

## グリア細胞内の微細なカルシウム活動も見逃さない 新しい生体内イメージング技術の開発

### 1. 発表者

金丸 和典（東京大学大学院医学系研究科 機能生物学専攻 細胞分子薬理学分野 助教）  
関谷 敬（東京大学大学院医学系研究科 機能生物学専攻 細胞分子薬理学分野 助教）  
飯野 正光（東京大学大学院医学系研究科 機能生物学専攻 細胞分子薬理学分野 教授）  
田中 謙二（慶應義塾大学医学部 精神・神経科学教室 特任准教授）

### 2. 発表のポイント：

- ◆これまで捉えることが困難であったグリア細胞の突起で起こる微小なカルシウムシグナル（カルシウム濃度の変化）を鮮明に可視化できる手法を開発しました。
- ◆超高感度カルシウムセンサーを導入した遺伝子改変マウスを作製し、グリア細胞の特に微細な突起に限局して発生する新しいカルシウムシグナルを発見しました。
- ◆本手法は、脳のさまざまな生理／病理機能に重要であると示唆されているグリア細胞の機能解明に大きく貢献することが期待されます。

### 3. 発表概要：

グリア細胞は神経細胞を取り囲むように脳に存在する細胞で、脳の平常の機能だけでなく病態制御への関与も示唆されている重要な細胞です。グリア細胞の活動の指標となるのが細胞内カルシウムイオン（Ca<sup>2+</sup>）の濃度変化（カルシウムシグナル）です。これまでの研究では、生きた動物個体のグリア細胞のカルシウムシグナルを細胞の中心部（細胞体）で観察する手法が主流であったため、グリア細胞の微細な突起部分で起こるカルシウムシグナルの観察は困難でした。今回、東京大学大学院医学系研究科 機能生物学専攻 細胞分子薬理学分野の飯野正光 教授らと慶應義塾大学医学部 精神・神経科学教室の田中謙二 特任准教授らの共同研究グループは、超高感度カルシウムセンサーをグリア細胞の隅々まで行き渡らせた遺伝子改変マウスの作製に成功し、グリア細胞全体のカルシウムシグナルを観察しました。その結果、微細な突起のみで発生する新しいカルシウムシグナルを発見しました。

この新規手法は、検証の余地が多く残されている「グリア細胞活動の謎」を紐解くための、極めて強力なツールとなることが期待され、脳のさまざまな生理機能や神経変性疾患・脳梗塞等の病理機能の解明につながる可能性があります。本研究成果は、2014年6月26日に米国科学雑誌『Cell Reports』オンライン版に掲載されます。

#### 4. 発表内容：

##### 【研究の背景】

グリア細胞の一種であるアストロサイト（注1）は、無数の細かい突起を持つ球形の細胞であり（図1左）、神経細胞を取り囲むように脳に存在します。アストロサイトは、神経細胞の情報処理や脳血流の制御などの平常時の脳機能に貢献するだけでなく、神経変性疾患や脳梗塞といった病態の制御にも深く関与することが示唆されている重要な細胞です。そのアストロサイトの活動の指標となるのが細胞内カルシウムイオンの濃度変化（カルシウムシグナル）です。アストロサイトのカルシウムシグナルを観察する手法は、これまでに急速な発展を遂げ、多くの発見をもたらしてきました。しかし、これまでの手法では、生きた動物個体におけるアストロサイトのカルシウムシグナルを、細胞の中心部の構造である細胞体で観察する手法がほとんどであったため、アストロサイト全体あるいは微細突起でカルシウムシグナルがどのような時空間動態を示すかは明らかにされていませんでした。

##### 【研究内容】

研究グループは、KENGE-tet システム（注2）を応用した遺伝子工学的な手法により、超高感度カルシウムセンサーである YC-Nano50（注3）をアストロサイトにのみ発現する遺伝子改変マウスを作製しました。このマウスのアストロサイトは細胞の隅々までカルシウムセンサーを発現し、そのセンサーが発する蛍光によって微細な突起までを観察できました（図1左）。このマウスに生体内イメージング法（注4）を適用し、アストロサイトのカルシウムシグナルを測定しました。YC-Nano50 は、2種類の蛍光タンパク質の蛍光強度比を算出することでカルシウムシグナルを検出するため、動物の心拍・呼吸・運動といった生体内イメージング法では不可避なノイズの影響をある程度減らすことができました（図1右）。このことは生体内イメージング法におけるカルシウムシグナルの高精度な検出に、今回の手法が非常に適していることを示しています。

このマウスのイメージングにより、アストロサイトのカルシウムシグナルの新しい特性が明らかになりました。麻酔下・無刺激の条件下で、アストロサイトが自発的に起こすカルシウムシグナルを測定したところ、アストロサイトの微細突起に局限したカルシウムシグナルが非常に多く、細胞体ではほとんど起こらないことが分かりました（図2）。このカルシウムシグナルは、夜空に瞬く星々を連想させることから「Ca<sup>2+</sup> twinkle」（カルシウム トウインクル）と名づけました。Ca<sup>2+</sup> twinkle は、主に細胞体を観察する従来のイメージング法では観察することができない新しいカルシウムシグナルです。また、脳をマウスから取り出し、薄い切片にする急性スライスと呼ばれる標本でカルシウムシグナルを測定したところ、自発的なカルシウムシグナルは見られるものの、生体内とは異なり細胞体でも多くのシグナルが

観察されました。微細突起に好発する  $\text{Ca}^{2+}$  twinkle の性質には生体内環境が必要であることが示唆されます。

さらに、遺伝子改変マウス尾部を刺激した際のアストロサイトのカルシウムシグナルを観察した結果、アストロサイトの微細突起の先端部分から生じたカルシウム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が鮮明に可視化できました。この結果は、アストロサイトの微細突起が、外部からの刺激に最も素早く、敏感に応答する場所であることを直接的に示しています。

#### 【今後の展望】

アストロサイトの活動は非常に捉えにくい、また、捉えても条件や研究グループによって結果が異なり、謎が多いとされてきました。従来法の解像度をはるかに凌ぐ今回の新規手法は、アストロサイトの活動の謎を解き明かすための極めて強力なツールとなります。今後グリア細胞、ひいては脳のさまざまな生理機能や神経変性疾患・脳梗塞等の病理機能解明に光明をもたらすことが期待されます。

#### 5. 発表雑誌：

雑誌名：Cell Reports（2014年6月26日オンライン版）

論文タイトル（和訳）：*In vivo* visualization of subtle, transient and local activity of astrocytes using an ultrasensitive  $\text{Ca}^{2+}$  indicator（生体内アストロサイトの局所で起こる僅かな活動を超高感度カルシウムインジケーターで可視化する）

著者：Kazunori Kanemaru, Hiroshi Sekiya, Ming Xu, Kaname Satoh, Nami Kitajima, Keitaro Yoshida, Yohei Okubo, Takuya Sasaki, Satoru Moritoh, Hidetoshi Hasuwa, Masaru Mimura, Kazuki Horikawa, Ko Matsui, Takeharu Nagai, Masamitsu Iino and Kenji F Tanaka

DOI 番号：10.1016/j.celrep.2014.05.056

アブストラクト URL：<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.056>

#### 6. 問い合わせ先：

田中 謙二（たなか けんじ）

慶應義塾大学医学部 精神・神経科学教室 特任准教授

Tel: 03-5363-3934

Email: [kftanaka@a8.keio.jp](mailto:kftanaka@a8.keio.jp)

飯野 正光 (いいの まさみつ)

東京大学大学院医学系研究科 機能生物学専攻 細胞分子薬理学分野 教授

Tel: 03-5841-3414

Fax: 03-5841-3390

Email: iino@m.u-tokyo.ac.jp

## 7. 用語解説：

注1) アストロサイト：

多数の細かい突起を持つグリア細胞の一種。カルシウムシグナルを介する神経伝達の調節や脳傷害時の神経保護作用などが近年報告され、アストロサイトの脳機能への貢献を解明するための研究が多くなされている。Astro (星) -cyte (細胞) という名前は、古くから用いられる染色法でアストロサイトの細胞骨格が星形に見えることに由来する。

注2) KENGE-tet システム：

Knockin-mediated ENhanced Gene Expression system with transactivator (tTA)-tet operator (tetO) strategy という、目的遺伝子の高効率発現が可能な遺伝子改変マウス作製法。この方法で作製したカルシウムセンサー発現マウスと別種の遺伝子改変マウス (*Mlc1-tTA* マウス) の交配により、アストロサイトのみカルシウムセンサーを発現するマウスを作製した。

注3) YC-Nano50：

Yellow Cameleon-Nano 50 と呼ばれる、 $\text{Ca}^{2+}$  に対して非常に高い感受性・応答性を持つタンパク質型カルシウムセンサー。波長特性の異なる二つの蛍光タンパク質間で起こる蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) という物理現象を利用して、カルシウムイオンの濃度を蛍光の強さに変換する。

注4) 生体内イメージング法：

生きたままの実験モデル動物 (本研究ではマウス) の脳組織に直接、顕微鏡のレンズを密着させて高解像度の光学測定を行う技術。脳の深部でも鮮明な画像を得るため、二光子励起 (れいき) 現象という特殊な光学現象を用いて測定する。

8. 添付資料：

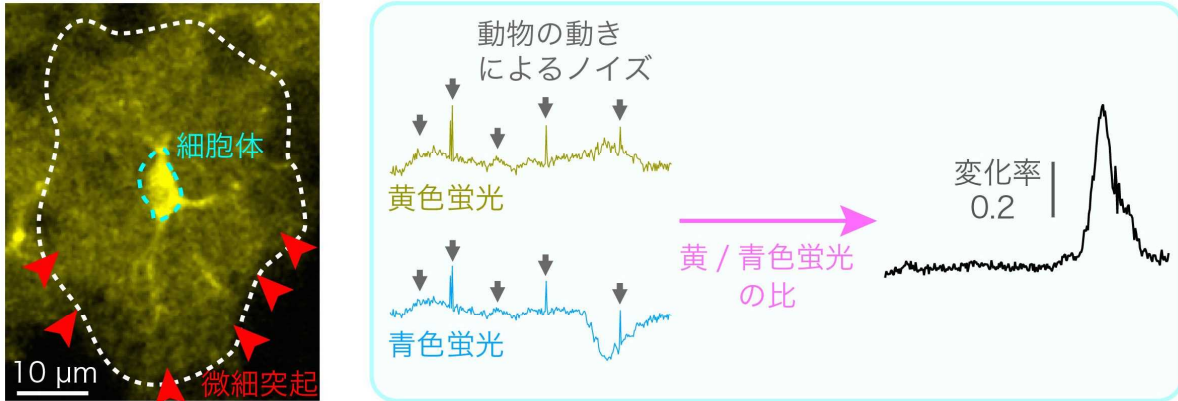


図1. 細胞全体に発現する超高感度カルシウムセンサーで検出したカルシウムシグナル

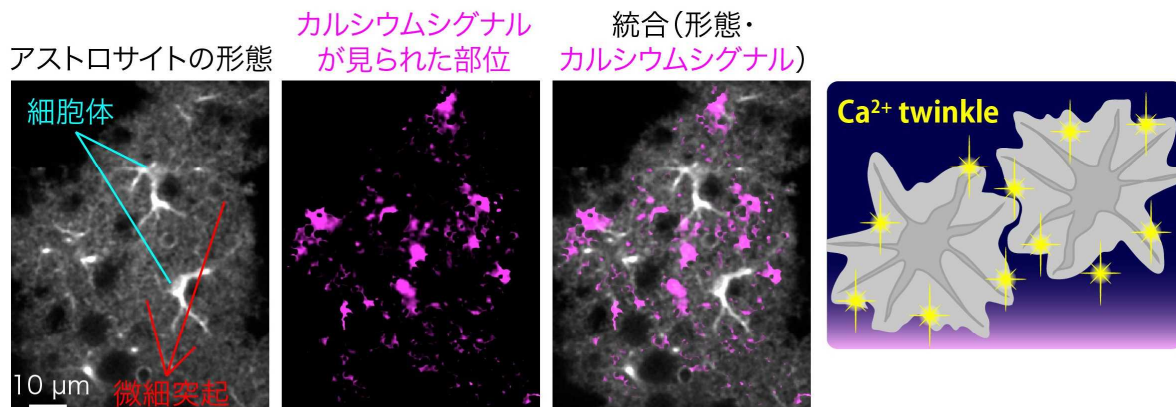


図2. 微細突起に限局して見られる自発的カルシウムシグナル「Ca<sup>2+</sup> twinkle」

高解像度の図は以下のウェブサイトにて取得できます。

<https://sites.google.com/site/twinklepress2014/>