

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08353

研究課題名(和文) 生後環境に起因するミクログリアの異常からみた精神発達遅滞の病態解明アプローチ

研究課題名(英文) an new approach the pathogenesis of mental retardation from the abnormality of microglia by postnatal mental stress.

研究代表者

平澤 孝枝 (Hirasawa, Takae)

帝京大学・理工学部・准教授

研究者番号：10402083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ミクログリアの自閉症や発達障害、うつ病における活性化はすでにヒトの疾患研究などでも言われているが、その具体的な特性やその活性化が脳機能にどのような影響を与えるのかが分かっていない。本研究では生後初期のストレスに起因するミクログリアの特性と脳内に浸潤したミクログリアの成熟の特性を明らかにすることを目的とした。母子分離ストレスを与えたマウスは生後の発達期(生後7,14日)において脳内ミクログリアが炎症性にシフトしている事が示唆された。すなわち生後初期のストレスは肝臓由来の血球系細胞(クッパー細胞)由来から骨髄由来にシフトしており、生後発達期において活性化型に変化している事が示唆される結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミクログリアは脳内免疫を担う重要な役割を持つ一方、シナプスの刈り込みにも関わる事が考えられている。一方で、うつ病などをはじめとする精神疾患においてシナプス形成の不全や減少がシナプスの刈り込みによるものであるかどうか不明である。本研究ではミクログリアの性質が幼若期の環境に影響を受けることを示した。大人の脳は既に幼少の環境に影響を受けることを示唆している。更に、これらの性質は炎症性のサイトカインを放出する性質を示している。この事からうつ病を始めとした精神疾患の神経症状にはミクログリアの性質の調節が重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Activation of microglia in autism, developmental disorders, and depression has already been described in human disease studies, but their specific characteristics and how their activation affects brain function are not known. In this study, we aimed to characterize the properties of microglia induced by stress in the early postnatal period and the maturation of microglia infiltrating the brain. Mice subjected to mother-infant separation stress showed an inflammatory shift in brain microglia during postnatal development (postnatal days 7 and 14), suggesting that early postnatal stress induces an inflammatory shift in the brain microglia. The results suggest that stress in the early postnatal period shifts from the liver-derived hematopoietic cells (Kupffer cells) to the bone marrow-derived cells, which become activated during the postnatal developmental period.

研究分野：神経科学

キーワード：ミクログリア ストレス 母子分離

1. 研究開始当初の背景

白血球は、体の免疫細胞の代表的な細胞であるが脳内には白血球が入らない仕組みがある。脳内免疫の独自性は末梢のマクロファージが BBB の生後初期の閉鎖と共に浸潤するのを最後に中枢神経独自のサイトカインネットワークを構築している。組織に存在するマクロファージは、常在している組織により 3 種類 (卵黄嚢、胎児肝臓、骨髄) の異なる起源を持っているが、ミクログリアはこのうち卵黄嚢と胎児肝臓由来とされている。脳に白血球が侵入出来るのは病気や怪我で損傷した時のみで、骨髄由来のマクロファージ系細胞の浸潤による。同じ免疫を司るマクロファージ細胞とは形態が全く異なり、突起を伸ばして周囲の細胞に接触して異常がないかを感知している。更に、発達期においてミクログリアは神経細胞に接触し形成期の「シナプスの刈り込み」を行なうことでシナプス成熟を完成させる独自の働きを持っている。ミクログリアの活性の意義は神経細胞の成熟やグリア細胞の機能、脳発達の観点からも未解明な点が多い。

2. 研究の目的

ミクログリアの自閉症や発達障害、うつ病における活性化はすでにヒトの疾患研究などでも言われているが、その具体的な特性やその活性化が脳機能にどのような影響を与えるのか分かっていない。こうした疾患の主因は神経活動によるが、実際には神経-グリア細胞の相関性の異常によることが大きい。本研究では生後初期のストレスに起因するミクログリアの特性と脳内に浸潤したミクログリアの成熟の特性を免疫学的・神経科学的に明らかにし、神経機能調節異常がミクログリアの脳内免疫制御異常に起因するものである事を証明する。

3. 研究の方法

<実験方法>母子分離群とコントロール群で差がある亜集団について、その特性を FACS 解析する。更に体内マクロファージの成熟機構である脾臓や産生期間である骨髄細胞との比較を行うことで、いつから脳内免疫の独自性が生まれてくるのかを同定する。免疫染色によるミクログリアの形態、およびウェスタンブロッティング法による発現解析を行った。幼若期精神ストレスはこれまでの申請者の知見から既にストレス脆弱性の強いモデルとして作製可能な母子分離ストレスを使用する。具体的には生後 1 日齢の仔マウスをコントロール群、母子分離群の 2 群に分け、ストレス群には 1 日 1 時間の母子分離ストレスを 14 日間与える。生後 7 日齢、14 日齢、21 日齢と各発達ステージにて解剖、採取を行なう。採取するサンプルはミクログリアが発生起源とされている肝臓、骨髄、脳、脾臓である。これまでの結果から、生後 14 日間の母子分離ストレスでストレスホルモンの受容体である Glicocorticoid receptor (GR) の発現量が低下する事が分かっており、更に免疫染色によるミクログリアの活性化、不安様行動が認められる。(H25 年度文部科学省科学研究費補助金基盤(C))。

4. 研究成果

4-1. 脳発達期における脳室部・大脳皮質部におけるミクログリアの形態変化

脳発達期におけるミクログリアの形態および発現分布を観察するため、生後 7 日齢、生後 14 日齢の脳室部・大脳皮質部においてミクログリア細胞マーカーを用いた免疫組織染色を行った。生後 7 日齢の脳室付近では幼若型であるアメーバ状のアメボイド型をしていた。生後 7 日齢において母子分離群は Iba1 (+) 細胞は、F4/80 (+) 生後 14 日齢、生後 21 日齢の脳室部・大脳皮質部ではともに多数の突起を持つラミファイド型の発現が確認できたため、ミクログリアは生後 14 日齢までには成熟型になることが確認できた (図 1)。

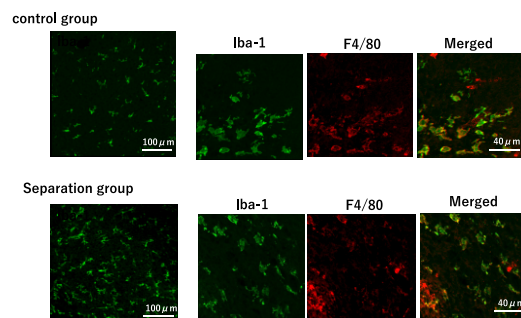


図 1 脳内 Iba, F4/80 の発現量変化

4-2. 母子分離ストレス負荷後、の脳室部における F4/80 の発現解析

母子分離ストレス負荷におけるミクログリアの産生の変化を検討するため、ストレス負荷後の生後 7 日齢、生後 14 日齢、生後 21 日齢、生後 28 日齢、の脳室部において骨髄由来のマクローフェージ抗体である抗 F4/80 と細胞マーカーを用いた免疫組織二重染色を行った。その結果、生後 7 日齢でのコントロール群の脳室部では、ミクログリアの特異抗体である抗 Iba1 との共局在が観察された。一方、生後 7 日齢のストレス負荷群において、抗 Iba1 の発現は確認できた。しかし、F4/80 ではほとんどが陰性、もしくは Low であることが確認できた。生後 14 日齢、生後 21 日齢、生後 28 日齢では、コントロール群、ストレス負荷群ともに脳室部・大脳皮質部における F4/80 の発現は確認できなかった。母子分離ストレス負荷におけるミクログリアの原始細胞であるマクローフェージ産生に変化があるのかを検討するため、ストレス負荷後の生後 7 日齢において骨髄由来マクローフェージ抗体であり、脾臓に多く分布している抗 F4/80 とマクローフェージの細胞マーカーとしても使用される抗 Iba1 を用いて免疫組織二重染色を行った。その結果、コントロール群、ストレス負荷群ともに F4/80 の発現が確認できた。さらに、Iba1 が強く発現している箇所と F4/80 の発現細胞が一致しており、胚中心の周辺に集積していることが確認できた。しかし、胚中心の中心部では Iba1 のみが発現していることから、中心部では由来の違うマクローフェージが産生されている可能性が示唆された。次に、母子分離ストレス負荷後のミクログリアの量的変動を検討するために、ウエスタンブロッティング法を用いて、生後 7 日齢、14 日齢の脳および脾臓をマクローフェージの骨格タンパクである Iba1 の発現量について検討した。その結果、脳においては 7 日齢でコントロール群に対してストレス群が有意に低下した(* $p < 0.05$)。また 14 日齢ではコントロール群に対してストレス群が有意に増加した(* $p < 0.05$)。一方、脾臓では生後 7 日齢及び 14 日齢ともに有意差が確認できなかった。

4-3. 母子分離ストレス負荷後の海馬・大脳皮質部における CD11b/c、Iba1 の発現解析

母子分離ストレス負荷による炎症反応の有無を検討するため、ストレス負荷後の生後 14 日齢の海馬・大脳皮質部を対象として活性化型ミクログリア抗体である CD11b/c とミクログリア細胞マーカーの抗 Iba1 を用いて免疫組織二重染色を行った。その結果、本研究ではコントロール群、ストレス負荷群ともに発現は確認出来なかった。CD11b/c と Iba1 の共局在と考えられる発現は確認できたが、染色結果が不明瞭であることから、染色方法を見直し、再度検討していく必要がある。一方、ウエスタンブロッティング法を用いて、生後 7 日齢、14 日齢、21 日齢、28 日齢の脳および脾臓を単球-マクローフェージの発現抗体である CD11b の発現量について検討した。その結果、生後 7 日齢の脳でコントロール群に対してストレス群が有意に低下した(** $p < 0.01$)。また生後 14 日齢の脾臓でコントロール群に対してストレス群が有意に低下していた(* $p < 0.05$)。21 日齢及び 28 日齢に関しては脳及び脾臓のコントロール群とストレス群で有意差は確認できなかったが、7 日齢から 21 日齢にかけてコントロール群に対してストレス群が増加する傾向が見られた。また、脾臓に関しても、21 日齢から 28 日齢にかけてコントロール群に対してストレス群が増加する傾向が見られた(図 2)。

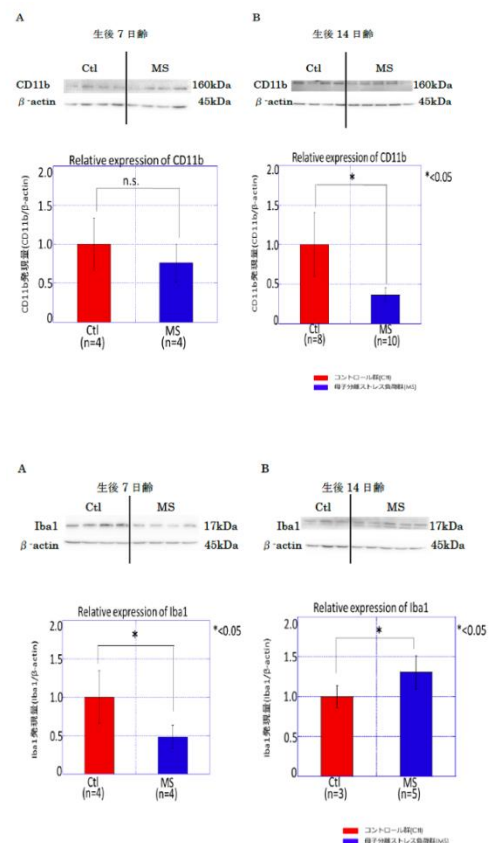


図 2 脳内 CD11b、Iba1 の発現量変化

4-4. フローサイトメトリー法によるミクログリア細胞の調節法の検討

これまでに申請者の手法で 90%以上の純度のミクログリアを分離する事が可能になり、FACS ソーターにて脳内に浸潤する単球由来細胞がミクログリアに分化する過程における特性を調べた。その結果、単球由来細胞 CD45/CD11b の発現強度でミクログリアは四種の亜

集団 (A,B,C,D) に分けられ、全てミクログリア細胞のマーカーである Iba1 陽性細胞である事が分かった (図 3)。ミクログリア細胞採取によって得られたサンプルの純度や性質を解析するため、マクロファージを含む血球系細胞を持つ骨髄と脾臓を用いて検討を行った。その結果、骨髄、脾臓、脳において発現個所が一致していることから、血球系細胞であることが示唆された。また、パーコール密度勾配分離法が成功に至らなかった場合は、血球系細胞が単離出来ていないということが確認できた。血球系細胞集団を白血球マーカーである CD45 および単球マクロファージマーカーである CD11b の発現強度で展開を行った。その結果、細胞集団はそれぞれの抗原に対する発現強度比から A (CD45(high)/CD11b(high)、B(CD45(high)/CD11b(mild))、C (CD45(low)/CD11b(low))3 種類の細胞集団に分類されることが確認できた。脳において CD45(low)/CD11b(low)の C グループが多く、脾臓、骨髄において CD45(high)/CD11b(mild)である B グループが多かった。このことから、同じ骨髄血球分画でも由来が違うことが考えられる。

母子分離ストレス負荷マウスの生後 14 日齢、生後 21 日齢、アダルトマウスの細胞群の比較を行った結果、14 日齢では細胞集団は点在していたが、生後 21 日齢では C の細胞集団が優位に成熟するのに伴い、A の細胞集団が優位になる傾向が確認できた (図 4)。このことから、マウスのミクログリア細胞は発達が進むにしたがってポピュレーションや特性が変化している可能性が示唆された。胎生期において肝臓は最大の造血器官だが、生後 7 日を基準に造血器官は骨髄へと移行する。これはミクログリアの脳内遊走と同時期に起きることであり、ストレス初期における血球系の応答が観察できる時点であると考えられたため、生後 7 日齢の肝臓の血球系細胞の同定を行った。その結果、生後初期の肝臓において 3 種類の血球系細胞集団が存在することが確認出来た (図 5)。生後初期の肝臓において 3 種類の血球系細胞集団が存在することから、生後初期の肝臓の血球マクロファージ系細胞が母子分離ストレスを受けるとどのように変化するのか、CD45 の展開による解析を行った。その結果、ストレス負荷群の血球系マクロファージ細胞のポピュレーションが優位に減少していることが確認出来た (図 6)。したがって、生後初期の造血幹細胞、血球系細胞の生産に生後初期のストレスが大きく影響することが示唆された。この結果から、幼若期ストレスによってミクログリアの由来が卵黄嚢由来から骨髄由来に変化する事が示唆される。さらに、母子分離群は CXCR3、F4/80 の A のポピュレーション群が有意に低下することがわかった。一方で、ポピュレーション C が有意に増加しており、14 日齢になるとポピュレーション C の CXCR3 抗原が有意に高くなっていた。CXCR3 は炎症性サイトカインのミクログリアである事が示唆された。

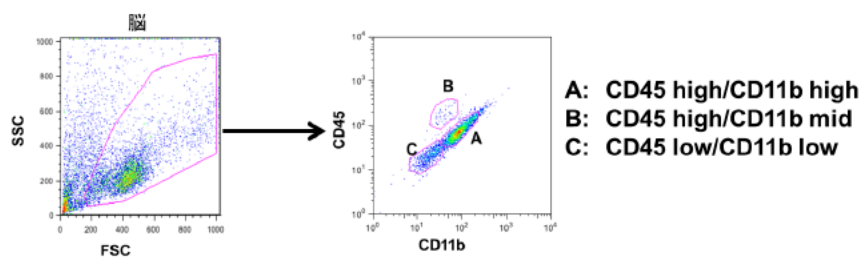


図 3 脳内ミクログリア表面抗原の解析

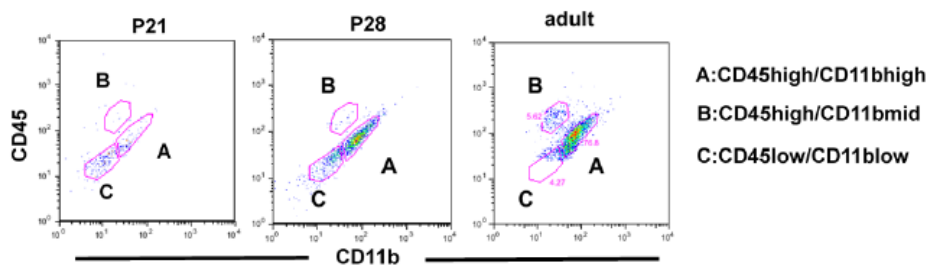


図 4 脳内ミクログリア亜集団の日齢別解析

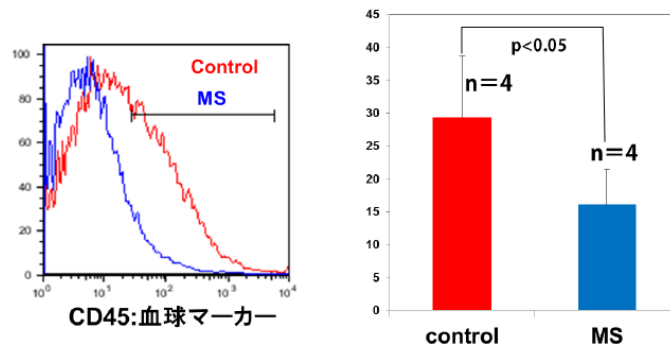


図5 生後7日齢の肝臓における血球集団へのストレスの影響

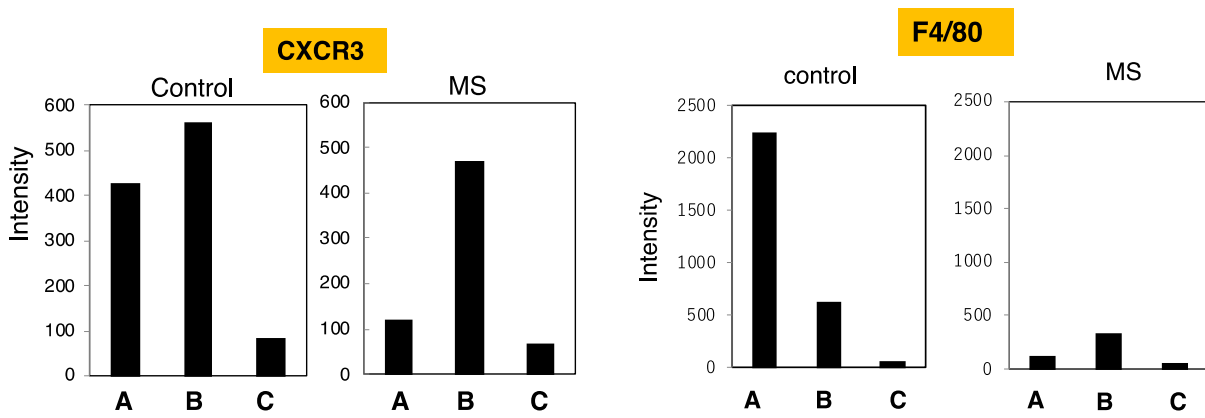


図6 生後7日齢の脳内ミクログリアの表面抗原におけるストレスの影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 平澤孝枝	4. 巻 36 (1)
2. 論文標題 胎児期・幼若期ストレスに起因する生後の脳機能発達とミクログリア	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ストレス科学	6. 最初と最後の頁 22-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Yamada A*, Hirasawa T*, Nishimura K, Shimura C, Kogo N, Fukuda K, Kato M, Yokomori M, Hayashi T, Umeda M, Yoshimura M, Iwakura Y, Nikaido I, Itoharu S, Shinkai Y.	4. 巻 24 (7)
2. 論文標題 Derepression of inflammation-related genes link to microglia activation and neural maturation defect in a mouse model of Kleeftstra syndrome.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.102741.	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平澤孝枝
2. 発表標題 環境変化によるバイオダイバーシティ 「遺伝子」、「種」、「生態」
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 滝沢零士、平澤孝枝、吉田 宰、原秀磨、刈月祥太
2. 発表標題 Temperature-dependent sexual differentiation mechanism in Japanese eel
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平澤孝枝
2. 発表標題 幼若期ストレスにおける脳内ミクログリア細胞の動態とストレス耐性
3. 学会等名 第36回日本ストレス学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊地貴矢, 太田大樹, 平澤孝枝, 田口徹
2. 発表標題 骨格筋神経における非活動性侵害受容器の組織学的発現解析
3. 学会等名 第20回新潟医療福祉学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田壘夕美、西村佳也子、志村知古、平澤孝枝、眞貝洋一
2. 発表標題 Kll1efstra症候群モデルマウスを用いた神経症状発症機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.teikyo-u.ac.jp/topics/2021/0706 https://www.teikyo-u.ac.jp/faculties/undergraduate/science_tech/bio_science_hirasawa.html
--

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