

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2023

課題番号：17K01980

研究課題名(和文)海馬依存的学习におけるミクログリアの生理的役割の解明

研究課題名(英文)Studies of physiological role of microglia on hippocampus-dependent learning

研究代表者

明間 立雄 (Akema, Tatsuo)

聖マリアンナ医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：60128585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：海馬の担う高次機能にミクログリアがどのように関わっているのかわかるようにするために、ミクログリアを時期依存的、空間依存的に操作することにした。ミクログリアにAdeno-associated Virus (AAV)を発現させることを試みた。まずセロタイプを決めるため、AAV1, 2, 3, 4, 5, 6, 6.2, 7, 8, 9, Rh10, DJ/8は、ニューロンでは発現が見られたが、ミクログリアには発現が認められなかった。そこで、報告されている、AAV6-CD68やAAV2/6TM6-Iba1発現を観察したが、ミクログリアには発現を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海馬の担う高次機能のみならず、ミクログリアは様々な脳機能に関与し、また、疾患に起因することから、その役割を解明していくことは学術的に重要である。脳を健康に保つことは、健康な生活を維持していく上で重要なことであり、従ってミクログリアの生理的な役割や病態における関与を明らかにしていくことは社会的に意義のあることになると推測される。

研究成果の概要(英文)：To clarify possible involvement of microglia in spatial learning by the hippocampus, we tried to express adeno-associated virus as time- and spatial-dependent manner. To determine serotype of AAV, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAV Rh10, AAV DJ/8 were injected with the brain, and found that they were expressed neurons but not microglia. It was reported that AAV6-CD68 or AAV2/6TM6-Iba1 was expressed in microglia, but we could not confirm it.

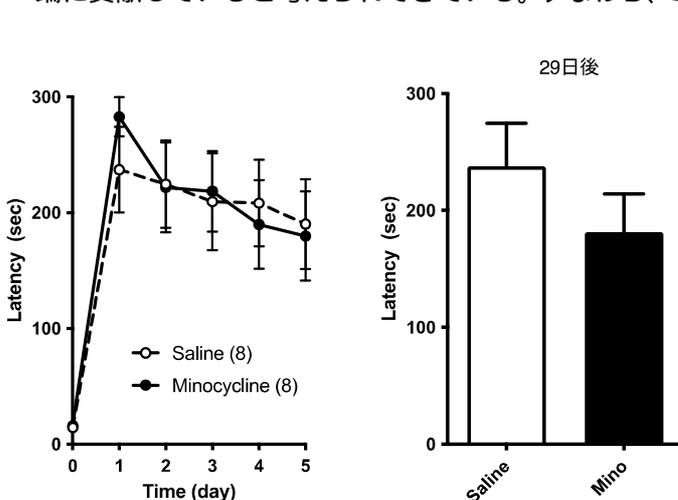
研究分野：神経科学

キーワード：ミクログリア AAV Cre-LoxP DREADD dTA 高次機能 シナプス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来研究対象にされていたニューロンのみならず、グリア系の細胞が中枢神経系の機能の発現や調節に重要な役割を演じていることが近年注目されている。わけてもマイクログリアが免疫系のみならず、生理機能の調節に深く関わっていることが推測されている。特に、記憶や学習と言った高次機能は、シナプスを中心として語られていたが、最近では、マイクログリアもその一端に貢献していると考えられてきている。すなわち、これまで中枢神経系に発現するマイクロ



グリアは、病的な状態で活性化し、シナプスや神経軸索に起因する病態に関与していると考えられてきたが、正常な状態でも役割を演じていることが示唆されている。この左の図は、研究代表者らのデータであるが、受動的回避実験において、マイクログリアに非選択的な阻害効果を示すミノサイクリンが受動的回避実験において、当初は効果がないが、より長期的な記憶の定着において抑制作用がある可能性を示唆する結果を得ている。すなわち、学習の獲得機序に影響している可能性が示唆された。受動的回避に限らず恐怖条件

づけなどは、記憶の定着のみならずその消去も、心的外傷後ストレス障害とのかかわりにおいても注目されている。いずれにしても我々は、通常の記憶や学習におけるマイクログリアの役割に興味をもった。

2. 研究の目的

本研究は、病的な状態ではなく、正常な記憶、学習の過程にマイクログリアがどのように関与しているのかを明らかにすることを目的としている。そのために、海馬のマイクログリアのみを選択的に抑制、または、促進して、海馬の担う学習機能、恐怖条件づけや、受動的回避実験、モリス水迷路、Y迷路に対する作用を検討する。

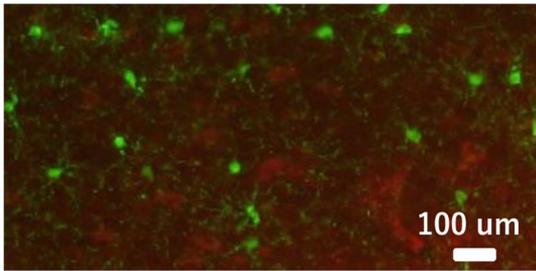
3. 研究の方法

細胞特異的、部位特異的、時期特異的に遺伝子を動かすために、最近、よく用いられているのは、細胞特異的に発現している遺伝子の下流に Cre を発現する knock in ドライバー動物を用意し、adeno-associated virus (AAV) を用いて、光遺伝学や Designer receptors exclusively activated by designer drugs システム、Toxin receptor-mediated cell knockout 法を利用するために蛋白を発現させ、光や、選択的リガンドでその細胞の活動を制御する。後者のジフテリアアトキシンサブユニット (dTA) を用いた実験では、その細胞を選択的に死滅、欠損させる。

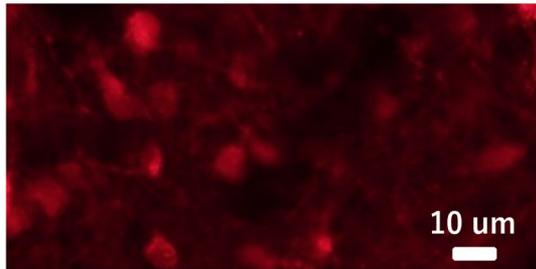
マイクログリアに関して、動物は、CX3CR1-Cre ラットを用いる (LE-Tg(OTCC1005CX3CR1-Cre-ERT2, RRRRC#00858)。CX3CR1 遺伝子は、マイクログリア細胞にのみ発現している。本研究の根幹はマイクログリアに選択的に感染する AAV である。無論、マイクログリアのみに感染しなくても、少なくともマイクログリアを含んで感染すれば、Cre を発現しているのはマイクログリアのみなので、Cre-Lox P システムを使うので、Lox P 配列で動くのは Cre を発現している細胞のみ、つまり、マイクログリアのみとなる。Cre-Lox P システムでは、Cre は Lox P の配列を認識して、Lox P 配列ではさまれた領域を切り出すか、逆転させる。例えば mCherry/dTA を DUO 配列ではさむと、Cre を発現する細胞では DUO 配列ではさまれた領域が逆転し dTA が発現するようになるし、通常の Cre を発現しない細胞では mCherry のみを発現する。

4. 研究成果

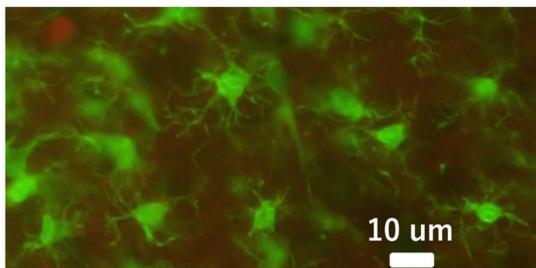
まず、マイクログリアに感染する AAV のセロタイプの同定を試みた。そして、AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAV-Rh10, AAV DJ/8 は、ニューロンには発現量の差はあるが感染していたが、マイクログリアには全く発現していなかった。そこで、近年、



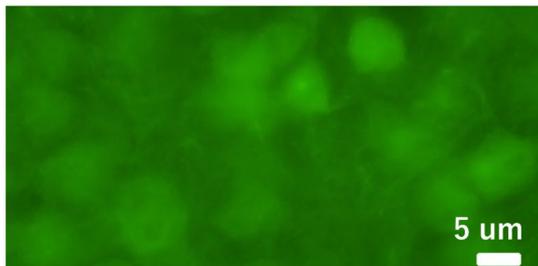
緑蛍光色のマイクログリアマーカーのIba1とAAVの赤蛍光色のmCherry。AAV-mCherryの発現は極めて低く、少なくともマイクログリアには感染していない。



赤蛍光色（mCherry）陽性細胞はAAVに感染しているが形状はニューロン



緑蛍光色のマイクログリアマーカーのIba1とAAVの赤蛍光色のmCherry。AAVの発現は極めて低く、少なくともマイクログリアには感染していない



緑蛍光色陽性の細胞はAAVに感染している。プロモーターはCMV

開発されマイクログリアに発現するセロタイプの AAV6TM (Rosario et al, Mol Ther Methods Clin Dev, 2016)-Iba1-mCherry を作成して、脳に投与した。3 週間後、ホルマリン還流固定後、定型的に脳内の発現を観察した。緑色のマイクログリアマーカーの Iba1 免疫陽性細胞は数多く観察されたが、AAV の感染の指標となる mCherry 陽性細胞は、少なくともマイクログリアには発現が認められなかった。一つの原因として、Iba1 という他のプロモーターより弱いものを使ったこと、AAV6TM がマイクログリアに選択性がなかったことなどが考えられた。

次に、脊髄のマイクログリアに選択的に発現することが報告された (Grace et al, Proc Natl Acad Sci USA 2016) AAV9-CD68 hM4D (Gi) mCherry (Add gene#75033) を試みた。赤蛍光色の mCherry は AAV が感染していることを示している、すなわち、mCherry 陽性細胞は明らかにマイクログリアではなく、形状はニューロンであった。

そこで、新たに開発されたセロタイプとして AAV MG1.2 の発現を試みた (Add gene #184541, Lin et al, Nat Methods 2022)。用いたプラスミドは、AAV MG1.2 SFFV-DIO-mCherry である。これは新たなプロモーターとして論文から SFFV を試みた (Lin et al, Nat Methods 2022)。左の図から明らかなように、緑蛍光色の Iba1 陽性のマイクログリア細胞に mCherry 陽性の赤蛍光色はなく、また mCherry 自体、発現が極めて乏しかった。これは、AAV のタイターが低すぎた結果と考えた。そこで、タイターを上げる工夫をしてプラスミドを CMV-eGFP したところ、首尾よく緑蛍光色の AAV の発現は認められたが、明らかにニューロンであった。現在、プラスミドを SFFV プロモーターに変えてより高いタイターにすべく改良を重ねている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hagiwara Hiroko, Sakimura Kenji, Abe Manabu, Itoi Keiichi, Kamiya Yoshinori, Akema Tatsuo, Funabashi Toshiya	4. 巻 1773
2. 論文標題 Sex differences in pain-induced modulation of corticotropin-releasing hormone neurons in the dorsolateral part of the stria terminalis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 147688 ~ 147688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2021.147688	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 Ogura Yuji, Kakehashi Chiaki, Yoshihara Toshinori, Kurosaka Mitsutoshi, Kakigi Ryo, Higashida Kazuhiko, Fujiwara Sei-Etsu, Akema Tatsuo, Funabashi Toshiya	4. 巻 15 (10)
2. 論文標題 Ketogenic diet feeding improves aerobic metabolism property in extensor digitorum longus muscle of sedentary male rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-16, e0241382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0241382	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 Kubota Takafumi, Fukushima Atsushi, Hagiwara Hiroko, Kamiya Yoshinori, Furuta Miyako, Miyazaki Tomoyuki, Fujioka Hitomi, Fujiwara Sei-Etsu, Funabashi Toshiya, Akema Tatsuo	4. 巻 671
2. 論文標題 Short-term fasting decreases excitatory synaptic inputs to ventromedial tuberoinfundibular dopaminergic neurons and attenuates their activity in male mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 70 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2018.02.017	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 Kubota T, Fukushima A, Hagiwara H, Kamiya Y, Furuta M, Miyazaki T, Fujioka H, Fujiwara SE, Funabashi T, Akema T	4. 巻 671
2. 論文標題 Short-term fasting decreases excitatory synaptic inputs to ventromedial tuberoinfundibular dopaminergic neurons and attenuates their activity in male mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurosci Lett.	6. 最初と最後の頁 70-75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2018.02.017	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 Fujioka H, Funabashi T, Akema T	4. 巻 360
2. 論文標題 Prostaglandin E2 modulates presynaptic regulation of GnRH neurons via EP4 receptors in accordance with estrogen milieu	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 139-145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2017.07.025	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Hitomi FUJIOKA, Atsushi, FUKUSHIMA, Toshiya FUNABASHI, Tatsuo AKEMA
2. 発表標題 Involvement of kiss-1 neurons in the suppression of LH surge by LPS and amelioration of this suppression by minocycline pretreatment in ovarian steroid-primed ovariectomized rats
3. 学会等名 第42回神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Ogura, Mitsutoshi Kurosaka, Chiaki Kakehashi, Ryo Kakigi, Tatsuo Akema, Toshiya Funabashi
2. 発表標題 Ketogenic diet induces slow-type shift of skeletal muscle in male rat
3. 学会等名 FAOPS2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Ogura, Mitsutoshi kurosaka, Tatsuo Akema, Toshiya Funabashi
2. 発表標題 Involvement of early growth response 3 in myoblast proliferation
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M Furuta, A Fukushima, T Akema, T Funabashi
2. 発表標題 The effect of maternal experiences on spatial learning and hippocampal neural plasticity
3. 学会等名 The 48th Society for Neuroscience
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤岡仁美、船橋利也、明間立雄
2. 発表標題 LPS急性ストレスによるGnRHサージ発生機構の活動抑制とミノサイクリン前投与による抑制解除へのkiss1ニューロンの関与（口頭発表，一般） 2018/10/27
3. 学会等名 第45回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小倉 裕司, 黒坂 光寿, 明間 立雄, 船橋 利也
2. 発表標題 骨格筋再生過程におけるTRPV1の役割
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大野真弘, 藤谷博人, 後藤勝正, 黒坂光寿, 小倉裕司, 谷田部かなか, 工藤貴章, 小林創, 内野彩, 油井直子, 船橋利也, 幸田和久, 明間立雄, 仁木久照, 武者春樹
2. 発表標題 ACL切断ラットにおける膝関節周囲筋群の長期経過観察 ACL切断肢, 対側肢および健常肢の比較
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小倉裕司, 黒坂光寿, 明間立雄, 船橋利也
2. 発表標題 Egr3はNF-kB経路を介して筋芽細胞の増殖を制御する
3. 学会等名 第72回日本体力医学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 松尾 理 編集、船橋利也、藤岡仁美 分担執筆	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 437
3. 書名 QUICK生理学・解剖学	

1. 著者名 岡田 隆夫 編集、船橋利也、藤岡仁美 分担執筆	4. 発行年 2022年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 368
3. 書名 生理学	

〔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
研究分担者	藤岡 仁美 (Fujioka Hitomi) (50410064)	聖マリアンナ医科大学・医学部・講師 (32713)	ウイルス投与、免疫組織

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	船橋 利也 (Funabashi Toshiya) (70229102)	聖マリアンナ医科大学・医学部・教授 (32713)	ウイルス設計、実験デザイン

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