

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15268

研究課題名（和文）ミクログリアによる情動変容を担う脳内組織恒常性の維持とその破綻機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of machinery for brain homeostasis and its disruption associated with emotional abnormalities by microglia

研究代表者

谷口 将之（Taniguchi, Masayuki）

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：90831751

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）：社会環境から受けるストレスは、抑うつなど認知情動変容を誘導し、精神疾患のリスク因子となる。これまでの研究から慢性ストレスではミクログリアの活性化に端を発した脳内炎症が生じることが示されているが、その実態には不明な点が多い。本研究では、多様な脳領域のミクログリアを解析するための手法を確立した。さらに、エピゲノム解析及び遺伝子発現解析を駆使して、ミクログリア活性化に関わる複数の情報伝達経路とその遺伝子発現応答を同定し、それらが反復社会挫折ストレスによる情動変容に関与することを示唆した。以上の成果は、ミクログリアがストレスによる複数の情報伝達経路を統合し、情動変容を促す可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミクログリア活性化は情動変容に関わる脳内炎症に重要である。本研究の成果は、ミクログリアはストレスによる複数の情報伝達経路を統合し、情動変容に関与することを示した。これらの成果はストレスによる脳機能変化の難可逆性の生物学的基盤に迫る点で学術的意義は大きい。また、治療抵抗性の精神疾患において新規治療標的の探索が不可欠であり、本研究成果はストレス関連疾患の病態の解明のみならず精神疾患創薬のための新たな標的を提示する点で社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：Social stress often induces cognitive emotional abnormalities such as depression and anxiety, and can be a risk factor for mental illness. Our studies suggest that chronic stress induces neuroinflammation through microglia activation. However, the nature of microglial activation and its mechanism remain unknown. Here we developed a technique to analyze microglial diversity across the brain regions. Using epigenetic and transcriptome analyses, we found several signaling pathways involved in microglial activation and their gene expression responses. We also found that these pathways contribute to stress-induced emotional abnormalities. These findings suggest that microglia integrate several stress-induced signaling pathways and promote emotional abnormalities.

研究分野：神経科学

キーワード：ストレス ミクログリア エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

社会環境から受けるストレスは抑うつや不安など認知情動変容を引き起こし、うつ病など精神疾患のリスク因子となる。申請代表者は、マウスの反復社会挫折ストレスを用いて急性ストレスにおけるストレス抵抗性の増強には前頭前皮質興奮性神経細胞に発現するドパミン D1 受容体が必須であること、その過程には内側前頭前皮質のドパミン D1 受容体を介した神経細胞の先端樹状突起造成を伴うことを見出した。一方、慢性ストレスは、ドパミン D1 受容体非依存的に神経細胞の樹状突起を萎縮させ、ストレス抵抗性を消失させることを明らかにした。申請代表者が共同研究者として参画した研究では、慢性ストレスが、前頭前皮質選択的に炎症関連細胞であるミクログリアを活性化し、神経細胞の樹状突起萎縮を伴う抑うつ行動を引き起こすことを示した。以上の知見から慢性ストレスによる神経細胞の樹状突起萎縮やストレス抵抗性の消失は、ミクログリアの活性化に端を発した脳内組織恒常性の破綻によると推測されるが、その実態は不明である。最近の研究からストレスの反復はミクログリアの活性化を次第に増強する“ミクログリアのプライミング現象”を誘導することが示された。このプライミングにはエピゲノム制御の関与が報告されていることから、ストレスによるミクログリアのエピゲノム制御の重要性が示唆される。従って、申請代表者は慢性ストレスによるミクログリアのエピゲノム制御に着目し、ミクログリア活性化の実態と、脳内組織恒常性の維持と破綻における役割の解析に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究は、マウス社会挫折ストレスと脳領域・細胞種特異的なエピゲノム・遺伝子発現解析、一細胞遺伝子発現解析を駆使し、ストレスの反復によるミクログリアのプライミングのメカニズムを同定し、脳内組織恒常性の維持と破綻における分子細胞生物学的基盤の創出を目指した。本研究による成果を通じ、うつ病などストレス性疾患の病態機序解明や新たな創薬標的創出に資する知見を得る。

3. 研究の方法

(1) マウス社会挫折ストレスモデル

C57BL/6 遺伝背景の成体雄マウスを体格が優位で攻撃性の高い ICR 遺伝背景の成体雄マウスの攻撃に 1 日 10 分間、単回あるいは 10 回反復して曝露した。社会性行動試験では、新規 ICR マウスが入った檻を設置したチャンパーに試験対象マウスを投じ、ICR マウスに近い領域(社会性行動ゾーン)と ICR マウスとは反対の領域(社会忌避行動ゾーン)の滞在時間により評価した。単回ストレスは社会性行動試験での社会忌避行動を誘導しないが、ストレスの反復は社会性行動試験での社会忌避行動、高架式十字迷路試験での不安行動、新規物体認識試験での認知機能障害を誘導する。また、このストレスモデルによる情動変容には個体差が大きく、反復ストレスにより抑うつ行動が誘導される“ストレス感受性群”と抑うつ行動が誘導されない“ストレス抵抗性群”が誘導される。このモデルで誘導される行動変化は抗うつ薬の慢性投与により改善することから、マウスうつ病モデルとして用いられる。

(2) 脳領域特異的なミクログリアのバルク RNA-seq と一細胞 RNA-seq

CX3CR1-EGFP マウスの内側前頭前皮質、側坐核など複数脳領域を切り出し、蛍光活性化細胞ソーティング (Fluorescence Activated Cell Sorting; FACS) を用いて EGFP 陽性の細胞を単離してミクログリアとした。バルク RNA-seq では単離したミクログリアから RNA を精製した後、RNA-seq ライブラリを作製し、次世代シーケンサーに供した。一細胞 RNA-seq では 10xgenomics 社の Chromium コントローラー及び Chromium Single Cell 3' Reagent Kits v3、を用いてライブラリを作製し、次世代シーケンサーに供した。Multiplexing には 3' CellPlex を用いた。

(3) 脳領域特異的なミクログリアの ChIP-seq 及び ATAC-seq 解析

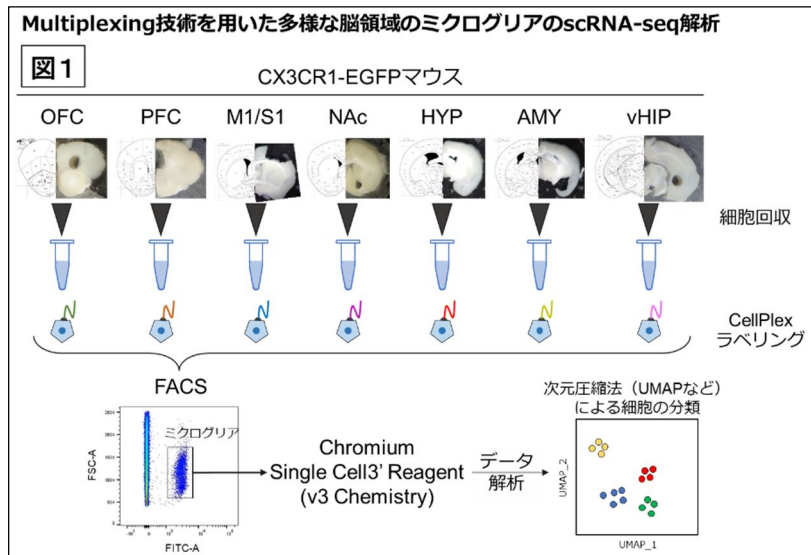
CX3CR1-EGFP マウスの内側前頭前皮質、側坐核から RNA-seq と同様の手法でミクログリアを単離し、クロマチン免疫沈降シーケンス解析 (Chromatin immunoprecipitation sequencing; ChIP-seq) と網羅的オープンクロマチン領域解析 (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using

sequencing; ATAC-seq) を行った。ChIP-seq では、抗 H3K27ac 抗体を用いてアセチル化ヒストン修飾を受けたヒストンタンパク質に結合した DNA ゲノム領域 (= エンハンサー領域) を回収した。ATAC-seq では Tn5 transposase を用いてオープンクロマチン領域を回収した。回収したそれぞれの DNA から ChIP-seq ライブラリ、ATAC-seq ライブラリを作製し、次世代シーケンサーに供した。

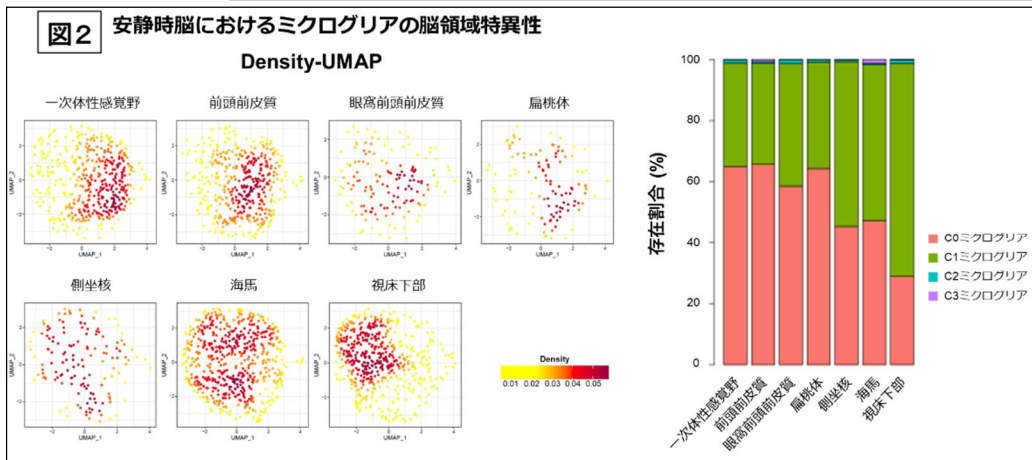
4. 研究成果

(1) 安静時脳におけるミクログリアの脳領域特異性の解析

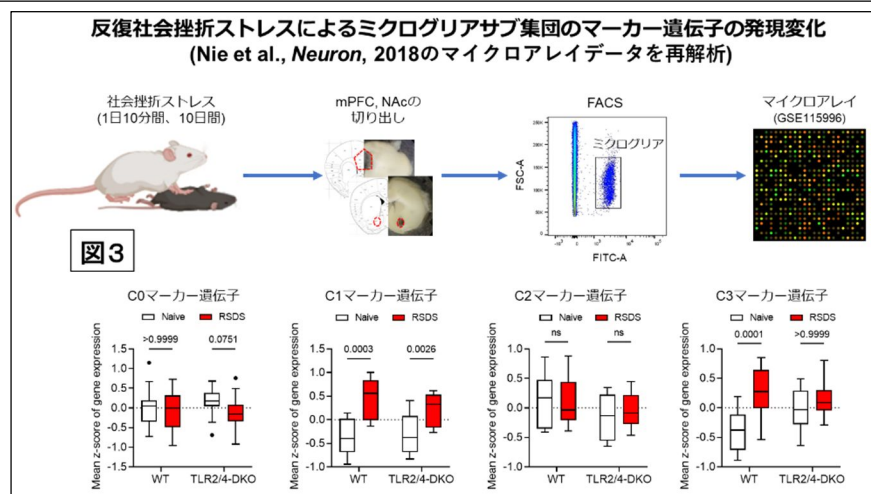
反復社会挫折ストレスが前頭前皮質など特定の脳領域に選択的にミクログリアを活性化させることを示してきた。従って、反復ストレスによる多様な脳領域でのミクログリアの変化の実態とそのメカニズムに迫るため、複数の脳領域組織のミクログリアを単離して一細胞 RNA-seq 解析を行うための Multiplexing 技術を確立した (図 1)。この技術を用いて前頭前皮質と一次



感覚運動野を含む大脳皮質と視床下部ではミクログリアの遺伝子発現パターンが大きく



異なり、側坐核と海馬はその中間に位置することを見出した (図 2)。また反復社会挫折ストレスによりミクログリアで発現が変化する遺伝子群の発現が特定のミクログリアサブタイプで高いことも見出した (図 3、Mishima et al. J Pharmacol Sci 2023)。



(2) ストレスによるミクログリアのエピゲノム・遺伝子発現制御変化の解析

ストレスによるミクログリア活性化の実態を調べるため、CX3CR1-EGFP マウスを単回・反復ストレスに供し、前頭前皮質、側坐核、海馬、運動感覚野、視床下部のミクログリアを単離し、

一細胞 RNA-seq 解析を行った。さらに、より詳細に遺伝子発現変化のパターンを解析するために、前頭前皮質と側坐核から単離したマイクログリアでバルク RNA-seq を行った。その結果、ストレスによる遺伝子発現変化はストレスの期間、ストレス感受性、脳領域選択性のクラスターに分類できることを見出した。さらに、そのメカニズムに迫るために、前頭前皮質と側坐核のマイクログリアで H3K27ac-ChIP-seq 解析を行ったところ、ストレスによりスーパーエンハンサーが変化し、その変化から複数のクラスター分類できること、その変化は近傍の遺伝子発現変化と傾向が合致し、ストレスによる遺伝子発現変化クラスターの一部を説明できることを示した。さらに、ATAC-seq 解析を実施し、ストレスにより変化したスーパーエンハンサー領域に含まれるヌクレオソームフリー領域を検出し、転写因子モチーフの濃縮を調べた結果、異なるスーパーエンハンサークラスターは異なる転写因子による制御を受ける可能性を見出した。以上の結果は、マイクログリアでは、ストレスの期間、ストレス感受性、脳領域選択性がエピゲノムレベルで統合され、ストレス応答を決定することを示唆する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Emoto T, Yamamoto H, Yamashita T, Takaya T, Sawada T, Takeda S, Taniguchi M, Sasaki N, Yoshida N, Saito Y, Sivasubramaniyam T, Otake H, Furuyashiki T, Robbins CS, Kawai H, Hirata K	4. 巻 145
2. 論文標題 Single Cell RNA Seq Reveals a Distinct Immune Landscape of Myeloid Cells in Coronary Culprit Plaques Causing Acute Coronary Syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 1434-1436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.058414	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Uchida M, Noda Y, Hasegawa S, Hida H, Taniguchi M, Mouri A, Yoshimi A, Nabeshima T, Yamada K, Aida T, Tanaka K, Ozaki N	4. 巻 150
2. 論文標題 Early postnatal inhibition of GLAST causes abnormalities of psychobehaviors and neuronal morphology in adult mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochem Int.	6. 最初と最後の頁 105177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2021.105177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mishima Rei, Taniguchi Masayuki, Matsushita Kazutoshi, Tian Bowen, Furuyashiki Tomoyuki	4. 巻 151
2. 論文標題 Microglial subpopulations with distinct transcriptome signatures vary across brain regions in the resting mouse brain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 142 ~ 147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2022.12.010	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 Sakai Mai, Yu Zhiqian, Taniguchi Masayuki, Picotin Rosanne, Oyama Nanami, Stellwagen David, Ono Chiaki, Kikuchi Yoshie, Matsui Ko, Nakanishi Miharuru, Yoshii Hatsumi, Furuyashiki Tomoyuki, Abe Takaaki, Tomita Hiroaki	4. 巻 24
2. 論文標題 N-Acetylcysteine Suppresses Microglial Inflammation and Induces Mortality Dose-Dependently via Tumor Necrosis Factor- Signaling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3798 ~ 3798
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24043798	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12件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷口将之, 古屋敷智之
2. 発表標題 脳と末梢のストレス応答を統合するミクログリアの転写プログラム
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松下和敏, 谷口将之, 古屋敷智之
2. 発表標題 慢性ストレスへのミクログリア応答の半球非対称性
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷口将之, 松下和敏, 三島零, 北岡志保, 工樂樹洋, 門田満隆, 古屋敷智之
2. 発表標題 ミクログリアの局所的および全般的なストレス応答を担う転写・エピゲノム制御
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松下和敏, 谷口将之, 古屋敷智之
2. 発表標題 慢性ストレスへのミクログリア応答の左右非対称性
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口将之, 松下和敏, 三島零, 北岡志保, 工樂樹洋, 門田満隆, 古屋敷智之
2. 発表標題 ミクログリアのストレス応答を担う転写・エピゲノム制御
3. 学会等名 第139回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三島 零, 谷口 将之, 松下 和敏, 古屋敷 智之
2. 発表標題 一細胞解析による内側前頭前皮質のミクログリアのサブタイプとストレス応答性の多様性
3. 学会等名 第139回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口将之、古屋敷智之
2. 発表標題 Stress-induced transcriptional and epigenetic landscape of microglia
3. 学会等名 BPCNP4学会合同年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taniguchi M, Furuyashiki T
2. 発表標題 Transcriptional machinery of microglial stress response
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mishima R, Taniguchi M, Matsushita K, Furuyashiki T
2. 発表標題 Chronic social stress-induced transition of microglial transcriptome states in mice
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taniguchi M, Matsushita K, Mishima R, Kitaoka S, Kuraku S, Kadota M, Furuyashiki T
2. 発表標題 Transcriptional and epigenetic regulations of microglia for stress responses
3. 学会等名 NEURO 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsushita K, Taniguchi M, Furuyashiki T
2. 発表標題 Hemispheric asymmetry in chronic stress-induced microglial responses
3. 学会等名 NEURO 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷口将之
2. 発表標題 ストレスによるミクログリアの転写・エピゲノム応答とその役割
3. 学会等名 第147回日本薬理学会関東部会 次世代薬理学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap
<https://researchmap.jp/7000023903>

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