

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01841

研究課題名(和文) 生体脳内シナプス可塑誘導刺激にともなうアストロサイト動態変化の慢性計測

研究課題名(英文) chronic measurement of glial dynamics for response to plasticity induction in vivo

研究代表者

三嶋 恒子 (Mishima, Tsuneko)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：90415307

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)：刺激強度を定量的に変化させることがより容易であるような可塑的变化誘導刺激として経頭蓋直流電気刺激(tDCS)を導入した。アストロサイトと相互関係がある、もうひとつのグリア細胞・ミクログリアの形態変化をを固定脳および、覚醒動物の生体脳で刺激前後での観測を行った。刺激に対しミクログリアの形態が覚醒状態の動物において形態変化(細胞体の拡大、突起の縮小)を示すこと、この変化はアストロサイトの刺激に対する細胞内カルシウム上昇の経路と関連していることが分かった。また、in vivoでのイメージングにより刺激に対し、ミクログリアはその監視領域をも縮小させている傾向にあることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Transcranial direct current stimulation (tDCS) induce neural and behavioral plasticity. To investigate how this plasticity inducing stimulation affects microglia, which is involved in astrocyte, we performed IBA-1 immunohistochemistry in mouse (C57BL6/J) and IP3R 2 knockout mice brains that underwent tDCS. Morphometric analyses suggest that this microglial cell body enlargement depends on astrocytic Ca^{2+} activity. Our results parallel with the reduced degree of tDCS-induced astrocytic Ca^{2+} surges during deep isoflurane or urethane anesthesia and suggest that and their morphological changes may play a role in long-term effects of tDCS. We also perform 2-photon imaging of microglial dynamics before- and after stimulation in vivo, and it suggested that the surveillance area showed the trend to shrink after tDCS. It may the noradrenaline released from neuron by tDCS suppress branch extension of microglia.

研究分野：神経科学

キーワード：グリア 二光子顕微鏡 可塑性 tDCS ミクログリア アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

記憶や学習は、LTP や LTD に代表されるシナプス可塑性を中心とする神経回路の機能変化により実現される。このシナプスを微小突起で被覆するグリア細胞とシナプスの機能的な相互作用、特にシナプス可塑性に関わるアストロサイトの動態(カルシウムシグナル等)が近年着目されている。アストロサイト微小突起には、カリウムチャネルやグルタミン酸トランスポーターが発現しており、シナプスでの細胞外液環境を調節している。軸索側の前シナプス末端、樹状突起側の(後シナプス)スパイン、アストロサイトの微小突起の複合体は3者間シナプス(tripartite synapse)と呼ばれおり、構造的にも機能的にもアストロサイトはシナプスの重要な構成要素である。また、可塑性への密接に関与も、最近認知されつつある、我々の注目するグリア細胞とシナプスが機能的に相互作用している状態を観測するには *in vivo* (実験動物が生きたままの状態)で実験することが必須である。なぜなら、急性脳スライス標本の状態では、神経回路の大部分が切断され、ネットワークとしての神経活動が起こりにくく、しかもアストロサイトやミクログリアなどのグリア細胞は脳の損傷に対して非常に鋭敏に炎症反応を起こす。即ち、正常な脳の状態とは異なる反応性を示す可能性があるからである。また、培養細胞の状態でアストロサイトは本来の形態を保つことはない。グリア細胞の本質的な機能を見極めることは困難である。以上より、本課題では *in vivo* 状態でグリアが可塑性刺激によって時間的・刺激強度によりどのような動態変化を示すのかを検証することにした。

2. 研究の目的

本課題ではシナプス可塑性に関わるグリア細胞の動態(カルシウムシグナル等)に着目した。近年確立した *in vivo* 状態での微小

ネットワークの長期慢性計測の手法を用いて、神経回路の可塑性に伴うグリア細胞の形態およびカルシウムシグナル動態を、時間変化または可塑性誘導の刺激強度の変化に従って同一領域で慢性的に観測し、これらの関係性を詳細に知ることを目的とした。これは、生物として機能を損なうことのない *in vivo*・無麻酔の状態で行い、これによりシナプス可塑性の脳内メカニズムにおける、神経活動とグリア細胞の動態を明らかにすることを目標とした。当初計画したウイルスとトランスジェニックマウスのコンビネーションを用いたところウイルスの挙動・機材に問題が生じたため、代替案とし、アストロサイトと直接相互作用していると報告のあるもうひとつのグリア細胞、ミクログリアを観察し、可塑性誘導刺激に対するアストロサイトの動態を間接的に観測できる可能性があると考え以下の方法で課題遂行を試みた

3. 研究の方法

げっ歯類(マウス)を用い、(1)、(2)、(3)を実施した。可塑性誘導刺激として、強度の調整が容易である経頭蓋直流電流刺激(tDCS: transcranial direct current stimulation)を導入する。単一強度での tDCS 刺激はアストロサイト内のカルシウム上昇を誘発することはすでに先行研究が存在する¹。そこで tDCS 可塑性誘導刺激によるミクログリアの変化を検討した。実施に伴い、刺激装置としてはカスタムメイドの tDCS 刺激装置用の回路を作成した。

(1) 固定切片を用いた免疫組織化学的検討
C57BL6/J マウスを用い、可塑性刺激(tDCS)の前後で起こるミクログリアの形態的な変化を同定する。イソフルラン麻酔下で8週令の動物の頭部に頭部固定用のチャンバーをとりつける。同時に頭蓋表面(視覚野)に内径 2-2.5mm のチューブを貼り付け、刺激時に導電性ゲルを詰めて刺激領域とする。可塑

性刺激は麻酔下よりも覚醒条件下においてより効果的に機能することが期待されるので²動物は以下のタイムライン (Figure.1) で実験環境に順化させたのち、可塑性刺激 (tDCS) あるいは、偽刺激(Sham 刺激)を行う。刺激後3時間置いた後に灌流固定し、60 μm の厚さにスライスする。Iba-1 抗体を用いた免疫染色を行い蛍光ラベルしたミクログリアを共焦点レーザー顕微鏡で2 μm , 0.5 μm (それぞれ対物レンズ $\times 20$, $\times 60$ を使用)のZ方向のステップで取得する。取得画像はKozlowski等によるmatlab プログラムを改変したもの³および、ImageJ を用いて解析する。取得画像は2D スタックし、ミクログリアの輪郭(周辺距離)および細胞体を形態パラメータとして採用し、可塑性刺激 (tDCS) をしたものと Sham 刺激のみのグループについて統計的に解析する。

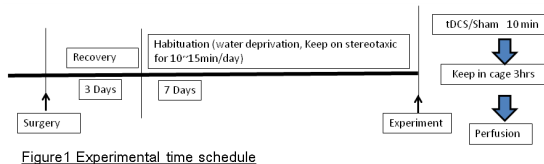


Figure 1 Experimental time schedule

(2) in vivo 同一動物・ミクログリアの刺激前後での変化の二光子イメージング

同一個体・ミクログリアの可塑性刺激による変化を観測するために、Iba1 プロモータ下流に蛍光タンパク (GFP) を組み込んだ、トランスジェニックマウスを用いる。動物は(1)の固定切片を用いた動物と同じく刺激用のチューブ・チャンパーを取り付ける。さらに GFP を発現しているミクログリアを観測するための観測窓 (3mm) を感覚野領域に埋め込む (Figure 2)。この際、ミクログリアへの影響を抑えるため、硬膜は残す。動物は1週間以上の回復期間を置いたのち、更に1週間子顕微鏡を用いる。レーザー波長は GFP 励起波長として波長 920nm を使い、60 分間 1 分毎に Z 方向に約 55 μm を 2 μm 幅でイメージングを行う (刺激前)。0.1mA 10 分間の

可塑性刺激 (tDCS) 後は動物をケージに戻し保持する。3 時間後、再び同じ細胞を刺激前と同様に 60 分間 1 分毎にイメージングを行う (刺激後)。カスタムメイドの頭部固定装置を用いることで、刺激前後での同一細胞・座標での画像取得が可能となる。各時間でのイメージを 2D スタックしたものを、ノイズ処理・2 値化したのち、ミクログリアの監視領域 (surveillance area) をイメージより抽出し可塑性刺激前後での変化及び細胞体の変化を調べる。

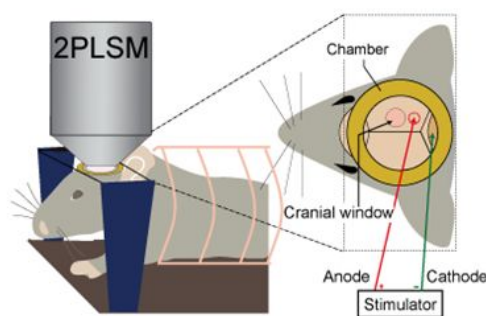


Figure 2 Experimental Configuration for in vivo imaging

4. 研究成果

(1) 固定切片を用いた免疫組織化学的検討

実験環境に馴化した C57BL/6J マウスに対し、0.1mA 10 分間の可塑性刺激(tDCS)あるいは偽刺激(Sham 刺激)をおこなった。3 時間の動物保持の後、灌流固定したのちから切片を作成した。これを用いて Cy3 蛍光ラベルしたミクログリアの画像を共焦点レーザー顕微鏡により画像を取得し、解析をおこなった。取得画像より形態パラメータとして細胞

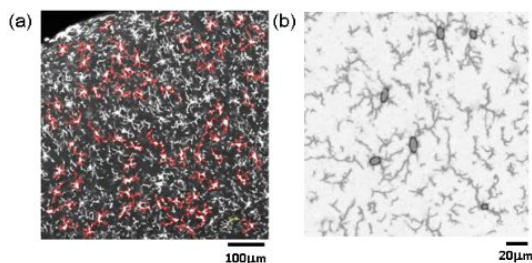
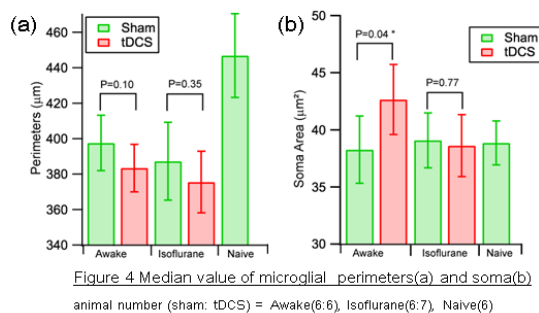


Figure 3 Examples of perimeters(a) and soma(b)

の周辺距離 (Figure3a) および細胞体の面積

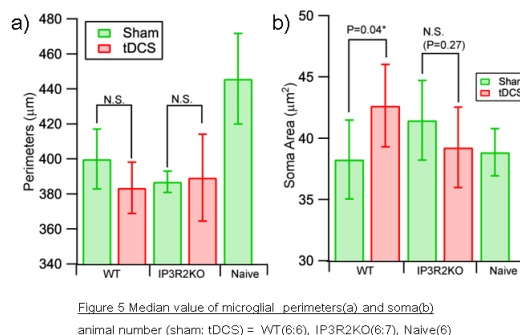
(Figure.3b) を、Matlab プログラムおよび ImageJ(NIH)で計算・抽出した。

抽出パラメータの中央値を、可塑性刺激 (tDCS)を受けた動物群と偽刺激 (Sham 刺激) のみの動物群間で比較したところ、刺激 (tDCS) 群では偽刺激 (Sham) 群に比べ細胞体の面積が有意に大きくなっていることがわかった。この差異は覚醒下の動物群でのみ観察され (Figure4 tDCS 群: 偽刺激群: $P=0.04$)、麻酔下の動物で刺激をおこなった場合は統計的に優位な細胞体の膨張は見られなかった(Figure4a $P=0.77$)。一方ミクログリアの周辺距離については覚醒下であっても統計的に優位な差は得られなかったが、刺激群では偽刺激群に比べ細胞体の縮小傾向が見られた。また、細胞体の面積と同様、麻酔下の動物で刺激をおこなった場合はこの細胞体の縮小傾向はより小さくなった (Figure4b)。以上より、可塑性刺激によるミクログリアは覚醒下でのみこの刺激によって細胞体が膨張することがわかった。



tDCS はアストロサイトの A1AR 依存的にカルシウムを上昇させることがすでに報告されている¹。そこで tDCS 誘発性のミクログリア形態変化とアストロサイト Ca^{2+} 上昇との関係を調べるため、アストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 上昇の欠失した IP3R2 ノックアウトマウスを用いて、tDCS 群と偽刺激群間の比較をおこなった。その結果、野生型で見られた統計的に優位な tDCS 誘発性のミクログリア細胞体の膨張は消失し ($P=0.27$)、さらに細胞周辺距離の縮小傾向もほぼ完全に消失

した ($P=0.82$)。これはミクログリアの形態変化がアストロサイトの Ca^{2+} 上昇に依存した現象であることを示唆している。



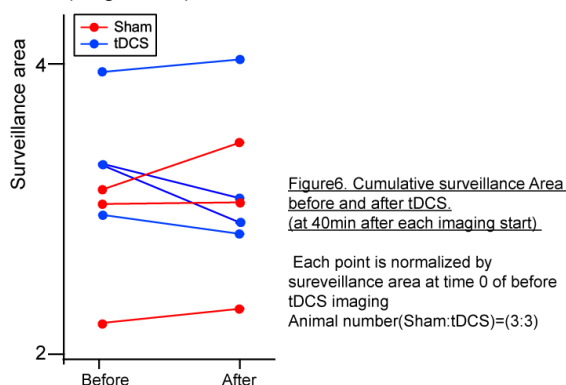
付け加えて、これらの変化は頭部を固定した半拘束条件下でおこなうため、少なからず動物ストレスがかかる。この影響を確認するために、頭部手術後、実験環境への馴化を受けない非馴化動物 (Figure4, Naive) は細胞体面積については馴化を受けた動物 (Sham, 覚醒下) と統計的な有意差はない (μm)。一方、ミクログリア周辺距離については、非馴化動物 (Naive) のほうが、有意に周辺距離が大きい。即ち馴化によりミクログリアはその分枝を縮退させていることがあきらかとなった。

(2) in vivo ミクログリアの刺激前後での動態変化イメージング

次に、in vivo でミクログリアの可塑性刺激 (tDCS) による動態変化のタイムコースを調べるため、二光子レーザー顕微鏡を用いて tDCS 前後でのミクログリアのイメージング・解析をおこなった。動物はミクログリアに蛍光たんぱく質 GFP を発現する遺伝子改変マウス (Iba1-GFP) を用い、刺激前と刺激後 3 時間の時点で、それぞれに 1 分毎、60 分間の感覚野領域に作成した観測窓を通して覚醒下で、イメージングを行った。

ミクログリアはその特徴的な動態として自身の突起を常時、伸縮させて周辺環境をモニターしている。モニターされる領域 (監視領域: surveillance area) の変化を可塑性刺激 (tDCS) または偽刺激の前後で比較した。

その結果、ミクログリアは観測時間中の累積監視領域（面積）が可塑性刺激後は刺激前より小さい傾向にあった。これに対し、偽刺激動物のミクログリアは、偽刺激の前後で、累積監視領域は大きい傾向にあることがわかった(Figure.6)。



これは可塑性刺激 tDCS の作用機序として近年提唱されている、(1) tDCS で出来る電場により、ノルアドレナリンなどの神経修飾物質が脳内に漏洩（あるいは放出）され、(2) アストロサイトの IP3/Ca²⁺ シグナル経路が作動グリア伝達物質が分泌、(3) これがシナプス伝達および可塑性に影響を及ぼすというモデルに加え、ノルアドレナリンが、ミクログリアの突起の進展を妨げるという in vitro の結果とも合致する⁴。

以上、脳の可塑的变化にともなうグリア細胞のひとつミクログリアの形態的变化を形態およびその動態を固定切片および in vivo イメージングにより解析し、本課題の最終目的であるアストロサイトとの関連を一部明らかにした以降これを更に推し進めた解析を行い、可塑性にかかわるグリア細胞の詳細な作用機序を明らかにしていきたい。

1. Monai, H. *et al.* Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain. *Nat. Commun.* **7**, 11100 (2016).
2. Gellner, A.-K., Reis, J. & Fritsch, B. Glia: A Neglected Player in Non-invasive Direct Current Brain Stimulation. *Front. Cell. Neurosci.*

10, 188 (2016).

3. Kozlowski, C. *et al.* An automated method to quantify microglia morphology and application to monitor activation state longitudinally in vivo. *PLoS One* **7**, e31814 (2012).
4. Gyoneva, S. & Traynelis, S. F. Norepinephrine modulates the motility of resting and activated microglia via different adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **288**, 15291-302 (2013).

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 1 件)

1. Hirase H, Mishima T, Hiromu Monai (2018) Enhancement of neural plasticity by glial activation : a possible mechanism of transcranial direct current stimulation Dementia Japan 32;17-23(2018) (査読なし)

[学会発表](計 3 件)

1. 三嶋恒子, 永井てるみ, 矢作和子, 毛内拓, 大江祐樹, 平瀬肇
経頭蓋直流電気刺激 (tDCS)によるミクログリア細胞体の変化
日本神経科学大会(2018) (神戸国際会議場)
2. 三嶋恒子, 永井てるみ, 矢作和子, 毛内拓, 大江祐樹, 平瀬肇
経頭蓋直流電気刺激 (tDCS)によるミクログリア形態変化の解析
日本神経科学大会(2017) (幕張メッセ)

3. Tsuneko Mishima, Yuki Oe, Hiromu Monai, Hajime Hirase
Transcranial direct current stimulation alters microglial morphology in mice (2017) Nuromodulation

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 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

三嶋 恒子 (MISHIMA, Tsuneko)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合
研究センター・研究員

研究者番号：90415307

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

平瀬 肇 (HIRASE, Hajime)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合
研究センター・チームリーダー
研究者番号：90392084

(4) 研究協力者

()