

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21465

研究課題名(和文) ミクログリアによるシナプス貪食と異性間コミュニケーション行動

研究課題名(英文) Heterosexual communication and microglial synaptic pruning

研究代表者

田中 潤也 (Tanaka, Junya)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70217040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：Wistarラットを用いて、オスに好かれるメス、好かれないメスを行動学的に検出した。不安感が強く行動量が少ないメスが好まれることがわかった。前頭葉ミクログリアの活性を調べたところ、行動量の少ないメスではミクログリア活性が高く、より多くのシナプスを貪食していた。ミクログリアの活性を上昇させる β 2アゴニスト、クレンブテロールとミクログリア活性を抑制するプロロッカー、プロプラノロールを投与すると、前者ではオスに好かれるようになり、後者では好かれなくなった。これらの結果から、オスラットは行動が不活発なメスを好み、その背景にはミクログリアによるシナプス貪食の亢進があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、先進国では世界的に出生率が減少している。特に、日本では出生率の低下の背景に恋愛率、結婚率の低下が指摘されている。今回の行動実験の結論は、不安感が強くおとなしいメスがオスに好かれるというものであった。特に、明暗箱試験で、巣に相当する暗室に長時間滞在するような行動をとるメスが好かれた。天敵が多数いる野生社会では、巣に長時間母親が滞在する方が子育てに有利であると考えられ、子孫を残す上で有利となるメスをオスが選ぶ傾向があるものと考えられた。人間社会において、女性の社会進出と出生率は反比例する傾向があるが、今回のラットによる実験結果を敷衍できるかどうかさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Recently in many developed countries, love and marriage rates as well as birth rates are declining, and consequently the population has begun to decline. To explore the biological background for these trends, we developed a behavioral test to determine what kinds of female Wistar rats are preferred by males. Male Wistar rats preferred females with high anxiety and low motor activity. We examined the activity of microglia in the prefrontal cortex and found that less active females with higher microglial activity that phagocytosed more synapses, compared to active females with less anxious. Administration of clenbuterol, a β 2 agonist that increases microglial activity, and propranolol, a β -blocker that suppresses microglial activity, caused the former to be preferred by males and the latter to be less preferred. These results suggest that male rats prefer inactive female rats and that this is due to enhanced synaptic phagocytosis by microglia.

研究分野：神経科学、分子細胞生理学、行動科学

キーワード：行動科学 恋愛 ラット ミクログリア アドレナリン受容体 前頭葉 シナプス

1. 研究開始当初の背景

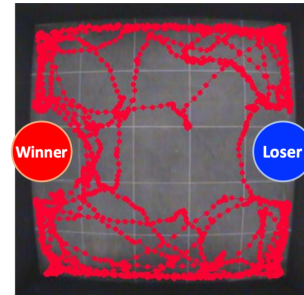
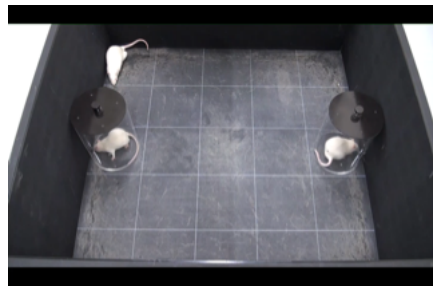
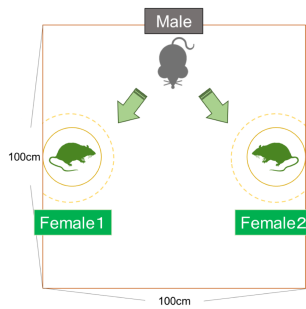
- (1) 近年、先進諸国では出生率が低下し、人口の減少が危惧される様になった。人口維持に必要な合計特殊出生率約2.1を維持している先進諸国はほとんどなく、日本では実際に総人口の減少が継続する様になっている。この様な人口動態の変化に対して、各国はさまざまな手を打っているが、出生率2.1には遠く及ばない状況である。日本の出生率の低下には、晩婚化、結婚率の低下、さらには恋愛率の低下などが経済的事情の悪化や新型コロナウイルス感染症の広がりに加えて背景に挙げられている。
- (2) 我々は出生率低下や人口減少という大きな社会問題に対して、脳科学・行動科学の面から貢献ができないか検討し、ラットを用いた恋愛研究を行うこととした。特に、長年の飼育経験からWistarラットでは、オスに好まれにくく仔が生まれにくいメスが存在することを経験的に把握していたため、「モテない」メスの研究を行動学的・分子細胞生物学的に行うこととした。

2. 研究の目的

- (1) Wistarラットのオス、メスを用いて、その社会性行動を観察し、オスに好かれる、逆にオスに好かれないメスを選抜し、その行動学的特性を種々の行動実験を通じて明らかにする。この様な行動特性の抽出により、人間社会での恋愛率の低下の様な社会的現象の解釈に本研究の成果が応用できるのか、考察をする。
- (2) 脳には神経細胞に加えて、電氣的興奮性を持たないグリア細胞が存在する。その中でも、我々は中胚葉系由来のマクログリアに類似するミクログリアがシナプス貪食を通じて高次脳機能を調節することに関心を持って研究を続けてきた(Choudhury et al.2020; Miyanishi et al.2021)。特に、近年はメスのミクログリアはオスより活性が高く、より多くのシナプス貪食を行うことが示されている(Yanguas-Casás et al., 2018)。そこで、本研究ではメスラットがオスに好かれるかどうかを調べる行動実験とミクログリアのシナプス貪食との関係を探る。
- (3) ミクログリアの活性は、さまざまな方法で変化させることができる。我々は、ヒトにも応用可能な安全性が確立された薬物でミクログリア活性を調節・変化させ、メスの「モテる・モテない」行動変化につなげることで、異性間コミュニケーションにおけるミクログリアの重要性を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 卵巣摘出手術：Wistarラット6週齢メスの両側卵巣を摘出する。手術1週間後よりごま油に溶解したエストラジオールを4日ごとに皮下注射し、女性ホルモンの変動をなくした形で行動実験を行なった。異性間コミュニケーションは、従ってプラトックラブを検討したことになる。
- (2) 行動実験：種々の行動実験を行なった(Miyanishi et al. 2019)。中心となる行動実験は、1m四方のオープンフィールドの両端に穴の空いたアクリルの筒を置きその中に1匹ずつ卵巣摘出メスを入れて、1匹のオスを離し、そのオスがどちらのメスの周辺に長時間滞在するかを測定するパートナープリファレンステスト(PPT)である(下図)。ここでは、オスがより長く周辺に滞在したメスラットをWinner、短時間滞在した方をLoserとしている。



また、メスの社会性を調べるための60cm四方のオープンフィールドを用いた社会性テストと明室・暗室を持つ容器内にラットを入れ、明暗どちらに長時間滞在するか調べる明暗箱試験も行なった(左写真)。

(3) 行動実験終了後、メスラットの前頭葉を摘出し、遺伝子発現を調べるためRNAを精製、あるいはウエスタンブロッティングを行うため、電気泳動サンプルを

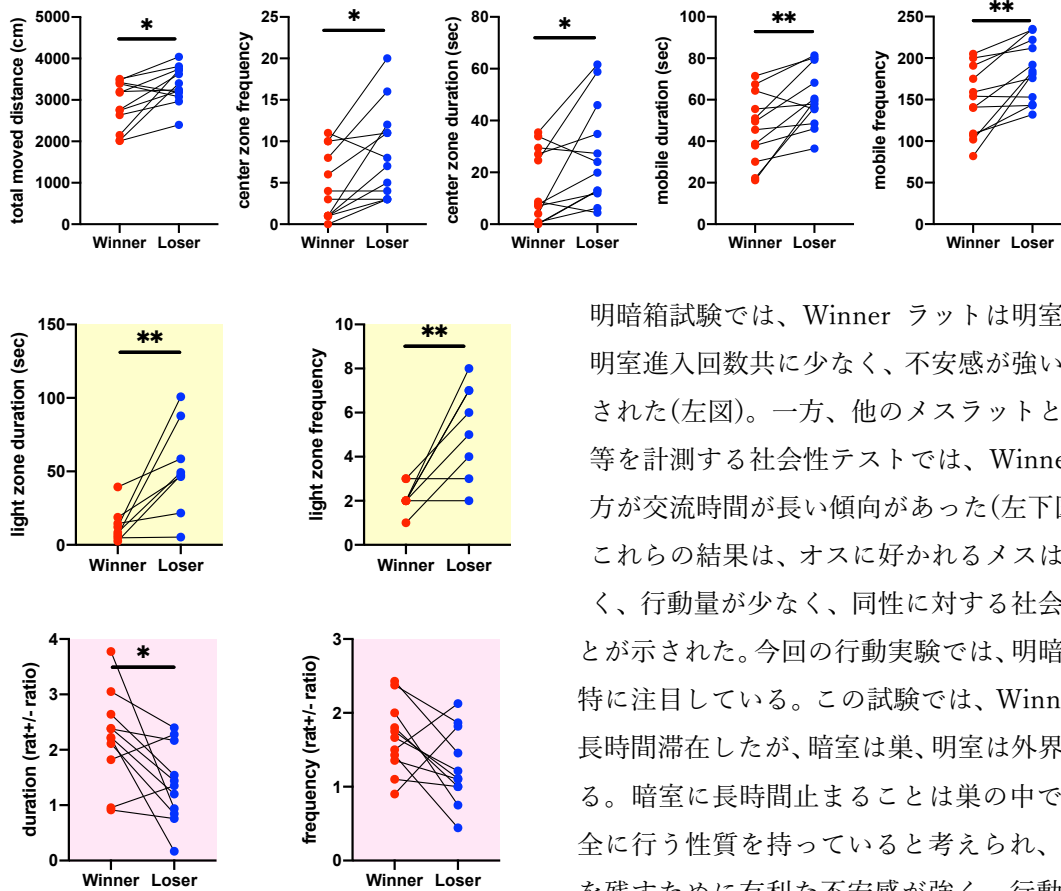
調製した。

- (4) ミクログリアの活性や形状、また、ミクログリアのシナプス貪食を定量するため前頭葉からミクログリアをソーティングして、ウエスタンブロッティングを行い、ミクログリアが取り込んだシナプスをシナプシンI検出により検討した。
- (5) 薬理学的実験：ミクログリアはアドレナリン受容体を発現し、主に $\beta 2$ 受容体を介して機能制御を受ける(Mori et al. 2002; Ishii et al 2015)。本研究では、メスラットに $\beta 2$ アゴニストのクレンブテロール、 β ブロッカーのプロプラノロールを投与し、PPTを行うとと主に、ミクログリア活性の変化を調べた。

4. 研究成果

(1) 行動実験

4匹1ケージでメスラットを飼育しその4匹に対して、オスラット4匹を用いてPPTを実施し、1匹のオスに好かれるモテるメスラット(Winner)と好かれないメスラット(Loser)を選抜し、その行動特性をオープンフィールド試験により検討した。下のグラフに示すように、Winnerは行動量 total moved distance、運動時間 mobile duration、運動頻度 mobile frequency がいずれも Loser より少なく、運動面では不活発であった。また、不安レベルの指標となるオープンフィールド中央区画での滞在時間 center zone duration や同区画への進入回数 center zone frequency も Winner で少なく、Winnerは不安感が強いことが示唆された。



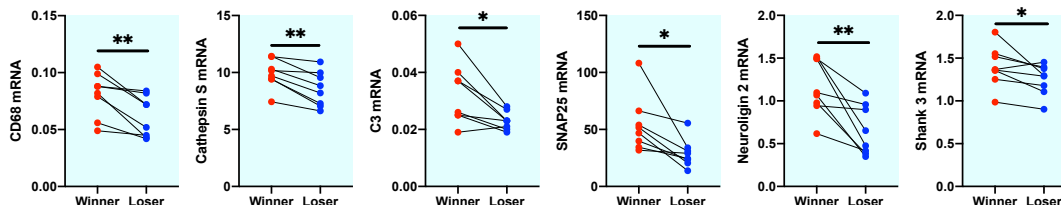
明暗箱試験では、Winner ラットは明室滞在時間、明室進入回数共に少なく、不安感が強いことが示唆された(左図)。一方、他のメスラットとの交流時間等を計測する社会性テストでは、Winner ラットの方が交流時間が長い傾向があった(左下図)。

これらの結果は、オスに好かれるメスは不安感が強く、行動量が少なく、同性に対する社会性は高いことが示された。今回の行動実験では、明暗箱の結果に特に注目している。この試験では、Winner は暗室に長時間滞在したが、暗室は巣、明室は外界と解釈される。暗室に長時間止まることは巣の中で子育てを安全に行う性質を持っていると考えられ、オスは子孫を残すために有利な不安感が強く、行動量が少ない

ために、巣の中に長時間止まる性質を好むものと考察している。

(2) 前頭葉の遺伝子発現の比較

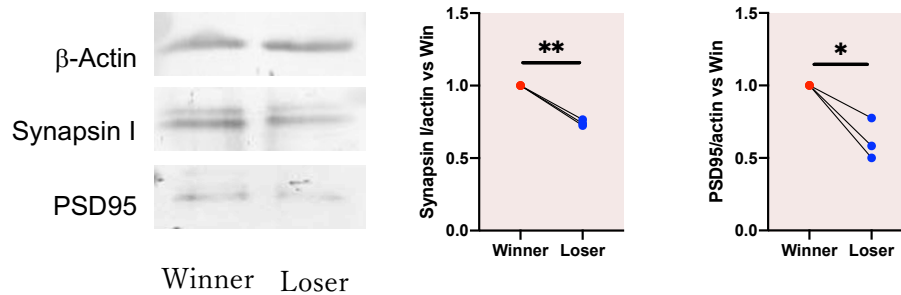
前頭葉から調製した全 RNA を元に作成した cDNA を用いた定量的 RT-PCR の結果の一部である。Winner は、ミクログリアのシナプス貪食に関わる遺伝子の発現が高く、またシナプス関連遺伝子、特に抑制性シナプス関連分子 Neuroligin 2 の発現上昇が目立つ。Winner の抑制的行動との関連があるのか、今後検討を進める必要がある。



(3) 前頭葉ミクログリア活性の違い

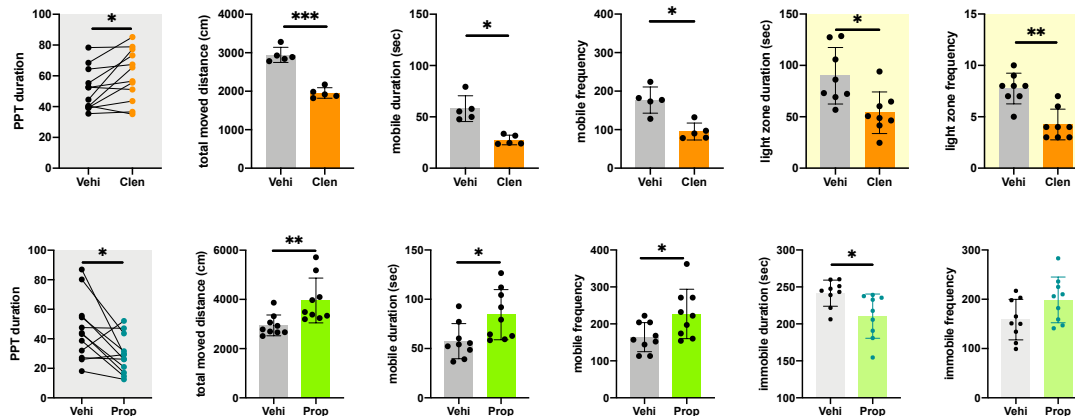
前頭葉ミクログリアを FACS で分析したところ、若干ではあるが、細胞サイズを示す FS や細胞内構造の複雑性を示す SS の値が Winner 群で上昇しており、また貪食マーカーである CD68 の発現も Winner で上昇していた。下図のウェスタンブロッティングは、ソーティングしたミクログリアを泳動して得たもので、Winner のミクログリアからはより多くのシナプスタンパク質を取り込んでいることが示さ

れている。この結果は、Winner のミクログリア活性が Loser より高く、その結果として PSD95 を発現する様な興奮性シナプスの貪食が過剰に生じて、行動が抑制されているものと考えられる (Jogamoto et al. 2020)。



(4) 薬物投与によるミクログリア活性の変化と PPT への影響

ミクログリアは LPS の様な起炎症性活性化は主にアドレナリン $\beta 2$ 受容体を介したシグナルにより抑制される。一方、LPS の様な刺激がない場合は、逆に活性化される場合がある。本研究では、脳移行性 $\beta 2$ 受容体アゴニスト、クレンブテロールによるミクログリア活性化と β ブロッカー、プロプラノロールによる抑制をおこなった場合のラットの行動変化を観察した。下図、オレンジはクレンブテロール、グリーンはプロプラノロール投与の結果を示す。クレンブテロールを投与すると PPT でオスに好かれる様になり、プロプラノロール投与でオスはあまり接近しなくなることがわかる。オープンフィールド試験や明暗箱試験で、クレンブテロールはメスラットの行動抑制を、プロプラノロールは行動の活性化を引き起こした。



これらの結果は、メスラットがオスから好かれるかどうかの少なくとも一部は、ミクログリアの活性によりコントロールされていることを示す。

<参考文献>

Choudhury et al. *Glia* 68 (2020) 44-59; Ishii et al. *Neurochem Int* 90 (2015) 56-66; Jogamoto et al. *Neurochem Int* 141 (2020) 104857; Miyanishi et al. *Neurochem Int* 122 (2019) 38-46.; Miyanishi et al. *Neurochem Int* 142 (2021) 104901; Mori et al. *Neuropharmacology* (2002) 43: 1026-1034; Yanguas-Casás et al. *Glia* 66 (2018) 522-537

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Verkhatsky Alexei, Sun Dandan, Tanaka Junya	4. 巻 144
2. 論文標題 Snapshot of microglial physiological functions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104960 ~ 104960
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2021.104960	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Nishikawa Masahiro, Inoue Akihiro, Ohnishi Takanori, Yano Hajime, Kanemura Yonehiro, Kohno Shohei, Ohue Shiro, Ozaki Saya, Matsumoto Shirabe, Suehiro Satoshi, Nakamura Yawara, Shigekawa Seiji, Watanabe Hideaki, Kitazawa Riko, Tanaka Junya, Kunieda Takeharu	4. 巻 10
2. 論文標題 CD44 expression in the tumor periphery predicts the responsiveness to bevacizumab in the treatment of recurrent glioblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 2013 ~ 2025
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.3767	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 Takeda Haruna, Yamaguchi Teruaki, Yano Hajime, Tanaka Junya	4. 巻 145
2. 論文標題 Microglial metabolic disturbances and neuroinflammation in cerebral infarction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 130 ~ 139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2020.11.007	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 Miyanishi Kazuya, Sato Arisa, Kihara Nanako, Utsunomiya Ryo, Tanaka Junya	4. 巻 142
2. 論文標題 Synaptic elimination by microglia and disturbed higher brain functions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104901 ~ 104901
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2020.104901	査読の有無 有
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 Tanaka Junya, Takahashi Hisaaki, Yano Hajime, Nakanishi Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Generation of CSF1-Independent Ramified Microglia-Like Cells from Leptomeninges In Vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 24 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10010024	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 Jogamoto Toshihiro, Utsunomiya Ryo, Sato Arisa, Kihara Nanako, Choudhury Mohammed E., Miyanishi Kazuya, Kubo Madoka, Nagai Masahiro, Nomoto Masahiro, Yano Hajime, Shimizu Yusuke I., Fukuda Mitsumasa, Ishii Eiichi, Eguchi Mariko, Tanaka Junya	4. 巻 141
2. 論文標題 Lister hooded rats as a novel animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104857 ~ 104857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2020.104857	査読の有無 有
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 Murata Yukie, Sugimoto Kana, Yang Chihpin, Harada Kazuo, Gono Rina, Harada Teiji, Miyashita Yohei, Higashisaka Kazuma, Katada Ryuichi, Tanaka Junya, Matsumoto Hiroshi	4. 巻 140
2. 論文標題 Activated microglia-derived macrophage-like cells exacerbate brain edema after ischemic stroke correlate with astrocytic expression of aquaporin-4 and interleukin-1 alpha release	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104848 ~ 104848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2020.104848	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 Abe Naoki, Nishihara Tasuku, Yorozyua Toshihiro, Tanaka Junya	4. 巻 9
2. 論文標題 Microglia and Macrophages in the Pathological Central and Peripheral Nervous Systems	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2132 ~ 2132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9092132	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
--	---------------------------	-----------------------	----

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