

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23650190

研究課題名（和文）

精神活動に関与するミクログリアのサブタイプの同定とその脳移植による情動制御

研究課題名（英文）

Microglial subtypes: Identification and characterization of their roles in emotional functions

研究代表者

澤田 誠 (SAWADA MAKOTO)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：10187297

研究成果の概要（和文）：これまで実態が全くわからなかった脳の精神活動に関わるミクログリアのサブタイプを同定するために、ミクログリア株細胞のサブタイプや脳移行性を持つ骨髄前駆細胞から Hoxb8 遺伝子を指標にして精神機能調節に関わる細胞を同定し、選定した細胞を情動障害モデルマウスに注入して精神症状への関わりを調べた。まず申請者が樹立したミクログリア細胞株が低レベルながら Hoxb8 を発現していることが確認できた。次にこれを強制水泳うつ病モデルマウスに注入したところ、水泳後のストレス脆弱性が減弱した。したがって、ミクログリアはうつ病の発症に関係するストレス脆弱性の調節システムに関与し精神機能の発現に寄与している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Although Hoxb8-lineage microglia are indicated to be involved in the obsessive-compulsive disorder spectrum disorder, there are few lines of evidence between microglia and emotional regulation. In this project I indicated that cloned microglia and a part of bone marrow progenitor cells expressed Hoxb8. Injection of these cells directly into striatum improved stress-vulnerability in the forced-swimming stressed mice. These results suggest that microglia may be involved in stress-regulation of higher brain functions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：神経化学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学神経薬理学

キーワード：グリア細胞、ミクログリア、サブタイプ、精神活動、グリア神経関連

1. 研究開始当初の背景

2010年5月にミクログリアのサブタイプが精神疾患形成に関与する決定的な証拠が報告された (Cell 141 775-785 2010)。この報告はマウス Hoxb8 遺伝子のノックアウトを行うと脳の基質的变化は見られず正常発生するものの、ミクログリアのサブタイプの一部が欠損し、並行して精神活動の異常である衝動障害の一種の抜毛症の症状が発症する

というものであった。さらに、正常の骨髄を移植する事で脳内のミクログリアを補充すると症状が回復する事を示した、驚くべきものであった。

申請者はこれまでにミクログリアのサブタイプをマウス、ラットの脳から分離精製する方法を確立し (Protocol for Neural Cell Culture 4th 231-239 2009) その手法を応用して性質の異なる数種類のミクログリア株

細胞を樹立した。この株細胞は幼弱なミクログリアや骨髄前駆細胞に発現する表面抗原や遺伝子を発現し培養下で分岐上に誘導できるなど、マクロファージには見られない性質も持ち、血中に注入すると血液脳関門を越えて脳に浸潤する能力を持っている(特許:米国 6673605, 欧州 0949331, 国内 3410738, 4387108)。したがって精神活動の調節に関与するミクログリアのサブタイプと一致する性質を持っていると考えられる。さらに、申請者らは、脳のスライス培養や脳内移植法によりこれらのミクログリア細胞株を導入すると神経伝達の安定化や LTP 形成、ダメージを受けた申請細胞の保護作用を示すことを見いだしている(Neurosci 142, 87-96, 2006, JCBFM 27, 488-500, 2007)。

そこで申請者の確立したミクログリア株細胞やこれまでに同定済みの脳移行性を持つ骨髄前駆細胞中に精神活動に関与する細胞が存在すると考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究は、これまで実態が全くわからなかった脳の精神活動に関わるミクログリアのサブタイプの同定を目指すもので、①申請者が確立したミクログリア株細胞サブタイプ、②我々独自の手法で脳から分離したミクログリアサブタイプ、③脳移行性を持つ骨髄前駆細胞、の各細胞群から Hoxb8 遺伝子を指標にして精神機能調節に関わる細胞を同定し、選定した細胞を情動障害モデルマウスに注入して精神症状への関わりを調べることを行う。背景として、Hoxb8 のノックアウトによりミクログリアのサブタイプの一部が欠損し並行して精神活動の異常である衝動障害の一種の抜毛症の症状が発症するという報告がある(Cell 141 775-785 2010)。この欠損するミクログリアは新生仔期に脳に侵入する性質をもち、申請者が単離している株細胞の性質に酷似している。本研究により精神活動に関与するミクログリアが同定できれば精神疾患の発症メカニズムや高次脳機能調節のパラダイムシフトを惹起できると考える。

3. 研究の方法

(1) ①申請者が確立したミクログリア株細胞サブタイプ、②我々の開発した手法で脳から分離できるミクログリアサブタイプ、③これまでに同定している脳移行性を持つ骨髄前駆細胞、およびそれらを「活性化」した時の細胞について

1) Hoxb8 発現の有無

2) 我々が同定した骨髄とミクログリアに共通して発現する 7 種類 (RAI E3, HSERP, EN7, ufo, Hn1, B94 など、ただしマクロファージには発現していない遺伝子) (Glia

28;265, 1999)

3) 幼弱化細胞表面マーカー (EPOR, ERMP12, ERMP20)

を指標にして性質を調べる。この時、「活性化」は LPS や IFN などマクロファージ用活性を誘導する活性化ではなく、幼弱化を促進する因子である GM-CSF, IL-3, PMA などを用いる。それは、Hoxb8 の発現が細胞譜系決定に関わる因子であり、成熟ミクログリアには見られない点である。このような刺激のタイプ別活性化を検討できるのは申請者らのアドバンテージである。

(2) 鬱病モデルマウス脳からのレーザーマイクロディセクションによるミクログリアサブタイプの切り出しと遺伝子発現プロファイリング: 情動障害モデルは強制水泳および幼若時アイソレーションによる 2 種類の鬱病モデルマウス (既に作製技術確立済み) から脳切片を作製し、ミクログリアのサブタイプを弁別的に染色できる抗体及びレクチン (ERMP12, EPOR, F4/80, Mac1 の抗体と RCA1, IB4 などのレクチン) で染色し、組織画像解析装置連動型のレーザーマイクロディセクション顕微鏡によりそれぞれを単一細胞として切り出して既報の方法で遺伝子発現プロファイリングを行う。

(3) 上記実験で同定した精神活動調節に関与する可能性のある候補となったミクログリアサブタイプまたは骨髄細胞分画を濃縮して PKH 2 6 などの蛍光色素で染色し、情動障害モデル (強制水泳および幼若時アイソレーションによる 2 種類の鬱病モデルマウス) 脳内に移植する。移植後、経時的に 4 8 時間行動解析を行い、鬱状態の評価を行う。

4. 研究成果

ミクログリアのサブタイプのうち精神機能調節に関わる細胞を同定する目的の第一段階として Hoxb8 遺伝子の発現について調べた。申請者が独自に確立した 2 種類の性質の異なる株化ミクログリア 6-3 及び Ra2、骨髄細胞に濃度差と時間差の条件を変えて M-CSF, GM-CSF, IL-3 など刺激因子を加え、Hoxb8 の発現量を RT-PCR 法を用いて調べた。その結果、6-3 および Ra2 に IL-3 を加えたサンプルで Hoxb8 が増加する事が確認できた。骨髄細胞に対してはいずれの刺激もコントロールより Hox b 8 の発現量を低下させるが、IL-3 を加えると他の刺激より発現量が多い事が確認できた。Hoxb8 は脳に広範に分布するが発現量が低く、脳内で Hoxb8 を発現している細胞の種類を確認するのは困難である。申請者が開発したミクログリア株細胞は Hoxb8 発現からみると単球より未分化な状態であり、適度な IL-3 刺激でミクログリアの Hoxb8 の発現を増大させる事がわかった。また骨髄細胞に対しても、IL-3 による刺激では他の

MCSF や GMCSF といった刺激より Hoxb8 を増加させる傾向を示した。以上より IL-3 による支配での分化の段階で Hoxb8 の発現が強まる可能性が示唆された。したがって、ミクログリアのサブタイプのうち Hoxb8 を発現し精神機能調節に関わる細胞は脳組織から単離培養できるミクログリアより未分化形質を維持している可能性が考えられる。

そこで、うつ病モデルマウスの脳に Hoxb8 発現細胞を注入する実験を行った。マウスうつ病モデルは強制水泳法で行い、強制水泳処理後 1 日目と 2 日目の無動時間 (秒) を測定しその変化によりストレス脆弱性 (2 日目の無動時間 / 1 日目の無動時間) を計測した。実験はミクログリア細胞 1×10^6 個を線条体に投与し、投与 8 日と 7 日前および 7 日と 8 日後にマウスの強制水泳後の無動時間について測定した。その結果、ミクログリア投与により①強制水泳後の無動時間が約 1/3 に短縮された②強制水泳後 2 日目の無動時間の変化が抑制された③ストレス脆弱性が改善された (スコア 3.2 から 1.4, $p=0.16$)。一方、注入したミクログリアはほぼ注入した線条体に集積して確認され、その一部の細胞に Hoxb8 タンパク質が免疫染色により確認できた。ミクログリアを注入しなかった強制水泳マウスの線条体には Hoxb8 陽性細胞はほとんど検出できなかった。このとき、線条体神経細胞の Arc-dVenus 発現量に関してはその発現量が非常に低く、変化が確認できなかった。以上の結果から、ミクログリアはうつ病の発症に関係するストレス脆弱性の調節システムに関与し精神機能の発現に寄与している可能性が考えられた。今回使用したミクログリア細胞株は iNOS の発現や神経栄養因子発現のプロファイルに差があるため、ミクログリアのサブタイプの違いを反映していると考えているが、両者とも Hoxb8 遺伝子を発現しているため、2010 に報告された Hoxb8 遺伝子ノックアウトでみられる精神機能障害に関与するサブタイプに属すると考えられる。今後、Hoxb8 を発現しないミクログリアとの役割の違いを明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Oishi K, Miyamoto Y, Saito H, Murase K, Ono K, Sawada M, Watanabe M, Noguchi Y, Fujiwara T, Hayashi S, Noguchi H: In vivo imaging of transplanted islets labeled with a novel cationic nanoparticle. PLoS One 8(2): e57046, 2013 査読有 10.1371/journal.pone.0057046
2. Oishi K, Noguchi H, Saito H, Yukawa H, Miyamoto Y, Ono K, Murase K, Sawada M, Hayashi S: Novel positive-charged nano-particles for efficient magnetic resonance imaging of islet transplantation. Cell Medicine 3(1-3): 43-49, 2012 査読有 <http://www.ingentaconnect.com/content/cog/cm>
3. Sakai A, Takasu K, Sawada M, Suzuki H: Hemokinin-1 gene expression is upregulated in microglia activated by lipopolysaccharide through NFkB and p38 MAPK signaling pathways. PLoS One 7(2): e32268, 2012 査読有 10.1371/journal.pone.0032268
4. Matsuura T, Mori T, Hasaka M, Kuno M, Kawawaki J, Nishikawa K, Nakanishi T, Sawada M, Asada A: Inhibition of voltage-gated proton channels by local anaesthetics in GMI-R1 rat microglia. The Journal of Physiology 590(Pt 4): 827-844, 2012 査読有
5. Denora N, Laquintana V, Trapani A, Suzuki H, Sawada M, Trapani G: New fluorescent probes targeting the mitochondrial-located translocator protein 18 kDa (TSPO) as activated microglia imaging agents. Pharmaceutical Research 28(11): 2820-2832, 2011 査読有
6. Fujita K, Yamaguchi Y, Mori T, Muramatsu N, Miyamoto T, Yano M, Miyata H, Ootsuyama A, Sawada M, Matsuda H, Kaji R, Sakaguchi S: Effects of a brain-engraftable microglial cell line expressing anti-prion scFv antibodies on survival times of mice infected with scrapie prions. Cellular and Molecular Neurobiology 31(7): 999-1008, 2011 査読有
7. Mizoguchi H, Nakade J, Tachibana M, Ibi D, Someya E, Koike H, Kamei H, Nabeshima T, Itohara S, Takuma K, Sawada M, Sato J, Yamada K: Matrix metalloproteinase-9 contributes to kindled seizure development in pentylene-tetrazole-treated mice by converting pro-BDNF to mature BDNF in the hippocampus. Journal of Neuroscience 31(36): 12963-12971, 2011 査読有
8. Shibata N, Kato Y, Inose Y, Hiroi A, Yamamoto T, Morikawa S, Sawada M, Kobayashi M: 4-hydroxy-2-nonenal upregulates and phosphorylates

cytosolic phospholipase A (2) in cultured Ra2 microglial cells via MAPK pathways. *Neuropathology* 31(2): 122-128, 2011 査読有

[学会発表] (計 15 件)

1. 澤田 誠: 光操作によるミクログリアの活性化. 第 90 回日本生理学会大会, 2013. 3(東京)
2. 澤田 誠: ミクログリアのサブタイプ、毒性転換と脳機能発現との関わり. 第 29 回Neuroscience Seminar Tokushima, 2013. 3(徳島)
3. 小野健治、山本龍生、佐橋秀紀、鈴木弘美、澤田 誠: チャネルロドプシン 2 を導入した OS3 グリア前駆細胞株における細胞分化の光制御. 第 85 回日本生化学会大会, 2012. 12(福岡)
4. Ono K, Yamamoto R, Sahashi H, Suzuki H, Sawada M: Optogenetic control of cell differentiation in channelrhodopsin-2 expressing OS3, a bipotential glial progenitor cell line. 第 35 回日本神経科学大会, 2012. 9(名古屋)
5. 澤田 誠: ミクログリアのサブタイプと毒性転換について. Japanese Consortium for Age-related Neurodegenerative disorders, 2012. 8(東京)
6. 澤田 誠: 光機能制御グリア細胞を用いた神経修復・髄鞘再生戦略. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012. 5(東京)
7. 澤田 誠: 血液脳関門を壊さない安全性の高い脳標的化技術 大学発・選り抜きバイオセミナー第 13 回, 2012. 2. (東京)
8. 澤田 誠: ヒトはなぜ夢をみるのか?, “名大カフェ” Science, and Me”, 2012. 2 (名古屋)
9. 澤田 誠: ミクログリアのサブタイプと毒性転換. 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所公開セミナー, 2012. 2(春日井, 愛知)
10. 澤田 誠: 光を使ってミクログリアの毒性転換をコントロールする. 第 8 回群馬大学名古屋大学合同シンポジウム. 2011. 12 (前橋)
11. 澤田 誠: 光を使ってミクログリアの毒性転換を調節する. 第 9 回神経科学研究会, 2011. 11 (東京)
12. 澤田 誠: 神経疾患モデルにおけるミクログリアの毒性転換と脳機能の画像化の試み. アステラス製薬バイオイメージング研究所・薬理研究所合同セミナー, 2011. 10 (筑波)
13. Ono K, Tabata K, Suzuki H, Sawada M:

Visualization of iNOS gene expression from activated cells in magnetic resonance imaging[[10122]]. 第 34 回日本神経科学大会 2011. 9 (横浜)

14. 澤田 誠: ミクログリアの毒性転換のイメージングとサブタイプ. ミクログリア研究会, 2011. 8 (神戸)
15. 澤田 誠: 細胞を使った脳の標的化技術と脳の機能イメージング, 第 19 回薬理学セミナー, 2011. 6 (名古屋)

[図書] (計 4 件)

1. 澤田 誠: なぜひとは夢をみるのか? 子供の科学 75(1): 12-21, 誠文堂新光社, 2012
2. 澤田 誠: てんかんとアストロサイト CLINICAL NEUROSCIENCE 29(11): 1289-1291, 中外医学社 2011
3. 澤田 誠、鈴木弘美、小野健治: ミクログリアによる BBB 非崩壊型の脳へのターゲティング DDS. 薬剤学 71(5): 259-267, 日本薬剤学会 2011
4. Sawada H, Suzuki H, Ono K, Imamura K, Nagatsu T, Sawada M: Role of microglia in inflammatory process in Parkinson's disease. *Etiology and Pathophysiology of Parkinson's Disease*: 329-348, Walters Kluwer Health 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 蛍光プローブ及びその製造方法
発明者: 小野健治、澤田誠、瀧真吾、竹田美和
権利者: 国立大学法人名古屋大学
種類: 特許
番号: 特願 2011-160261
出願年月日: 2011 年 7 月 21 日
国内外の別: 国内

名称: 蛍光プローブ及びその製造方法
発明者: 小野健治、澤田誠、瀧真吾、竹田美和
権利者: 国立大学法人名古屋大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2012/068111
出願年月日: 2012 年 7 月 17 日
国内外の別: 外国

○取得状況 (計 1 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 誠 (SAWADA MAKOTO)
名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：10187297

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者

小野 健治 (ONO KENJI)
名古屋大学・環境医学研究所・助教
研究者番号：80329698