

博士論文

線条体ニューロン・アストロサイトの双方で発生する
代謝型グルタミン酸受容体依存的・活動電位非依存的
長時間持続自発 Ca^{2+} リズム

東北大学大学院医学系研究科 保健学専攻

医用情報技術科学領域

田村 篤史

目次

1. 要約.....	1
2. 背景.....	3
2-1. 大脳基底核.....	3
2-2. 線条体を構成する細胞群.....	4
2-2-1. 神経細胞 (neuron).....	4
2-2-2. 神経膠細胞 (glia).....	5
2-2-3. 線条体の細胞で発現する代謝型受容体.....	6
2-3. 細胞内の Ca^{2+} の機能と動態.....	7
2-3-1. 細胞内の Ca^{2+} の機能.....	7
2-3-2. 細胞内の Ca^{2+} 排出機構.....	8
2-3-3. 細胞膜の Ca^{2+} 流入機構.....	9
2-3-4. 小胞体.....	10
2-3-5. 中枢神経系における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 振動現象.....	11
2-4. Ca^{2+} イメージング.....	12
2-4-1. Ca^{2+} イメージングの原理.....	12
2-4-2. Fura-2 LR の細胞への導入.....	15
3. 研究目的.....	17
4. 研究方法.....	18
4-1. GFAP-GFP マウス.....	18
4-2. 標本作製.....	19
4-3. 光学計測系.....	20
4-4. データ解析.....	21
4-4-1. データ処理と特徴量の解析.....	21
4-4-2. 自発 Ca^{2+} リズムの複数細胞間での相関の解析.....	22
4-5. 免疫染色.....	24
4-6. 薬理実験.....	25
5. 結果.....	27
5-1. 線条体のニューロンとアストロサイトの双方から観測される長時間持続自発 Ca^{2+} リズム.....	27

5-2. ニューロンとアストロサイトの自発 Ca^{2+} リズムへの mGluR5 依存的シグナル経路の寄与	31
5-3. ニューロンの自発 Ca^{2+} リズムの神経活動依存性.....	32
5-4. 自発 Ca^{2+} リズムの複数細胞間同期.....	34
6. 考察.....	36
6-1. 遅い自発 Ca^{2+} リズムの発生機構	36
6-2. 遅い自発 Ca^{2+} リズムの機能的意義.....	40
6-3. ニューロンとアストロサイトの判別.....	43
7. 今後の展望	44
8. 結論.....	45
9. 参考文献.....	47
10. 図	55
10-1. 図の説明	55
10-2. 図.....	63

1. 要約

線条体は脳基底核の主な入力部であり、大脳皮質から入力を受けている。線条体は脳基底核の他の核との間にシナプス結合を形成し、脳基底核の出力は再び大脳皮質に入力する。線条体の活動は、運動制御や強化学習に関係しているといわれている。線条体の投射ニューロンにはグループ I 代謝型グルタミン酸受容体が多く発現しており、この線条体のグループ I 代謝型グルタミン酸受容体はパーキンソン病の治療標的となる可能性があり、線条体において最も重要な受容体であるドーパミン受容体との間の相互作用も報告されている。このグループ I 代謝型グルタミン酸受容体と細胞内 Ca^{2+} 濃度の間には密接な関係がある。

そこで、本研究では、急性スライス標本の線条体細胞での Ca^{2+} シグナルについて、細胞種ごとの特性や発生機構を明らかにすることを目的とした。

Ca^{2+} シグナルをニューロンとアストロサイトを区別して観測するために、アストロサイト特異的に蛍光タンパク質を発現した遺伝子組換え動物である GFAP-GFP マウスの大脳から急性スライス標本を作製した。 Ca^{2+} イメージング法を用いて、GFAP-GFP マウスの急性スライス標本の線条体細胞から細胞内 Ca^{2+} 濃度の計測を行った。計測した Ca^{2+} 振動の特性をとらえるために、発生頻度、振幅、持続時間、上昇の傾き、減衰の傾きの特徴量について、ニューロンとアストロサイトの間での比

較や薬理効果の評価、多細胞間の同期の解析を行った。

線條体ではニューロンとアストロサイトの両方で、遅く、持続時間の長い自発的な細胞内 Ca^{2+} 濃度変化 (自発 Ca^{2+} リズム) が生じることがわかった。活動電位の阻害と興奮性シナプス伝達の阻害はニューロンとアストロサイトのどちらの細胞の自発 Ca^{2+} リズムも抑制しなかった。一方で、細胞内 Ca^{2+} ストアの枯渇や、 IP_3 受容体の阻害はニューロンとアストロサイトのどちらの自発 Ca^{2+} リズムの発生頻度も大きく減少させた。また、 mGluR5 の阻害薬もニューロンとアストロサイトのどちらの自発 Ca^{2+} リズムの発生頻度も減少させた。この結果はニューロンとアストロサイトの自発 Ca^{2+} リズムの主要な発生要因は活動電位非依存的であり、かつ mGluR5-IP_3 シグナル経路が関与していることを示している。しかし、ニューロンの自発 Ca^{2+} リズムの振幅、持続時間、上昇の傾きは活動電位依存的であった。また、自発 Ca^{2+} リズムは複数細胞間での同期現象を示し、ニューロンとアストロサイトのどちらも、この同期現象に参加していた。そして、この同期現象もまた活動電位依存的であった。

自発 Ca^{2+} リズムの同期現象の存在とその活動電位依存性から、 mGluR5 依存的な自発 Ca^{2+} リズムが線條体でのニューロン - グリア相互作用に関与する可能性が示唆された。

2. 背景

2-1. 大脳基底核

大脳基底核は、大脳皮質からの入力を受け出力を視床に送り、視床は大脳皮質へ入力する。大脳基底核は解剖学や生理学など分野により解釈が異なるが、ここで言う大脳基底核とは、機能的な結合を形成している線条体、淡蒼球、黒質、視床下核の 4 つの領野を含む領域のことである¹⁾。本研究で対象とした線条体はこの中でも大脳皮質からの入力を主に受け取る重要な部位である²⁾。

大脳基底核は運動制御に深く関連していることが知られている^{3),4)}。線条体は、運動に直接関与した働きだけでなく、認知、記憶、学習など運動発現に影響を与えるさまざまな機能に関係している^{5),6)}。例えば、大脳基底核が関与している学習として強化学習があげられる。この強化学習には、線条体とそこへ投射するドーパミンニューロンの活動が重要であると言われている⁷⁾。運動制御や強化学習に関わる情報は大脳基底核で統合・処理されたのち、再び大脳皮質に戻ってくる、つまり、大脳基底核は大脳皮質との間でループ回路を形成する²⁾ (図 1)。このループ回路の中で、線条体からの投射先は 2 つに分けられ、淡蒼球内節／黒質網様部へ投射する (直接路) ものと、線条体から淡蒼球外節-視床下核-淡蒼球内節／黒質網様部と投射する (間接路) ものがある。直接路、間接路を担う線条体のニューロンはそれぞれ異なるニューロンであ

る。

また、パーキンソン病などの大脳基底核の疾患では運動障害が現れることが知られている。パーキンソン病の原因は、黒質緻密部から線条体へと投射するドーパミンニューロンの障害である。ある仮説では、ドーパミンによる線条体直接路ニューロンへのドーパミン D1 受容体を介した興奮性入力と、間接路ニューロンへの D2 受容体を介した抑制性入力なくなる。このような直接路・間接路の変化が最終的に寡動や無動といったパーキンソン病の症状を引き起こしている⁸⁾。

2-2. 線条体を構成する細胞群

2-2-1. 神経細胞 (neuron)

線条体には 1 種類の投射ニューロンと少なくとも 3 種類以上の介在ニューロンが存在する⁹⁾。線条体の投射ニューロンは medium spiny neuron (MSN) と呼ばれ、線条体の神経細胞のうち、げっ歯類では 90% 以上、霊長類では 75% を占める。MSN は γ -アミノ酪酸 (gamma-aminobutyric acid; GABA) 作動性ニューロンであり、前述のモデル (節 2-1、図 1) のように、直接路のものと、間接路のもの 2 種類に分けられる。介在ニューロンには コリン作動性ニューロン、GABA 作動性 fast-spiking (FS) ニューロン、GABA 作動性 low threshold spiking (LTS) ニューロンがあり、霊長

類ではさらに カルレチニン含有 GABA 作動性ニューロンも存在する。これらのニューロンの線条体内での配置は大脳皮質や小脳と異なり、層構造をなしていない。

2-2-2. 神経膠細胞 (glia)

中枢神経系にはニューロンの他にグリア細胞が存在し、ニューロンの周りを取り囲んでいる。グリア細胞は、ニューロンと異なり、活動電位を発生せず、ニューロンの機能を補助する働きを担っていると考えられている。

脊椎動物の中枢神経系では、グリア細胞は通常、アストロサイトとオリゴデンドロサイトのマクログリアとそれ以外のミクログリアに分けられる。アストロサイトは、脳内で広く突起を伸ばして微小血管網や神経回路の間を埋めるかのように存在しており、神経系の構築、細胞外液の恒常性の維持、血液脳関門の形成などの重要な働きを果たしている。オリゴデンドロサイトは神経軸索に巻き付いて有髄神経を形成や、神経繊維を束ねる働きをしており、末梢神経繊維にミエリン鞘を作るシュワン細胞と同類の細胞である。ミクログリアは異物や死細胞を貪食し脳内環境を保つ役割を担っている。

近年、これらのグリア細胞が神経情報伝達に関わっているとの見方もあり、例えば、ニューロンのシナプス前末端から放出された神経伝達物質によって、グリア細胞の細

胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) が変化することや^{10),11)}、グリア細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変化に応じて、神経細胞のシナプス後活動が変化することなどが報告されている^{12),13)}。このことから、脳研究を進める上で、神経細胞とグリア細胞の関係の重要性は高まっている。

2-2-3. 線条体の細胞で発現する代謝型受容体

線条体の細胞には様々な代謝型受容体が発現している。たとえば、ドーパミン受容体 (dopamine receptor; DR) は MSN だけでなく介在ニューロンにまで幅広く発現しており、大脳基底核の機能や運動に深く関わっている¹⁴⁾⁻¹⁷⁾。前述した、ドーパミンの欠乏により起こるパーキンソン病では運動障害が生じることからも DR と線条体が行う運動制御との関係は明らかである。このように DR は線条体の情報処理において非常に重要な受容体の一つである。DR 以外に、代謝型グルタミン酸受容体 (metabotropic glutamate receptor; mGluR) も線条体の細胞で高い密度で発現している代謝型受容体の一つである。線条体のニューロンにはいくつかの種類の mGluR が発現している^{18),19)}。その中でもグループ I の mGluR に属する mGluR5 は線条体の広い範囲で発現しており、ニューロンだけでなくアストロサイトにも発現している²⁰⁾。また、mGluR5 はパーキンソン病の治療ターゲットとなる可能性を示唆する報告が複数

ある²¹⁾⁻²³⁾。また、これに関連して、Bergson らは mGluR5 をはじめとする グループ I mGluR やムスカリン受容体の活性化により生じる Ca^{2+} や IP_3 などが、DR の機能を修飾することを報告している²⁴⁾。このように、DR と mGluR5 などの他の代謝型受容体の間には相互作用が存在することから、DR と同様に、mGluR5 も線条体の情報処理へ寄与することが想定される。

2-3. 細胞内の Ca^{2+} の機能と動態

2-3-1. 細胞内の Ca^{2+} の機能

細胞内の Ca^{2+} は細胞内シグナル伝達分子であり、細胞の様々な状況で、多様な刺激に対して反応し、その濃度が変化する²⁵⁾。状況に応じてその濃度を変化させる細胞内 Ca^{2+} は神経伝達物質の放出、遺伝子発現の調節、細胞内タンパク質の活性、筋収縮などに関わっており、重要な働きをしている²⁵⁾ (図 2A)。例えば、小胞体にある ryanodine 受容体は Ca^{2+} により調節される。 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルは Ca^{2+} により開閉が調節される。他にもリン脂質加水分解酵素であるホスホリパーゼ C (phospholipase C; PLC) やタンパク質リン酸化酵素であるプロテインキナーゼ C (protein kinase C; PKC) は Ca^{2+} により活性化される。また、同じタンパク質リン酸化酵素であるプロテインキナーゼ A (protein kinase A; PKA) は環状アデノシンリン酸

(cyclic adenosine monophosphate; cAMP) により調節されるが、 Ca^{2+} は cAMP の合成に関わる酵素であるアデニル酸シクラーゼ (adenylate cyclase) を活性化するため、PKA は間接的に Ca^{2+} によって調節されると言える。そして、この PKA は電依存性 Ca^{2+} チャネルを調節する。遺伝子発現の調節に関しては、 Ca^{2+} は核の内外で核内因子 κB (nuclear factor-kappa B; NF- κB) や cAMP 応答配列結合タンパク質 (cAMP response element binding protein; CREB) などの様々な転写因子を調節する。また、 Ca^{2+} に活性化される PKC やカルモジュリン (calmodulin; CaM) なども転写因子を調節する。

2-3-2. 細胞内の Ca^{2+} 排出機構

細胞外液の Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) は約 2 mM であるのに対して、静止時において細胞質の Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) は約 100 nM にすぎず、その濃度差は 1 万倍以上にもなる。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が低濃度に維持されることにより、少量の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇でも、細胞に大きな影響を与えることになる。この濃度差を維持するため、細胞内の Ca^{2+} は Ca^{2+} -ATPase (Ca^{2+} ポンプ) や Na^{2+} - Ca^{2+} 交換体により能動的に細胞外へ排出される。 Ca^{2+} ポンプはアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate; ATP) のエネルギーを利用して、 Na^{2+} - Ca^{2+} 交換体は細胞内外のナトリウムイオン (Na^+) の電気化学勾配を利用して Ca^{2+} を細胞外へ排出する (図 2B)。

2-3-3. 細胞膜の Ca^{2+} 流入機構

Ca^{2+} は細胞の様々な状況で、多様な刺激に対して反応し、その濃度が変化する²⁵⁾。

細胞外からは細胞の興奮やシナプス伝達により電位依存性の Ca^{2+} チャネルやイオン透過型の受容体を通して Ca^{2+} が細胞内に流入する。また、細胞内の二次メッセンジャーの働きにより小胞体 (endoplasmic reticulum; ER) のようなオルガネラから Ca^{2+} が放出される (後述 2-3-3) ことによっても $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は上昇する (図 2B)。

細胞膜は脂質であるため、水溶性であるイオンの細胞膜への透過性は極めて低いが、膜上にはチャネルと呼ばれるトンネル状のタンパク質分子があり、1 価や 2 価のイオンを透過させる仕組みになっている。イオンチャネルはチャネルごとにイオン選択性が異なり、細胞膜には Ca^{2+} を選択的に透過させるイオンチャネルも存在する。このうち、膜電位によって開閉が制御されるものを電位依存性 Ca^{2+} チャネルと呼ぶ。電位依存性 Ca^{2+} チャネルは 1 種類ではなく、性質の異なる L、N、P、Q、R、T 型の複数の種類が存在する。

電位依存性 Ca^{2+} チャネルが膜電位の脱分極によって開くチャネルであるのに対して、開閉確率が膜電位に依存しないタイプのものもある。その主なものがイオンチャネル型受容体である。例えば、イオンチャネル型のグルタミン酸受容体 (ionotropic

glutamate receptor; iGluR) のうち N-methyl-D-aspartate (NMDA) により選択的に活性化される受容体 (NMDA 受容体) は Ca^{2+} 透過性であり、シナプス前末端から放出されたグルタミン酸の作用に加え、細胞膜の電位が大きく上昇すると、受容体のチャンネルをブロックしているマグネシウムイオン (Mg^{2+}) がはずれてチャンネルが開き、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} を透過させる。

2-3-4. 小胞体

細胞内のオルガネラである小胞体も Ca^{2+} を取り込む能力をもち、同時に蓄えた Ca^{2+} を細胞質中に放出する機構も備えている (図 2B)。小胞体内の Ca^{2+} 濃度は $[\text{Ca}^{2+}]_e$ と同程度の高濃度になっている。神経伝達物質など細胞外からの刺激により二次メッセンジャーが関わる間接的な機構で小胞体から Ca^{2+} が放出され $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇する。

小胞体には細胞膜の Ca^{2+} ポンプとは構造的に異なる Ca^{2+} ポンプが存在し、細胞質の Ca^{2+} を小胞体に取り込む。ATP に依存した小胞体への Ca^{2+} 取り込みは $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を低く維持する上で重要である。また、刺激に反応して Ca^{2+} を放出し、空になった小胞体内の Ca^{2+} を再充填して次の刺激に対応できるようにするのもこのポンプの役割である。

小胞体からの Ca^{2+} 放出機構の 1 つにはイノシトール - 1, 4, 5 - 三リン酸 (inositol 1, 4, 5-triphosphate; IP_3) という二次メッセンジャーが関与している。グループ I mGluR などの一部の代謝型受容体では、受容体が刺激されたとき、受容体に結合した G タンパク質の働きにより、PLC が活性化される。細胞膜に存在するリン脂質であるホスファチジルイノシトール - 4, 5 - ニリン酸 (phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate; PIP_2) を加水分解し、 IP_3 と 1, 2-diacylglycerol を産生する。産生した IP_3 は小胞体の IP_3 受容体を活性化し、 Ca^{2+} を細胞質内へ放出する。この機構は IP_3 誘発性 Ca^{2+} 放出 (IP_3 -induced Ca^{2+} release; IICR) と呼ばれる。小胞体にはもう 1 つ、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ がある程度まで上昇すると、 Ca^{2+} 自体が引き金となって Ca^{2+} が放出される Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出 (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release; CICR) という機構がある。この機構は小胞体にあるリアノジン受容体が担っている。IICR、CICR の機構は神経細胞や筋細胞の興奮性を持つ細胞だけでなく、グリア細胞のような興奮性をもたない細胞にも存在し、細胞内の Ca^{2+} 動態に関与している。

2-3-5. 中枢神経系における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 振動現象

中枢神経系において $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の振動現象は様々な場所で報告されている。例えば、ニューロンでは大脳皮質^{26),27)} や線条体²⁸⁾ のスライス標本や、海馬のスライス培養

標本²⁹⁾などで自発的な $[Ca^{2+}]_i$ 変動を計測した報告がある。これらの報告で示されているのは基本的に活動電位に伴い電位依存性 Ca^{2+} チャネルから Ca^{2+} が流入したことにより変化した $[Ca^{2+}]_i$ 変動を見ているものと考えられ、多くの研究では $[Ca^{2+}]_i$ 変動を活動電位の発生を複数細胞で捉えるための指標として用いている。一方、グリア細胞でも $[Ca^{2+}]_i$ の振動現象が報告されており、これらは小胞体からの Ca^{2+} 放出由来のものが多く見られる³⁰⁻³²⁾。グリア細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 振動現象は大脳皮質のアストロサイトではリアノジン受容体を介した CICR によって起こっているとされており³¹⁾、海馬では IP_3 受容体に関係していると言われており³⁰⁾。これらのグリア細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 振動現象は神経細胞での活動電位依存的 $[Ca^{2+}]_i$ 変動に比べ、遅い変動であるという点が各分野間で共通している。しかし、ニューロンでもグリア細胞のような遅い $[Ca^{2+}]_i$ 振動現象が脊髄急性スライス標本のニューロン³³⁾や線条体や黒質の培養ニューロン^{34),35)}で報告されており、 $[Ca^{2+}]_i$ 振動現象は実に多様であることが分かる。

2-4. Ca^{2+} イメージング

2-4-1. Ca^{2+} イメージングの原理

本研究では、 $[Ca^{2+}]_i$ 変化を測定する方法として Ca^{2+} イメージング法を採用した。イメージングは 2 次元画像としてデータを取得するため、画像上の多くの細胞の挙

動を同時に計測することができる。 Ca^{2+} イメージング法では Ca^{2+} 濃度の変化に伴い
蛍光を変化させる試薬 (Ca^{2+} 感受性蛍光色素) を細胞内に導入し、 Ca^{2+} 感受性蛍光
色素の蛍光変化を測定することで $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化を測定する。

Ca^{2+} 感受性蛍光色素には、 Ca^{2+} の結合量に応じて蛍光強度のみが変化するもの (1
波長励起 1 波長蛍光の色素:例 Oregon Green 488 BAPTA-1) と Ca^{2+} の蛍光量により
最大吸収波長 (2 波長励起 1 波長蛍光の色素:例 Fura-2) や最大蛍光波長 (1 波長励
起 2 波長蛍光の色素:例 Indo-1)が変化するものがある。本研究では 2 波長励起 1
波長蛍光の色素である Fura-2 LR (Fura-PE3)³⁶⁾ 用いた。

2 波長励起 1 波長蛍光の色素を用いる場合、2 つの波長で励起し、その蛍光をそれ
ぞれ計測する。具体的には Fura-2 LR の場合、340 nm と 380 nm の波長で励起し、
そのときの蛍光量 (F_{340} , F_{380}) を計測する。340 nm で励起したときの蛍光量は $[\text{Ca}^{2+}]_i$
に応じて増大し、380 nm で励起したときの蛍光量は減少するため、この比 ($R = F_{340} /$
 F_{380}) を取ると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に応じた変化量をより大きく取ることができる (図 3)。また、
1 波長励起 1 波長蛍光の色素の場合、細胞に取り込まれている色素の絶対量によっ
て蛍光強度が変化してしまうため、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の絶対値を知ることは困難であるが、
Fura-2 LR などでは R を算出することにより蛍光色素の量に、あるいは蛍光色素の
退色にも左右されない計測結果を得ることができる。2 波長励起 1 波長蛍光の色素に

については、Grynkiewicz らにより $[Ca^{2+}]_i$ と蛍光量を対応付ける定式化が行われている³⁷⁾。

$$[Ca^{2+}] = Kd \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \left(\frac{S_{f380}}{S_{b380}} \right) \quad (1)$$

但し、

S_{f340}, S_{f380} : $[Ca^{2+}] = 0$ のときにそれぞれの励起光で生じる蛍光強度

S_{b340}, S_{b380} : $[Ca^{2+}]$ 飽和状態のときにそれぞれの励起光で生じる蛍光強度

また、式 (1) を、

$$Kd' = \frac{S_{f380}}{S_{b380}} Kd \quad (2)$$

として表すと、(3) 式のようになる。

$$[Ca^{2+}] = Kd' \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \quad (3)$$

R_{min}, R_{max}, Kd' はそれぞれ、キャリブレーションにより求めることができる。具体的

には、まず実験に使用する細胞外液を $[Ca^{2+}] = 0$ かつ EGTA (Ca^{2+} キレート剤)、

と高濃度 Ca^{2+} 溶液を使用し、ionomycin を用いて細胞内外の $[Ca^{2+}]$ を同じにする

ことにより、各 $[Ca^{2+}]$ での R を計測する。次に $R-[Ca^{2+}]$ プロット を作成し (3) 式

R について変形した (5) 式でフィッティングすることで、 R_{min}, R_{max}, Kd' が計算でき

る。

$$R = \frac{[Ca^{2+}]R_{max} + Kd'R_{min}}{[Ca^{2+}] + Kd'} \quad (4)$$

ただし、実際のところは、細胞や組織の自家蛍光の影響が無視できず、また K_d 値が生体内では状況により異なりうるため、厳密な定量は困難である。このため、通常は、 $[Ca^{2+}]_i < K_d$ として近似し、

$$\Delta[Ca^{2+}]_i \propto \Delta R \quad (5)$$

但し、

$\Delta[Ca^{2+}]_i$: $[Ca^{2+}]_i$ の変化量

ΔR : R の変化量

として表すことが多い。そのため、本論文でも原則、 ΔR を $\Delta[Ca^{2+}]_i$ の指標として記述することとした。

2-4-2. Fura-2 LR の細胞への導入

細胞内に Ca^{2+} 感受性蛍光色素を導入する方法はいくつか存在するが、本研究では、多細胞へ導入する方法として最適な acetoxymethyl ester (AM) 体を用いた方法を採用した。この方法について説明する。

細胞膜は脂質で構成されるため、水溶液中でイオンとして存在する Ca^{2+} 感受性蛍光色素は水溶性であり、そのままでは細胞膜を透過できない。AM 体は Ca^{2+} 感受性蛍光色素のカルボキシル基と AM 基をエステル結合させた物質で、色素そのものを

脂溶性にすることができる。脂溶性になったことにより、AM 体を溶解させた細胞外液に細胞あるいは組織を浸しておくだけで細胞内に色素が負荷される。ただし、AM 体はイオンではないのでこのままでは Ca^{2+} と結合しない。しかし、通常の細胞内にはエステラーゼ (エステル分解酵素) が存在し、細胞内に導入された色素の AM 体はエステラーゼにより分解され、元の Ca^{2+} 感受性蛍光色素に戻る。

3. 研究目的

大脳基底核線条体は大脳基底核の主な情報の入口であるだけでなく、運動制御、強化学習など様々な生理的機能を有している重要な部位である。この線条体では、パーキンソン病との関係で知られるドーパミン受容体を初めとした、代謝型受容体を介した機能調節が行われている。 Ca^{2+} は細胞内シグナル伝達分子であり、その細胞内動態は細胞の内部状態を示していると考えられる。この細胞内の Ca^{2+} の状態は、代謝型受容体の活性化で変化することが知られている。そこで、本研究では線条体の自発的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化を多細胞から同時に計測することにより、その特徴を記述することと、その発生機構を明らかにすることを目的とする。なお、このような自発的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変動はニューロン、グリアのどちらで発生しているのか不明であるため、細胞腫を区別するためにアストロサイトに GFP を発現している遺伝子組換えマウスを用いて計測を行う。これにより、ニューロン、アストロサイトを区別して、自発 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変動の特徴を記述できるだけでなく、それらの両者の相関関係を解析することにより、ニューロン-グリア相互作用についても考察することが可能である。

4. 研究方法

全ての実験動物の取り扱いは、東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会、大阪大学動物実験委員会の承認を受け、東北大学と大阪大学の定める動物実験等に関する規定及び、日本生理学会及び National Institutes of Health (NIH) の定める基本的指針に基づき行った。

4-1. GFAP-GFP マウス

研究目的で述べたように、線条体の細胞で観測された自発 Ca^{2+} リズムはニューロンとアストロサイトのどちらで生じる現象であるかは明らかになっていない。自発 Ca^{2+} リズムの特徴を明らかにするうえで、ニューロンとアストロサイトを区別して議論する必要がある。近年、神経生理学研究でも盛んに活用されている遺伝子組換え動物を用いることで、生理条件下でニューロンとアストロサイトを区別することができる。本研究では、アストロサイトのマーカータンパク質である glial fibrillary acidic protein (GFAP) を発現している細胞特異的に green fluorescent protein (GFP) が発現するようにした遺伝子組換え動物 (GFAP-GFP transgenic mouse; FVB/N-Tg(GFAPGFP)14Mes/J; Jackson Laboratories, Bar Harbor, MR; stock #003257) を用いた。この動物は human GFAP promoter の下流で GFP (hGFP-S65T) を発現する。

GFAP-GFP マウスは C57BL/6J 系統マウスと 3 世代以上かけ合わせた動物を実験に使用した。

4-2. 標本作製

Ca²⁺ イメージング実験には生後 10-21 日齢の GFAP-GFP マウスを用いた。

GFAP-GFP マウスに halothane (Takeda, Tokyo, Japan) で麻酔を施した後、迅速に脳を摘出し、95% O₂-5% CO₂ を通気し氷冷した人工脳脊髄液 (ACSF) に浸し冷却した。

ACSF の組成は以下のとおりである: 137 NaCl, 2.5 KCl, 21 NaHCO₃, 0.6 NaH₂PO₄, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 10 D-glucose (mM)。氷冷した脳から大脳皮質が付いた状態で線条体のブロックを切り出し、マイクロスライサー (VT-1000S, VT-1200S, Leica Microsystems, Nussloch, Germany) を用いて矢状断の 300 μm 厚のスライス標本作製した (図 4)。

作成したスライス標本を室温にて約 1 時間静置した後、20 μM Fura-2 LR AM (Calbiochem, San Diego, CA), 0.02% Cremophor EL (Sigma, St. Louis, MO) を溶解した ACSF 100 μl に浸し、湿潤で 95% O₂-5% CO₂ を通気し、35°C に維持したインキュベーター内で 40 分間静置し、Fura-2 LR AM を細胞内に導入した。Cremophor EL は Fura-2 LR AM の細胞膜透過性を高めるために使用した界面活性剤である。Fura-2 LR AM と Cremophor EL はジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide, DMSO; Dojindo

Laboratories, Kumamoto, Japan) に溶解し、それぞれ 5 mM, 10% としたものをストックし、それを実験に使用した。スライス標本は Fura-2 LR AM を細胞内に導入した後、色素を含まない ACSF に浸し、導入時と同じ環境のインキュベーター内に 15 分静置することで、細胞外の Fura-2 LR AM を wash out した。

4-3. 光学計測系

Fura-2 LR AM を細胞内に導入したスライス標本 (以下単に試料と表記する) は、正立落射蛍光顕微鏡 (BX51WI; Olympus, Tokyo, Japan) 下のチャンバー内に静置した (図 5)。波長 340 nm、380 nm の励起光は Xenon ランプ内臓の高速波長切替装置 (Lambda DG-4; Sutter Instruments, Novato, CA) から交互に照射した。励起光はダイクロイックミラーで反射され、水浸対物レンズ (20×, NA = 0.95; Olympus, Tokyo, Japan) を通して試料に照射した。試料からの蛍光は水浸対物レンズを通りダイクロイックミラーを通過し、冷却 CCD (Cool SNAP HQ; Photometrics, Tucson, AZ) もしくは EM-CCD (DU-885; Andor, Belfast, UK) で測定した。励起光の露光時間は 50-100 ms、露光間隔 (= サンプルング間隔) は 2 s とした。高速波長切替装置、CCD の制御はイメージング用ソフトウェア MetaFluor (Molecular Devices; Downingtown, PA) で行った。測定中の試料を静置したチャンバー内は 95% O₂-5% CO₂ を通気した ACSF を流速 2-2.5

ml / min で灌流し、恒温装置で 30 ± 1 °C に維持した。

4-4. データ解析

4-4-1. データ処理と特徴量の解析

画像データの解析は MetaFluor を用いて行った。画像データの 細胞領域に手動にて関心領域 (ROI) を設定し、ROI 内の蛍光信号の空間平均を各フレームで取得し、各励起光での蛍光強度 (F340, F380) の変化量の時系列データとした。取得した各 ROI での蛍光強度時系列データは数値解析ソフトウェア MATLAB (Math Works, Natic, MA) で記述したプログラムを用いて解析した。蛍光強度時系列データから Ratio ($R = F340 / F380$) を算出し、ノイズ低減のために、ローパスフィルターとして Hanning フィルター (window 幅 6 s) をかけた。 $[Ca^{2+}]_i$ 変化の立上りは R の傾きが設定した閾値より大きくなった次のフレームを立上りとするアルゴリズムで決定した。R の変化量を決定するためのベースラインは 変化の立上りの直前 3 フレーム間の R の値の平均値とし、このベースラインから R の最大値までの変化量を peak amplitude (ΔR) とした。 ΔR が閾値 (0.005-0.01) を超えないものについては、誤検出として取り除いた。さらに、その上で目視により明らかにノイズであると判断されたものは取り除いた。

自発 Ca^{2+} リズムに含まれる一つ一つの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化の特徴を決定するために、発生頻度、振幅 (peak amplitude)、持続時間、上昇の傾き、減衰の傾きを計算した (図 6)。

発生頻度は計測時間 (> 1000 s) の中に含まれる立上りの回数を 1000 s あたりの回数として計算した。振幅は先に述べた通り、ベースラインから R の最大値までの値とする。持続時間は立上りの時刻から、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇し最大値に達した後再び、閾値以下に減衰するまでの時間とした。上昇の傾きは、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化の上昇中で、最大値の 5-90% の部分の傾きとした。減衰の傾きは、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化の減衰中で、最大値の 95% から $1/e$ までの部分の傾きとした。

特に断りがない限り、すべての数値は平均値 \pm 標準誤差の形で表記し、統計検定で $p < 0.05$ となった場合に有意差があるとした。

4-4-2. 自発 Ca^{2+} リズムの複数細胞間での相関の解析

複数細胞間での活動の相関解析はこれまでにいくつかの報告があり、確立された方法がある²⁶⁾⁻²⁸⁾。本研究ではこれらの報告で使用されている方法を持続時間の長い現象へ適用した。先にあげた報告²⁶⁾⁻²⁸⁾では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化の立上りに注目し、スパイクのラスタプロットを作成し、それを解析対象としているが、本研究の計測対象は持続時間が長いため、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が高い状態を維持している時間に注目するために、前項

(2-6) で述べた閾値を基準に二値化した (図 7A)。つまり、 $[Ca^{2+}]_i$ 変化の持続時間の間を 1、それ以外を 0 とした。計測した自発 Ca^{2+} リズムが異なる細胞間で同期しているかどうかの判定は、偶然確率 (chance rate) を越えて有意な数の細胞が同時に高い $[Ca^{2+}]_i$ 状態にあるものを同期とみなした。この判定を行うために、モンテカルロシミュレーションを 1000 回試行し偶然確率を決定した²⁶⁾⁻²⁸⁾ (図 7B)。モンテカルロシミュレーションでは、実データをランダムな時刻で前後を入れ替えたデータ (surrogate データ) を全ての細胞について作成した。これによりそれぞれの細胞について、実データでの $[Ca^{2+}]_i$ が上昇していた時間を保持して、 $[Ca^{2+}]_i$ 変化が起きるタイミングがランダムなデータが作成できる。ランダムな入れ替え 1000 試行分について、surrogate データの各フレームでの同期細胞数を加算し、同期細胞数の分布を計算することにより、ランダムな現象が偶然同期する確率、つまり同期細胞数の偶然確率を計算する。このとき危険率を $p < 0.01$ とした。それぞれの細胞がどの程度同期しているかを調べるために、同期する細胞数がピークに達する時刻 (同期のピーク) に活動のあった細胞について、全ての同期のピークのうち同期のピークで活動していた回数の割合 (同期のピークへの参加率) を計算した。また、相関する細胞数の違いは計測時間中に有意に同期している時間の合計の違いにも現れると考え、今回は同期時間の合計を相関の指標として使用した。

4-5. 免疫染色

遺伝子組換えマウスもしくは野生型マウスから取りだした脳を 4% paraformaldehyde を溶解したリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline; PBS, pH 7.4) に浸し 4 °C で 24 時間維持し固定した。固定した脳から氷冷した PBS 内で矢状断に厚さ 40 μ m の薄切切片を作成した。薄切切片をスライドガラスに載せ、0.1% (v/v) Triton X-100 と 10% nonimmune goat serum を含む PBS に 4 °C で 4-12 時間浸した。薄切切片は PBS で 15 分間 3 回洗った後、遺伝子組換えマウスの切片は一次抗体 rat anti GFP monoclonal antibody (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) と rabbit anti-bovine S-100 polyclonal antibody (Sigma, St. Louis, MO)、もしくは rat anti GFP monoclonal antibody と mouse anti NeuN monoclonal antibody (Chemicon International, Temecula, CA) を 0.01% Triton X-100 と 1% nonimmune goat serum を含む PBS で 1:1000 に希釈したものの中で 24 時間 4 °C で静置した。薄切切片は再び PBS で 15 分間 3 回洗った後、fluorescein-conjugated goat anti-rat IgG antibody (Chemicon International) と rhodamine-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Sigma) もしくは fluorescein-conjugated goat anti-rat IgG antibody と rhodamine-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Chemicon International) を 0.01% Triton X-100 と 1% nonimmune goat serum を含む PBS で 1:50 で希釈したものの中で 4-8 時間 4 °C で静置した。薄切

切片は 4 回 PBS で洗い流し、退色防止剤 (ProLong Gold; Invitrogen, Carlsbad, CA) を加えカバーガラスで封入した。野生型マウスの薄切切片では一次抗体として rabbit anti-bovine S-100 polyclonal antibody と mouse anti NeuN monoclonal antibody、二次抗体として rhodamine-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody と fluorescein-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Chemicon International) を用いた。手順は遺伝子組換えマウスの切片と共通である。fluorescein と rhodamine の蛍光は標準的な fluorescein と rhodamine のフィルターを使い、正立落射蛍光顕微鏡 (BX51WI, Olympus) で観察した。

4-6. 薬理実験

薬理実験での各薬品の投与は全て、薬品を ACSF に溶解し灌流することによって行った。6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX; 10 μ M; Tocris, Bristol, United Kingdom) と DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5; 50 μ M; Tocris) はそれぞれ AMPA 型と NMDA 型の iGluR を阻害するために使用した。Tetrodotoxin (TTX; 1 μ M; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) は活動電位を阻害するために使用した。Thapsigargin (2 μ M; Alomone Labs) は細胞内 Ca^{2+} ストアの Ca^{2+} ポンプを阻害し、細胞内 Ca^{2+} ストアを枯渇させるために使用した。2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB;

100 μM ; Tocris) は細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出に関与する IP_3 受容体を阻害するために使用した。2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP; 10 or 30 μM ; Tocris) は代謝型グルタミン酸受容体 5 型 (mGluR5) を阻害するために使用した。

5.結果

5-1. 線条体のニューロンとアストロサイトの双方から観測される長時間持続自発

Ca²⁺ リズム

自発 Ca²⁺ リズムを示す細胞がニューロンなのかアストロサイトなのかを確認するために、GFAP-GFP マウスを使用して実験を行った。まず初めに、GFAP-GFP マウスの GFP 陽性細胞がアストロサイトであり、GFP 陰性細胞がニューロンであることを免疫染色により確認した (図 8)。線条体の全細胞の 1/3 がアストロサイトであり (図 8C)、その内、GFP 陰性のアストロサイトはアストロサイト全体のうちの 30% であった (図 8A)。この結果から、GFP 陰性細胞のほとんどはニューロンであり、GFP 陰性細胞がアストロサイトである確率は $30\% \times 1/3 = 10\%$ 程度であると考えられる。このことから、本研究では GFP 陽性細胞はアストロサイト、GFP 陰性細胞はニューロンとして扱った。この結果を踏まえて、GFAP-GFP マウスを使用して Ca²⁺ イメージングを行った結果、自発的な [Ca²⁺]_i 変化がニューロンとアストロサイトの両方で観測された (図 9)。典型的な自発 [Ca²⁺]_i 変化の波形を図示する (図 9B)。Cell 1 はバースト様の [Ca²⁺]_i 変化と持続時間の長い [Ca²⁺]_i 変化を示した。Cell 2 は持続時間が短く低頻度だが振幅の大きな [Ca²⁺]_i 変化を示した。Cell 3 は持続時間が短く高頻度の振幅の小さな [Ca²⁺]_i 変化を示した。Cell 4 は低頻度かつ振幅の小さな [Ca²⁺]_i 変

化を示した。Cell 5 は Cell 4 同様振幅は小さいが頻度は Cell 4 よりも高い $[Ca^{2+}]_i$ 変化を示した。Cell 6 は持続時間の長い $[Ca^{2+}]_i$ 変化を繰り返し示した。Cell 1-3 はニューロン、Cell 4-6 はアストロサイトであった。この自発 $[Ca^{2+}]_i$ 変化の発生頻度はニューロンとアストロサイトの間で有意な差は見られなかった (図 9C; ニューロン: $(6.68 \pm 0.45) \times 10^{-3}$ Hz (n = 200), アストロサイト: $(5.57 \pm 0.74) \times 10^{-3}$ Hz (n = 78), p = 0.0903, Mann-Whitney U 検定)。自発 $[Ca^{2+}]_i$ 変化はニューロンでもアストロサイトでも同程度起こっている現象であることがわかった。自発 $[Ca^{2+}]_i$ 変化には様々な形状のものがあつたが、ニューロン、アストロサイトのどちらの自発 $[Ca^{2+}]_i$ 変化にも、自発的であることと繰り返し現れることという共通の特徴が見られた。このことから、この自発 $[Ca^{2+}]_i$ 変化を自発 Ca^{2+} リズムと呼称することとする。

Ca^{2+} リズムの特性を明らかにするために、自発 Ca^{2+} リズムの波形全体から分離した一つ一つの $[Ca^{2+}]_i$ 変化から、最大値の振幅、持続時間、上昇の傾き、減衰の傾きの 4 つの特徴量を抽出した。最大値の振幅、持続時間、上昇の傾き、減衰の傾きのそれぞれの平均値はニューロンでは $(2.01 \pm 1.44) \times 10^{-2}$ (n = 3235 events), 24.7 ± 19.9 s (n = 3235), $(2.00 \pm 1.70) \times 10^{-3}$ (n = 3204), $1.78 \pm 1.43 \times 10^{-3}$ (n = 3212)、アストロサイトでは、 $(1.56 \pm 7.73) \times 10^{-2}$ (n = 795), 21.2 ± 16.5 s (n = 795), $(1.60 \pm 1.03) \times 10^{-3}$ (n = 793) and $(1.55 \pm 1.04) \times 10^{-3}$ (n = 787) (平均値 \pm 標準偏差) であつた。最大値の振幅、持続時間、

上昇の傾き、減衰の傾きの 4 つの特徴量の分布はニューロンとアストロサイトの間で有意に異なり、それぞれ、アストロサイトの方がニューロンに比べ、振幅は小さく、持続時間は短く、上昇の傾き、減衰の傾きは緩やかであることがわかった (図 10; $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.0102$, Kolmogorov-Smirnov 検定)。 $[Ca^{2+}]_i$ 変化の上昇と減衰は $[Ca^{2+}]_i$ が高いほど速くなると考えられ、特に Ca^{2+} 排出機構による $[Ca^{2+}]_i$ の減衰は $[Ca^{2+}]_i$ 高いほど時定数が短くなることが知られている³⁸⁾。これらの点を踏まえると、ニューロンとアストロサイトの間での自発 Ca^{2+} リズムの特徴の違いを端的に説明するならば、ニューロンでは振幅が大きく持続時間の長い $[Ca^{2+}]_i$ 変化、アストロサイトでは振幅が小さく持続時間の短い $[Ca^{2+}]_i$ 変化が生じていたといえる。

次に、 Ca^{2+} リズムの発生経路を特定するために、薬理実験を行った(図 11)。

まず、CNQX + AP5 投与により興奮性シナプス伝達を、TTX 投与により活動電位を阻害した (図 11A, B)。Control 条件下の Ca^{2+} リズムの発生頻度で規格化した相対的な発生頻度は CNQX + AP5 投与下では ニューロンは $102 \pm 17\%$ (図 11E; $n = 20$, $p = 0.3886$, 1 標本 t 検定)、アストロサイトは $91 \pm 9\%$ (図 11F; $n = 8$, $p = 0.0856$, 1 標本 t 検定) であった。また、TTX 投与下で、ニューロンは $123 \pm 16\%$ (図 11E; $n = 69$ neurons; $p = 0.1391$, 1 標本 t 検定)、 $92 \pm 18\%$ (図 11F; $n = 23$ astrocytes, $p = 0.6471$, 1 標本 t 検

定)であった。ニューロンとアストロサイトともに、自発 Ca^{2+} リズムは CAQX+AP5 の投与、TTX の投与のどちらでも阻害されなかった。この結果から自発 Ca^{2+} リズムは興奮性シナプス伝達や活動電位の発生を必ずしも必要とはしない現象であるということがわかった。次に、細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出の自発 Ca^{2+} リズムへの寄与を確かめるために、thapsigargin を投与し、小胞体 (ER) の Ca^{2+} ポンプを阻害した (図 11C)。Control 条件下の Ca^{2+} リズムの発生頻度で規格化した thapsigargin を投与下での相対的な発生頻度は、ニューロンは $11 \pm 8\%$ (図 11E; $n = 29$, $p < 0.0001$, 1 標本 t 検定)、アストロサイトは $34 \pm 8\%$ (図 11F; $n = 9$, $p < 0.0001$, 1 標本 t 検定)であった。Thapsigargin の投与により、ニューロンとアストロサイトのどちらの自発 Ca^{2+} リズムも発生頻度が有意に減少した。また、2-APB の投与により ER からの Ca^{2+} 放出経路の一つである IP_3 受容体を阻害した (図 11D)。Control 条件下の Ca^{2+} リズムの発生頻度で規格化した 2-APB 投与下での相対的な発生頻度は、ニューロンは $24 \pm 11\%$ (図 11E; $n = 29$, $p < 0.0001$, 1 標本 t 検定)、アストロサイトは $1 \pm 1\%$ (図 11F; $n = 9$, $p < 0.0001$, 1 標本 t 検定)であった。2-APB の投与はニューロンとアストロサイトのどちらの自発 Ca^{2+} リズムの発生頻度も減少させた。これらの結果は IP_3 が引き起こす ER からの Ca^{2+} 放出が自発 Ca^{2+} リズムの発生源であることを示している。

5-2. ニューロンとアストロサイトの自発 Ca^{2+} リズムへの mGluR5 依存的シグナル経路の寄与

mGluR5 は IP_3 産生に関わる受容体の一つであり、線条体に多く発現していることが知られている¹⁸⁾⁻²⁰⁾。そこで、mGluR5 の阻害剤である MPEP を投与し、自発 Ca^{2+} リズムへの mGluR5 の寄与を調べた (図 12)。MPEP は濃度依存的に自発 Ca^{2+} リズムを阻害した (図 12A)。30 μM の MPEP を投与したとき、アストロサイトの自発 Ca^{2+} リズムはほぼ完全に阻害された (図 12B; $(7.21 \pm 3.24) \times 10^{-3}$ Hz for control and $(0.07 \pm 0.05) \times 10^{-3}$ Hz for 30 μM MPEP ($n = 8$); $p = 0.0295$ vs. control; Kruskal-Wallis 検定及び Steel-Dwass 法による多重比較)。ニューロンの自発 Ca^{2+} リズムは 30 μM の MPEP の投与で発生頻度が有意に減少した ($(7.98 \pm 1.15) \times 10^{-3}$ Hz for control and $(4.16 \pm 0.97) \times 10^{-3}$ Hz for 30 μM MPEP administration ($n = 30$); $p = 0.0053$ vs. control; Kruskal-Wallis 検定及び Steel-Dwass 法による多重比較)。アストロサイトの自発 Ca^{2+} リズムへの 30 μM の MPEP の影響は、ニューロンに比べより大きかった ($p = 0.00389$; Kruskal-Wallis 検定及び Steel-Dwass 法による多重比較)。この結果より、ニューロン、アストロサイトともに、自発 Ca^{2+} リズムを引き起こす IP_3 の産生に mGluR5 が関与していることがわかった。また、MPEP に対する感度の違いは、アス

トロサイトの自発 Ca^{2+} リズムに対しては mGluR5-IP₃ の経路がより支配的であり、ニューロンの自発 Ca^{2+} リズムに対して mGluR5-IP₃ の経路以外の関与を示唆する結果であった。

5-3. ニューロンの自発 Ca^{2+} リズムの神経活動依存性

自発 Ca^{2+} リズムへの神経活動の寄与を確認するために、TTX 投与下での前項 (3-1) で挙げた 4 つの特徴量を投与前と比較した (図 13)。ニューロンの自発 Ca^{2+} リズムの振幅、持続時間、上昇の傾き、減衰の傾きの平均値は、TTX 投与前で $(2.08 \pm 1.66) \times 10^{-2}$ (n = 887 events), 23.4 ± 17.5 s (n = 887), $(2.11 \pm 1.70) \times 10^{-3}$ (n = 882), $1.84 \pm 1.37 \times 10^{-3}$ (n = 885)、TTX 投与下で $(1.44 \pm 0.77) \times 10^{-2}$ (n = 600 events), 18.4 ± 14.7 s (n = 600), $(1.58 \pm 0.92) \times 10^{-3}$ (n = 598), $1.75 \pm 1.11 \times 10^{-3}$ (n = 600) (平均値 \pm 標準偏差) であった。アストロサイトの自発 Ca^{2+} リズムの振幅、持続時間、上昇の傾き、減衰の傾きの平均値は、投与前で $(1.67 \pm 0.86) \times 10^{-2}$ (n = 132 events), 19.0 ± 10.4 s (n = 132), $(1.63 \pm 1.05) \times 10^{-3}$ (n = 132), $1.99 \pm 1.07 \times 10^{-3}$ (n = 132)、TTX 投与下で $(1.73 \pm 0.85) \times 10^{-2}$ (n = 127 events), 18.6 ± 9.1 s (n = 127), $(1.69 \pm 0.89) \times 10^{-3}$ (n = 127), $1.88 \pm 1.06 \times 10^{-3}$ (n = 127) (平均値 \pm 標準偏差) であった。TTX 投与下でのニューロンの自発 Ca^{2+} リズムの振幅、持続時間、上昇の傾きは投与前に比べ減少した(図 13A, B, C; $p < 0.0001$,

Kolmogorov-Smirnov 検定)。しかしながら、ニューロンの自発 Ca^{2+} リズムの減衰の傾き (図 13D) とアストロサイトの自発 Ca^{2+} リズムの振幅、持続時間、上昇の傾き、減衰の傾き (図 13E-H) は TTX 投与により変化しなかった ($p = 0.6110$, $p = 0.0512$, $p = 0.9746$, $p = 0.5749$, and $p = 0.5003$, Kolmogorov-Smirnov 検定)。また、自発 Ca^{2+} リズムの特徴量に対する興奮性シナプス伝達の影響を確認するために、イオンチャネル型グルタミン酸受容体の阻害剤である CNQX と AP5 を投与した (図 14)。ニューロンの自発 Ca^{2+} リズムの振幅、持続時間、上昇の傾き、減衰の傾きの平均値は、CNQX + AP5 投与前で $(1.99 \pm 1.12) \times 10^{-2}$ ($n = 357$ events), 23.5 ± 17.0 s ($n = 357$), $(2.09 \pm 1.51) \times 10^{-3}$ ($n = 357$), $1.65 \pm 1.36 \times 10^{-3}$ ($n = 357$)、CNQX + AP5 投与下で $(1.99 \pm 1.12) \times 10^{-2}$ ($n = 223$ events), 21.9 ± 16.1 s ($n = 223$), $(2.04 \pm 1.37) \times 10^{-3}$ ($n = 223$), $1.77 \pm 1.47 \times 10^{-3}$ ($n = 223$) (平均値 \pm 標準偏差; $p = 0.7219$, $p = 0.0402$, $p = 0.5401$, and $p = 0.3253$; Kolmogorov-Smirnov 検定)。アストロサイトの自発 Ca^{2+} リズムの振幅、持続時間、上昇の傾き、減衰の傾きの平均値は、投与前で $(1.80 \pm 0.71) \times 10^{-2}$ ($n = 166$ events), 19.3 ± 9.3 s ($n = 166$), $(1.99 \pm 1.01) \times 10^{-3}$ ($n = 166$), $1.68 \pm 1.04 \times 10^{-3}$ ($n = 166$)、CNQX + AP5 投与下で $(1.65 \pm 0.63) \times 10^{-2}$ ($n = 114$ events), 19.6 ± 10.8 s ($n = 114$), $(1.83 \pm 1.05) \times 10^{-3}$ ($n = 114$), $1.18 \pm 1.47 \times 10^{-3}$ ($n = 114$) (平均値 \pm 標準偏差; $p = 0.0878$, $p = 0.3951$, $p = 0.3658$, $p = 0.9942$; Kolmogorov-Smirnov 検定)。自発 Ca^{2+} リズムの特徴量の分布は、

ニューロンの持続時間がわずかな差があったこと (図 14B; $p = 0.0402$, Kolmogorov-Smirnov 検定) を除いて、CNQX と AP5 の投与により、ニューロンでもアストロサイトでも変化はなかった (図 14A, C-H)。これらの結果から、活動電位依存的プロセスはニューロンの自発 Ca^{2+} リズムのみ調節しており、アストロサイトの自発 Ca^{2+} リズムは活動電位の影響を受けないことがわかった。前項 (3-2、図 12B) の結果からアストロサイトの自発 Ca^{2+} リズムにも mGluR5 が関与するため、アストロサイトでは活動電位以外の機構によって放出されるグルタミン酸が関与しているのかもしれない。

5-4. 自発 Ca^{2+} リズムの複数細胞間同期

自発 Ca^{2+} リズムのネットワーク活動の有無を明らかにするために、自発 Ca^{2+} リズムの複数細胞間での同時性を調べた (図 15)。その結果、chance rate を越える自発 Ca^{2+} リズムの同期活動が繰り返し現れることがわかった (図 15A)。この同期活動にはニューロンだけでなくアストロサイトも参加しており、同期する細胞数がピークに達する時刻 (同期のピーク) 全てのうち、 $46 \pm 17\%$ でアストロサイトが参加していた (図 15C, D, $n = 4$ slices, in control)。同期のピークでは、全てのニューロン、アストロサイトのうち一度でも同期するニューロンが $81 \pm 7\%$ 、アストロサイトが $54 \pm 22\%$

であり、それ以外の細胞はいずれの同期のピークにも参加していなかった (図 15C, D, E, n = 4 slices, in control)。ニューロンの同期のピークへの参加率は control 条件下で $38 \pm 36\%$ (n = 69 細胞, 平均値 \pm 標準偏差)、TTX 投与下で $27 \pm 37\%$ (n = 61 細胞, 平均値 \pm 標準偏差) であり、TTX の投与により減少した (図 15C; p = 0.0072, Kolmogorov-Smirnov 検定)。一方、アストロサイトの同期のピークへの参加率は control 条件下で $19 \pm 25\%$ (n = 23 細胞, 平均値 \pm 標準偏差)、TTX 投与下で $18 \pm 30\%$ (n = 19 細胞, 平均値 \pm 標準偏差) であり、TTX を投与しても同期のピークへの参加率の分布は変化しなかった (図 15C; p = 0.5367, Kolmogorov-Smirnov 検定)。そして自発 Ca^{2+} リズムが同期する時間は TTX の投与により減少した (図 15E; 合計同期時間の平均値 (control に対する相対値の百分率): $24 \pm 14\%$, n = 4 slices; p = 0.0118, 1 標本 t 検定)。この結果は、自発 Ca^{2+} リズムの相関について、ニューロンでは活動電位依存的機構が関係していることを示している。

6. 考察

本研究では、持続時間が最大 200 s の長時間持続する自発 Ca^{2+} リズムがニューロンとアストロサイトの両方で起こっていることを明らかにした (図 9)。この遅い $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 振動は脊髄急性スライス標本のニューロン³³⁾ や線条体や黒質の培養ニューロン^{34),35)} で報告されている現象と共通点がある。しかし、本研究の結果は急性スライス標本の線条体細胞から観測された点、受容体作動薬などによる活性化のない自発的に生じている現象である点、遺伝子組換えマウスにより細胞種を区別している点、の 3 点についてこれまでに観測された遅い $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 振動とは異なる。また自発 Ca^{2+} リズムは TTX 非依存的機構により生じている遅い Ca^{2+} リズムであるにもかかわらず、活動電位により生じる自発 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化²⁶⁾⁻²⁸⁾ と同様に、複数細胞間での同期を示していた (図 15)。

6-1. 遅い自発 Ca^{2+} リズムの発生機構

線条体の自発 Ca^{2+} リズムは活動電位や興奮性シナプス伝達により起こる現象ではなかった (図 11 A, B, E, F)。自発 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化の主な発生源は ER からの IP_3 受容体を介した Ca^{2+} 放出であり (図 11 C, D, E, F)、mGluR5- IP_3 シグナル経路がニューロンとアストロサイト両方の自発 Ca^{2+} リズム発生機構に関与していた (図 12)。た

だし、ニューロンでは、MPEP 投与により自発 Ca^{2+} リズムは部分的にしか阻害されなかった (図 12B)。それゆえ、ニューロンの自発 Ca^{2+} リズムには mGluR5 以外の受容体も関係している可能性がある。実際に、線条体ニューロンは他の種類の mGluR も発現しており^{18),19)}、DR も発現している^{16),17)}。ただし、本研究ではあくまでも 2 つの濃度 (10, 30 μM) の MPEP を投与したときの自発 Ca^{2+} リズムの発生頻度の減少結果の違いから論じているにすぎず、ニューロンの自発 Ca^{2+} リズムへの mGluR5 以外の受容体の関与を結論付けるには、より広い範囲の MPEP 濃度について自発 Ca^{2+} リズムの発生頻度を調べることにより投与量依存性をニューロンとアストロサイトの間で比較する必要がある。また、mGluR や DR を含む様々な受容体の作動薬や阻害薬の投与を行ったが、今のところ、mGluR5 以外の受容体の自発 Ca^{2+} リズムへの寄与を示す明確な証拠は得られていない。mGluR5 以外の受容体の阻害剤についての薬理学実験をさらに行うことで、ニューロンの自発 Ca^{2+} リズムへの他の受容体の関与について精査する必要がある。

また、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の細胞間相関が TTX 投与で阻害された (図 15A)。これは、細胞間相関に活動電位依存的なプロセスが関与していることを意味している。この 2 つの現象を主要因として、以下の仮説を提案する。アストロサイトの mGluR5 の活性化はアストロサイトから何らかの伝達物質 (gliotransmitter) の放出を引き起こして

いる可能性がある。Gliotransmitter としては グルタミン酸や D-serin や ATP などが知られている³⁹⁾。これらの gliotransmitter がニューロンで受容されニューロンの活動を調節するという報告がある。例えばアストロサイトから放出されたグルタミン酸^{10),11)} や D-serin⁴⁰⁾ がニューロンの NMDA 受容体で受容されるという報告や ATP がアデノシン受容体で受容される報告¹³⁾ などがある。また、海馬のアストロサイトの mGluR5 の活性化により ATP が放出され、ニューロンのシナプス伝達効率が調節されたという報告がある¹³⁾。線条体でも、gliotransmitter がニューロンで受容されることにより、ニューロンとアストロサイトの自発 Ca^{2+} リズムの同期が生じている可能性がある。AP5 + CNQX の投与がニューロンの自発 Ca^{2+} リズムに影響しない (図 14) ことから、NMDA 受容体の関与する可能性は低いと考えられるが、他の D-serine や ATP などが gliotransmitter として自発 Ca^{2+} リズムの同期に関与する可能性がある。この仮説の検証のためにはさらなる調査が必要である。

次に、自発 Ca^{2+} リズムの発生に関わる、大脳皮質ニューロン、線条体のニューロンとアストロサイトの三者の関係を推測すると、以下のような機序が予想される (図 16)。活動電位の発生が自発 Ca^{2+} リズムの発生に必要なではないことから、mGluR5 を活性化させるグルタミン酸は活動電位非依存的に放出されるグルタミン酸であると考えられる。これは例えば、アストロサイトから放出されるグルタミン酸^{10),11)}である

可能性がある (図 16(1))。このアストロサイトからのグルタミン酸放出がある限り、自発 Ca^{2+} リズムは発生すると考えられる。加えて、アストロサイトは様々な種類の gliotransmitter を放出しているとの報告がある^{13),39)}ことと、本研究でニューロンの自発 Ca^{2+} リズムに mGluR5 以外の受容体の関与が示唆された (図 12B) ことから、アストロサイトはグルタミン酸以外の伝達物質も放出している可能性がある(図 16(2))。

一方で、自発 Ca^{2+} リズムの同期には活動電位が必要であった。我々のこれまでの研究で、 Ca^{2+} リズムの細胞間同期には大脳皮質からの入力が必要であることが示唆されているため⁴¹⁾、大脳皮質のニューロンの発火が自発 Ca^{2+} リズムの同期現象に関与していると考えられる (図 16(3))。大脳皮質ニューロンは線条体ニューロンを広範囲に渡って神経支配している。単一の大脳皮質ニューロンが複数の線条体ニューロンへ投射することによって、あるいは同期発火している複数の大脳皮質ニューロンが複数の線条体ニューロンへ投射することによって、広い範囲で複数の線条体ニューロンの自発 Ca^{2+} リズムが同期するものと考えられる。例えば、Zhang らは大脳皮質ニューロンから放出されるグルタミン酸が黒質ドーパミンニューロンの軸索末端にある mGluR1 に作用することでドーパミン放出を調節することを報告している⁴²⁾。このグルタミン酸 - ドーパミン調節機構が同期現象に関与している可能性も考えられる (図 16(4))。

6-2. 遅い自発 Ca^{2+} リズムの機能的意義

細胞内 Ca^{2+} はタンパク質の機能や遺伝子発現、細胞の形態的变化を、様々な状況で調節している²⁵⁾。本研究で報告した自発 Ca^{2+} リズムがタンパク質の機能や遺伝子発現に影響を与えうるかどうかについて検討するために、以下に述べる方法により自発 Ca^{2+} リズムで生じる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化量を概算した。

まず、 ΔR を以下のように定義する。

$$\Delta R = R - R_{base} \quad (6)$$

但し、 R_{base} は R のベースラインの値。

ベースラインの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を $[\text{Ca}^{2+}]_{base}$ と表し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と $[\text{Ca}^{2+}]_{base}$ のそれぞれについての (5) 式を (6) 式に代入することにより、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と ΔR の関係は (7) 式のように表される。

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = \frac{Kd'\{\Delta RKd + (\Delta R + R_{max} - R_{min})[\text{Ca}^{2+}]_{base}\}}{Kd'(R_{max} - R_{min} - \Delta R) - \Delta R[\text{Ca}^{2+}]_{base}} \quad (7)$$

キャリブレーションにより R_{min} , R_{max} , Kd' が求められている場合には、(7) 式により ΔR からピークでの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を計算することができる。ただし、この方法により知ることができるのは $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化量のオーダーであり、概算された $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化量と実際の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化量の数値には数倍程度の誤差がある³⁸⁾ことに注意が必要である。

以上の方法により $[Ca^{2+}]_i$ 変化量を概算すると、今回 $[Ca^{2+}]_i$ 変化として検出された最小の $[Ca^{2+}]_i$ 変化はニューロンとアストロサイトともに 10 nM 程度であった。一方で、検出した内で最大の $[Ca^{2+}]_i$ 変化はニューロンでは 900 nM 程度、アストロサイトでは 200 nM 程度であった。この $[Ca^{2+}]_i$ 変化量は細胞内シグナル伝達に影響を及ぼしうるのに十分な量であり、ニューロンでは自発 $[Ca^{2+}]_i$ リズムにより細胞の状態が変化することが想定される。例えば、Mao らは、線条体培養神経細胞ではグループ I mGluR を介した Ca^{2+} シグナルが最初期遺伝子の発現に関与していることを報告している⁴³⁾。一般的に、グループ I mGluR の活性化は 2-3-3 で述べたような IICR の機構により小胞体からの Ca^{2+} 放出を促すことで、 $[Ca^{2+}]_i$ 変化を引き起こし得る。自発 Ca^{2+} リズムもグループ I mGluR である mGluR5 依存的な機構により生じている $[Ca^{2+}]_i$ 変化であるため、Mao らの報告にある現象と同様に最初期遺伝子の発現に関与している可能性がある。Mao らの報告では 30 nM 程度の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇で十分に最初期遺伝子 c-Fos の発現量を上昇させることを示している。本研究で計測された自発 Ca^{2+} リズムではニューロンで最大で $[Ca^{2+}]_i$ が 900 nM 程度変化しており、十分に最初期遺伝子の発現に関与しうると考えられる。mGluR の活性化で起こった $[Ca^{2+}]_i$ 変化は、線条体機能の生理学的・病態生理学的変化を説明する上で重要な神経可塑性に関わる遺伝子の発現に関わっているかもしれない。

電気生理学的観点から見ると、細胞内 Ca^{2+} によって調節される Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルの関与が考えられる。線条体の MSN には SK チャネルと BK チャネルの 2 種の Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルが発現している。SK チャネルと BK チャネルは MSN の静止状態での外向き電流の 30-50% を担っている^{44),45)}。SK チャネルの開確率に対する Ca^{2+} の 50% 効果濃度 (EC_{50}) は 700 nM 程度であると言われており⁴⁶⁾、自発 Ca^{2+} リズム では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ はニューロンで最大 900 nM 程度変化しており、静止状態の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を 100 nM とすると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇のピークでは $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が 1 μM に達するため、このときの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は十分に SK チャネルを開口させると考えられる。Deister らは淡蒼球のニューロンでは、SK チャネルが発火の正確さを決定する電位依存性チャネルに影響を与えていることを報告している⁴⁷⁾。それゆえ、本研究で発見された自発 Ca^{2+} リズムは、活動電位よりは長く、既日リズムよりは短い中間のタイムスケールで MSN の発火特性を調節するかもしれない。Osanai らのシミュレーションによる予備実験でも自発 Ca^{2+} リズムが Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルを介して発火に影響することが示唆されている⁴⁸⁾。

ニューロンとアストロサイトの両方が自発 Ca^{2+} リズムの同期活動に参加していた (図 15B-D)。ニューロン-グリア相互作用が mGluR によって仲介されるという報告が脳のいくつかの領域でなされている^{12),13),39),49)}。それゆえ、mGluR5 依存的な

自発 Ca^{2+} リズムは線条体でのニューロン - グリア相互作用に関与する可能性がある。
る。

6-3. ニューロンとアストロサイトの判別

本論文では全ての結果および考察について、GFAP-GFP マウスにおいて、免疫染色の結果 GFP 陰性細胞がアストロサイトである確率は 10% 程度であることから (図 8)、GFP 陰性細胞をニューロンとして扱った。この判断基準により分離した 2 つの細胞集団で自発 Ca^{2+} リズムの特徴を比較した結果、両者の間に有意な差が認められたことから (図 10)、異なる細胞集団に分離できているものと考えられる。ただし、アストロサイトの突起は周囲のニューロンを包みこむように伸びているため、アストロサイトとニューロンが重なっている部分が存在するものと考えられる⁵⁰⁾。本研究で用いた計測系では、焦点面以外の蛍光がどうしても含まれてしまうため、ニューロンの蛍光として計測しているものがアストロサイトの蛍光を含んでいる可能性を完全には排除できない。そのため、ニューロンとアストロサイトが完全に判別されているわけではなく、本文中でニューロンとした細胞の一部にはある程度の誤判定が含まれることに注意が必要である。

7. 今後の展望

6-4 節では本研究で発見した自発 Ca^{2+} リズムが様々な細胞機能に影響しうることを論じた。この章では、自発 Ca^{2+} リズムが及ぼす影響により生体でどのような変化が生じているのかについて、今後検証していく必要のある可能性について述べる。

本研究では大脳皮質と線条体を切り出したスライス標本を用いている (図 4)。線条体へのドーパミン入力は主に黒質のドーパミンニューロンによりもたらされるが、スライス標本ではこのドーパミンニューロンとの結合が切断されるため、線条体内のドーパミン量は減少すると考えられる。パーキンソン病患者の線条体ではドーパミン量が減少していることが知られており⁵¹⁾、スライス標本の線条体細胞はパーキンソン病の状態と同じ状況におかれている可能性がある。本研究では、自発 Ca^{2+} リズムの発生頻度が mGluR5 の阻害により減少することが明らかになったが、Ambrosi らはパーキンソン病の症状が mGluR5 の阻害により軽減されることを報告している²³⁾。この mGluR5 が関与するという共通点から考えると、自発 Ca^{2+} リズムはスライス標本にすることにより、パーキンソン病類似の状態になることで生じている現象であるかもしれない。このように考えると *in vivo* での $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化の計測やパーキンソン病モデル動物での自発 Ca^{2+} リズムの特徴を健常動物と比較することで、本研究は、病態生理学的にも非常に有益な研究に発展することが期待できる。

8. 結論

本研究では、持続時間が最大 200 s の長時間持続する自発 Ca^{2+} リズムがニューロンとアストロサイトの両方で起こっていることを明らかにした。これは、急性スライス標本の線条体ニューロンから、受容体作動薬などによる活性化なしに、遺伝子組換えマウスにより細胞種を区別した上で、観測された遅い $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 振動としては初めての発見である。この自発 Ca^{2+} リズムはニューロンとアストロサイトで特徴の異なる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化を含んでいた。また、自発 Ca^{2+} リズムの発生機構は活動電位や興奮性シナプス伝達に非依存的であり、かつ mGluR5-IP_3 シグナル経路がニューロンとアストロサイトのどちらの自発 Ca^{2+} リズムの発生機構にも関わっていた。さらに、自発 Ca^{2+} リズムは TTX 非依存的機構により生じている遅い Ca^{2+} リズムであるにもかかわらず、活動電位により生じる自発 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化と同様に、ニューロンとアストロサイトの両方を含む複数の細胞間での同期を示していた。これにより、自発 Ca^{2+} リズムが線条体でのニューロン - グリア相互作用の仲介となる可能性を示した。

謝辞

本研究の遂行にあたり、懇切丁寧に指導して頂いた東北大学大学院 医学系研究科 准教授小山内 実先生に心から感謝いたします。

研究の遂行にあたり、様々な助言をしていただいた東北大学大学院 医学系研究科 教授森 一生先生、町田 好男先生に深く感謝いたします。

Ca^{2+} イメージングの研究を共同して行っていただいた大石 恵一君、船崎 亮佑君、研究に対して助言、討論を行っていただいた、菊地 琴美さん、菊田 里美さんをはじめ東北大学大学院 医学系研究科医用画像工学分野の皆様には日頃から御支援、御協力を頂き、心から感謝いたします。

また、本研究は大阪大学 大学院工学研究科教授八木 哲也先生が主催される研究室においてスタートした研究が発端となっており、様々な助言をしていただいた八木 哲也先生、 Ca^{2+} イメージングの研究を共同して遂行していただいた山田 尚弘さん、矢口 雄一さんをはじめ大阪大学 大学院工学研究科 生体システム・デバイス領域の皆様にも多大なる御協力を頂き、心から感謝いたします。

9. 参考文献

1. Albin RL, Young AB, Penney JB : The functional anatomy of basal ganglia disorders. Trends Neurosci 1989;12(10):366–375.
2. Nambu A, Tokuno H, Takada M : Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal “hyperdirect” pathway. Neurosci Res 2002;43(2):111–117.
3. Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, et al. : The basal ganglia and adaptive motor control. Science 1994;265(5180):1826–1831.
4. Kimura M : Behaviorally contingent property of movement-related activity of the primate putamen. J Neurophysiol 1990;63(6):1277–1296.
5. Graybiel AM : Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. Curr Opin Neurobiol 1995;5(6):733–741.
6. Chesselet MF, Delfs JM : Basal ganglia and movement disorders: an update. Trends in neurosciences 1996;19(10):417–422.
7. Samejima K, Ueda Y, Doya K, et al. : Representation of action-specific reward values in the striatum. Science 2005;310(5752):1337–1340.
8. DeLong MR : Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. Trends Neurosci 1990;13(7):281–285.

9. Kreitzer AC : Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu Rev Neurosci* 2009;32:127–147.
10. Fellin T, Pascual O, Gobbo S, et al. : Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 2004;43(5):729–743.
11. Porter JT, McCarthy KD : Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 1996;16(16):5073–5081.
12. Pasti L, Volterra A, Pozzan T, et al. : Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci* 1997;17(20):7817–7830.
13. Panatier A, Vallée J, Haber M, et al. : Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 2011;146(5):785–798.
14. Schultz W : Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu Rev Neurosci* 2007;30:259–288.
15. Heien MLA V, Wightman RM : Phasic dopamine signaling during behavior, reward, and disease states. *CNS & neurological disorders drug targets* 2006;5(1):99–108.

16. Missale C, Nash SR, Robinson SW, et al. : Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological reviews* 1998;78(1):189–225.
17. Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC : Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci* 2000;23:185–215.
18. Tallaksen-Greene SJ, Kaatz KW, Romano C, et al. : Localization of mGluR1a-like immunoreactivity and mGluR5-like immunoreactivity in identified populations of striatal neurons. *Brain Res* 1998;780(2):210–217.
19. Testa CM, Standaert DG, Young AB, et al. : Metabotropic glutamate receptor mRNA expression in the basal ganglia of the rat. *J Neurosci* 1994;14(5 Pt 2):3005–3018.
20. Biber K, Laurie DJ, Berthele A, et al. : Expression and signaling of group I metabotropic glutamate receptors in astrocytes and microglia. *J Neurochem* 1999;72(4):1671–1680.
21. Bonsi P, Cuomo D, Picconi B, et al. : Striatal metabotropic glutamate receptors as a target for pharmacotherapy in Parkinson's disease. *Amino Acids* 2007;32(2):189–195.

22. Oueslati A, Breysse N, Amalric M, et al. : Dysfunction of the cortico-basal ganglia-cortical loop in a rat model of early parkinsonism is reversed by metabotropic glutamate receptor 5 antagonism. *Eur J Neurosci* 2005;22(11):2765–2774.
23. Ambrosi G, Armentero M-T, Levandis G, et al. : Effects of early and delayed treatment with an mGluR5 antagonist on motor impairment, nigrostriatal damage and neuroinflammation in a rodent model of Parkinson’s disease. *Brain Res Bull* 2010;82(1-2):29–38.
24. Bergson C, Levenson R, Goldman-Rakic PS, et al. : Dopamine receptor-interacting proteins: the Ca²⁺ connection in dopamine signaling. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24(9):486–492.
25. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD : The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1(1):11–21.
26. Mao BQ, Hamzei-Sichani F, Aronov D, et al. : Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron* 2001;32(5):883–898.
27. Cossart R, Aronov D, Yuste R : Attractor dynamics of network UP states in the neocortex. *Nature* 2003;423(May):13–16.

28. Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Tapia D, et al. : Encoding network states by striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 2008;99(3):1435–1450.
29. Sasaki T, Matsuki N, Ikegaya Y : Metastability of active CA3 networks. *J Neurosci* 2007;27(3):517–528.
30. Nett WJ, Oloff SH, McCarthy KD : Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J Neurophysiol* 2002;87(1):528–537.
31. Tashiro A, Goldberg J, Yuste R : Calcium oscillations in neocortical astrocytes under epileptiform conditions. *J Neurobiol* 2002;50(1):45–55.
32. Aguado F, Espinosa-Parrilla JF, Carmona MA, et al. : Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J Neurosci* 2002;22(21):9430–9444.
33. Gorbunova Y V, Spitzer NC : Dynamic interactions of cyclic AMP transients and spontaneous Ca^{2+} spikes. *Nature* 2002;418(6893):93–96.
34. Tang T-S, Bezprozvanny I : Dopamine receptor-mediated Ca^{2+} signaling in striatal medium spiny neurons. *J Biol Chem* 2004;279(40):42082–42094.

35. Yasumoto F, Negishi T, Ishii Y, et al. : Endogenous dopamine maintains synchronous oscillation of intracellular calcium in primary cultured-mouse midbrain neurons. *Cell Mol Neurobiol* 2004;24(1):51–61.
36. Vorndran C, Minta A, Poenie M : New fluorescent calcium indicators designed for cytosolic retention or measuring calcium near membranes. *Biophys J* 1995;69(5):2112–2124.
37. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY, et al. : A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260(6):3440–3450.
38. Suzuki S, Osanai M, Murase M, et al. : Ca^{2+} dynamics at the frog motor nerve terminal. *Pflügers Archiv* □: European journal of physiology 2000;440(3):351–365.
39. Halassa MM, Haydon PG : Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol* 2010;72:335–355.
40. Henneberger C, Papouin T, Oliet SHR, et al. : Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 2010;463(7278):232–236.
41. Osanai M, Yaguchi Y, Yamada N, et al. : Spontaneous calcium changes in striatal cells. *IEEJ Transactions on Electronics, Information and Systems* 2008;128(7):1050–1057.

42. Zhang H, Sulzer D : Glutamate spillover in the striatum depresses dopaminergic transmission by activating group I metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci* 2003;23(33):10585–10592.
43. Mao L, Wang JQ : Group I metabotropic glutamate receptor-mediated calcium signalling and immediate early gene expression in cultured rat striatal neurons. *Eur J Neurosci* 2003;17(4):741–750.
44. Bargas J, Ayala GX, Vilchis C, et al. : Ca^{2+} -activated outward currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 1999;88(2):479–488.
45. Galarraga E, Vilchis C, Tkatch T, et al. : Somatostatinergic modulation of firing pattern and calcium-activated potassium currents in medium spiny neostriatal neurons. *Neuroscience* 2007;146(2):537–554.
46. Hirschberg B, Maylie J, Adelman JP, et al. : Gating properties of single SK channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Biophys J* 1999;77(4):1905–1913.
47. Deister CA, Chan CS, Surmeier DJ, et al. : Calcium-activated SK channels influence voltage-gated ion channels to determine the precision of firing in globus pallidus neurons. *J Neurosci* 2009;29(26):8452–8461.

48. Osanai M, Tamura A, Mori I : Firing properties of medium spiny projection neuron in striatum could be modulated by the long-lasting spontaneous calcium rhythm. Program No. 341.6. 2010 Neuroscience Meeting Planner. Society for Neuroscience, 2010. Online, San Diego, CA, 2010;
49. Sun W, McConnell E, Pare J-F, et al. : Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain. *Science* 2013;339(6116):197–200.
50. Nicholls JG, Martin AR, Wallace BG, et al. : *From Neuron to Brain*. 4th ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2001; 133–154
51. Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O : Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med* 1988;318(14):876–880.

10. 図

10-1. 図の説明

図 1. 大脳皮質 - 基底核ループ

大脳皮質と大脳基底核の 4 つの核の結合を模式的に示す。点線で囲った領域が大脳基底核である。興奮性の結合を赤、抑制性の結合を青で示している。

図 2. 細胞内の Ca^{2+} の機能と動態

A) Ca^{2+} 作用部位を示す模式図。様々なタンパク質の機能や遺伝子の発現などに直接的・間接的に影響を与える。B) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇経路と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を下げる機構の模式図。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は細胞外からの流入と小胞体 (ER) からの放出によって上昇する。

図 3. Fura-2 LR の吸収特性

Fura-2 LR の 2 波長励起 1 波長蛍光の Ca^{2+} 感受性蛍光色素の吸収スペクトル³⁶⁾。

Ca^{2+} 濃度が低い時 (Ca^{2+} と蛍光色素が結合していない時 (a)) は 340 nm 付近に吸収波長 (励起波長) のピークがあるが、 Ca^{2+} 濃度が高い時 (Ca^{2+} と蛍光色素が結合している時 (b)) は吸収波長のピークが 380 nm 付近にシフトする。これにより、同じ強度の励起光を照射したときに、340 nm の励起光では Ca^{2+} 濃度上昇に伴い蛍光強

度が上昇し、380 nm の励起光では減少する。

図 4. スライス標本作製と計測部位

Ca²⁺ イメージングを行うスライス標本の切り出し部位と計測する領域を示している。

図 5. イメージングシステムの模式図

Ca²⁺ イメージングを行った光学系の模式図を示す。光源からの励起光は高速波長切替装置により、340 nm, 380 nm の波長の光を交互に発生させる。励起光はダイクロイックミラーで反射し、対物レンズを通して試料に照射される。試料からの蛍光は対物レンズとダイクロイックミラーを通り冷却 CCD (もしくは EM-CCD) で電気信号に変換され PC に送られる。

図 6. 特徴量の抽出

振幅、持続時間、上昇の傾き、減衰の傾きの 4 つの特徴量をそれぞれの [Ca²⁺]_i 変化から求めた例を示している。

図 7. 複数細胞間の同期解析

A) 自発 Ca^{2+} リズムの二値化。同期解析を行うために自発 Ca^{2+} リズムを二値化する方法を示している。立上りと閾値を二値化の基準とした。B) モンテカルロシミュレーションによる同期解析。同期解析を行うためのモンテカルロシミュレーションの流れを示している。二値化した実データと実データをランダムな時刻で前後を入れ替えたデータ (surrogate データ) を細胞ごとに作成する。Surrogate データの各フレームでの同期細胞数を計算し、ランダムな入れ替え 1000 試行分について、同期細胞数の分布を計算することにより、同期細胞数の chance rate を計算する。

図 8.

GFAP-GFP マウスの免疫染色。A) GFAP-GFP マウスの線条体スライスの GFP 陽性細胞とアストロサイトマーカー S-100 陽性細胞。画像は GFP 陽性細胞を緑、S-100 陽性細胞を赤で示している。ほとんどの S-100 陽性細胞は GFP を発現していた。S-100、GFP のそれぞれに陽性である細胞は、S-100、GFP 両方に陽性であったのが $62.4 \pm 1.8\%$ 、S-100 のみのものが $30.3 \pm 1.9\%$ 、GFP のみのものが $7.2 \pm 1.1\%$ ($n = 5$ slices, total cell number = 1509 cells) であった。B) GFAP-GFP マウスの線条体スライスの GFP 陽性細胞とニューロンマーカー NeuN 陽性細胞。画像は GFP 陽性細胞を緑、

NeuN 陽性細胞を赤で示している。少数の細胞が、GFP、NeuN の両方に陽性であった (n = 5 slices)。C) 野生型マウスの線条体スライスの NeuN 陽性細胞と S-100 陽性細胞。画像は NeuN 陽性細胞を緑、S-100 陽性細胞を赤で示している。線条体ではニューロンに比べアストロサイトは少数で、NeuN 陽性細胞数と S-100 陽性細胞数の比はおおよそ 2:1 であった。スケールバーは 50 μm 。

図 9. 線条体細胞の自発 Ca^{2+} リズム。A) GFAP-GFP マウスの線条体スライスの蛍光画像。画像は Fura-2 LR を赤、GFP を緑で示している。GFP 陰性である Cell 1-3 はおそらくニューロンであり、GFP 陽性である Cell 4-6 はアストロサイトである。スケールバーは 100 μm 。B) 線条体細胞の自発 Ca^{2+} リズムの例。線条体細胞の自発 Ca^{2+} リズムの時間経過の例を示している。それぞれの波形の細胞番号は A の図に示した細胞番号と対応している。スケールバーの横軸は 200 s、縦軸は $\Delta R = 0.02$ 。C) 自発 Ca^{2+} リズムの発生頻度のニューロンとアストロサイトの間での比較。計測細胞数はニューロンが 67 細胞、アストロサイトが 18 細胞。

図 10. 線条体ニューロンとアストロサイトの間での自発 Ca^{2+} リズムの特徴の違い。振幅 (A)、持続時間 (B)、上昇の傾き (C)、減衰の傾き (D) の分布を累積確率分布で示

している。実線がニューロン、破線がアストロサイトの自発 Ca^{2+} リズムの各特徴量の分布を示している。Kolmogorov-Smirnov 検定による p 値をそれぞれの累積確率分布と共に示している。

図 11. ニューロンとアストロサイトの自発 Ca^{2+} リズムへの IP_3 受容体を介した細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出の関与。A-D) それぞれ 10 μM CNQX + 50 μM AP5 (CNQX + AP5)、1 μM TTX、2 μM thapsigargin (Thapsi)、100 μM 2-APB を投与したときのニューロンとアストロサイトの自発 Ca^{2+} リズムの時間経過の例を示している。各波形の下の横線は各試薬を投与している時間を示している。スケールバーの横軸は 200 s、縦軸は $\Delta R = 0.02$ 。E, F) それぞれ、各試薬を投与した時のニューロンとアストロサイトの自発 Ca^{2+} リズムの発生頻度。自発 Ca^{2+} リズムの発生頻度は control 条件下での発生頻度で規格化して示している。計測した細胞数はそれぞれの棒グラフの上を示している。****p < 0.001; 1 標本 t 検定。

図 12. ニューロンとアストロサイトの自発 Ca^{2+} リズムの mGluR5 依存性。A) MPEP を投与したときのニューロンとアストロサイトの自発 Ca^{2+} リズムの時間経過の例。各波形の下の横線は MPEP を投与している時間を示している。スケールバ

一の横軸は 200 s、縦軸は $\Delta R = 0.02$ 。B) control 条件下と 10, 30 μM MPEP 投与時の自発 Ca^{2+} リズムの発生頻度。計測細胞数はニューロンは 30 細胞アストロサイトは 8 細胞。 $*p < 0.05$; $**p < 0.03$; $***p < 0.01$; Kruskal-Wallis 検定 Steel-Dwass 法による多重比較。

図 13. 活動電位阻害によるニューロンでの自発 Ca^{2+} リズムの特徴の変化。それぞれニューロンとアストロサイトの振幅 (A, E)、持続時間 (B, F)、上昇の傾き (C, G)、減衰の傾き (D, H) の分布を累積確率分布で示している。実線が control 条件下、破線が TTX 投与時の自発 Ca^{2+} リズムの各特徴量の分布を示している。Kolmogorov-Smirnov 検定による p 値をそれぞれの累積確率分布と共に示している。

図 14. イオンチャネル型グルタミン酸受容体阻害によるニューロンでの自発 Ca^{2+} リズムの特徴の変化。それぞれニューロンとアストロサイトの振幅 (A, E)、持続時間 (B, F)、上昇の傾き (C, G)、減衰の傾き (D, H) の分布を累積確率分布で示している。実線が control 条件下、破線が CNQX + AP5 投与時の自発 Ca^{2+} リズムの各特徴量の分布を示している。Kolmogorov-Smirnov 検定による p 値をそれぞれの累積確率分布と共に示している。

図 15. 自発 Ca^{2+} リズムの神経活動依存的な多細胞同期。A) 同期している細胞数の割合を時間の関数として示したヒストグラム。黒線は全ての細胞種、緑線はアストロサイトのみの活動細胞数を示している。ヒストグラムの下横線は TTX を投与している時間を示している。破線は chance rate ($p < 0.01$) の活動細胞数の割合を示している。B) 活動細胞と同期活動細胞の位置関係。マゼンタの丸は 50% 以上の同期のピークで活動している細胞、黒丸は 50% 未満の同期のピークで活動している細胞を示している。矢印はそれぞれの同期のピークで活動しているアストロサイトを示している。白丸は同期のピークでは活動していない活動細胞。それぞれの図の左側の数字は A で示したそれぞれの同期のピークの番号と対応している。スケールバーは 100 μm 。C, D) それぞれ、ニューロンとアストロサイトの同期のピークへの参加率の分布を累積確率分布で示している。活動電位阻害によるニューロンでの自発 Ca^{2+} リズムの特徴の変化。実線が control 条件下、破線が TTX 投与時の各細胞の同期のピークへの参加率の分布を示している。Kolmogorov-Smirnov 検定による p 値をそれぞれの累積確率分布と共に示している。E) TTX 投与時の合計同期時間。TTX 投与時の合計同期時間を control 条件下での合計同期時間に対する相対値とし百分率 (%) で示している。n = 4 slices; p = 0.00706; 1 標本 t 検定。

図 16. 自発 Ca^{2+} リズムの発生機構に関して予想される大脳皮質ニューロン、線条体ニューロンとアストロサイトの三者の関係を示す模式図。(1) 線条体のアストロサイトからグルタミン酸が放出されることで、線条体ニューロンやアストロサイトの mGluR5 が活性化して自発 Ca^{2+} リズムが発生している可能性がある。(2) アストロサイトは様々な gliotransmitter を放出するので、ニューロンの自発 Ca^{2+} リズムに関与している可能性のある mGluR5 以外の受容体はアストロサイトの放出した gliotransmitter を受容しているのかもしれない。(3) 自発 Ca^{2+} リズムの複数細胞間での同期は大脳皮質ニューロンが発火することにより放出されるグルタミン酸により制御されていると思われる。大脳皮質ニューロンは線条体ニューロンを広範囲に渡って神経支配しているため、大脳皮質ニューロンの発火が多く、線条体ニューロンの自発 Ca^{2+} リズムに対して影響を与えうる。このとき活性化する受容体は mGluR5 のような直接自発 Ca^{2+} リズムの発生機構に関わる受容体以外であると考えられる。(4) 大脳皮質ニューロンから放出されるグルタミン酸が黒質ドーパミンニューロンの軸索末端にある mGluR1 に作用することでドーパミン放出を調節することが知られている。このグルタミン酸 - ドーパミン調節が自発 Ca^{2+} リズムの同期現象に関与する可能性がある。

10-2. 図

図 1

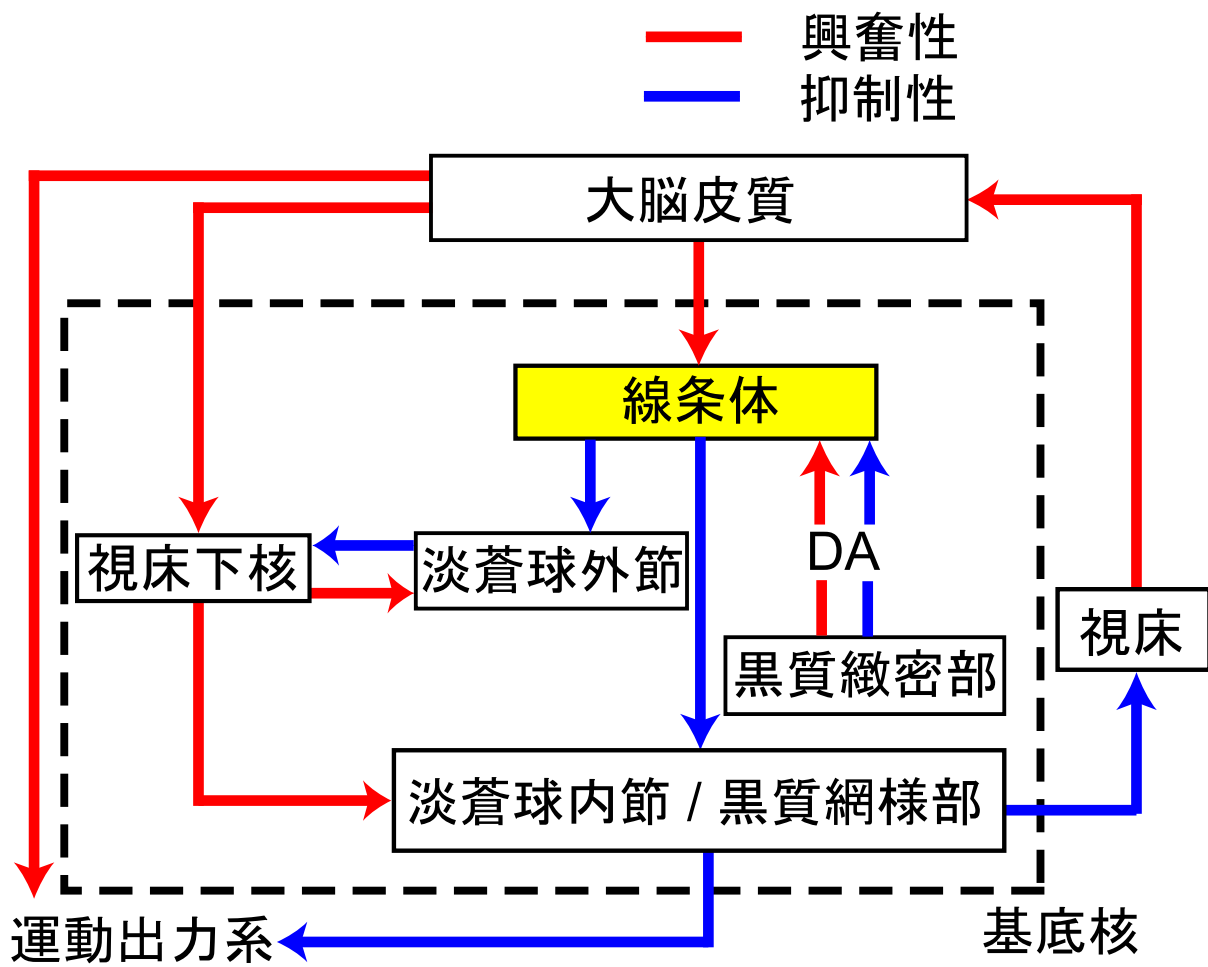
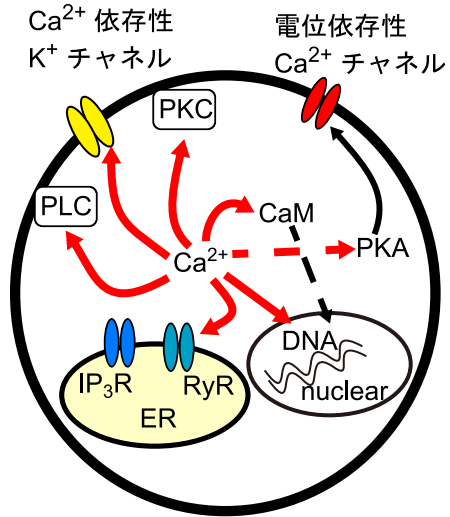


図 2

A



B

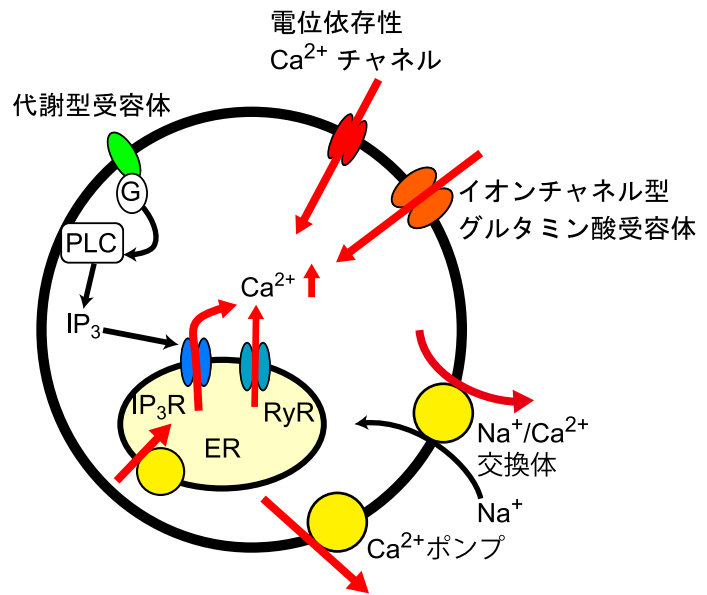


图 3

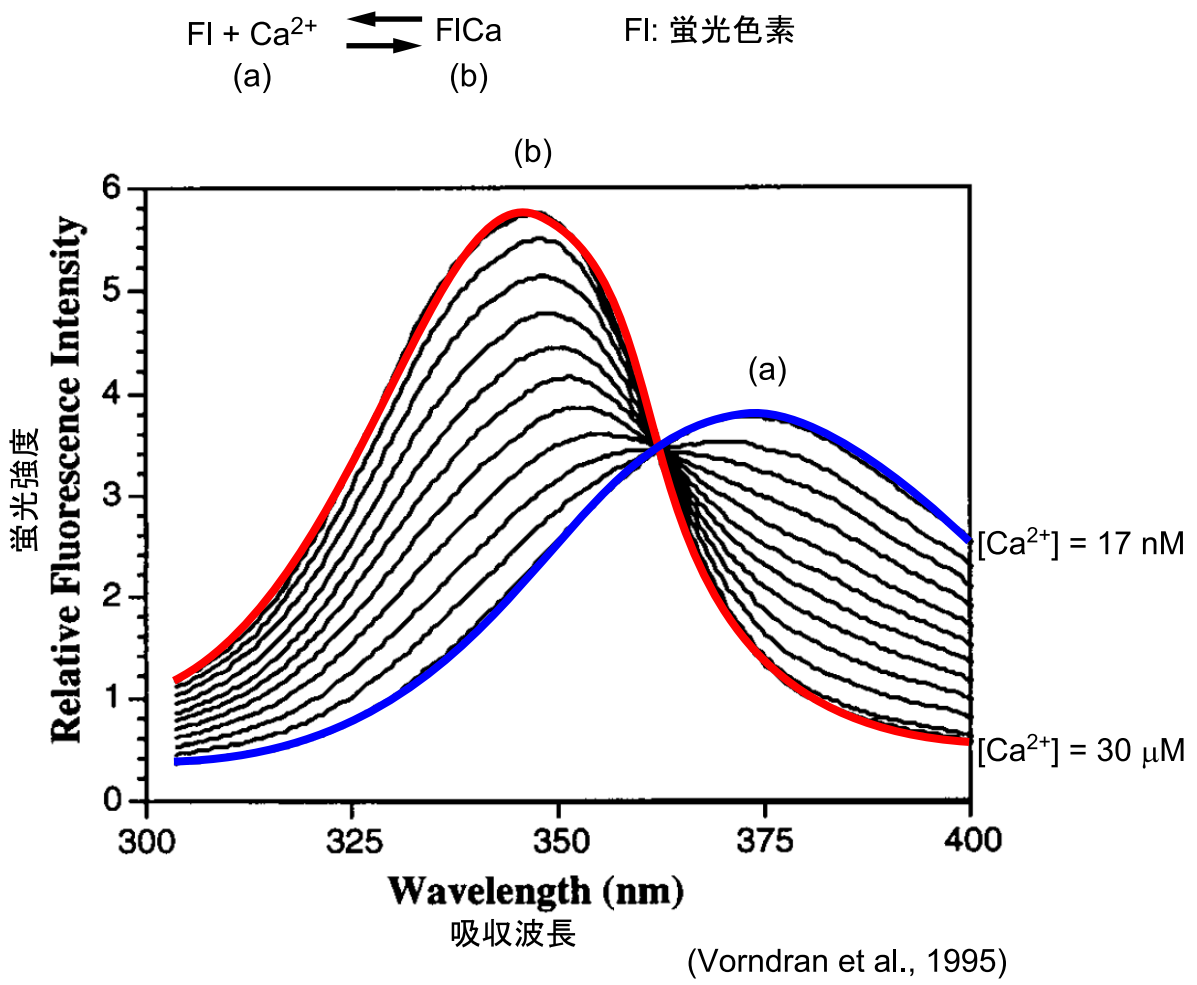


図 4

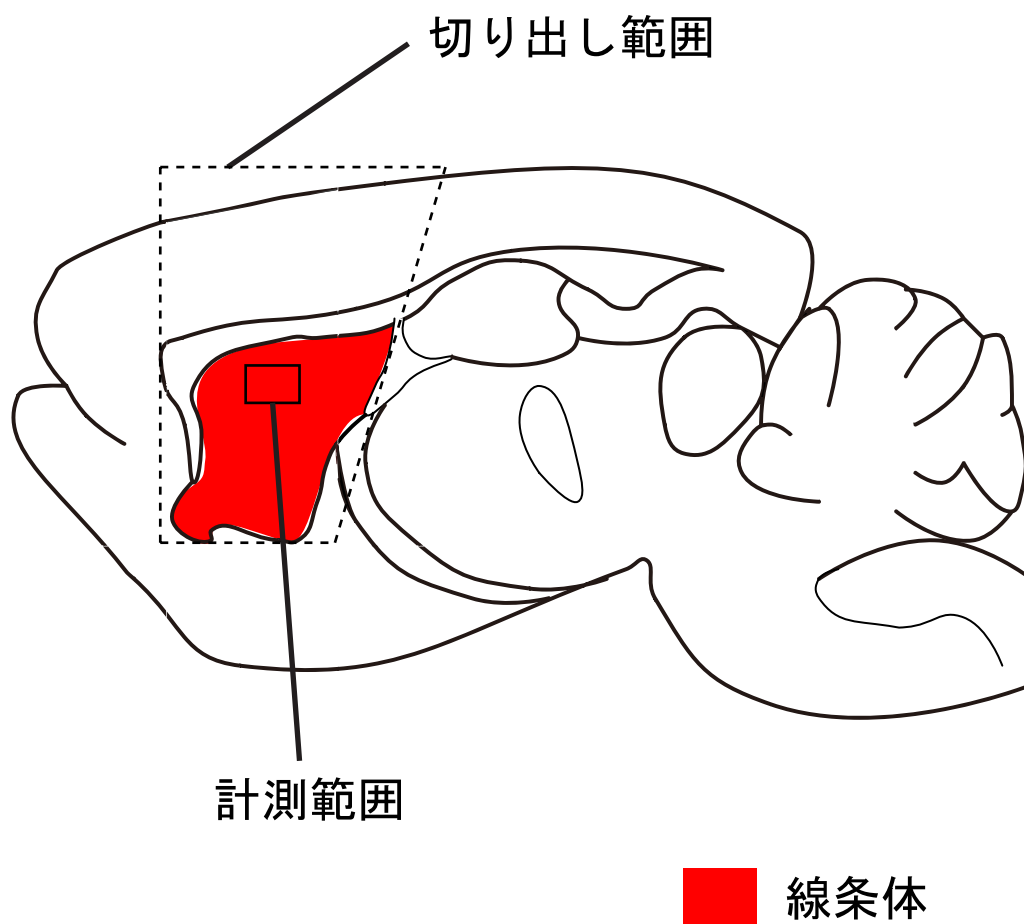


図 5

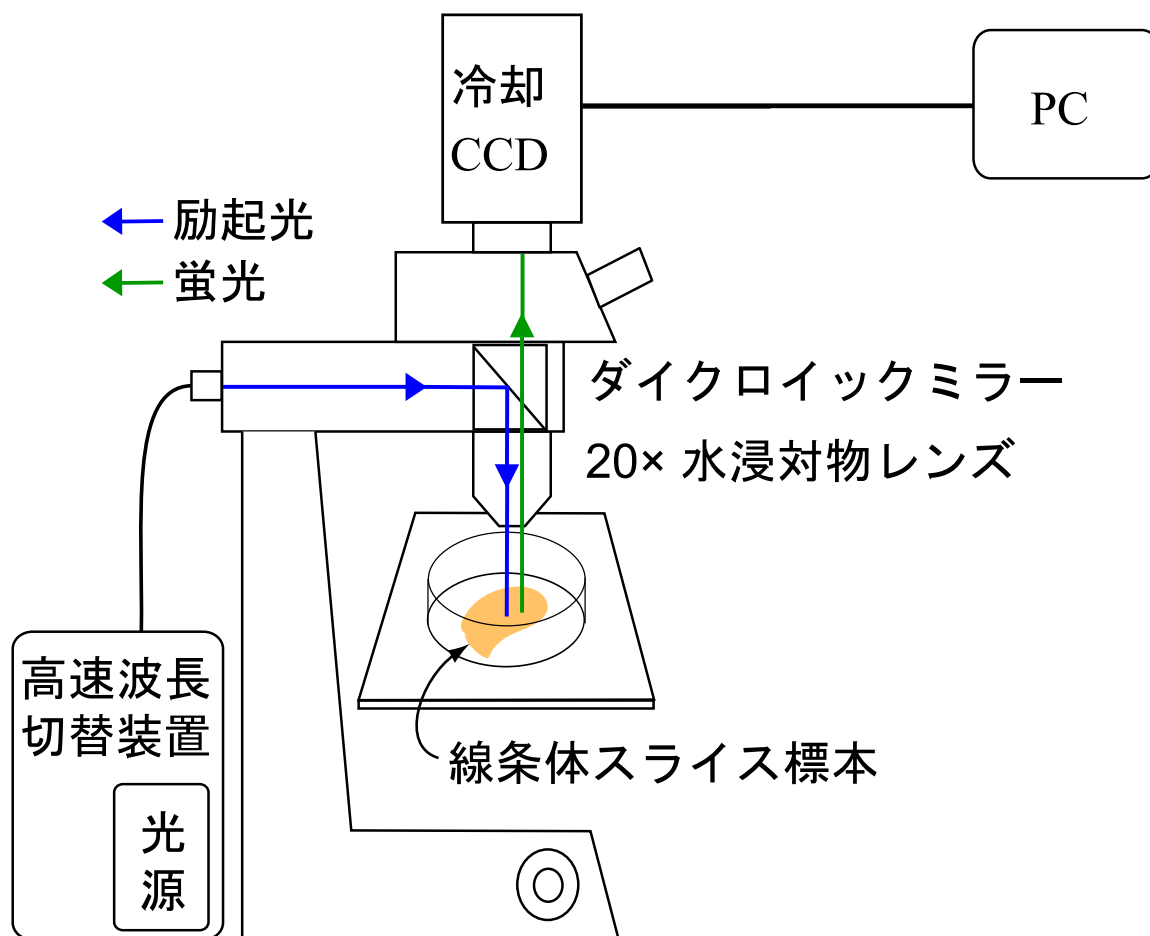


図 6

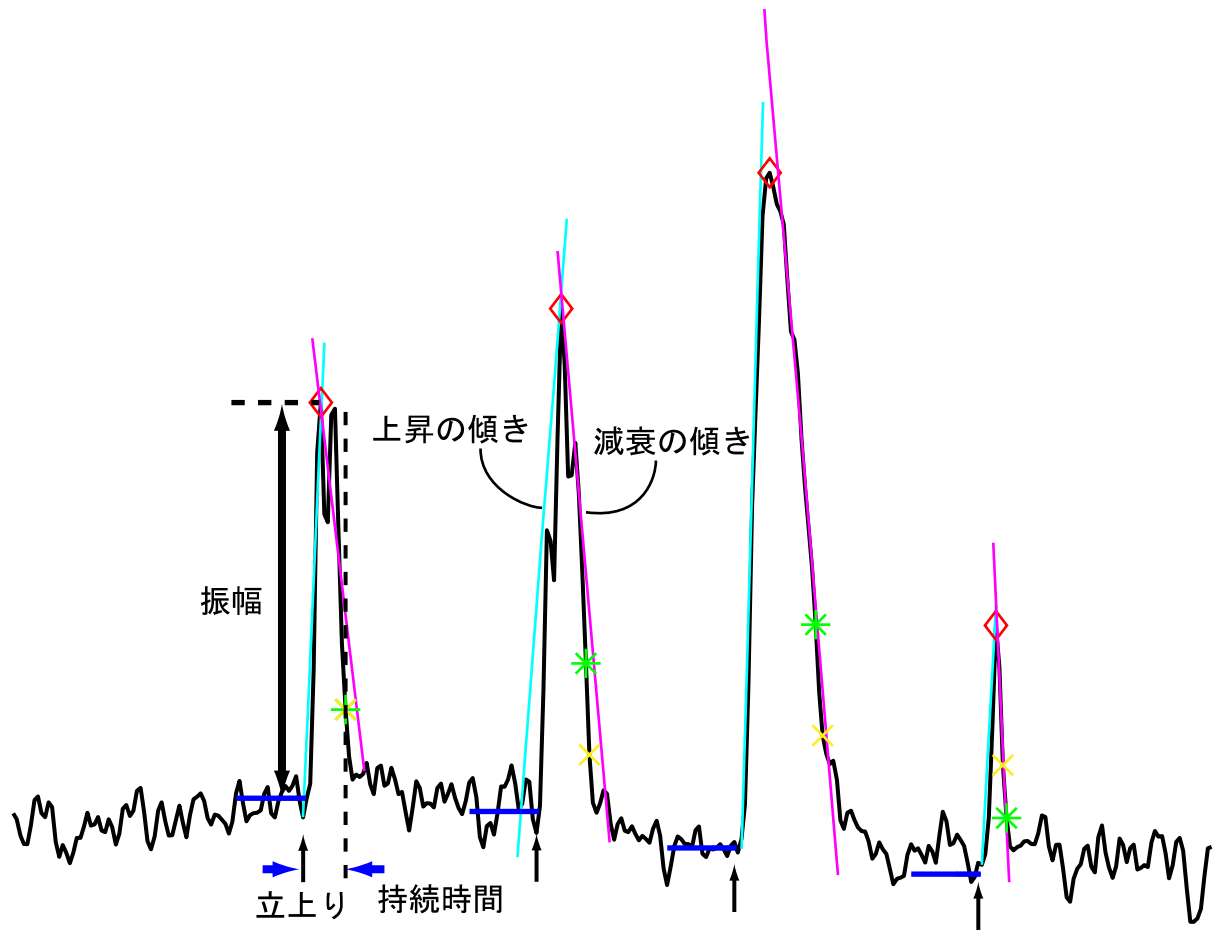
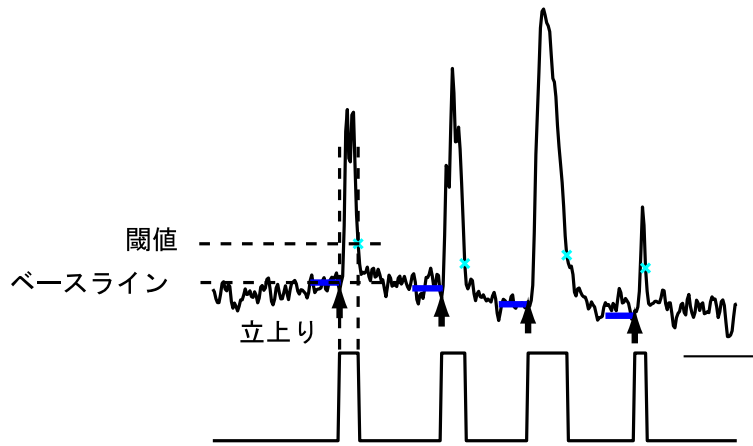
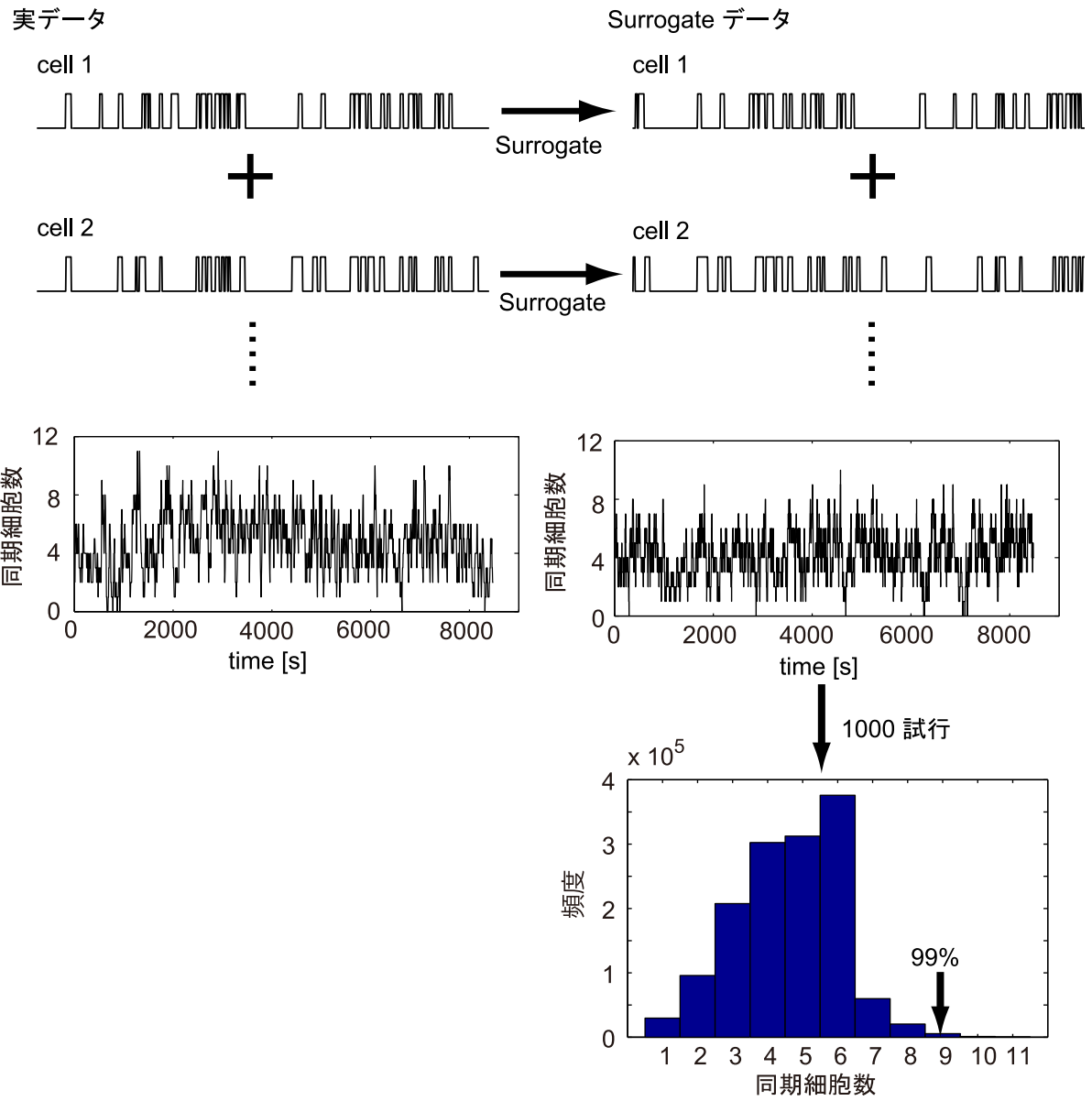


図 7

A

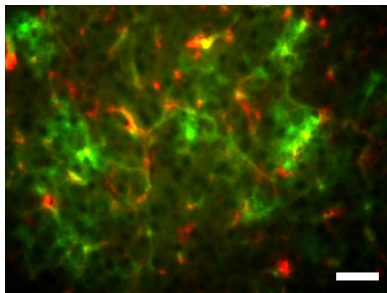


B

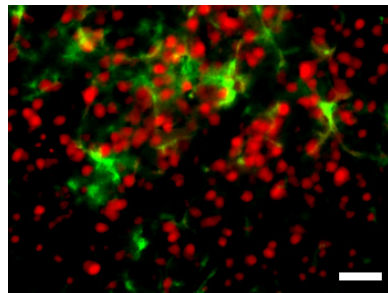


☒ 8

A



B



C

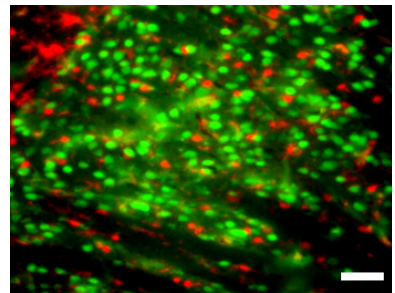


Figure 9

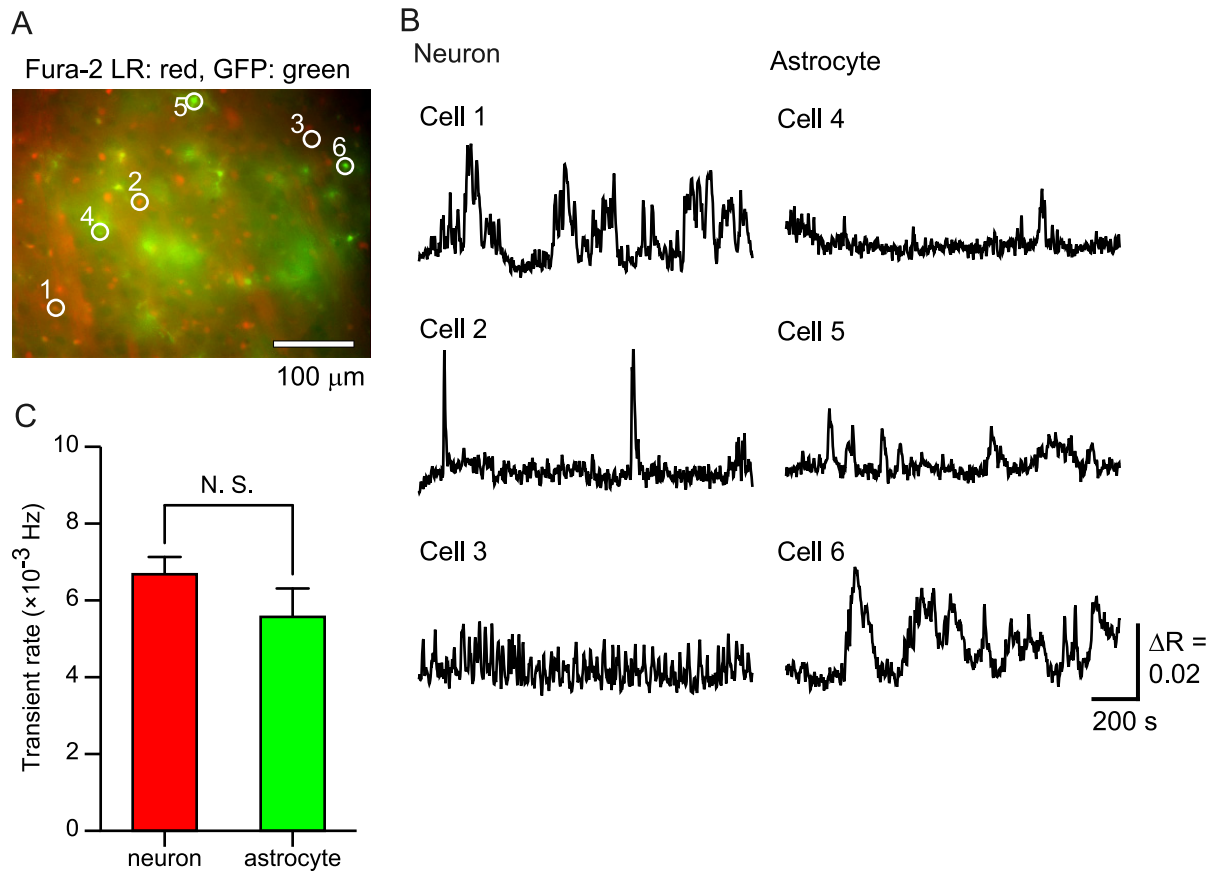
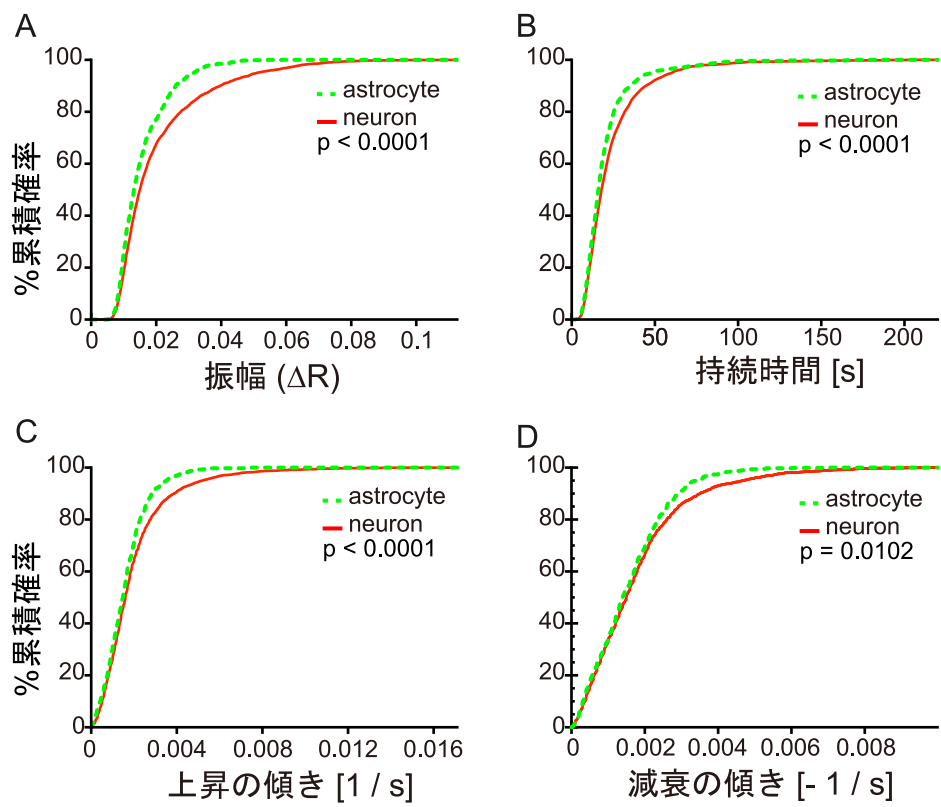


図 10



☒ 11

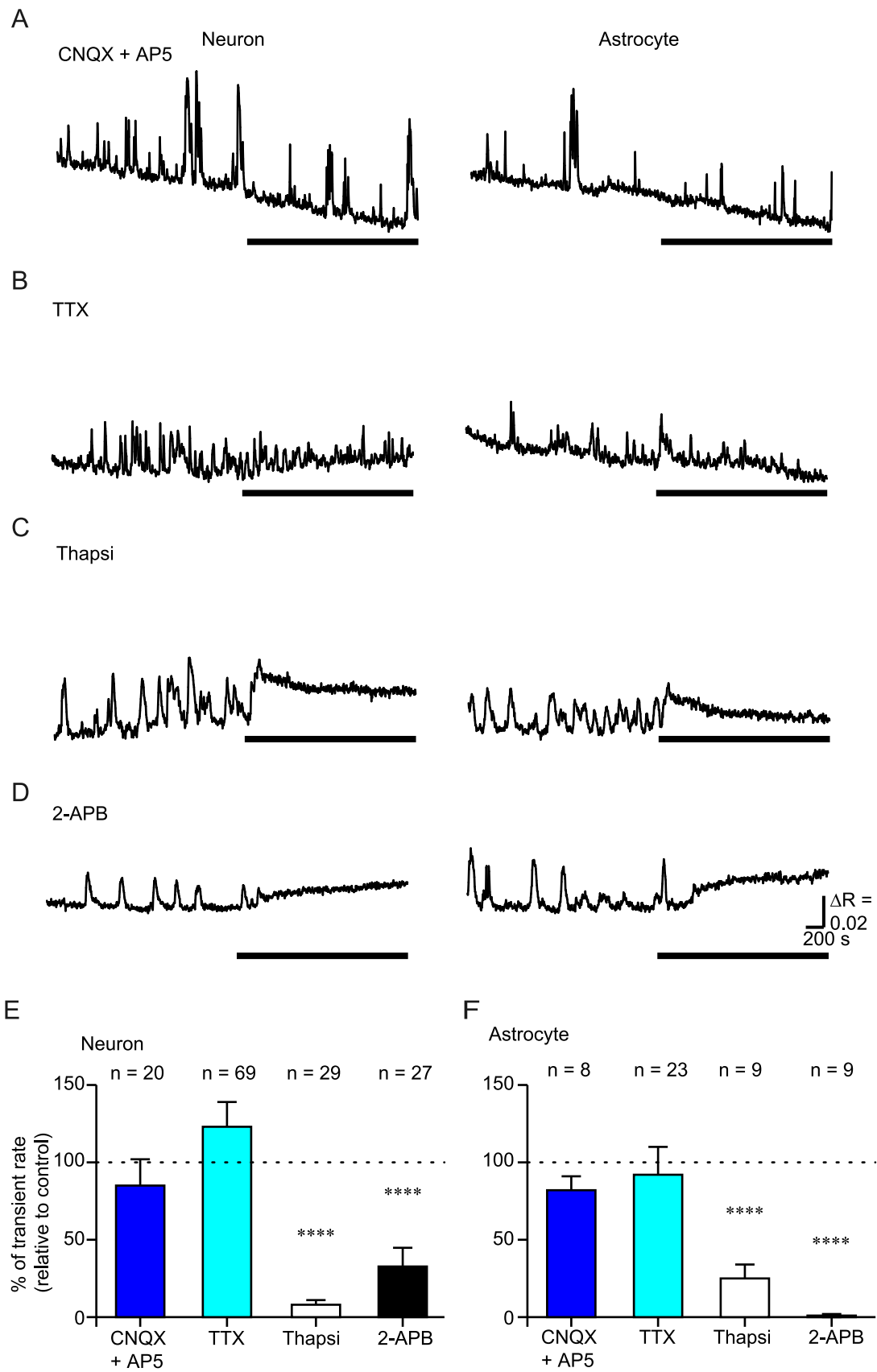


図 12

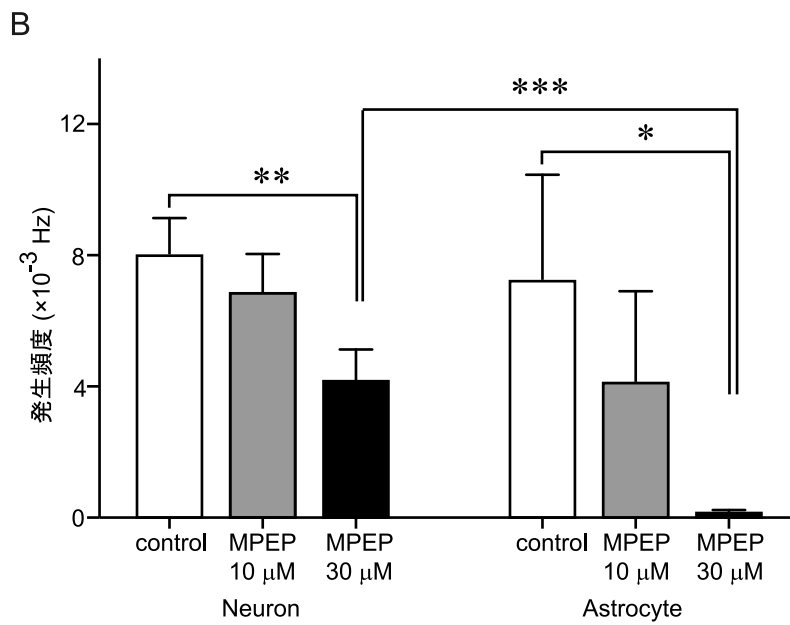
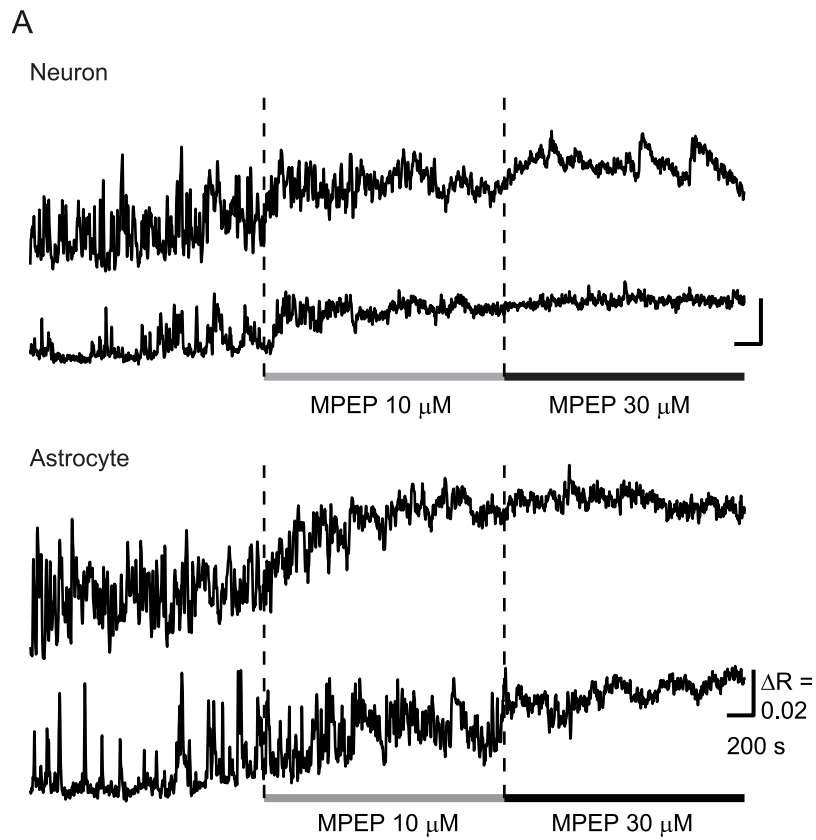


図 13

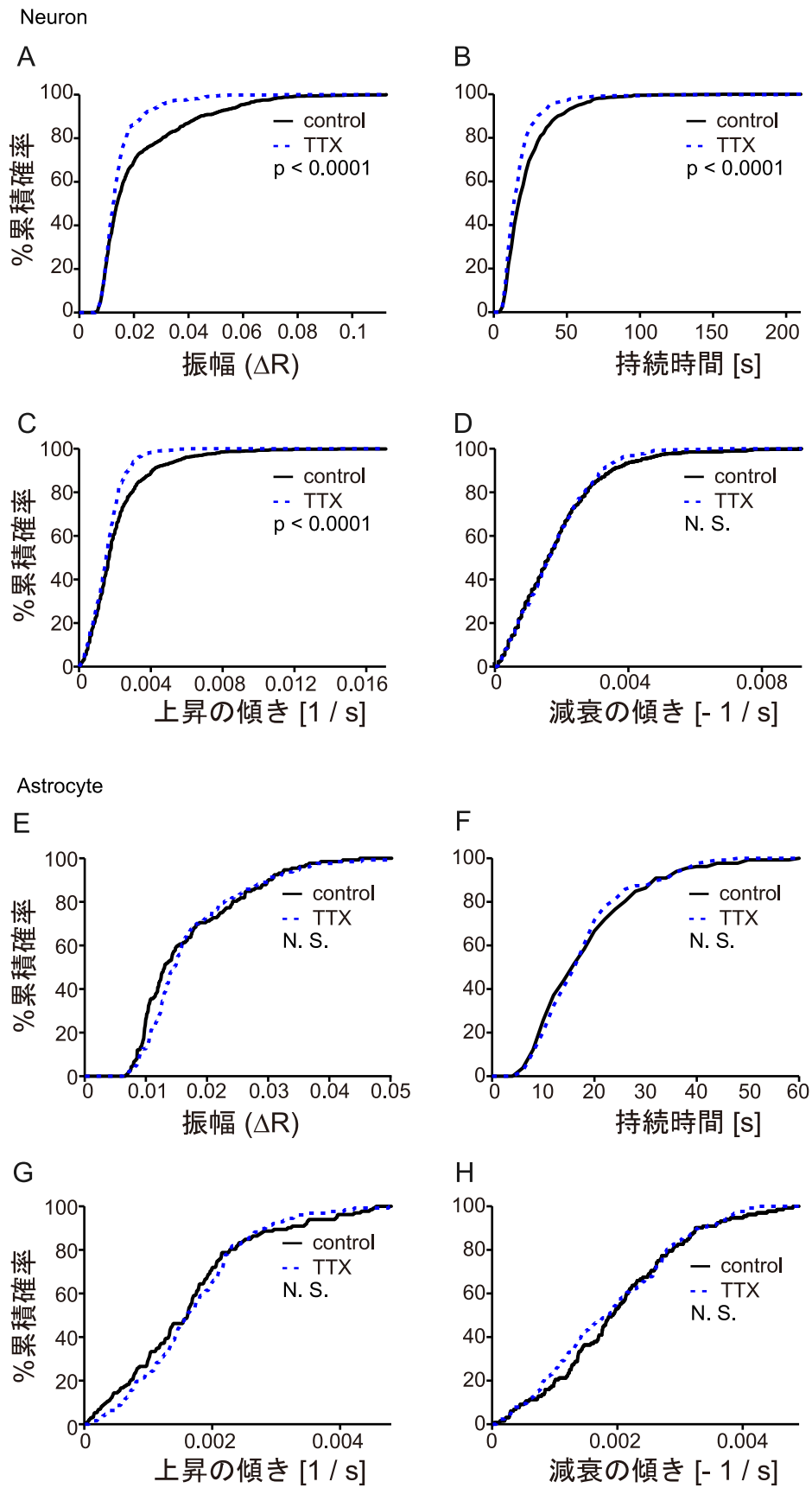


図 14

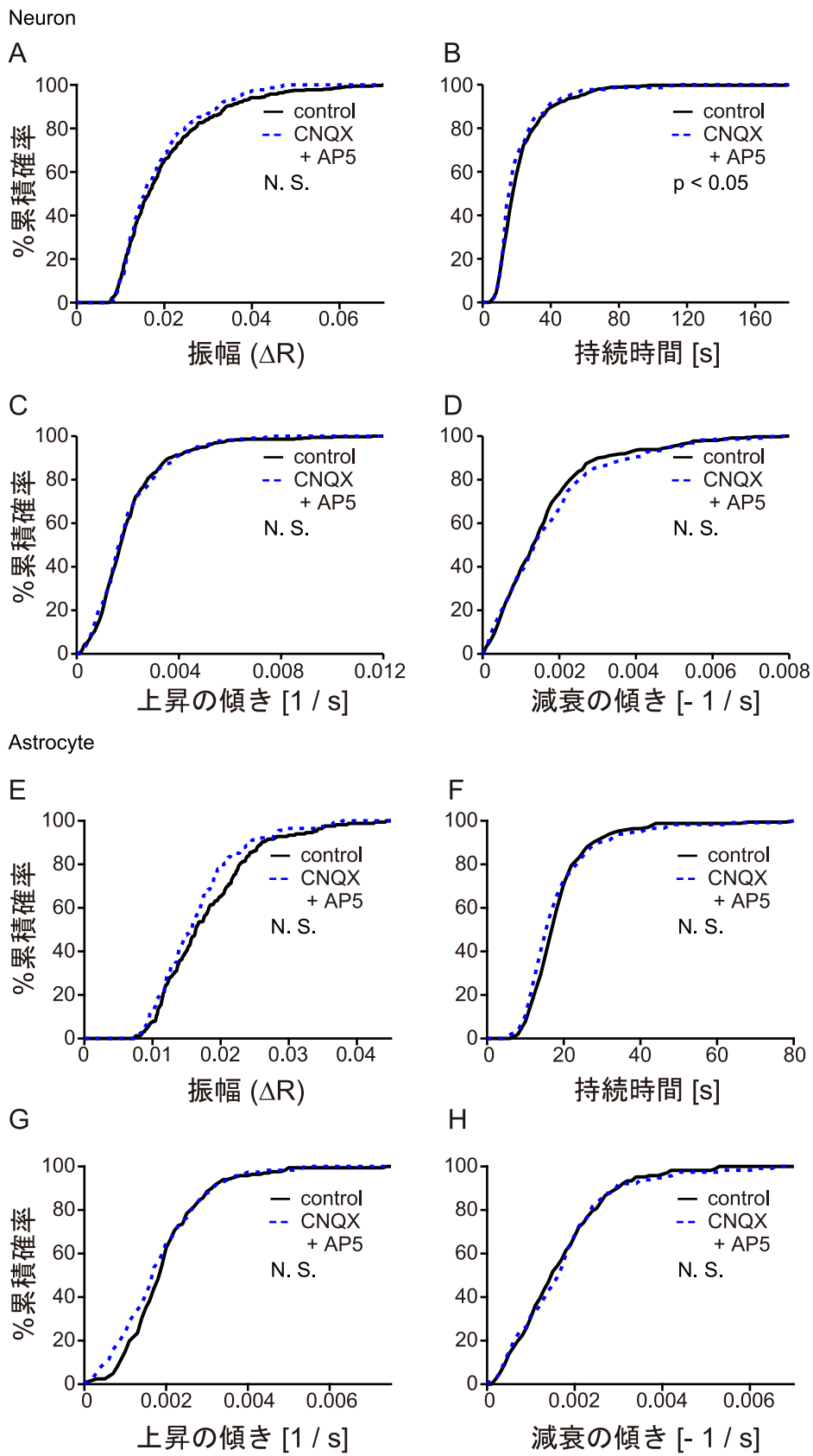


図 15

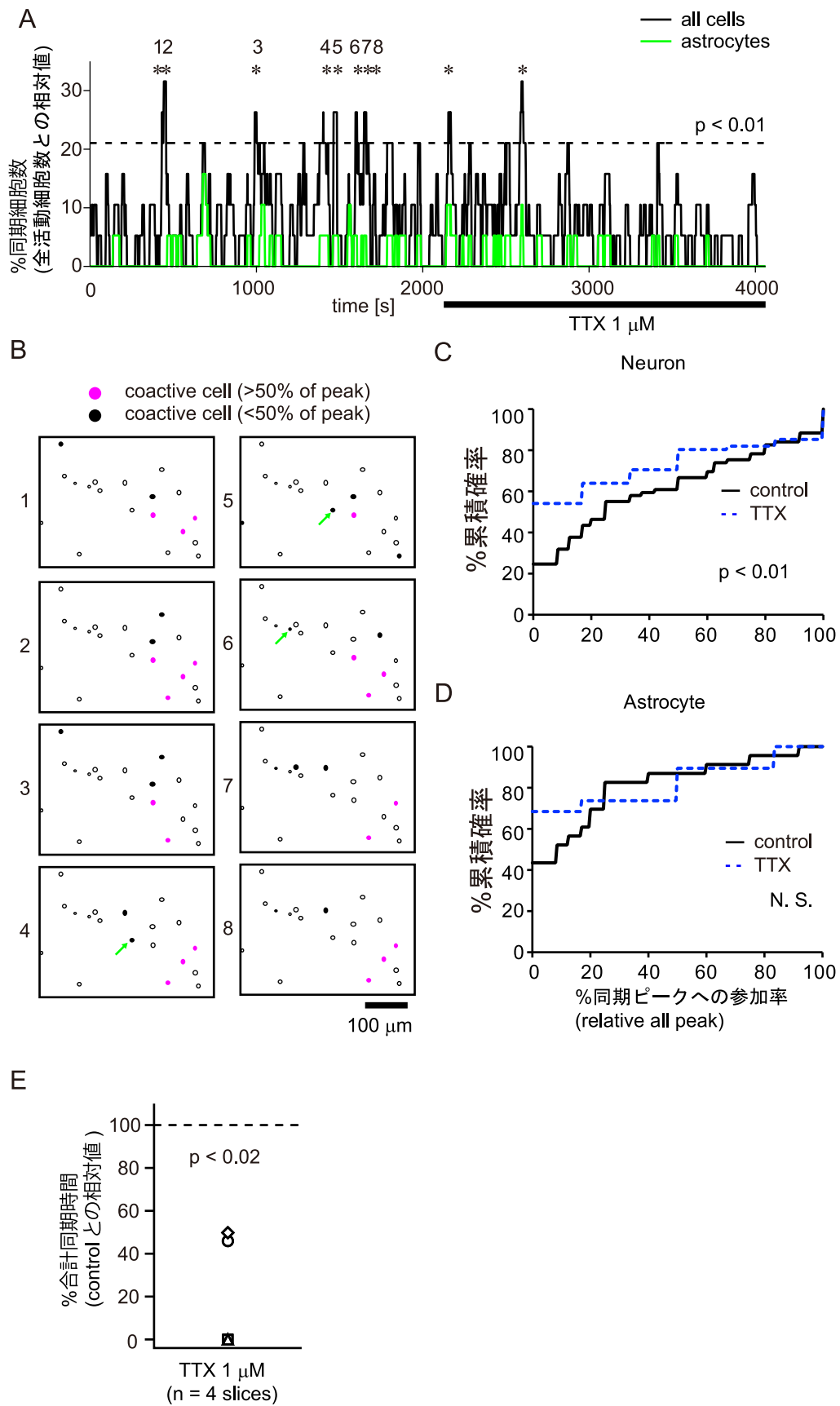


図 16

