに、テトラサイクリン制御システム遺伝子導入動物（Tet-Op system transgenic mice）を用いたトランスジェニックマウスの作製に成功し、脳部位・時期特異的に γ PKC-GFPあるいは δ PKC-GFPを発現させることに成功している。今回、これらを用いて、神経細胞あるいはグリア細胞に特異的に γ PKCまたは δ PKC-GFPを強発現し、神経・グリア間の情報伝達クロストーク機構に注目してPKCサブタイプを介した神経細胞保護作用のメカニズムを解明する。

中枢ミエリン特異的膜タンパク質オパリンの有随神経軸索における機能の解析

古市貞一

理化学研究所脳科学総合研究センター分子神経形成研究チーム

有随神経線維は、ニューロンの軸索とグリアのミエリンの相互作用で形成される構造体で、神経インパルスの伝導に重要な役割を果たす。中枢ミエリンは、オリゴデンドロサイトの突起が伸び広がって神経軸索を多重に巻きついた構造である。多重突起の大部分は細胞膜の内膜側同士と外膜側同士が密着したコンパクトミエリン部分で、電気的な絶縁体として跳躍伝導に重要である。その辺縁部は内膜同士の接着がないために細胞質が細胞体から一繋がりループ状に続くノンコンパクトミエリン部分（インナーループとパラノードループ）からなり、ミエリン成分などの運搬やシグナル伝達あるいはミエリン膜間やミエリン-軸索間の接着などのほたらきを担うと考えられる。我々は、ほ乳類の中枢ミエリンにのみ特異的に発現し、ミエリン・ループ膜に限局して分布する膜貫通型の糖タンパク質オパリン（Opalin）を同定した。本研究計画ではオパリンの構造と機能を解析から、ミエリンループ膜の形成と機能について理解を深める。また、有随神経線維の維持と損傷・治療過程におけるオパリンの動態を明らかにする。

グリア神経回路網の破綻による行動異常

平田普三

名古屋大学大学院理学研究科

ゼブラフィッシュは発生が早く、胚が透明で、遺伝学が可能ことから従来、発生研究の脊椎動物モデルとして使われてきた。また、受精後17時間という未成熟な時期から運動をはじめること、電気生理学が容易なことから近年では神経科学研究のモデルとしても注目されている。我々は脊椎動物の運動を制御するグリア神経回路網の形成に必要な遺伝子を単離する目的で、ゼブラフィッシュの初期の運動に異常のある変異体を多数単離した。運動異常は神経系の異常だけでなく、筋の異常によっても発生するので、これらを区別する目的で全ての変異体について運動時の筋電位変化の測定を行った。筋に異常のある変異体は神経系から筋への出力は正常なので、正常な脱分極パターンが検出されるが、神経系に異常のある変異体では、異常な電位変化が見られるからである。変異体 shocked は受精17時間から現れる自発的運動が見られず、逃避運動が発達する受精2日でも正常な逃避ができない運動異常の変異体であるが、筋電位測定実験から神経系に異常をもつことが分かった。責任遺伝子をクローニングして、グリア細胞で発現するグリシントランスポーター1の膜ドメインに変異を同定した。電気生理から、変異でトランスポーター活性は失われることが分かった。

別項 1

別項 2

別項 3

別項 4

別項 5

別項 6

別項 7

別項 8

別項 9

別項 10