



## Negl2/3-mediated mechanism for tripartite synapse formation

野沢, 治

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3438号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490194>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(論文博士関係)

## 学位論文の内容要旨

**Necl2/3-mediated mechanism for tripartite synapse formation**

Necl-2 と Necl-3 を介した興奮性三者間シナプスの形成と維持の機構

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科 生理学・細胞生物学講座 細胞生理学分野 南康博教授)

野沢 治

緒言：

アストロサイトは、傍シナプスアストロサイト突起 (perisynaptic astrocyte processes: PAPs) と呼ばれる多数の細かい微小突起をシナプスに伸展させて接着し、三者間シナプスを形成している。また、アストロサイトは機能的な極性を発達させており、PAPs には、シナプスから放出されたグルタミン酸を回収するグルタミン酸トランスポーターや、神経活動に伴って上昇した細胞外カリウムイオンを取り込むカリウムチャネルなどの機能分子が集積している。しかし、アストロサイトのこのような枝分かれと極性形成の機構および PAPs とシナプスとの接着による三者間シナプスの形成と維持の機構は十分には解明されていない。これらの機構を解明するために、これまでアストロサイトと神経細胞の共培養系が開発されてきたが、従来の共培養系では生体内に近い形態や機能を持つアストロサイトを再現されていなかった。そこで本研究では、形態的にも機能的にも生体内に近いアストロサイトを再現する新しいアストロサイトと神経細胞の共培養系を開発し、これらの未解明の機構を解明することを目的とした。

結果：

## 1. 共培養系でのアストロサイトの枝分かれにおける神経細胞とその活動の必要性

膜局在型 GFP を発現して PAPs を可視化したアストロサイトは、単独培養では、枝分かれの少ない扁平状であったが、神経細胞との共培養では、生体内のアストロサイトのように複雑に枝分かれし、PAPs をシナプス付近に伸展させていた。これらの枝分かれと PAPs の伸展は、メタノールで前処理した神経細胞との共培養で抑制された。また、ナトリウムチャネル遮断薬のテトロドトキシンを加えた共培養でも抑制され、グルタミン酸の追加添加で回復しなかった。さらに、これらの枝分かれと PAPs の伸展は、代謝型グルタミン酸受容体 mGluR5 の阻害剤を加えた共培養で抑制され、mGluR3 や AMPA 受容体、NMDA 受容体などの他のグルタミン酸受容体の阻害剤を加えた共培養では抑制されなかった。これらの結果から、アストロサイトの枝分かれには、神経細胞とその活動によってシナプスから放出されるグルタミン酸が重要であり、少なくともアストロサイトの mGluR5 が関与することが明らかになった。

## 2. 共培養系のアストロサイト-シナプス相互作用とアストロサイトの極性形成における Necl-2 と Necl-3 のトランス結合の関与

アストロサイトと神経細胞との共培養系で形成された三者間シナプスの PAPs には、グルタミン酸トランスポーター EAAT1 と EAAT2 およびカリウムチャネル Kir4.1 が集積していた。また、細胞接着分子ネクチン/Necl ファミリーメンバーの Necl-2 は PAPs に、また他のメンバーの Necl-3 は PAPs に接している軸索に局在していた。しかし、Necl-2 欠損アストロサイトと野生型神経細胞の共培養では、PAPs がシナプスに接して三者間シナプスを形成し、そこに Necl-3 と EAAT2 は局在していたが、EAAT2 の集積は減少していた。逆に、

GFP-*Necl-2* を過剰発現させたアストロサイトと野生型神経細胞の共培養では、PAPs がシナップスにより強く接着し、*Necl-3* と EAAT2 の集積は増加していた。一方、野生型アストロサイトと *Necl-3* 欠損神経細胞の共培養では、PAPs はシナップスに未到達で三者間シナップスは形成されず、*Necl-2* と EAAT2 はシナップスと離れた PAPs に局在していた。さらに、*Necl-2* 欠損アストロサイトと *Necl-3* 欠損神経細胞との共培養では、PAPs はシナップスに到達せず、三者間シナップスは形成されていなかった。また、*Necl-2* と EAAT2 は PAPs に局在していなかった。EAAT2 以外の機能分子である EAAT1 や Kir4.1 も同様の結果であった。透過型電子顕微鏡を用いて、野生型アストロサイトと野生型神経細胞の共培養における三者間シナップスの形態を観察すると、PAPs はシナップスに到達していたが、シナップスを取り囲むように接していなかった。しかし、GFP-*Necl-2* 発現アストロサイトと野生型神経細胞の共培養では、PAPs はシナップスを取り囲むように接していた。これらの結果から、アストロサイトの *Necl-2* と軸索の *Necl-3* のトランス結合が PAPs とシナップスの接着に必要であり、アストロサイトの *Necl-2* が機能分子を PAPs に集積させることでアストロサイトの極性形成を引き起こし、三者間シナップスを形成することが明らかになった。

### 3. *Necl-2* と *Necl-3* のトランス結合によるシナップス数の増加

電気生理学的手法によってシナップスの微小興奮性シナップス後電流 (mEPSC) を測定してグルタミン酸の放出部位の数を解析したところ、mEPSC 頻度は、野生型神経細胞の単独培養と、野生型アストロサイトと野生型神経細胞の共培養との間に差はなかったが、GFP-*Necl-2* 発現アストロサイトと野生型神経細胞の共培養で増加していた。一方、シナップスマーカーの免疫染色でのシナップスの数は、野生型神経細胞の単培養と比較すると、野生型アストロサイトと野生型神経細胞の共培養で増加し、GFP-*Necl-2* 発現アストロサイトと野生型神経細胞の共培養でさらに増加していた。これらの結果から、アストロサイト *Necl-2* と軸索 *Necl-3* のトランス結合が、シナップス数を増加させることが明らかになった。

### 4. 生体内におけるアストロサイト極性形成と三者間シナップス形成における *Necl-2* と *Necl-3* の関与

海馬苔状線維シナップス周囲において、大部分の *Necl-2* と *Necl-3* が EAAT2 と共に局在しており、*Necl-2* はアストロサイト側、*Necl-3* は軸索側に局在していた。さらに、*Necl-2* 欠損マウス、*Necl-3* 欠損マウス、および *Necl-2* と *Necl-3* の二重欠損マウスを用いて、同部位で *Necl-2*、*Necl-3*、EAAT2 の局在とそれらの集積を検討した。*Necl-2* 欠損マウスでは、*Necl-3* と EAAT2 の局在とそれらの集積は変化していなかった。*Necl-3* 欠損マウスでは、海馬 CA3 野透明層における *Necl-2* の局在が減少し、海馬苔状線維シナップス外での EAAT2 の局在が減少していたが、海馬苔状線維シナップス周囲の EAAT2 の局在とその集積は変化していなかった。*Necl-2* と *Necl-3* の二重欠損マウスでは、海馬苔状線維シナップス周囲の EAAT2 が断片化・短縮化して減少していた。これらの結果から、共培養系の実験から得ら

れた結果が生体内でも起きていることが明らかになった。

考察：

アストロサイトの枝分かれには、神経活動依存的なグルタミン酸が重要であることは知られていたが、その詳細な機構は不明であった。本研究によって、アストロサイトの枝分かれには、神経細胞とその活動によってシナプスから放出されるグルタミン酸が重要であり、少なくともアストロサイトの mGluR5 が関与することが明らかになった。この結果は、アストロサイト特異的 *mGluR5* 欠損マウスや *mGluR5* の阻害剤を投与したマウスの大脳皮質アストロサイトの枝分かれが減少するという報告と一致している。

また、アストロサイト Necl-2 と軸索 Necl-3 のトランス結合が三者間シナプス形成に重要であることが、共培養系および生体内で明らかになった。ネクチン/Necl ファミリーは、同種または異種細胞間でトランス結合してネクチン/Necl スポットと呼ばれる細胞間接着装置を形成しているが、本研究で、三者間シナプスにおいては、アストロサイトと軸索との間で Necl-2/Necl-3 のスポットを形成していることが明らかになった。また、Necl-2/Necl-3 スポットがアストロサイトの極性形成に重要であることも初めて明らかになった。

さらに、Necl-2 と Necl-3 のトランス結合がシナプス数を増加させていることが明らかになった。これは、PAPs-シナプス間の細胞間接着が、三者間シナプスの形成を促進するという初めての知見である。Necl-2 と Necl-3 のトランス結合により、PAPs とシナプスの物理的距離が縮まり、シナプスの形成を促進させるアストロサイト由来液性因子の局所濃度が高まったことが要因のひとつであると考えられる。

このように本研究では、形態的にも機能的にも生体内に近いアストロサイトを再現する新しいアストロサイトと神経細胞の共培養系の開発に成功し、この共培養系を用いてアストロサイトの枝分かれと極性形成の機構および PAPs とシナプスとの接着による三者間シナプスの形成と維持の機構を解明するとともに、このような共培養系の実験から得られた結果が生体内でも起きていることを確認することができた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 2183 号	氏名	野沢 治
論文題目 Title of Dissertation	<p>Necl2/3-mediated mechanism for tripartite synapse formation Necl-2 と Necl-3 を介した興奮性三者間シナプスの形成と 維持の機構</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 菱本 明豊 副査 Vice-examiner 内丘 透 副査 Vice-examiner 松本 理器</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

アストロサイトは、傍シナプスアストロサイト突起 (perisynaptic astrocyte processes :PAPs)をシナプスに伸展させて接着し、三者間シナプスを形成している。アストロサイトのこのような枝分かれと極性形成の機構および PAPs とシナプスとの接着による三者間シナプスの形成と維持の機構は十分には解明されていない。これらの機構を解明するために、そこで本研究では、形態的にも機能的にも生体内に近いアストロサイトを再現する新しいアストロサイトと神経細胞の共培養系を開発し、これらの未解明の機構を解明することを目的とした。

#### 1. 共培養系でのアストロサイトの枝分かれにおける神経細胞とその活動の必要性

アストロサイトの枝分かれには、神経細胞とその活動によってシナプスから放出されるグルタミン酸が重要であり、少なくともアストロサイトの mGluR5 が関与することが明らかになった。

#### 2. 共培養系のアストロサイト-シナプス相互作用とアストロサイトの極性形成における Necl-2 と Necl-3 のトランス結合の関与

アストロサイトの Necl-2 と軸索の Necl-3 のトランス結合が PAPs とシナプスの接着に必要であり、アストロサイトの Necl-2 が機能分子を PAPs に集積させることでアストロサイトの極性形成を引き起こし、三者間シナプスを形成することが明らかになった。

#### 3. Necl-2 と Necl-3 のトランス結合によるシナプス数の増加

アストロサイト Necl-2 と軸索 Necl-3 のトランス結合が、シナプス数を増加させることが明らかになった。

#### 4. 生体内におけるアストロサイト極性形成と三者間シナプス形成における Necl-2 と Necl-3 の関与

海馬苔状線維シナプス周囲において、大部分の Necl-2 と Necl-3 が EAAT2 と共に局在しており、Necl-2 はアストロサイト側、Necl-3 は軸索側に局在していた。さらに、Necl-2 欠損マウス、Necl-3 欠損マウス、および Necl-2 と Necl-3 の二重欠損マウスを用いて、同部位で Necl-2、Necl-3、EAAT2 の局在とそれらの集積を検討した。Necl-2 欠損マウスでは、Necl-3 と EAAT2 の局在とそれらの集積は変化していなかった。Necl-3 欠損マウスでは、海馬CA3 野透明層における Necl-2 の局在が減少し、海馬苔状線維シナプス外での EAAT2 の局在が減少していたが、海馬苔状線維シナプス周囲の EAAT2 の局在とその集積は変化していなかった。Necl-2 と Necl-3 の二重欠損マウスでは、海馬苔状線維シナプス周囲の EAAT2 が断片化・短縮化して減少していた。これらの結果から、共培養系の実験から得られた結果が生体内でも起きていることが明らかになった。

本研究では、形態的にも機能的にも生体内に近いアストロサイトを再現する新しいアストロサイトと神経細胞の共培養系の開発に成功し、この共培養系を用いてアストロサイトの枝分かれと極性形成の機構および PAPs とシナプスとの接着による三者間シナプスの形成と維持の機構を解明するとともに、このような共培養系の実験から得られた結果が生体内でも起きていることを確認された。

よって本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。