

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16372

研究課題名(和文) 脳内微小環境破綻を担うミクログリア活性化制御機構とその細胞生物学的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms for regulating microglial activation underlying brain microenvironmental deterioration

研究代表者

谷口 将之(Masayuki, Taniguchi)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：90831751

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)：社会挫折から受けるストレスは、抑うつや不安亢進など情動変容を誘導し、精神疾患のリスク因子となるが、その実態には不明な点が多い。近年、慢性ストレスではミクログリアの活性化による脳内炎症が生じることが示されている。本研究では、マウス社会挫折ストレスモデルを用いて、ストレスの反復により脳領域特異的なミクログリアのエピゲノム変化が誘導されること、その変化は遺伝子発現と合致することを見出した。さらに、このエピゲノム変化に関わる転写因子を推定した。以上の成果は、ストレスがミクログリアのエピゲノム変化を誘導し、情動変容に関わる脳内炎症に寄与する可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミクログリア活性化は情動変容に関わる脳内炎症に重要である。本研究の成果は、ストレスによるミクログリア活性化・プライミングにはエピゲノム変化が重要であることを示し、その変化に関わる転写因子群の抽出に成功した。これらの成果はストレスによる脳機能変化の難可逆性の生物学的基盤に迫る点で学術的意義は大きく、またストレス関連疾患の病態の解明や、精神疾患創薬のための新たな標的を提示する点で社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Social stress often induces emotional alterations such as depression and anxiety, and can be a risk factor for mental illness. However, the mechanism remains unknown. Recently studies suggest that chronic stress induces neuroinflammation through microglia activation. Using a mouse model of social defeat stress, here we found that repetition of stress exposure induces brain region-specific epigenomic changes in microglia and these epigenetic changes are concordant with the expression of adjacent genes associated with different biological functions. Furthermore, we specified transcription factors associated with epigenomic changes. These results suggest that stress induces epigenomic changes in microglia, which may contribute to neuroinflammation for emotional disturbances.

研究分野：神経薬理学

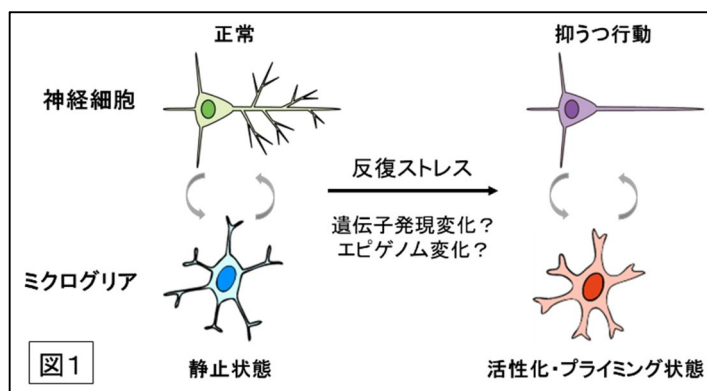
キーワード：ミクログリア ストレス 脳内炎症 エピゲノム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトのこころは、遺伝的素因に加えて、ストレスなどの障害を通じた様々な環境要因により形成される。社会挫折や孤独から受けるストレスは、抑うつや不安亢進など情動変容を引き起こし、精神疾患のリスク因子となる。

研究代表者はこれまで、ストレス抵抗性の増強には前頭前皮質興奮性神経細胞に発現するドパミン D1 受容体が必須であること、その過程には内側前頭前皮質のドパミン D1 受容体を介した神経細胞の形態的造成を伴うことを見出した。研究代表者が見出した神経細胞樹状突起の形態変化は、ストレスの反復によるストレス抵抗性の消失に伴い、神経細胞の形態的造成から萎縮に変化する(図1)。また、研究代表者らは、マウスの反復社会挫折ストレスが、内側前頭前皮質選択的に炎症関連細胞であるミクログリアを活性化し、抑うつ行動を引き起こすことを示した。興味深いことに、ストレスの反復は、内側前頭前皮質ミクログリアの活性化を次第に増強するミクログリアのプライミングを誘導する(図1)。また、ミクログリアの活性化に伴い、神経細胞を萎縮させることを見出しており、ミクログリアの活性化は神経細胞の萎縮に關与することが示唆される。しかし、ストレスによるミクログリアの活性化・プライミングのメカニズムは不明であった。ミクログリアの類縁細胞であるマクロファージでは自然免疫受容体である TLR4 の反復刺激がエピゲノム制御を介して炎症性サイトカインの発現を促進することが知られている。そこで、研究代表者らは、ストレスによるミクログリア活性化・プライミングにも同様の分子機序が關与する可能性を推測した。



### 2. 研究の目的

マウス社会挫折ストレスモデルと脳領域・細胞種特異的なエピゲノム・遺伝子発現解析を駆使し、ストレスの反復による内側前頭前皮質におけるミクログリア活性化・プライミングのメカニズムを転写・エピゲノム制御に着目して同定し、ストレス関連精神疾患の理解と新たな精神疾患創薬戦略を提言する。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス社会挫折ストレスモデル

C57BL/6 遺伝背景の成体雄マウスを体格が優位で攻撃性の強い ICR 遺伝背景の成体雄マウスの攻撃に 1 日 10 分間、単回あるいは 10 回反復して曝露した。このストレスの反復は、新規マウスに対する社会忌避行動、高架式十字迷路試験での不安行動を誘導する。また、このストレスモデルによる情動変容には個体差が大きく、反復ストレスにより抑うつ行動が誘導される“ストレス感受性群”と抑うつ行動が誘導されない“ストレス抵抗性群”が誘導される。このモデルで誘導される行動変化は抗うつ薬の慢性投与により改善することから、マウスうつ病モデルとして用いられる。また単回ストレスでは社会忌避行動が誘導されないことから、ストレスの反復が行動変化に重要である。

#### (2) 脳領域特異的なミクログリアの遺伝子発現解析

ミクログリア特異的に蛍光タンパク質を発現する CX3CR1-EGFP マウスを単回あるいは反復ストレスに供し、内側前頭前皮質と側坐核を切り出した。その後、蛍光活性化セルソーティング (Fluorescence Activated Cell Sorting; FACS) を用いて蛍光標識されたミクログリアを単離した。単離したミクログリアから RNA を精製した後、RNA-seq ライブラリを作製し、次世代シーケンサーに供した。

#### (3) 脳領域特異的なミクログリアのエピゲノム解析

脳領域特異的なミクログリアの遺伝子発現解析と同様の手法でミクログリアを単離し、クロマチン免疫沈降シーケンス解析 (Chromatin immuno-precipitation sequencing; ChIP-seq) と

網羅的オープンクロマチン領域解析 ( Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing; ATAC-seq ) を行った。ChIP-seq では、抗 H3K27ac 抗体を用いてアセチル化ヒストン修飾を受けたヒストンタンパク質に結合した DNA ゲノム領域 ( = エンハンサー領域 ) を回収した。ATAC-seq では Tn5 transposase を用いてオープンクロマチン領域を回収した。回収したそれぞれの DNA から ChIP-seq ライブラリ、ATAC-seq ライブラリを作製し、次世代シーケンサーに供した。

#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) 単回・反復ストレスによる内側前頭前皮質及び側坐核の遺伝子発現変化の同定

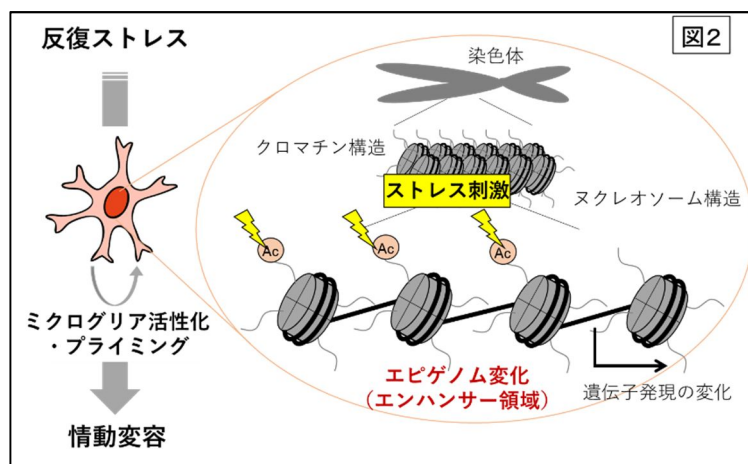
単回あるいは反復社会挫折ストレス後の内側前頭前皮質と側坐核ミクログリアの遺伝子発現解析の結果、ミクログリアの遺伝子発現はストレスの反復により変化し、その変化は内側前頭前皮質と側坐核で異なることを見出した。このストレスによる遺伝子発現変化は、内側前頭前皮質特異的な変化と内側前頭前皮質と側坐核で共通する変化に分類された。さらにミクログリアの機能変化を推測するため、ストレスにより変化した遺伝子群を Gene ontology enrichment 解析に供したところ、それぞれの遺伝子発現変化の集団は異なる機能に濃縮することを見出した。

##### ( 2 ) 単回・反復ストレスによる内側前頭前皮質及び側坐核のエピゲノム変化の同定とその分子機序の解明

単回あるいは反復社会挫折ストレス後の内側前頭前皮質と側坐核ミクログリアの抗 H3K27ac 抗体を用いた ChIP-seq 解析の結果、ミクログリアのエンハンサーの状態はストレスの反復により変化し、その変化は内側前頭前皮質と側坐核で異なることを見出した。このエンハンサーのストレスによる変化は内側前頭前皮質特異的な変化と、内側前頭前皮質と側坐核で共通する変化に分類されることを明らかにした。エンハンサーの変化と遺伝子発現変化の関係性を、hypergeometric test を用いて解析したところ、これらの変化の傾向は合致することを見出した。

ATAC-seq 解析では、ミクログリアのオープンクロマチン領域を同定した。ストレスにより変化のあったエンハンサー領域とオープンクロマチン領域のオーバーラップ領域で motif enrichment 解析を行ったところ、ストレスにより変化したエンハンサー領域は異なる複数の転写因子による制御を受ける可能性を見出した。

以上の成果は、反復ストレスがミクログリアにおいて脳領域選択性の異なる複数の転写・エピゲノム制御を誘導し、ミクログリアのストレス応答を決定することを示唆する ( 図 2 ) 。



##### ( 3 ) 内側前頭前皮質サブ領域特異的なミクログリア遺伝子発現解析法の確立とそれを用いた反復ストレスによる内側前頭前皮質サブ領域ミクログリアの遺伝子発現変化の解析

内側前頭前皮質はいくつかのサブ領域に分類され、モノアミン系の神経入力や役割が異なることが示されている。また、ミクログリアの活性化には左右差や層構造特異性が存在する可能性が示されており、サブ領域特異的なミクログリアの解析は重要である。そこで、免疫組織染色とレーザーマイクロダイセクションを用いたミクログリア単離法と遺伝子発現解析法を組み合わせ、内側前頭前皮質サブ領域特異的なミクログリア遺伝子発現解析法を確立した。内側前頭前皮質サブ領域の左右差に着目し、反復ストレスにより誘導されるミクログリアの遺伝子発現変化を解析した結果、反復ストレスにより変化する遺伝子のうち一部の遺伝子発現変化は内側前頭前皮質の左半球と右半球のミクログリアで異なることを見出した。この知見はストレスにより特定の脳局所でミクログリアのストレス応答が誘導され、脳内微小環境を変化させる可能性を示唆する。

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 Numa C, Nagai H, Taniguchi M, Nagai M, Shinohara R, Furuyashiki T	4. 巻 9
2. 論文標題 Social defeat stress-specific increase in c-Fos expression in the extended amygdala in mice: Involvement of dopamine D1 receptor in the medial prefrontal cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16670
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-52997-7	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masayuki Taniguchi, Shiho Kitaoka, Shigehiro Kuraku, Mitsutaka Kadota, Tomoyuki Furuyashiki
2. 発表標題 Analysis of epigenetic changes in prefrontal microglia induced by repeated social defeat stress
3. 学会等名 University of Washington Department of Pharmacology 2019 Symposium on Molecular Pharmacology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 反復社会挫折ストレスによる前頭前皮質ミクログリアのエピゲノム制御
2. 発表標題 谷口 将之, 北岡 志保, 門田 満隆, 工樂 樹洋, 古屋敷 智之
3. 学会等名 NEURO2019（第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学学会大会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayuki Taniguchi, Kazutoshi Matsushita, Mitsutaka Kadota, Shigehiro Kuraku, Tomoyuki Furuyashiki
2. 発表標題 Chronic Stress-Induced Epigenetic Changes of Microglia
3. 学会等名 ACNP 2020 米国精神神経医学会議 American College of Neuropsychopharmacology（国際学会）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷口将之、松下和敏、三島零、北岡志保、工樂樹洋、門田満隆、古屋敷智之
2. 発表標題 社会ストレスによるミクログリアのエピゲノム制御における多様な時空間的パターン
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口将之、北岡志保、工樂樹洋、門田満隆、古屋敷智之
2. 発表標題 反復社会挫折ストレスによる内側前頭前皮質ミクログリアのエピゲノム制御
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020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