

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2017～2020  
課題番号：17H03988  
研究課題名(和文) マイクログリアによる脳温感知メカニズムの解明

研究課題名(英文) Brain temperature and microglia

研究代表者

小山 隆太 (Koyama, Ryuta)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授

研究者番号：90431890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳に存在する興奮性神経細胞と抑制性神経細胞は、それぞれ適切な密度のシナプスを形成し、機能的な神経回路を構成する。シナプスの興奮と抑制の構造的かつ機能的なバランスは正常な脳機能発揮に重要であり、その崩壊は様々な脳疾患につながる。そして、シナプスは脳内免疫細胞であるマイクログリアの貪食によって刈り込まれ、その密度が制御されているが、マイクログリアによるシナプス貪食がシナプス興奮抑制バランスの調節に関与するかは明らかではない。本研究では、熱性けいれんモデルマウスを用いて、マイクログリアによる抑制性シナプス特異的な貪食が、シナプス興奮抑制バランスの崩壊に繋がることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、シナプスの形成と維持のメカニズムに関して、活動の高いシナプスがシナプス競合を経て選別されることで神経回路に残存するといった一般的な概念とは異なり、活動の高いシナプスが除去されるという現象とそのメカニズムを明らかにした点で学術的な意義がある。また、マイクログリアによる抑制性シナプス特異的な貪食がてんかん原性の獲得におけるシナプス興奮抑制バランス崩壊の原因となることを示した。この結果は、これまでの神経細胞を標的としたてんかんの治療に、マイクログリアを標的とした治療という新たな視点を与える点で社会的な意義がある。

研究成果の概要(英文)：Microglial synaptic engulfment has been confirmed by histology; however, direct real-time evidence is lacking. We develop a novel in vitro system of neuron-glia cocultures in which microglia maintain highly ramified processes. Using the system, we examined how synaptic engulfment is controlled when the “eat-me” signal, complement C1q. C1q significantly increased synaptic engulfment when microglial surveillance was induced by elevated neuronal activity. To confirm our findings in vivo, we used a mouse model of febrile seizures in which microglia preferentially engulf inhibitory synapses, even though C1q are deposited on both excitatory and inhibitory synapses. We determined that sustained activity of inhibitory neurons after seizures induce the inhibitory synapse-specific engulfment. Thus, our findings suggest that complement-dependent synaptic engulfment is triggered and spatially controlled by neuronal activity.

研究分野：神経生物学

キーワード：マイクログリア 熱性けいれん シナプス 貪食 神経活動 てんかん原性 ライブイメージング 補体

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む動物は日常生活や病態時において体温上昇を経験するが、体温上昇という温度情報が脳機能に与える影響や脳疾患の発症に關与するメカニズムは未解明である。本研究の目的は、脳内の免疫担当細胞であるマイクログリアが、脳内温度の上昇という温度情報を感知して活性化し、その貪食能力を介して神経回路を変性させ、脳疾患発症に關与する可能性とそのメカニズムを解明することである。

脳内温度を上昇させる例として、熱性けいれんに着目して研究を遂行する。熱性けいれんは38以上の発熱によって引き起こされ、乳幼児期に最も頻繁に生じるけいれんである。そのため、熱性けいれんが将来の脳機能へ与える影響については強い関心が寄せられており、申請者もこの現象に關して実験科学的な立場から報告をおこなってきた。現在、この熱性けいれんがけいれん重積型急性脳症を誘導することに注目が集まっている。けいれん重積型急性脳症は日本人の小児に多く、国内で年間数百人の頻度で発生する。典型的な例では、熱性けいれん発症の数日後に二度目の遅発けいれんが生じ、これを引き金としておよそ60%の患者で知的障害、運動麻痺、そしててんかんなどの後遺症が残る。よって、遅発けいれんの阻止が治療のキーポイントとなるが、熱性けいれんが、熱性けいれん以降のけいれん閾値を低下させるメカニズムは未解明である。

遅発けいれんの発生は、熱性けいれん後に神経回路のシナプス興奮/抑制バランスが崩れ、興奮性が優位になったことを示唆する。近年、シナプスの数は、マイクログリアによるシナプス貪食によって制御されることが示された (Schafer, Lehrman, Kautzman, Koyama, et al. *Neuron*. 74:691-705, 2012)。しかしながら、脳疾患発症におけるシナプス興奮/抑制バランスの破綻にマイクログリアによるシナプス貪食が關与する可能性やそのメカニズムは未解明である。

そこで、本研究では、熱性けいれんの発作焦点となる海馬神経回路において、熱刺激がマイクログリアによるシナプス貪食を誘導した結果、シナプス興奮/抑制バランスを破綻させ、遅発けいれんを誘導するとの仮説を検証する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、脳内免疫細胞であるマイクログリアが脳内温度を感知する能力を有する可能性とそのメカニズムを明らかにすることである。また、脳温変化を感知して活性化したマイクログリアが、免疫細胞としての貪食能力を利用して神経回路を変性させる可能性と、その脳機能への影響を問う。この問いに答えるための実験系として、熱性けいれんモデルマウスを利用し、熱性けいれん時の脳温上昇と、これに引き続く遅発性けいれんに着目する。具体的には、脳温変化という熱刺激によって活性化したマイクログリアが、シナプスを貪食することでシナプス興奮/抑制バランスを破綻させる可能性を検証する。

## 3. 研究の方法

新規に確立したグリア共培養系を用いて、マイクログリアによるシナプス貪食のライブイメージングを行った。同系を利用して、シナプス貪食における補体と神経活動の關与を検証した。生後初期マウスに高温処置をすることにより、マウスに熱性けいれんを誘導した。免疫染色法によってマイクログリアによるシナプス貪食を検証した。

## 4. 研究成果

マイクログリアによるシナプス貪食をリアルタイムで詳細に観察するため、培養系を利用した。従来の培養方法では、マイクログリアは過剰に活性化した形態を示し、生体脳で見られる細長く分岐した突起を失うため、シナプス貪食の検証には不適切であった。そこで、マイクログリアを脳内他種細胞と共培養し、培養条件を詳細に検討することで、生体脳に近い環境を構築した。その結果、生体脳マイクログリアの形態を培養環境において再現することに成功した。この共培養系において、マイクログリア、プレシナプス、神経細胞膜をそれぞれ緑、赤、近赤外の蛍光で標識し、三者の同時ライブイメージングを可能にした。そして、マイクログリアが生きた神経細胞の突起構造を切断することなく、シナプスを貪食する一連の過程を捉えることを明らかにした。

発達脳では、古典的補体経路がシナプス貪食を促進する。古典的補体経路開始の一部を担う補体分子C1qはeat-me signalと呼ばれ、マイクログリアが貪食するシナプスを選別する際の目印となる可能性がある。そこで、共培養系にC1qサブユニットA (C1qA) のリコンビナントタンパク質を添加し、シナプス貪食が促進される可能性を検証した。その結果、単位時間あたりのシナプス貪食数はコントロール群とC1qA添加群とで同程度であり、シナプス貪食の促進には別の

因子が必要であることが示唆された (図 2 C)。神経活動が上昇すると、マイクログリアの突起の運動性は上昇する。そこで、神経活動の上昇により、マイクログリアがシナプスに付着した補体を認識しやすくなる可能性を考えた。共培養系において神経活動を上昇させるため、アデノ随伴ウイルスを用いて神経細胞に興奮性の DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug) を発現させた。DREADD のリガンドである CNO を添加して神経活動を上昇させたところ、マイクログリアによる神経細胞への接触が増加し、神経活動の上昇がマイクログリア・神経細胞相互作用を促進することが示された。次に、C1qA 添加と神経活動上昇を組み合わせ、シナプス貪食のライブイメージングを行った。すると、神経活動を上昇させた群でのみ、C1qA によってシナプス貪食数が有意に増加した。以上より、補体経路と神経活動が協調的に働くことで、シナプス貪食が促進されることが示された。

共培養系で発見したシナプス貪食メカニズムを *in vivo* で検証するため、海馬の神経活動上昇を伴う熱性けいれん (Febrile seizure; FS) のモデルマウスを用いた。まず、最初期遺伝子である c-Fos を神経活動マーカーとして、FS 後の神経活動変化を解析した。その結果、歯状回門に存在する抑制性神経細胞における c-Fos の発現が FS の 1 時間後には有意に上昇し、少なくとも 4 時間後まで維持された。この結果から、FS 後に抑制性神経細胞が持続的に活性化することが示唆された。歯状回門の抑制性神経細胞は分子層にシナプスを形成する。そこで、FS 後の分子層に焦点を当て、マイクログリアと抑制性シナプスの相互作用を検証した。マイクログリアによる抑制性プレシナプスの貪食量を定量すると、FS の 6 時間後に有意に増加した。そして、FS の 24 時間後には、分子層における抑制性シナプス量が減少した。一方で、興奮性プレシナプスに関しては、マイクログリアによるシナプス貪食量およびシナプス量が FS によって変化しなかった。これらの結果から、FS 後にマイクログリアは抑制性プレシナプスを特異的に貪食することが示された。

FS 後の抑制性プレシナプスの貪食に補体経路が関与する可能性を検証した。FS の 6 時間後には、分子層において C1q の発現が上昇し、抑制性プレシナプスとの共局在量も増加した。また、FS の 1 時間後にはマイクログリアが有する補体受容体 CR3 の mRNA 量が上昇した。そして、CR3 KO マウスでは FS による抑制性シナプス貪食の促進が阻害された。以上から、FS 後にマイクログリアによる補体経路依存的なシナプス貪食が促進されることが示された。しかし、C1q 共局在量は興奮性シナプスでも増加した。それにも拘わらず、抑制性シナプスが特異的に貪食された理由として、各現象のタイミングから以下の様に考察した。即ち、抑制性シナプス貪食が増加した FS の 6 時間後において、抑制性神経細胞の活動上昇、C1q によるタグ付け、補体受容体上昇のタイミングが一致したため、抑制性シナプスに誘引されたマイクログリアが C1q を認識してシナプスを貪食した可能性がある。

マイクログリアによる補体依存的なシナプス貪食が神経活動による時空間的制御を受けることを発見した。活動の高いシナプスがマイクログリアによって貪食されるという結果は、発達期においてマイクログリアが活動の弱いシナプスを優先的に貪食するという先行研究と一致しない。しかし、過活動したシナプスの貪食は神経回路のホメオスタシス維持に重要であると考えられる。補体経路と神経活動が協調的に働く分子メカニズムの解明は神経回路形成メカニズムにとどまらずシナプス変性を伴う疾患の新規治療ターゲットの発見につながる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Koyama Ryuta, Andoh Megumi	4. 巻 15
2. 論文標題 Exercise, microglia, and beyond - workout to communicate with microglia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neural Regeneration Research	6. 最初と最後の頁 2029 ~ 2029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1673-5374.282241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ogaki Ari, Ikegaya Yuji, Koyama Ryuta	4. 巻 11
2. 論文標題 Vascular Abnormalities and the Role of Vascular Endothelial Growth Factor in the Epileptic Brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2020.00020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Andoh Megumi, Ikegaya Yuji, Koyama Ryuta	4. 巻 8
2. 論文標題 Synaptic Pruning by Microglia in Epilepsy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 2170 ~ 2170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8122170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Araki Tasuku, Ikegaya Yuji, Koyama Ryuta	4. 巻 40
2. 論文標題 Microglia attenuate the kainic acid induced death of hippocampal neurons in slice cultures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 85 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/npr2.12086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Andoh Megumi, Ikegaya Yuji, Koyama Ryuta	4. 巻 167
2. 論文標題 Microglia as possible therapeutic targets for autism spectrum disorders	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Prog Mol Biol Transl Sci	6. 最初と最後の頁 223 ~ 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.pmbts.2019.06.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kono Rena, Kim Gyu Li, Nagata Hidetaka, Ikegaya Yuji, Koyama Ryuta	4. 巻 39
2. 論文標題 Induced neuronal activity does not attenuate amyloid beta induced synaptic loss in vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 306 ~ 311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/npr2.12074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Andoh Megumi, Shibata Kazuki, Okamoto Kazuki, Onodera Junya, Morishita Kohei, Miura Yuki, Ikegaya Yuji, Koyama Ryuta	4. 巻 27
2. 論文標題 Exercise Reverses Behavioral and Synaptic Abnormalities after Maternal Inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2817 ~ 2825.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.05.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hoshi Yutaka, Okabe Kohki, Shibasaki Koji, Funatsu Takashi, Matsuki Norio, Ikegaya Yuji, Koyama Ryuta	4. 巻 38
2. 論文標題 Ischemic Brain Injury Leads to Brain Edema via Hyperthermia-Induced TRPV4 Activation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 5700 ~ 5709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2888-17.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiragi T, Ikegaya Y, Koyama R.	4. 巻 7
2. 論文標題 Microglia after Seizures and in Epilepsy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 E26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells7040026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Ryuta Koyama
2. 発表標題 Synapse pruning by microglia in epileptogenesis.
3. 学会等名 6th Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP) Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuta Koyama
2. 発表標題 Microglia attenuate the function of inhibitory synapses in epileptogenesis.
3. 学会等名 XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, GLIA 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山隆太
2. 発表標題 グリア間ネットワークによる脳内アラートシステムの形成
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山隆太
2. 発表標題 シナプス除去におけるグリア・神経相互作用
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山隆太、池谷裕二
2. 発表標題 マイクログリアとシナプスの相互作用による脳機能の修飾
3. 学会等名 第140回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山隆太
2. 発表標題 情報送受信者としてのマイクログリア機能の解明とiCellの利用
3. 学会等名 iCellユーザーミーティング2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小山隆太
2. 発表標題 てんかん脳のシナプスE/Iバランス破綻におけるマイクログリアの関与
3. 学会等名 Epilepsy Forum 2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小山隆太
2. 発表標題 脳内免疫細胞マイクログリアによる神経回路の再編成
3. 学会等名 第七回お茶の水サイエンス倶楽部（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小山隆太
2. 発表標題 てんかん脳におけるマイクログリアの役割
3. 学会等名 第20回日本分子脳神経外科学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryuta Koyama
2. 発表標題 Microglia prune synapses to modulate brain function
3. 学会等名 The 10th International Society of Radiation Neurobiology Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryuta Koyama
2. 発表標題 Modulation of memory by optogenetically manipulating astrocytic cAMP
3. 学会等名 The eighteenth conference of peace through mind/brain science（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Andoh M, Koyama R, Ikegaya Y.
2. 発表標題 Live imaging of synapse engulfment by microglia in vitro.
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koyama R, Ikegaya Y.
2. 発表標題 Brain hyperthermia stimulates microglia to engulf inhibitory synapses after seizures.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Andoh M, Koyama R, Ikegaya Y.
2. 発表標題 Real-time imaging of synapse remodeling by microglia.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Andoh M, Koyama R, Ikegaya Y.
2. 発表標題 Real-time imaging of activity-driven synapse-microglia interaction in vitro.
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koyama R
2. 発表標題 Neuronal activity-dependent synaptic pruning by microglia.
3. 学会等名 FAOPS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koyama R, Ikegaya Y
2. 発表標題 Brain hyperthermia activates microglia to engulf inhibitory synapses in epilepsy.
3. 学会等名 Microglia 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小山隆太、池谷裕二
2. 発表標題 マイクログリアによるシナプスE/Iバランスの破綻とてんかん原性の獲得
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小山隆太
2. 発表標題 てんかんにおけるマイクログリア病態
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小山隆太、池谷裕二
2. 発表標題 マイクログリアによるシナプスE/Iバランスの破綻
3. 学会等名 第39回神経組織培養研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小山隆太、池谷裕二
2. 発表標題 てんかんとマイクログリア
3. 学会等名 第19回応用薬理シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小山隆太、池谷裕二
2. 発表標題 脳疾患の分子病態におけるニューロン・グリア相関
3. 学会等名 第59回日本神経化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小山隆太
2. 発表標題 マイクログリアによる脳内温度情報の感知と神経回路再編成
3. 学会等名 温度生物学の展開（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------