

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：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460325

研究課題名(和文) 環境因子としてのミクログリアが高次脳機能に関与する分子基盤

研究課題名(英文) Mechanism for microglia involvement of the brain higher function

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラットで受動的回避学習を行い、ミクログリア特異的な阻害薬、ミノサイクリンを投与した。ミノサイクリンを投与したラットは嫌な記憶を早く忘れた。つまり、ミノサイクリン投与によりミクログリアの作用が弱まった結果、嫌な記憶の固定や再生が抑制されたと考えた。学習と関係のあるAMPA受容体のサブユニットを調べた結果、発現量にミノサイクリン投与による変化は認められなかった。しかし、リン酸化は減少する傾向が認められたことからPKAが関与する可能性が示唆された。マウスの受動的回避学習を解析する系を立ち上げた。その結果、ラットとマウスでミノサイクリン投与による受動的回避学習の変容が異なることが示唆された。

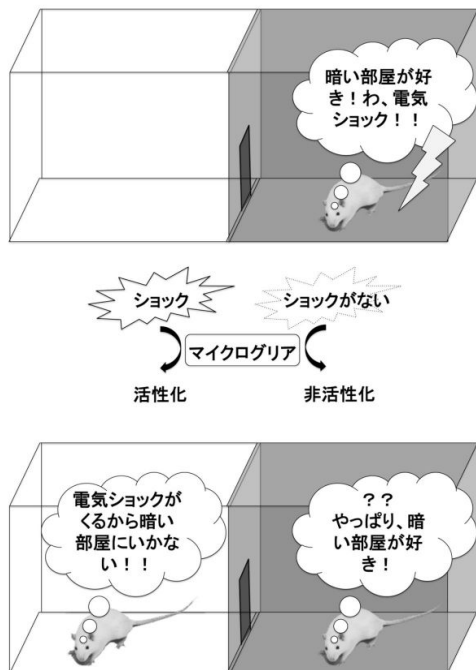
研究成果の概要(英文)：Microglia specific inhibitor, minocycline was administered before and after passive avoidance task in male rats. As the results, minocycline injection shortened the time enter the dark box. This means that the blocking of microglia activation attenuated the establishment of bad memory formation. We also analyzed AMPA receptor subunit expression. We revealed that phosphorylation status of 845 serine thus PKA might be changed. Next, we examined this task in mice. In mice, minocycline injection might attenuate the reconsolidation process hereby long-term bad memory formation was attenuated.

研究分野：生理学

キーワード：ミクログリア 海馬 学習 シナプス 行動解析

1. 研究開始当初の背景

代表研究者はこれまで、生殖内分泌機能の中心となる視床下部の Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) ニューロンの調節機構に関して研究を行ってきた。特に近年では、ミクログリアと GnRH ニューロンの関係について興味をもって検討してきた。一方、グリア細胞とニューロンの相互作用に関する最近の研究は、グリア細胞の機能が栄養作用、支持作用、貪食作用などとどまらないことを示している。脳の炎症反応や変性・細胞死などにミクログリアが関与することが明らかにされ、近年ではラット海馬の神経新生と空間学習におけるミクログリアの関与など、内的環境を整えるという生理的な状態でのミクログリアの機能が明らかにされつつある。特に興味深いことに、生理的



な環境下で常にシナプスを監視しているという報告がある。そこで代表研究者は、ミクログリアが、シナプス機能を調節することにより学習機能の発現に関与していると考え、代表的な海馬依存性高次機能における役割に注目した。恐らく、ストレス等の恐怖、つまり、電気ショックが関与する学習にはミクログリアが関与すると考えているが、動物で恐怖、もしくはそれに類似した事象が関与しない学習があるのか、という疑問を持った。そして、図のような仮説に致った。それは、ミクログリアが活性化されるような状況の学習は消去され難い、それは、成立した学習の質的な差に基づく、というものである。その質的な差とは、AMPA 受容体のサブユニットの構成の違いにあると推察している。

2. 研究の目的

平成 26~28 年度の 3 年間で、受動的回避学習および恐怖条件付け学習という課題では、学習成立機序にミクログリアが関与することを明らかにする。具体的には、ミクログリアの活性化の過程が学習成立、維持に影響していることを、ミクログリアの活性化の選択的な阻害剤を投与して、海馬依存性の学習課題の成立が変容する事、そして、その機序に AMPA 受容体のサブユニット構成が変化すること、すなわち、内的な環境を整えるミクログリアが活性化している状況では AMPA 受容体のサブユニット構成が異なり、それが学習の成立に影響することを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 行動解析

受動的回避学習

受動的回避学習装置は、ドアで隔られた明るい部屋と暗い部屋の 2 連部屋からなり、動物を明るい部屋におくと速やかに暗い部屋に移動する。暗い部屋に移動した時にドアをしめて床のグリッドから電気ショック (0.8-1.6 mA, 2 秒) を与える。その後再び明るい部屋に入ると受動的回避学習が成立しているため、明るい部屋に行かない。行動しないこと (明るい部屋に行かない) により電気ショックを回避する学習海馬依存性である事がわかっている。依存性の学習となる。

(2) 生化学的解析

ウエスタンブロット

動物をイソフルレン麻酔して脳を摘出し、実態顕微鏡下で目的の領域を切り出し、液体窒素で凍結する。サンプルから定型的に蛋白質を抽出する。シナプトソーム分画の場合は、組織サンプルを、シナプトソーム分画用バッファーにてホモジナイズを行い、フィルターを通して採集する。遠心後、上清を捨て、ペレットを再度シナプトソーム分画用バッファーにて溶解する。それら蛋白質サンプルは、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法を用いて、泳動を行い、メンブレン (PVDF 膜) に転写する。PVDF 膜に転写する。転写後、ブロッキング剤を用いてブロッキング処理を行い、目的の蛋白質の 1 次抗体を反応させる。反応後、膜を洗浄し、2 次抗体 (HRP 標識抗体) にて反応させ、化学発光法にて検出する。

(3) 遺伝子改変動物の解析

空間及び時間特異的にミクログリアを除去できる CD11b-DTR マウスは、ミクログリア特異的 (CD11b はミクログリアのマーカー) にジフテリア毒素 (DT) 受容体を発現し、DT を投与することで受容体発現細胞特異的に細胞死を誘導することが可能である。そこでより直接的な証明として、このマウスを用いる。まずマウスの受動的回避学習を解析する系

を立ち上げた。

4. 研究成果

(1) Wistar 雄性ラットを受動的回避学習を行い、ミクログリア特異的な阻害薬、ミノサイクリンを投与した。ミノサイクリンを投与したラットは有意に暗い部屋に入る時間が短縮した。すなわち、嫌な記憶を早く忘れたわけである。直後の嫌な記憶には差がないことから、ミノサイクリン投与によりミクログリアの作用が弱まった結果、嫌な記憶の固定や再生が抑制されたと考えた。

(2) 形成される経験に出来方による差がある可能性を考え、AMPA 受容体のサブユニット構成を調べた。AMPA 受容体のサブユニット構成により海馬シナプス機能が変化すると考えた。海馬を摘出し、液体窒素で凍結した。サンプルから定型的に蛋白質を抽出しシナプトソーム分画にした。サンプルは、SDS-ポリアクリルアミドにて電気泳を行い、メンブレンに転写し、化学発光法にて検出した。その結果、シナプトソーム分画にしてもAMPA受容体サブユニットGluR1やGluR2にミノサイクリン投与による変化は認められなかった。GluR1の831番目セリンのリン酸化には差がなかったが、845番目セリンのリン酸化はミノサイクリン投与により減少する傾向が認められたことからPKAが関与する可能性が示唆された。

(3) 空間及び時間特異的にミクログリアを除去できるCD11b-DTRマウスを手に入れた。CD11b-DTRマウスは、ミクログリア特異的(CD11bはミクログリアのマーカー)にジフテリア毒素(DT)受容体を発現し、DTを投与することで受容体発現細胞特異的に細胞死を誘導することが可能である。まずマウスの受動的回避学習を解析する系を立ち上げた。その結果、ラットとマウスでミノサイクリン投与による受動的回避学習の変容が異なることが示唆された。マウスの場合、ミノサイクリン投与によって受動的回避学習獲得過程には影響がなかったが、再強化の過程に抑制的に作用する可能性のあることが示唆された。また、新たな知見として、約1ヶ月後に再び受動的回避学習成立の度合いを調べると、受動的回避学習前後にかかわらずミノサイクリン投与は消去学習を促進する傾向にあった。一方、幼少期の経験はミクログリアの発現に影響すると考えられていたが、少なくとも受動的回避学習の成立には影響を及ぼさなかった。以上より、ミクログリアは受動的回避学習の維持に関与していると推測された。

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7件)

Kurosaka M, Ogura Y, Funabashi T, Akema T. Early Growth Response 3 (Egr3)

Contributes a Maintenance of C2C12

Myoblast Proliferation. *J Cell Physiol.*, 査読有り, 2017; 232(5):1114-1122.

10.1002/jcp.25574

Kurosaka M, Ogura Y, Funabashi T, Akema T. Involvement of Transient Receptor

Potential Cation Channel Vanilloid 1

(TRPV1) in Myoblast Fusion. *J Cell Physiol.*, 査読有り, 2016; 231(10):2275-85.

10.1002/jcp.25345.

Tada H, Koide M, Ara W, Shibata Y,

Funabashi T, Suyama K, Goto T, Takahashi T

Estrous Cycle-Dependent Phasic Changes in

the Stoichiometry of Hippocampal Synaptic

AMPA Receptors in Rats. *PLoS One*, 査読

有り, 2015; 10(6):e013135.

Fukushima A, Ogura Y, Furuta M, Kakehashi

C, Funabashi T, Akema T. Ketogenic diet

does not impair spatial ability controlled by

the hippocampus in male rats. *Brain Res.*, 査

読有り, 2015; 1622:36-42

Furuta M, Ninomiya-Baba M, Chiba S,

Funabashi T, Akema T, Kunugi H Exposure

to social defeat stress in adolescence

improves the working memory and

anxiety-like behavior of adult female rats

with intrauterine growth restriction,

independently of hippocampal neurogenesis.

Horm Behav., 査読有り, 2015; 70:30-7.

10.1016/j.yynbeh.2015.01.010.

Fukushima A, Hagiwara H, Fujioka H,

Kimura F, Funabashi T, Akema T. (2015) Sex

differences in feeding behavior in rats: the

relationship with neuronal activation in the

hypothalamus. *Front Neurosci.*, 査読有り,

9: 88. doi: 10.3389/fnins.2015.00088.

Fukushima A, Hagiwara Y, Yoshioka N,

Kimura F, Akema T, Funabashi T. (2014)

Expression of phosphorylated cyclic AMP

response element-binding protein in

melanin-concentrating hormone neurons and

orexin neurons in male and female rats during

ad libitum feeding. *NeuroReport*, 査読有り,

25: 766-770. 10.1097/WNR.0000000000000172

[学会発表](計27件)

小倉裕司、船橋利也、Egr3 抑制はマウス筋が細胞の静止性に関与する分子を増加させる、第 94 回日本生理学会大会 (2017 年 3 月)、浜松コンベンションセンター、静岡県浜松市

萩原裕子、崎村建司、井樋慶一、船橋利也、CRF-Venus Δ Neoマウスの分界条床核外側部 CRHニューロンのシナプス入力性の性差と痛み反応の性差、第94回日本生理学会大会 (2017年3月)、浜松コンベンションセンター、静岡県浜松市

藤岡仁美、明間立雄、船橋利也、雌ラットにおけるプロスタグランジン E2 の GnRH ニューロン微小 EPSC への影響、第 94 回日本生理学会大会 (2017 年 3 月)、浜松コンベンションセンター、静岡県浜松市

藤原清悦、久保田隆、船橋利也、明間立雄、恐怖条件付け後の海馬高周波と関連した海馬—扁桃体間の γ 活動、第94回日本生理学会大会 (2017年3月)、浜松コンベンションセンター、静岡県浜松市

古田都、福島篤、船橋利也、妊娠—出産—子育ての経験が視床下部TIDAニューロンへの興奮性シナプス入力へ及ぼす影響、第94回日本生理学会大会 (2017年3月)、浜松コンベンションセンター、静岡県浜松市

福島篤、船橋利也、マウス中枢神経系の PDGFR α 系を介する摂食調節作用は、末梢とは異なる、第 12 回環境生理学プレコンgres (2017 年 3 月)、浜松ホテル、静岡県浜松市

小倉裕司、船橋利也、Early growth response 3 (Egr3)の筋芽細胞における役割、第四回若手による骨格筋細胞研究会 (2016年11月)

藤原清悦、久保田隆、船橋利也、明間立雄、Gamma band oscillation between hippocampus and amygdala associated with hippocampal high frequency oscillation and fear memory、ライフエンジニアリングシンポジウム2016 (2016年11月)、九州工業大学、福岡県飯塚市

福島篤、萩原裕子、船橋利也、視床下部 PDGF受容体 α を介した摂食調節作用に関する研究、第43回日本神経内分泌学会 (2016年10月) 浜松コンベンションセンター、静岡県浜松市

小倉裕司、黒坂光寿、船橋利也、Early growth response 3 (Egr3)は筋芽細胞の増殖に関与する、第2回日本筋学会学術集会 (2016年8月) 国立精神神経医療研究センター、東京都小平市

萩原裕子、崎村建司、井樋慶一、明間立雄、

船橋利也、分界条床核における CRH ニューロンのシナプス入力の性差、第 39 回日本神経科学大会 (2016 年 7 月)、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

古田都、福島篤、船橋利也、幼弱期雌性ラットにおけるニコチン投与および母性様行動の成体期における母性行動と空間学習に及ぼす影響、第39回日本神経科学大会 (2016年7月) パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

藤岡仁美、福島篤、船橋利也、明間立雄、リポポリサッカライドによるLHサージ状分泌抑制に関与する終板脈絡器のIL-1 β 産生細胞の特徴、第39回日本神経科学大会 (2016年7月)パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

藤原清悦、久保田、船橋利也、明間立雄、恐怖条件付け後における海馬高周波出現時の扁桃体 θ および γ 活動、第39回日本神経科学大会 (2016年7月)パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

藤岡仁美、福島篤、船橋利也、明間立雄、ミノサイクリンはリポポリサッカライドによる LH パルス状分泌抑制を回復しない第93回日本生理学会大会 (2016年3月)、札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

古田 都、福島篤、明間立雄、船橋利也、雌性ラットの幼弱期ニコチン投与ならびに母性行動が成体期の母性行動および空間学習に及ぼす影響、第 93 回日本生理学会大会 (2016 年 3 月)札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

藤原清悦、久保田隆、船橋利也、明間立雄、第海馬高周波と恐怖記憶に関連する扁桃体の θ 活動と γ 活動、93回日本生理学会大会 (2016年3月)札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

黒坂光寿、小倉裕司、船橋利也、明間立雄、STAT6 シグナルは筋サテライト細胞の分化と融合を制御する、第 93 回日本生理学会大会 (2016 年 3 月)札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

小倉裕司、黒坂光寿、船橋利也、明間立雄、Early growth response 3 (Egr3)は筋芽細胞の増殖に関与する、第 93 回日本生理学会大会 (2016 年 3 月)札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

福島篤、萩原裕子、明間立雄、船橋利也、肝臓の PDGFR α 系を介した STAT5 のリン酸化は高脂肪食による肥満と糖耐性の低下に関与する、第 93 回日本生理学会大会 (2016 年 3 月)札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

- ②①萩原裕子、福島篤、明間立雄、船橋利也、血小板由来成長因子はマウスの視床下部による摂食調節に關与する、第93回日本生理学会大会(2016年3月)札幌コンベンションセンター、北海道札幌市
- ②②藤岡仁美、船橋利也、明間立雄、プロスタグランジン E2の GnRH ニューロン miniature EPSC への影響、第42回日本神経内分泌学会(2015年9月)、仙台市戦災復興記念館、宮城県仙台市
- ②③古田 都、福島篤、船橋利也、明間立雄、妊娠、出産、子育て経験後の学習機能の向上と AMPA 受容体サブユニットの構成の変化、第42回日本神経内分泌学会(2015年9月)、仙台市戦災復興記念館、宮城県仙台市
- ②④福島篤、萩原裕子、船橋利也、明間立雄、絶食によりマウス視床下部のオリゴデンドロサイト前駆細胞の PDGFR α を介したシグナルは刺激されるが、高脂肪食によりこの調節系が障害される、第42回日本神経内分泌学会(2015年9月)、仙台市戦災復興記念館、宮城県仙台市
- ②⑤萩原裕子、福島篤、明間立雄、船橋利也、エストロゲンによる摂食調節は視床下部のオリゴデンドロサイト前駆細胞の PDGFR α を介する、第42回日本神経内分泌学会(2015年9月)、仙台市戦災復興記念館、宮城県仙台市
- ②⑥Furuta M, Fukushima A, Funabashi T, Akema T, The effect of maternal experiences on hippocampal neural plasticity and spatial learning, The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (2015, 7)、神戸国際会議場、兵庫県神戸市
- ②⑦Fujiwara SE, Kubota T, Funabashi T, Akema T, Synchronous theta band oscillation between hippocampus and amygdala associated with hippocampal high frequency oscillation during rest time after aversive stimuli correlate with freezing behavior, The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (2015, 7)、神戸国際会議場、兵庫県神戸市

〔図書〕(計3件)

- 船橋利也(2014)第16編 生殖・小澤誠司、福田康一郎(編)標準生理学・医学書院(東京)・pp.1003-1033
- 船橋利也(2016)14 内分泌系の生理学・オックスフォード・生理学(原書4版)・丸善(東京)・pp.264-269.

明間立雄(2016)16 甲状腺、副甲状腺、副腎・オックスフォード・生理学(原書4版)・丸善(東京)・pp.289-315.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.marianna-u.ac.jp/physiology/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

船橋利也(Funabashi, Toshiya)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号：70229102

藤原清悦(Fujiwara, Seietsu)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号：10440322

黒坂光寿(Kurosaka, Mitsutoshi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
研究者番号：40553970