

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：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18575

研究課題名(和文) in vivoにおいてミクログリアが示す神経回路修飾機構

研究課題名(英文) Neuromodulatory function of microglia in neural circuits

研究代表者

河合 喬文 (Takafumi, Kawai)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70614915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：まずマウスを用い、ミクログリアの生理状態の基礎的性質について、電気生理やイメージングを駆使して解析した。その一環として、電位依存性プロトンチャンネルがミクログリアの活性酸素産生に重要であることを明らかにした。またこれが加齢依存的に脳梗塞の病態に関わることを示した。次に、これらのミクログリアの重要性をin vivoで解析したいと考え、ゼブラフィッシュを用いた検討を行うことにした。CRISPR/Cas9により電位依存性プロトンチャンネルの遺伝子を欠損したゼブラフィッシュを作製することに成功した。更にはゼブラフィッシュにおける活性酸素の測定系の確立にも成功し、今後の解析へと大きく前進することが出来た。

研究成果の概要(英文)：I first analyzed the basic physiological properties of microglia in vitro by combining electrophysiology, calcium imaging, and membrane potential imaging. Specifically, we found that voltage-gated proton channel, one of voltage-gated ion channels of microglia, is important for the regulation of reactive oxygen species (ROS) production. It also contributed to infarct volume in brain ischemia in age-dependent manner. Next, in order to analyze the importance of this phenomenon in vivo, we started the experiment using zebrafish, which is an excellent animal model for in vivo study. I used CRISPR/Cas9 system and succeeded in establishing Voltage-gated proton channel deficient zebrafish. Furthermore, we succeeded in establishing the ROS measurement system in zebrafish, allowing us to perform further detailed analysis in near future.

研究分野：生理学

キーワード：ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

近年神経回路の動態を調節する因子としてミクログリアの存在が脚光を浴びている。このミクログリアに関し、*in vitro* ではそのイオンチャンネル機能も含めて多くの知見が蓄積されていたが、それらを包括的に扱っている内容は数少ない。特に以上の内容を解析するに当たって問題となる点は、ミクログリアには *in vitro* と *in vivo* でその性質が遥かに異なるという点である。両者の間では細胞の形状も大きく異なるうえに、発現するイオンチャンネルの種類も大きく異なる。したがって、その生理状態を詳細に明らかにするためには、これらの問題を克服できる手法が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、まずこれまでの知見を整理するため、ミクログリアに発現するイオンチャンネルやその生理状態における重要性について、電気生理学、膜電位イメージング、カルシウムイメージングなどを駆使することで洗いなおし、各チャンネル特性の重要性を明らかにすることを第一の目的とした。

次にこれらの知見をさらに *in vivo* へと適用させるため、マウスよりも脳が小型でありかつ *in vivo* での実験が容易であるという利点を併せ持つゼブラフィッシュを用いることにした。近年ゼブラフィッシュにおいても CRISPR/Cas9 や TALEN などを用いた遺伝子欠損個体の作製方法が確立されてきている。そこで、これらの系を用いて、*in vivo* でのミクログリアの生理的特性やその機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

第一の、ミクログリアに発現するイオンチャンネルの同定、およびイメージング実験については、マウスの新生児より初代培養ミクログリアを調製することによって行った。電気生理学の実験は、パッチクランプ法によって行い、専用の電気増幅装置、並びに顕微鏡の装置を用いることによって行った。カルシウムイメージング法、膜電位イメージングは Fluo3 及び DiBaC(4)3 を用いることによって行った。またミクログリアの活性酸素産生は diogenes を用いた。Adult のマウスを用いて、脳梗塞実験も行った。

第二のゼブラフィッシュの実験には RIKEN Wildtype の実験系統を用い、CRISPR/Cas9 を使用することで、遺伝子欠損ゼブラフィッシュの作製を試みた。また、活性酸素の測定には DHE を使用した。

4. 研究成果

(1) 電気生理学、イメージング技術を用いた、ミクログリアの生理的特性の解析

まずマウスを用い、ミクログリアの生理状態の基礎的性質について、電気生理やイメージングを駆使して解析した(図 1)。これまで

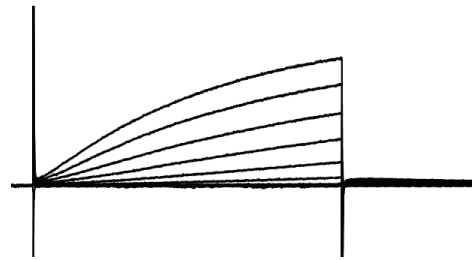


図 1 ミクログリアの電位依存性プロトン電流。パッチクランプ法を用いている。この他にも細胞外と細胞内に適切な溶液を用いることで、カリウムイオン電流を含めた種々のイオン電流を測定することが出来た。

の報告どおり、内向き整流性 K⁺電流、電位依存性 K⁺電流、電位依存性プロトン電流を含めたいくつかの電流成分が観察された。

また、イメージング実験の結果から、ミクログリアが細胞への刺激に応じて電位変動を示す様子などが観察された。したがって非興奮型細胞であると考えられていたミクログリアにおいても、これらイオンチャンネルの性質が重要な役割を示している可能性も十分に考えられる。更に解析を進めるうち、これらのミクログリアに発現するイオンチャンネルのうち、電位依存性プロトンチャンネルが、ミクログリアの活性酸素の産生に重要であることが明らかとなった(図 2)。すなわち、電位依存性プロトンチャンネルを欠損することで、ミクログリアの活性酸素の産生が増大した。さらに、adult マウスを用いた脳梗塞実験により、電位依存性プロトンチャンネルの欠損が脳梗塞の病態制御に、加齢依存的に関わることを明らかにした(図 3)。

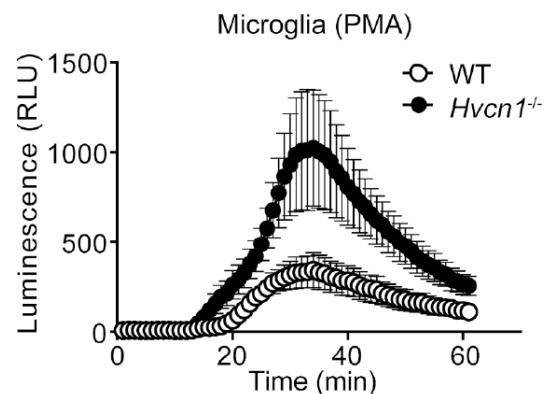


図 2 電位依存性プロトンチャンネル欠損によるミクログリア活性酸素産生の増大。Hvcn1^{-/-}が電位依存性プロトンチャンネル欠損を示す。

(2)ゼブラフィッシュにおける電位依存性プロトンチャンネル欠損個体の作製とその後の実験系の確立

次に、これらの電位依存性プロトンチャンネルのミクログリアにおける重要性を、in vivo で解析したいと考え、ゼブラフィッシュを用いた検討を行うことにした。CRISPR/Cas9 により電位依存性プロトンチャンネルの遺伝子を欠損したゼブラフィッシュを作製することに成功し、現在はこれらを野生型と戻し交配を行った後、F2 の遺伝子欠損個体を得る段階まで終わっている。更に数々の条件検討を行うことで、ゼブラフィッシュにおける活性酸素の測定系の確立にも成功した。これらの実験動物および実験技術を用いることで、今後の in vivo での解析に向けて大きく前進することが出来たと言える。

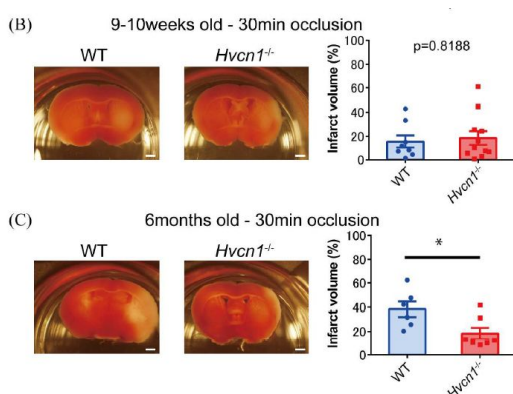


図 3 電位依存性プロトンチャンネル欠損による脳梗塞部位の変化。Hvcn1^{-/-}が電位依存性プロトンチャンネル欠損を示す。電位依存性プロトンチャンネル欠損により、加齢個体においてのみ、脳梗塞部位の軽減が認められた。

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 2 件)

1. Kawai T, Yoshimura A, Oka Y. (2015) Neurons in the preoptic area of the male goldfish are activated by a sex pheromone 17,20-dihydroxy-4-pregnen-3-one. J Neuroendocrinol. 27(2):123-30.

2. 河合 喬文, 岡村 康司, 辰巳 翔基
電位依存性プロトンチャンネルを介した老化に伴う肥満形成機構の解明
代謝異常治療研究基金研究業績集, 42, 73-77 (2015)

[学会発表](計 4 件)

1. Kawai T, Okochi Y, Imura Y, Sakimura K, Koizumi S, Okamura Y
Voltage-gated proton channels regulate

ROS production in mouse microglia
第 38 回日本神経科学学会、神戸国際会議場、神戸国際展示場、2015 年 7 月 28 日 ~ 2016 年 7 月 30 日

2. Kawai T, Miyata H, Nakanishi H, Sakata S, Arima H, Miyawaki N, Okochi Y, Watanabe M, Sakimura K, Sasaki T, Ikawa M, Okamura Y.

Function of voltage-sensing phosphatase in mice sperm

Symposium "PIPs-protein interaction in cell physiology", The 93rd Annual Meeting of the

Physiological Society of Japan, Sapporo, 2016 年 3 月 22 日 (火) ~ 3 月 24 日 (木)

3. Kawai T, Okochi Y, Ozaki T, Imura Y, Sakimura K, Koizumi S, Yamashita T, Okamura Y

Bidirectional regulation of ROS production by voltage-gated proton channels in microglia

第 39 回日本神経科学学会、パシフィコ横浜、2016 年 7 月 20 日 ~ 2016 年 7 月 22 日

4. Kawai T, Kawamura M, Koizumi S, Abe M, Sakimura K, Okamura Y

Subcellular localization and trafficking of voltage-gated proton channels in primary cultured microglia

第 94 回日本生理学会大会、アクトシティ浜松、2017 年 3 月 28 日 ~ 2017 年 3 月 30 日

[図書](計 1 件)

2. 河合 喬文, 岡村 康司
脳内環境辞典、メディカル・ドゥ、2017 年

[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

河合 喬文 (Kawai Takafumi)
大阪大学大学院・医学系研究科・助教
研究者番号：70614915

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()