

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15015

研究課題名(和文)「虐待脳」から学ぶ新たな仮説に基づく大脳皮質発達機構について

研究課題名(英文)Studies on cellular components underlying the cortex development

研究代表者

佐藤 真 (Sato, Makoto)

大阪大学・連合小児発達学研究所・教授

研究者番号：10222019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：実験を進めるに従い、予想外であったが「マイクログリアの活性化状態には3つ以上のフェーズが存在する」ことを支持する結果を得た。アルギニンメチル化酵素がこの活性化状態の遷移に本質的な役割をなうことを、CRISPR/Casのシステムをマイクログリア由来の細胞株に適用することで検証した。同時にPTSDの病態の脳内回路を解明するため、島皮質から前帯状回に投射しPTSDの病態に重要であるとヒトでの所見より想定されるが、高等哺乳類の脳にのみ存在するため実験的アプローチが困難とされていたvon Economo細胞の類似細胞が発現マーカーの検討により、げっ歯類島皮質にわずかであるが存在することを観察した。

研究成果の概要(英文)：Microglia is a well-known scavenger in the brain. Several lines of evidence suggest that microglia plays a pivotal role for the brain development through its phagocytic activity. We here observed that there exist several phases in the 'activated' microglia in terms of its scavenging activities in contrast to previous notion that only two activation phases exist. Furthermore, we confirmed that an involvement of one type of protein arginine N-methyltransferases in the phase transition by newly generating N-methyltransferases-null cells using CRISPR/Cas system. In addition, we identified the equivalent cells of von Economo neurons in mice by observing von Economo neuron-specific gene expression. It is known that von Economo neurons, which had been found only in the insular cortex of the highly evolved anthropoids, play crucial role for PTSD pathophysiology. Our identification of von Economo neuron-equivalent cells in mice allow us to study the pathophysiology of PTSD experimentally.

研究分野：解剖学

キーワード：神経科学 マイクログリア 脳・神経 von Economo neuron アルギニンメチル化酵素

1. 研究開始当初の背景

ストレスや虐待が脳の発達に多大な影響を及ぼす事は、PTSD(post-traumatic stress disorder)や愛着障害として良く知られている。しかしながら、その病態理解から治療法への展開については未だ十分ではない。

ストレスホルモン量の多寡がホルモン受容体を介し脳の発達に影響することや側坐核のシナプス部位においてストレスがAMPA受容体の動態に影響することは既に報告されている(Cell Symposium, 2012)。その一方で、PTSDではストレスにより大脳皮質の領野ごとに器質的変化(volume変化)まで生じる(Tomoda et al., Neuroimage, 2009)とされるが、このような現象が生じる仕組みはほとんど解明されていない。特にヒトにおいて、視覚から受けるストレスでは視覚野が、聴覚からのストレスでは聴覚野のvolume減少が起こる事実(いわゆる「虐待脳」)は、脳全体で一様に変化すると想定されるストレスホルモンのみでは説明がつかない。さらに、この「虐待脳」で想定される脳機能変化についての知見はほとんどない。一方、脳発達への関連がほとんど想定されていないマイクログリア(ミクログリア)であるが、正常脳発達においても、神経回路の組み換え(特にpruningの処理)などの局所での諸現象に関わるとの知見が報告され(Paolicelli, et al., Science 2011)、最近では大脳皮質において神経幹細胞の数の制御に関わるデータ(Noctor 研より Soc. Neurosci, 2012にて発表)まで明らかとなり、脳発達や脳volumeへのマイクログリアの関与が大いに注目されている。また、ストレスがマイクログリアの発生・発達に大きな影響を与えることも報告されている(Gomez-Gonzalez and Escobar, Acta Neuropathol., 2010)。

2. 研究の目的

本研究では「脳の発達に関わるマイクログリアがストレスホルモンの受け皿となり、かつ大脳皮質領野局所の刺激により局所に集積し、PTSDなどで見られる脳の器質的変化をもたらす」との仮説の検証を進め、マイクログリアの制御法の確立を目指すことを目的とする。

なお、研究の進行に伴い、また挑戦的萌芽研究の枠組みでの研究でもあり、得られた結果に基づき目的も一部変更し成果を得るべく研究を実施した。

3. 研究の方法

当初、「虐待脳」の病態を解明するため「PTSDなどで見られる脳の器質的変化は、脳の発達に関わるマイクログリアがPTSDのストレスの受け皿となり(ストレスホルモンにより一定程度活性度が上昇し)、さらに関係する大脳皮質局所の刺激により、局所に(貪食能の高い)マイクログリアが集積し生じ

る」との仮説を検証する。さらに、同病態から想定される「局所のマイクログリアが局所の神経発達に大きく影響する」との仮説を検証するとして実験の計画を立てた。

(1) PTSDのモデルを確立する。

(2) マイクログリアには非活性化状態と貪食作用を活発に行う活性化状態が存在する。そこで、マイクログリアがPTSDのストレスに対応し活性度が変化するかを検討する(ストレスホルモンでマイクログリアの活性化状態が変化するかを検討する)。

(3) (過度の)神経活動によりマイクログリアの集積度が脳局所で変化するかを検討する。

(4) PTSDでみられる脳の器質的変化にマイクログリアが直接かかわるかについてモデルマウスで検討する。

4. 研究成果

本研究は「マイクログリアは活性化し、貪食能をもつ」ことを前提としている。これは過去の他の研究者の報告に基づいてのものである。マクロファージに活性化が異なるM1およびM2と呼ばれる段階があるとの研究にならぬ、マイクログリアの活性化においても、同様にM1様とM2様の二つの活性化状態があるとの考えが研究開始当初、いわゆる通説として広く認められていた。そして、上述のように、我々の研究もこの仮説を拠り所としていた。しかしながら、本研究の準備研究を進める中で、この事実が必ずしも正しくないとの予備実験結果を得た。すなわち、マイクログリアには貪食作用を活発に行う活性化状態と、貪食をほとんど行わない非活性化状態が存在するのみならず、活性化状態と一般に判断される状態においても(活性化状態に特異的とされるマーカーを発現する状態においても)、その中には実は貪食があまり活発ではないフェーズが含まれること、すなわちM2様状態には二つのフェーズがあるとのデータを得た。さらには、このフェーズ間の移行には、アルギニンメチル化酵素が関与することを示唆するデータも得た。

ちなみに本研究実施中に、マイクログリアの活性化状態を単純にM1およびM2に分類するとの考えは正しくない(Ransohoff, RA Nature Neuroscience, 19: 987-991, 2016)との見解の発表は、我々の観察結果を後押しするものであった。

我々の観察結果は本研究の方向性を決める重要な内容であるが、予備実験の段階では、結果にばらつきがあった。そこで、まず上記データの是非の確認から、実際の研究をスタートさせた。あわせて、PTSDモデル動物の作成を進めることとした。これは当初の想定とは異なる内容も含むが、本研究が挑戦的萌芽研究であることより、研究実施は可能と判断し実施した。

(1) 該当アルギニンメチル化酵素欠損細胞株を作成し、その働きを検討した。

ノックダウン実験では結果がゆらぐことがあったため、より恒常的に分子の欠損を行い観察する必要があると考えた。そのため、CRISPR/Cas のシステムを用い、マイクログリア由来の細胞株において該当アルギニンメチル化酵素の欠損細胞株を作成した。その結果、この細胞株では、M2 状態がさらに二つのフェーズに分かれる現象は観察されなかった。それ故、アルギニンメチル化酵素が関与し、M2 状態が二つのフェーズに分かれ得るとの我々の観察は正しいと検証できた。

(2) PTSD に関与する脳内回路の検討

本研究は、PTSD の病態解明を本来の目的としていた。そのため、PTSD の病態解明は重要な課題と考え、併せて以下の実験をおこなった。すなわち、ヒト脳の解析により、島皮質吻側部から前帯状回へと伸びる回路は PTSD との関連性が強いと報告されている。そして、その回路は高等哺乳類の島皮質にのみ存在する、いわゆる von Economo 細胞が関与するとされている。しかし、いわゆるげっ歯類では形態学的に同定される von Economo 細胞がないため、動物実験でその細胞の機能を解明することが困難であった。われわれは、von Economo 細胞に特異的に発現する分子マーカーを検討し、形態学的には von Economo 細胞の特徴である紡錘型は取らないものの、分子発現動態では von Economo 細胞様の細胞が少数ながら島皮質近傍に存在することを見出した。今後、この細胞の投射路などの解明をすすめ、PTSD の病態解明にアプローチする予定である。

5. 主な発表論文等

Yagi, H., Takabayashi, T., Xie, M.-J., Kuroda, K., Sato, M. (2017) Subcellular distribution of non-muscle myosin IIb is controlled by FILIP through Hsc70. PLoS ONE 12(2):e0172257. doi: 10.1371/journal.pone.0172257.

Seno, T., Ikeno, T., Mennya, K., Kurishita, M., Sakae, N., Sato, M., Takada, H., Konishi, Y. (2016) Kinesin-1 sorting in the axonal arbor controls differential retraction of branches. J. Cell Sci. 129(18):3499-3510. doi: 10.1242/jcs.183806.

Kosaka, H., Okamoto, Y., Munesue, T., Yamasue, H., Inohara, K., Fujioka, T., Anme, T., Orisaka, M., Ishitobi, M., Jung, M., Fujisawa, T.X., Tanaka, S., Arai, S., Asano, M., Saito, D.N., Sadato, N., Tomoda, A., Omori, M., Sato, M., Okazawa, H., Higashida, H., Wada, Y. (2016) Oxytocin efficacy is modulated by dosage and oxytocin receptor genotype in young adults with high-functioning autism: A 24-week randomized clinical trial. Transl. Psychiatry 6(8):e872. doi: 10.1038/tp.2016.152.

Fujioka, T., Inohara, K., Okamoto,

Y., Masuya, Y., Ishitobi, M., Saito, D.N., Jung, M., Arai, S., Matsumura, Y., Fujisawa, T. X., Narita, K., Suzuki, K., Tsuchiya, K. J., Mori, N., Katayama, T., Sato, M., Munesue, T., Okazawa, H., Tomoda, A., Wada, Y., Kosaka, H. (2016) Gazefinder® as a clinical supplementary tool for discriminating between autism spectrum disorder and typical development in male adolescents and adults. 7:19 Mol Autism, doi:10.1186/s13229-016-0083-y

Yagi, H., Oka, Y., Komada, M., Xie, M.J., Noguchi, K., Sato, M. (2016) Filamin A interacting protein plays a role for proper positioning of callosal projection neurons in the cortex. Neurosci. Lett. 26:612:18-24. doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.049

[学会発表](計24件)

M, Xie, Phosphoinositide responsive phldb2 regulates synaptic plasticity、Neuroscience 2016, SfN's 46th annual meeting, 2016年11月13日、San Diego convention center (San Diego, U.S.A.)

森泰文、PRMT1-dependent arginine methylation on hnRNP K regulates dendritic transport of alpha CaMKII mRNA. 第39回日本神経科学大会、2016年7月21日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

岡 雄一郎、Visualization and developmental analysis of the inter-areal connections in the mouse cortex using a new method for sparse labeling, 第39回日本神経科学大会、2016年7月21日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Oka, Y.、A new method to amplify the reporter expression in the Cre/loxP system applicable to cortical development study、21st Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience、2016年5月11日、Palais des Congres d'Antibes Juan les Pins (Palais des Congres d'Antibes Juan les Pins, France)

猪口 徳一、DBZ は Ndel1 のリン酸化修飾制御を通して軸索伸長および皮質神経細胞の配置に関与する、第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016年3月28日~30日、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

小西 慶幸、微小管と軸索輸送の制御を介した軸索形態の維持システム、第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016年3月28日~30日、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

熊本 香名子、逆行性物質輸送が神経ネットワーク形成に与える影響について、第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016年3月28日~30日、ビッグパレット

ふくしま(福島県郡山市)

森 泰文、RNA 結合タンパク質 hnRNP K のアルギニンメチル化修飾を介した mRNA 輸送制御機構の解明、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016 年 3 月 28 日～30 日、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

謝 敏カク、膜脂質結合タンパク質 Phldb2 を介した AMPA 受容体局在制御機構、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016 年 3 月 28 日～30 日、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

Makoto, S.(招待講演) Development of Axon Collaterals as the Inter-Areal Connection in the Cerebral Cortex、7th Asia Pacific International Congress of Anatomists、2016 年 3 月 17 日～20 日、National University of Singapore (Singapore)

Kuroda, K.、FILIP-related molecule binds to NMDA receptor and controls spine maturation and synaptic function of the hippocampal neuron、Neuroscience 2015 SfN's 45th annual meeting、2015 年 10 月 17 日～21 日、McCormick Place (Chicago, U.S.A.)

Oka, Y.、Arginine methylated form of hnRNP K variant mediates a dendritic localization of CaMKII mRNA、Neuroscience 2015 SfN's 45th annual meeting、2015 年 10 月 17 日～21 日、McCormick Place (Chicago, U.S.A.)

Iguchi, T.、DISC1-binding zinc finger protein (DBZ) regulates cortical cell positioning and neurite elongation through control of Ndel1 dual-phosphorylation、Neuroscience 2015 SfN's 45th annual meeting、2015 年 10 月 17 日～21 日、McCormick Place (Chicago, U.S.A.)

佐藤 真(招待講演)、Oxytocin and more: what we have learned from the brain development and its disorders、第 58 回日本神経化学学会大会、2015 年 9 月 11 日～13 日、大宮ソニックシティ(埼玉県大宮市)

岡 雄一郎、Development of axon collaterals as the inter-areal connections in the cerebral cortex、第 58 回日本神経化学学会大会、2015 年 9 月 11 日～13 日、大宮ソニックシティ(埼玉県大宮市)

森 泰文、Functional analysis of protein arginine N-methyltransferase 8 (PRMT8) in activated microglia that are induced by spinal cord injury、第 58 回日本神経化学学会大会、2015 年 9 月 11 日～13 日、大宮ソニックシティ(埼玉県大宮市)

佐藤 真(招待講演) 疾患に学ぶ脳内の情報統合基盤とその形成、第 59 回「脳の医学・生物学研究会」、2015 年 8 月 1 日、名古屋大学鶴友会館(愛知県名古屋市)

謝 敏カク、Phldb2 はスナプスの可塑性を制御する、第 38 回日本神経科学大会、2015

年 7 月 28 日～31 日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)

黒田 一樹、海馬神経細胞における NMDA レセプタに結合する FILIP 関連分子の機能解析、第 38 回日本神経科学大会、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日～31 日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)

岡 雄一郎、皮質ニューロン軸索側枝による領野間結合の発達、第 38 回日本神経科学大会、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日～31 日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)

② 森 泰文、hnRNP K のサブタイプ特異的なアルギニンメチル化が mRNA の樹状突起への輸送を制御する、第 38 回日本神経科学大会、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日～31 日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)

② 猪口 徳一、受容体チロシンキナーゼとその反発性結合分子は脳内で相補的に発現することで軸索側枝の投射様式を制御し皮質 橋 小脳路の形成に関わる、第 38 回日本神経科学大会、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日～31 日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)

③ 佐藤 真(招待講演) 脳発達とその破綻に学ぶ脳の機能基盤への新たなアプローチ、第 31 回北海道大学脳科学研究教育センターシンポジウム、2015 年 7 月 21 日、北海道大学(北海道札幌市)

④ 佐藤 真(招待講演) 発達障害の病態解明に向けた新たなアプローチについて、第 57 回日本小児神経学会学術集会、2015 年 5 月 28 日、帝国ホテル大阪(大阪市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.anat2.med.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 真 (Sato, Makoto)

大阪大学・連合小児発達学研究所・教授

研究者番号：10222019

(2) 研究分担者

森 泰文 (MORI, Yasutake)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00343252

岡 雄一郎 (OKA, Yuichiro)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：30614432

猪口 徳一 (IGUCHI, Tokuichi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60509305