

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文概要

論文題目

大脳皮質アストロサイトの自発的なATP放出の時空間特性と機構の
解析

Spatiotemporal dynamics and the mechanisms of spontaneous ATP
release in cortical astrocytes

申請者

畑下 慶紀

Yoshiki HATASHITA

生命医科学専攻 神経生理学研究

2022年12月

アストロサイトは中枢神経系に存在する非神経細胞種，グリア細胞の1つである。細胞体から分岐した多くの突起構造を特徴とし，互いにテリトリーを持ちながら脳を埋め尽くすように存在する。アストロサイトの突起は神経細胞間の情報伝達部位であるシナプスを覆い，その数は齧歯類においてアストロサイト1細胞あたり約14万個に上ると概算される。さらに1990年代以降，アストロサイトがグリア伝達物質の放出を介してシナプス間の情報伝達を制御することが発見され，近年では記憶や学習など脳高次機能に密接に関与することが明らかとなった。グリア伝達物質放出の制御因子の1つとして知られる細胞内 Ca^{2+} は，アストロサイトの微小突起や枝ごとの限局した濃度上昇や細胞全体で起こるグローバルな上昇など，複雑な動態を示すことが蛍光イメージングにより明らかにされている。これらの Ca^{2+} 濃度動態がグリア伝達物質放出を誘発すると仮定した場合に，その細胞内の拡がりの範囲からアストロサイトはシナプスの活動を様々な規模で複数まとめて調節する可能性が提唱されてきた。しかし，これまでの非光学的な検出手法はグリア伝達物質放出の空間情報を欠いていたため，アストロサイトによるシナプス群の空間的な調節様式は不明なままであった。また，既存の手法は時間解像度が低く個々の放出現象を検出できず，個々の放出のキネティクスも明らかにされていない。本研究では，グリア伝達物質の1つであるATPの時空間特性をマウス脳組織内にて明らかにすることを目的とした。アストロサイトからのATP放出の抑制はマウスの鬱病様行動を誘発することから，定常時のATP伝達様式を明らかにすることは生物学的かつ医学的に重要だと考えられる。本研究では，近年開発された新規の細胞外ATPセンサーであるGRAB_{ATP1.0}を用いることで，脳組織内の細胞外ATP動態を可視化し，アストロサイトの自発的かつ局所的なATP放出現象を検討した。さらに，細胞内 Ca^{2+} 動態との関係やATP放出のキネティクスについて解析し，アストロサイトのATPシグナル伝達機構の一端を明らかにした。

本論文は序論，実験材料と方法，実験結果，総合討論の全4章で構成される。各章の概要を以下に記す。

第1章は本論文の序論として，研究対象であるアストロサイトについて概要を説明した後，アストロサイトの形態的特徴と細胞内 Ca^{2+} 動態，ATP放出を介したシグナル伝達について研究の背景を述べた。また，本研究で使用した蛍光ライブイメージングによる可視化技術や遺伝子導入手法，多次元データの解析手法，薬理的阻害剤について原理や背景を記載した。これらを踏まえ，本研究の立ち位置と概観，研究目的を述べた。

第2章は本研究で使用した実験材料と方法を記載した。本研究では，脳組織内のアストロサイトの活動を観察するためICRマウスを用いた。細胞外ATPと細胞内 Ca^{2+} の動態の可視化には蛍光タンパク質センサーであるGRAB_{ATP1.0}と

Lck-REX-GECO1をそれぞれ使用し，各センサーの遺伝子を含む PiggyBac トランスポゾンベクターを胎生 15 日目マウスに子宮内電気穿孔法により遺伝子導入することで，大脳皮質のアストロサイトにセンサータンパク質を発現させた。蛍光ライブイメージングには二光子顕微鏡を使用し，生後 4-8 週齢のマウスの頭蓋骨に観察窓を作製し *in vivo* イメージングを行った。また薬理的阻害実験には急性脳切片を観察対象としてイメージングを行った。取得した蛍光タイムラプス画像のデータ解析として，シグナル上昇のイベント検出とイベント特徴抽出およびクラスター解析によるイベント分類を行った。以上の実験について，詳細な手順と手法を記した。

第 3 章ではアストロサイトの自発的な ATP 放出現象とその機構に関する実験結果を記載した。子宮内電気穿孔法により大脳皮質のアストロサイトに GRAB_{ATP1.0} を疎らに発現させ，1 細胞レベルで細胞外 ATP 動態の *in vivo* イメージングを行った。麻酔下のマウスに刺激を与えず蛍光観察したところ，細胞の局所で一過的な細胞外 ATP 濃度上昇が検出された。この局所的な ATP 放出現象は非刺激下の急性脳切片においても見られ，典型的な面積は 50-250 μm^2 に及び，数秒から数百秒持続することが分かった。アストロサイトの活動を阻害するフルオロクエン酸投与により ATP の放出頻度は有意に減少した一方で，神経活動を阻害するテトロドトキシンには感受性を示さなかった。以上の結果から，ATP 放出はアストロサイトに由来し，神経活動によらない自発的な放出であることが分かった。また，細胞外 ATP 濃度について GRAB_{ATP1.0} の蛍光強度変化をキャリブレーションした結果，ATP 放出時の最大濃度上昇は 0.5-5 μM で，ATP の受容体を活性化しうる十分な濃度であることが示された。次に，自発的な ATP 放出現象についてその機構を明らかにするため，グリア伝達物質放出の重要な制御因子の 1 つとして知られる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇との関係を検証した。GRAB_{ATP1.0} と Lck-REX-GECO1 の同時イメージングを行い，ATP 放出と Ca^{2+} 濃度上昇の時空間的な重なりを評価した結果，過半数の ATP 放出は Ca^{2+} 濃度上昇と独立して起こることが分かった。また，それぞれの頻度の中に有意な相関は見られなかった。さらに， Ca^{2+} 依存的な ATP 放出の代表的な機構である小胞放出を Bafilomycin A1 投与により阻害したが，ATP 放出の頻度に有意な変化は見られなかった。以上から，自発的な ATP 放出は主に Ca^{2+} 非依存的な機構によることが示唆された。次に，ATP 放出の波形に着目して階層的クラスタリングによる分類を行ったところ，ATP 放出が 2 つの大きなクラスに分けられ，さらに 5 つのクラスターに細分類することができた。Bafilomycin A1 は ATP 放出全体と比較した際には頻度に影響しなかったが，ゆるやかな波形と比較的長い継続時間を特徴とする少数派のクラスにおいては有意に頻度を減少させていた。また，そのうちの 1 つのクラスターでは，ATP 放出前に Ca^{2+} 濃度が増加する傾向が見られた。また，非小胞放出経路の 1 つであるヘミチャネルの阻害剤を加えた際に

は、いずれのクラスおよびクラスターにおいても ATP 放出頻度に有意な減少は見られなかった。以上の解析から、自発的な ATP 放出には単一の機構ではなくキネティクスが異なる複数の機構が共在すること、さらに非小胞放出経路が主であることが示唆された。

第 5 章は本研究のまとめと考察、展望を記載した。本研究では、脳組織内のアストロサイトが神経活動に依存せず自発的に ATP を放出することを見出した。また、ATP 放出は細胞局所で発生することが明らかになった。さらに細胞内 Ca^{2+} 動態との関係や波形に着目した機構解析により、キネティクスの異なる複数の機構が存在し、特に非小胞放出機構が主であること、また Ca^{2+} 濃度上昇の寄与は部分的であることが分かった。しかし依然として、自発的な ATP 放出現象に寄与する放出機構の全貌や候補分子は不明である。また、アストロサイトが自発的かつ局所的に ATP を放出することの生理学的意義についても不明のままである。今後の展望として、まずはアストロサイトにおける自発的な ATP 放出を担う主要な放出機構の特定が望まれる。これが明らかになることで、その遺伝子除去等により自発的な ATP 放出の生理学的意義の検証が可能になると期待される。考察では、阻害剤の効果や Ca^{2+} 濃度上昇との同期性について得た結果をもとに、すでに同定されているアストロサイトの ATP 放出機構を挙げながら自発的な ATP 放出機構の主要な候補分子を推察した。また、自発的な ATP 放出が及ぼしうる作用について、細胞外 ATP の上昇濃度とその空間特性から、ATP の各種受容体の親和性やシナプス密度などの文献値と照らして議論した。また、神経グリア共培養系で報告されている自発的な ATP 放出の作用や、脳組織内アストロサイトからの誘発性 ATP 放出の効果と比較しながら議論した。最後に、本研究が当該分野にもたらした洞察を以下にまとめる。従来、アストロサイトは神経活動の補助や脳恒常性維持を担う受動的な細胞として認識されてきたが、神経活動に応答してグリア伝達物質を放出することで、より直接的に情報伝達に関与することが近年分かってきた。本研究ではさらに、アストロサイトが神経活動に依存せず自発的に ATP シグナル伝達を駆動するというより能動的な側面に新たに光を当てた。また、以前からアストロサイト内 Ca^{2+} 動態の空間特性を基に、異なる神経細胞に属する近接したシナプス群がグリア伝達物質によりまとめて制御される機能的クラスターを形成している可能性が指摘されてきた。本研究では、数百のシナプスが存在する範囲に ATP が拡散することを示し、この仮説に関してより直接的な根拠を提示した。また、これまで細胞内 Ca^{2+} 動態がアストロサイトの活動指標として重視されてきたが、 Ca^{2+} 動態には反映されないシグナル伝達がアストロサイト内に恒常的に存在することを示し、アストロサイトの細胞機能を測る上で細胞内 Ca^{2+} 以外の分子指標を求める必要性を示唆している。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名： 畑下 慶紀

印

(2023年 6月 現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>○題目：Spontaneous and multifaceted ATP release from astrocytes at the scale of hundreds of synapses 掲載誌：Glia, in press 発行年月：2023年 6月 1日（online） 連名者：Hatashita Y, Wu Z, Fujita H, Kumamoto T, Livet J, Li Y, Tanifuji M, Inoue T</p> <p>題目：Requirement of CRMP2 Phosphorylation in Neuronal Migration of Developing Mouse Cerebral Cortex and Hippocampus and Redundant Roles of CRMP1 and CRMP4. 掲載誌：Cerebral Cortex, 32 (3): 520-527 発行年月：2021年 7月23日 連名者：Yamazaki Y, Moizumi M, Nagai J, Hatashita Y, Cai T, Kolattukudy P, Inoue T, Goshima Y, Ohshima T.</p> <p>題目：Quantification of native mRNA dynamics in living neurons using fluorescence correlation spectroscopy and reduction-triggered fluorescent probes 掲載誌：Journal of Biological Chemistry, 295 (23): 7923-7940 発行年月：2020年 6月 5日 連名者：Fujita H, Oikawa R, Hayakawa M, Tomoike F, Kimura Y, Okuno H, Hatashita Y, Fiallos Oliveros C, Bito H, Ohshima T, Tsuneda S, Abe H, Inoue T.</p> <p>題目：Astrocytic endfeet re-cover blood vessels after removal by laser ablation 掲載誌：Scientific Reports, 9 (1263): 1-10 発行年月：2019年 2月 4日 連名者：Kubotera H, Ikeshima-Kataoka H, Hatashita Y, Allegra Mascaro AL, Pavone FS, Inoue T.</p>
講演	<p>題目：Multi-faceted spontaneous ATP release events in astrocytes 学会名：Neuroscience 2022 発表年月：2022年11月13日 連名者：Hatashita Y, Wu Z, Li Y, Inoue T.</p> <p>題目：Spatiotemporal ATP release in cortical astrocytes 学会名：FENS Forum 2022 発表年月：2022年 7月11日 連名者：Hatashita Y, Wu Z, Li Y, Inoue T.</p> <p>題目：Spontaneous and local ATP release in astrocytes revealed by spatiotemporal analysis using two-photon microscopy. 学会名：第95回日本薬理学会年会 発表年月：2022年 3月7日 連名者：Hatashita Y, Wu Z, Li Y, Inoue T.</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名： 畑下 慶紀

印

(2023年 6月 現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	題目：Calcium event-independent spontaneous ATP release in astrocytes in cortical slice. 学会名：Neuroscience 2021 発表年月：2021年11月11日 連名者： Hatashita Y , Wu Z, Li Y, Inoue T.