

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06457

研究課題名(和文) グリア細胞によるシナプスリファインメントが及ぼす脳機能・病態発現機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of brain function and pathogenesis induced by glial cell-mediated synaptic refinement

研究代表者

森澤 陽介 (Morizawa, Yosuke)

東北大学・生命科学研究科・JSPS特別研究員(PD)

研究者番号：50772167

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)：神経回路(シナプス)の再編成は、正常時には学習・記憶の礎となるが、病態時には不適切な神経回路の形成を促し、病態発現を引き起こす。本研究では、シナプス消失機構の解明を目指した。機構の候補として、周囲に存在するグリア細胞によるシナプスの貪食・除去が挙げられる。しかしながら、貪食された構造体は速やかに消化されるため検出が難しいという難点があった。この問題を解決するため、哺乳類細胞で消化されづらい蛍光プローブを細胞種特異的、時期特異的に発現する遺伝子改変マウスを作出し、標的の神経細胞に発現させることによって、発達期や学習時、脳傷害時の周囲のグリア細胞の貪食性を定性的、定量的に評価できる系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

貪食を可視化する新規遺伝子改変マウスの作出およびその有用性について詳細に解析・評価を行い、従来、貪食性細胞として注目されていなかった細胞による神経回路再編が、発達後の脳内でも盛んに生じていることを明らかにした。コミュニティ内で渴望されてきた新ツールの開発・提供により、他疾患モデル等におけるシナプス貪食の探索型の研究が可能となるだけでなく、神経回路再編以外にも様々な貪食研究に応用可能な有益なツールと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neural circuits (synapses) remodeling is the fundamental process of learning and memory in the normal brain. In pathological conditions, it could promote the formation of inappropriate neural circuits and cause pathological deficits. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of synapse loss.

One possible mechanism is removal of synapses by surrounding glia through phagocytosis. However, the phagocytosed materials are rapidly digested, making them difficult to detect. To solve this problem, we generated new transgenic mice line that express fluorescent probes, which are relatively resistant to mammalian lysosomes, in a cell type- and timing-specific manner. By expressing these probes on target neurons, we established a new tool that can qualitatively and quantitatively evaluate the phagocytosis of surrounding glial cells during development, learning, and brain injury.

研究分野：神経化学

キーワード：貪食 グリア アストロサイト ミクログリア 神経回路再編 シナプスリモデリング シナプス除去

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

不要な神経回路を除去し、淘汰する過程は、適切な神経回路網の形成・動作、ひいては記憶などの脳機能発現に重要な過程と考えられる。しかしながら、神経回路の新生に比べ、この過程がどのようなメカニズムで実行されるかは十分に検討されていない。我々のグループを含む近年の研究から、ミクログリアやアストロサイトのようなグリア細胞の貪食によるシナプス刈り込みが、発達期や病態時に生じる大規模なシナプス除去のメカニズムの一つであることが示唆されている。一方で、正常の成体マウス脳内では、(1) シナプスのリモデリング頻度が低いこと、(2) 貪食された物質やその抗原は貪食細胞内ですぐに分解されてしまうために、その瞬間を捉えることや、追跡することは困難であるという問題点があった。

2. 研究の目的

神経回路リモデリングにおけるグリア細胞貪食の関与を検討するため、非侵襲的に貪食を可視化できるツールを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

オートファジー研究から着想を得て、リソソーム内プロテアーゼに対して耐性のある蛍光タンパク質 Keima 変異体、pHRed を神経細胞のサブセットに発現させることで、近隣のグリア細胞によって貪食された pHRed シグナルを追跡できるのではないかと仮説を立てた。特定の細胞タイプで非侵襲的、時期特異的、かつ高レベルの発現を実現するために、Knockin-mediated Enhanced Gene Expression system (KENGE-tet)を用いて、tetO-pHRed トランスジェニックマウス系統を作出した。本マウスを、神経細胞特異的プロモーター下で tTA を発現するマウスと交配することで、Bigenic マウスを作出し、その有用性を組織学的に評価した。

4. 研究成果

(1) バーグマングリア (小脳アストロサイト) による恒常的な神経回路貪食

小脳プルキンエ細胞のシナプス刈り込みに注目し、プルキンエ細胞内で pHRed を発現する PV-tTA; tetO-pHRed マウスを作出した (図 1A)。免疫組織染色を用い、周囲のグリア細胞による貪食性を解析した。成体マウス小脳において、粒子状の pHRed シグナルが近接するバーグマングリア内のリソソーム中に多数観察されることが明らかになった (図 1B)。発達期のシナプス貪食の関与を避けるため、薬剤投与によって発達過程の pHRed 発現を抑制し、成熟後に発現を誘導しても、同様の結果を認めた。また、GFP や PV、プルキンエ細胞特異的な抗体を用いた場合には、バーグマングリア内にシグナルは認めなかった。さらに薬理学的に貪食を抑制したところ、バーグマングリア内での pHRed シグナルが低下した。これらのことから、pHRed の特性による貪食のトレースが可能であること、成体内においてもバーグマングリアによる神経回路の貪食が恒常的に働いていることが明らかになった。

(2) 異なるグリアによる領域特異的もしくはコンパートメント特異的な貪食

プルキンエ細胞の形態学的な特徴を生かし、樹状突起およびシナプス後部(スパイン)が存在する分子層と細胞体から伸びる軸索、シナプス前部(ブートン)のコンパートメントが存在する小脳白質に着目して周囲のグリア細胞の貪食性を解析した。

バークマングリアはプルキンエ細胞の樹状突起、シナプス後部を覆うようにして突起を張り巡らせており、非常に多くの pHRed シグナルを取り込んでいた。しかし、軸索周囲に存在する小脳アストロサイトでは、ほとんど pHRed シグナルが検出されなかった。一方、ミクログリアにおいては、その逆で分子層よりも小脳白質部における pHRed シグナルの方が高かった。これらの結果は、それぞれ異なるグリア細胞が異なる領域もしくはコンパートメント依存的に貪食を果たすことで、協調して神経回路の恒常性維持を担う可能性を示唆している。

本ツールによって、これまで注目されていなかった小脳バークマングリアが高い貪食活性を示していることや異なるグリア細胞が貪食することの意義について新たな知見が得られた。またこれまで用いられてきた蛍光トレーサーの注入といった技術的な煩雑性や組織侵襲性がないことから、グリア細胞の活性化を生じることなく時期・空間特異的な責任細胞の探索的研究が可能となった。今後は、学習時に伴うシナプス刈り込みを追跡したり、病態マウスと掛け合わせることで、グリア細胞による貪食を介した神経回路再編の生理、病態生理的な意義の解明を進めていきたい。

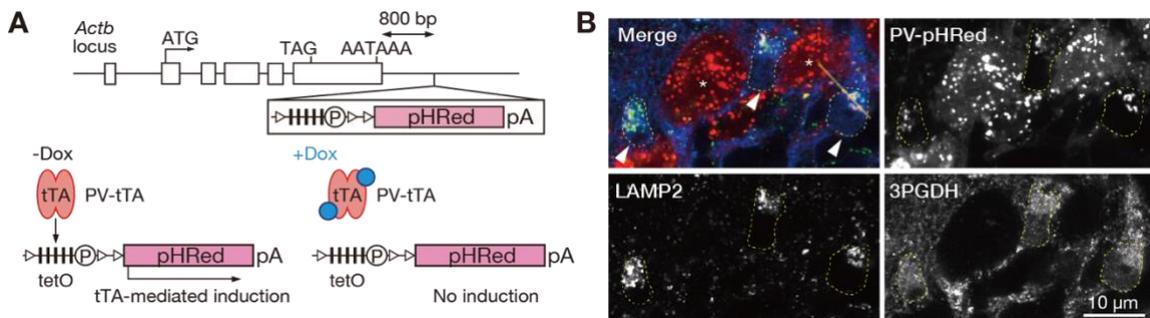


図 1 tetO-pHRed 遺伝子改変マウスの設計と小脳バークマングリア細胞による pHRed 取り込み

A. beta-actin locus の下流に tetO-pHRed カセットを挿入することで、遺伝子発現を細胞種・時期特異的に強力に誘導することを実現した。

B. バークマングリア(3PGDH)内のリソソーム(LAMP2)中に pHRed シグナルが観察された (矢じり)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Morizawa Y, Matsui K.
2. 発表標題 A new tool for visualization of phagocytic activity and glial engulfment of synapses upon learning-dependent synapse elimination.
3. 学会等名 XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Morizawa and Schuichi Koizumi
2. 発表標題 Purinergic regulation of astrocytic phagocytosis
3. 学会等名 Glia in Health & Disease, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting ((国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yosuke Morizawa, Schuichi Koizumi, Ko Matsui
2. 発表標題 Brain Remodeling by Astrocytic Phagocytosis
3. 学会等名 The Joint Congress of The 40th Annual Meeting of JSBP and The 61st Annual Meeting of JSN
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yosuke Morizawa and Ko Matsui
2. 発表標題 Role of glial phagocytosis of synapses in physiological memory engravement process
3. 学会等名 Glial Biology, Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------