

2022年10月31日

報道機関 各位

東北大学大学院生命科学研究科
東北大学大学院医学系研究科

シナプスを食べて憶える グリア細胞による神経細胞の微細構造の貪食が記憶を支える

【発表のポイント】

- ・ 脳内での情報の受け渡しは、神経細胞同士をつなぐシナプス^{*1}で行われています。学習や記憶にともない、シナプスのサイズが変化し、神経を伝わる信号の強度が制御されます。しかし、シナプス構造の調節メカニズムの全容は不明です。
- ・ シナプスを含む神経細胞の一部を、小脳バークマングリア細胞^{*2}が断片的に食べる(貪食^{*3}する)ことで、不要な神経接続を弱め、記憶の定着を促進することを示しました。
- ・ 記憶におけるグリア細胞貪食を理解することで、記憶力促進や認知症治療などに役立つ可能性が期待されます。

【概要】

記憶の形成は、脳神経細胞間のシナプス伝達が強くなる、もしくは、新たなシナプス接続が形成されることで作られると考えがちですが、むしろ、不要なシナプスでの信号伝達が弱くなる、もしくは、シナプス接続そのものが除去されることで、効果的な適応学習が成立することもあります。今回、グリア細胞による貪食作用が脳内の微細構造の変化を支持し、記憶の定着の本質に関わることを示しました。

東北大学大学院生命科学研究科の森澤陽介研究員(研究時、日本学術振興会特別研究員 PD)、松井広教授(大学院医学系研究科兼任)らのグループは、小脳バークマングリア細胞が神経細胞の一部を貪食していることを、新規開発・遺伝子改変マウスを用いた蛍光タンパク質の追跡法^{*4}、三次元電子顕微鏡解析法^{*5}で示しました。さらに、小脳依存性運動学習^{*6}にともない、バークマングリア細胞によるプルキンエ細胞のシナプス構造の貪食が亢進しました。この貪食作用を薬理的に阻害すると、シナプス構造の変化が抑制され、学習の効果が低下することが明らかになりました。本研究により、グリア細胞の活躍次第で、記憶の定着のしやすさが左右される可能性が示されました。

本研究成果は、2022年11月1日付でNature Neuroscience誌にAccepted Articlesとして掲載されます。

【詳細な説明】

脳は、破壊と脱構築を繰り返して、成長していく器官だと捉えることができます。脳内の情報は、神経細胞の間のシナプス伝達が増強／抑制されることで短期的に保持され、引き続くシナプスの構造変化によって長期的に定着すると考えられています。なお、シナプスの強化が記憶の形成、シナプスの減弱が忘却と勘違いされがちですが、不要なシナプス接続を弱め、効率的な神経回路を形成する過程も、新たな記憶形成の過程のひとつとしてみなすことができます。本研究で着目した小脳は、スポーツや楽器の演奏などの「身体で覚える」運動学習を担っています。小脳では、シナプスの接続が減弱することが、効果的な学習の成立につながると考えられています。また、脳内情報処理は、もっぱら神経細胞の織り成す神経回路のみが担っていると考えられてきましたが、近年、シナプス周囲のグリア細胞もまた、伝達物質の放出等を介してシナプス伝達効率の変化をサポートする機能を持つことが示されてきました。

東北大学大学院生命科学研究所の森澤陽介研究員(研究時)、松井広教授(大学院医学系研究科兼任)らのグループは、健常な小脳組織において、バークマングリア細胞が恒常的に周囲の神経細胞の一部を断片的に貪食することを示しました。貪食を可視化するため、リソソーム中で分解されにくい赤色蛍光タンパク質(pHRed)を特定の時期に目的の神経細胞のみに発現させる新たな遺伝子変異マウスを作出し、グリア細胞に取り込まれた神経細胞断片を追跡する方法を確立しました。さらに、三次元電子顕微鏡法を用いて、バークマングリア細胞が、シナプスやシナプス以外の神経細胞の構造を部分的に取り込む過程の詳細な観察に成功しました。

次に、研究グループは、水平視機性眼球運動(HOKR)の学習による影響を調べました。電車の車窓から外を眺めている人は、風景に合わせて眼球を不随意に動かすことで、網膜上の像がなるべくブレないように調整します。このような眼球運動のことをHOKRと呼びます。水平方向に左右に触れる画像をマウスに繰り返し提示すると、眼球運動の振幅が大きくなることが知られており、小脳の小領域がこの適応を担っています。HOKR学習後の当該領域において、小脳バークマングリア細胞による貪食が亢進し、興奮性シナプスの後部構造であるスパインのサイズが減少していることが明らかになりました。また、貪食を阻害する薬物を投与したところ、スパインのサイズ減少は抑制され、HOKR学習の一部が阻害されることが示されました。さらに、バークマングリア細胞の貪食に重要な遺伝子を同定し、当該遺伝子をバークマングリア特異的に欠損させたマウスにおいても、同様にHOKR学習の一部が阻害されることを示しました。

本研究は、グリア細胞が神経細胞を断片的に貪食することが、シナプス微細構造の変化につながること示し、脳に記憶が刻まれる過程をグリアの機能が支えている可能性が明らかになりました。今回発見されたのは、これまで報告されてきたグリア伝達

物質を介したものと異なった新たな記憶制御メカニズムです。学習時におけるグリア細胞のもつ貪食能の高低次第で、学習・記憶の成立のしやすさが左右される可能性が考えられます。したがって、脳における情報処理と記憶形成を理解するには、神経細胞とグリア細胞を含めた超回路機構を理解することが必要であることが分かりました。

なお、記憶の形成時以外にも、グリア細胞による貪食が重要な役割を担う可能性が考えられます。今回、グリア細胞による貪食は、シナプスに限らず、様々な神経細胞の部位で生じていることが観察されました。これらの不要物質を取り込み処理する機能は、脳内環境の恒常性を維持する上でも、重要であると考えられます。

統合失調症やアルツハイマー病など多くの精神神経疾患で、シナプス構造の異常(収縮・消失)が起きることが知られています。シナプス周囲のグリア細胞による貪食の役割や病態時におけるその異常な働きを正しく理解することは、病態メカニズムの解明、そして、新たな治療戦略の開発につながる可能性が期待されます。

本研究は、日本学術振興会、文部科学省研究費補助金 JSPS KAKENHI (16K18388, 16H06280, 18H05120, 18K06457, 18J00603, 18H05110, 19K22469, 19H03323, 19H03338, 20H05046, 22H02713)、学術変革領域(A)「グリアデコーディング」(20H05896)、AMED (JP21dm0207111)、先端バイオイメージング支援プラットフォーム(JP16H06280)、光科学技術研究振興財団、難治疾患共同研究拠点、ノバルティス科学振興財団、内藤記念科学振興財団、山梨県大村智人材育成基金の支援を受けて行われました。

【用語説明】

*1 シナプス:

興奮性神経細胞の出力末端のシナプス前部には、グルタミン酸の詰まったシナプス小胞が集積していて、神経細胞が興奮すると、このシナプス小胞の中身が細胞外空間に放出されます（開口放出）。細胞外に放出されたグルタミン酸は、シナプス後部まで拡散し、グルタミン酸に特異的に反応する受容体に結合し、細胞内に陽イオンが流入することで、この神経細胞は興奮します。シナプス伝達の効率が增強されたり減弱されたりすることで短期的な記憶は成立し、シナプスが構造的に変化することで長期的な記憶が定着すると考えられています。小脳においては、シナプス伝達効率が減弱し、シナプス構造が小さくなったり切断されたりすることで、運動学習記憶が形作られると考えられています。

*2 グリア細胞:

脳内の細胞は、神経細胞とグリア細胞に分類されます。神経細胞は活動電位で情報を表現し、神経細胞同士をシナプス結合でつなぐネットワークで脳内情報処理が進むと考えられています。グリア細胞は、神経細胞の隙間を埋めて、神経細胞への栄養供給をする存在だと考えられてきましたが、近年、グリア細胞も特有の情報表現をしていて、神経細胞の担う情報処理に影響を与えることが認識されるようになってきました。

グリア細胞は、大きく分けて、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトに分類されます。脳内において情報処理にかかわるのは神経細胞ですが、アストロサイトによる情報処理の修飾やシナプス可塑性のメタ制御等に近年注目が集まっています。今回、神経組織の微細構造が変化し、学習や記憶が神経回路に刻まれて定着する過程において、アストロサイトの貪食作用が関与することが示唆されました。なお、今回、特に注目したのは小脳バークマングリア細胞についてです。この細胞は、アストロサイトの一種に分類されますが、他のどのグリア細胞とも異なる特徴が多くあるため、独立した細胞種としてみなす場合もあります。バークマングリア細胞は、特に、小脳依存性の運動学習との関わりが強く示されてきました。

*3 貪食(どんじょく):

細胞が他の細胞の一部や外来の異物を取り囲んで「食べて」しまうように見える現象のことを **phagocytosis** (貪食) と呼びます。実際に、食べられた細胞の断片は、リソソームという細胞内小器官に取り込まれ、その内容が分解(消化)されます。脳内では、グリア細胞のうちの免疫担当のミクログリアによる脳組織の貪食作用は良く知られていました。また、シナプス部位や血管等の周囲を占め、脳内でのエネルギーの受け渡し等の代謝機能に主な役割をもつアストロサイトも、近年、神経組織を貪食することが示されています。ただ、このようなアストロサイトによる貪食は、発生発達のごく初期の過程か、脳梗塞等によって脳組織の一部が壊れた時にしか生じないと考えられてきました。今回、健常時の脳でも、学習等の刺激によって、アストロサイトによ

る貪食が亢進することが示されました。

***4 遺伝子改変蛍光タンパク質の追跡法:**

今回、神経細胞特異的に蛍光タンパク質を遺伝子発現させて、この蛍光タンパク質の場所を追跡し、グリア細胞に取り込まれたかどうかを調べる方法を用いました。これまで、同様のストラテジーで、神経細胞に緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現させて、追跡を試みた例はありますが、貪食された細胞片はグリア細胞内のリソソームに運ばれてしまいます。GFP は早い段階でリソソームによって分解されてしまいます。したがって、貪食された神経組織を GFP で標識して追跡することはできませんでした。一方、今回、リソソームによる分解作用を受けにくい赤色蛍光タンパク質 (pHRed) を神経細胞に発現させたところ、グリア細胞内に取り込まれてもなお、pHRed で標識された神経組織を長期的に追跡することが可能になりました。

***5 三次元電子顕微鏡解析法:**

グリア細胞には極めて薄いシート状の微細構造があり、光学顕微鏡の解像度を下回るため、グリア細胞が神経組織片を完全に包囲しているのか、それとも、神経細胞とグリア細胞とが、ただ隣接しているだけなのかを区別することは困難でした。また、電子顕微鏡を用いて、超薄切片1枚の画像を調べて、たとえ、神経組織片がグリア細胞に包囲されているように見えたとしても、どこかで神経組織片が神経細胞の本体とつながっている可能性は否定できませんでした。今回、ブロック状に固めた脳組織の表面を Focused Ion Beam (FIB) で薄く削って、ブロック組織の表面を走査型電子顕微鏡 (Serial Electron Microscope; SEM) で観察する方法を繰り返すことで、脳組織の三次元像を高解像度で再構築する方法を用いました。この方法によって、神経組織片がグリア細胞によって完全包囲されつつある過程も観察することができ、貪食が完成する前から、神経細胞の微細構造において変性が始まっていることも示唆されました。

***6 小脳依存性運動学習:**

各種筋肉の働きを調節して、効率的な運動機能が成り立つような適応学習は、小脳において成立すると考えられています。特に、目の前の画像が左右に触れるのを追跡する不随意の眼球運動の学習 (Horizontal Optokinetic Response; HOKR) が良く調べられています。繰り返し、画像を提示することで、次第に眼球運動の振幅が大きくなり、網膜上の画像が安定化すると考えられています。この運動学習は、小脳の中でも flocculus という小領域が担当しています。今回、HOKR 学習によって、flocculus でのバークマングリア細胞による神経組織の貪食が亢進し、グリア貪食を薬理的に阻害すると学習の一部が阻害されることが示されました。

【 図 】

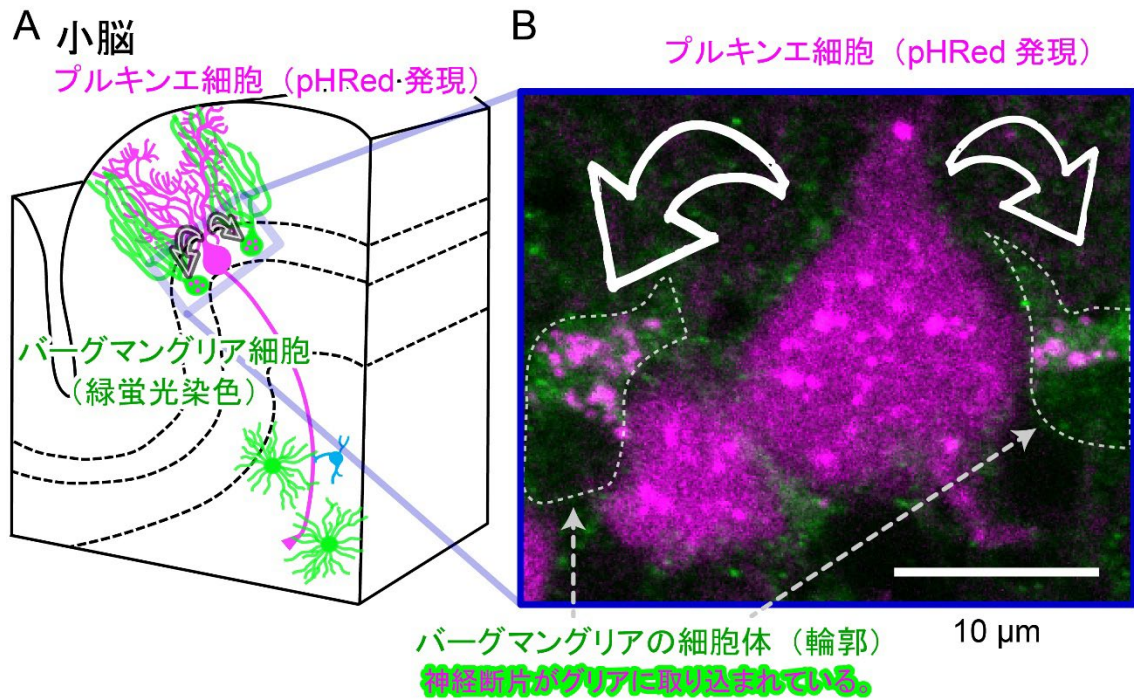


図1 バーグマングリア細胞による神経片貪食の蛍光追跡法

(A) 小脳の出力神経細胞のプルキンエ細胞の細胞体や樹状突起は、バーグマングリア細胞（小脳におけるアストロサイトの種類）に取り囲まれていることが知られています。遺伝子工学的な技術を使って、プルキンエ細胞に特異的に pHRed 蛍光タンパク質を発現させました。動物をホルマリンで灌流固定した後、小脳を取り出して組織切片を作製し、バーグマングリア細胞を緑色に蛍光染色をしました。

(B) 小脳切片の蛍光画像を調べたところ、プルキンエ細胞で pHRed が発現していることは確認できました。また、バーグマングリア細胞は緑蛍光染色されていました。興味深いことに、プルキンエ細胞以外の場所でも、pHRed による粒状の蛍光が見られることが分かりました。詳しく解析したところ、バーグマングリア細胞の細胞体(点線で囲まれた部分)の中に、pHRed の粒状蛍光が認められることが分かりました。プルキンエ細胞だけでなく pHRed は遺伝子発現していないにもかかわらず、pHRed の一部は、バーグマングリア細胞の中にも認められたというわけです。バーグマングリア細胞が、プルキンエ細胞の一部を食べて(貪食して)、プルキンエ細胞の細胞質内の pHRed ごと、バーグマングリア細胞内に取り込んだことが示唆されました。細胞内小器官のリソソームを蛍光染色したところ、バーグマングリア細胞内の粒状の pHRed とリソソームの位置が一致することが分かりました。リソソームは、細胞にとって不要な分子を分解して消化する器官です。バーグマングリア細胞は、プルキンエ細胞の一部を貪食して、それを

リソソームで消化していることが示されました。なお、pHRed は、リソソームによる分解を受けにくい分子であることが知られており、バークマングリア内のリソソームに取り込まれても、なお、分解されずに蛍光を発することができたのだと考えられます。これまで、緑蛍光タンパク質 (GFP) 等を使って、貪食片を追跡することが試みられてきましたが、GFP は、リソソームに取り込まれ次第、すぐに分解されてしまうので、貪食片を追跡する標識としては使えませんでした。今回、pHRed による貪食追跡法が新たに確立されたため、脳を含め、広く、一般的に、細胞による貪食の機能と役割を明らかにする画期的なツールとして活用されることが期待されます。

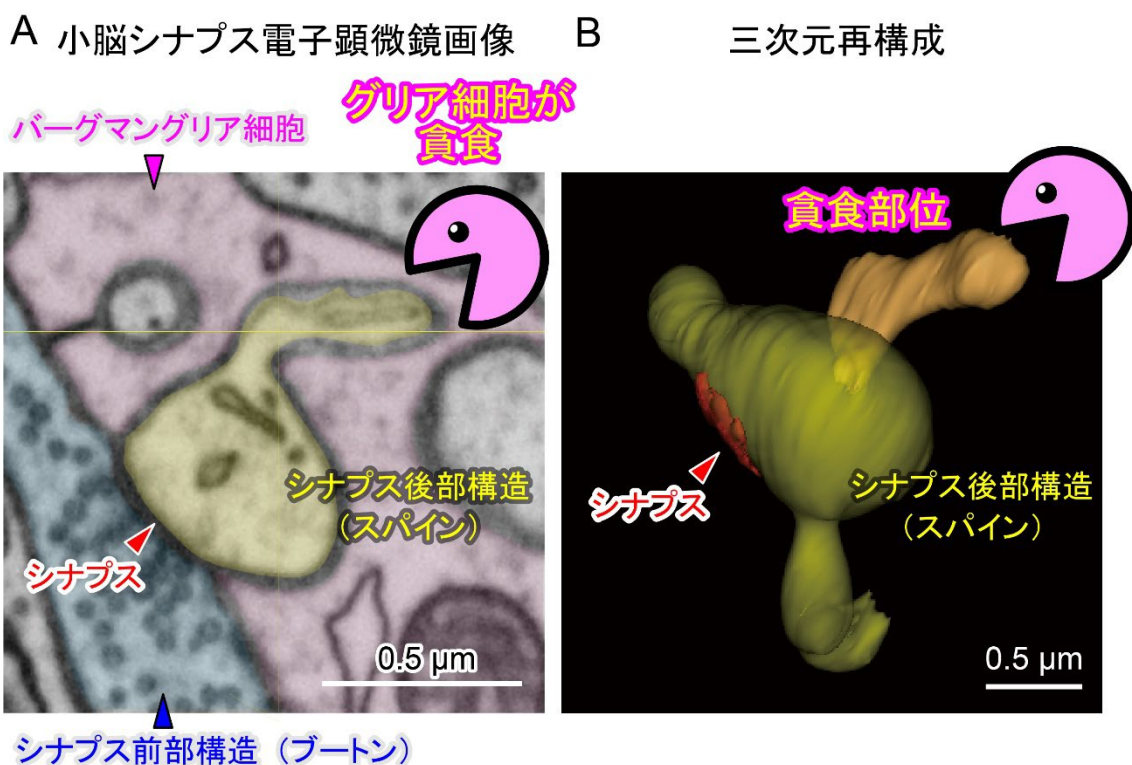


図2 グリア細胞貪食の電子顕微鏡解析

(A) 小脳組織の電子顕微鏡画像を解析したところ、シナプス前部構造(ブートン、水色着色)とシナプス後部構造(スパイン、黄色着色)と接するシナプス部位において、周囲を取り囲むバークマングリア細胞(マゼンタ着色)が、プルキンエ細胞のスパイン部位をまさに貪食せむとする決定的な場面を捉えることに成功しました。この例では、貪食部位は、まだ、神経細胞のスパインとつながった状態でしたが、貪食されつつある部位では、既に、組織変性が始まっていることが示唆されました。また、別の例では、貪食が完成し、元の神経部位と完全につながりが切れた直後と思われる画像も得られました。この他にも、シナプス前部構造の一部や、神経細胞の他の部位を貪食している様子も多数記録することができました。これまで、脳損傷や脳梗

塞時、あるいは、発生発達のごく初期にグリア細胞による貪食が生じることは報告されてきました。しかし、今回のように、脳に何らダメージがない、ごく健康な脳内において、グリア細胞によるスパインの貪食の決定的な瞬間を詳細に電子顕微鏡で捉えたのは、世界で初めてです。

(B) 化学固定された脳組織ブロックをイオン束(Focused Ion Beam)によって薄く削って、残った組織ブロックの表面を走査型電子顕微鏡(Serial Electron Microscope)で観察し、再び、FIBで削って観察することを繰り返すことで、脳組織の精細な三次元像を再構築することが可能です。今回、最新鋭の FIB-SEM 技術を使って貪食部位を観察したところ、通常のスパイン形状から明らかに飛び出してグリアに貪食されつつある構造が浮かび上がってきました。

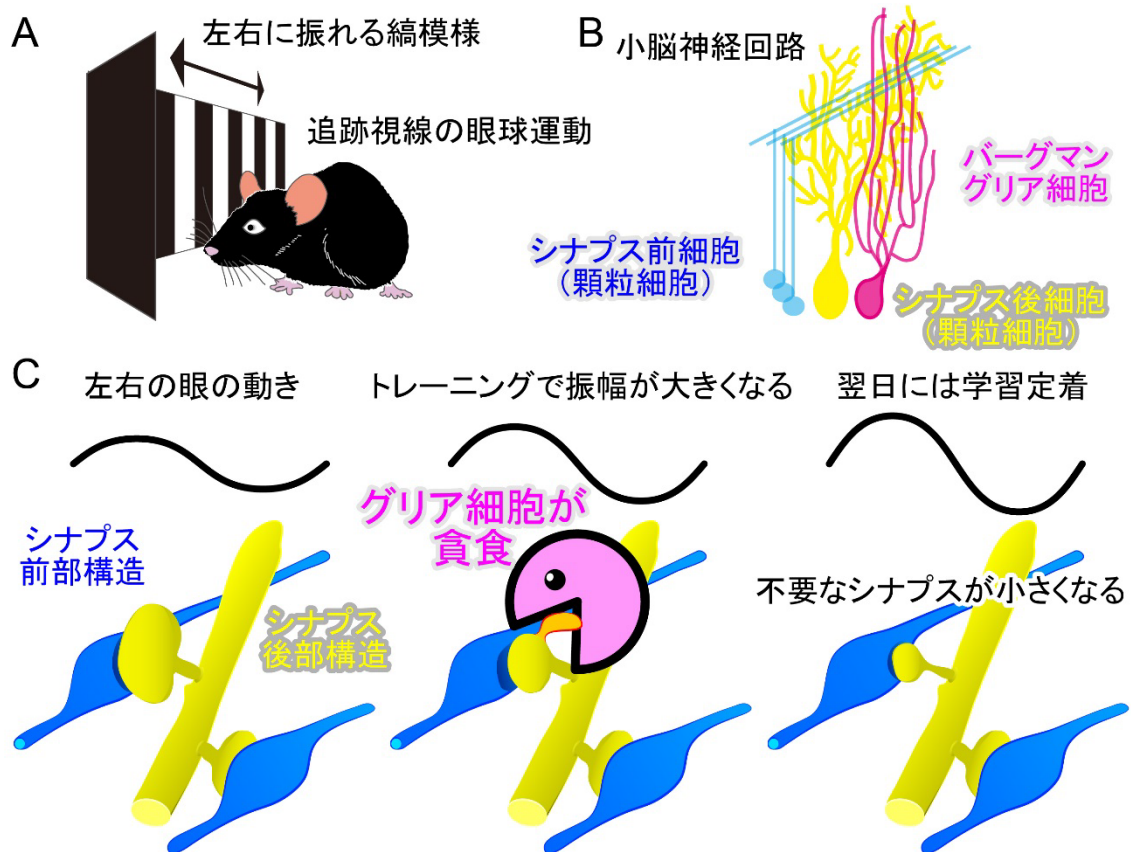


図3 グリア貪食が学習と記憶を支える

(A) マウスの目の前のスクリーンに提示した縦縞模様を左右に動かすと、この縞模様を追跡する不随意の眼球運動が引き起こされます。このような視覚刺激を繰り返し提示すると、眼球運動の振幅は次第に増大し、やがて、縞模様の動きを完全に補足ようになります。

(B) このような水平視機性眼球運動(HOKR)学習は、小脳のなかでも flocculus という小領域でのシナプス可塑性によって生じると考えられています。小脳では、視覚情報などは顆粒細胞

を介して伝わり、プルキンエ細胞に情報は伝えられ、プルキンエ細胞から小脳外に向けて信号が出力されます。この顆粒細胞とプルキンエ細胞の間のシナプスが可塑的に変化することで、トレーニングの効果が発揮され、適応的な行動の記憶が定着すると考えられています。今回、小脳依存性の HOKR 運動学習や記憶が効果的に定着するにあたり、顆粒細胞とプルキンエ細胞の間のシナプス部位を取り囲む、バークマングリア細胞による貪食作用が重要な役割を果たすことが明らかになりました。

(C) 小脳では、適応行動にとって不要なシナプスでの信号伝達が減弱することで学習が成立することが知られています。今回、HOKR 学習トレーニングを重ねると、バークマングリア細胞による貪食が活発になることが示されました。また、トレーニングを終えた翌日のシナプス後部構造(スパイン)部位の体積は小さくなり、このことが効果的な学習の促進と定着につながるということが明らかになりました。引き続き、グリア貪食の役割を調べるため、薬剤投与によって、トレーニング中のグリア貪食を抑制しました。すると、グリア貪食を抑制しても、トレーニング中の学習は変わらずに進むことが示されましたが、トレーニング後、翌日にかけてさらに学習が促進される過程が、グリア貪食の抑制によって阻害されることが示されました。このことより、グリア貪食は、記憶の定着と促進に役割があることが示されました。

【論文題目】

題目： Synaptic pruning through glial synapse engulfment during motor learning

著者： Yosuke M. Morizawa, Mami Matsumoto, Yuka Nakashima, Narumi Endo, Tomomi Aida, Hiroshi Ishikane, Kaoru Beppu, Satoru Moritoh, Hitoshi Inada, Noriko Osumi, Eiji Shigetomi, Schuichi Koizumi, Guang Yang, Hirokazu Hirai, Kohichi Tanaka, Kenji F. Tanaka, Nobuhiko Ohno, Yugo Fukazawa, Ko Matsui

筆頭著者情報

氏名： 森澤 陽介

研究時所属： 東北大学 大学院生命科学研究科 超回路脳機能分野

研究時所属： 日本学術振興会 特別研究員 (PD)

雑誌： Nature Neuroscience

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01184-5>

【問い合わせ先】

(研究に関すること)

東北大学大学院生命科学研究科

教授 松井 広(まつい こう)

電話番号: 022-217-6209

Eメール: matsui@med.tohoku.ac.jp

(報道に関すること)

東北大学大学院生命科学研究科広報室

担当: 高橋 さやか (たかはし さやか)

電話番号: 022-217-6193

Eメール: lifsci-pr@grp.tohoku.ac.jp