

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19001

研究課題名(和文) ミクログリアにおける機械受容チャネルの機能解明

研究課題名(英文) The function of mechanosensitive channel in microglia

研究代表者

堀内 浩 (Horiuchi, Hiroshi)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・特任助教

研究者番号：60760733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ミクログリアは神経細胞と接触することで、発達期の神経回路形成や神経活動を制御する。本研究ではミクログリアに発現する機械受容チャネルに着目し、その機能を見出すため、ミクログリア特異的な同チャネルの遺伝子発現制御を試みた。新規遺伝子導入法によるshRNAおよび蛍光タンパク質の発現を行ったが十分な発現量を得られなかったため、Cre-loxPシステムを用いて遺伝子改変動物を作成した。その結果、遺伝子欠損と2光子イメージングによる突起の形態観察が可能であることを確認した。現在、欠損時におけるミクログリアの形態、動態の変化および神経回路形成過程および神経回路の可塑的な変化に対する役割について検証している。

研究成果の概要(英文)：Microglia are immune cell in the brain. Recent studies have shown that microglia contribute to neural circuit formation during developmental stage by contacting synapses. Additionally, microglia suppress excessive excitation of neuron by contacting neural soma. Thus, it maybe postulated that mechanical interactions between microglial process and neurons maybe required for the above mentioned activities. In this study, the function of mechanosensitive channel in microglia was focused on. To examine the function, I tried to regulate the expression of the mechanosensitive channel in microglia using lentivirus. However, the transfer efficiency was not enough to suppress the expression of the channel. Therefore, I created microglia-specific mechanosensitive channel deficient mice using Cre-loxP system. Currently, I am examining the effect of depletion of mechanosensitive channel on microglial morphology and dynamics.

研究分野：神経生理学

キーワード：ミクログリア 力学知覚 神経回路

### 1. 研究開始当初の背景

脳内免疫細胞であるミクログリアはその突起を非常に活発に動かして周囲の細胞と接触することが知られていた(Nimmerjahn et al, 2005)。特に、神経活動レベルに依存してシナプスと頻りに接触していた(Wake et al, 2009)。また、病態時にはシナプスとの接触時間が長くなることから、ミクログリアは神経回路活動状態を認識していると考えられた。発達期の神経回路形成過程においては、過剰なシナプスは刈り込まれ、必要なシナプスが強化されることが知られている。この過程において、ミクログリアは補体系シグナルによって不要な神経細胞を認識し食食することが示されていた(Schafer et al, 2012)。一方、成熟したマウスにおいても、神経細胞体に接触することによって過剰な神経活動を抑制することが示された(Li et al, 2012)。すなわち、ミクログリアは脳内微小構造物との接触によって生じる機械的な圧力などの共通した運動モードの変換メカニズムが存在することが示唆される。

ミクログリア初代培養系では、生体ミクログリアと異なり、突起を持たないことが経験的に知られている。最近、硬さの異なる培養環境ではミクログリアが突起を有する形態を示すこと(Moshayedi et al, 2014)、硬さにグラデーションを持たせた培養環境では、硬い方向に突起を伸ばす傾向にあることが示されており(Bollmann et al, 2015)、ミクログリアは化学的な刺激のみならず、周辺の物理的な環境変化にも応答することが示唆されてきた。しかしながら、脳内における機能やその分子メカニズムはわかっていなかった。

そこで事前実験として、生体2光子イメージングによって、ミクログリア特異的に緑色蛍光タンパク質を発現する Iba1-EGFP マウスの脳内に機械受容チャネル特異的阻害薬 GsMTx4 を投与したところ、ミクログリアの形態および動態に著明な変化が生じることを見出した(図1)。すなわち、機械受容チャネル阻害薬 GsMTx4 の皮質局所投与によって、ミクログリアの突起の複雑性の低下(図1A, B)、分岐点の低下(図1C)、突起の短縮(図1D)、細胞体の収縮(図1E)の形態変化が認められ、突起の伸展退縮速度の低下(図1F)が認められた。

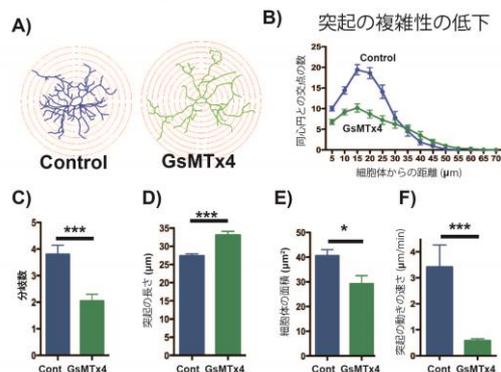


図1. 機械受容チャネル阻害によるミクログリアの形態及び動態変化

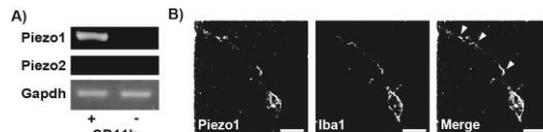


図2. ミクログリアにおける Piezo1 の発現

哺乳動物における機械受容メカニズムの実態はわかっていなかったが、機械受容チャネル Piezo1/2 がその有力な候補であることが明らかとなっていた(Coste et al, 2010)。そこで、脳内でのそれらの発現について検証した。その結果、大脳皮質由来 CD11b+ミクログリアにおいて機械受容チャネル Piezo1 が発現しており、CD11b-細胞においては発現していないことを見出していた(図2)。一方で、同じく機械受容チャネルである Piezo2 は脳内ではいずれの細胞においても発現していなかった。そこでミクログリアに発現する Piezo1 が脳内構造物との接触時に生じる力学的な変化を受容しうるのではないかと仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

これまでミクログリアは、免疫的な刺激によって初めて活性化すると考えられてきた。しかしながら、2光子顕微鏡の登場によってミクログリアが生理的条件下においても活発に突起を動かしていることが明らかとなり(Nimmerjahn et al, 2005)、神経活動との相互作用が見出されるにつれて、その生理的な機能が着目されてきた。神経回路形成過程では、補体系シグナルによって不要なシナプスがミクログリアによって取り除かれること(Schafer et al, 2012)や成熟期においても学習過程ではミクログリアから放出される BDNF によって神経回路の再編成が制御されていることが分かってきた(Parkhurst et al, 2013)。また、脳組織の損傷時にはミクログリアが ATP シグナルを受容することによって損傷部へ突起を伸ばしていることが分かってきた(Davalos et al, 2005)。このように、ミクログリアと神経細胞との相互作用の分子メカニズムについては主に化学的シグナルを中心に研究がなされてきた。一方、前述のようにミクログリアは周辺環境の物理的な変化をも受容し、自らの性質を変化させていることが明らかになってきた。

ミクログリアは、生理的条件下において突起を高頻度に動かすことによって、シナプス形成、除去および可塑性などの神経回路の恒常性に重要な役割を果たしている。興味深いことに、これらの可塑的变化はすべてミクログリアのシナプスへの「接触」が起点となっている。すなわち、ミクログリアはシナプスに接触し、シナプスの要・不要を規定し、活動性を変化させると考えられるが、接触認識に関する分子基盤や、接触を起点として神

経回路形成をどのように制御するかは明らかでない。したがって、そこで本研究課題では、ミクログリアに著明に発現する機械受容チャネル *Piezo1* に着目し、その機能解明によって、ミクログリアを試みた。*Piezo1* の全身性の欠損および血管内皮細胞特異的な欠損によって胎生致死することが知られているため、本研究ではミクログリア特異的な欠損あるいは遺伝子発現制御を行うことを目指した。

### 3. 研究の方法

まず、ミクログリア特異的な *Piezo1* 欠損による力学知覚の破綻が、ミクログリアの形態・動態に及ぼす影響を観察する。*Piezo1* の機能を明らかにするため、ミクログリアにおける *Piezo1* の発現制御を行った。レンチウイルスによる *Piezo1* shRNA および蛍光タンパク質の遺伝子導入を試みた。レンチウイルスを用いた遺伝子導入法によってミクログリア特異的に *Piezo1* shRNA および2光子励起可能な蛍光タンパク質を発現させる。ミクログリアへの遺伝子導入は困難であることが経験的に知られているため、同時に遺伝子改変動物を作成することによるミクログリア特異的な *Piezo1* 発現制御を試みた。本研究では、*Piezo1* の発現制御に加え、2光子イメージングによる経時的な形態観察を必要とするため、同時に蛍光タンパク質 EYFP を発現させる遺伝子改変動物を作成した。すなわち、Cx3CR1-CreER-IRES-EYFP マウス (ミクログリア特異的に CreER および EYFP が発現し、タモキシフェン投与によって時期特異的に Cre が核内へ移行する) と floxed-*Piezo1* マウス (Cre 依存的に *Piezo1* が欠損) を交配し、ミクログリア特異的かつ時期特異的な *Piezo1* 欠損マウスを作成する。これにより、*Piezo1* 欠損による発達期および他細胞への影響を回避する(図2)。これらの手法を用いて、機械受容チャネル欠損時のミクログリアの形態変化、動態変化、他細胞に及ぼす影響などについて主に生体2光子イメージングを用いて検討した。

一方、ミクログリアの神経細胞との接触時に生じるミクログリアの活動変化をモニタリングするためにミクログリア特異的にカルシウム感受性蛍光タンパク質を発現させる。まず、前述のレンチウイルスを用いた遺伝子導入法により、カルシウム蛍光タンパク質 GCaMP6 を発現させる。さらに、Iba1-tTA::tetO-GCaMP6 マウスを作成し、ミクログリア特異的に GCaMP6 を発現する遺伝子改変動物を作成する。このマウスのミクログリアの活動を2光子イメージングによって観察し、ミクログリアの活動分布を明らかにする。さらに、同マウス大脳皮質にアデノ随伴ウイルスを用いて神経細胞特異的に赤色蛍光タンパク質を発現させ、神経細胞と接触時のミクログリアの活動変化を2光子イメー

ジングによって計測する。

### 4. 研究成果

*Piezo1* の欠損は血管の形成不全によって胚性致死することが報告されていたため(Li et al, 2014)、出生後の機能を解析するために、ミクログリア特異的な *Piezo1* の発現制御およびイメージングのための2光子励起可能な蛍光タンパク質の発現方法の確立を行った。ミクログリアへの遺伝子導入効率は非常に低いことは経験的によく知られていたが、レンチウイルスを用いた新規導入法が開発されたため、*Piezo1*-shRNA の導入を試みた。しかしながら、*Piezo1* の発現抑制および蛍光タンパク質の発現は確認できなかった。

そこで、CreER-loxP システムを用いてミクログリア特異的かつ時期特異的な発現制御可能な *Piezo1* 欠損マウスを作成した。同マウスは、*in vivo* 2光子イメージングによって、ミクログリアの形態を比較的鮮明に描写することができ、タモキシフェン投与によって、*Piezo1* の機能に関わる遺伝子配列の脱落を確認できた。したがって、ミクログリア特異的な *Piezo1* 欠損マウスを作成することに成功した。現在、同マウスを用いて、発達期および成熟期において *Piezo1* を欠損させ、ミクログリアの形態変化、動態変化ならびに欠損による神経回路形成、神経回路活動に対する影響について詳細な検討を行っている。

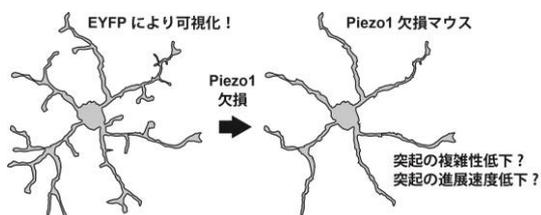


図3. *Piezo1* はミクログリアの力学知覚責任分子か?

さらに、*Piezo1* が  $Ca^{2+}$  透過性の陽イオンチャネルであることに着目し、ミクログリアの  $Ca^{2+}$  イメージングを試みた。

まず、レンチウイルスを用いて、GCaMP6 の遺伝子導入を試みた。しかしながら、ミクログリア特異的な発現は認められなかった。そこで、Tet-off システムを用いてミクログリア特異的にカルシウム感受性タンパク質を発

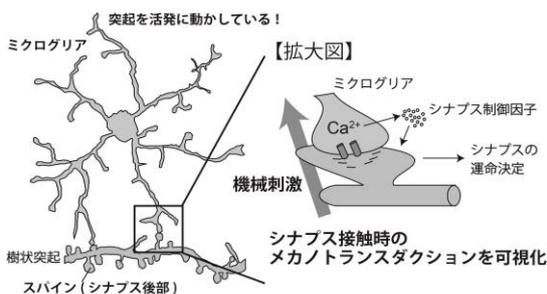


図4 ミクログリアのシナプス制御分子基盤を明らかにする

現させた。その結果、2光子イメージングによってミクログリアにおける局所的な輝度変化が認められた。

#### 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1件)

- ① 和氣弘明、堀内 浩、宮本愛喜子、鍋倉淳一、脳の機能とミクログリア、領域融合レビュー、6, e007, 2017. (査読なし)

[学会発表] (計1件)

- ① Hiroshi Horiuchi, Hiroaki Wake, Junichi Nabekura, The functional analysis of microglia for neuronal homeostasis, The 2<sup>nd</sup> Young glia meeting, Homberg (Germany), May, 2016

[図書] (計1件)

- ① 江藤 圭、堀内 浩、鍋倉淳一、グリア細胞による神経回路再編成機構、光アライアンス 27(7), 5-8, (2016)

[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

堀内 浩 (HORIUCHI, Hiroshi)  
生理学研究所・基盤神経科学研究領域・特任助教  
研究者番号：60760733

#### (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

( )