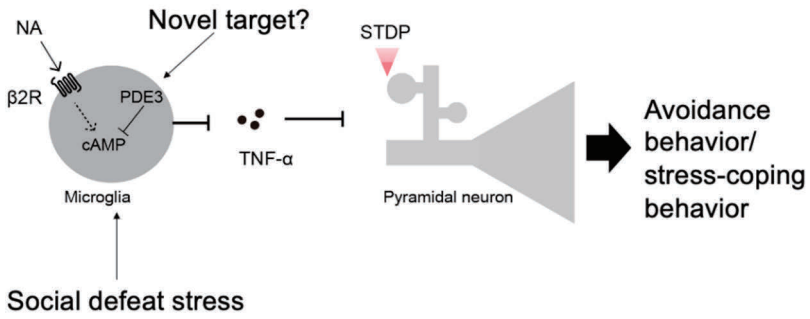
156　ミクログリアによる前頭葉スパイン可塑性の抑制機序	柳下　祥

【目的】成体マウスの大脳新皮質では、学習時に活動依存的に樹状突起スパインが増大する構造的な可塑性を示すことが *in vivo* 観察研究で多く報告されてきた。構造的な可塑性は機能的な可塑性と連関することが知られており、スパイン増大は長期的なシナプス伝達効率を構造的に保持することから記憶の主座であることが長らく考えられてきた。海馬の脳スライスを用いて多くの研究でこのスパイン増大のシナプス細胞レベルの探索がなされてきた。しかし、新皮質において活動依存的なスパインの頭部増大をもたらす正確なシグナル伝達経路は不明なままである。そこで新皮質でスパイン頭部増大を誘発し、シグナル路の探索を行うことを目的とした。

【方法】内側前頭葉を含むマウス脳急性スライスを作製し、第 5 層錐体ニューロンからパッチクランプ・全細胞記録を行った。この際、蛍光試薬を灌流させることでスパインの可視化を行い、2 光子励起顕微鏡で観察した。観察とは異なる 2 光子励起によりグルタミン酸の 2 光子アンケージングを単一スパインで行った。このスパインのグルタミン酸刺激と電極からの活動電位を組み合わせるスパイクタイミング依存的可塑性（STDP）プロトコルを用いて、単一スパインにおけるスパイン頭部増大の誘発を行った。薬理や遺伝学、アデノ随伴ウィルスなどを用いてスパイン増大に必要なシグナル伝達経路を調査した。

【結果】STDP 刺激により、幼若マウス（P16～21）ではスパイン頭部増大が見られたが、成体マウス（P35～45）では見られなかった。しかし、ミクログリアを薬理学的に除去すると、成体マウスでもスパイン頭部増大が認められた。この結果は、ミクログリアによる活動依存的なスパイン形態可塑性制御機序には年齢依存性があり、幼若期では可塑性を邪魔しないが、成体内側前頭前皮質（mPFC）において、ミクログリアがスパインの可塑性を抑制していることを示唆した。ノルアドレナリン（NA）は mPFC の学習を制御すること、さらにミクログリアは NA 感受性の Gs 共役型 β2 アドレナリン受容体を発現しており、下流では cAMP シグナルが活性化されることが知られている。薬理学的手法により NA が β1 アドレナリン受容体依存的ではなく β2 アドレナリン受容体依存的にスパイン可塑性を促進することを見いだした。さらに、ミクログリア特異的なホスホジエステラーゼ 3 の薬理学的阻害は NA 非存在下でスパイン可塑性を誘導した。一方、ミクログリアを標的に cAMP シグナル伝達を化学的に阻害すると、NA 依存的なスパイン可塑性はブロックされることがわかった。次にミクログリアがスパインを抑制する下流機序を探索した。*in vivo* イメージング研究ではミクログリアは物理的な接触によりスパイン機能を抑制していると考えられてきた。ミクログリアの形態イメージングでは、STDP 刺激で刺激されたスパインにミクログリアが新たに接触することはなく、そのような効果を示唆する以前の研究とは矛盾することが分かった。一方、ミクログリアが液性因子によりスパインを抑制する可能性を薬理学的に検証したところ、ミクログリア関連の TNF-α シグナルは、NA の下流でスパイン可塑性を抑制することがわかった。社会的敗北ストレスを与えたストレス感受性群のマウスでは NA 依存的な可塑性誘発が阻害された。しかしホスホジエステラーゼ 3 の阻害により改善したことからミクログリアの関与が考えられた。これらの結果は、若年成体マウスにおいて、NA がミクログリア-cAMP 経路を介して活動依存的なスパイン増大を間接的に脱抑制していることを示した。

前頭葉スパイン頭部増大を制御する新規シグナル路



156. ミクログリアによる前頭葉スパイン可塑性の抑制機序

柳下　祥

東京大学 大学院医学系研究科 構造生理学部門

Key words：樹状突起スパイン，ノルアドレナリン，形態可塑性，ミクログリア

緒　言

前頭葉は脳高次機能に重要とされ、多くの精神疾患において機能変調が生じていると考えられている。高次機能の細胞基盤として錐体細胞の樹状突起スパインが着目されており、その形態が学習やストレス負荷に伴い変化することが *in vivo* の観察研究で繰り返し報告されてきた。海馬の錐体細胞では長期増強（LTP）誘発刺激により形態可塑性が生じることが脳スライス実験でよく知られている。しかし、前頭葉を含む新皮質では具体的にどのようなシグナルによりスパイン形態可塑性が起きるかは不明である。著者これまで 2 光子励起顕微鏡と光遺伝学を駆使し情動制御に関わる側坐核の急性スライス標本においてドーパミンがグルタミン酸と活動電位と動機することでスパインの形態可塑性および学習行動を制御することを明らかにしてきた［1〜3］。

そこで、同技術を前頭葉に展開し、前頭葉スパイン可塑性を制御する条件を探索してきた。その結果、幼若期（P16〜21）のマウスでは単一スパインに対するケイジド・グルタミン酸の 2 光子刺激と発火の同期刺激によって顕著なスパイン増大が誘発された。成体マウス（P35〜45）ではこの刺激に応答しなかった。ところが成体マウスであっても、ミクログリアを除去すると幼若期と同等の可塑性が誘発された一方、幼若期ではミクログリア除去の効果はみられなかった。つまり、成体マウスのスパイン可塑性がミクログリアにより抑制されていると考えられる。そこで、生理的なシグナルによりこのミクログリアの抑制が解除されるのかを調べた。その結果、ノルアドレナリン（NA）を投与すると可塑性が生じ、さらにこの NA がミクログリアに選択的に発現するとされる β2 受容体を阻害すると抑制されることがわかった。一方、神経細胞に発現する β1 受容体の阻害は効果を持たなかった。β 受容体は細胞内で cAMP を上昇させる。そこで、この cAMP を分解するホスホジエステラーゼ（phosphdiesterase : PDE）の抑制を試みた。ミクログリアに選択的に発現する PDE3 を阻害すると NA がなくてもグルタミン酸と発火で可塑性が誘発されるが、神経に発現する PDE4 を阻害しても可塑性は誘発されなかった。これらのことから、NA 上昇でミクログリアによる可塑性抑制が脱抑制されることが学習に関連した可塑性制御機序ではないかという可能性が考えられた。

このような背景から本研究では新規にミクログリア特異的に遺伝子発現する系を導入し、1. ミクログリアの物理的な接触が可塑性抑制に関わる可能性、2. ミクログリア内 cAMP シグナルの可視化と操作を行い、最後に 3. ストレスモデルにおけるミクログリアによる可塑性制御の調査を行った。これらにより新規可塑性制御現象の機序解明を目的とした。

方　法

内側前頭葉を含むマウス脳急性スライスを作製し、第 5 層錐体ニューロンからパッチクランプ・全細胞記録を行った。この際、蛍光試薬 Alexa488 を灌流させることでスパインの可視化を行い、2 光子励起顕微鏡で 980 nm の波長で観察した。観察とは異なる 720 nm の 2 光子励起（0.6 ms）によりグルタミン酸の 2 光子アンケージングを単一スパインで行った。このスパインのグルタミン酸刺激と電極からの活動電位を組み合わせるスパイクタイミング依存的可塑性（STDP）プロトコルを単一スパインに与えた。具体的にはグルタミン酸アンケージング

の 10 ms 後 100 Hz の活動電位を 3 回、これを 10 Hz で 10 回与えた。これを 1 train として 10 秒間隔で 15 回繰り返した。刺激後 50 分間の間計測し、刺激前に対する体積の変化率を計算した。薬理や遺伝学、アデノ随伴ウィルスなどを用いてスパイン増大に必要なシグナル伝達経路を調査した。

ミクログリア特異的に Cre を発現する Tmem119-Cre 遺伝子改変マウスと Cre 依存的に赤色蛍光タンパク tdTomato を発現する遺伝子改変マウス Ai14 をかけ合わせてミクログリアの可視化を行った。ミクログリア特異的に Cre を発現する Tmem119-Cre 遺伝子改変マウスと Cre 依存的に化学遺伝学プローブ hM4Di を発現する遺伝子改変マウスをかけ合わせてミクログリアの cAMP シグナルの操作を行った。

結　果

1. ミクログリアの物理的な接触が可塑性抑制に関わる可能性の調査

これまでの実験から成体マウス（P35～45）では STDP 刺激のみではスパイン頭部増大が誘発されないが、ミクログリアを除去すると誘発されることがわかっている。過去の *in vivo* でミクログリア動態を観察した先行研究では形態可塑性を起こしたシナプスにミクログリアが接触することが観察され、これによりスパインが除去される可能性が考えられている。そこで本実験条件において、可塑性が起きない STDP 条件ではミクログリアが刺激したスパインに接触し、これが可塑性を抑制しているという仮説をたて、これを検証した。まず、ミクログリア特異的に Cre を発現する Tmem119-Cre 遺伝子改変マウスと Cre 依存的に赤色蛍光タンパク tdTomato を発現する遺伝子改変マウス Ai14 を掛け合わせ、このマウスから急性スライスを作製し、ミクログリアが観察できることを確認した（図 1）。

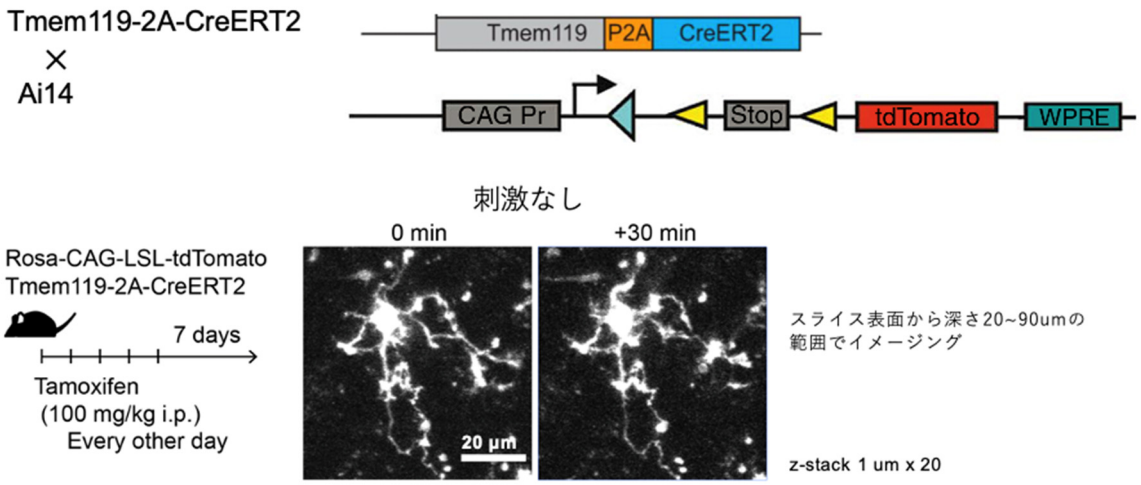
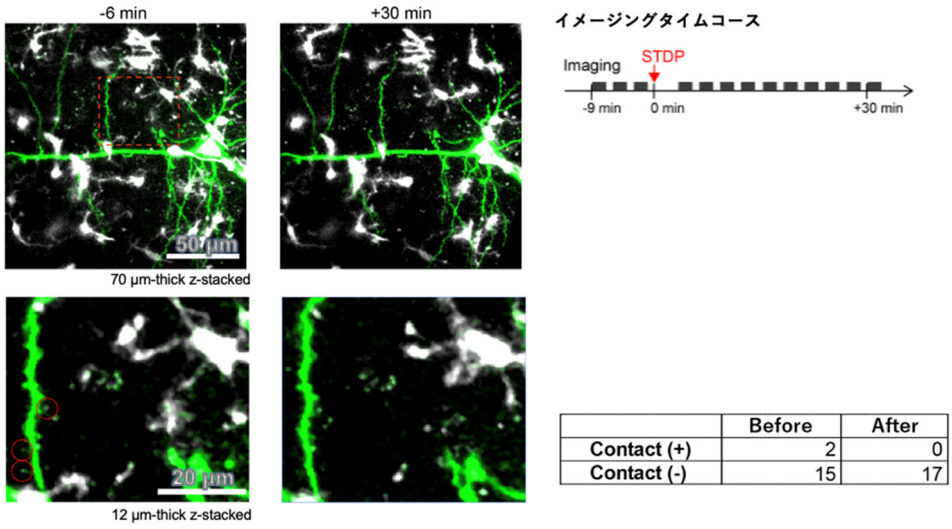


図 1. 遺伝子改変動物によるミクログリアの可視化

上段に遺伝子改変動物の発現する遺伝子の模式図を示す。下段左にタモキシフェンの投与プロトコルを示す。下段中央に急性スライスで経時的に観察したミクログリアを示す。

次に STDP 刺激の後に刺激したスパインにミクログリアが接近するかを調べた（図 2）。その結果、明らかなミクログリアの接近は見られなかった。ただし、tdTomato の蛍光は十分に明るいとは言えず、可視化できなかった微細構造の接近は否定できなかった。



	Before	After
Contact (+)	2	0
Contact (-)	15	17

図 2. STDP 刺激後のミクログリアの観察

上段左に刺激前後のミクログリア（白）と刺激した神経（緑）を示す。下段左に拡大図を示す。赤は刺激したスパイン。上段右に撮像タイムラインを示す。下段右に刺激前および刺激後の全経過で刺激スパインの近傍にミクログリアシグナルが見えた数を示す。

2. ミクログリア内 cAMP シグナルの可視化と操作

上述の Tmem119-Cre マウスと hM4Di を発現する遺伝子改変動物を掛け合わせ、NA と STDP 刺激によるスパイン頭部増大を抑制するかを調査した。まず実験系を構築し発現を確認した（図 3）。

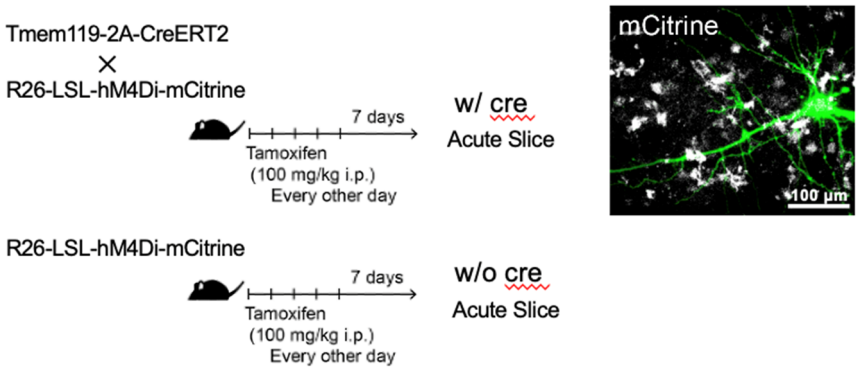


図 3. 遺伝子改変動物によるミクログリアの cAMP 操作系

左にタモキシフェンの投与プロトコルを示す。

右に急性スライスで観察したミクログリア（白）と全細胞記録した神経（緑）を示す。

次に、すでに可塑性誘発がわかっている NA 存在下で可塑性誘発を行った。DCZ100 nM をバス灌流し、hM4Di を刺激することで Gi／o によりミクログリア内 cAMP を抑制した。ノルアドレナリンは Gs 共役の β2 受容体を介していることがわかっているので、この NA 作用と拮抗するという仮説を立てたが、実験結果はこの仮説を支持した（図 4）。

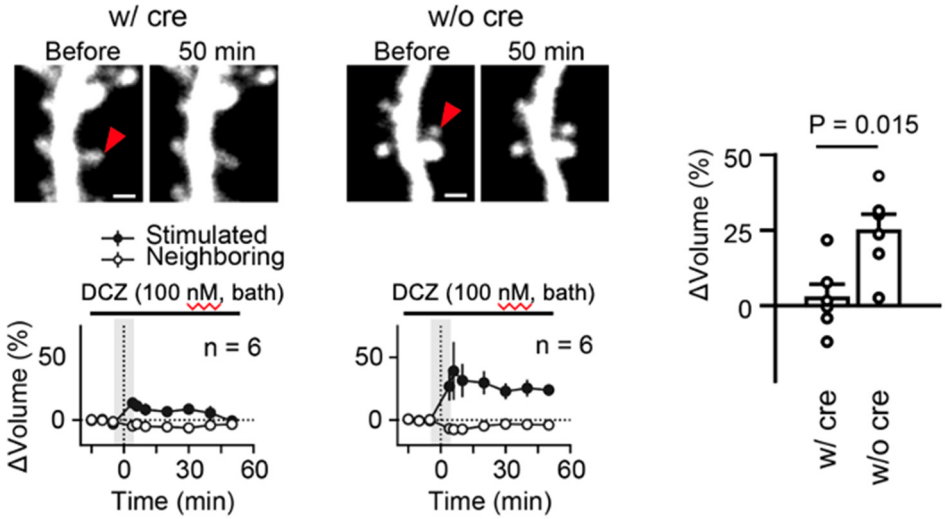


図 4. ミクログリア特異的 cAMP 抑制の可塑性への効果

Creの発現がありhM4Diを発現した条件（左）とCreの発現がなく、hM4Diが発現していない条件における刺激スパインの例（上段）とSTDPに対する時系列（下段）を示す（スケールバー：1μM）。一つのnは細胞数であり、3～4スパインの平均した値である。40～50分における平均を示す（右）。P値はマン・ホイットニーのU検定の結果である。

ミクログリア内 cAMP の可視化を試みたが、当初想定したレンチウィルスでは遺伝子導入が難しかった。その後、ミクログリアをターゲットできる AAV が開発されてきており［4，5］、これらを用いた遺伝子発現系を構築している。さらに、最近、新規の cAMP センサーが開発され［6］、この応用によりミクログリア cAMP の可視化が可能になると考えられるが、今回の報告には間に合わなかった。

3. ストレスモデルにおけるミクログリアによる可塑性制御の調査

当初計画では社会的敗北ストレスにより抑うつ行動を示すマウスにおいて結果 1、2 で開発した方法によりミクログリアのノルアドレナリンによる形態変化または cAMP の応答が低下しているのかを確認することを目的とした。しかし、1 ではまずミクログリア形態変化は見られず、この観察の意義がなくなった。2 については方法が期間内に開発できず、この検証ができなかった。

そこで、ミクログリア内 cAMP を上昇させることが知られている PDE3 を投与したところ、社会的敗北ストレスにより抑うつ行動を示すマウスにおいて、STDP 刺激による可塑性が回復することがわかった。このため社会的敗北ストレスによる前頭葉可塑性障害にミクログリア内 cAMP の関与が新たに考えられた。

考　察

本研究により、活動依存的な前頭葉スパインの可塑性を誘発するシグナル路には STDP に加えて NA があった場合に生じることがわかった。驚いたことに NA の制御はミクログリア内 cAMP 制御を介していた。本研究により明らかにされた新しい可塑性制御機序はストレス脆弱性がある。このような知見をもとに動物実験を行うことで新皮質の学習原理の理解に大きく貢献すると考えられる。加えて幼若期には STDP のみでスパイン増大が生じるなど可塑性が高いが、それがミクログリアにより可塑性が抑制されていくという細胞レベルでの知見は、発達

期にどのように脳が情報を獲得しているのかという理解のためにも重要であると考えられる。ミクログリアの機能が各種精神疾患モデルにおいて変化していることがこれまで多く報告されてきている。本研究ではストレスモデルを解析の対象とするが、統合失調症モデルや依存症モデル、認知症モデルなど様々なモデルへの展開が可能であると期待される。本研究から PDE3 阻害によりミクログリア機能を変化させることが可能であると考えられ、この作用を持つ薬剤の応用が考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学系研究科構造生理学部門の田尻美緒氏と近江秀文氏である。

文　献

1) Yagishita S, Hayashi-Takagi A, Ellis-Davies GC, Urakubo H, Ishii S, Kasai H. A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. Science. 2014 Sep 26;345(6204):1616-20. doi: 10.1126/science.1255514. PMID: 25258080; PMCID: PMC4225776.

2) Iino Y, Sawada T, Yamaguchi K, Tajiri M, Ishii S, Kasai H, Yagishita S. Dopamine D2 receptors in discrimination learning and spine enlargement. Nature. 2020 Mar;579(7800):555-560. doi: 10.1038/s41586-020-2115-1. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32214250.

3) Yamaguchi K, Maeda Y, Sawada T, Iino Y, Tajiri M, Nakazato R, Ishii S, Kasai H, Yagishita S. A behavioural correlate of the synaptic eligibility trace in the nucleus accumbens. Sci Rep. 2022 Feb 4;12(1):1921. doi: 10.1038/s41598-022-05637-6. PMID: 35121769; PMCID: PMC8817024.

4) Lin R, Zhou Y, Yan T, Wang R, Li H, Wu Z, Zhang X, Zhou X, Zhao F, Zhang L, Li Y, Luo M. Directed evolution of adeno-associated virus for efficient gene delivery to microglia. Nat Methods. 2022 Aug;19(8):976-985. doi: 10.1038/s41592-022-01547-7. Epub 2022 Jul 25. PMID: 35879607.

5) Okada Y, Hosoi N, Matsuzaki Y, Fukai Y, Hiraga A, Nakai J, Nitta K, Shinohara Y, Konno A, Hirai H. Development of microglia-targeting adeno-associated viral vectors as tools to study microglial behavior in vivo. Commun Biol. 2022 Nov 11;5(1):1224. doi: 10.1038/s42003-022-04200-3. PMID: 36369525; PMCID: PMC9652230.

6) Yokoyama T, Manita S, Uwamori H, Tajiri M, Imayoshi I, Yagishita S, Murayama M, Kitamura K, Sakamoto M. A multicolor suite for deciphering population coding in calcium and cAMP in vivo. bioRxiv 2023.01.06.522686; doi: https://doi.org/10.1101/2023.01.06.522686