

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01530

研究課題名（和文）グリア細胞による長期神経回路再編

研究課題名（英文）Glia-induced Remodeling of Neuronal Circuits

研究代表者

鍋倉 淳一（JUNICHI, NABEKURA）

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・所長

研究者番号：50237583

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 32,400,000円

研究成果の概要（和文）：発達や障害などによる脳機能の基盤には活動する神経回路の変化が挙げられる。本課題では、脳内グリア細胞によるマウス大脳皮質神経ネットワーク再編について2光子励起顕微鏡を用いた生体イメージングを主な研究手法として検討をおこなった。ミクログリアはシナプスへの接触を繰り返しており、接触時にはシナプス伝達を促進し、局所神経回路の同期活動を惹起していることが判明した。また、慢性疼痛モデルマウスにおいてアストロサイトを再活性化し、末梢神経活動を制御することにより痛覚関連シナプスの除去を介して痛覚過敏を長期間緩和できることが判明した。この結果から、グリア細胞の操作は病態の治療戦略となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性疼痛などの慢性脳疾患の治療法として、グリア細胞をターゲットとした新規治療戦略を提示した。

研究成果の概要（英文）：Changes in functional neural circuits are the basis of brain function in development and disorders. In this study, we investigated the reorganization of the neural circuits in cerebral cortex of mice and the contribution of glial cells, using two-photon excitation microscope as the main research method. We demonstrated that resting microglia repeatedly contact onto synapses, promote synaptic transmission during their contact, leading to synchronous activity of local neural circuits in healthy brain. On the other hand, activated microglia lost their facilitatory action on synapse transmission. As for the role of astrocyte in circuits remodeling, reactivating astrocytes and controlling peripheral nerve activity in chronic pain model mice could alleviate hyperalgesia for a long period of time, caused by the removal of pain-related synapses. This result suggests that manipulation of glial cells may be a therapeutic strategy for pathological conditions.

研究分野：神経生理学

キーワード：ミクログリア 神経回路 再編成 アストロサイト シナプス

1. 研究開始当初の背景

発達期や脳障害後には脳機能が大きく変化する。その背景には活動する神経回路の長期的な変化があることが考えられる。これまで、代表者は成熟期の正常脳における代表的な抑制性伝達物質である GABA に注目し、幼若期や障害脳では GABA 機能が興奮性であることを報告してきた。その原因として、GABA は細胞膜に存在する GABA-A 受容体に作用しクロールイオンチャネルを開口することにより、成熟期では陰イオンであるクロールイオンが細胞内に流入することにより過分極を惹起することが一因として挙げられる。一方で幼若期や障害を受けた細胞では細胞膜に存在するカリウム-クロール共役担体 (KCC2) の発現が低いことに起因する細胞内クロールイオンの上昇により、GABA-A 受容体が活性化すると陰イオンが流出し、細胞内の脱分極を引き起こす。そのため、未熟期や障害後早期は抑制性回路機能が減弱していることが特徴である。このように伝達物質に対する神経細胞応答の変化という機能的変化に加えて、幼若期や障害神経細胞では余剰な回路が存在するため、成熟期とは異なる脳機能が発現される。

代表者はこれまで、発達期や障害時における大脳皮質における神経回路再編において、脳内グリア細胞の関与を報告してきた。マウスにおいて慢性疼痛発症時には大脳皮質体性感覚野のシナプス再編が起こり触覚処理回路と痛覚処理回路が機能的につながることが末梢の触覚刺激で痛みを生じる慢性疼痛の原因であること、このシナプス再編にはグリア細胞であるアストロサイトの活性化、シナプス形成促進分子トロンボスポンジンの放出が背景にあることを報告してきた。大脳皮質体性感覚野のアストロサイトの活性化は障害側と対側の末梢に痛み過敏を発症するミラーイメージペインの発症にも寄与することを報告してきた。また、未熟脳においてはミクログリアの突起が神経細胞の樹状突起に接触しシナプス形成を促進し、成熟期における大脳皮質局所回路の形成に寄与していることを報告してきた。これらのグリア細胞を利用して障害回路において可塑性を促進し、神経回路活動および脳内環境を変化させることにより、病態を正常化することにチャレンジする。

2. 研究の目的

慢性的な脳神経疾患の病態は、病的回路が維持されていることに起因する。病的回路の可塑性を更新させ、さらに神経回路活動および脳内環境の正常化を組み合わせることにより、病的回路を正常回路へと再編させ、病態が除去される可能性について、各種病態マウスを用いて検討する。そのため、病態モデルとして、慢性疼痛モデルマウスを用いて、各種グリア細胞の活動操作を行い、また神経回路活動の操作を組み合わせ、シナプス可塑性の再促進と痛覚の変化を指標として検討する。また、脳内環境を評価するため、神経活動による各種脳内物質や細胞外イオンの動態を生体で抽出できる技術の構築を行う。

3. 研究の方法

(1)慢性疼痛モデルマウスにおいて、痛覚過敏慢性期に DREAD(designer receptor exclusively activated by designer drug) をウイルスを用いてアストロサイトに導入する。同 DREADD は生体へのクロザピン-N-オキシド (CNO) の全身投与により活性化させる。また、臨床応用を視野に、経頭蓋電流刺激を用いてアストロサイトの活性も試みる。神経回路活動の操作は、損傷した抹消神経への神経活動抑制薬を慢性投与して行う。大脳皮質錐体細胞に蛍光蛋白を発現させた遺伝子改変マウスに 2 光子励起顕微鏡を適用し、大脳皮質体性感覚野錐体細胞の 2-3 週間の長期繰り返し観察をおこない、シナプスの消失・新生 (シナプスターンオーバー; シナプスの可塑性の評価) を観察した。病態の評価は末梢四肢への機械的刺激による行動変化を痛覚の評価とした。

(2)脳内細胞外環境の評価技術の構築。

CMOS センサーを配列したイオン・物質イメージングセンサー (豊橋技術大学・澤田和明教授作成) をマウス生体脳内に留置し、脳内環境の時空間的变化を抽出する技術を構築するとともに、感覚刺激により脳内 Ph の変化を検出した。

4. 研究成果

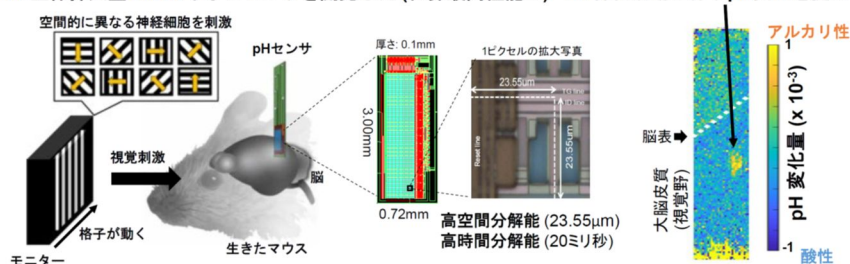
(1)慢性疼痛モデルマウスにおいて、末梢神経 (座骨神経部分損傷) 後 1 週間にわたり痛覚過敏が増悪し、その後は同程度の過敏が数種間に渡り持続した。慢性疼痛モデルマウスに脳内大脳皮質体性感覚野にアデノ随伴ウイルスを用いてアストロサイトに DREAD Gq 受容体を導入した。末梢神経損傷 2 週間後に CNO を 1 日 3 回 1 週間にわたり腹腔内投与し、アストロサイトが持続的に活性化することをアストロサイト内カルシウム上昇を指標として確認した。また、末梢神経活動ブロックのため高分子ポリマー (ELVax) にテトロドトキシン (ELVax) を溶解したシートを損傷座骨神経を包み慢性的に活動を抑制した。まず行動実験で、痛覚過敏の変化を検討した。CNO によるアストロサイトの活性化のみでは、痛覚過敏状態は持続した。TTX 投与群では、投与数日間は痛覚過敏は抑制されたが 1 週間後には痛覚過敏状態が再出現した。一

方で、アストロサイト活性化 + 末梢神経ブロック群では、3 週間以上にわたり痛覚過敏が除去された。この結果から、大脳皮質体性感覚野のアストロサイト活性と末梢感覚入力との操作により、持続的な痛覚過敏が除去されることが判明した。そのメカニズムについて、2 光子顕微鏡を用いて大脳皮質体性感覚野の神経細胞シナプスの繰り返し観察を行った。アストロサイト活性化 + 末梢神経損傷群において、操作期間に限ってシナプス消失率の亢進が認められた。除去されるシナプスについての詳細をするため、末梢神経損傷後の痛覚過敏発症期に新生されるシナプス(痛覚過敏関連シナプス)に注目し、同シナプスの繰り返し観察を行った。その結果、アストロサイト活性化 + 末梢神経活動抑制群において、痛覚過敏関連シナプスが、それ以外と比較し、除去される割合が有意に高いことが判明した。この結果から、痛覚過敏持続期においてアストロサイト活性化と末梢神経からの感覚入力を抑制することにより、痛覚回路と触覚回路の機能連結を形成しているシナプスが除去されることにより、末梢感覚の正常化が起こることが判明した。

この結果の臨床応用への試みとして、臨床医療でも通常で用いられている手技に置き換える試みを行った。末梢神経活動の抑制にはリドカイン等の局所麻酔薬を利用した。大脳皮質アストロサイトの活性化には経頭蓋電流刺激 (tDCS) を用いた。tDCS は一般的に神経細胞の活動を惹起するとされている。一方、先行研究では、より弱い刺激はアストロサイトを活性するとの報告もある。そこで、tDCS によるアストロサイトと神経細胞の活動の変化について、マウス頭蓋に金属プレートを用いて慢性的に留置し、大脳皮質においてそれぞれにカルシウム指示蛋白を発現させて検討を行った。tDCS により神経細胞およびアストロサイトの活性化を引き起こした。通電電流値を神経細胞活性化閾値以下まで減弱させても、アストロサイトの活性化は観察された。この神経細胞活性化閾値下の刺激強度を以降の実験には使用した。tDCS による大脳皮質アストロサイトの持続的活性化 (1 日 3 回) と局所麻酔薬による末梢神経活動の抑制を 1 週間継続するとその後 数週間以上も痛覚過敏の除去が持続した。この結果から、既に臨床医療で慢性疼痛の治療に用いられている 2 つの治療法を組み合わせることで、より有効な痛覚過敏の除去を行えることが示唆された。今後は臨床医療への応用も視野に入れて研究を進める。

(2) 神経回路の長期再編とグリア細胞の関与を大域的に検討するために、脳内環境の包括的抽出技術の創出が必要である。豊橋技術大学・澤田和明教授のグループが開発した CMOS センサーを利用したイオンイメージングセンサーを生体埋め込み用に改良し、マウス大脳皮質感覚野への挿入技術を開発した。大脳皮質感覚野において、視覚刺激により大脳皮質各層における pH の変化が一様ではなく、感覚刺激による脳内 pH の時空間的なダイナミックな変化を捉えることに成功した (下図)。さらに、プロトンに加えて、ナトリウム、カリウム、カルシウムセンサーを交互に配置したセンサープレートでは、神経細胞の活動に伴う細胞外イオン環境のミリ秒での変化を捉えることに成功した。予備実験ではあるが、癲癇モデルマウスにおいては、神経細胞の過剰活動発生時に選考して、アストロサイトの活性化と脳内 pH の変化が見られることを見いだしており、難治性癲癇の治療にむけてグリア細胞と脳内環境の観点からの新規アプローチを開始している。

A. 生体挿入型 CMOS イオンセンサーを開発した (世界最高性能!) B. 神経活動に伴う pH 変化を捉えた



Horiuchi et al., Nat Commun. 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 8件 / うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Ishikawa Tatsuya, Eto Kei, Kim Sun Kwang, Wake Hiroaki, Takeda Ikuko, Horiuchi Hiroshi, Moorhouse Andrew J., Ishibashi Hitoshi, Nabekura Junichi	4. 巻 159
2. 論文標題 Cortical astrocytes prime the induction of spine plasticity and mirror image pain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PAIN	6. 最初と最後の頁 1592 ~ 1606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/j.pain.0000000000001248	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Takeda Akiko, Shinozaki Youichi, Kashiwagi Kenji, Ohno Nobuhiko, Eto Kei, Wake Hiroaki, Nabekura Junichi, Koizumi Schuichi	4. 巻 66
2. 論文標題 Microglia mediate non cell autonomous cell death of retinal ganglion cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2366 ~ 2384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23475	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Akiyoshi Ryohei, Wake Hiroaki, Kato Daisuke, Horiuchi Hiroshi, Ono Riho, Ikegami Ako, Haruwaka Koichiro, Omori Toshiaki, Tachibana Yoshihisa, Moorhouse Andrew J., Nabekura Junichi	4. 巻 5
2. 論文標題 Microglia Enhance Synapse Activity to Promote Local Network Synchronization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 0088-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0088-18.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakamura Kayo, Moorhouse J Andrew, Cheung L Dennis, Eto Kei, Takeda Ikuko, Rozenbroek PW, Nabekura Junichi	4. 巻 69
2. 論文標題 Overexpression of neuronal K+-Cl- co-transporter enhances dendritic spine plasticity and motor learning.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 453-463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-018-00654-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kim Sun Kwang, Nabekura Junichi, Koizumi Schuichi	4. 巻 65
2. 論文標題 Astrocyte-mediated synapse remodeling in the pathological brain	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 1719 ~ 1727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Murakoshi Hideji, Shibata Akihiro, Nakahata Yoshihisa, Nabekura Junichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Corrigendum: A dark green fluorescent protein as an acceptor for measurement of Forster resonance energy transfer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 46840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep46840	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morizawa Yosuke, Hirayama Yuri, Ohno Nobuhiko, Shibata Shinsuke, Shigetomi Eiji, Sui Yang, Nabekura Junichi, Sato Koichi, Okajima Fumikazu, Takebayashi Hirohide, Okano Hideyuki, Koizumi Schuichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-00037-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Eto Kei, Kim Sun Kwang, Takeda Ikuko, Nabekura Junichi	4. 巻 126
2. 論文標題 The roles of cortical astrocytes in chronic pain and other brain pathologies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 3 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2017.08.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawano Hiroyuki, Oyabu Kohei, Yamamoto Hideaki, Eto Kei, Adaniya Yuna, Kubota Kaori, Watanabe Takuya, Hirano-Iwata Ayumi, Nabekura Junichi, Katsurabayashi Shutaro, Iwasaki Katsunori	4. 巻 143
2. 論文標題 Astrocytes with previous chronic exposure to amyloid -peptide fragment 1-40 suppress excitatory synaptic transmission	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 624 ~ 634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato Daisuke, Eto Kei, Nabekura Junichi, Wake Hiroaki	4. 巻 163
2. 論文標題 Activity-dependent functions of non-electrical glial cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 457 ~ 464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shen Jie, Xu Guihua, Zhu Runxiu, Yuan Jun, Ishii Yoko, Hamashima Takeru, Matsushima Takako, Yamamoto Seiji, Takatsuru Yusuke, Nabekura Junichi, Sasahara Masakiyo	4. 巻 April 9
2. 論文標題 PDGFR- restores blood-brain barrier functions in a mouse model of focal cerebral ischemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism	6. 最初と最後の頁 271678X18769515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0271678X18769515	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishikawa Tatsuya, Eto Kei, Kim Sun Kwang, Wake Hiroaki, Takeda Ikuko, Horiuchi Hiroshi, Moorhouse Andrew J., Ishibashi Hitoshi, Nabekura Junichi	4. 巻 159
2. 論文標題 Cortical astrocytes prime the induction of spine plasticity and mirror image pain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PAIN	6. 最初と最後の頁 1592 ~ 1606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/j.pain.0000000000001248	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeda Akiko, Shinozaki Youichi, Kashiwagi Kenji, Ohno Nobuhiko, Eto Kei, Wake Hiroaki, Nabekura Junichi, Koizumi Schuichi	4. 巻 66
2. 論文標題 Microglia mediate non-cell-autonomous cell death of retinal ganglion cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2366 ~ 2384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23475	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計11件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 JUNICHI NABEKURA
2. 発表標題 Remodeling of Cortical Neuronal Circuits in vivo: Neurons-Glia Interaction
3. 学会等名 2018 Symposium on Functional Interactions among Glia and Neurons (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鍋倉淳一
2. 発表標題 大脳皮質の神経回路再編: グリア-シナプス連関
3. 学会等名 第2回 ヒューマン・ハイ・パフォーマンスの実現を目指した次世代健康スポーツ科学と神経科学の融合・統合 ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 JUNICHI NABEKURA
2. 発表標題 Remodeling of Cortical Circuits in vivo: synapse-glia interaction
3. 学会等名 McGill Univ-NIPS Joint Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 JUNICHI NABEKURA
2. 発表標題 Remodeling of Cortical Neuronal Circuits: Neurons-Glia Interaction
3. 学会等名 Max Planck Florida Institute Lecture (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 JUNICHI NABEKURA
2. 発表標題 Brain Imaging in vivo
3. 学会等名 14th Laser Ceramics Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 JUNICHI NABEKURA
2. 発表標題 Glia research in Japan
3. 学会等名 2019 Korea-Yonsei-NIPS International Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 JUICHI NABEKURA
2. 発表標題 Remodeling of cortical neuronal circuits in vivo: neurons-glia interaction
3. 学会等名 2nd Jinling international frontier in brain science and pharmacy forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鍋倉淳一
2. 発表標題 Microglia Surveillance of Synapses
3. 学会等名 20th Annual Meeting of Korean Society for Brain and Neural Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鍋倉淳一
2. 発表標題 Remodeling of Cortical Circuits in vivo
3. 学会等名 Australian Neuroscience Society 38th Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鍋倉淳一
2. 発表標題 Cortical Remodeling in vivo
3. 学会等名 第2回イラン生理・薬理学会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鍋倉淳一
2. 発表標題 Microglia Surveillance of Synapses
3. 学会等名 EMBO Meeting (Microglia2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生理学研究所 生体恒常性発達研究部門ホームページ
http://www.nips.ac.jp/hsdev/index_japanese.html
生理学研究所 生体恒常機能発達研究部門
<https://www.nips.ac.jp/research/group/post-15/>

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
研究協力者	堀内 浩 (Horiuchi Hiroshi)		
研究協力者	竹田 育子 (Takeda Ikuko)		
研究協力者	キム サム クワン (Kim Sunkwang)		
研究協力者	中村 佳代 (Nakamura Kayo)		
研究協力者	チャン デニス (Cheung Dennis)		

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			
オーストラリア	University of New South Wales			
韓国	Kyung-Hee University			