

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14825

研究課題名(和文) 脳内免疫細胞の力学知覚による神経回路制御機構の探索

研究課題名(英文) Neuronal circuit regulation by the microglial mechanosensitivity

研究代表者

堀内 浩(Horiuchi, Hiroshi)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・特任助教

研究者番号：60760733

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)：脳内免疫細胞であるミクログリアは、複雑に分岐した突起を活発に動かし、周辺環境に接触しながら脳細胞の活動状態を監視・調節している。ミクログリアは様々な物理的環境変化に常に曝されているが、ミクログリアの物理刺激受容機構やその機能はわかっていない。そこで本研究ではミクログリアの活動パターンを視覚化することによって明らかにし、機械受容体を介した活動の様子を捉えた。さらに機械受容体を欠損させた個体動物を作成し、形態・動態の変容を捉えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では細胞の活動指標であるCa濃度の変化を可視化することによって、ミクログリアの活動様式を明らかにした。さらにこれを用いることで、ミクログリアが物理的刺激や機械受容体を介してどのように応答しているかを明らかにした。今後同受容体の機能制御によって、ミクログリアの活動変化やそれを介した生体機能への影響を見出し、ミクログリアの力学知覚とそれを介した生理機能を明らかにすることができれば、未知の生理機能の発見や物理信号を治療標的とした新たな治療戦略の構築へと結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Microglia are the main immune effector cells in the central nervous system (CNS) in the brain, actively motile their processes and monitor the brain status by contacting various cells. However, it has been unknown how microglia response to the mechanical stimulation. In this study, we visualized microglial functional activity using two-photon Ca imaging, revealed their response to the stimulation of the receptor. To investigate the physiological function, we generated microglia specific mechano-receptor deficient mice, investigated change of their process activity.

研究分野：神経生理学

キーワード：ミクログリア 力学知覚 神経回路

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ミクログリアは脳内唯一の免疫細胞であり、脳内では細胞同士が互いに重なることなく均等に配置されて、その多数の突起をテリトリ内に伸ばしている。近年の 2 光子励起顕微鏡による生体内イメージングにより、ミクログリアの突起の動態ダイナミクスが明らかになってきた (Nimmerjahn et al, 2005)。驚くべきことに、ミクログリアの突起は微細血管や神経細胞などに対して、伸展、接触による停止、その後退縮を頻回に繰り返していることが判明し、テリトリ内の微細構造を接触監視していることが示唆された。多種多様な脳内微細構造物に対しても、伸展・接触を経て退縮へ運動モードの変化が認められるため、機械的な圧力などの共通した運動モードの変換メカニズムが存在することが示唆される。ミクログリアの神経回路に対する作用として、ミクログリアがシナプスに接触することで神経活動を監視していることが示された (Wake et al, 2009)。発達期において視覚入力遮断はミクログリアの機能抑制によってミクログリアがシナプスを取り囲む様子 (Tremblay et al, 2010) や未熟なシナプスが増加することが示された (Paolicelli et al, 2011)。さらに、ミクログリアは樹状突起に接触し、フィロポディアを構築することが明らかとなった (Miyamoto et al, 2016)。ミクログリアの欠損は神経回路編成効率の低下を伴った運動学習の顕著な低下を示す (Parkhurst et al, 2013)。したがって、ミクログリアのシナプス再編によって神経回路の恒常性を維持するためには、シナプス接触を認識し、シナプスの要・不要を決定する必要がある。しかしながら、これまでにシナプス接触時のミクログリア-シナプス間の分子基盤は明らかになっていない。さらに、これまでにミクログリアが神経細胞から放出されるグルタミン酸や ATP などの化学シグナルの濃度勾配によってその基盤を説明することが試みられているが、これはミクログリアの突起の動きに規則性が認められないことと矛盾する。したがって、これまでと全く異なる視点からそれを解明する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ミクログリアの神経回路再編の分子基盤を力学知覚の観点から明らかにすることである。ミクログリア単離培養において、底面の硬さによって形態および活性化状態が変化することが示されている (Moshayedi et al, 2014)。したがって、力学知覚は脳内においても例外なく重要であることが示されてきたが、ミクログリアにおける力学知覚を担う分子は明らかになっておらず、生体ミクログリアにおける力学応答の必要性および神経回路恒常性にどのように機能しているかは示されていない。そこで、生体 2 光子イメージングによってミクログリアの活動や力学知覚の責任分子を機能破壊した場合のミクログリアの活動変化とそれに伴う形態・動態変化を捉えることによって、ミクログリアの物理的環境の識別機構と生体機能への寄与を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

まず、ミクログリア特異的にカルシウム感受性蛍光タンパク質を発現させ、2光子カルシウムイメージングによって、ミクログリアの活動パターンを明らかにする。この時、イベントを個々に捉える解析法を適用することで、イベントの発生位置や活動パターンなどを定量的に解析する。従来の関心領域を用いた解析法も合わせて用いる。さらに、ミクログリアにおける機械刺激受容機構として、機械受容チャネルPiezo1に着目する。Piezo1 選択的作動薬 Yoda1 を投与し、それに対する Ca 応答を観察することによって、ミクログリアがPiezo1 を介して機械刺激を受容し、それに対してどのような活動パターンを示すかを検証する。

ミクログリアがどのような機械刺激に対して応答するかを明らかにするため、まずは環境の硬さに注目する。硬さの異なる外部環境をハイドロゲルの混合率の違いによって構築し、ミクログリアを培養することで、形態的あるいは動的な違いを明らかにする。また、分子生物学的なアプローチによって物理的環境の違いによる遺伝子発現の差異を検出する。

Piezo1 を欠損させた個体動物を作成し、2光子顕微鏡によって、形態動的な観点から、ミクログリアにおける力学知覚の機能を明らかにする。

#### 4 . 研究成果

ミクログリアの生体 Ca<sup>2+</sup>イメージングを行い、一つ一つの活動イベントを個別に抽出・定量することで、ミクログリアの Ca<sup>2+</sup>活動のほとんどが突起を起源とすることを見出した。ミクログリアの機能活動にはその場に留まる静的な活動と方向性をもって拡散する動的な活動が存在することを見出した。さらに、突起を起源とする動的なイベントの拡散方向を定量的に算出することで、情報伝達の方向性、速度、範囲を定量的に読み出すことに成功した。興味深いことに、分岐点において精密に情報伝達が制御されている所見を得た。さらに、関心領域ベースの解析を行うことによって、突起遠位部において活動変化率が高いことを見出した。さらに、ミクログリアの Ca<sup>2+</sup>活動が神経活動に依存することや ATP 受容体を介していることを明らかにした。

ミクログリアがPiezo1 を介して応答するかを明らかにするために、Piezo1 の選択的作動薬である Yoda1 を投与したところ、顕著なカルシウム応答を示した。このことから、ミクログリアは Piezo1 を介してミクログリアが物理的的刺激に対してどのような応答を示すのかを明らかにするために、ハイドロゲルによって硬さの異なる培養環境を構築した。

今後ミクログリアが Piezo1 を介して周辺環境の硬さや物理的性質の変容に対してどのように機能応答するのかを検証していく。それにより脳内メカノバイオロジーの機能破綻による精神疾患や発達障害、認知症などの脳高次機能異常に関する病態解明とそれによる新規治療戦略を提案する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 4件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Ishikawa Tatsuya, Eto Kei, Kim Sun Kwang, Wake Hiroaki, Takeda Ikuko, Horiuchi Hiroshi, Moorhouse Andrew J., Ishibashi Hitoshi, Nabekura Junichi                                    | 4. 巻<br>159               |
| 2. 論文標題<br>Cortical astrocytes prime the induction of spine plasticity and mirror image pain  | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Pain  | 6. 最初と最後の頁<br>1592 ~ 1606 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1097/j.pain.0000000000001248   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>該当する              |
| 1. 著者名<br>Akiyoshi Ryohei, Wake Hiroaki, Kato Daisuke, Horiuchi Hiroshi, Ono Riho, Ikegami Ako, Haruwaka Koichiro, Omori Toshiaki, Tachibana Yoshihisa, Moorhouse Andrew J., Nabekura Junichi | 4. 巻<br>5                 |
| 2. 論文標題<br>Microglia Enhance Synapse Activity to Promote Local Network Synchronization  | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>eneuro  | 6. 最初と最後の頁<br>0088-18     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1523/ENEURO.0088-18.2018   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する              |
| 1. 著者名<br>Wake Hiroaki, Horiuchi Hiroshi, Kato Daisuke, Moorhouse Andrew J., Nabekura Junichi   | 4. 巻<br>2034              |
| 2. 論文標題<br>Physiological Implications of Microglia-Synapse Interactions   | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Methods Mol Biol.   | 6. 最初と最後の頁<br>69 ~ 80     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/978-1-4939-9658-2_6   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>該当する              |
| 1. 著者名<br>Kato Daisuke, Ikegami Ako, Horiuchi Hiroshi, Moorhouse Andrew J., Nabekura Junichi, Wake Hiroaki  | 4. 巻<br>2034              |
| 2. 論文標題<br>In Vivo Two-Photon Imaging of Microglial Synapse Contacts  | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Methods Mol Biol.   | 6. 最初と最後の頁<br>281 ~ 286   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/978-1-4939-9658-2_20  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>該当する              |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Murakoshi Hideji, Horiuchi Hiroshi, Kosugi Takahiro, Onda Maki, Sato Aiko, Koga Nobuyasu, Nabekura Junichi | 4. 巻<br>9       |
| 2. 論文標題<br>ShadowR: a novel chromoprotein with reduced non-specific binding and improved expression in living cells  | 5. 発行年<br>2019年 |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-019-48604-4   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する    |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Horiuchi Hiroshi, Agetsuma Masakazu, Ishida Junko, Nakamura Yusuke, Lawrence Cheung Dennis, Nanasaki Shin, Kimura Yasuyuki, Iwata Tatsuya, Takahashi Kazuhiro, Sawada Kazuaki, Nabekura Junichi | 4. 巻<br>11      |
| 2. 論文標題<br>CMOS-based bio-image sensor spatially resolves neural activity-dependent proton dynamics in the living brain   | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>Nature Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41467-020-14571-y  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する    |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Horiuchi Hiroshi, Parajuli Bijay, Komiya Hiroyasu, Ogawa Yuki, Jin Shijie, Takahashi Keita, Azuma Yasu-Taka, Tanaka Fumiaki, Suzumura Akio, Takeuchi Hideyuki | 4. 巻<br>12      |
| 2. 論文標題<br>Interleukin-19 Abrogates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Attenuating Antigen-Presenting Cell Activation   | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Immunology   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fimmu.2021.615898   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する    |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Takeuchi Hideyuki, Horiuchi Hiroshi, Parajuli Bijay, Komiya Hiroyasu, Tanaka Fumiaki, Suzumura Akio | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Interleukin 19 ameliorates experimental autoimmune encephalitis                                    | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>Clinical and Experimental Neuroimmunology   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/cen3.12642  | 査読の有無<br>無      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-       |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>堀内 浩, 石田順子, 鍋倉淳一         |
| 2. 発表標題<br>覚醒下ミクログリアの2光子カルシウムイメージング |
| 3. 学会等名<br>第66回中部日本生理学会             |
| 4. 発表年<br>2019年                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hiroshi Horiuchi, Masakazu Agetsuma, Junko Ishida, Yusuke Nakamura, Kazuaki Sawada |
| 2. 発表標題<br>Development of novel CMOS-based ion image sensor for in vivo pH imaging of brain   |
| 3. 学会等名<br>12th International workshop on approaches to single cell analysis (国際学会)           |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Hiroshi Horiuchi, Masakazu Agetsuma, Junko Ishida, Kazuaki Sawada |
| 2. 発表標題<br>Proton imaging in the brain using CCD-type ion image sensor       |
| 3. 学会等名<br>FAOPS 2019 (招待講演) (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hiroshi Horiuchi, Masakazu Agetsuma, Junko Ishida, Dennis L Cheung, Kazuaki Sawada, Junichi Nabekura         |
| 2. 発表標題<br>CMOS-based bio-image sensor spatially resolves neural activity dependent proton dynamics in the living brain |
| 3. 学会等名<br>ABiS Symposium Forefront and Future of Electron Microscopic Imaging  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>堀内 浩、揚妻正和、石田順子、澤田和明、鍋倉淳一      |
| 2. 発表標題<br>CMOSイメージセンサによる生体脳pHイメージング     |
| 3. 学会等名<br>名古屋大学大学院医学系研究科-生理学研究所合同シンポジウム |
| 4. 発表年<br>2020年                          |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>堀内 浩、揚妻正和、石田順子、Dennis Cheung、澤田和明、鍋倉淳一                             |
| 2. 発表標題<br>イオンイメージセンサによる生体脳pHイメージング   |
| 3. 学会等名<br>【機能タンパク質の構造と機能のダイナミクスと、それに基づく細胞・生体システム作動機構の研究拠点の形成】年度末成果報告会・シンポジウム |
| 4. 発表年<br>2021年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|