

カルシウムイメージングによる
アストロサイト機能解析

金丸 和典

要約：アストロサイトは無数の微細突起を伸ばし、アストロサイト同士あるいは他の脳細胞と非常に多くの領域をもって接するグリア細胞の一種である。アストロサイトがシナプス伝達・脳血流・神経細胞死などの幅広い生理・病理機能に寄与することが先行研究により明らかになってきているが、その機能や機能発現メカニズムには未解明な点を多く残している。アストロサイトは活動電位を発生しない非興奮性細胞であるため、電気生理学的手法を用いてリアルタイムに活動を検出することは困難であるが、蛍光 Ca^{2+} インジケータを細胞内に導入し、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化 (Ca^{2+} シグナル) を観察することにより活動をモニターすることができる。また、アストロサイトの Ca^{2+} シグナル形成に重要なイノシトール三リン酸 (IP_3) 受容体とその関連シグナル分子を人為的に制御した際のフェノタイプを解析すれば、アストロサイトの機能に迫ることができる。本稿では、このような手法を用いて著者らが見出してきた知見を紹介する。

1. 研究1：アストロサイト Ca^{2+} シグナルの神経突起伸長作用

マウスやラットの新生児あるいは胎児から海馬や大脳皮質を摘出した後、酵素処理により得た細胞懸濁液をシャーレに播種して何度か継代培養すると、ほぼアストロサイトのみで構成されるシート状の細胞群を得ることができる。このような培養アストロサイトは、生体内でみられるような微細突起を持たず、HeLa や HEK などといった上皮系の培養細胞株と似た形態をしているが、遺伝子やタンパク質の発現パターンは生体内の性質を少なからず保持している。培養アストロサイトを用いた先行研究により、アストロサイトが神経成長、特にシナプス形成を促進することが報告されていたが(1)、神経突起の伸長に対する影響を詳細に

検証した報告はなかった。培養アストロサイトで Ca^{2+} イメージングを行うと、非刺激条件下においても自発的な Ca^{2+} シグナルを頻繁に示す (図 1A 左)。 Ca^{2+} シグナルは様々な細胞機能を制御するため、自発アストロサイト Ca^{2+} シグナルが神経突起伸長に寄与するのではないかと考えた。そこで著者らは、 Ca^{2+} シグナルを恒常的に抑制したアストロサイトを作成し、これと共培養したニューロンの突起伸長を解析した。

各種阻害薬を用いた予備実験より、小胞体からの Ca^{2+} 放出が培養アストロサイトの自発 Ca^{2+} シグナルの形成に不可欠であるという先行研究と一致する結果を得た。そこで、これを抑制するため、イノシトール三リン酸 (IP_3) 脱リン酸化酵素である IP_3 5-phosphatase (2) をレトロウイルスベクターで安定発現させたところ、顕著な Ca^{2+} シグナルが消失した“ Ca^{2+} シグナル抑制アストロサイト”を作出することに成功した (図 1A 右)。これと単離海馬ニューロンを共培養し、樹状突起伸長を免疫染色で、軸索伸長を成長円錐のイメージングにより解析した。その結果、樹状突起・軸索いずれも伸長が抑制されており、アストロサイトの自発 Ca^{2+} シグナルが神経突起の伸長に促進的な作用を持つことが明らかとなった。

アストロサイト内の Ca^{2+} シグナルがニューロンに作用を及ぼすためには、何らかの細胞外因子を介する必要がある。これには、グリア由来神経伝達物質 (いわゆる ‘glio’-transmitter) やサイトカインなどのように細胞外に放出・遊離して作用する液性因子と、プロテオグリカンや細胞外マトリクス分子などのように細胞膜上や細胞膜近傍に提示される接触性因子が考えられる。このような因子を特定する手がかりを、成長円錐のイメージングから得ようと試みた。 Ca^{2+} シグナル抑制アストロサイトと、自発 Ca^{2+} シグナルを示す正常アストロサイトを混合してモザイク状に培養し、その

キーワード：グリア、アストロサイト、ニューロングリア相互作用、カルシウムイメージング

東京大学大学院 医学系研究科 細胞分子薬理学教室 (113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

E-mail: kznr@m.u-tokyo.ac.jp 原稿受領日：2018 年 2 月 13 日、第 32 回日本薬理学会学術奨励賞受賞講演総説

上を進行する成長円錐の動きを解析した。その結果、正常アストロサイト上を進行している成長円錐が、 Ca^{2+} シグナル抑制アストロサイトに触れた後に進行速度が低下することを発見した(図1B, C)。このことは、アストロサイトの細胞膜上に発現する接触性因子が成長円錐の進行に関わる可能性を強く示唆している。そこで、アストロサイトに発現することが知られている細胞膜上分子あるいは細胞外マトリクス分子のうち、神経突起伸長への影響が報告されている6種類の発現を調べたところ、N-カドヘリンの発現が Ca^{2+} シグナル抑制アストロサイトで減少していることが分かった(図1D)。N-カドヘリンは細胞間接着因子として極めて有名であるが、神経突起伸長を促進する作用も有することが報告されていたため、N-カドヘリンがアストロサイト Ca^{2+} シグナルによる軸索伸長を仲介するかを検証した。正常アストロサイトとニューロンの共培養の培地中にN-カドヘリンの機能阻害抗体を添加すると、成長円錐の進行が抑制された。また、 Ca^{2+} シグナル抑制アストロサイトにN-カドヘリンを強制発現させると、成長円錐の進行速度が有意に回復した。このように、アストロサイトの自発的な Ca^{2+} シグナルがN-カドヘリンの発現量を維持することにより、神経突起伸長を促進することを見出した(3)。

2. 研究2：脳損傷時に生じるアストロサイト Ca^{2+} シグナルの神経保護作用

てんかんや梗塞、脳挫傷、感染、神経変性疾患などによる脳へのダメージは神経細胞死を誘発し、不可逆的な脳機能の低下を引き起こす。このような病態下では、損傷部位近傍のアストロサイトは細胞骨格タンパク質GFAPの顕著な増大や細胞肥大化などの形態変化を伴う大規模な遺伝子発現変動を起こし、反応性アストロサイトへと分化する。反応性アストロサイトは、炎症性サイトカインの放出やプロテオグリカンの発現などにより神経細胞死を誘発・助長あるいは軸索の再投射を妨げるといった脳機能に対してネガティブな作用を持つことが古くから知られていた。しかし、反応性アストロサイトの形成を抑制する遺伝子改変マウスに脳傷害モデルを適用した研究では、生存神経細胞数の減少および脳実質に浸潤する血球細胞の増加、軸索再生の抑制などが見られたことから(4)、反応性アストロサイトが神経保護作用というポジティブな面も併せ持つことが示された。このような相反する作用を人為的に操作できれば脳疾患治療への貢献が期待できるが、そのメカニズムの多くは不明であり、応用は難しいのが現状である。我々はこの問題に別の視点からア

プローチすることを試みた。脳傷害時にはアストロサイトは物理的刺激や神経伝達物質、損傷した細胞からの細胞内容物などに暴露される。これらはいずれもアストロサイトの Ca^{2+} シグナルを惹起するはずである。例えば、高密度で培養しているアストロサイトを電極でつつくと、刺激を受けた細胞から生じた Ca^{2+} シグナルが隣接する細胞に次々と伝搬し、ウェーブ状に広がっていくことはよく知られている。また、ニューロトランスミッターであるグルタミン酸やアセチルコリン、ATPなどをアストロサイトに投与すると、顕著な Ca^{2+} シグナルが生じる。同様のことが、損傷時の生体内のアストロサイトでも起こり、これに引き続き起こるシグナリングカスケードの活性化が、反応性アストロサイト形成や神経保護作用に寄与する可能性があるのではないかと考えた。

この仮説を検証するために、まず、生体内アストロサイトの Ca^{2+} シグナルが脳損傷刺激で惹起されるかを調べた。二光子励起顕微鏡を用いたマウス大脳皮質のin vivo イメージング下で、視野中の一部領域に高出力レーザーによる損傷刺激を与えると、周囲のアストロサイトで Ca^{2+} シグナルが誘発された(図2A上)。アストロサイトの Ca^{2+} シグナル形成には2型 IP_3 受容体($\text{IP}_3\text{R2}$)が必須であることが、 $\text{IP}_3\text{R2}$ ノックアウトマウス($\text{IP}_3\text{R2-KO}$ マウス)の海馬スライスを用いた研究により報告されていた。 $\text{IP}_3\text{R2-KO}$ マウスを入手してin vivo イメージングを行ったところ、傷害刺激による Ca^{2+} シグナルが抑制されていることを確認した(図2A下)。そこで、 $\text{IP}_3\text{R2-KO}$ マウスの大脳皮質にメスを刺入して損傷刺激を与え、反応性アストロサイトの形成がどのようになるかを評価した。興味深いことに、 $\text{IP}_3\text{R2-KO}$ マウスではコントロールマウスよりも反応性アストロサイトが形成されにくく、また、損傷部位近傍で生存しているニューロン数が減少することを見出した(図2B)。脳損傷時に生じるアストロサイト Ca^{2+} シグナルが、反応性アストロサイト形成と神経保護作用を促進する作用を持つと考えられる。

次に、アストロサイト Ca^{2+} シグナルの下流で働く経路・因子の解明を試みた。 IP_3 5-phosphatase 発現による Ca^{2+} シグナル抑制アストロサイトを用いて、通常アストロサイトとの発現遺伝子の差をDNAマイクロアレイで網羅的に解析した。その結果のなかで、 Ca^{2+} シグナルを抑制すると顕著に発現増加するpumilio2(Pum2)という分子に着目した。Pum2は、3'非翻訳領域にUGUAA(U)AUAの配列を持つmRNAに特異的に結合する翻訳抑制因子である。前述のように、培養アストロサイトの Ca^{2+} シグナルは、N-カドヘリンの発現を制

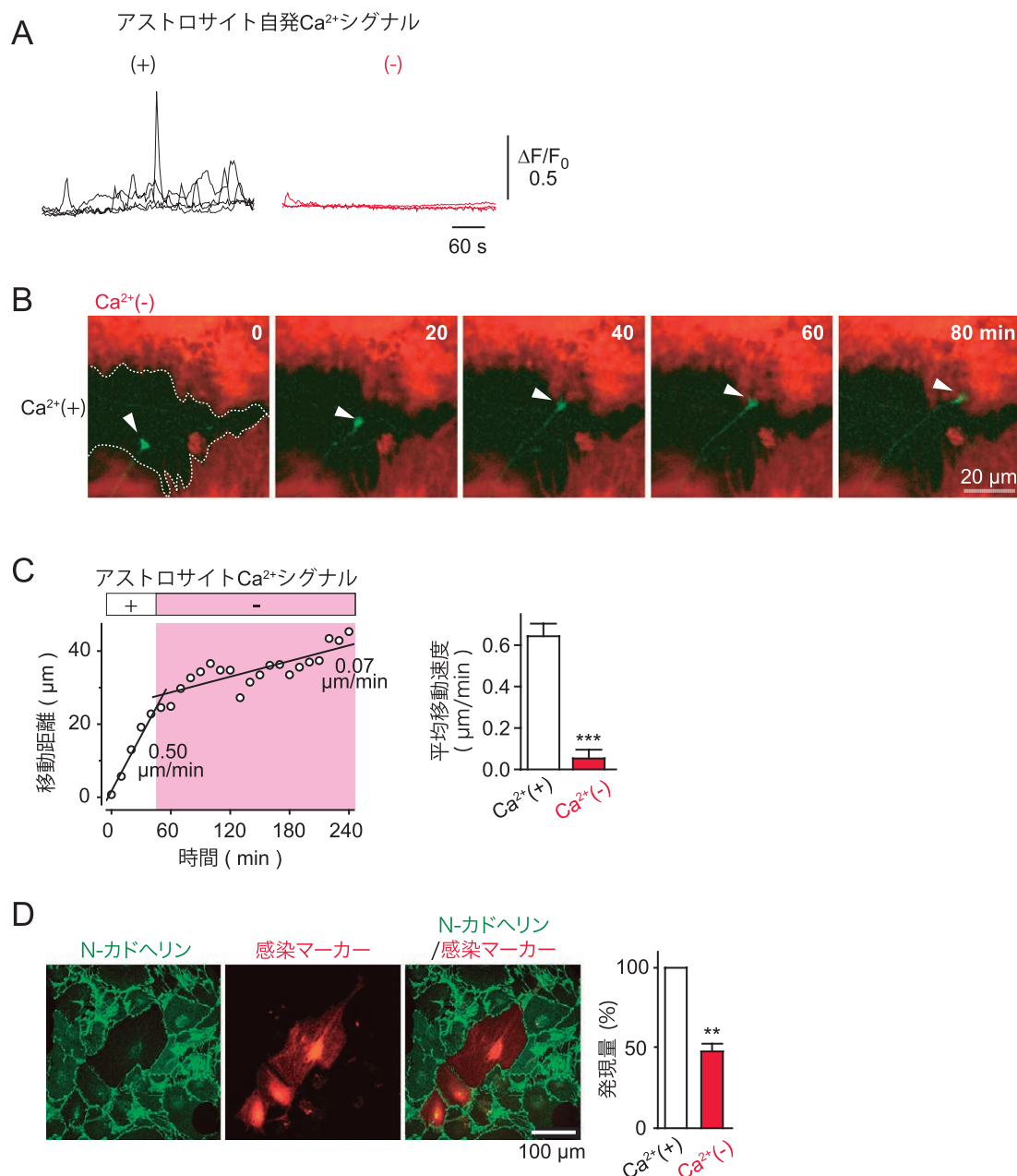


図1 アストロサイトCa²⁺シグナルによる神経突起伸長促進

A: 培養海馬アストロサイトにおける自発Ca²⁺シグナル。非刺激条件下で見られる自発的なCa²⁺シグナル(左; +)は、IP₃分解酵素であるIP₃ 5-phosphataseの恒常発現によりほぼ完全に消失した(右; -)。Fluo-4により測定。BおよびC: 成長円錐の経時観察において、コントロールアストロサイト(Ca²⁺(+))の上からCa²⁺シグナル抑制アストロサイト(Ca²⁺(-))の上へと移動するものに着目した。測定開始から約40分でCa²⁺(-)アストロサイトに接触した後、進行が停止したように見えた。移動速度を定量した結果、Ca²⁺(-)アストロサイトに接触した後は進行速度が激減していることがわかった(C, 左)。13例の細胞で同様の結果を得た(右)。D: N-カドヘリン抗体を用いた免疫染色。培養アストロサイトにおけるN-カドヘリンの発現量はCa²⁺シグナル抑制により低下した。

御するという知見を得ていたため、N-カドヘリン mRNAの配列を調べたところ、3' 非翻訳領域開始点から730塩基ほど下流にPum2 認識配列を持つことがわかった。この配列は、哺乳類から魚類まで動物門を超えてN-カドヘリンの3' 非翻訳領域の約700塩基下流に存在しており、その保存性の高さから機能的重要性が期待される。そこで、Pum2がアストロサイトのN-カドヘリン発現量を実際に制御できるかを検証した。培養アストロサイトへのトランスフェクションおよびマウス大

脳皮質へのウイルス注入によるアストロサイトへのPum2 過剰発現は、N-カドヘリン発現量の顕著な低下を引き起こした。さらに、GFPコード領域の下流にN-カドヘリン3' 非翻訳領域を付与した遺伝子を培養細胞に発現させるレポーターアッセイにより、Pum2によるN-カドヘリンの発現制御が、N-カドヘリン mRNAの3' 非翻訳領域にあるPum2 認識配列に依存することを確認した。これらの結果から、Pum2がN-カドヘリンの翻訳抑制因子としても機能することが示唆された。

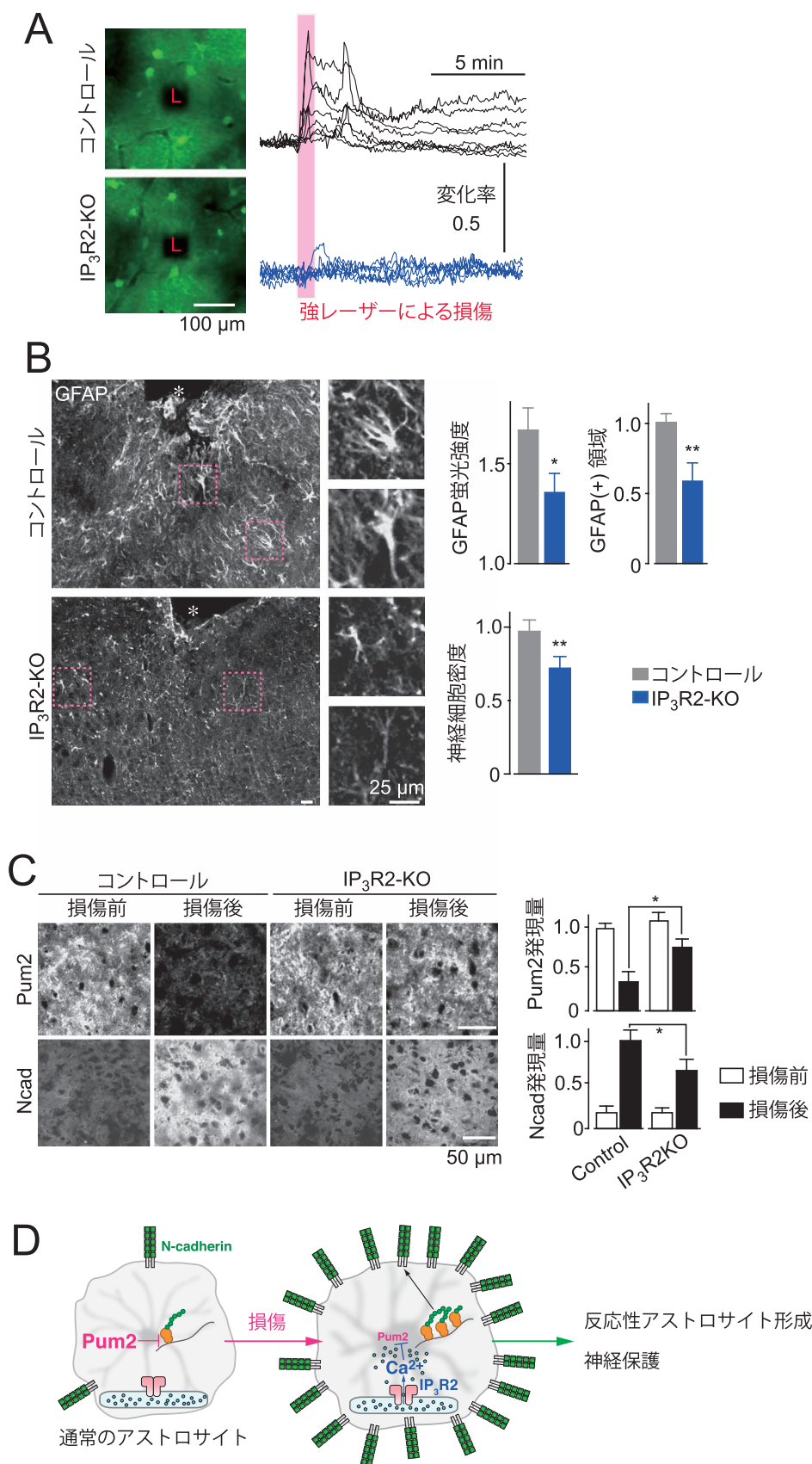


図2 脳損傷時のアストロサイト Ca^{2+} シグナルによる神経保護作用

A: 脳傷害により活性化されるアストロサイト Ca^{2+} シグナル。マウス大脳皮質 in vivo イメージング中に高出力レーザーを視野の一部(L)に当てた。この Ca^{2+} シグナルはIP₃R2-KO マウスでは激減した。B: メス刺入による脳傷害モデル適用後の大脳皮質アストロサイト。コントロール群で多く生じる反応性アストロサイトは、IP₃R2-KO マウスでは有意に減少した。生存する神経細胞数の減少も見られた。C: 大脳皮質におけるN-カドヘリンおよびPum2の発現量。D: 傷害誘発 Ca^{2+} シグナルによる反応性アストロサイト形成とアストロサイトによる神経保護作用のメカニズム。

マウス大脳皮質におけるPum2とN-カドヘリンの発現量を免疫染色により調べたところ、正常時にはPum2が多くN-カドヘリンが少ない、損傷モデル適用後にはPum2が少なくなりN-カドヘリンが増えるという逆相関が見られたため(図2C, コントロール)、実際の生体内でも内因性のPum2がN-カドヘリンの発現を制御している可能性が示唆される。次にアストロサイト Ca^{2+} シグナルが抑制されている $\text{IP}_3\text{R2-KO}$ マウスを用いて解析したところ、損傷によるPum2減少とN-カドヘリン増大が有意に減弱したことから(図2C, $\text{IP}_3\text{R2-KO}$)、この現象に損傷誘発性の Ca^{2+} シグナルが必要であることが示唆された。このような結果から、 $\text{IP}_3\text{R2-KO}$ マウスで見られる反応性アストロサイトの形成不全と神経保護作用の低下はN-カドヘリンを介することが予想される。これを検証するため、アストロサイト特異的にN-カドヘリンをノックアウトしたマウスを作製し、損傷モデルを適用した。その結果、反応性アストロサイトの形成不全と神経保護作用の低下という、 $\text{IP}_3\text{R2-KO}$ マウスと同様のフェノタイプが確認することができた。

以上の結果は、次のシグナル伝達経路の存在を示す。
 ①健全な脳のアストロサイトに多く発現するPum2は、その翻訳抑制能によりN-カドヘリンの発現量を低く保っている。
 ②損傷により Ca^{2+} シグナルが惹起されるとPum2のダウンレギュレーションが起こり、
 ③Pum2による抑制が減弱するためN-カドヘリン発現量が増大する。その結果、
 ④N-カドヘリンを介する反応性アストロサイト形成と神経保護作用が促進される(図2D)(5)。反応性アストロサイトは脳傷害だけでなく様々な病態で生じるため、この経路は脳の病態に共通して起こる可能性がある。 Ca^{2+} シグナルがどのようにPum2発現を制御するか、また、N-カドヘリンがどのようにして反応性アストロサイト形成と神経保護作用に貢献するか、などといった点の解明は今後の課題である。

3. 研究3: In vivo Ca^{2+} イメージングに適する遺伝子改変マウスの開発

従来のin vivoイメージング解析では、fluo-4やOregon Green BATPAなどといった低分子量化合物の Ca^{2+} インジケータを脳内注入もしくは脳表から取り込ませることにより細胞に導入する。この手法では、ある程度の細胞種指向性はあるものの、神経細胞など他種の脳細胞にも Ca^{2+} 指示薬が導入される。そのため、アストロサイトが選択的に取り込むローダミン系色素Sulforhodamine101で標識するなどしたうに、

神経細胞や神経線維のシグナルの混入を避けるべくアストロサイト細胞体付近に関心領域を設定してシグナルを抽出する必要がある。シナプスや血管などの他細胞に広く接することから“細胞間相互作用の場”を担うと考えられるアストロサイト微細突起領域にフォーカスし、その Ca^{2+} シグナルをより正確に解析できる手法が、ニューロングリア機能連関のさらなる解明に必要である。そこで筆者らは、高感度 Ca^{2+} 指示タンパク質yellowameleon Nano50 (YC-Nano50)(図3A)(6)を、遺伝子改変マウス作成技術であるKnockin-mediated ENhanced Gene Expression system with transactivator-tet operator strategy (KENGE-tet)(7)によりアストロサイト特異的に発現させた(*Mlc1*-YC-Nano50マウス)(図3B)(8)。

YC-Nano50は見かけの Ca^{2+} 解離定数が50 nM付近にあり、 Ca^{2+} シグナルを非常に高感度で検出できる。また、YC-Nano50は Ca^{2+} 濃度依存的なcyan fluorescent protein (CFP)とyellow fluorescent protein (YFP)間の蛍光共鳴エネルギー移動(Föresters resonance energy transfer: FRET)を利用した Ca^{2+} センサーである。YFPとCFPの蛍光強度比を算出することで、in vivoイメージングでは不可避な体動・呼吸などに伴うノイズを除去し、 Ca^{2+} シグナル成分を抽出することが可能である(図3C)。また、YC-Nano50のYFP蛍光は静止時 Ca^{2+} 濃度においても非常に明るいため、微細突起を含むアストロサイトの形態を高解像度で捉えながらの Ca^{2+} イメージング解析が可能である。

麻酔下の*Mlc1*-YC-Nano50マウス大脳皮質におけるイメージング解析から、微細突起に局限して発生し、細胞体では生じないという興味深い時空間動態を示す Ca^{2+} シグナルを発見した(図3D)。このシグナルが星の瞬きを連想させることから“ Ca^{2+} twinkle”と命名した。 Ca^{2+} twinkleの発生メカニズムに迫るため、*Mlc1*-YC-Nano50マウスと $\text{IP}_3\text{R2-KO}$ マウスを交配した産仔でin vivoイメージングを行った。このマウスでは Ca^{2+} twinkleの発生頻度は著しく低下したが、発生箇所とシグナル強度・持続時間は*Mlc1*-YC-Nano50マウスとほぼ同等であった。従って、 Ca^{2+} twinkleの発生頻度には $\text{IP}_3\text{R2}$ が大きく寄与するが、これ以外のシグナル特性は他の未解明なメカニズムにより維持されることが示唆された。さらに、in vivoイメージング下の*Mlc1*-YC-Nano50マウス尾部を電気刺激すると、多数の大脳皮質アストロサイトにおいて、微細突起先端から生じた Ca^{2+} シグナルが徐々に細胞内部へと広がり、最後に細胞体に到達する様子を鮮明に可視化することができた(図3E)。この Ca^{2+} シグナルは $\text{IP}_3\text{R2-KO}$ マ

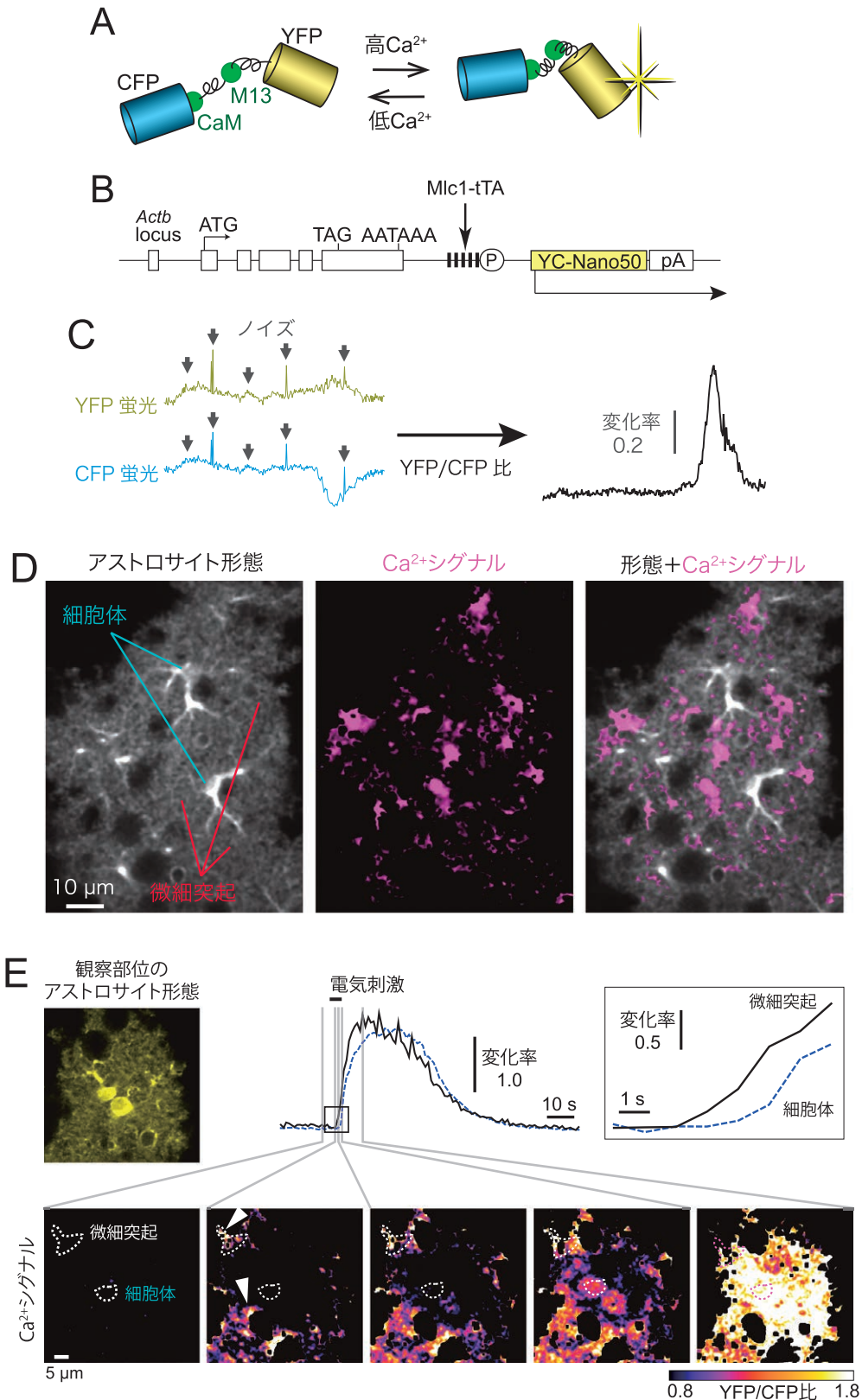


図3 YC-Nano50 発現マウスを用いた *in vivo* アストロサイト Ca²⁺シグナル

A: Ca²⁺指示タンパク質 YC-Nano50 の Ca²⁺応答. Ca²⁺センサーであるカルモジュリン (CaM) とその基質ペプチド M13 の Ca²⁺依存的な相互作用により CFP と YFP 間の FRET が起きる. B: KENGE-tet システムによる YC-Nano50 発現模式図. コンディショナル YC-Nano50 発現マウスに *Mlc1*-tTA マウスを交配した産仔はアストロサイト特異的に YC-Nano50 を発現する. C: YFP/CFP 比の算出による Ca²⁺シグナルの抽出. YFP あるいは CFP の蛍光強度経時変化に混入するノイズ (左) が軽減される (右). D: 非刺激条件下で見られる微細突起に局限した Ca²⁺シグナル "Ca²⁺twinkle". YFP 蛍光によるアストロサイト形態 (左) と 5 分間の測定時間内で Ca²⁺twinkle が見られた箇所 (中央) を重ね合わせると, Ca²⁺twinkle が細胞体から離れた微細突起でのみ起きていることがわかる (右). E: 刺激時にアストロサイト全体に広がる Ca²⁺シグナル. 尻尾の電気刺激直後に大きな Ca²⁺シグナルが微細突起で発生し, 細胞体へと伝搬する様子が観察できた.

ウスではほぼ消失した。これらの結果から、刺激依存的な Ca^{2+} シグナルは細胞体を含む細胞全体に伝搬することができ、その発生メカニズムに $\text{IP}_3\text{R2}$ が大きく関わることを示された。小分子 Ca^{2+} 指示薬を用いた従来法では、こうした大規模な Ca^{2+} シグナルのみを捉えていた可能性が高い。微細突起における小さい Ca^{2+} シグナルを鮮明に捉えられる本手法は、未だ謎の残るアストロサイトの機能解明に大きく貢献することが期待できる。最近では、ウイルスベクターもしくは遺伝子改変マウスにより他のタンパク質型 Ca^{2+} インジケータを発現させた *in vivo* イメージング手法も確立されている(9)。インジケータの感度や波長特性を理解し、実験目的に応じた手法の選択が必要である。

YC-Nano50 発現マウスの応用範囲は広く、細胞種特異的なプロモーターをもつ tTA マウスを選択すれば、ミクログリア・オリゴデンドロサイト等の別種のグリア細胞をはじめ、神経細胞、あるいは末梢臓器の細胞など、あらゆる細胞に YC-Nano50 の発現が可能である。実際に我々は、臍β細胞特異的に YC-Nano50 を発現するマウスを用いた *in vivo* イメージングを行い、腸の蠕動運動や呼吸由来のノイズがあるなかでβ細胞の Ca^{2+} シグナルを長時間取得することに成功している。このように本手法は、グリア細胞の生理・病理機能だけでなく、あらゆる細胞種の生体内活動をモニターするための極めて強力なツールであると言える。

4. まとめ

上記のように、発生・発達段階における神経成長に関わる Ca^{2+} シグナルの解明(研究1)あるいは脳損傷

治療過程(研究2)に関わる Ca^{2+} シグナルとその下流因子の解明、さらに今後の生体内イメージング解析を大幅に促進できるツールの開発と新規 Ca^{2+} シグナルの発見(研究3)により、筆者らはアストロサイトの機能解明をすすめてきた。また、筆者らは小胞体内腔およびミトコンドリアの Ca^{2+} シグナルを高い時空間解像度で蛍光測定可能なツール(CEPIA)も開発しており(10)、今では世界中で多くの研究者に使われている。これらの知見やツールを活かして、今後もグリア研究・カルシウムシグナリング研究を展開していきたい。これが脳科学や生命科学の発展だけでなく、創薬・医療の発展の一助となると幸いである。

謝辞：本稿で紹介した研究は、飯野正光先生(日本大学医学部/東京大学大学院医学系研究科)のご指導のもと、また、田中謙二先生(慶応大学医学部)との共同研究、関谷敬先生(東京大学大学院医学系研究科)をはじめとする共著者および飯野研究室(東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理学教室)の皆様の多大なるご支援とご協力により行われました。心より感謝いたします。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Ullian EM, et al. Science. 2001;291:657-661.
- 2) Hirose K, et al. Science. 1999;284:1527-1530.
- 3) Kanemaru K, et al. J Neurosci. 2007;27:8957-8966.
- 4) Bush TG, et al. Neuron. 1999;23:297-308.
- 5) Kanemaru K, et al. PNAS. 2013;110:11612-11617.
- 6) Horikawa K, et al. Nat Methods. 2010;9:729-732.
- 7) Tanaka KF, et al. Cell Rep. 2012;2:397-406.
- 8) Kanemaru K, et al. Cell Rep. 2014;8:311-318.
- 9) 繁富英治, 他. 日薬理誌. 2016;148:75-80.
- 10) Suzuki J, et al. Nat Commun. 2014;5:4153.

Analysis of astrocytic function using Ca^{2+} imaging

Kazunori Kanemaru

Department of Cellular and Molecular Pharmacology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

Abstract. Accumulating evidence shows astrocytic contribution to brain function and diseases, however, the function of astrocytes remains to be uncovered. Dynamic changes in the intracellular Ca^{2+} level in astrocytes are one of the outstanding indexes of ongoing astrocytic activity. Therefore, we tried to uncover astrocytic function using approaches combined with Ca^{2+} imaging. We showed that astrocytes promote neuronal growth and survival after injury via Ca^{2+} -dependent regulation of a cell adhesion protein, N-cadherin. Furthermore, we developed a method for the monitoring of astrocytic Ca^{2+} signals in living mouse brain, and found a previously unidentified pattern of spontaneous Ca^{2+} signals, which are preferably displayed in astrocytic fine processes. These findings and methods are promising to provide further information of astrocytic function, which can contribute to development of pharmacology.