

別刷

Experimental Medicine

実験医学 増刊

www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/

Vol.37-No.17 2019

第37巻第17号
1985年12月25日

脳の半分を占める グリア細胞

脳と心と体をつなぐ“^{にかわ}膠”

編集＝松井 広，田中謙二

glial cells

羊土社

2. ライブ超解像イメージングによる三者間シナプスのアストロサイト信号の解明

有菌美沙, U. Valentin Nägerl

脳の機能には神経細胞と非神経細胞の一種である「アストロサイト」が連携して働くことが重要である。この連携を理解するうえで、アストロサイトの活動の指標である「細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化 (Ca^{2+} シグナル)」を正確にモニターすることは欠かせない。従来アストロサイトの Ca^{2+} シグナルは、神経細胞のシナプス伝達に比べ、時空間精度が低いと思われてきた。しかし近年、 Ca^{2+} イメージング技術の発達により、アストロサイトも局所的で速い Ca^{2+} シグナルを生じることがわかってきた。ここでは超解像イメージングを応用することにより、1シナプスレベルでアストロサイトの Ca^{2+} シグナルを可視化するアプローチについて紹介したい。

はじめに

細胞内の Ca^{2+} 動態を可視化する Ca^{2+} イメージング^{※1}によりアストロサイトの活動がはじめて観察された。これを機に、それまで沈黙の細胞と思われてきたアストロサイトが注目を浴びるようになった。その後、一連の研究によりアストロサイトは多くの神経伝達物質受容体を発現し、さまざまな刺激に Ca^{2+} シグナルで反応するばかりか、この Ca^{2+} シグナルを介して神経活動を制御するということが明らかになった¹⁾。神経伝達

におけるアストロサイトの役割が認知されるにつれて、アストロサイトを神経細胞の前シナプスと後シナプスに加えて第三のシナプスパートナーとみなす「三者間シナプス」という概念も広く普及した。一方でアストロサイトの Ca^{2+} シグナルの役割については未知なことも多く、なかには相反する報告もある²⁾。この要因の1つとして、 Ca^{2+} イメージング方法によって Ca^{2+} シグナルの検出感度が異なることが考えられる。例えば、時間解像度が足りないために速い Ca^{2+} シグナルを見落とすことや、空間解像度が足りないために近接した複

【略語】

FRAP : fluorescence recovery after photo-bleaching (光褪色後蛍光回復法)

LTP : long-term potentiation (長期増圧)

PALM : photoactivated localization microscopy

PFA : paraformaldehyde

STED : stimulated emission depletion (誘導放出抑制)

STORM : stochastic optical reconstruction microscopy

SUSHI : super-resolution shadow imaging

YFP : yellow fluorescent protein

Investigating astrocytic Ca^{2+} signals at tripartite synapses using live super-resolution microscopy

Misa Arizono/U. Valentin Nägerl : The Institute for Interdisciplinary Neuroscience, University of Bordeaux (ボルドー大学 The Institute for Interdisciplinary Neuroscience)

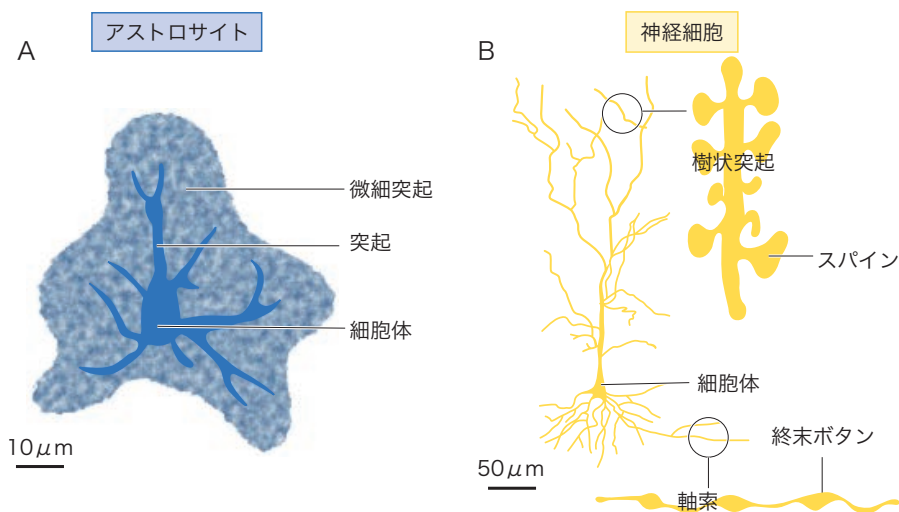


図1 アストロサイトと神経細胞の構造
A) アストロサイトの細胞構造. B) 神経細胞の細胞構造.

数の Ca^{2+} シグナルを同一の Ca^{2+} シグナルと見なすことが起こりうる³⁾. 今後アストロサイトの Ca^{2+} シグナルを正しく理解するうえで、その時空間ダイナミクスを細胞全体で正確にモニターできる系が必要である。

1 アストロサイトの Ca^{2+} シグナルの多様性

アストロサイトは、核を含む細胞体、放射状に伸びる太い突起、および無数の「微細突起」からなる (図1)。この微細突起が主にアストロサイトとシナプスとのやりとりを担う部分である。従来の研究では Ca^{2+} 指示薬を用いて比較的容易に観察できることから、主にアストロサイトの細胞体における Ca^{2+} シグナルが観察されてきた。近年、遺伝子コード型 Ca^{2+} センサーの導入によって、細胞体のみならず突起の Ca^{2+} シグナルもはっきりと可視化できるようになった。その結果、細胞体よりもむしろ突起の方が活発であることがわかり、

これまで多くの活動が見落とされてきたことが明らかになった^{4) 5)}. また Ca^{2+} センサーを細胞膜にターゲットすることで、細胞膜が豊富な微細突起の活動をよりよく観察する方法も開発された⁶⁾. これらの Ca^{2+} イメージングの向上に伴い、アストロサイトの Ca^{2+} シグナルは、「細胞全体に広がるゆっくりとした Ca^{2+} シグナル」から「突起や微細突起における局所的で速い Ca^{2+} シグナル」までさまざまな時空間ダイナミクスを呈することがわかった。1つのアストロサイトは微細突起を介して10万個以上ものシナプスに接するので⁷⁾, アストロサイトがこれらの多様な Ca^{2+} シグナルをどのように使い分けしているのかというのは重要な課題である。例えばアストロサイトが細胞全体に広がる Ca^{2+} シグナルを用いて幾千ものシナプスを同時に制御する場合と、局所的な Ca^{2+} シグナルを用いて少数または個々のシナプスを別々に制御する場合とでは、神経ネットワークへの影響が全く異なってくる。

2 アストロサイトの微細構造

さて、アストロサイトがどのように Ca^{2+} シグナルの広がりを決めているかを考えるうえで、微細突起の構造は一考に値する。例えば神経細胞は、興奮性のシナプス入力を受ける後シナプス構造として、樹状突起に

※1 Ca^{2+} イメージング

Ca^{2+} と結合すると蛍光強度が変化する Ca^{2+} センサーを細胞内に導入し、この蛍光変化の観察を通して、細胞内の Ca^{2+} 濃度の変化 (Ca^{2+} シグナル) を調べる方法。 Ca^{2+} センサーには、主に Ca^{2+} 指示薬と、遺伝子コード型の Ca^{2+} センサーの2種類がある。

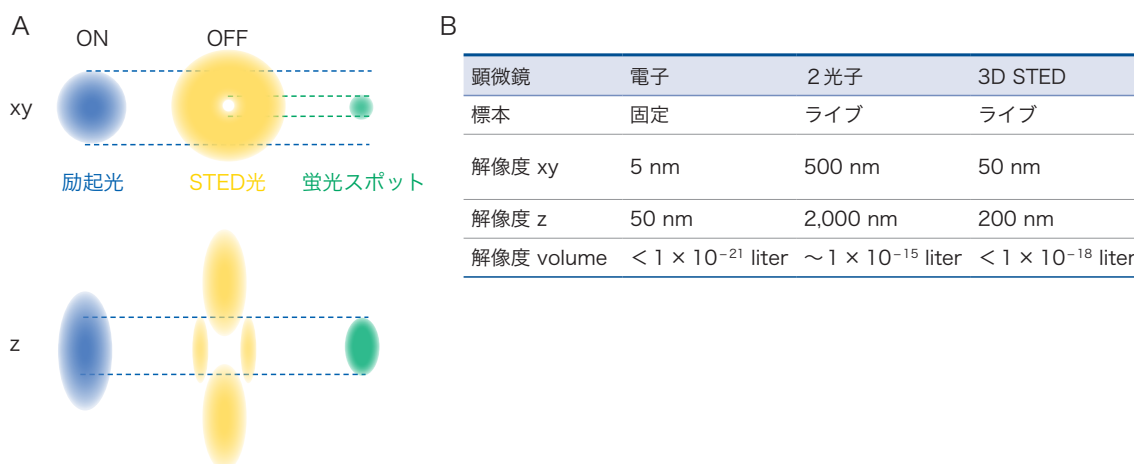


図2 STED顕微鏡の原理と特色

A) STED顕微鏡の原理, B) 電子顕微鏡, 2光子顕微鏡, STED顕微鏡の比較.

「スパイン」という小さな突出部を発達させている(図1)。この特別な構造によってスパインは樹状突起から独立した小区画として機能することができ、隣のスパインへの Ca^{2+} シグナルの波及を制限しているとされている。アストロサイトの微細突起もまた入り組んだ構造をしており⁸⁾、 Ca^{2+} シグナルを細かく区画化し、小区画として機能するのに適しているように見受けられる。アストロサイトの微細突起と Ca^{2+} シグナルの関係を検証するには、両者を対応づける必要がある。しかし微細突起はあまりに小さく高密度で存在するので、通常の光学顕微鏡では個々の微細突起を見分けることができない。そのため、これまでアストロサイトの微細突起の構造に関する知識は電子顕微鏡画像から得られたものが主であった。一方で、最近電子顕微鏡によく使われるPFA固定が、アストロサイトの微細突起を歪める可能性が報告された⁹⁾。PFA固定した標本と、細胞外スペースを保持する凍結固定した標本を比較した場合、アストロサイトの微細突起の構造が大きく異なることが明らかにされたのである。そこで、 Ca^{2+} シグナルとの関係を調べるためのみならず本来の微細構造を知るためにも、アストロサイトの微細突起を生理的な環境で観察することがますます重要となっている。

3 超解像STEDイメージング

超解像イメージング^{※2}は、光学的なトリックを使って通常の光学顕微鏡のそれを超えた解像度を実現する技術である。多くの超解像イメージング技術が培養細胞や固定細胞に用いられるなかで、STED (stimulated emission depletion) 顕微鏡は生きた脳スライスや個体脳を観察する*in vivo*イメージングにも使えることが強みである。レーザー顕微鏡の解像度はどれだけ蛍光スポットを小さくできるかによって決定されている。STED顕微鏡は、通常の励起レーザーに加え、蛍光分子を脱励起するSTEDレーザーを備えており、このSTEDレーザーをドーナツ型にし、励起レーザーとともに照射することで、蛍光スポットをより小さくできる(図2A)。このSTEDレーザーの効果によって、STED顕微鏡では通常の共焦点顕微鏡の解像度(～250 nm)の数倍の解像度(～50 nm)を実現できる。この結果、電子顕微鏡の解像度(～0.1 nm)には、は

※2 超解像イメージング

従来の光学顕微鏡の解像度は、光が波としての性質をもつためその波長によって制限されてきた。近年この限界を超える顕微鏡を用いたイメージング方法、超解像イメージングが次々と開発された。これらの方法には、顕微鏡の光学系の特性を生かしたものや、観察対象である蛍光タンパク質の特性を生かしたものがある。

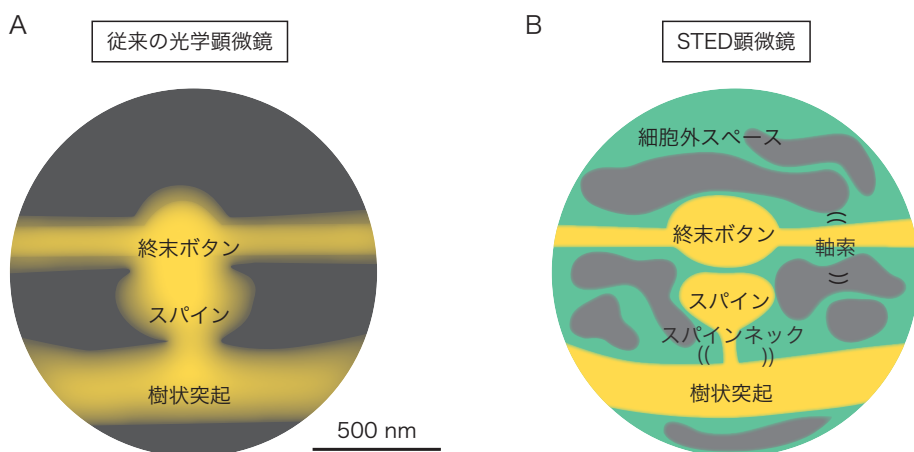


図3 STED顕微鏡が明らかにするシナプス生理

A) 従来の光学顕微鏡で観察できるシナプス構造, B) STED顕微鏡で観察できるシナプス構造.

るかに及ばないものの、通常の顕微鏡ではよく見えないシナプスの詳しい形態や動態を生きた標本で観察することができる (図2B)¹⁰⁾。筆者の留学先であるフランス・ボルドー大学のValentin Nägerl研究室はSTED顕微鏡を用いたシナプス生理学の研究で世界をリードしている。アストロサイトをを用いた研究例を紹介する前に、Nägerl研のこれまでの成果を例にとってSTED顕微鏡を用いたアプローチの有用性を説明する。

4 STED イメージングが明かすシナプス生理

シナプスはちょうどSTED顕微鏡の強みを存分に活かせるサイズである。樹状突起スパインは、比較的大きい頭部 (～600 nm) と細いスパインネック (～150 nm) からなる (図3B)。スパインネックは樹状突起とスパイン頭部の分子のやりとりを制限することで、個々のスパインが独立した小区画として機能するために重要な役割を果たすとされる。しかし、通常の顕微鏡でははっきりと見る事ができない (図3A)。そこでTønnesenらは海馬スライスで、「スパインの形態を調べるSTEDイメージング」と「分子の拡散を調べるFRAP※3実験」を組み合わせることで、スパインネックが細いほど樹状突起とスパイン頭部の分子のやりとりが制限されることを示した。さらに電気生理実験を組

合わせることで、シナプス伝達強度を増加させるLTP (long term potentiation) 誘導によってスパイン頭部が肥大するとともにスパインネックが太くなるということを明らかにした¹¹⁾。前シナプス構造である軸索終末「終末ボタン」および軸索 (図1) も細く通常の顕微鏡では正しく測ることができない (図3B)。Chéreauらは同様の実験系を用いて、LTP誘導後一過的に終末ボタンが肥大した後、軸索が徐々に太くなるということを発見した¹²⁾。また、この形態の変化と活動電位の伝導速度の変化が連動していることを明らかにした。これらの研究結果は、従来生きた状態で観察できなかったシナプスの微細形態が、じつはシナプス可塑性に応じてダイナミックに変化していることを示している (図3B)。

STED顕微鏡は*in vivo*実験にも応用できる。2光子顕微鏡は脳の深部を観察することができる一方で、共焦点顕微鏡に比べ解像度が低い (～500 nm)。そこで2光子顕微鏡とSTED顕微鏡を組合わせた2光子STED顕微鏡を用いると、脳の深部を高解像度で観察するこ

※3 FRAP

分子の拡散をみる方法。蛍光分子を含む細胞に局所的に強いレーザーをあてて蛍光を退色させると、周りの蛍光分子がこの部分に拡散し蛍光が回復する。蛍光分子の拡散が速いほど蛍光の回復が速いので、この回復度合いを測ることで分子の拡散についての情報が得られる。

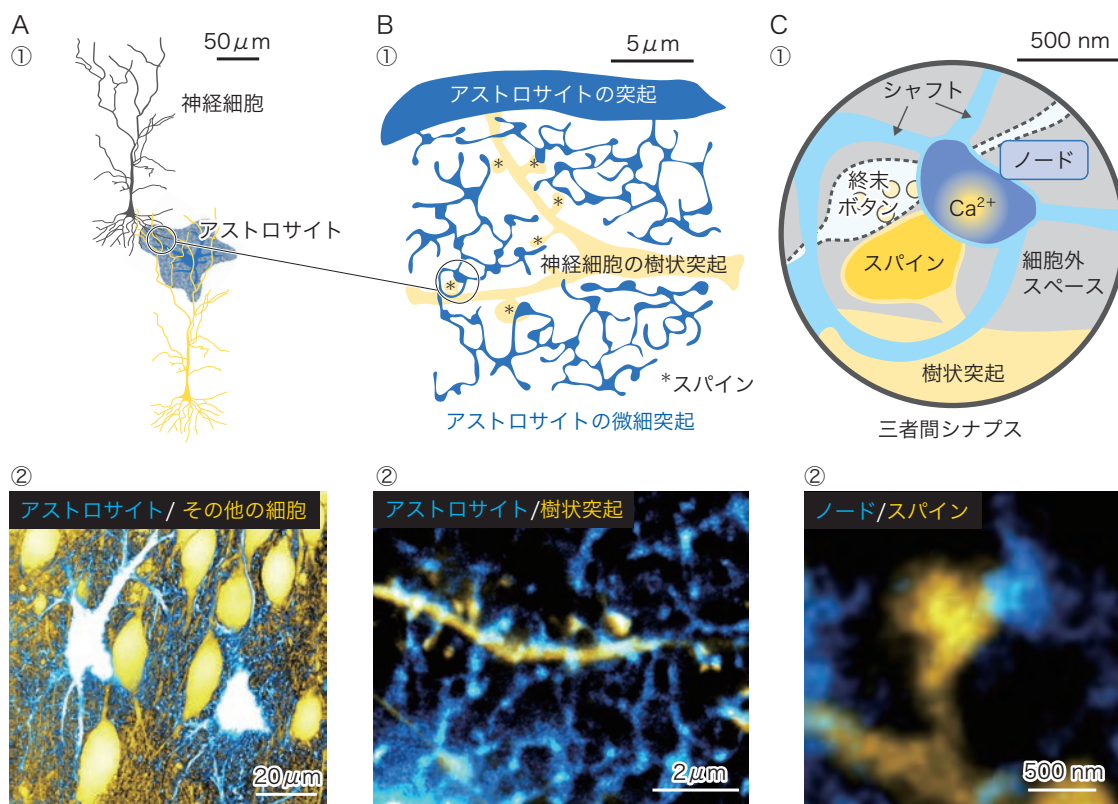


図4 STED顕微鏡が明らかにするアストロサイトの細胞生理

A)-①：神経細胞とアストロサイト，B)-①：神経細胞の樹状突起とアストロサイトの微細突起，C)-①：神経細胞のスパインとアストロサイトのノード，A)-②：アストロサイトとその他の細胞のSTED画像，その他の細胞の形態は，SUSHI技術で細胞外スペースを標識し，その像を反転することで可視化した，B)-②：神経細胞の樹状突起とアストロサイトの微細突起のSTED画像，C)-②：神経細胞のスパインとアストロサイトのノードのSTED画像。

とができる。海馬観察用の窓（hippocampal window）を通して，海馬のスパインを追跡した結果，スパインが従来の光学顕微鏡を用いた報告の2倍の密度で存在し，4日で40％と高いスパインのターンオーバーが起こっていることが明らかになった¹³⁾。

STED顕微鏡の応用例はシナプスにとどまらない。最近，STED顕微鏡で細胞外スペースを観察するSUSHI（super-resolution shadow imaging）という技術が開発された¹⁴⁾。細胞外液に蛍光物質を入れるだけの画期的な手法で，これまで組織レベルで間接的にしか測定できなかった細胞外スペースを直接詳細に可視化できる手法として注目を浴びている。この細胞外スペースのシグナルを反転することで，標本中に存在するすべ

ての細胞構造を可視化することもでき，元来の個々の細胞を直接標識する方法に代わる手法としても期待されている（図3B，図4A-②）。

5 STEDイメージングが明かすアストロサイトの細胞生理

このようにSTED顕微鏡は生きたシナプス微細構造を可視化し，他の生理的実験と組み合わせられるパワフルなツールである。筆者はこの技術のアストロサイトに応用することで， Ca^{2+} シグナルにおける微細突起の構造の役割を調べようと考えた。ここにその研究結果を紹介する¹⁵⁾（Cell Press pre-print server

まず微細突起を生きた標本で観察するために、アストロサイトにZsGreenという蛍光タンパク質を発現する海馬培養スライスを用いた。この標本を用いてSTEDイメージングを行った結果、アストロサイトの微細突起は、末端に向かうにつれ細く枝分かれしていく神経細胞の樹状突起とは異なり、細胞体付近も末端も一様の3Dの網目構造(図4)を呈することがわかった。網目構造は多くのループ様構造からなり、このような構成をとるにあたって、アストロサイトの微細突起が分岐した後また再融合する、または1つの微細突起が真ん中から裂ける可能性が示唆された。この網目の分岐点にはしばしば肥大した節のような構造が観察され、サイズや密度が神経細胞のスパインにも似ていることから、何らかの機能ユニットであると推測された。この構造を「ノード」と命名した。ノードとスパインを同時に観察したところ、半数以上ものスパインがノードに接していることが明らかになった。大きいスパインはより大きいノードと接することから、両者の間に何らかの機能的連携があることが示唆された(図4C-①, ②)。従来の電子顕微鏡画像ではアストロサイトの微細突起がシナプスの大部分を被覆する様子がよくみられるが、生きた脳スライスにおいてはアストロサイトのノードはスパインの一部に接するのみで、完全な被覆は稀であることがわかった(図4C-①, ②)。またSUSHIを用いて細胞外スペースを染色した結果、ノードとシナプスの周辺に大きな細胞外スペースがみられ、細胞外スペースがほぼない電子顕微鏡の画像とは対照的なシナプス環境が観察された。ベースラインにおけるノードとスパインの接触の安定性を2時間半に渡って調べた結果、数秒単位で変化するミクログリアとスパインとの接触¹⁶⁾とは対照的に、両者とも動くにもかかわらず接触自体は比較的安定していることがわかった。

アストロサイトのノードは丸く、神経細胞のスパイン頭部や終末ボタンに似ており、細いシャフトに挟まれることによって独立した小区画として機能する可能性がある(図4C-①, ②)。FRAP実験を行った結果、シャフトがノードに対して細いほど、分子のやりとりが制限されていることが明らかになった。この結果を受けて、ノードがスパインのように独立したCa²⁺シグ

ナルを担うことができるかどうかを調べることにした。アストロサイトにCa²⁺センサーGCaMP6s¹⁷⁾を発現し、高解像度共焦点顕微鏡で、外的刺激がない状態でみられるアストロサイトの自発的Ca²⁺シグナルを観察した。この結果、おのおののノードは高密度で分布しているにもかかわらず独自の自発的Ca²⁺シグナルを呈することがわかった。これはCa²⁺シグナルがノードに局限している可能性を示している。微細突起におけるCa²⁺シグナルの広がりを実測したところ、大部分のCa²⁺シグナルは1 μm未満で、単一のノードにとどまっていることが示唆された。Ca²⁺イメージング後にGCaMP6sシグナルのSTEDイメージングを行い、Ca²⁺シグナルと微細構造を対応させたところ、ほぼすべてのCa²⁺シグナルがノードにおいて生じることがわかった。これらの結果はノードがCa²⁺シグナルの発生する場所として機能し、アストロサイトの微細構造がCa²⁺シグナルを区画化していることを強く示唆している。薬理実験によってこのCa²⁺シグナルにIP₃受容体が寄与していることも明らかになった。

さて、ここまでの結果はノードが個々のスパインに特異的なCa²⁺シグナルを担う区画として機能する可能性を示している。そこで個々のスパインにおけるノードのCa²⁺シグナルを可視化するために、神経細胞を蛍光タンパク質YFP (yellow fluorescent protein) で標識した脳スライスにおいてアストロサイトのCa²⁺イメージングを行った。アストロサイトのCa²⁺シグナルをスパインのSTEDイメージに重ねたところ、大半のアストロサイトの自発的Ca²⁺シグナルが個々のスパインに特異的である、つまり隣のスパインに接するノードに波及しないということが明らかになった。また大きいスパインに接するノードはより大きいCa²⁺シグナルを呈することがわかり、それぞれノードが接するスパインと機能的に連携している可能性が示唆された。

本研究からノードは神経細胞のスパインや終末ボタンに並ぶアストロサイトの機能ユニットであることが強く示唆された(図4C)。アストロサイトはノードを介して一つひとつのシナプスと特異的なコミュニケーションを行っていることが考えられる。

STED顕微鏡は、アストロサイトの細胞生理を解くにあたって微細構造と機能を同時に観察できるたいへん有用なツールである。今後、生きた個体脳での三者

間シナプスの *in vivo* STED イメージングの結果が待たれる。アストロサイトのノードが、無数のタンパク質の複合体を含むスパインと同様のサイズであることを考えると、ノードもまた Ca^{2+} シグナルにかかわる大きな複合体を擁する可能性がある。ノードの内部構成の解明にはシナプス分子の詳しい局在を明らかにしてきた STORM, PALM といった一分子局在化観察法¹⁸⁾ と言われる超解像イメージング技術が有用になってくるだろう。

おわりに

ノードの分子構成が解明されれば、これらの分子を操作することでノードの生理的な役割を調べることが可能になる。ノード構造が破綻し、 Ca^{2+} シグナルの区画化メカニズムが失われた場合、神経活動および記憶・学習にはどのような影響があるのだろうか。興味深いことにアルツハイマー病のモデルマウスでは、アストロサイトの Ca^{2+} シグナルが異常に亢進し、 Ca^{2+} wave が広範囲に波及することが報告されている¹⁹⁾。このような脳では Ca^{2+} シグナルの区画化メカニズムが崩壊している可能性がある。ノードの生理的役割を理解するうえで、これらの病態脳における微細突起と Ca^{2+} シグナルの関係について調べることも不可欠である。

文献

- 1) Araque A, et al : Neuron, 81 : 728-739, 2014
- 2) Fiacco TA & McCarthy KD : J Neurosci, 38 : 3-13, 2018
- 3) Rusakov DA : Nat Rev Neurosci, 16 : 226-233, 2015
- 4) Srinivasan R, et al : Nat Neurosci, 18 : 708-717, 2015
- 5) Sherwood MW, et al : Glia, 65 : 502-513, 2017
- 6) Shigetomi E, et al : J Gen Physiol, 141 : 633-647, 2013
- 7) Bushong EA, et al : J Neurosci, 22 : 183-192, 2002
- 8) Ventura R & Harris KM : J Neurosci, 19 : 6897-6906, 1999
- 9) Korogod N, et al : Elife, 4 : doi:10.7554/eLife.05793, 2015
- 10) Chéreau R, et al : Methods, 88 : 57-66, 2015
- 11) Tønnesen J, et al : Nat Neurosci, 17 : 678-685, 2014
- 12) Chéreau R, et al : Proc Natl Acad Sci U S A, 114 : 1401-1406, 2017
- 13) Pfeiffer T, et al : Elife, 7 : doi:10.7554/eLife.34700, 2018
- 14) Tønnesen J, et al : Cell, 172 : 1108-1121.e15, 2018
- 15) Arizono M, et al : Cell Press pre-print server (2018), <https://ssrn.com/abstract=3287791>
- 16) Wake H, et al : J Neurosci, 29 : 3974-3980, 2009
- 17) Chen TW, et al : Nature, 499 : 295-300, 2013
- 18) Sydor AM, et al : Trends Cell Biol, 25 : 730-748, 2015
- 19) Kuchibhotla KV, et al : Science, 323 : 1211-1215, 2009

<筆頭著者プロフィール>

有菌美沙：東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻卒業。フランス国立保健医学研究所（Inserm）研究員。アストロサイトの Ca^{2+} シグナルには、神経細胞の電気シグナルのみでは説明できなかった脳の生理・病理をひも解く鍵が隠されていると考え、その解読に情熱を燃やしている。