

研究終了報告書

「外因性微粒子の脳内動態におけるマイクログリアネットワークの関与の解明研究」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：小山 隆太

1. 研究のねらい

近年、中国大陸などから飛来する大気中の微小粒子状物質(PM2.5)が、我が国の人々の健康を脅かしています。外因性微粒子の人体への長期的暴露は呼吸器系のみならず、最終的には脳を含む全身に取り込まれて炎症を誘導することが示唆されています。実際に、大気汚染が深刻な中南米諸国などでは、PM2.5 と各種脳疾患(アルツハイマー病や精神疾患など)の発症が関連するという報告がなされてきました。また、このような健康被害報告は小児や高齢者に関するものが多く、少子高齢化社会問題を抱える我が国では特に解決すべき喫緊の課題です。しかしながら、外因性微粒子の脳内の分布局在機構、細胞レベルでの受容と免疫反応惹起の分子機構には不明な点が多く、これが脳機能および個体の行動に影響を及ぼす分子細胞生物学的メカニズムは未解明です。

そこで、本研究の目的として、PM2.5 をはじめとする大気環境中の外因性微粒子の脳内動態メカニズムを解明することを掲げました。そして、これによって、外因性微粒子と脳機能疾患の関連に細胞生物学に基づいた新たな知見を付与することを意義とした研究を遂行しました。また、本研究では外因性微粒子として、PM2.5 のうち、脳内への侵入の報告が多いナノ粒子を主に扱いました。外因性微粒子の脳内動態メカニズムとしては、脳内免疫細胞であるマイクログリアの新たな活性化メカニズムに着目しました。特に、脳内に侵入した外因性微粒子がマイクログリアと、もう一つのグリア細胞であるアストロサイトの相互作用を介して処理されるメカニズムと、その行動への影響を明らかにすることを目指しました。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究の目的は、PM2.5 をはじめとする大気環境中の外因性微粒子の脳内動態メカニズムの解明です。特に、脳内に侵入した外因性微粒子が脳内免疫細胞マイクログリアの活性化を介して処理されるメカニズムと、その行動への影響を検証します。また、本研究の遂行によって得られる発見をもとに、外因性微粒子によって引き起こされる認知機能障害や精神疾患を抑制するための知見を獲得することを目指します。

本研究では、PM2.5として黄砂の主成分であるシリカのナノ粒子を用いて、実験動物(マウス)の脳実質内に侵入したシリカナノ粒子がマイクログリアに取り込まれる際のメカニズム解明に注力しました。その結果、シリカナノ粒子によって刺激された脳血管から放出されたケモカインが、最終的にマイクログリアのシリカナノ粒子の貪食作用を促進させることが分かりました。また、これまでの本研究の結果から、シリカナノ粒子の脳内への侵入がマウスの不安様行動などの行動異常を誘起することを明らかにしてきました。そして、発見したケモカインシグナルを薬物で阻害することで、不安様行動が悪化しました。これは、マイクログリアによ

るシリカナノ粒子の貪食が抑制されたためであると考えられます。また、マイクログリアによるシリカナノ粒子の貪食には、血管周囲に存在するアストロサイトが必要であることが示唆されました。

本研究の結果は、血流に入ったシリカナノ粒子が脳内に到達し、ケモカインシグナルを介して活性化したマイクログリアがシリカナノ粒子を貪食によって処理することを示しています。ただし、本実験で用いたナノ粒子溶液の濃度は、実際にヒトが大気環境下で曝露される濃度よりも高く、侵入経路(投与経路)も異なる点には注意すべきだと考えます。

(2) 詳細

研究テーマA「新規グリア培養系の確立と、微細構造ライブイメージング」

グリア細胞と微粒子の相互作用(特にグリア細胞による微粒子の貪食)を扱う本研究では、in vivo における細胞構造を再現した培養系の確立が必須でした。これは、グリア細胞が貪食機能を発揮する際には、放射状に枝分かれした微細突起が必要なためです。また、グリア細胞の微細突起と微粒子との相互作用をライブイメージングしながらそのメカニズムを検証するためには、多色イメージングを行うと同時に、遺伝学的・薬理学的に実験系をマニピュレーションする必要があります。そこで、培地組成や、細胞基質の条件を詳細に検討したところ、in vivo に近い状態の形態を保ったグリア細胞を培養することに成功しました。これにより、グリア細胞が微粒子を細胞外小胞に含んで輸送することが明らかになりました。この新規グリア培養系の使用によって得られた知見の一部を元にして、グリア細胞の脳機能における役割を報告しました(5. 主な研究成果リスト、文献1-3)。本さがけ研究を通じて実現した、新規グリア培養系の確立やこれらの研究成果は、脳機能におけるグリア細胞の役割を検証するために役立ち、今後の神経科学の発展に貢献すると考えます

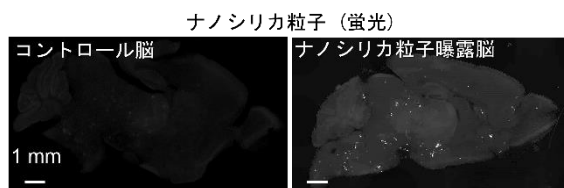


図1: PM_{2.5}曝露モデルマウスの作製

研究テーマB「in vivo における微粒子の脳内動態の検証」

脳内に侵入した微粒子が、グリア細胞によって処理されるメカニズムを明らかにすることを目的とするとともに、微粒子が行動に与える影響を検証しました。

まず、マウスを用いたPM_{2.5} 曝露モデルを作成しました。生後 2 週齢の小児期マウスに 1 週間ナノシリカ粒子を皮下投与したところ、ナノシリカ粒子が脳内に広く分布する様子が観察されたため(特に、線条体や視床や視床下部、中脳や橋・延

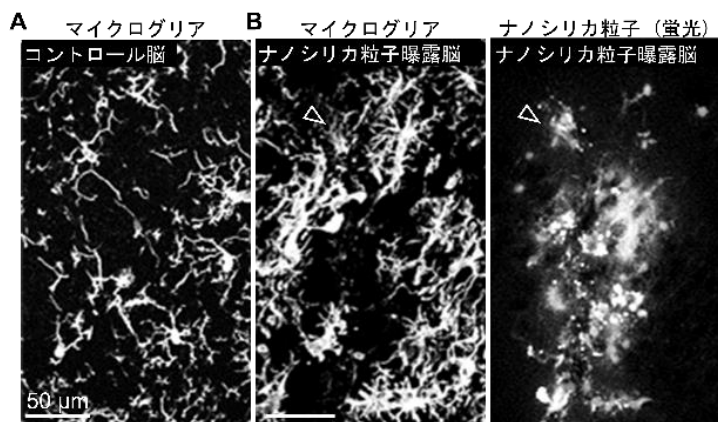


図2: 脳内に侵入したナノシリカ粒子は周囲の肥大化したマイクログリアに貪食される

髓に局在)、これを PM2.5 曝露モデルマウスとしました (図 1)。また、マイクロプラスチックを模擬した蛍光ナノポリスチレン粒子を同様に曝露したところ、in vivo ライブイメージング法により、マウスの脳表面において、血管内を流れるポリスチレン粒子を確認しました。以上から、マウスに皮下投与したナノ粒子が脳内に到達することが分かりました。

そこで、このナノシリカ粒子を投与したモデルマウスにおいて、免疫組織化学法による脳細胞種の網羅的形態解析を行った結果、ニューロンやアストロサイトでは形態の顕著な変化が確認されませんでした。その一方で、マイクログリアはナノシリカ粒子周囲で肥大化し、貪食に必要なリソソームのマーカ―を強発現していました (図 2)。さらに、このような状態のマイクログリアでは、ナノシリカ粒子を貪食している様子も確認されました (図 2B 鏡)。そして、前述の結果から、PM2.5 曝露モデルマウスでは、ナノシリカ粒子は血管を介して脳に侵入すると考えられるため、血管周囲のナノシリカ粒子の局在を免疫組織化学染色にて検討しました。その結果、血管内皮細胞マーカ―である CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1), I 型膜貫通糖タンパク質) の周囲を取り囲むようにマイクログリアが存在し、血管周囲のマイクログリアがナノシリカ粒子を貪食している様子が観察されました。

マイクログリアによるナノシリカ粒子の貪食が、脳実質への微粒子の曝露を防いでいる可能性を検証するために、このモデルマウスに Colony-Stimulating Factor-1 Receptor (CSF-1R) のアンタゴニストである PLX3397 を用いてマイクログリアの除去を行いました。その結果、マイクログリアに貪食されず、脳実質内(マイクログリア以外の脳実質部位)に分布するナノシリカ粒子が増加しました。以上から、脳内に侵入したナノシリカ粒子はマイクログリアの形態変化を誘導すること、そして、マイクログリアは貪食によって脳内のナノシリカ粒子を処理することが示唆されました。

次に、ナノシリカ粒子によるマイクログリアの形態変化や貪食に関与する分子を検証するため、ナノシリカ粒子最終投与の翌日に PM2.5 曝露モデルマウスの全脳を摘出してサイトカイン定量抗体アレイによるタンパク質発現量の網羅的解析を行いました。これは、マイクログリアやアストロサイトといった脳内のグリア細胞が炎症性サイトカインに応答してその機能を大きく変化させるためです。その結果、PM2.5 曝露モデルマウスにおいてはケモカイン X (論文未発表) の顕著な増加が確認されました。ケモカイン X は中枢神経系において海馬 CA1 野ニューロンや活性化した血管内皮細胞で産生されることが知られています。そして、ケモカイン X の受容体は、マイクログリアやアストロサイトに存在することが報告されています。さらに、LPS によって誘導されるマイクログリアの形態変化がケモカイン X の欠損マウスでは生じないことが報告されています。そこで、ナノシリカ粒子により活性化した血管内皮細胞によってケモカイン X が上昇し、マイクログリアもしくはアストロサイトに存在するケモカイン X 受容体によってマイクログリアによるナノシリカ粒子の貪食が増加する可能性が考えられたため、これを検証しました。まず、生後 14 日齢のナイーブマウスにおけるケモカイン X や C ケモカイン X 受容体の局在を免疫組織化学染色したところ、ケモカイン X は血管内皮細胞に、ケモカイン X 受容体は血管を包むアストロサイトのエンドフィートに局在する様子が観察されました。次に、マイクログリアのナノシリカ粒子貪食にケモカイン X シグナリングが関与する可能性を検証するため、ケモカイン X 受容体の競合的アンタゴニストである阻害薬 Y をナノシリカ粒子曝露の 3 日前から投与したところ、PM2.5 曝露モデルマウスにおいて、マイクログ

リアに貪食されないナノシリカ粒子量が増加しました。以上から、マイクログリアによるナノシリカ粒子の貪食に血管由来のケモカイン X と、それをケモカイン X 受容体で受容するアストロサイトが関与することが示唆されました。

最後に、生後 6 週齢において行動試験を行い、小児期におけるナノシリカ粒子曝露による脳機能への影響を検証しました。オープンフィールド試験によって不安様行動を比較したところ、ナノシリカ粒子曝露群ではフィールド中央の滞在時間が減少し、不安様行動が増加することが示されました。さらにこの行動異常は、PLX3397 や阻害薬 Y 投与によって増悪しました（図 4）。以上から、マイクログリアの貪食機構の抑制により脳内ナノシリカ粒子が増加することで、ナノシリカ粒子曝露によって誘導される不安様行動が悪化することが示唆されました。

本研究により、脳内に侵入したナノシリカ粒子はケモカイン X シグナルの活性化を介してマイクログリアに貪食されることが明らかになりました。また、マイクログリアによるナノシリカ粒子の貪食が抑制され、マイクログリアに貪食されない脳内ナノシリカ粒子が増加すると、ナノシリカ粒子曝露による行動異常が増悪することが示されました。本研究は、血管から脳実質内に侵入した異物に対するマイクログリアの処理機構の 1 つとその意義を明らかにしたという点からも意義深いと考えます。

3. 今後の展開

まず、新規グリア培養系について記述します。本研究で確立した新規グリア培養系は、これまで十分には明らかになってきていないグリアの機能や、他の脳細胞との相互作用メカニズムを明らかにするために大きく貢献すると考えます。これは、細胞機能を支えるメカニズムを追求するためには、*in vivo* における性質を維持した状態の培養系が必須であることと、本新規培養系がこれまで不可能であったグリアの微細構造を再現しているためです。グリア培養系に関しては、おおよそのタイムスパンとしては 2022~2023 年度にかけて内容(培養系の作成方法も含む)を公表する予定ですが、その後、この手法を用いて数年間をかけ、グリア細胞の機能(特にマイクログリアによる貪食機能の発揮メカニズム)や複数種の脳細胞同士の相互作用のメカニズムがより詳細に分かってくると考えます。*In vivo* での再現実験は必要ですが、これまでに明らかにされてこなかったグリアの動態が明らかになることも期待されます。なお、本さきがけ領域内における複数の共同研究では、既にエクソソームの取り込みメカニズムを検証するために同培養系を使用しており、微粒子動態の解明にも貢献していく実験系であると考えます。

次に、ナノシリカ粒子の脳内動態について記述します。マイクログリアは絶えず突起を動かしながら周囲環境を探索・監視しますが、この探索様式には空間的排他性があり、各マイクログリアには占有領域が存在すると考えられてきました。これまでのマイクログリアの免疫機能に関する研究によって、マイクログリアが拡散性のサイトカインを放出し、離れたマイクログリアに情報を伝達することが知られています。そのため、マイクログリア間の情報伝達には必ずしも細胞同士の接触が必要ではないと考えられてきました。しかし本研究では、PM2.5 曝露モデルマウス脳において血管周囲をマイクログリアが取り囲むように突起同士が接触している連結構造「マイクログリアルネットワーク」を発見しました。また、新規グリア培養系によって、マイクログリアが細胞外小胞にナノシリカ粒子を含んでやりとりする様子も観察されまし

た。以上の様なマイクログリアネットワークが機能的に働くことを示した知見は現在までに存在しませんが、既知の拡散性の情報伝達とは異なる情報伝達形態である可能性があります。マイクログリアネットワークの形成機構と機能に関しては、更なる検討が必要であると考えます。

本研究で明らかとなったケモカイン X シグナルを介したマイクログリアによる貪食は、血管から漏出した異物に対するマイクログリアの処理機構の一つである可能性が高いと感ぜられます。ただし、被貪食物の選定、つまり「周囲の物質を無作為に貪食しているのか」あるいは「ナノシリカ粒子を特異的に異物と認識して貪食しているのか」についてはまだ明らかではありません。本研究から、マイクログリアによるナノシリカ粒子の貪食には、アストロサイトの存在が必要である可能性が高いため、今後は、アストロサイトの関与のメカニズムを検証する必要があります。アストロサイトが最終的にマイクログリアの貪食を促進するためのメカニズムが明らかになれば、グリア細胞機能の調節を利用して、脳内に侵入した PM2.5 の脳機能や行動への影響を制御できると考えます。これまでの環境問題と脳機能の関連の研究では、相関関係を示しながらも、それらをつなぐメカニズムが十分に明らかにされていませんでした。そのために、時に漠然とした不安が社会に広がることがあります。本研究の論文公表は 2022 年度を目指しておりますが、論文が公表されれば、PM2.5 曝露と脳機能変化の関連に生物学的メカニズムを与え、PM2.5 の脳機能への影響に対する科学的事実に基づいた対策に繋がる可能性があります。

4. 自己評価

研究目的の達成状況：新規グリア培養系の確立に成功したため、グリア機能の理解を深め、脳内微粒子動態のメカニズム解明に役立つと判断できます。また、ナノシリカ粒子の脳内動態に関してもマイクログリアとアストロサイトの両者が関与することおよびケモカインシグナルという具体的なメカニズムを明らかにしたことは重要だと考えます。

研究の進め方（研究実施体制及び研究費執行状況）：研究成果が最も効率的に得られる研究実施体制及び研究費執行状況であったと考えます。特に、スピニングディスク型共焦点システムは、グリア機能と微粒子の関係を明らかにするために重要な役割を果たしました。また、同システムを利用したグリア培養系の観察は、さきがけ研究の垣根を超え、多くの共同研究をもたらしてくれました。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果：新規グリア培養系とその超解像度イメージング法の確立は、新技術シーズとして、今後も神経科学研究の発展に大きく貢献すると考えます。また、将来における研究成果と社会との接点として、大気環境汚染に伴う外因性微粒子の健康への影響に対する漠然とした不安に、具体的な科学的知見（細胞生物学的メカニズム）を付与することで、その対策方法の確立に貢献すると考えます。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文（原著論文）発表

研究期間累積件数: 8件

<p>1. Hoshi Y, Shibasaki K, Gailly P, Ikegaya Y, *Koyama R. Thermosensitive receptors in neural stem cells link stress-induced hyperthermia to impaired neurogenesis via microglial engulfment. Science Advances., 7(48):eabj8080, 2021.</p>
<p>脳の神経幹細胞に発現する温度受容体が、ストレスによって生じる成体神経新生の減少に関与することを、マウスの社会性ストレスモデルを利用して明らかにしました。本研究では、ストレス応答に重要な海馬歯状回に存在する神経幹細胞に 温度受容体 TRPV4 が多く発現することを発見しました。そして、その活性化が脳内免疫細胞であるマイクログリアによる神経幹細胞の貪食を促進することを発見しました。</p>
<p>2. Zhou Z, Okamoto K, Onodera J, Hiragi T, Andoh M, Ikawa M, Tanaka KF, Ikegaya Y, *Koyama R. Astrocytic cAMP modulates memory via synaptic plasticity. PNAS, 118: e2016584118, 2021.</p>
<p>本研究では、マウスのアストロサイトに光活性化アデニル酸シクラーゼを発現させ、光遺伝学的手法によって、アストロサイトにおける cAMP 量を上昇させることに成功しました。この手法を用いて、アストロサイトにおける cAMP 量の上昇が、マウスの記憶や学習を調節することを明らかにしました。神経細胞ではなく、アストロサイトの活動を起始として脳機能が調節されることを明らかにしました。</p>
<p>3. Andoh M, Shibata K, Okamoto K, Onodera J, Morishita K, Miura Y, Ikegaya Y, *Koyama R. Exercise reverses behavioral and synaptic abnormalities after maternal inflammation. Cell Reports, 27:2817-2825, 2019.</p>
<p>本研究では、母体免疫活性化による自閉症マウスモデルを使用し、自発的な運動が、自閉症によるシナプス密度の過剰な増加を元に戻すことが可能であることを示しました。自閉症モデルマウス脳では、シナプスの過剰な形成が生じていましたが、マウスに運動させると、脳内でマイクログリアが活性化し、不要なシナプスを除去することで神経回路が精密化されることが明らかになりました。</p>

(2)特許出願

研究期間全出願件数: 0件 (特許公開前のものも含む)

1	発 明 者	
	発 明 の 名 称	
	出 願 人	
	出 願 日	
	出 願 番 号	
2	概 要	
	発 明 者	
	発 明 の 名 称	
	出 願 人	
	出 願 日	
	出 願 番 号	

	概	要	
--	---	---	--

(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)

1. 小山隆太

マイクログリア形態とその機能

大阪大学・ニコンイメージングセンター シリーズセミナー第1回、招待講演

2021年10月10日

2. Koyama R.

Microglia rewire circuits in epileptogenesis

UNSW neuroscience symposium, University of New South Wales (Sydney, Australia), Invited seminar, Nov 29, 2019,

3. Koyama R.

Modulation of memory by optogenetically manipulating astrocytic cAMP

The eighteenth conference of peace through mind/brain science (Hamamatsu), Feb 18, 2020

4. 小山隆太

グリアによる脳の状態遷移

神経化学会 若手教育セミナー(新潟)、招待講演

2019年7月24日

5. Koyama R.

Neuronal activity and complement boost microglia to eat inhibitory synapses in epilepsy

Physiology seminar, Department of Physiology, University of Lausanne (Switzerland), Invited seminar, July 16, 2019