

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15028

研究課題名(和文) 社会ストレスによる神経形態変化を導く神経グリア相互作用の超微細細胞生物学的解明

研究課題名(英文) Ultrastructural analysis of social stress-induced neuron-glia interaction underlying neuronal morphological alterations

研究代表者

永井 裕崇 (Nagai, Hirotaka)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：30814587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：社会や環境より受けるストレスは内側前頭前皮質(mPFC)や海馬の神経細胞の機能形態変化を生じ認知情動変容を招く。この機序として脳や末梢における炎症が重要であるが、脳内炎症を司るミクログリアと神経細胞との間に生じる相互作用の実態及び機序には不明な点が多い。本研究では、雄のC57BL/6マウスに社会的敗北ストレスを与え、mPFCにおけるミクログリアと神経細胞を三次元電子顕微鏡と超解像顕微鏡により可視化し、ストレスによる神経グリア相互作用変化を調べた。その結果、ストレスは、ミクログリアと神経細胞の接触面積を亢進することが分かった。またこの現象が皮質II/III層に特異的に生じることも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレスによる脳機能変化において脳内炎症やミクログリア活性化の意義は確立されてきたものの、神経細胞へ与える影響は不明な部分が多い。本研究はミクログリアと神経細胞が直接的に相互作用することを三次元電子顕微鏡及び超解像イメージングを用いて示し、神経-ミクログリア界面という新たな現象を見出した。今後は本現象を担う分子機序を明らかにすることによってストレス及び精神疾患の新たな創薬標的候補の創出に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Animal studies using various stress models have shown that excessive environmental stress induces brain and peripheral inflammation thereby causing neuronal dysfunction especially in the medial prefrontal cortex (mPFC) and the hippocampus. However, how microglia, a main player in the brain inflammation, interacts with neurons upon stress remains elusive. Here we examined the cell-to-cell interaction of microglia and neurons in the mPFC using three-dimensional electron microscopy and super-resolution microscopy. We subjected male C57BL/6 mice to either single or repeated social defeat stress, and analyzed the brains from those stressed mice or from control mice. We found that social defeat stress increased microglia-neuron interfaces. By the use of expansion microscopy-based super-resolution imaging, we found that the increase in neuron-microglia interaction occurs specifically in the layer II/III but not in the layer I of the mPFC.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ストレス ミクログリア シナプス 三次元電顕 膨張顕微鏡法

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

社会や環境から受けるストレスは、短期的には適応的变化を引き起こすが、長期的には精神疾患、心血管疾患、代謝疾患など各種慢性疾患の発症リスクとなる。慢性ストレスによる認知情動変容の細胞生物学的基盤として高次脳機能を担う前頭前皮質における神経細胞の形態的萎縮やシナプス消失による神経機能低下が重要である。その機序としてミクログリア活性化を伴う脳内炎症やストレスホルモンである副腎皮質ホルモンの亢進が重要であると考えられている。例えば慢性ストレスにより自然免疫受容体 TLR2/4 を介したミクログリアの活性化が炎症性サイトカインを放出し内側前頭前皮質(mPFC)錐体神経細胞の樹状突起退縮を導くこと(Nie et al. *Neuron* 2018)や、慢性ストレスにより神経細胞が放出した CSF1 がミクログリアの CSF1 受容体を介してミクログリア活性化と神経細胞の形態的リモデリングやうつ様行動を誘導すること(Wohleb et al. *Biol Psychiatry* 2018)が示されている。しかし、ミクログリアと神経細胞が行う相互作用が直接的相互作用によるものかあるいは液性因子を介するものかということはあまり分かっていない。

2. 研究の目的

従って本研究においては神経細胞やミクログリアの有する微細な突起を再構成する三次元電子顕微鏡や超解像イメージングを用いてストレス病態における神経—ミクログリア相互作用の実態を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 社会挫折ストレス

解析対象の雄マウス(C57BL/6N)を、攻撃性の高い雄マウス(ICR)に1日10分間曝露することによって挫折ストレスを加える。短期的(1日)ストレス後には適応的反応が誘導される一方で長期的(10日)ストレス後には新奇個体との社会行動を避け不安行動が亢進するなど、うつ様行動が誘導される。ストレス抵抗性には個体差が大きく、うつ様行動が誘導される「脆弱群」とうつ様行動が誘導されない「耐性群」が存在する。このモデルは抗うつ薬の治療効果の再現性が高く、マウスのうつ病モデルと考えられている。尚、ストレス実験の前にはICRマウスの攻撃性を攻撃頻度並びに強度により評価し、攻撃性の高いマウスのみを用いる。マウスを1日間あるいは10日間の社会挫折ストレスに供し、社会相互作用試験を実施しうつ様行動を評価した。社会相互作用試験においては縦40cm 横30cmのオープンフィールドチャンバーの片側に新奇個体のICRマウス(ストレス実験に用いたマウスとは異なるマウス)を設置し、ストレスを受けた個体あるいはコントロールの個体を150秒間自由に探索させた。ICRマウスから遠く離れた場所を社会忌避行動ゾーンと定義し、うつ様行動の指標とした。

(2) 三次元電子顕微鏡

三次元電子顕微鏡の一種として知られるSBEM (Serial block-face scanning electron microscopy) は脳組織表面の切削と観察を繰り返すことによりxy方向に5nm、z方向に50nmの解像度を実現できる。電界放射型走査電子顕微鏡 Sigma (Zeiss)と3View (Gatan)により構成されたSBEMを用い、電子染色と樹脂包埋を施したmPFCを撮像した。50nm間隔500枚の高解像度画像を取得し、FIJIを用いたアラインメントを実施した後にTrakEM2ソフトウェアを用いて神経細胞並びにグリア細胞のアノテーションを実施した。三次元再構成にはAmiraソフトウェア(Thermo Fisher Scientific)を用いた。

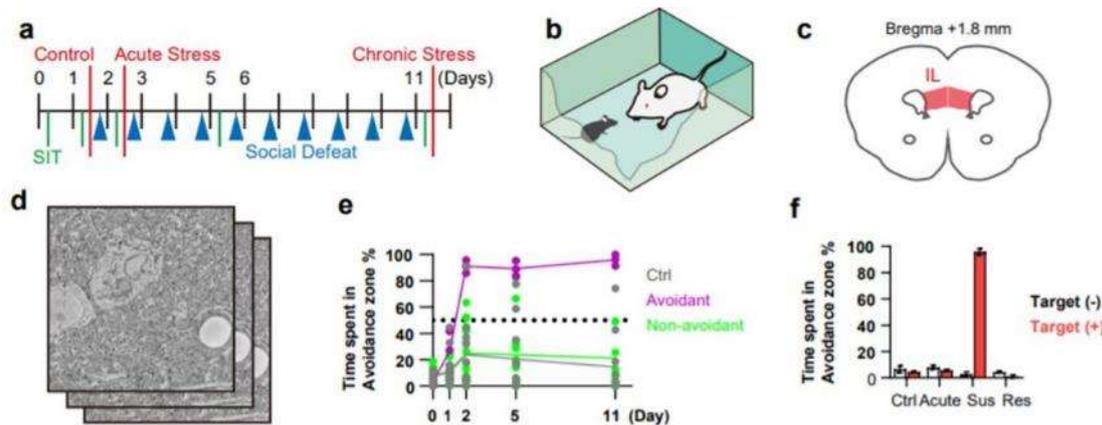
(3) 超解像イメージング

吸水性ポリマーを用いた組織膨張を行うことにより超解像観察を実現できる膨張顕微鏡法(Tillberg et al. *Nat Biotechnol* 2016)を用い、神経細胞とミクログリアを可視化した。神経細胞をラベル化するためにAAV2retro-EF1 α -FLEX-EYFPとAAV2retro-CMV-Creをそれぞれ発現するアデノ随伴ウイルスをmPFCに局所注入した。神経細胞可視化のためにEYFPに対する抗体を、ミク

ログリア可視化のためにミクログリアマーカーTMEM119 に対する抗体を用いて免疫染色を行った。二次抗体に結合している蛍光色素を吸水性ポリマーの単量体に結合させてからポリマーを形成し、タンパク質分解酵素による反応後に給水させ組織膨張を行った。この方法を用いると一方向約 3.5 倍、体積として約 40 倍の膨張を実現できる。

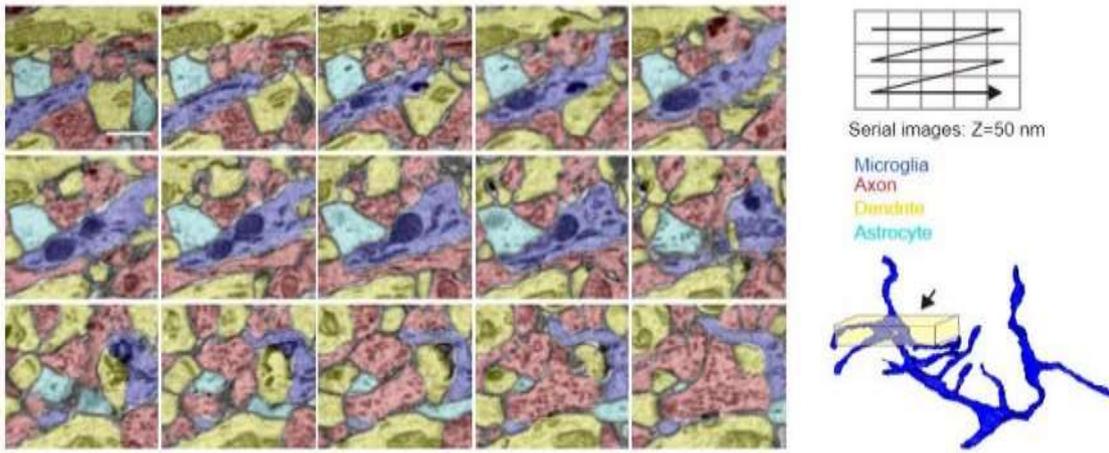
4. 研究成果

C57BL/6N マウスを 1 日間(1 回)あるいは 10 日間(10 回)の社会挫折ストレスに供し、社会相互作用試験によりうつ様行動を評価した(図1)。その結果、1 日間の社会挫折ストレス加えた群では社会忌避行動が生じなかったものの 10 日間の慢性社会挫折ストレスを加えた群では一部の個体において著明な社会忌避行動が生じた。一方で、過去の報告通り社会忌避行動を全く示さない個体も存在した。これらの知見は社会挫折ストレスに対するストレス抵抗性に個体差があることを示しており、過去の研究報告と一致する。慢性ストレス後にうつ様行動を示した個体をストレス脆弱群(Sus; susceptible)、そして示さなかった個体をストレス抵抗性群(Res; resilient)とし、コントロール群及び急性ストレス群を加えた計 4 群について脳を回収し三次元電子顕微鏡により mPFC の infralimbic area を撮像した。



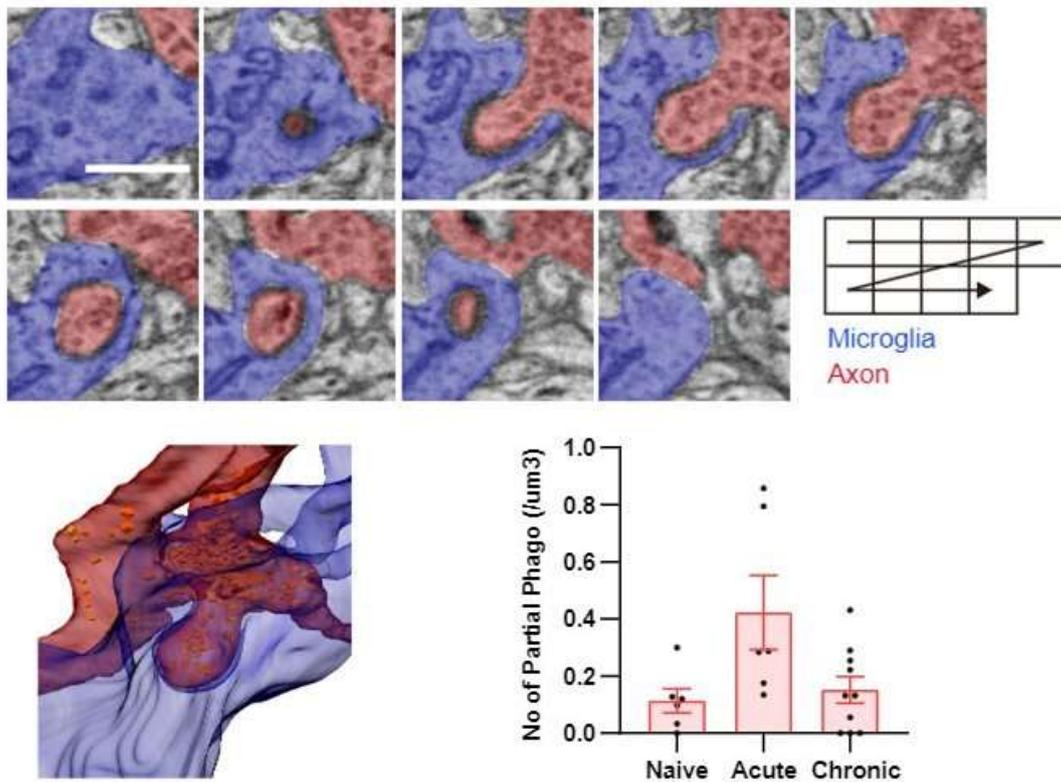
「図1 社会挫折ストレスによるうつ様行動」

得られた連続画像は ImageJ ソフトウェアを用いてアラインメントを行い、同ソフトウェアの TrakEM2 プラグインを用いて各細胞種を同定した(図2)。神経細胞の軸索は豊富なシナプス小胞や軸索ブトンを、そして樹状突起はスパインを有する。またアストロサイトはグリコーゲン顆粒及び細胞間の隙間に入り込む特徴的な形態を有する。そのためこれらの細胞種は容易に判別することが出来る。ミクログリアについてはその細胞体の小ささや細胞質の高い電子染色性、そしてヘテロクロマチンの形態から判別することが可能であるが、オリゴデンドロサイトとの鑑別が困難な場合がある。そのため、本電子顕微鏡解析においては推定ミクログリア細胞として三次元電顕解析を実施した。その結果、ミクログリアに特徴的な突起の分岐を三次元的に再構成することが出来た(図2)。



「図2 三次元電顕を用いた推定マイクログリア細胞の三次元再構成」

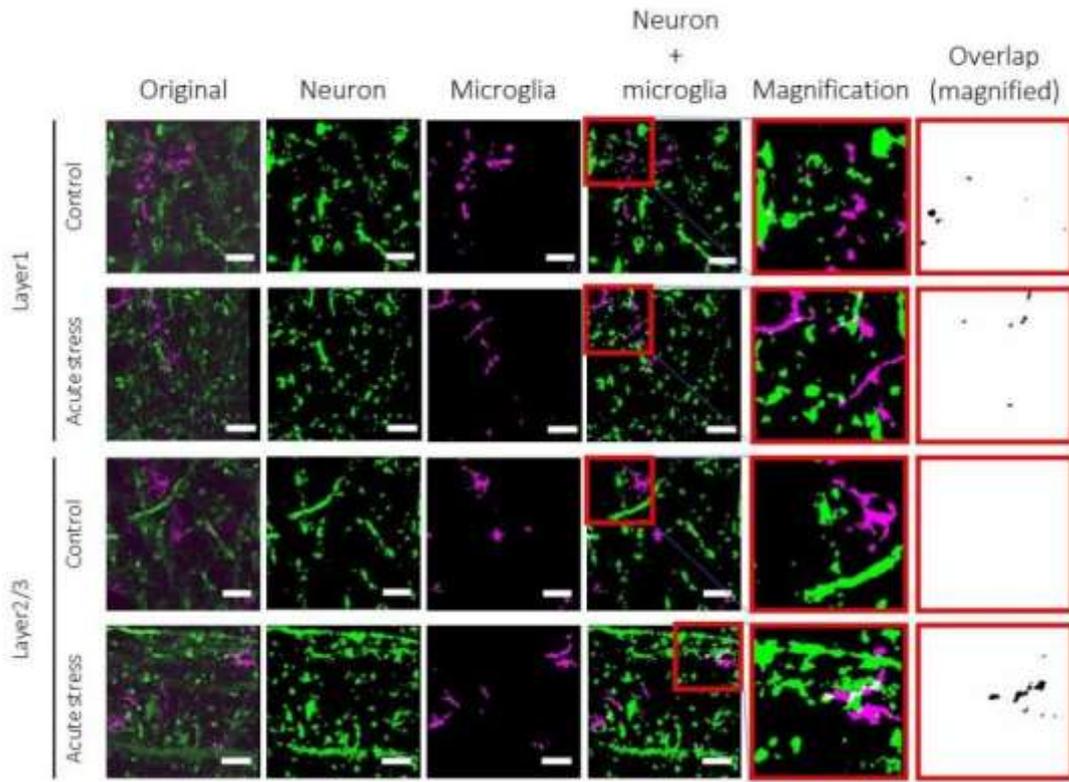
ストレスによる神経—マイクログリア相互作用変化を調べるため、推定マイクログリアと接触する、もしくは貪食されている神経細胞の構成成分を調べた。その結果、推定マイクログリア突起の中に入り込むようにして軸索の一部が囲まれる軸索包囲現象の頻度が急性ストレス後に亢進することが明らかとなった(図3)。



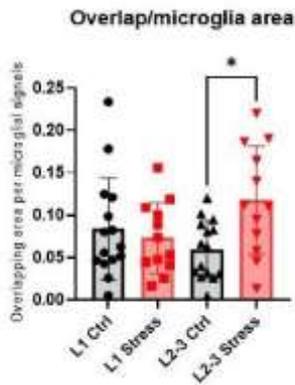
「図3 三次元電顕を用いた神経—マイクログリア相互作用の解析」

慢性ストレス後のストレス脆弱性群及びストレス抵抗性群についてはどちらもコントロール群と変化がなかったことから、ストレス後急性期に軸索—マイクログリア相互作用が亢進し、慢性期に減弱する可能性が示唆された。また、他にもマイクログリアの中に神経細胞の構成要素が完全に囲まれる貪食現象も調べたが、こちらについてはその内容物の種類及び頻度についてコントロール群、急性ストレス群、慢性ストレス群の間に有意な差を認めなかった。すなわち、急性ストレス後にマイクログリアが神経細胞を貪食するというよりもむしろ接触することによって相互作用の場が生じている可能性が明らかとなった。これらの分子機序に迫るため、超解像レベルで分子可視化を行うための技術として、膨張顕微鏡法の導入を実施した。この技術は、吸水性ポリマーを用いて組織膨張することにより理論的 xy 分解能を 70nm まで改善することができる。また、軸索を特異的に可視化するため逆行性アデノ随伴ウイルスによる遺伝子導入を、そしてマイクログリアを可視化するためにマイクログリアマーカーを用いた免疫染色を行った。これらの技

術により可視化した軸索及びマイクログリアの共局在を調べたところ、急性ストレス後に mPFC の第 I 層では変化が認められなかったものの、第 II/III 層では共局在が亢進することが分かった(図 4、5)。すなわち、これらの知見はストレス後に生じる神経—マイクログリア相互作用が皮質層特異的に生じることを意味する。



「図 4 膨張顕微鏡法を用いた神経—マイクログリア相互作用の解析」



「図 5 大脳皮質 II/III 層特異的なストレスによる神経—マイクログリア相互作用の亢進」

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Numa Chisato, Nagai Hiroataka, Taniguchi Masayuki, Nagai Midori, Shinohara Ryota, Furuyashiki Tomoyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 ocial defeat stress-specific increase in c-Fos expression in the extended amygdala in mice: Involvement of dopamine D1 receptor in the medial prefrontal cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16700
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-52997-7	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 Okamura Satoshi, Nagai Hiroataka, Numa Chisato, Nagai Midori, Shinohara Ryota, Furuyashiki Tomoyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Social defeat stress induces phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in the leptomeninges in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/npr2.12051	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 Nagai Midori, Nagai Hiroataka, Numa Chisato, Furuyashiki Tomoyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Stress-induced sleep-like inactivity modulates stress susceptibility in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19800
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-76717-8	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7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 永井 裕崇、古屋敷 智之
2. 発表標題 断眠ストレスや社会ストレスによる脳組織の超微細な細胞生物学的変化の解析
3. 学会等名 生理研研究会「情動の生起と変容の多面的理解に向けて」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagai H, Ueyama J, Nagai M, Numa C, Ohno N, Furuse M, Furuyashiki T
2. 発表標題 Ultrastructural analysis of microglia-neuron interaction following social defeat stress using serial electron microscopy
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Numa C, Nagai H, Furuyashiki T
2. 発表標題 Elucidating neuronal projections from the medial prefrontal cortex responsible for the resilience to social defeat stress in mice
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井裕崇, 古屋敷智之
2. 発表標題 社会ストレスによる脳組織の超微細細胞生物学的解析の解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirotaka Nagai, Shu Higashida, Kazuki Nakayama, Ryota Shinohara, Masayuki Taniguchi, Midori Nagai, Takatoshi Hikida, Satoshi Yawata, Yukio Ago, Shiho Kitaoka, Shuh Narumiya, Tomoyuki Furuyashiki
2. 発表標題 Repeated social defeat stress impairs attentional set shifting irrespective of social avoidance and increases female preference
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井裕崇
2. 発表標題 断眠ストレスや社会ストレスによる脳組織の超微細細胞生物学的解析の解析
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirotaka Nagai, Luisa De Vivo, Michele Bellesi, Maria F Ghilardi, Giulio Tononi, Chiara Cirelli
2. 発表標題 Sleep Consolidates Motor Learning of Complex Movement Sequences in Mice
3. 学会等名 WCP2018 - 18th WORLD CONGRESS OF BASIC AND CLINICAL PHARMACOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap https://researchmap.jp/hirotakanagai/
--

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

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
---------	---------