●特集 情報素子としての生体膜およびその模倣技術の開発

神経—グリア細胞系におけるカルシウム波と カルシウム振動：その測定と発生機構

佐野雅己・中村秀樹・吉田 篤

東京大学大学院理学系研究科 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

Observation of Calcium Activities in Newron-Glia Co-cultured System : Seacrhing for underling mechanism

Masaki Sano, Hideki Nakamura and Atsushi Yoshida

Department of Physics, Graduate School of Science, University of Tokyo,
Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

Cultured neural network is a useful tool for the understanding of fundamental functions and structure of nervous system. In this biological neural network, nerve cells mutually communicate by electrical or chemical interactions, and exhibit collective dynamics of activities such as synchronous bursting or calcium wave propagation. Photostimulation by using caged-glutamate were performed to elucidate the mechanism of Ca wave propagations through the measurement of the speed of Ca wave, rising time of Ca increase, and range of propagation, etc. To analyze the activity and dynamical connectivity of the cultured network, we quantified spontaneous collective dynamics of the network by lowering magnesium concentration in extracellular solution. From the visualization of network structure, cell type discrimination by MAP2 monochronal antibody, and measurement of dynamical activity by $[Ca^{2+}]$ sensitive dye, we quantitatively elucidated that collectivity of the network activities were increased due to the development of long-range interaction between neurons.

Key words: neuron / glial cells / astrocyte / calcium wave / calcium oscillation / model

1 はじめに

脳の情報処理の基本単位である神経細胞に関しては、膨大な電気生理学データが積み重ねられてきたが、近年、ゲノム解析の急速な進展や細胞内信号伝達系の解析が進むにつれ、神経系においても化学物質等による電位以外の信号伝達に関する研究が今後急速に進展することが予想されている。また、神経細胞だけでなく、グリア細胞の機能に対する関心も高まっている。従来、グリア細胞

は神経系の栄養補給など補助的な役割を担っていると考えられてきたが、両者が化学物質を仲介として相互作用していることが明らかになり、現在では積極的に情報処理にかかわっている可能性も指摘されており^{1), 2)}、神経—グリア系の研究は今後いっそう重要性をましていくものと考えられる。私たちは、神経系に見られる興奮や振動現象の非線形・非平衡の側面と、そのようなアクティブな素子が多数集まったシステムが集団活動により機能を持つことに興味を持ち、細胞の集団活動

Primary dissociated culture of rat cortex

- E18 Rat Cortex,
- Polyethylenimine coating, 10^6 cells per well
- DMEM, 37°C , CO_2 5%

Cf. Kuroda, Kobayashi, J. Neurophysiology, 70, 1606 (1993)

Maeda, Jinbo, J. Neuroscience, 15, 6834 (1995)

Fig. 1 Dissociated Cell Culture of Neuron and Glia

を記録し解析することから機能の理解に迫ろうと考え数年前に研究を開始した。現在、私たちは神経—グリア集団に見られる極めて動的な信号伝達であるカルシウム波とカルシウム振動³⁾に着目して、その動態と発生機構や機能的役割などを解明すべく様々な実験を行っている。興奮波の伝播と同期振動は、非線形・非平衡系の理論的枠組みでは比較的良好に扱われる現象であるが、細胞内・細胞間のカルシウム伝播に関する最近の実験結果により、それが通常の興奮波と異なった性質を持ち、生理学的にも意味を持つものであることが分かってきた。以下にカルシウム波に関する研究の現状と私たちが得た新しい知見について述べることにする。

2. 実験方法および結果

2.1 実験系

神経—グリアの培養ネットワークを構成するため、ラット胎児 (17~18日) の大脳皮質から取り出した細胞を解離し、ガラス基盤上に分散培養⁴⁾、培養日数の経過に伴って形成されたネットワークについてその構造と細胞内 Ca^{2+} 濃度の可視化と集団活動の定量化などを行った (Fig.1)。細胞内 Ca^{2+} 濃度の計測には、レーザー共焦点顕微鏡と蛍光顕微鏡を用いた。また Ca^{2+} 濃度の観測後には細胞を固定し、抗体染色を行うことにより、神経細胞とグリア細胞を特定し Ca^{2+} 活動における両者の

Fig. 2 Photostimulation by a flush pulse laser photolysis of caged compound

Fig. 3 Stimulation by glutamate using laser photolysis and Ca^{2+} response of the cell

動態の違いを解析した。

2.2 外部刺激によるカルシウム波の生成

(a) レーザーフォトリシスによる局所刺激

神経グリア系におけるカルシウム波などの応答を調べるには、ピペットによる薬物刺激などの方法が考えられるが、ここではレーザーフォトリシスによる局所刺激の方法を取る^{5),6)}。レーザー照射とcaged化合物を用いたこの方法では、ピペットによる刺激に比べて、局所的でかつ正確なタイミングで神経伝達物質を与えることができるという利点がある。この方法では、神経のデンドライトの近傍にUVレーザーで5 nsの時間幅のパルス照射することにより、あらかじめ溶液に溶かしたcaged-Glutamateを解離させ (Fig.2)、本来は前シナプスから放出されて後シナプスに伝えられる神経伝達物質であるグルタミン酸を、特定の細胞のねらった部位に局所的に与えることが可能である。この際の刺激スポットの大きさは、対物レンズやレーザーパワーを変えることにより $1\mu\text{m}$ から $20\mu\text{m}$ の範囲で調整可能である。また与えるグルタミン酸の濃度は、あらかじめ溶かしておく

Fig. 4 Ca^{2+} wave propagation by stimulation
(Horizontal axis: distance of propagation (μm),
Vertical axis: elapsed time (sec))

caged-Glutamateの濃度とレーザー光のパワー，照射するパルスの回数などによって制御可能であることなど様々の利点を持っている．実際の照射スポットサイズや形状は，caged-Fluoresceinなどを用いて，レーザー解離により生じた蛍光を観測し，スポットの形状やプロファイルを計測することで一定の校正を行うことができる．このように細胞に目的の情報伝達物質を与え，細胞内イオンの標識用としてはカルシウム感受性蛍光色素などを使うことにより，刺激による細胞の応答を光学的に測定することができる．

2.3 測定結果

神経グリア培養系において，caged-Glutamateをレーザーフォトリシスにより解離させ，一つの細胞の近傍にグルタミン酸を与えると，刺激を与えられた細胞のカルシウム濃度は一定の時間遅れの後に上昇し，その後，隣接した細胞のカルシウム濃度が上昇し，さらに隣接した細胞へとカルシウムの波が伝播していく様子が観察される．この場合の，個々の細胞の応答と細胞間のカルシウム波伝播の結果をFig.3とFig.4に示す．これらの応答から測定可能なことはいくつかある．第一に単一細胞への刺激に対するカルシウム応答の立ち上がりを解析することにより， Ca^{2+} の増幅機構が分かる．Fig.5に単一細胞のGlutamate刺激に対する応

Fig.5 Ca^{2+} response of single cell

答を片対数グラフで示す．1桁以上の範囲において相対濃度が刺激とともに指数関数的に上昇していることがわかる．このことから，振幅の小さい線形領域においては，指数関数的に Ca^{2+} 濃度が上昇する自己増殖的な反応過程があることが分かる．また，この時の指数関数の特徴的時間から反応の立ち上がり時間として， $\tau \approx 0.1\text{sec}$ という値が得られた．減衰過程に関しては，振幅が小さい範囲においてのみ指数関数的な減衰を見せているが，上昇に比べやや複雑な応答を示していることが言える．次に細胞間のカルシウム波伝播に関してこの実験から得られる知見について述べる．まず，カルシウム波が伝播する距離は有限であり，その距離は与えられた伝達物質の量に依存することが明らかになった． $10\mu\text{M}$ のcaged-Glutamate濃度の場合には1度の刺激により，4～5個先の細胞までしか伝播しないが，レーザーパルスを連続して照射し，解離する量を増やしてやると10個以上離れた細胞にまでカルシウム波が伝播する．各細胞の応答が最大値の半分の振幅に達する時間から，細胞間の伝播の時間遅れを測定し，伝播速度を見積もると4～5個までの範囲では約 $15\mu\text{m/sec}$ の速度であった．非線形波動に関する知見から，反応の立ち上がり時間 τ と波の伝播時間 v との間には，次のような関係があることが知られている．

Fig. 6 Ca^{2+} wave propagation curve
(Horizontal axis: elapsed time (sec), Vertical axis: distance of propagation (μm))

$$v = \sqrt{\frac{D}{\tau}}$$

ただし、ここで D は興奮波の興奮性物質の拡散定数である。この関係に上で得られた値を代入することにより、 $D \sim 220 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ という値が得られる。カルシウム波の興奮を引き起こす物質として、イノシトール 3 リン酸 (IP_3) や Ca^{2+} 自身が候補として挙げられるが、それぞれの細胞内での拡散定数は、約 $280 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ と $13 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ 程度であることが知られている⁷⁾。(IP_3 より小さい分子である Ca^{2+} イオンの拡散定数が小さいのは、カルシウムに結合する蛋白やキレート物質などが細胞内に多く存在するためであると考えられている。) 上で得られた拡散定数との比較から、カルシウム波の伝播は、 Ca^{2+} によって引き起こされるのではなく IP_3 の拡散によって引き起こされていると考えることができる。 IP_3 は、細胞間のギャップジャンクションを通過して隣接した細胞に拡散することが知られており、隣接細胞に流入した IP_3 が、 IP_3 レセプターに結合し小胞体からの Ca^{2+} の放出を促すものと考えられる。このことは、 Ca^{2+} 波の伝播距離が有限であるという事実によっても裏づけられる。 IP_3 は、グルタミン酸を受けたレセプターの近傍で生成されるので、隣接した細胞での IP_3 濃度の上昇は他の細胞からの IP_3 の拡散だけによっている。そのため IP_3 が細胞間を拡散するにつれ濃度が下

Fig. 7 Mechanism of Ca^{2+} wave propagation

がっていき、 Ca^{2+} 放出に必要な閾値を下回ると Ca^{2+} 波の伝播は停止する。この時、伝播速度は刺激部位から遠ざかるほど遅くなり、伝播距離は時間の平方根に比例する振る舞いをみせる (Fig. 6)。このことも IP_3 の拡散現象として説明できる。また、刺激物質の量が多いほど伝播距離が延びる事実は、放出される IP_3 の量が多い場合は、遠くまで IP_3 が拡散しても閾値レベルを超える範囲が広がることで説明可能である。

2.4 カルシウム波の発生機構

以上述べた実験事実を反映して、 Ca^{2+} 波のモデルを構成することができる。考慮すべきは、外部刺激によって生成される IP_3 の拡散、 IP_3 が IP_3 受容体に結合することにより小胞体より放出される Ca^{2+} (IP_3 Induced Calcium Release: IICR) と Ca^{2+} が小胞体の受容体に結合することによって放出される Ca^{2+} (Calcium Induced Calcium Release: CICR) である⁸⁾ (Fig. 7)。 Ca^{2+} 波に関してはこれまで、 IP_3 だけによる Ca^{2+} の放出を考え CICR を考えないモデルが提案されているが⁹⁾、このモデルでは実験で得られた細胞の Ca^{2+} 応答のデータと一致することはできない。この受動的なモデルでは、 IP_3 によって引き起こされた Ca^{2+} 濃度の上昇が、拡散により IP_3 濃度が減少するまでの期間続くため、最初に刺激された細胞が最後まで最も高い Ca^{2+} 濃度を保つことになってしまうからである。しかし、実験ではどの細胞もほぼ一定の応答波形を示し、 Ca^{2+} 濃度の高い細胞は刺激を受けた細胞から遠くの細胞へと順々に伝わっていくことが分かっている。この実験事実を説明するには、受動的モデルでは不十分で CICR を取り入れながら、 IP_3 の拡散が Ca^{2+} の拡散より大きいことを取り入れたモデルが必要になる。そこで我々は、IICR と CICR を取

Fig. 8 Time series of spontaneous Ca activities. (a) day 4, (b) day 8, (c) day 14

り入れた以下のような Ca^{2+} 波のモデルを考え、シミュレーションを行っている。

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \alpha - \frac{V_p k_p P}{k_p + P} + D_p \nabla^2 P$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = kP + J_{\text{flux}} - J_{\text{pump}} - \beta c + D_c \nabla^2 c + \beta_i c_i$$

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = J_{\text{pump}} - J_{\text{flux}} - \beta_i c_i$$

$$J_{\text{flux}} = k_{\text{flux}} \frac{c^n}{k_A^n + c^n} \frac{c_i^r}{k_i^r + c_i^r}$$

$$J_{\text{pump}} = \frac{\gamma c^m}{k_r^m + c^m}$$

ここで、 P は IP_3 の濃度、 c は細胞質内の Ca^{2+} 濃度、 c_i は小胞体内の Ca^{2+} 濃度、 J_{flux} は小胞体内からCICRによって放出される Ca^{2+} の量、 J_{pump} は細胞質内から小胞体内に輸送される Ca^{2+} の量を表している。

3. 自発的カルシウム振動の発生

3.1 同期発火現象の定量化

培養細胞系は、通常の培養条件や観測用バッファ溶液で観測を行うと、カルシウム活動を見る限りでは自発的な活動はまれにしか起こらない。そのため Ca^{2+} 波の応答を見ようとすればGlutamate刺激や電気刺激を行う必要があった。まれに一部の細胞のカルシウム濃度が時間振動することもあるが、それが細胞全体に広がることはない。(電気活動を測定した報告によると、自発的なアクションポテンシャルは、頻度は高くないが発生している。)しかし、測定用の溶液を Mg^{2+} を含まないものに変えてやると、細胞系全体に強い同期発火のバーストが起こり、同時にカルシウム濃度の振動が観測される。この過程における時系列の観測結果をFig.8に示す。計測は、視野内の全ての細胞(約500個)についてその時系列を約20分間にわたり同時記録した。これは、もともと一定程度存在する自発的な電気活動によりシナプスから神経伝達物質が放出され、シナプス後細胞のデンドライトの電位が上昇するとともに、 Mg^{2+} フリーにしたことにより、神経細胞のNMDAレセプターのMgブロックが外れやすくなり、 Ca^{2+} イオンが神経細胞内に流入し濃度が上昇し、遅れて Ca^{2+} ポンプが働くことにより振動が起こっているものと予想される。また、この時に興奮した細胞のシナプスからはグルタミン酸が放出されるため、周辺のグリア細胞でも Ca^{2+} 濃度の上昇が引き起こされ細胞系全体に同期的振動が広がるものと考えられる。この同期発火状態では約200ミクロン離れた視野内の細胞間で時間の遅れは殆ど見られない(30msec以下)ことから、 IP_3 や Ca^{2+} の興奮波の伝播速度を越えており、電気的興奮波による同期振動現象であると考えられる。我々はこの状態にあ

Development of Neuron-Neuron Correlations

Fig. 9 Evolution of a distribution function of neuron-neuron correlation coefficient, (a) day 4, (b) day 8, (c) day 14

る全ての細胞の時系列を計測し、相互相関関数を測り解析した。時系列解析を行った結果、自発発火状態の Ca^{2+} 活動パターンには、上で述べた同期発火の他にも、殆ど同期が見られず各細胞がほぼランダムに発火するランダム発火や、まれには伝播型の Ca^{2+} 波も観測されることを確認した。このうち同期発火が見られた場合について、神経細胞とグリア細胞がどのように相互作用しているのかを確かめるため、測定終了後直ちに抗体染色を行い、神経とグリア細胞を弁別し、細胞の種類を分けて相互相関を計算した。抗体染色には、神経に特異的に発現するMAP2の抗体を用い、さらにそれに結合する2次抗体で蛍光観察を行った。神経—神経間の相関係数、神経—グリア間の相関係数、グリア—グリア間の相関係数を全ての細胞の組み合わせについて計算し、それぞれの相関係数のヒストグラムを得て、培養からの日数とともに分布関数がどう変化するかを調べたのがFig.9, Fig.10, Fig.11である。最も相関の高いものは、

Development of Neuron-Glia Correlations

Fig.10 Evolution of a distribution function of neuron-glia correlation coefficient, (a) day 4, (b) day 8, (c) day 14

神経—神経間の相関であり、培養4日目では殆ど相関がなかったものが8日目では相関が上昇し、14日目では殆どの細胞間で強い相関が見られる。これに対して神経とグリアの Ca^{2+} 活動の相関は弱いですが、14日目では相関係数の平均値が0から正にシフトしており、両者が情報的に相互作用して同期発火が起こっていることを示す実験結果が得られた。グリア—グリア間の相関もほぼ同様であった。また同期活動の解析には新しい試みとして改良された主成分分析を用いて、全細胞数の中で何個の細胞が同期しているかを定量化した。相関係数の行列の固有値と固有ベクトルが、互いに直交する相関クラスターの分解に関係していることを利用して、相関の強いクラスターに含まれる細胞を抽出した。その結果、主成分分析の第一固有ベクトルに対応する同期クラスターに含まれる細胞が日数とともに増大し、培養1週間から2週間では、ほぼ半数の細胞が第一主成分で説明される同期発火を起こすようになり、全体の同期化が強ま

Fig.11 Evolution of a distribution function of glia-glia correlation coefficient, (a) day 4, (b) day 8, (c) day 14

っていく様子が明確になった。

3.2 ネットワーク構造の定量化

培養日数とともに形成されるネットワーク構造をMAP2の抗体染色により可視化し、細胞同士が互いに接続していると見られるクラスターの大きさを定量化した。培養5日目と14日目におけるネットワークの構造をそれぞれFig.12, Fig.13に示す。定量化の方法には、Gyration 半径の測定を用いた。その結果、接続の広がりを表すGyration 半径が日数とともに指数関数的に成長する様子が明らかになった (Fig.14)。また、Gyration 半径と同期発火には強い相関があることが確認された。実際に培養日数と無関係にプロットした全細胞ペアの相関係数の平均値とGyration 半径の関係は強い正の相関を持っていることは当然予想した通りであった。しかし、同じ培養日数でもサンプルによるばらつきのためネットワークの発達の仕方に違

Fig.12 Network structure of the culture on day 5 (MAP2 monochromal staining)

Fig.13 Network structure of the culture on day 11 (MAP2 monochromal staining)

Fig.14 Gyration radius of the maximum cluster in the network vs. elapsed days after dissection.

いがある場合があり、同じ日数でもGyration半径はかなり異なってくる。このようなデータに対しても同じ培養日数のサンプルでGyration 半径と平均相関係数をプロットするといっそう分散が小さ

く強い正の相関が見られた。このことは、発達したデンドライト構造により互いにシナプス結合を形成したネットワークの広がりが同期的なCa振動にとって不可欠であることを示していると考えられる。

4. カルシウム波と振動の生物学的意義

脳細胞の半分以上はグリア細胞が占めているが、その機能は最近まで神経細胞の補助的なものと考えられてきた。しかし、ここにも述べたように最近の研究で、神経グリアの複合系として脳は、ダイナミックな活動を行っていることが明らかになってきた。脳の中で通常存在するのは大型グリア細胞（マクログリア）であり、その中にはアストロサイトやオリゴデンドロサイトが含まれる。現在では、アストロサイトは脳の種々の機能に関わっているとされ、ニューロンの発育、シナプスの形成、細胞間隙の K^+ イオン濃度の調節によるニューロンの興奮性の調節、脳血液関門の形成、ニューロンのエネルギー源であるグリコーゲンの貯蔵とグルコースの遊離、脳における免疫機能などを担っているとされている。生体内でも存在する Ca^{2+} 波は、神経の興奮とグルタミン酸の放出によって引き起こされ^{10), 11)}、その細胞を含む数10ミクロンから数100ミクロンの空間領域に広がっていく。この空間領域は局所的ではあるが、細胞数としてはかなり多くの細胞を含んでいる。 Ca^{2+} 波の伝播により信号を受け取ったグリアは、発生過程ではニューロンの発育を調節することによりニューロンの空間分布や接続に影響を与えることが予想される。 Ca^{2+} 波が伝わった空間領域でのシナプス形成を促進あるいは抑制したり、細胞間隙の K^+ イオン濃度の調節により領域内のニューロンを興奮しやすくするなどのフィードバック

を通じて脳の学習機能に大きな影響を与えている可能性も十分考えられる。今後、電気的測定と光学的測定によるネットワークのマクロレベルの可塑性の詳細、さらにその分子機構に関する実験が進展することにより、脳の機能形成の新しい姿が見えてくることが期待される。

謝 辞

本報告は、日本膜学会第23回年会におけるシンポジウムの講演に新しいデータも付け加え、書き改めた記録である。講演の機会を与えていただいた委員の皆様に感謝します。

本研究は、交流協会の援助により実施されました。ここに感謝します。

文 献

- 1) Parpura V., Basarsky T., Liu F., Jeftinija K., Jeftinija S., and Haydon P G., *Nature*, **369**, 744-747 (1994).
- 2) Pasti L., Volterra A., Pozzan T., and Carmignoto G., *J. Neurosci.*, **17**, 7817-7830 (1997).
- 3) Jaffe L F., *BioEssays*, **21**, 657-667 (1999).
- 4) Muramoto K., Kobayashi K., Nakanishi S., Matsuda Y., and Kuroda Y., *Proc. Japan Acad.*, **64**, 319-322 (1988).
- 5) Callaway E M. and Katz L.C., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **90**, 7661-7665 (1993).
- 6) Corrie J E T., DeSantis A., Katayama Y., Khodakhah K., Messenger J B., Ogden D C., Trentham D R., *J. Physiology*, **465**, 1-8 (1993).
- 7) Albritton N.L., Meyer T., Stryer L., *Science*, **258**, 1812-1815 (1992).
- 8) Goldbeter A., Dupont G., and Berridge M J., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **87**, 1461-1465 (1990).
- 9) Sneyd J., Wetton C., Charles T.R., and Sanderson M J., *Am. J. Physiol.*, **268**, C1537-1545 (1995).
- 10) Cornell-Bell A H., Finkbeiner S M., Cooper M S., and Smith S J., *Science*, **247**, 470-504 (1997).
- 11) Cornell-Bell A H., and Finkbeiner S M., *Cell Calcium*, **12**, 185-204 (1991).

(受付 2001年10月27日 掲載決定 10月30日)