

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14402

研究課題名（和文）ミクログリア 神経相互作用によるストレス応答機構の解明と食品成分による制御

研究課題名（英文）Microglia-neuron interaction in stress response and its regulation by food components

研究代表者

板倉 正典（Itakura, Masanori）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：70803162

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：うつ病の発症において、活性酸素種の産生や脳内炎症の関与が示唆されているがその詳細なメカニズムは不明である。本研究ではうつ病発症機構の解明を目的に、ミクログリア-神経細胞相互作用に焦点を当て、ストレス応答性分子である解糖系酵素GAPDHの動態を解析した。その結果、短期ストレス（尾懸垂ストレス）負荷により、マウス脳内ミクログリアにおけるGAPDH量の増加が認められた。さらに共培養実験の結果、ATP刺激によりミクログリア内GAPDH量の増加と神経細胞からのGAPDH放出が観察され、ストレス応答におけるGAPDH細胞種間輸送の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うつ病に代表される精神疾患患者数は年々増加しており、発症メカニズムの解明と予防法の確立は急務とされている。これまでにうつ病と脳内炎症（ミクログリアの異常活性化）の関連性が報告されているものの、抗炎症薬によりうつ様症状が悪化するなど、その発症メカニズムの複雑さが示されている。本研究結果からミクログリア-神経相互作用を介した新たなストレス応答機構の可能性が示されたことは、精神疾患の複雑な発症メカニズムの一端を明らかにするとともに、治療・予防における新規治療戦略につながる可能性があり、本研究の社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The involvement of reactive oxygen species and brain inflammation in depression was reported, however, the detailed mechanism remains to be elucidated. In this study, we analyzed the protein dynamics of GAPDH, a glycolytic enzyme, especially focusing on microglia-neuron interaction. First, we found out the upregulation of microglial GAPDH in the mice subjected to short-term stress (tail suspension stress). Next, we conducted a co-culture experiment and revealed ATP-induced upregulation of microglial GAPDH and GAPDH release from neurons. These results indicated the possibility of intercellular transport of GAPDH in stress response.

研究分野：食品科学

キーワード：ミクログリア GAPDH ストレス応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) うつ病で医療機関にかかっている国内患者数は、平成 26 年には 110 万人を超え、さらにその 3 倍以上の未受診うつ病患者が存在すると推定されている。うつ病の発症において、精神的・物理的・化学的ストレスによる神経細胞の機能異常に加え、脳内免疫担当細胞であるミクログリアの関与に注目が集まっている。一方で、ミクログリアの活性化および不活化のどちらもがうつ病発症を惹起することが報告されているなど(引用文献) ストレス暴露時におけるミクログリア 神経細胞間シグナルの詳細は明らかでない。また、野菜や果物、魚類を多く食べるなどの食生活の改善によって、うつ病発症のリスクが低下することが報告されているが、その分子機構には不明な点が多く残されている。

(2) 解糖系酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) はその多機能性が報告されており、酸化修飾依存的な核移行や繊維状凝集体形成を介した神経細胞死を引き起こし、神経変性疾患の発症に関与することが報告されている。さらに近年ではうつ病などの精神疾患と神経細胞内 GAPDH の関連性が報告されているが(引用文献) ストレス暴露時におけるミクログリア-神経細胞間における GAPDH 動態については不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究は、発症機序が未解明であるうつ病をターゲットとして、ミクログリア 神経相互作用に着目したストレス応答機構を解明するとともに、食品成分によるストレス応答制御法の確立を目指すものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) ストレス負荷マウスにおける脳内 GAPDH の局在解析

拘束水浸ストレス：雄性 ddY マウスを空気孔を開けた 50 ml チューブに挿入・拘束し、水温 22 の恒温槽に浸し(3 時間/日、7 日間) 拘束水浸ストレスを負荷した。ストレス負荷最終日の翌日にマウスの灌流固定および採材を行った。

尾懸垂ストレス：雄性 ddY マウスを床上 20 cm の位置で尾端をテープで固定し、10 分間懸垂した(尾懸垂ストレス)。20 分後にマウスの灌流固定および採材を行った。

③GAPDH の脳内局在解析：採材した脳から凍結切片を作製し、GAPDH 抗体および各種細胞マーカーで免疫組織染色を行い、共焦点顕微鏡でそれらの局在および蛍光強度を解析した。

#### (2) 株化ミクログリアおよび神経細胞を用いた GAPDH 動態解析

マウスミクログリア細胞株 (BV2) およびマウス神経細胞株 (Neuro2a)を単培養もしくは共培養し、各種ストレス関連物質 (ATP、LPS、L-グルタミン酸)を処置した。30 分後に細胞を回収、固定、膜透過処理を行ったのちに抗 CD11b 抗体および抗 GAPDH 抗体を用いて染色を行い、フローサイトメーターで解析を行った。また GAPDH mRNA 量をリアルタイム PCR 法で測定した。

#### (3) 神経細胞からの GAPDH 分泌の解析

マウス神経細胞株 (Neuro2a)に ATP 処置を行い、30 分後の培養上清を回収し、限外ろ過法によりタンパク質を濃縮したのちにウエスタンブロット法により GAPDH 量の測定を行った。

#### (4) 食品成分による GAPDH 動態への影響評価

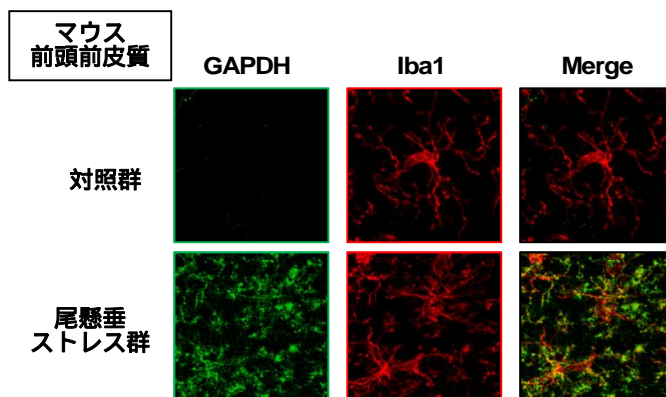
マウス神経細胞株 (Neuro2a)にポリフェノール(ケルセチン、エピガロカテキンガレート)を処置した 24 時間後に ATP で刺激を行い、30 分後の培養上清中の GAPDH 量をウエスタンブロット法により評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) ストレス負荷マウスにおける脳内 GAPDH の局在解析

慢性的な拘束水浸ストレスを負荷したマウスにおいて、脳内(特に前頭前皮質および海馬領域)

における GAPDH 量の増加が観察され、それらはミクログリア(Iba1 陽性細胞)で顕著であった。さらに興味深いことに、拘束水浸ストレスによるうつ病様態の確認の為実施していた尾懸垂試験を行うことで、拘束水浸ストレスを負荷していない対照群のマウスにおいてもミクログリア内 GAPDH 量が増加することが明らかとなった。以上の結果より、ミクログリア内 GAPDH 量増加は、短期的な尾懸垂ストレスによっても誘導されることが明らかとなった(図 1)。



## (2) 株化ミクログリアおよび神経細胞を用いた GAPDH 動態解析

ミクログリア細胞株および神経細胞株の共培養系を用いて、ストレス関連物質 (ATP、LPS、L-グルタミン) を処置した。その結果、細胞死を誘導しない濃度の 1 mM ATP 処置によりミクログリア内 GAPDH 量の有意な増加が認められた。一方で神経細胞株においては GAPDH 量の増加は認められなかった。

次に単培養系を用いて同様の実験を行なったところ、ミクログリアだけでなく、神経細胞においても GAPDH 量の有意な増加が認められた。GAPDH mRNA 量はミクログリア、神経細胞ともに ATP 刺激により増加が認められた。

## (3) 神経細胞からの GAPDH 分泌の解析

神経細胞株培養上清中の GAPDH 量を解析した結果、無処置群と比較して、30 分間の ATP 処置により培養上清中 GAPDH 量の有意な増加が認められた。

## (4) 食品成分による GAPDH 動態への影響評価

ポリフェノール類 (ケルセチンおよびエピガロカテキンガレート) を前処置した神経細胞株を用いて GAPDH 分泌量を測定した結果、ポリフェノール類の添加によって ATP 誘導性 GAPDH 分泌量への影響は認められなかった。

本研究の *in vivo* 解析の結果、研究開始当初には予期していない短期的なストレス負荷によって、マウスミクログリア内における GAPDH 量増加が誘導されることが明らかとなった。さらに培養細胞を用いた *in vitro* 解析の結果、ATP 刺激によって神経細胞からの GAPDH 分泌が誘導されることが明らかとなり、ミクログリア-神経相互作用のタンパク質輸送を介したストレス応答機構の存在が示唆された。

## < 引用文献 >

Yirmiya, Raz, Neta Rimmerman, and Ronen Reshef. "Depression as a microglial disease." *Trends in neurosciences* 38.10 (2015): 637-658.

Harrasz, Maged M., et al. "Antidepressant action of ketamine via mTOR is mediated by inhibition of nitrenergic Rheb degradation." *Molecular psychiatry* 21.3 (2016): 313-319.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----