

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05951

研究課題名(和文) 非定型カドヘリンFat3を介したミクログリアによるシナプス制御

研究課題名(英文) Synaptic regulation by microglia through atypical cadherin Fat3

研究代表者

鶴田 文憲 (Tsuruta, Fuminori)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：30571450

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)：出生後のミクログリアは、突起を伸ばして複雑な形態へ変化していく。近年、この過程において、ミクログリアは、不必要なシナプスを取り除き、精密な神経回路を構築していくことが示唆されている。しかし、ミクログリアによるシナプス刈り込みのメカニズムは不明な点が多い。これまで申請者は、ミクログリアの形態変化を誘導する因子を探索し、非定型カドヘリンファミリータンパク質Fat3を同定してきた。本課題では、Fat3のノックアウトマウスを解析し、Fat3が出生後ミクログリア成熟を早め、シナプス刈り込みを促進することを見出した。本成果は、ミクログリアによるシナプス制御の新たなメカニズムを提唱するものといえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでミクログリアは、脳内の免疫担当細胞として、主に炎症応答や死細胞の除去などに関与することが示唆されていた。しかし近年、ミクログリアは、シナプスの形成や刈り込み、神経幹細胞の増殖分化、脳血管の機能制御など、多彩な機能を示すことが明らかとなりつつある。本研究課題は、これまでミクログリアの制御因子としての解析は行われてこなかった非定型カドヘリンファミリータンパク質Fat3に着目し、ミクログリア成熟との関連を示した点が学術的意義のある点だと考えている。

研究成果の概要(英文)：After birth, microglia extend their projections and change into complex morphologies. Recently, it has been suggested that during this process, microglia remove unnecessary synapses and construct precise neural circuits. However, the mechanism of synaptic pruning by microglia remains unclear. Previously, the applicant has searched for factors that induce morphological changes in microglia and identified an atypical cadherin family protein, Fat3. In this project, we analyzed Fat3 knockout mice and found that Fat3 accelerates postnatal microglial maturation and synaptic pruning. These results propose a new mechanism for synaptic regulation by microglia.

研究分野：神経科学 分子生物学

キーワード：FAT3 ミクログリア シナプス

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の神経細胞は、胎児期に神経幹細胞から産生された後、所定の位置に移動していく。出生後は、神経突起を伸ばしながらシナプスを形成し、複雑な神経回路網を構築していく。通常、出生後に過剰なシナプスが形成され、その後、ミクログリアによって不必要なシナプスが取り除かれる。また、このプロセスが破綻すると、自閉スペクトラム症などの発達障害、統合失調症などの精神疾患の発症リスクが増加する。このことから、ミクログリアによるシナプス制御の研究は、胎児期、新生児期における脳構築のメカニズム解明のみならず、様々な脳機能障害の理解につながることを期待できる。先行研究から、シナプスの刈り込みが起こるメカニズムとして、神経細胞から発現される C1q、ミクログリア上の CR3 や Cx3CR1 などの受容体を始め、いくつかの因子が報告されている。しかし、これら因子が機能する条件（時期、領域、外的要因など）は限定的であり、解明されていない要因もまだ多数あると考えられていた。これまで申請者は、ミクログリア細胞株 BV2 を用いて、形態変化を制御するメカニズムを解析し、ミクログリア BV2 の形態がヒポキサンチン処理の有無で変化することを発見した。ヒポキサンチンは、プリン代謝の中間産物で、サルベージ経路の中心酵素 HPRT によって IMP を産生する。そこで申請者は、ヒポキサンチン処理によって、発現変動する遺伝子を解析し、非定型カドヘリンファミリータンパク質 FAT3 に着目した。さらに、ミクログリアにおける FAT3 の発現パターンを Brain RNA-seq データベース (<https://www.brainrnaseq.org/>) を用いて調査したところ、出生後、ミクログリアが成熟するタイミングで FAT3 の発現が上昇することを見出した。このことから、プリン代謝の変化から FAT3 発現に至る経路がミクログリアの成熟プロセスを調節し、同時期に起こるシナプス刈り込みの制御に関わるのではないかと推測した。

## 2. 研究の目的

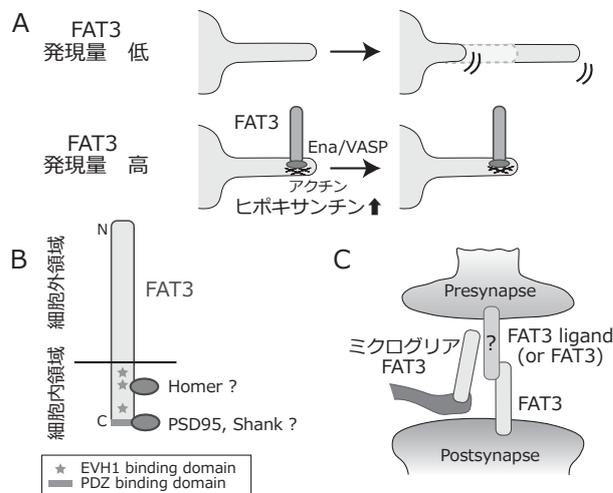
本研究課題では、申請者らが見出してきた FAT3 によるミクログリア成熟とシナプス形成の制御メカニズムを明らかにする。また FAT3 上流のプリン代謝によるミクログリア制御への関与も解析し、ミクログリア内のヌクレオチド代謝とミクログリアの発生、分化、成熟に対する包括的理解を目指す。

## 3. 研究の方法

- (1) FAT3 による新生仔期ならびに幼若期マウスのミクログリア形態とシナプス形成の制御  
野生型ならびに *Fat3* ノックアウト (KO) マウス (21 日齢) を灌流固定した後、脳を取り出し、クライオスタットで凍結切片を作製した。その後、ミクログリアマーカー (Iba1 など) やシナプスマーカー (PSD95, VGLUT1, GAD65, Gephyrin など) の抗体抗体で染色し、ミクログリア形態やシナプス形成を Fiji Image J を用いて定量し、FAT3 の生体内における機能を解析した。
- (2) プリン代謝によるミクログリア制御  
ヒポキサンチンの代謝酵素 HPRT がミクログリア形質の制御に関わるか、ミクログリア細胞株 BV2 に強制発現させ、細胞形態を Fiji Image J で解析した。またヒポキサンチン処理が HPRT の発現を調節するか、分子生物学的手法で検証した。さらに、プリン代謝が生体内のミクログリア成熟プロセスを制御するか、各種薬剤をマウスに投与し、ミクログリアの遺伝子発現や形態を組織染色で解析した。

#### 4. 研究成果

(1) FAT3による新生仔期ならびに幼若期マウスのミクログリア形態とシナプス形成の制御  
 幼若期ミクログリアをミクログリアマーカーIba1抗体で染色したところ、*Fat3* KOマウスのミクログリアでは、野生型と比較して、突起の伸長や分岐が亢進していた。また恒常性ミクログリアをGFPでラベリングするマウス(Cx3cr1-GFP)マウスと*Fat3* KOマウスを交配し、より詳細な形態観察を行ったところ、*Fat3* KOマウスのミクログリアでは、大脳皮質におけるミクログリアの占有率が、野生型より増加していた。以上の結果から、FAT3はミクログリアの成熟プロセスを遅らせる可能性が示唆された。次に、FAT3がシナプス形成の制御に関わるか、興奮性シナプスのマーカーであるVGLUT1とPSD95、抑制性シナプスのマーカーであるGAD65とGephyrinで染色し、共染色の割合をFIJI Image Jで定量した。その結果、*Fat3* KOマウスでは、野生型と比べて、興奮性シナプス、抑制性シナプス、共に減少していた。以上の結果から、FAT3が幼若期マウスのシナプス形成に関わることが示唆された。FAT3の細胞内ドメインには、後シナプスタンパク質であるPSD95やHomerが結合するドメインも存在することから、神経細胞シナプス上のFAT3やFAT3 ligandとミクログリアFAT3が競合的に作用し、Don't eat meシグナルとして機能している可能性が考えられた。



#### FAT3によるミクログリア形態とシナプス形成の制御の作業仮説

(A) FAT3はEna/VASPファミリータンパク質と結合して、アクチン骨格を制御する。FAT3の発現量が高くなると、アクチンフィラメントが安定化して、突起の伸長退縮が起こりにくくなる。

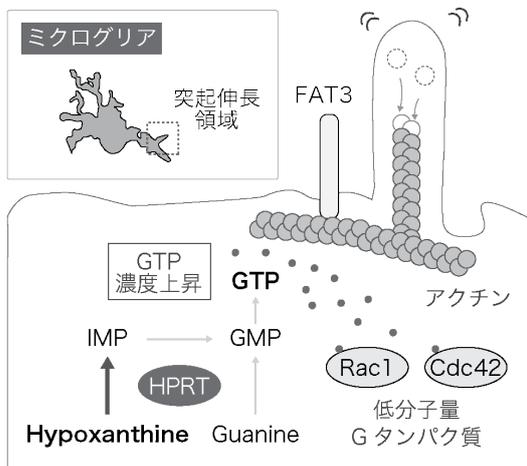
(B) FAT3の細胞内にはHomerと結合する可能性のあるEVH1結合領域、PSD95やShankと結合する可能性のあるPDZ結合領域が存在する。

(C) プレシナプスとポストシナプスに発現するFAT3がシナプス結合を調節し、ミクログリアに発現するFAT3がこれら結合を調節している。シナプスに発現するFAT3がDon't eat meシグナルとして機能する可能性を推定している。

(Okajima T and Tsuruta F. Neural Reg Res 2021より抜粋改変)

#### (2) プリン代謝によるミクログリア制御

次に、ヒポキサンチン処理によってミクログリア形態が変化することから、ヒポキサンチンの代謝酵素HPRTに着目した。まず、FAT3同様、HPRTがミクログリア細胞株BV2の形態変化に関わるか、HPRTの過剰発現、ならびにshRNAを用いたノックダウンの系で検討したところ、HPRTの発現でBV2の突起が伸長し、ノックダウンで退縮した。次に、ヒポキサンチン処理が、細胞内のヒポキサンチン濃度の上昇につながるか、LC/MSを用いて検証したところ、ヒポキサンチンによる取り込みが有意に増加していた。以上の結果から、細胞内ヒポキサンチン濃度の上昇が、ミクログリア形態の変化につながることを示唆された。次にHPRT下流で形態制御を促すメカニズムとして、GTPに着目した。GTPは細胞骨格を制御する低分子量GTPタンパク質の活性化に必要な因子として知られている。そこで、イノシン酸からGTP産生を促す経路をニコフェノール酸モチフェルを用いて抑制したところ、アクチン重合が抑制された。以上の結果から、ヒポキサンチン-HPRT下流で細胞形態を制御するメカニズムとして、GTP濃度の制御が考えられた。



### プリン代謝によるミクログリア形態制御の作業仮説

ヒポキサンチンの細胞内濃度の上昇によって、HPRTの発現が増加し、IMPやGMPの濃度が上昇する。その結果、低分子量Gタンパク質の活性が変動し、アクチンダイナミクスが亢進する。一方、FAT3の発現が高いと、このアクチンダイナミクスが低下し、形態の変動が安定化する。

(照屋林一郎、鶴田文憲, Medical Science Digest, 2022年12月号より抜粋改変)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Yano S, Akiyama K, Tsuchiya R, Kubotani H, Chiba T, Nagata T, Tsuruta F.	4. 巻 11
2. 論文標題 A MATLAB-based program for three-dimensional quantitative analysis of micronuclei reveals that neuroinflammation induces micronuclei formation in the brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 18360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97640-6.	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 -

1. 著者名 Okajima T, Tsuruta F.	4. 巻 16
2. 論文標題 Exploring genes that control microglial heterogeneity and transition.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neural Regen Res.	6. 最初と最後の頁 2397-2398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/1673-5374.313035.	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 -

1. 著者名 Okajima Tomomi, Gu Yichen, Teruya Rin-ichiro, Yano Sarasa, Taketomi Takumi, Sato Ban, Chiba Tomoki, Tsuruta Fuminori	4. 巻 7
2. 論文標題 Atypical Cadherin FAT3 Is a Novel Mediator for Morphological Changes of Microglia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 0056-20.2020
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0056-20.2020	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 -

1. 著者名 Okajima Tomomi, Tsuruta Fuminori	4. 巻 16
2. 論文標題 Exploring genes that control microglial heterogeneity and transition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neural Regen Res	6. 最初と最後の頁 2397-2398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/1673-5374.313035.	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 -

1. 著者名 Sato B, Kim J, Morohoshi K, Kang W, Miyado K, Tsuruta F, Kawano N, Chiba T.	4. 巻 24
2. 論文標題 Proteasome-Associated Proteins, PA200 and ECPAS, Are Essential for Murine Spermatogenesis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom13040586.	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 -

1. 著者名 Nakamura J, Aihara T, Chiba T, Tsuruta F.	4. 巻 10
2. 論文標題 Cold shock protein RBM3 is upregulated in the autophagy-deficient brain.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 MicroPubl Biol.	6. 最初と最後の頁 17912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17912/micropub.biology.000695. eCollection 2022.	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 -

1. 著者名 Taketomi T, Tsuruta F.	4. 巻 18
2. 論文標題 Mutations in Hevin/Sparcl1 and risk of autism spectrum disorder.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neural Regen Res.	6. 最初と最後の頁 1499-1500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1673-5374.361543.	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 -

1. 著者名 Taketomi T, Yasuda T, Morita R, Kim J, Shigeta Y, Eroglu C, Harada R, Tsuruta F.	4. 巻 12
2. 論文標題 Autism-associated mutation in Hevin/Sparcl1 induces endoplasmic reticulum stress through structural instability.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 11891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-15784-5.	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 -

1. 著者名 Nosaki S, Kaneko MK, Tsuruta F, Yoshida H, Kato Y, Miura K.	4. 巻 186
2. 論文標題 Prevention of necrosis caused by transient expression in <i>Nicotiana benthamiana</i> by application of ascorbic acid.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Physiol.	6. 最初と最後の頁 832-835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiab102.	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 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Fuminori Tsuruta
2. 発表標題 Propagation of neuronal micronuclei regulates microglial diversity
3. 学会等名 Cell and Experimental Biology 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fuminori Tsuruta
2. 発表標題 Propagation of neuronal micronuclei regulates microglial diversity during brain development
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 鶴田文憲
2. 発表標題 神経細胞微小核伝播による発達期ミクログリア多様性の制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鶴田文憲
2. 発表標題 ミクログリア成熟を制御する神経細胞微小核の細胞間伝播
3. 学会等名 第45回 日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 浅見奈都・照屋 林一郎・鶴田 文憲	4. 発行年 2023年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 3
3. 書名 BIO Clinica ミクログリアの発生・分化・多様性獲得のメカニズム	

1. 著者名 照屋 林一郎・鶴田 文憲	4. 発行年 2023年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 3
3. 書名 Medical Science Digest 発達期ミクログリアの多様性制御	

〔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
---------	---------