

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670091

研究課題名(和文) マイクログリアを介するストレスと脳発達の新展開

研究課題名(英文) Possible roles of microglia and the underlying mechanisms on the brain development

研究代表者

佐藤 真 (SATO, Makoto)

大阪大学・連合小児発達学研究所・教授

研究者番号：10222019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、そもそも「マイクログリアが貪食能をもち、脳発達に影響する」との仮説検証を目的とする。その基礎的な現象を確認する過程で想定外の成果が得られた。すなわち、以前はマイクログリアは、いわゆる活性化状態で貪食作用を活発化させるとされていたが、実は活性化状態にも貪食能が大きく変わる二つのフェーズがあり、そのフェーズ移行にアルギニンメチル化酵素が関わる可能性を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Microglia is a well-known scavenger in the brain. Several lines of evidence suggest that microglia plays a pivotal role for the brain development through its phagocytic activity. There exist two phases in the 'activated' microglia in terms of its scavenging activities. We here demonstrate that one type of protein arginine N-methyltransferases is essential for such phase transition.

研究分野：解剖学

キーワード：神経科学 マイクログリア 脳・神経 脊髄損傷 アルギニンメチル化酵素

1. 研究開始当初の背景

東日本大震災後の PTSD (post-traumatic stress disorder) への対応のみならず、親の愛情不足からくる虐待や孤食が脳に及ぼす影響への対応は大きな社会問題であり、ストレスが脳の、特に発育に及ぼす影響の解明とメカニズムの理解に基づく正しい対応法の早急な確立が望まれている。最近になり、脳の側坐核が責任部位の一つとして注目され、役割について多くの知見が集積されてきた。そして、治療法への展開も図られている。一方、ストレスにより大脳の一部が(特に領野ごとに)障害され脳のボリュームそのものが減少するとの衝撃的な報告がなされているが、このような大脳皮質に対し器質的变化をもたらすメカニズムは未だ不明であり、いわんやそのメカニズムの解明に基づいた対応策も確立されていない。本研究は、最近正常脳の発達において神経回路の成熟に関わる事が報告され、脳発達との関連が特に着目されているマイクログリア(ミクログリア)に着目し、マイクログリアのもつ貪食能が脳の器質的变化をもたらしていると仮定し、ストレスに伴う大脳のボリューム減少メカニズムを説明しようとするものである。マイクログリアは外的刺激により活性状態が変わり、活性化すると高い貪食能を示すとされるため、その活性化メカニズムについて詳細に検討し、ついで脳発達やストレス下でのその意義を明らかにしようとする。

なお、申請研究代表者は、過去 10 年以上大脳皮質形成・発達の研究に従事してきた (Nat. Cell Biol., 2002; J. Neurosci., 2004; J. Biol. Chem., 2010; Cereb. Cortex, 2012 等。また共同研究にて PNAS, 2008; Nat. Med., 2009; J. Neurosci., 2012 等) として、大脳皮質の発達を分子・細胞面で制御する数々のノウハウや解析に適したモデルマウスなどを有している。そのような実績のもと、本研究を着想した。

2. 研究の目的

ストレスが脳の発達に多大な影響を及ぼすことは、PTSD や愛着障害として良く知られている。しかしながら、予防法・治療法については未だその研究は道半ばであり、ストレスホルモン量の多寡がホルモン受容体を介し大脳の発達に影響することや、側坐核のシナプス部位においてストレスが AMPA 受容体の動態に影響するなどの報告はあるものの (Malenka 研より Cell Symposium, 2012 にて発表) PTSD ではストレスにより大脳の領野ごとに器質的变化 (volume 変化) まで生じるとされるその仕組みについてはほとんど解明されていない。一方、正常脳発達に関連するとは全く想定されていなかったマイクログリアであるが、正常脳発達においても、神経回路の成熟 (特に余分な神経突起の刈り込み (pruning) を担う) などに関わるとの知見が報告され、大脳において神経幹細胞を

貪食し、その数の制御に関わるとのデータ (Noctor 研より Soc. Neurosci, 2012 にて発表) まで明らかとなっており、脳の正常発達へのマイクログリアの関与がホットな研究領域として大いなる注目を浴びている。ストレスがマイクログリアの発生・発達に大きな影響を与えることも報告されている。以上を踏まえ、本研究では、全く大胆であるが「脳の発達に関わるマイクログリアがストレスホルモンを受け皿となり、正常発達における機能の過剰亢進を通じ、PTSD などで見られる脳の器質的变化の責任細胞として機能する」との仮説を立て、その是非を検討することを当初の目的とした。そして、マイクログリアの貪食能 ~ すなわち活性化状態 ~ を正しく制御し、科学的エビデンスに基づく PTSD への対処法を確立することを目指す研究として開始した。本研究では、仮説そのものがチャレンジングであり、またマイクログリアの活性化の分子基盤にも不明な点が現状では多い。そこで、これら未知の部分をも対象に含めた研究を行うこととし、挑戦的萌芽研究として実施することとした。

3. 研究の方法

本研究は当初、ストレスによるマイクログリアの活性化状況の変化を検討し、次いで貪食能の高まりとストレス時の脳発達を検討することでスタートした。しかしながら、研究の過程で思わぬ成果が得られ、結果として、その成果に基づき期間後半は研究を遂行した。これは、挑戦的萌芽研究ならではの展開と考えている。

すなわち、以前はマイクログリアは、いわゆる活性化状態で貪食作用を活性化させるとされ、本研究もそのような知見をベースとして提案した。しかし研究実施中に、実は活性化状態にも貪食能が大きく変わる二つのフェーズがあることがマクロフェージ研究のアナロジーとして提唱されるようになり (それぞれの状態を M1 様マイクログリア、M2 様マイクログリアと呼ぶ) そのフェーズ移行を詳細に検討する必要がでてきた。われわれは、そのフェーズ移行の分子メカニズムを解明する過程で、アルギニンメチル化酵素の一つが重要な役割を担う可能性を見いだした。この新たな展開は、大阪大学大学院医学系研究科解剖学講座 (神経機能形態学) 森泰文博士との共同研究によるものであり、森博士は当初の研究メンバーには含まれていないが、上記想定外の展開のため、森博士と共同し進めた。

すなわち、タンパク質メチル化酵素の一つである protein arginine N-methyltransferase (PRMT) の一つが中枢神経系に局限して発現するという、森博士らによる研究、さらに脊髄損傷ストレス時には、その PRMT がマイクログリア様細胞にも観察されるとの知見 (未発表) に基づき、ストレスにより PRMT がマイクログリアの活性化状態を変換する

コンバーターとして機能する可能性を検討した。そのため、その PRMT (の一つのタイプ) に対する抗体も用いて、同 PRMT 発現マイクログリアの性質を、特に M2 様マイクログリアの特徴を有するか否かも含め検討した。

< 引用文献 >

Tomoda, A.; Suzuki, H.; Rabi, K.; Sheu, Y. S.; Polcari, A.; Teicher, M. H., Reduced prefrontal cortical gray matter volume in young adults exposed to harsh corporal punishment. *Neuroimage*, 47 Suppl 2, 2009 T66-71.

Paolicelli, R. C.; Bolasco, G.; Pagani, F.; Maggi, L.; Sciani, M.; Panzanelli, P.; Giustetto, M.; Ferreira, T. A.; Guiducci, E.; Dumas, L.; Ragozzino, D.; Gross, C. T., Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 333 (6048), 2011, 1456-8.

Gomez-Gonzalez, B.; Escobar, A., Prenatal stress alters microglial development and distribution in postnatal rat brain. *Acta Neuropathol*, 119 (3), 2010, 303-15.

Kousaka, A.; Mori, Y.; Koyama, Y.; Taneda, T.; Miyata, S.; Tohyama, M., The distribution and characterization of endogenous protein arginine N-methyltransferase 8 in mouse CNS. *Neuroscience*, 163 (4), 2009, 1146-57.

4 . 研究成果

本研究は、そもそも「マイクログリアが貪食能をもち、脳発達に影響する」との仮説検証を目的とする。その基礎的な現象を確認する過程で想定外の成果が得られた。すなわち、以前はマイクログリアは、いわゆる活性化状態で貪食作用を活性化させるとされていたが、実は活性化状態にも貪食能が大きく変わる二つのフェーズ (マクロファージでの M1 マクロファージ様状態と M2 マクロファージ様状態に相当すると考えられ、そのためそれらをそれぞれ M1 様マイクログリア、M2 様マイクログリアと呼ぶ) があり、そのフェーズ移行にアルギニンメチル化酵素が関わる可能性を見いだした。すなわち、脊髄損傷ストレス時にあらわれる PRMT 陽性マイクログリアは M2 様マイクログリアのマーカーに対し陽性であった。さらに、shRNA などにより PRMT の一つの発現を抑制したところ、M2 様マイクログリアのマーカー陰性となった。以上より、このアルギニンメチル化酵素がマイクログリアが (M1 様から) M2 様マイクログリアに移行するのに重要な役割を担うことが判明した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Okamoto, M., Iguchi, T., Hattori, T. Matsuzaki, S., Koyama, Y., Taniguchi, M., Komada, M., Xie, M.-J., Yagi, H., Shimizu, S., Konishi, Y., Omi, M., Yoshimi, T., Tachibana, T., Fujieda, S., Katayama, T., Ito, A., Hirotsune, S., Tohyama, M., Sato, M. (2015) DBZ regulates cortical cell positioning and neurite development by sustaining the anterograde transport of Lis1 and DISC1 through control of Ndel1 dual-phosphorylation. *J. Neurosci.* 35(7):2942-2958.

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5029-13.2015

Komeda, H., Kosaka, H., Saito, D. N., Mano, Y., Jung, M., Fujii, T., Yanaka, H. T., Munesue, T., Ishitobi, M., Sato, M., Okazawa, H. (2014) Autistic empathy toward autistic others. *Soc. Cogn Affect Neurosci.* 10 (2) 145-152.

DOI: 10.1093/scan/nsu126

Yagi, H., Nagano, T., Xie, M.-J., Ikeda, H., Kuroda, K., Komada, M., Iguchi, T., Tariqur, R.M., Morikubo, S., Noguchi, K., Murase, K., Okabe, M., Sato, M. (2014) Filamin A-interacting protein (FILIP) is a region-specific modulator of myosin 2b and controls spine morphology and NMDA receptor accumulation. *Sci. Rep.* 4, 6353; DOI:10.1038/srep06353.

Lopatina, O., Yoshihara, T., Nishimura, T., Zhong, J., Akther, S., Fakhru, A.A., Liang, M., Higashida, C., Sumi, K., Furuhashi, K., Inahata, Y., Huang, J.J., Koizumi, K., Yokoyama, S., Tsuji, T., Petugina, Y., Sumarokov, A., Salmina, A.B., Hashida, K., Kitao, Y., Hori, O., Asano, M., Kitamura, Y., Kozaka, T., Shiba, K., Zhong, F., Xie, M.-J., Sato, M., Ishihara, K., Higashida, H. (2014) Anxiety- and depression-like behavior in mice lacking the CD157/BST1 gene, a risk factor for Parkinson's disease. *Front. Behav. Neurosci.* 8:133.

DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00133.

Komada, M., Iguchi, T., Takeda, T., Ishibashi, M. and Sato, M. (2013) Smoothed controls cyclinD2 expression and regulates the generation of intermediate progenitors in the developing cortex. *Neurosci. Lett.* 547:87-91.

DOI: 10.1016/j.neulet.2013.05.006.

Komeda, H., Kosaka, H., Saito, N-D., Inohara, K., Munesue, T., Ishitobi, M., Sato, M. and Okazawa, H. (2013) Episodic memory retrieval for story characters in high-functioning autism. *Mol. Autism* 4(1):20.

DOI: 10.1186/2040-2392-4-20.

[学会発表] (計 19 件)

岡 雄一郎, 猪口 徳一, 佐藤 真、マウ

ス大脳皮質長連合ニューロンの軸索投射、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 11 日～13 日、パシフィコ横浜（神奈川県）

八木 秀司、佐藤 真、野口 光一、FILIP とシャペロン分子によるシナプス形態調節、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 11 日～13 日、パシフィコ横浜（神奈川県）

謝 敏カク、八木 秀司、猪口 徳一、岡 雄一郎、黒田 一樹、柚崎 通介、松田 信爾、石川 保幸、佐藤 真、Phldb2 は樹状突起スパインの成熟およびスパインの可塑性を制御する、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 11 日～13 日、パシフィコ横浜（神奈川県）

謝 敏カク、八木 秀司、猪口 徳一、岡 雄一郎、黒田 一樹、柚崎 通介、松田 信爾、石川 保幸、佐藤 真（招待講演）、PHldb2 は LTD 誘導後のシナプスでの APMA 受容体のエンドサイトーシスを制御する、第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回神経化学大会合同大会、2014 年 9 月 28 日～10 月 1 日、奈良県文化会館（奈良）

Yagi, H., Sato, M., Noguchi, K., A chaperone protein controls the morphology of neuronal spines via filamin-A interacting protein, Society for Neurosciece 2014、2014 年 11 月 15 日～19 日、Walter E. Washington Convention Center(Washington D.C.,U.S.A.)

謝 敏カク、佐藤 真、脂質関連分子は LTD 誘導後のシナプスでの APMA 受容体のエンドサイトーシスを制御する、第 41 回日本脳科学学会、2014 年 11 月 22 日～23 日、福井県県民ホール（福井県福井市）森 泰丈、小山 佳久、猪口 徳一、佐藤 真、遠山 正彌、脊髄損傷時に出現する活性化マイクログリアにおけるアルギニンメチル化酵素 PRMT8 の機能解析、第 19 回グリア研究会、2014 年 12 月 6 日、東京商工会議所（東京都千代田区）

佐藤 真（招待講演）進化と個体発生から見通す大脳皮質構築、第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2015 年 3 月 21 日～23 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

黒田 一樹、八木 秀司、謝 敏カク、尾身 実、猪口 徳一、岡 雄一郎、佐藤 真、神経細胞のスパインにおける NMDA 受容体と結合する FILIP 関連分子の機能解析、第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2015 年 3 月 21 日～23 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

岡 雄一郎、猪口 徳一、佐藤 真、マウス大脳皮質領野間の軸索投射の解析、第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2015 年 3 月 21 日～23 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

猪口 徳一、尾身 実、岡 雄一郎、佐藤 真、皮質脊髄路発達期の側枝形成に關与する受容体分子の解析、第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2015 年 3 月 21 日～23 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

猪口 徳一、尾身 実、岡 雄一郎、佐藤 真、皮質脊髄路回路形成における軸索側枝形成因子の探索と解析、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 21 日、京都国際会館（京都市）

岡 雄一郎、猪口 徳一、佐藤 真、マウス大脳皮質長連合ニューロンの選択的標識、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 21 日、京都国際会館（京都市）服部 剛志、岡本 昌之、駒田 致和、小山 佳久、高雄 啓三、宮川 剛、片山 泰一、伊藤 彰、佐藤 真、遠山 正彌、DBZ KO マウスにおける大脳皮質発達の解析、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 21 日、京都国際会館（京都市）

黒田 一樹、八木 秀司、謝 敏カク、岡 雄一郎、猪口 徳一、佐藤 真、FILIP 関連分子による Myosin- b を介した神経細胞野^o 形成の制御とシナプス可塑性における機能解析、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 21 日、京都国際会館（京都市）

謝 敏カク、八木 秀司、猪口 徳一、岡 雄一郎、黒田 一樹、柚崎 通介、松田 信爾、白尾智明、石川保幸、佐藤 真、Phldb2 は樹状突起スパインの成熟および化学的 LTD 誘導後のシナプスでの AMPA 受容体のエンドサイトーシスを制御する、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 21 日、京都国際会館（京都市）

Xie, M.-J., Yagi, H., Iguchi, T., Oka, Y., Kuroda, K., Yuzaki, M., Matsuda, S., Shirao, T., Ishikawa, Y. and Sato, M.、Phldb2 regulates the maturation of dendritic spines and AMPA receptor endocytosis during long-term depression.、Society For Neuroscience 2013、2013 年 11 月 11 日、San Diego, U.S.A.

Kuroda, K., Yagi, H., Xie, M.-J., Oka, Y., Iguchi, T. and Sato, M.、FILIP-related molecule controls spine maturation and synaptic function in the hippocampal neuron via non-muscle myosin b.、Society For Neuroscience 2013、2013 年 11 月 11 日、San Diego, U.S.A.

黒田 一樹、謝 敏カク、尾身 実、八木 秀司、佐藤 真、神経細胞のスパインにおける FILIP 関連分子の生体における機能解析、第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014 年 3 月 28 日、自治医科大学キャンパス（栃木県下野市）

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.anat2.med.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 真 (SATO, Makoto)

大阪大学・連合小児発達学研究科・教授

研究者番号：10222019

(2) 研究分担者

謝 敏力夕 (XIE, Min-Jue)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：40444210

尾身 実 (OMI, Minoru)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：00400416

猪口徳一 (IGUCHI, Tokuichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60509305