

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14351

研究課題名(和文) マイクログリアの睡眠覚醒リズム形成への関与:シナプスの貪食と形成の繰り返し

研究課題名(英文) Involvement of microglial cells in the sleep/wake cycle

研究代表者

田中 潤也 (Tanaka, Junya)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70217040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： マイクログリアは、入眠時に活性化し、シナプス貪食を行い、覚醒時には活性を落としてシナプス貪食を抑制する。その結果シナプス量は入眠時に少なく、覚醒時に多い日内変動が生じる。脳内ノルアドレナリン量の変動が、マイクログリアの機能形態の変動を生じさせる。 マイクログリアのシナプス貪食は、入眠と睡眠の持続を促す可能性がある。 マイクログリアは、C3やMFG-E8で標識される特定のシナプスの選択的な除去をすることから、睡眠中の記憶の固定(memory consolidation)に関与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)： Microglial cells become activated during sleeping time (light period; Zeitgeber Time (ZT0-12)), while actively phagocytizing synapses. Around the waking time (dark period; ZT12-24), microglial phagocytic activity is suppressed. Consequently, amounts of synapses reduced during the light period as revealed by Western blotting. Circadian changes in the concentration of noradrenaline caused the changes in the activity of microglial cells. Higher concentration of noradrenaline was correlated with suppressed microglial activity. It is likely that elimination of synapses by microglial cells causes asleep and maintain the sleep. Microglial cells eliminate only synapses with immunoreactivity of C3 or MFG-E8, suggesting the involvement of microglial cells during asleep in memory consolidation.

研究分野：神経科学

キーワード：microglia circadian sleep synapse noradrenaline EEG phagocytosis eat-me signal

### 1. 研究開始当初の背景

睡眠時にシナプスの減少があることはわかっていた。シナプスの減少は神経細胞のオートファジーによる可能性が想定されていたが、堅固なタンパク質を多く含むシナプスを神経細胞が分解除去できるのか疑問があった。マイクログリアが活発にシナプスに接触していること、AM7とPM7で、ラット脳を固定しマイクログリアを観察すると、ラットの入眠時刻に当たる前者で細胞形態が大きいことを見出した。この結果から、我々は、マイクログリアが入眠時にシナプスを貪食することが睡眠を誘発する可能性について検討することとした。

### 2. 研究の目的

睡眠覚醒リズムを作るメカニズムについては現在もなお不明な点が多い。最近我々は、ラット一次培養マイクログリアに対し、グルタミン酸を添加するとマイクログリアの貪食能が亢進し、ノルアドレナリン添加はその効果を打ち消すことを見いだした。JAK/STATの下流分子である interferon regulatory factor1(IRF1)と貪食細胞マーカーCD68の発現は、ラットの就寝時に当たる午前7時に発現が高く、起床時に相当する午後7時に低いことも判明した。本研究ではこれらの知見に基づき、マイクログリアが睡眠時に視床からのグルタミン酸作動性入力を貪食により除去することで睡眠導入に寄与し、覚醒時には青斑核からのノルアドレナリンによってその作用が抑制され、覚醒が促進されるとの新たな睡眠仮説を立て、その実験的証明を行う。

### 3. 研究の方法

- (1) ラット大脳前頭葉皮質から4時間ごと、1日6回サンプルを採取、定量的RT-PCRによるmRNAの定量あるいは、(Zeitgeber time (ZT)0/12(AM7/PM7)でサンプル採取し、ウエスタンブロッティングを行い、グルタミン酸作動性シナプスおよびマイクログリア関連因子等の発現変動を調べる。
- (2) 詳細な共焦点顕微鏡観察からマイクログリア形態の日内変動とマイクログリアによるシナプス貪食を調べる。
- (3) FACSにより、マイクログリアの形態変化を調べる。
- (4) ZT0/12でマイクログリアを分離、細胞内のシナプシンI含量を比較する。
- (5) ノルアドレナリンの大脳皮質における日内変動。
- (6) マイクログリアの貪食能に影響する、デキサメサゾンやノルアドレナリン前駆物質L-DOPS、ノルアドレナリン枯渇剤レセルピンを投与し、睡眠への影響を脳波測定により解析する。
- (7) 培養マイクログリアへのグルタミン酸/ノルアドレナリンの影響の解析。
- (8) マイクログリアは特定のシナプスに限っ

て貪食していると考えられ、その分子機序解明のため、eat-me signalに着目した免疫組織化学染色及び、シナプトソーム分離によるウエスタン解析を行う。

### 4. 研究成果

#### マイクログリアの日内変動について

- (1) 免疫組織化学染色及びFACSにより、生後2ヶ月ウイスターラットオス前頭葉大脳皮質マイクログリアは、ZT0に大きく、ZT12に小さいことが判明した。
- (2) 4時間ごとに採取したサンプルからcDNAを調整し、定量的RT-PCRを行い、mRNA発現を調べたところ、マイクログリアマーカーのCX3CR1、F4/80のほか、細胞移動に関わるMMP2、MMP9、MMP13、MMP14、起炎症性転写因子IRF1、eat-me signal認識分子の補体C1q、C3、MFG-E8をコードするmRNA発現がZT0で高かった。
- (3) ZT0及びZT12から調整したウエスタンブロッティングサンプルでは、ZT0でシナプシンI、PSD95が少ないこと、CX3CR1、IRF1、MMP2、MMP13、MMP14がいずれも高発現していることを見出した。

#### マイクログリアのシナプス貪食について

- (1) 大脳皮質から分離したマイクログリアをウエスタンブロッティングすると、ZT0で多くのシナプシンIが検出された。
- (2) 共焦点顕微鏡観察から、マイクログリアはZT0付近で、一部のシナプスを貪食していることが判明した。
- (3) 大脳皮質シナプトソーム分画のウエスタンブロッティングを行うと、C1q、C3、MEG-E8はZT0前後に、最も多くシナプトソームに局在していた。
- (4) 共焦点顕微鏡でも、マイクログリアが貪食するシナプスにC3bとMFG-E8が結合していることが観察された。

#### 大脳皮質ノルアドレナリン含量の日内変動

- (1) HPLCによる分析により、ZT0前後で大脳皮質ノルアドレナリン量が最も高く、ZT10、すなわち覚醒時間帯前に、ノルアドレナリン含量は最も低くなることを確認した。

#### 培養マイクログリアに対するノルアドレナリンとIRF1の影響

- (1) ラット一次培養マイクログリアを用いた、培養貪食実験では、グルタミン酸負荷によるマイクログリア貪食能亢進をノルアドレナリンがキャンセルした。
- (2) グルタミン酸負荷により、培養マイクログリアのMMPsやCX3CR1、F4/80の発現が増大した。
- (3) 培養マイクログリアでIRF1をノックダウンすると、ノルアドレナリン負荷と同様の効果をもたらした。

レセルピン、L-DOPSを用いた脳内ノルアドレ

#### ナリン量を変化させる薬理実験

- (1) レセルピンを投与し、ZT0 の脳内ノルアドレナリン量を ZT12 程度のノルアドレナリンにまで減少させると、マイクログリアのサイズは ZT0 程度にまで縮小することを FACS により示した。一方、レセルピンにより脳内ノルアドレナリンを枯渇させるとマイクログリア細胞体は拡大した。
- (2) レセルピンにより減少させたノルアドレナリンをノルアドレナリン前駆物質 L-DOPS 投与により回復させると、ZT12 と同等程度にマイクログリアのサイズが回復した。
- (3) レセルピンを投与すると、マイクログリアの活性化をうかがわせる mRNA 発現変化：IRF1、Iba1、C1q、C3、MMP2 の発現上昇があった。一方、シナプシン I の発現は減少した。

#### デキサメサゾンによるマイクログリア活性化抑制の影響

- (1) デキサメサゾンは、マイクログリアの活性化を強く抑制する。マイクログリアは ZT0 のマイクログリアの活性化を抑制し、遺伝子発現上は覚醒状態が持続する現象をもたらした。

#### 脳波測定による睡眠とノルアドレナリン含量の変化及びデキサメサゾンの影響

- (1) ラットの 24 時間脳波測定により、デキサメサゾンによるマイクログリアの活性化抑制は覚醒時間延長を、ノルアドレナリンを減少させるレセルピン投与により睡眠時間の延長をもたらす事を明らかにした。さらに、レセルピン投与により延長した睡眠時間は、L-DOPS 投与によりコントロールレベルに復帰した。

#### 結論

- (1) マイクログリアは、入眠時に活性化し、シナプス貪食を行い、覚醒時には活性を落としてシナプス貪食を抑制する。その結果シナプス量は入眠時に少なく、覚醒時に多い日内変動が生じる。
- (2) 脳内ノルアドレナリン量の変動が、マイクログリアの機能形態の変動を生じさせる。
- (3) マイクログリアのシナプス貪食は、入眠と睡眠の持続を促す可能性がある。
- (4) マイクログリアは、C3 や MFG-E8 で標識される特定のシナプスの選択的な除去をことから、睡眠中の記憶の固定 (memory consolidation) に関与している可能性がある。

**Auris Nasus Larynx** 2016, 44(1):58-64 DOI: 10.1016/j.anl.2016.04.002

#### 結論

- (1) マイクログリアは、入眠時に活性化し、シナプス貪食を行い、覚醒時には活性を落としてシナプス貪食を抑制する。その結果シナ

プス量は入眠時に少なく、覚醒時に多い日内変動が生じる。

- (2) 脳内ノルアドレナリン量の変動が、マイクログリアの機能形態の変動を生じさせる。
- (3) マイクログリアのシナプス貪食は、入眠と睡眠の持続を促す可能性がある。
- (4) マイクログリアは、C3 や MFG-E8 で標識される特定のシナプスの選択的な除去をことから、睡眠中の記憶の固定 (memory consolidation) に関与している可能性がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

#### 1. Facial paralysis induced by ear inoculation of herpes simplex virus in rat

*Takashi Fujiwara, Seiji Matsuda, Junya Tanaka, Naohito Hato*

**Auris Nasus Larynx** 2017, 44(1):58-64 DOI: 10.1016/j.anl.2016.04.002 (査読有)

#### 2. Elevated Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-1 expression enhances the metastatic collective migration of head and neck squamous cell carcinoma cells

*Tepei Kaminota, Hajime Yano, Kohei Shiota, Noriko Nomura, Haruna Yaguchi, Yui Kirino, Kentaro Ohara, Issei Tetsumura, Tomoyoshi Sanada, Toru Ugumori, Junya Tanaka, Naohito Hato*

#### **Biochemical and Biophysical Research**

**Communications** 486 (2017) 101-107

[http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.](http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.007)

2017.03.007 (査読有)

#### 3. The hypnotic bromovalerylurea ameliorates 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neuron loss while suppressing expression of interferon regulatory factors by microglia

*Hiromi Higaki, Mohammed Emamussalehin Choudhury, Chisato Kawamoto, Keisuke Miyamoto, Afsana Islam, Yurika Ishii, Kazuya Miyanishi, Haruna Takeda, Naoto Seo, Kana*

*Sugimoto, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano and Junya Tanaka*

**Neurochemistry International** 99 (2016) 158-168 DOI:10.1016/j.neuint.2016.06.013 ( 査読有 )

4. A truncated form of CD200 (CD200S) expressed on glioma cells prolonged survival in a rat glioma model by induction of a dendritic cell-like phenotype in tumor-associated macrophages

*Kana Kobayashi, Hajime Yano, Akihiro Umakoshi, Shirabe Matsumoto, Ayano Mise, Yu Funahashi, Yoshitomo Ueno, Yoshiaki Kamei, Yasutsugu Takada, Yoshiaki Kumon, Takanori Ohnishi, and Junya Tanaka\**

**Neoplasia** 18 (2016) 229-241, DOI:10.1016/j.neo.2016.02.006 ( 査読有 )

5. Blood vessels expressing CD90 in human and rat brain tumors

*Akihiro Inoue, Junya Tanaka, Hisaaki Takahashi, Shohei Kohno, Shiro Ohue, Akihiro Umakoshi, Katsuhiko Gotoh, Takanori Ohnishi*

**Neuropathology** 2016; 36, 168-180 DOI:10.1111/neup.12244 ( 査読有 )

6. Treadmill exercise ameliorates ischemia-induced brain edema while suppressing Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 expression

*Ryutaro Nishioka, Kana Sugimoto, Hitomi Aono, Ayano Mise, Mohammed E. Choudhury, Kazuya Miyaniishi, Afsana Islam, Takahiro Fujita, Haruna Takeda, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Junya Tanaka\**

**Experimental Neurology** 277 (2016) 150-161 DOI:10.1016/j.expneurol.2015.12.016 ( 査読有 )

7. Oct-3/4 promotes tumor angiogenesis through VEGF production in glioblastoma

*Hisaaki Takahashi, Akihiro Inoue, Yuya Kawabe, Yuki Hosokawa, Shinji Iwata, Kana Sugimoto, Hajime Yano, Daisuke Yamashita, Hironobu Harada, Shohei Kohno, Shiro Ohue, Takanori Ohnishi, Junya Tanaka*

**Brain Tumor Pathol** 32 (2015) 31-40 ( 査読有 )

8. CD200<sup>+</sup> and CD200<sup>-</sup> macrophages accumulated in ischemic lesions of rat brain: The two populations cannot be classified as either M1 or M2 macrophages.

*Shirabe Matsumoto, Junya Tanaka, Hajime Yano, Hisaaki Takahashi, Kana Sugimoto, Shiro Ohue, Akihiro Inoue, Hitomi Aono, Akari Kusakawa, Hideaki Watanabe, Yoshiaki Kumon, Takanori Ohnishi*

**J Neuroimmunol** 282 (2015) 7-20 ( 査読有 )

9. The ameliorative effects of a hypnotic bromvalerylurea in sepsis

*Satoshi Kikuchi, Tasuku Nishihara, Shun Kawasaki, Naoki Abe, Jun Kuwabara, Mohammed E. Choudhury, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Takumi Nagaro, Yuji Watanabe, Mayuki Aibiki, Junya Tanaka*

**Biochem Biophys Res Commun** 459 (2015) 319-326 DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.111 ( 査読有 )

10. Oct-3/4 modulates the drug-resistant phenotype of glioblastoma cells through expression of ATP binding cassette transporter G2

*Yuki Hosokawa, Hisaaki Takahashi, Akihiro Inoue, Yuya Kawabe, Yu Funahashi, Kenji Kameda, Kana Sugimoto, Hajime Yano, Hironobu Harada, Shohei Kohno, Shiro Ohue, Takanori Ohnishi, Junya Tanaka*

Biochim Biophys Acta - General Subjects 1850  
(2015) 1197–1205 DOI:  
10.1016/j.bbagen.2015.01.017 (査読有)

11. miR340 Suppresses the Stem-like Cell  
Function of Glioma-Initiating Cells by  
Targeting Tissue Plasminogen Activator  
*Daisuke Yamashita, Toru Kondo, Shiro Ohue,  
Hisaaki Takahashi, Madoka Ishikawa, Ryo  
Matoba, Satoshi Suehiro, Shohei Kohno,  
Hironobu Harada, Junya Tanaka, and  
Takanori Ohnishi*

**Cancer Res** 75 (2015) 1123-1133  
DOI:0.1158/0008-5472.CAN-14-0938 (査読  
有)

12. Anti-inflammatory effects of noradrenaline  
on LPS-treated microglial cells: suppression of  
NFkB nuclear translocation and subsequent  
STAT1 phosphorylation.  
*Yurika Ishii, Ayaka Yamaizumi, Ayu Kawakami,  
Afsana Islam, Mohammed E. Choudhury,  
Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Junya  
Tanaka*

**Neurochemistry International** 90 (2015)  
56-66 DOI: 10.1016/j.neuint.2015.07.010  
(査読有)

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 入眠時の正常成熟ラット脳におけるマイ  
クログリアのシナプス貪食  
Synaptic elimination by microglial cells  
in the normal mature rat brain during the  
onset period of sleep

森 菜都子、木上 侑香、秋山 順一、EM チ  
ョードリ、矢野 元、田中 潤也  
第94回日本生理学会大会  
アクトシティ浜松、静岡県浜松市  
2017年3月29日

2. 神経伝達物質によるミクログリアの機  
能制御：その生理と病理-学部学生の研究成  
果から得られたもの (招待講演)

田中 潤也

第17回ブレインサイエンス研究会  
休暇村志賀島、福岡県福岡市  
2015年6月6日

他 17 件

〔その他〕  
ホームページ等  
<https://hgyano.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
田中 潤也 (Tanaka, Junya)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：70217040