

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16731

研究課題名(和文) ミクログリアに発現する温度感受性分子の探索と同定

研究課題名(英文) Identification of thermosensitive molecules involved in microglia movement

研究代表者

西本 れい(Nishimoto, Rei)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60789585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ミクログリアは、中枢神経系における免疫担当細胞で、中枢神経系の恒常性を保つ働きを担う。ミクログリアの異常は、てんかんなどの神経異常行動や精神異常を引き起こすことがわかってきた。本研究は、ミクログリアが温度によってその動きが制御されること、および温度感受性イオンチャンネルTRPV4がその制御に関わることを明らかにし、イオンチャンネルを介した細胞の温度による機能制御という新しい概念を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温度を感じるイオンチャンネルが存在することの生理学的意義について、未だ全てが解明されてはいない。この研究では、中枢神経系の恒常性を担うミクログリアという細胞は、温度感受性イオンチャンネルTRPV4を介して温度を感じて動きを変化させることを明らかにした。すなわち、ミクログリア細胞の機能維持には温度感受性イオンチャンネルTRPV4が必要であることがわかった。ミクログリアは神経活動を制御することから、ミクログリアの機能保持とそれによる神経保護を目的とした創薬分野の開拓に寄与できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Microglia maintain central nervous system homeostasis by monitoring changes in their environment. Microglial dysfunction including abnormality in microglia movement could cause neural network failure. In this study, we found that mouse microglia exhibit temperature-dependent movement in vitro and in vivo that is mediated by TRPV4 channels within the physiological range of body temperature. Our findings may provide a new basis for future research into the potential clinical application of temperature regulation to preserve cell function via manipulation of ion channel activity.

研究分野：麻酔科学、生理学

キーワード：ミクログリア イオンチャンネル

1. 研究開始当初の背景

低体温療法は、心肺蘇生後患者の蘇生後脳症に対する脳神経保護を目的とした治療法であり、神経学的予後を改善する(Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group *N Engl J Med* 2002, Choi HA *et al Nat Rev Neurol* 2012)。その実際は、心拍再開後できるだけ早く中等度低体温(34°C)を確立し、24時間維持する。なぜ急性期の24時間の低体温が慢性期の神経学的予後を改善するのか、そのメカニズムはいまだにわかっていない。申請者は、蘇生後脳症の病態生理に中枢神経系の免疫担当細胞ミクログリアが関与するという報告から、ミクログリアに温度に反応する性質や分子が備わっているのではないかと考えた(Yenari MA *et al Nat Rev Neurosci* 2012)。

申請者の予備実験から、単離培養ミクログリアの動きは熱刺激によってすぐさま活発になることを発見していた(ミクログリアの動きの温度依存性)。そこで、温度感受性イオンチャネルの発現を網羅的に解析し、温度感受性 Transient receptor potential (TRP) channel のうち、TRPM2、TRPM4、TRPV4 を候補として見出していた。申請者は、ミクログリアに発現するこれらの温度感受性 TRP チャンネルがどのようにミクログリアの温度依存的な機能に関与するか解析することを本研究の目的とした。

TRPM2 と TRPV4 については、ミクログリアでの機能的発現は既に報告があり、それぞれの遺伝子欠損マウスが入手可能であった。TRPM4 はミクログリアでの機能解析は報告されておらず、また遺伝子欠損マウスは国内では入手不可能であった。

2. 研究の目的

ミクログリアの動きの温度依存性について、その責任分子を明らかにする。候補分子として温度感受性 TRP チャンネルの TRPM2、TRPM4、TRPV4 を見出していたことから、これらの分子の機能解析と個体レベルでの検討を行うことで、候補分子がミクログリアの温度依存性にどのように関与するか、明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) in vitro における細胞運動解析

マウス初代培養ミクログリアを対象に、TRPM2、TRPM4、TRPV4 の活性化剤や阻害剤を併用した電気生理学的手法(パッチクランプ法、カルシウムイメージング法)を用いた熱応答解析を行い、TRP チャンネルの機能的発現を確認する。また、温度制御可能なタイムラプスシステムを構築し、細胞運動を観察する。

2) Iba-1(ミクログリア特異的タンパク)-EGFP マウスを用いた in vivo imaging

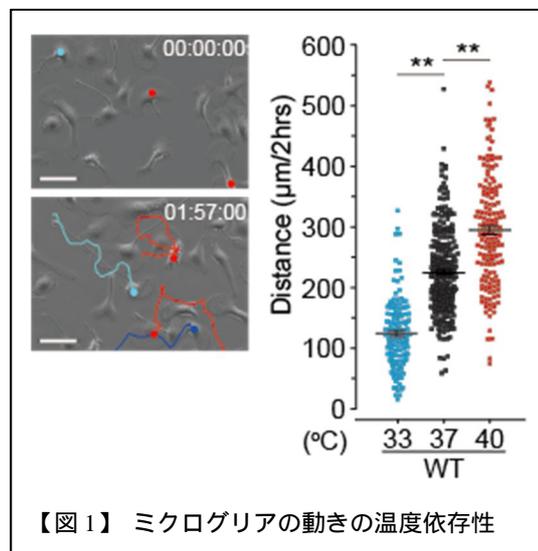
2光子励起顕微鏡および Iba-1-EGFP マウスを用いて、生きたマウスのミクログリアについて、温度に反応するのか、そしてその性質について TRP チャンネルが関与するのかどうか、検討を行う。マウス中枢神経温を制御しながらイメージングを行うためのシステムを構築する。

3) TRPM4 遺伝子欠損マウスの作成

TRPM4 遺伝子欠損マウスが国内で入手できないことから、RNA 干渉法による遺伝子ノックダウンおよび TRPM4 遺伝子欠損マウスの作成を行う。

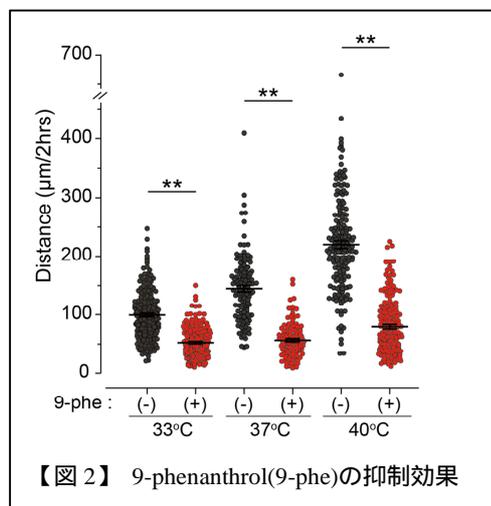
4. 研究成果

単離ミクログリアの動きには温度依存性があることを見出し(図1)、関連分子として温度感受性 TRP チャンネルの TRPM2、TRPM4、TRPV4 が候補となった。TRPM4 については遺伝子欠損マウスが国内で得られず、TRPM4 阻害剤である 9-phenanthrol を用いた薬理的解析を行い、9-phenanthrol 投与によってミクログリアの動きが制限される結果を得た(図2)。この薬剤の特異性を調べるため、パッチクランプ法によって TRPM2 および TRPV4 発現 HEK293T 細胞を対象に活性化への影響を検討したところ、9-phenanthrol はこれらも阻害することがわかった(図3)。TRPM4 に関して、ミクログリアでの RNA 干渉法を用いた遺伝子ノックダウンを

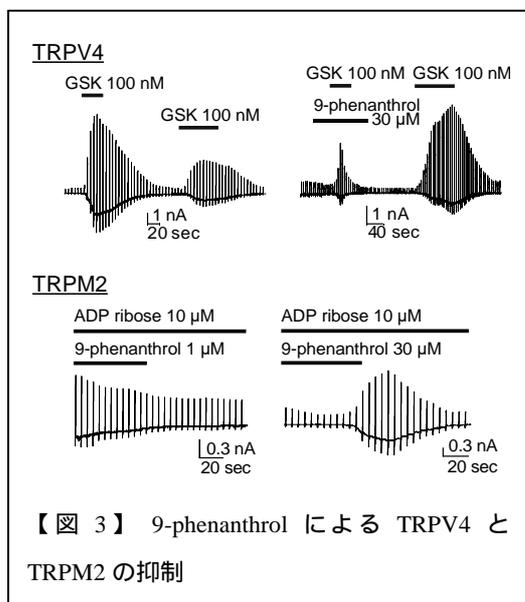


試みたが、細胞運動解析に適さなかったため、CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子欠損マウスを作成した (Cong *et al.* Science 2013)。遺伝子発現の確認を行っていたが、研究期間終了までに確認実験が終了しなかった。

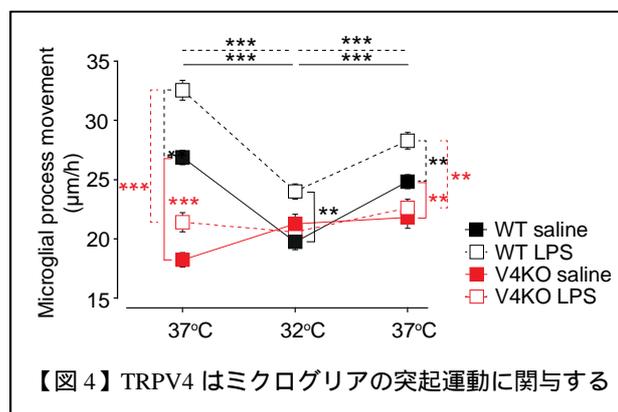
Iba-1-EGFP 発現 TRPM2 および TRPV4 遺伝子欠損マウス (M2KO、V4KO) を作成し、Iba-1-EGFP マウス (WT) をコントロールとして *in vivo* imaging を行ったところ、WT ミクログリアの突起の動きに温度依存性があることがわかった。この温度依存性は、M2KO では保たれていたが、V4KO では消失していた。炎症状態を模倣した LPS 腹腔内投与モデルを作成して観察したところ、WT では突起の運動性が高まったが、V4KO ミクログリアでは温度依存性は見られなかった (図 4)。また、*in vitro* imaging にて TRPV4 活性化剤の GSK1016790A (GSK) を投与すると、ミクログリアの細胞の移動距離が長くなった。以上から、生きたマウスにおいても、ミクログリアには温度依存的な機能があり、それには TRPV4 が関与する結果が得られた。以上について論文にまとめ、発表した (Nishimoto and Derouiche *et al.* PNAS 2021、5. 主な発表論文等)。



【図 2】 9-phenanthrol(9-phe)の抑制効果



【図 3】 9-phenanthrol による TRPV4 と TRPM2 の抑制



【図 4】 TRPV4 はミクログリアの突起運動に関与する

今回の研究において、1) ミクログリアの動きは温度依存性があること、2) ミクログリアの動きの温度依存性には TRPV4 の活性化が関与していることがわかった。すなわち、ミクログリアの運動性は少なくとも、1) 温度と 2) TRPV4 活性の 2 つの要素で制御されることがわかった。当初検討する予定であった TRPM4 の機能解析について、遺伝子欠損マウスの遺伝子発現の確認実験を終えたあとに開始する予定である。TRPM4 も細胞運動に関与することが他の細胞種で報告されており、TRPV4 の活性化の下流で関与する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishimoto Rei, Derouiche Sandra, Eto Kei, Deveci Aykut, Kashio Makiko, Kimori Yoshitaka, Matsuoka Yoshikazu, Morimatsu Hiroshi, Nabekura Junichi, Tominaga Makoto	4. 巻 118
2. 論文標題 Thermosensitive TRPV4 channels mediate temperature-dependent microglia movement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2012894118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2012894118	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Rei Nishimoto, Sandra Derouiche, Makiko Kashio, Yoshikazu Matsuoka, Hiroshi Morimatsu, Makoto Tominaga
2. 発表標題 Microglia Movement is Temperature-dependent
3. 学会等名 2019 Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sandra Derouiche, Rei Nishimoto, Kei Eto, Makoto Tominaga
2. 発表標題 Involvement of thermosensitive TRP channels in temperature-dependent microglia movement
3. 学会等名 9th of Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies in conjunction with the 96th annual meeting of the Physiological Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西本れい、デルーチ サンドラ、富永真琴
2. 発表標題 ミクログリアの動きは温度依存的である
3. 学会等名 第64回日本麻酔科学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 デルーチ サンドラ、西本れい、富永真琴
2. 発表標題 Involvement of thermosensitive TRP channels in temperature-dependent microglia movement.
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>プレスリリース</p> <p>1) 「脳の免疫細胞ミクログリアが温度を感じて動くメカニズムを解明」 https://www.nips.ac.jp/release/2021/04/post_437.html</p> <p>2) 「脳の免疫細胞ミクログリアが温度を感じて動くメカニズムを解明」 http://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id821.html</p>
--

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
研究協力者	富永 真琴 (Tominaga Makoto) (90260041)		

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
---------	---------