

研究報告書

「身体疾患で惹起される免疫変容が起こす神経回路恒常性の破綻と精神症状の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 和氣 弘明

1. 研究のねらい

複雑に多様化する現代社会において、高次脳機能に障害を有する発達障害、精神疾患の解明が社会経済的に急務であり、その治療法の開発は喫緊の課題である。このような精神疾患の研究はこれまで遺伝的背景に着目され、精神疾患患者がもつ遺伝子異常を動物で再現し、その行動を検証する重要な研究が行われ一定の成果をあげてきた。しかしながら精神疾患で表出する精神症状は精神疾患でのみ表出するものではなく、自己免疫疾患や悪性腫瘍、また肝腎疾患などの身体疾患でも表出することが知られている。このような身体疾患では精神疾患特有の遺伝子異常を認められないと考えられる。その為遺伝的要因以外の影響による神経回路活動の異常を来す結果、精神症状が生じると考えられる。またこのような精神疾患を表出する身体疾患においては効率に免疫異常を認めることが知られている。そのため本課題では、身体疾患に付随する精神・神経症状の発現に着目し、身体疾患の体循環系における免疫異常が中枢神経系に作用し、神経回路活動の異常をきたすことで精神症状を発現する神経回路基盤およびそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

具体的には

1. 免疫異常をきたす身体疾患(自己免疫疾患など)における体循環系免疫細胞と中枢神経系免疫細胞であるミクログリアの相互相関を明らかにする
2. 体循環系免疫細胞との相互相関によって引き起こされるミクログリアの変容機構を明らかにする
3. さらに発達期および成熟期におけるミクログリアの新規生理機能を2光子顕微鏡などの新規光学システムによって解き明かす。
4. 上記新規生理機能の疾患モデルにおける変容を明らかにし、生理機能が破綻することによって引き起こされる神経回路活動の異常を可視化する。
5. 上記の変化による行動異常を個体計測によって明らかにする。

以上の研究内容を行うことで、精神症状を表出する神経回路活動を可視化することによって明らかにするとともに、遺伝子異常を伴わない精神症状の発現のうち、免疫と神経回路活動との相関による発現のメカニズムを明らかにし、最終的に異常を来す回路基盤の解明に挑戦する。

2. 研究成果

(1) 概要

多様化する現代社会において、高次脳機能に異常を呈する発達障害・精神疾患の病態の解明および治療法の開発は喫緊の課題である。本課題では、精神症状が精神疾患特異

的なものではなく、身体疾患(特に免疫異常を来す疾患群)にも発現することに着目し、体循環系免疫および中枢神経系の免疫の変容による神経回路活動の異常が起こるメカニズムを明らかにする。

免疫異常を来す身体疾患モデルとして全身性エリテマトーデスモデルを用い、全身炎症の際の血管周囲にはミクログリアが集積し、その集積部に特異的なシグナルにより体循環系免疫細胞の停留を促し、さらに血液脳関門の非薄化が生じ、体循環系の免疫細胞とミクログリアの接触による相互相関および脳内浸潤を促すことを明らかにした。このような接触の結果として全身慢性炎症時には血管周囲のミクログリアの突起の短縮などで観察される活性化を認めることを明らかにした。

このように全身慢性炎症時に活性化されるミクログリアの神経回路活動に対する寄与の検討を行った。体循環系免疫の活性化を行ったマウス第1次運動野2/3層の運動学習中の神経細胞集団の活動を可視化した。全身炎症によるミクログリアの活性化を伴うマウスにおいては神経細胞の同期性が低下することで学習が阻害されることがわかった。またこのような変化はミクログリアを除去したマウスにおいても認められることから、ミクログリアがその生理機能を喪失した結果神経回路活動の異常を引き起こし、学習行動を阻害することを明らかにした。

ミクログリアは発達期および成熟期においてその形態を大きく変化させることが知られている為、その発達期および成熟期に特異的な生理機能を持つことが考えられる。光学イメージングを駆使し、これまで、胎生期・発達早期・成熟期の生理機能を明らかにすることを試み、いくつかの新規生理機能を解き明かした。ミクログリアは発達早期では樹状突起に接触することにより、シナプス新生を促し、特定の神経回路形成に寄与することを明らかにした。さらに成熟期においてはシナプスに接触し、神経細胞間の協調活動を制御することを明らかにした。このミクログリアの生理機能は、活性化した体循環系の免疫細胞と相互相関することによって喪失し、協調的な神経細胞活動の異常が生じ、高次脳機能発現を阻害することを示した。本研究によって、全身炎症に伴う高次脳機能障害のメカニズムの一端を示すことができたとともに、このような免疫異常に伴って生じる精神症状の治療への新たな戦略を提示することができた。

(2) 詳細

研究テーマA「全身炎症時における体循環系免疫細胞と中枢神経系ミクログリアの相互作用」

全身炎症モデルとして全身性エリテマトーデスの疾患モデルである MRL/lpr マウスを用いた。これまで MRL/lpr マウスは行動異常があることが報告されている。そこで、本マウスにおける中枢神経系における体循環系の免疫細胞動態および中枢神経系免疫細胞であるミクログリアの動態を調べた。

中枢神経系において、MRL/lpr のミクログリアは正常群に比して血管周囲にミクログリアがより集積することがわかった。さらに2光子顕微鏡を用いた in vivo イメージングによって、同部位に体循環系の免疫細胞が著明に停留することがわかった。同部位における停留するメカニズムとして、ミクログリアが集積する部位の血液脳関門の非薄化および血管内皮細胞

の分子特異的な発現によるものであることがわかった。さらなる詳細な観察をおこなった。ミクログリアに EGFP が発現する遺伝子改変マウスにおいて蛍光色素をもちいて血液脳関門を形成するアストロサイトの突起を生体で染色することによって両者の関係を可視化した。その結果ミクログリアは血液脳関門の内部に突起を伸展させることを明らかにした。またそれによって体循環系の免疫細胞と相互接触することを明らかにした。の体循環系免疫細胞との接触の結果、MRL/lpr マウスにおけるミクログリアは活性化し、さらに血管周囲に集積するミクログリアは MRL/lpr マウスにおいて活性化していることがわかった(投稿準備中)

研究テーマB「中枢神経系ミクログリアの新規生理機能の解明」

ミクログリアは中枢神経系唯一の免疫担当細胞であり、これまでは中枢神経系の病態において形態を変化させ、神経保護的もしくは毒性作用を発揮し、病態の進行に関与することに着目した重要な研究が数多く行われてきた。しかしながら、その生理機能は技術的な問題から不明な点が多く、ミクログリアに一時的に起因する疾患の存在は不明のままであった。近年の光学技術の発達により生体内で生理的条件下におけるミクログリアを観察することができるようになり、その生理機能に着目した研究が進められるようになった。すなわちミクログリアは生体内において絶えずその突起を伸展・退縮させ(Nimmerjahn et al., Science 2005)、さらにミクログリア突起がその動きによって頻繁にシナプス構造に接触し、シナプス活動の監視を行っていることを我々が報告した (Wake et al., J. Neurosci 2009)。これらの監視機構によって、梗塞の周囲領域で神経回路の再編が生じていると考えられる領域ではミクログリアの接触を受けたシナプスが除去されることが示され、可塑的変化の高い領域においてミクログリアがシナプスの可塑的変化に関与することを明らかにした (Wake et al., J. Neurosci 2009.)。さらに発達期の回路再編時において、ミクログリアは神経活動依存性に古典的な補体経路を用いてシナプス除去過程に関与することがわかり (Schafer et al., 2012, Neuron; Tremblay et al., 2010, PLoS Biol.)、ミクログリアのシナプスに対する生理機能が明らかとなってきた(Wake et al., Trends in Neurosci, 2013)。本研究においては発達期・成熟期のミクログリアに着目し

1. 発達早期においてミクログリアが活性化体であることに着目し、そのシナプスに対する生理機能 (Miyamoto et al., 2016, Nature Commun)。
2. 障害時における神経細胞過剰応答の際に発揮されるミクログリアの神経保護作用 (Kato et al., 2016, eNeuro)。

を明らかにした。

ミクログリアは発達期において活性化体から静止体へ変化することが知られている。発達期のこの変化の時期を検証するためにミクログリアの活性化マーカーの一つである Iba1 mRNA の発現を検証したところ、Iba1 mRNA の発現が P8-10 で増加し、その後低下することがわかった。そこでミクログリア特異的に EGFP を発現しているマウス (Iba1-EGFP マウス) に子宮内電気穿孔法によって大脳皮質 2/3 層錐体細胞に赤色蛍光タンパク質(tDTomato)を発現させた。生後 8-10

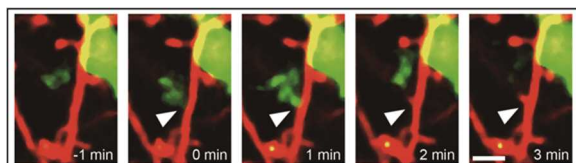


図1. In vivo タイムラプスイメージング画像 (生後 10 日目) Scale bar: 5 μm
白矢頭の示す部分においてミクログリア (緑) が樹状突起 (赤) に接触した後、フィロポディアが形成される様子が観察された。

日齢(P8-10)のマウスに2光子顕微鏡を適応させることにより、ミクログリアと樹状突起の相関を、大脳皮質体性感覚野 2/3 層にて観察した。

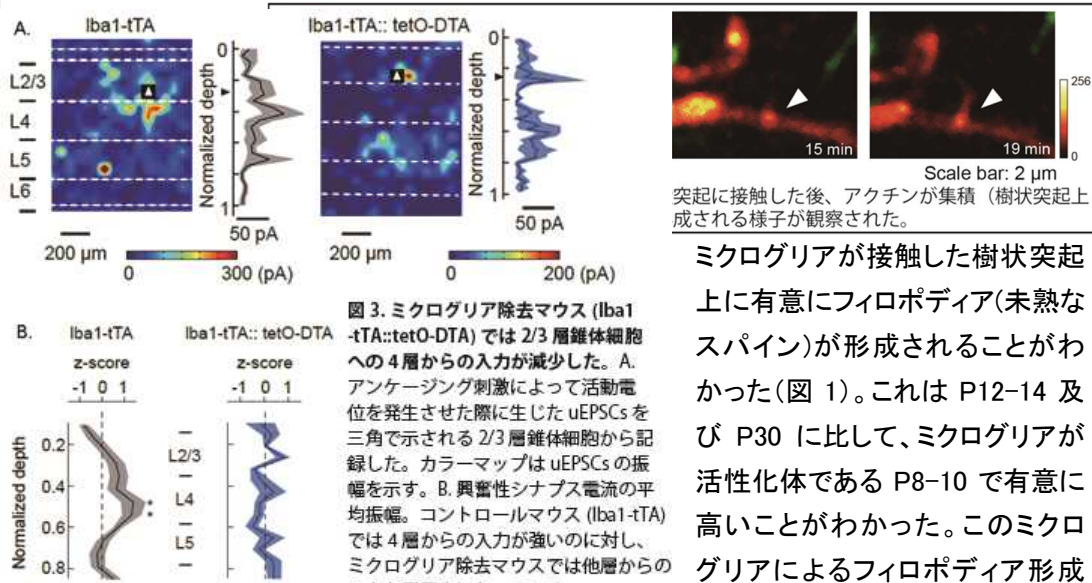


図 3. ミクログリア除去マウス (lba1-tTA::tetO-DTA) では 2/3 層錐体細胞への 4 層からの入力が増加した。A. アンケーシング刺激によって活動電位を発生させた際に生じた uEPSCs を三角で示される 2/3 層錐体細胞から記録した。カラーマップは uEPSCs の振幅を示す。B. 興奮性シナプス電流の平均振幅。コントロールマウス (lba1-tTA) では 4 層からの入力が高いのに対し、ミクログリア除去マウスでは他層からの入力と同程度になっている。

ミクログリアが接触した樹状突起上に有意にフィロポディア(未熟なスパイン)が形成されることがわかった(図 1)。これは P12-14 及び P30 に比して、ミクログリアが活性化体である P8-10 で有意に高いことがわかった。このミクログリアによるフィロポディア形成はカルシウム感受性緑色蛍光タンパク質(GCaMP)および赤色蛍光タンパク質(tdTomato)もしくはアクチン動態をアクチン結合ペプチドである Lifeact を大脳皮質 2/3 層錐体細胞に発現させて行った観察から、ミクログリアの接触によって、樹状突起にカルシウム上昇が生じ、それによってアクチン重合が促進された結果フィロポディアが形成されることが明らかとなった(図 2)。またカルシウムが上昇した樹状突起に形成されるフィロポディアは生存時間が長いことがわかった。遺伝的にミクログリアを除去したマウス(テトラサイクロン依存的にミクログリア特異的にジフテリア毒素 A 断片を発現)においてはミクログリアの密度が 50%程度減少し、さらにスパインの密度が有意に減少した。さらに本マウスの脳切片から計測される微小興奮性シナプス後電位(mEPSC)の頻度が対照群と比較して優位に減少していることから密度減少による機能的差異も生じていることを明らかにした。すなわちミクログリアにより形成が促進されたされたフィロポディアは機能的シナプスの形成に寄与していることがわかった。

次にこのミクログリアによるシナプス形成が時期特異的に起こることから回路特異的シナプス形成に寄与すると考え、大脳皮質パレル野において層間結合の強度を、ミクログリアを除去したマウスを用いて検証した。レーザーによるグルタミン酸のアンケーシング法とホールセルパッチクランプ法を組み合わせ、各層からの機能応答を各層においてグルタミン酸のアンケーシングをおこない、その電気的応答を 2/3 層の錐体細胞で記録した。ミクログリアを除去したマウスから切り出した脳切片においては対照群に比して、4 層からの入力が増弱していることが明らかとなった。これは 4 層からの入力が増強されることと一致していた(図 3)。

またこのようなシナプス形成を担うミクログリアに発現する分子群を網羅的に解析し、候補分子を上げることができた。

研究テーマ「全身炎症時の神経回路基盤」

全身性炎症を引き起こすためにリポ多糖類を腹腔内投与したマウスにおいて、運動学習が損なわれていることがわかり、さらにその神経細胞集団の活動を 2 光子顕微鏡を用いて学習中に捉えることで、異常を検出することができた。この結果から神経細胞の同期性が損なわれること、これはミクログリアのシナプス活動修飾に起因することがわかった。

すなわちミクログリアは生理的にシナプスに接触することによって、その活動を増強し、さらにシナプスを持つ神経細胞の活動電位の発火頻度を増加させることが明らかとなった。これによって神経細胞間の同期性を促し、学習効率を維持する。一方、全身炎症をもつ個体では脳血管の血管透過性が亢進し、体循環系の免疫細胞がミクログリアと接触することによって、血管周囲のミクログリアを活性化し、これによってミクログリアが生理機能を喪失する結果、シナプス活動がミクログリアの接触によっても増強されず、神経細胞間の同期性が喪失し、学習行動が阻害されることを明らかにした(投稿準備中)。

以上の結果から全身炎症時には体循環系免疫細胞と中枢神経系免疫細胞が相互相関することによって中枢神経系免疫細胞であるミクログリアの変容を引き起こし、その生理機能を喪失させることによって神経回路活動が異常を呈することが明らかとなった。このような疾患を含めた精神・神経疾患においては脳免疫隔離療法が有用であると考えられることから、現在その戦略の開発を進めているところである。

3. 今後の展開

これまで体循環系免疫細胞の活性化および血管内の炎症によって、血液脳関門が非薄化し、中枢神経系の血管の透過性が亢進する。この血液脳関門が非薄化した部位において、体循環系の免疫細胞とミクログリアが接触し、相互作用していることが明らかとなった。そこで、このような全身炎症による高次脳機能障害を防ぐ治療戦略のために、血液脳関門が非薄化している部位における体循環系免疫細胞とミクログリアの相互作用を阻害するために、相互作用する分子機序の同定を図り、候補分子が絞れてきている。関連する分子に対する自己抗体もしくは阻害剤を血管内投与することで、体循環系免疫細胞—ミクログリア間の相互作用を阻害し、中枢神経系免疫を体循環系免疫から隔離する治療法の開発を行う。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究により、体循環系免疫細胞が中枢神経系免疫細胞と中枢神経系内の血管で相互作用することおよびその分子メカニズムを明らかにした。さらに、ミクログリアの新規生理機能をいくつか明らかにすることによって、その生理機能の破綻による、神経回路活動の異常を検証し、個体計測にて行動異常を計測し、その相関を明らかにすることができたとともに、発達障害および精神疾患への新規戦略の可能性を示すことができた。研究実施体制は本研究期間中に2度の異動があったため、その時に応じた体制をとることができた。達成状況はおおむね順調であるが、研究成果の発表に少し遅れがある。

今後の研究成果の科学技術および社会経済への波及効果を期待するものとして、今後製薬

企業と合同で本研究によって明らかとなった分子への新規治療薬開発を進めることが決まっているため、治療薬が開発された際には十分な社会経済への波及効果があると考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、身体疾患時において体循環系の免疫細胞がミクログリアを介して中枢神経系に及ぼす作用についてマウスを用いて検討した。その結果、ミクログリアのシナプス形成への作用および神経保護作用について論文として報告することができた。また、全身炎症時に体循環系免疫細胞が集積する中枢神経内の部位とミクログリアの関連、学習効果についての検討結果はさきがけ研究期間中には論文発表できなかったが、論文準備中のところまで進んでおり、さきがけ研究の課題はほぼ達成された。本研究中に見出された機能分子を標的とする薬剤開発にも道筋が開けており、今後の進捗が期待される。

和氣研究者はさきがけ研究期間内に基礎生物学研究所助教から生理学研究所准教授、神戸大学教授へと昇進し、研究室を主宰することとなった。論文発表も含め、国際学会、国内学会での多数の報告がある。また、本研究成果から特許を出願することも出来ている。文部科学大臣表彰 若手科学賞も受賞し、今後の活躍が十分に期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Miyamoto A, Wake H, Ishikawa AW, Eto K, Shibata K, Murakoshi H, Koizumi S, Moorhouse AJ, Yoshimura Y, Nabekura J. Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nature Commun.* 2016. Aug 25;7:12540. (IF=11.470 CI=0)
2. Kato G, Inada H, Wake H, Akiyoshi R, Miyamoto A, Eto K, Ishikawa T, Moorhouse AJ, Strassman AM, Nabekura J. Microglial Contact Prevents Excess Depolarization and Rescues Neurons from Excitotoxicity. *eNeuro.* 2016 Jun 21;3(3). pii: ENEURO.0004-16.2016. doi: 10.1523/ENEURO.0004-16.2016. eCollection 2016 May-Jun. (査読あり)
3. Wake H, Ortiz FC, Woo DH, Lee PR, Angulo MC, Fields RD. Non-synaptic junctions on myelinating glia promote preferential myelination of electrically-active axons. *Nature Commun.* 2015. Aug 4;6:7844. (IF=11.470 CI=0)

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

① 国際会議

1. **Wake H.** Functional contacts between microglia and neural circuits in living brain:



implications for immune – brain interactions. Brain Sciences UNSW / School of Medical Sciences seminar, Sydney, Australia, 2016.10.26.

2. **Wake H.** Activity dependent myelination and impaired motor learning as the result of its disruption. Glial Heterogeneity Meeting, Dusseldorf, Germany, 2014.10.14.
3. **Wake H.** Activity dependent myelination and impaired motor learning as the result of its disruption. SFB 894 University of Saarland, Homburg, Germany, 2014.10.10.
4. **Wake H.** Disruption of myelin homeostasis impairs motor learning. 日韓シンポジウム, 岡崎, 2014.9.4.

②国内会議

1. **和氣 弘明.** 脳情報処理における髄鞘化の役割. 生理学研究所研究会「体内エレメントの探索的研究と新技術の開発」, 岡崎, 2016.10.13.
2. **和氣 弘明.** The role of microglia in learning during systemic inflammation. 第39回日本神経科学大会, 横浜, 2016.7.22.
3. **和氣 弘明.** 光を用いた脳機能計測と操作. 新学術領域「マイクロ精神病態」若手育成合宿, 埼玉(理化学研究所), 2016.3.2.
4. **和氣 弘明.** 光学顕微鏡による生体イメージング. 生理学研究所 第5回多次元脳トレーニング&レクチャー, 岡崎, 2016.2.23.
5. **和氣 弘明.** The role of microglia in the adult CNS of systemic inflammation. 第20回グリア研究会, 大阪, 2015.12.5.
6. **和氣 弘明.** The role of microglia in the adult CNS is systemic inflammation. 第58回日本神経化学会大会, 大宮, 2015.9.11.
7. **和氣 弘明.** Activity dependent myelination and impaired motor learning as result of its disruption. 第92回日本生理学会大会, 神戸, 2015.3.23.
8. **和氣 弘明.** Activity dependent myelination and impaired motor learning as the result of its disruption. 第37回日本神経科学大会, 横浜, 2014.9.12.

受賞

2014年 4月 15日

文部科学大臣表彰 若手科学賞