

日本神経化学会奨励賞受賞者研究紹介

背側線条体におけるアストロサイト-ニューロン連関の機能解析

長井 淳

カリフォルニア大学ロサンゼルス校医学部生理学科

はじめに

生物が外界の情報を受容・処理し、次の行動に反映するしくみの理解は、脳科学の中心的な課題である。大脳皮質による認知的な随意運動と脳幹による生得的な運動は、大脳基底核により協調的に制御され、適切な運動機能の発現に寄与する。大脳基底核の主要な構成要素である線条体は、運動調節・認知・強化学習に関わる。またパーキンソン病・ハンチントン病・薬物依存などにおいて機能変調を示すことが知られている¹⁻³⁾。このように個体行動や疾患に関与する線条体の機能は、ニューロン・グリア細胞・血管など多様な細胞の中、あるいは間で起こるダイナミックなシグナル伝達が統合されて発揮されると考えられる。しかし、細胞間相互作用のメカニズムおよび意義については不明な点が多い。

アストロサイトは中枢神経系にタイル状にひしめくグリアの一種である。哺乳類の脳細胞の約2~4割を占め、ニューロンと密なコミュニケーションをとっている⁴⁾。その機能に関して、大脳皮質や海馬での研究が数多く行われてきたが、近年の研究から背側線条体アストロサイトについての知見が集まっている。まず、アストロサイト微細突起はニューロンおよびシナプスと緊密に接している^{5,6)}。また、アストロサイト特異的RNAシーケンス (RNA-seq) により得られた遺伝子発現データからは、代謝補助、イオン・伝達物質のバッファリングといった、脳回路機能を支えるホメオスタティックなアストロサイト機能が示

唆されている⁵⁾。さらに、アストロサイトでは電気的活動シグナルの伝搬が観察されないが、ダイナミックな細胞質 Ca^{2+} イオンの増減が見られる (Ca^{2+} シグナル) ことが分かってきた⁷⁾。興味深いことに、アストロサイトのホメオスタティックな機能分子および Ca^{2+} シグナルは、ハンチントン病モデルマウスで減少していることが明らかになっている^{7,8)}。

しかし、背側線条体アストロサイトの機能ダイナミクスについては、その多くが不明であった。特に、(1)アストロサイトがいつ・どのようにニューロン活動に呼応するのか、(2)その結果、どのような機能を発揮し、神経回路・個体行動に影響するのか、という根本的な生理学的メカニズム解析がなされていなかった。筆者は、分子・回路・動物行動レベルの多階層解析を通して、背側線条体におけるアストロサイト-ニューロンの相互作用のしくみと意義の解明を目的として研究を行った^{9,10)}。本稿では、まず(1)ニューロンからアストロサイトへのシグナル伝達機構、次に(2)アストロサイトの Ca^{2+} シグナルを「不活性化」「活性化」した際の行動・回路への影響について概説する。

1. ニューロンからアストロサイトへシグナルを伝達する機構

これまで、ニューロン活動により放出される伝達物質 (グルタミン酸、ATP、カンナビノイドなど) や修飾物質 (ノルアドレナリン、アセチルコ

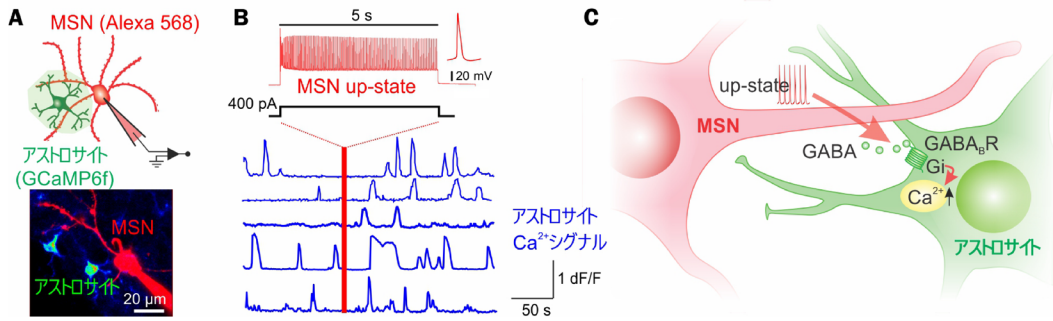


図1 背側線条体における中型有棘ニューロン (MSN) からアストロサイトへのシグナル伝達

A, 赤色素ダイアライシスによって可視化された MSN と Ca^{2+} 指示薬 GCaMP6f を発現したアストロサイト。B, up-state 様の興奮性を模倣した MSN 脱分極の後、アストロサイト Ca^{2+} シグナル (青) の頻度が増加した。C, MSN の脱分極依存的な GABA 放出は、アストロサイトが発現する GABA_B 受容体を介して Gi 経路を活性化し、 Ca^{2+} シグナルを引き起こす。

リンなど) がアストロサイト Ca^{2+} シグナルを上昇させることが報告されてきた¹¹⁾。しかし、成体マウス背側線条体での機構は不明であった。そのため、まず成体マウス脳スライスをを用いて、ニューロンの興奮性操作とアストロサイト Ca^{2+} シグナルイメージングを同時に行った (図1A)。ホールセルパッチクランプにより中型有棘ニューロン (MSN) を up-state 様 (静止膜電位より +20–30 mV) 興奮¹²⁾ を引き起こしたところ、近傍 (細胞体か樹状突起から 50 μm 以内) に存在するアストロサイトが Ca^{2+} シグナル上昇を示した (図1B)。驚くべきことに、TTX で活動電位を阻害してもこの Ca^{2+} シグナルは上昇した。ニューロンの電位変化のみでアストロサイト Ca^{2+} シグナルを引き起こすメカニズムとして、樹状突起に高発現している L-type 電位依存性 Ca^{2+} からニューロンへ Ca^{2+} が流入¹³⁾ し、小胞放出を介して伝達物質がアストロサイトに作用していることを薬理学的実験により見出した。

次に、MSN は GABA 作動性ニューロンであることから、アストロサイト Ca^{2+} シグナルを上昇させる伝達物質は GABA ではないかと仮説を立てた。生体内から単離したアストロサイトの mRNA およびタンパク質の解析から、 GABA_B 受容体が高発現していることが見出された。これを受けて、

GABA および GABA_B 受容体アゴニストを急性スライスのアストロサイトに投与したところ、 Ca^{2+} シグナルを引き起こされた。また、MSN 興奮性依存的なアストロサイト Ca^{2+} シグナルは GABA_B 受容体ノックダウンにより阻害された。さらに、光遺伝学的に *in vivo* ニューロンを興奮させた場合においても、 GABA_B 受容体を介したアストロサイト Gi/ Ca^{2+} シグナルの上昇が観察された。これらのことから、MSN の up-state 様活動依存的に放出される GABA が、アストロサイトが高発現する Gi 共役型 GABA_B 受容体を活性化させ、 Ca^{2+} シグナルを上昇させることが示された⁹⁾ (図1C)。

2. アストロサイト活性化がマウス行動、シナプス伝達に与える影響とその機構

では上記のアストロサイト Ca^{2+} シグナルはどのような機能的意義をもつのであろうか? この問いに答えるための実験的アプローチを考案する際に、以下のような留意点が存在した。まず、 GABA_B 受容体はアストロサイトで高発現しているとはいえニューロンや脳以外の臓器にも発現があるため、例えば GABA_B 受容体アゴニストをマウスに投与して観察される表現型は、アストロサイト GABA_B 受容体刺激のみを反映した結果である

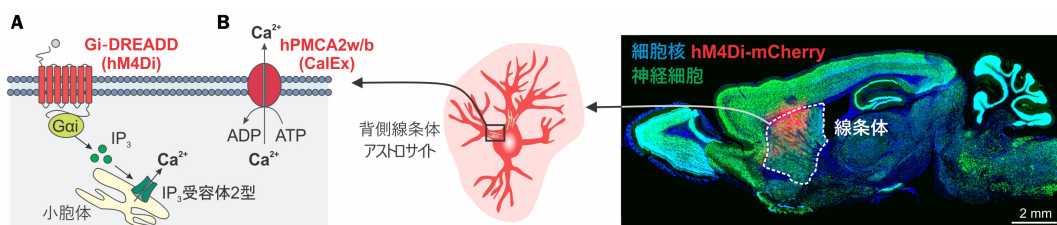


図2 アストロサイト選択的な背側線条体への AAV 導入 (右図、赤) により、アストロサイト Ca^{2+} シグナル活性化ツール (A) あるいは不活性化ツール (B) を発現させる系

とみなすことは難しい。また、Cre ライン¹⁴⁾ を用いて GABA_B 受容体をアストロサイト特異的に欠損させることも可能だが、欠損は背側線条体以外の多領域に及ぶため、例えば欠損マウスで行動変化が見られた場合に、背側線条体依存的である部分を切り分けることが困難である。脳領域特異的なアストロサイトマーカー／プロモーターの発見は今後の重要な課題である¹⁵⁾。

以上のことから、アストロサイト特異性・脳領域選択性を兼ね備えた *GfaABC1D* 指向性アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いたアプローチを採用した⁹⁾ (図2)。アストロサイト特異的かつ背側線条体選択的に、人工の Gi 共役型 GPCR である Gi-DREADD hM4Di¹⁶⁾ を発現させ、これを刺激する合成リガンドの投与により、時空間的に制御した形で1で示したシグナルを模倣する系を確立した (図2A)。

背側線条体アストロサイトに Gi-DREADD 刺激を与えたマウス (以下 hM4Di マウス) では、合成リガンド投与2時間後にアストロサイト Ca^{2+} シグナルが上昇することが示された。また、hM4Di マウスはオープンフィールド試験において、落ち着きなく動き続ける様子 (多動) が観察された。線条体が担う機能の一つである運動調節を調べるために、Rotarod 試験を行ったところ、運動記憶には問題が見られなかったいっぽう、hM4Di マウスは落ち着きのない行動のため rotarod 上から落下することが散見された。これを受け、注意欠陥を調べる目的で、視覚的な刺激 (光、新奇物体) に依存する反応性を検証したところ、hM4Di マウスは顕著に鈍い反応性を示した。計10種の行動試験の結果を統合して、この行動表現型は注意欠陥・多動性

障害 (ADHD: Attention deficit/Hyperactivity disorder) を想起させる表現型であると結論づけた。

さらに、アストロサイト Gi-GPCR 刺激が ADHD 様行動を引き起こすメカニズムを解明した。アストロサイト特異的 RNA-seq、脳スライス電気生理学、覚醒マウスにおけるニューロン活動記録を組み合わせた結果、ADHD 様行動を示しているマウスでは、アストロサイトがシナプス産生因子 TSP-1 を放出し、線条体における皮質-線条体経路の興奮性シナプス過剰産生を引き起こしていることが見出された。TSP-1 は神経系発生期に高発現し、回路形成に寄与する分子であり、成体マウスでは発現が非常に低いことが知られていた¹⁷⁾。しかし、アストロサイト Gi シグナルの活性化は TSP-1 を“再活性化”し、皮質-線条体経路の興奮性シナプス伝達を増強し、神経回路活動を亢進させることが明らかになった。TSP-1 のニューロン受容体 $\alpha 2\delta$ -1 拮抗薬であるガバペンチン (ガバペン®) をマウスに投与したところ、異常なシナプス産生、回路活動亢進および行動が全て正常化された。以上の結果により、アストロサイト Gi シグナルの活性化は発生期シナプス産生因子 TSP-1 を再活性化し、神経回路・個体行動に変化をもたらすことが見出された⁹⁾ (図3A)。

3. アストロサイト不活性化がマウス行動、シナプス伝達に与える影響とその機構

以上の実験では、アストロサイト活性化による影響を検証したが、アストロサイト Ca^{2+} シグナルを減少させるアプローチでもその意義に迫った。アストロサイト Ca^{2+} シグナルの減少が確認されて

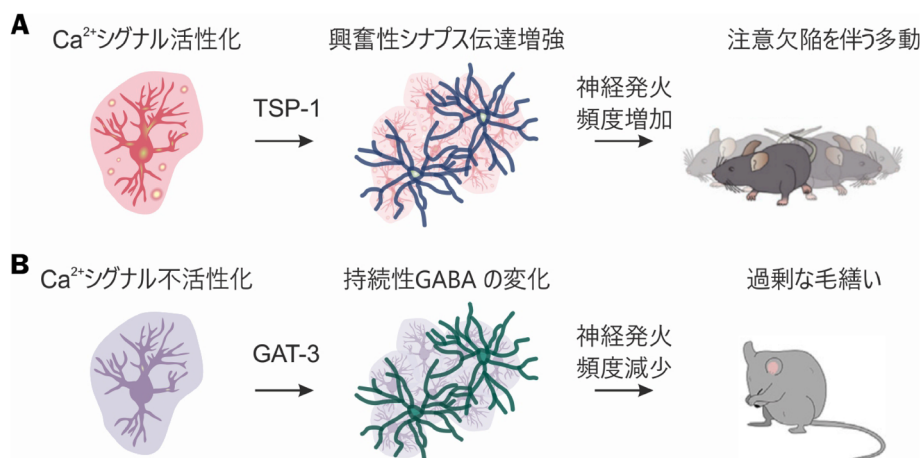


図3 背側線条体におけるアストロサイト Ca^{2+} シグナル活性化(A)および不活性化(B)による神経回路および動物行動への影響

いるマウスとして IP_3 受容体2型欠損マウスが知られているが、このマウスの表現型については長らく議論がある^{18, 19)} ことに加え、背側線条体特異的な欠損ではない。脳領域選択性を担保するために、AAVにより細胞膜上で機能する Ca^{2+} ポンプ(hPMCA2w/b)を過剰発現させ、 Ca^{2+} シグナルを低減させる新規の手法を CalEx (Calcium extruder) と名付けた(図2B)。AAVによる背側線条体アストロサイト特異的 CalEx 発現は、アストロサイト自発的 Ca^{2+} シグナルおよび GPCR 依存的 Ca^{2+} シグナルを70–80% 低減させることに成功した。

AAV 注入の3週間後に CalEx マウスの行動を複数の試験により解析したところ、過剰な毛繕い行動を示すことが見出された。単位時間当たりの毛繕い回数に変化はなく、毛繕いの時間が顕著に長くなっていた。高架式十字迷路試験の結果からは不安様行動が観察されなかったため、自らの意思に反して繰り返しの行動をしてしまう強迫性障害(OCD: Obsessive-compulsive disorder)を想起させる行動変化であると結論付けた。

この行動変化を引き起こすメカニズムを解明するために、脳スライス電気生理学を用いて、CalEx マウスにおける MSN のシナプス伝達記録を行った。その結果、興奮性伝達には影響がなく、持続性抑制が低減されていることが見出された。このシナプス表現型はアストロサイト GABA トラン

スポーター GAT-3 の阻害剤により消失した。興味深いことに、CalEx による OCD 様行動、またアストロサイト Ca^{2+} シグナル低減を伴うハンチントン病モデルマウスにおける OCD 様行動も GAT-3 阻害剤によって有意に抑制されることが分かった。CalEx マウスのアストロサイト RNA-seq 解析から、背側線条体アストロサイトの自発的 Ca^{2+} シグナルは、神経伝達物質バッファリングを含むホメオスタティックな機能を維持するための遺伝子発現を調節しており、その変調は精神障害様の行動変化を引き起こす可能性が見出された(図3B)。

おわりに

上記の一連の研究を通して、成体マウスの背側線条体におけるアストロサイトの活性化と不活性化がどちらも精神疾患様の行動異常を引き起こすことが明らかになった。さらに、薬理学的に標的可能な細胞間相互作用メカニズムを見出すことができた。特に、上述のガバペンチンはすでに抗てんかん薬として使用されているため、今回の発見はドラッグリポジショニングによる新規治療戦略に貢献できる可能性がある。今後は、操作時間の分解能やシグナル経路特異性が改良されたツールなどの開発を試み、それらを用いて異なる脳領域においてアストロサイトに摂動を与えることで、

アストロサイトの行動神経学的役割と意義が紐解かれていくことが期待される。グリア生理学の発展に伴い、将来的にニューロンに着目するだけでは見えてこなかった脳回路機能のしくみや疾患治療・診断・予防法の理解に寄与することが展望される。

謝 辞

本稿で紹介いたしました研究成果は、カリフォルニア大学ロサンゼルス校 (UCLA) 医学部生理学科で得られました。多大なるご指導を賜りました Baljit Khakh 教授と研究室でのコラボレーション、ディスカッションをしていただいた Khakh 研究室メンバーに厚く御礼申し上げます。また、共同研究先の Michael Fanselow 教授、Sotiris Masmanidis 准教授、Giovanni Coppola 教授 (全て UCLA 所属) に、それぞれ動物行動学、In vivo 電気生理学、RNA-seq 解析を学ばせていただいたことに心より感謝申し上げます。最後に、本稿執筆の機会を与えて下さいました日本神経化学会選考委員の先生方関係者の方々、並びに関係者の先生方に深く感謝申し上げます。

文 献

- Graybiel AM, Grafton ST. The striatum: Where skills and habits meet. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(8), a021691 (2015). doi: 10.1101/cshperspect.a021691
- Kreitzer AC, Malenka RC. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, 60(4), 543–554 (2008). doi: 10.1016/j.neuron.2008.11.005
- Zhai S, Tanimura A, Graves SM, Shen W, Surmeier DJ. Striatal synapses, circuits, and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol*, 48, 9–16 (2018). doi: 10.1016/j.conb.2017.08.004
- Ventura R, Harris KM. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci*, 19(16), 6897–6906 (1999).
- Chai H, Diaz-Castro B, Shigetomi E, Monte E, Oceau JC, Yu X, Cohn W, Rajendran PS, Vondriska TM, Whitelegge JP, Coppola G, Khakh BS. Neural circuit-specialized astrocytes: Transcriptomic, proteomic, morphological, and functional evidence. *Neuron*, 95(3), 531–549 (2017). doi: 10.1016/j.neuron.2017.06.029
- Oceau JC, Chai H, Jiang R, Bonanno SL, Martin KC, Khakh BS. An optical neuron-astrocyte proximity assay at synaptic distance scales. *Neuron*, 98(1), 49–66.e9 (2018). doi: 10.1016/j.neuron.2018.03.003
- Jiang R, Diaz-Castro B, Looger LL, Khakh BS. Dysfunctional calcium and glutamate signaling in striatal astrocytes from huntington's disease model mice. *J Neurosci*, 36(12), 3453–3470 (2016). doi: 10.1523/JNEUROSCI.3693-15.2016
- Diaz-Castro B, Gangwani MR, Yu X, Coppola G, Khakh BS. Astrocyte molecular signatures in Huntington's disease. *Sci Transl Med*, 11(514), eaaw8546 (2019). doi: 10.1126/scitranslmed.aaw8546
- Nagai J, Rajbhandari AK, Gangwani MR, Hachisuka A, Coppola G, Masmanidis SC, Fanselow MS, Khakh BS. Hyperactivity with disrupted attention by activation of an astrocyte synaptogenic cue. *Cell*, 177(5), 1280–1292.e20 (2019). doi: 10.1016/j.cell.2019.03.019
- Yu X, Taylor AMW, Nagai J, Golshani P, Evans CJ, Coppola G, Khakh BS. Reducing astrocyte calcium signaling in vivo alters striatal microcircuits and causes repetitive behavior. *Neuron*, 99(6), 1170–1187.e9 (2018). doi: 10.1016/j.neuron.2018.08.015
- Guerra-Gomes S, Sousa N, Pinto L, Oliveira JF. Functional roles of astrocyte calcium elevations: From synapses to behavior. *Front Cell Neurosci*, 11, 427 (2017). doi: 10.3389/fncel.2017.00427
- Wilson CJ, Kawaguchi Y. The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J Neurosci*, 16(7), 2397–2410 (1996).
- Carter AG, Sabatini BL. State-dependent calcium signaling in dendritic spines of striatal medium spiny neurons. *Neuron*, 44(3), 483–493 (2004). doi: 10.1016/j.neuron.2004.10.013
- Srinivasan R, Lu TY, Chai H, Xu J, Huang BS, Golshani P, Coppola G, Khakh BS. New transgenic mouse lines for selectively targeting astrocytes and studying

- calcium signals in astrocyte processes in situ and in vivo. *Neuron*, 92(6), 1181–1195 (2016). doi: 10.1016/j.neuron.2016.11.030
- 15) Yu X, Nagai J, Khakh BS. Improved tools to study astrocytes. *Nat Rev Neurosci*, 21(3), 121–138 (2020). doi: 10.1038/s41583-020-0264-8
- 16) Roth BL. DREADDs for neuroscientists. *Neuron*, 89(4), 683–694 (2016). doi: 10.1016/j.neuron.2016.01.040
- 17) Allen NJ, Eroglu C. Cell biology of astrocyte-synapse interactions. *Neuron*, 96(3), 697–708 (2017). doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.056
- 18) Fiacco TA, McCarthy KD. Multiple lines of evidence indicate that gliotransmission does not occur under physiological conditions. *J Neurosci*, 38(1), 3–13 (2018). doi: 10.1523/JNEUROSCI.0016-17.2017
- 19) Savtchouk I, Volterra A. Gliotransmission: Beyond black-and-white. *J Neurosci*, 38(1), 14–25 (2018). doi: 10.1523/JNEUROSCI.0017-17.2017



オンラインによる授賞式