

氏 名 別府 薫

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1695 号

学位授与の日付 平成26年3月20日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial
glutamate release and ischemic brain damage

論文審査委員 主 査 教授 鍋倉 淳一
教授 吉村 由美子
教授 池中 一裕
チームリーダー 平瀬 肇 理化学研究所
教授 松井 広 東北大学
教授 重本 隆一 IST

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

The brain is composed of many cells and it is considered that signals transmitted between these numerous cells are what underlie the basis of our mind and behavior. Glial cells comprise more or less half of the cells in the brain. However, active communication between neurons and glial cells has not been well understood as glial cells are mostly electrically silent. Here, I showed the astrocyte, one of the population of glial cells, can send information to neurons using glutamate as a transmitter. The mechanism of glutamate release was totally different from that in case of neurons, suggesting a role of astrocytes as a modulator of neuronal excitability and synaptic plasticity. I also found that the activity of astrocytes can run away and cause devastating effects on the homeostasis of the brain environment. A large contributor to the development of excitotoxicity upon ischemia was glutamate released from astrocyte, which was triggered by astrocytic acidification. Optogenetic countering of astrocytic acidosis was sufficient to suppress ischemic brain damage. These data suggest a two-sided nature of astrocyte; on one side, it can modulate behavior and learning in physiological situations and, on the other side, it can have a destructive role upon pathology. In both case, I showed that the glial cells are not silent and should not be neglected population of cells in the brain.

In this thesis, I present data obtained using immunohistochemistry, electrophysiology, and behavioral studies. Controlling astrocytic activity at will was essential in understanding the function of astrocytes. To this end, I introduced transgenic mice which selectively express optogenetic tools such as channelrhodopsin-2 (ChR2) and Archaeorhodopsin-T (ArchT) in astrocytes.

Astrocytes are known to maintain neuronal survival and functioning, such as trophic support, uptake of glutamate, and removal of K^+ from extracellular space. Recent studies show that astrocyte exhibit dynamic and rapid activity in response to neuronal activity. However, whether astrocytes can send information back to neurons was largely unknown. This was because, specific method to selectively stimulate astrocytes has not been available. However, recent technical advance in optogenetic tool enable us to study the glia-to-neuron interaction.

To investigate whether astrocyte-to-neuron signaling exists, I established a transgenic mouse which expresses ChR2, a light gated cation channel, in astrocytes. Optic fiber was placed on the cerebellum and astrocyte-photostimulation was delivered through the skull under free moving condition. Astrocyte-photostimulation induced expression of *c-fos*, suggesting astrocyte activation could induce neuronal activity. In addition, cerebellar-dependent behavior and learning was also affected by astrocyte-photostimulation. This result suggests that astrocyte-to-neuron signaling

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

exists and astrocytes can drive dynamic neuronal activity, which can alter the brain circuits' function.

I next searched for the signals that mediate astrocytic activity to neuronal excitation. Using cerebellar acute slice preparation of mice, I found that astrocyte-photostimulation leads to release of glutamate which activates AMPA receptors and metabotropic glutamate receptor 1 expressed on neurons. As a result, long term depression occurred in the cerebellar Purkinje cells, suggesting that synaptic plasticity was affected. This result suggests that the signal initiated from astrocyte is glutamate.

Next, the mechanism of glutamate release driven by astrocyte-photostimulation was investigated. In neuron, glutamate release is known to be released by calcium-dependent vesicular release. However, I found that astrocyte-photostimulated glutamate release was mediated by a quite different way. When ChR2 is opened by light application, proton influx occurs through ChR2 causing acidification within astrocytes. This proton elevation in astrocytes triggers anion channel opening and glutamate is released through this anion channel.

I next studied the astrocytic contribution to excitotoxicity because the form of astrocyte-to-neuron signaling that I found would likely manifest under pathological conditions. Upon brain ischemia, two major events occur. One is acidosis, and the other is release of excess glutamate, which leads to excitotoxicity. However, it is not clear whether these two events are independent or related to each other. I hypothesized that the extreme acidification in astrocytes causes excess glutamate release. To verify this hypothesis, a tool to counter astrocytic acidification was required. Thus, I introduced a transgenic mouse line which expresses light sensitive proton pump, ArchT, in astrocytes. I found that countering of astrocytic acidification upon ischemia with ArchT-photostimulation dramatically inhibited astrocytic glutamate release and ischemic brain damage. This result suggests that acid-sensitive astrocytic glutamate release is the major cause of brain damage upon cerebellar ischemia.

In conclusion, my study suggests that astrocytes have a powerful role in regulating neuronal activity and brain healthiness. Further studies of the functions of astrocytic activity seem to elucidate previously unrecognized functions of the brain.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

博士学位出願者・別府薫氏は、脳機能の正常な稼働や脳内環境の恒常性がどのように維持されており、脳病態時には何が原因でそれらが破綻していくのかに注目しその解明を目指した。その中で、神経細胞を密接に取り囲み、脳の構造を支持しているアストロサイトというグリア細胞に着目し、その機能が、脳の正常な働きや病態の発生に影響を及ぼしているのではないかと仮説を立て、アストロサイトの活動が神経細胞や脳機能へ及ぼす影響について研究を行った。

これまで神経細胞間を伝わる信号網が、行動や学習の基盤であると考えられてきた。しかし従来は不活性であるとみなされてきたアストロサイトも、細胞内の Ca^{2+} 変動があり、周囲の情報を検知していることが分かってきた。そこで、アストロサイトの活動が神経細胞間の情報伝達網に介入しうるのかを調べることにした。

アストロサイトの活性化が神経細胞へ情報を伝えることができるのかを調べるために、光に感受性のあるChannelrhodopsin2(ChR2)という陽イオンチャネルをアストロサイト選択的に発現させる遺伝子改変マウスを作成した。頭蓋骨に設置した光ファイバーを介して小脳アストロサイトを光刺激すると、神経細胞の活動が上昇することを*c-fos*の発現で確認した。次に、このようなアストロサイトから神経細胞への情報伝達を仲介する伝達物質が何かを調べた。小脳スライス標本を用いてアストロサイトを光刺激したところ、神経細胞で内向きの電流が流れ、グルタミン酸受容体の阻害剤で抑制された。アストロサイトからのグルタミン酸放出は緩徐であることから、シナプス伝達のような素早い情報伝達を担うのではなく、神経細胞の定常的な活動を調節したり、シナプス可塑性の起こりやすさを左右する作用があることが示唆された。

次に、別府氏はアストロサイトからどのようにしてグルタミン酸が放出されるのかを調べたところ、ChR2を介して流入した水素イオンによる細胞内の酸性化によって開口する陰イオンチャネルを介してグルタミン酸が放出されることが分かった。このことから、神経細胞における Ca^{2+} に依存した小胞性のグルタミン酸放出とは全く異なる経路で、アストロサイトからグルタミン酸が放出され、神経細胞へ情報を発信していることが示唆された。

加えて、別府氏はアストロサイトから神経細胞への作用が顕在化すると考えられる病態時での研究を進めた。出願者のこれまでの研究により、アストロサイトの酸性化がグルタミン酸の放出を起こすことが示されたので、細胞内の酸性化が顕著に起こる脳虚血に着目した。出願者は、虚血時の過剰なグルタミン酸放出はアストロサイト内の酸性化が引き金となっていると推測し、この仮説を検証するために、光感受性のプロトンポンプであるArchaeorhodopsin(ArchT)をアストロサイト選択的に発現させた。ArchTを光刺激してアストロサイトの細胞内アルカリ化を引き起こしたところ、虚血時の過剰なグルタミン酸放出を抑制することができ、グルタミン酸毒性による神経細胞死を抑えることができた。

以上の結果から、アストロサイトからの情報伝達は、神経回路網の定常状態を制御したり、可塑性の起きやすさを左右する面がある一方、アストロサイトの機能が破綻すると、神経細胞の障害をもららすことが分かった。これらの発見は脳虚血以外の病態時においてもpHに依存したアストロサイトの作用が、病態の発生や進行に関与している可能性を示

(Separate Form 3)

竣する重要な成果である。