

# 脳内での細胞間の協調による高次脳機能発現

ミクログリアによる記憶・学習の制御

澤田 誠

**■ 研究のねらい** 記憶や学習といった高次脳機能の研究において神経細胞を調べるだけで本当に理解できるのだろうか。現在 LTP や LTD に見られる神経伝達の効率の変化が記憶学習の基本メカニズムと考えられているため、神経細胞でのイオンチャンネルや細胞内伝達系の変化が多く調べられている。しかしこのような神経伝達の効率の変化はシナプスの形態変化を伴うことも報告されており、分解再構築にかかわるプロテアーゼの役割も重要であると考えられている。脳内でのプロテアーゼ活性の多くはミクログリアやアストロサイトによって産生されるため、LTP や LTD の形成に大きく関わっていると考えられるが、これまでの電気生理学的手法ではアプローチがむずかしくほとんど調べられてこなかった。そこで本研究は脳内での細胞間の協調による高次脳機能発現を調べるために LTP 形成におけるミクログリアの役割を検討することを目的として行った。

## ■ 研究成果

・ラット大脳皮質スライス培養を用いた研究

### (1) 計測システム

今回の研究はスライス培養にミクログリアを添加し、添加ミクログリアの動態とスライス内の神経細胞の電気応答を同時に記録することが必要であるため、MED (multi-electrode dish) システムを用いた (図 1)。MED はガラス製培養皿に  $50 \times 50 \mu\text{m}$  の平板微小電極が  $150 \mu\text{m}$  間隔で  $8 \times 8$  個パターンニングされているもので、任意の電極を 8 チャンネル同時に記録できる。MED プローブはブタ臍由来 type I コラーゲンで処理し約  $50 \mu\text{m}$  の厚さのゲルを構成した。このゲル上に、生後 1-3 日齢の Fisher ラット新生仔から大脳皮質視覚野を摘出し、厚さ  $0.2-0.4\text{mm}$  の冠状断切片を調製して  $1.5-2.5\text{mm}$  の小片に細切後、コラーゲンゲル上に付着させ培養した (図 1)。

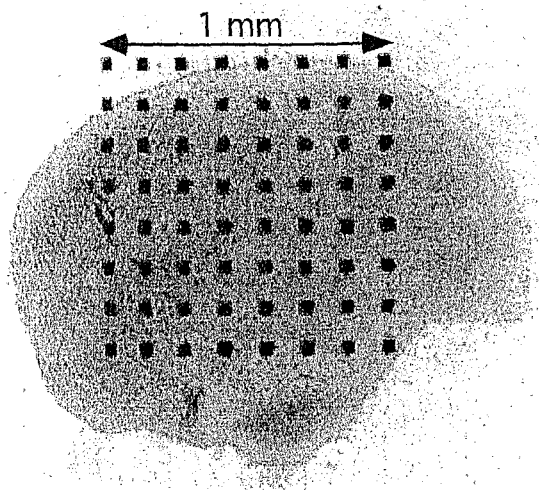


図1 MED上で培養したラット大脳皮質スライス。培養5日目のもので、形態、層構造などよく保存されている。黒い四角が $50 \times 50 \mu\text{m}$ の平板微小電極で、 $150 \mu\text{m}$ 間隔で64個の電極が $1\text{mm}^2$ にパターンニングされている。

## (2) スライス培養中の添加ミクログリアの動態

ラット新生仔から摘出した大脳皮質視覚野スライスはコラーゲンゲル上で3週間程度培養することができた。スライスをニッスル染色した結果、錐体細胞、顆粒細胞を含むほぼ正常な層構造を保持することがわかった。神経細胞の大きさは10-20  $\mu\text{m}$  で正常であった。培養2週間目のスライスに蛍光色素 PKH26 で染色したミクログリアをMEDあたり  $2 \times 10^4$  個添加するとスライス上に乗ったミクログリアの一部は速やかにスライス内部に侵入し、内在性のミクログリアの特徴的な形態である分岐状形態を呈することがわかった(図2)。この形態から添加したミクログリアが周囲の細胞と何らかの相互作用をもつことが考えられる。

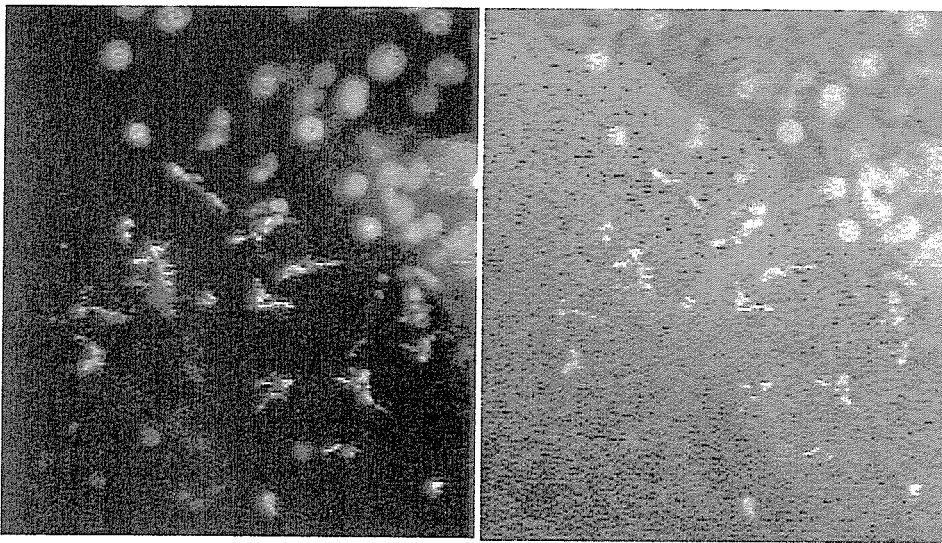


図2 培養スライスに添加したミクログリアの形態変化。  
(左) 蛍光像、(右) 位相差像と蛍光像の重ね合わせ。ミクログリアを添加して6時間後にはスライス内部に侵入したミクログリアが突起をのびして分岐状を呈している。これに対し、スライスに侵入していないミクログリアは球状-アメーバ状を呈している。

## (3) 誘発電位に対するミクログリア添加の影響

MED を用いることによって培養スライスの電気活動を多数の点から同時に記録することができた。また、培養経過日数に応じた応答の成熟がみられた。培養5日目では刺激電極近傍に短い潜時(約5ms)の反応が見られるにすぎなかったが、培養10日をすぎるとより広い範囲で応答がみられるようになり、さらに5日目では見られなかった長い潜時(約20ms)をもつ持続時間の長い応答が観察されるようになった。このとき、テタヌス刺激(100hz, 1 s)を加えることにより180-200%程度のLTPが観察された。次に、神経応答が十分成熟した14日目のスライスにミクログリアをMEDあたり  $2 \times 10^4$  個添加すると、テタヌス刺激を加えていないにも関わらず、400-500%のLTPが観察され、約15時間持続した(図3)。この現象はアストロサイトやマクロファージではみられず、ミクログリア特有のものであることがわかった。

神経可塑性の原理と考えられているLTPやLTDを生じさせるためのテタヌ刺激は生理的にはほとんどあり得ないと考えられており、実際に脳内ではテタヌ刺激に代わる何らかのメカニズムが神経可塑性を発現させていると考えられている。今回の結果からミクログリアの機能亢進がそのメカニズムに何らかの役割を果たしている可能性が明らかになった。本研究によって記憶や学習といった高次脳機能のメカニズムを理解する上で脳内での細胞間の協調という観点からとらえる必要があることを指摘できた点は重要であると考えている。

・株化ミクログリアの作製と新規な性質の発見

今回の研究の過程でラットおよびマウスの株化ミクログリア細胞を樹立することに成功した。この株化ミクログリアは増殖因子依存的に増殖し、因子非存在下では増殖能を失い分岐したミクログリアの形態（通常の脳内で見られる形態）をとるため、生体内に移入しても腫瘍化する危険性はないと考えられ、もともと脳内に存在する細胞の状

態に戻るため、脳内に移植または移入してもほとんど悪影響は持たないと思われる。この株化ミクログリアは末梢血管に注入すると脳に特異的に侵入することがわかった（図4）。この性質を利用すると脳特異的な遺伝子治療や薬物デリバリシステムに応用できるため、国内及び国際特許を申請した。

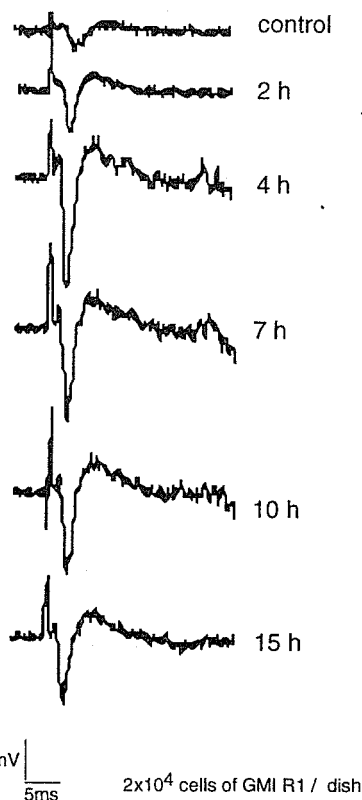


図3 ラット大脳皮質スライス培養でのミクログリアによるEPSPの増大

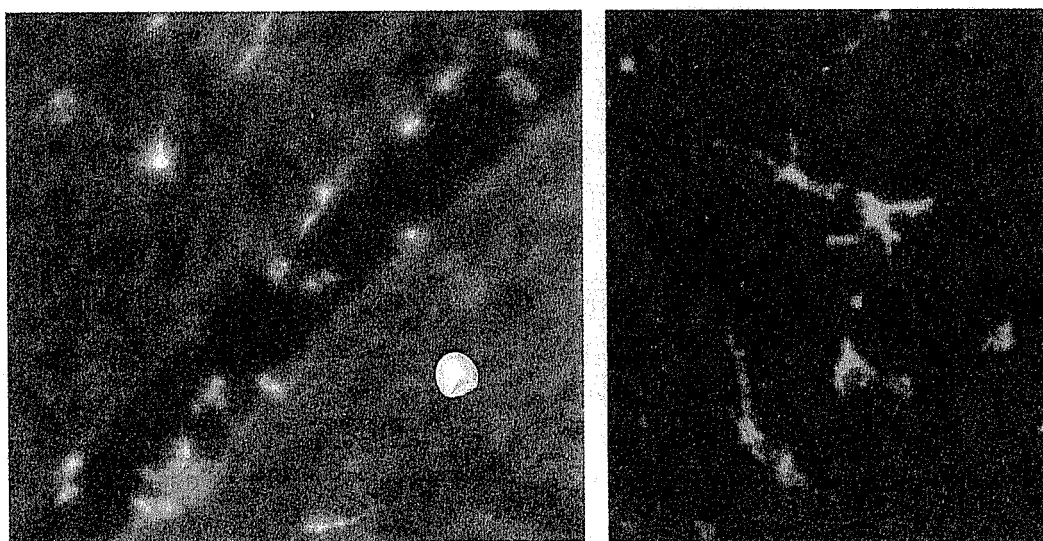


図4 ミクログリアの脳特異的侵入。(左) 蛍光色素で標識し、腋窩動脈に注入後2時間での血管腔像。生理食塩水で灌流しているにもかかわらず血管内皮に接着し脳実質に侵入するミクログリアが見られる。(右) 蛍光タンパク質GFPを発現するミクログリアの脳内侵入後の形態変化。脳内に侵入したミクログリアは分岐状の形態を呈する。

#### ・マウス個体を用いたアプローチ

ミクログリアの血液中に注入するだけで脳に特異的に入るという特殊な性質を利用して脳に傷を付けずにミクログリアをマウス脳内に導入して、「賢い」マウス（LTP が起こりやすいマウス）ができるかどうかについて現在検討している。特に、スライス培養でみられた神経結合の発達する時期に外来生のミクログリアをマウス個体に導入させるシステムが有用であると考え、e13 マウス胎仔に *exo utero* 法により蛍光標識ミクログリアを注入し、出生成熟させた後、電気生理学的分析や行動分析を行っている。

#### ・今後の展開

今回の研究でミクログリアが記憶や学習といった高次脳機能発現の基本メカニズムである LTP 形成をコントロールしている可能性を示すことができた。次の段階としてミクログリアにおける神経機能調節の責任分子が何であるかを検討することが重要である。この分子の本体を解明することによって脳の可塑性研究に新しい方向性をもたらすとともに、痴呆などの治療にもこれまでにない方法論を提供できると考えている。

また、今回の研究でミクログリアは血液中に注入するだけで脳に特異的に入るという特殊な性質を明らかにすることができ、さらにこの性質を保持したまま細胞を株化することに成功し、脳特異的に遺伝子発現を行ったり薬物を導入することが可能になった。この研究は痴呆などの改善や脳への薬物や遺伝子の導入による治療法に新しい方法論を提供するだけでなく、脳の機能の理解についてこれまでにない細胞生物学的な方向性を与えるかもしれない。

今回の研究によって「知」を構成する基本器官である脳では信号を伝播する神経細胞とミクログリアを代表とするそれ以外の細胞との相互作用の結果として機能を発現していることが示唆できた。細胞間の相互作用は多くの分子を介して行われるため、今後はそれらの責任分子を同定しなければならない。最近では遺伝子工学や遺伝子解析の手法が飛躍的に進歩しており、「知」に関わる遺伝子についても研究が進展しているが、今回の研究成果である、「知」を細胞相互作用としてとらえる観点が遺伝子解析においても新たな局面を開くものと期待している。

#### ・成果リスト

##### 1. 論文

- Sawada, M., Suzumura, A., Hosoya, H., Marunouchi, T., Nagatsu, T.: IL-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia. *J. Neurochem.*, 72:1466-1471, 1999.
- Ono, K, Takii, T, Onozaki, K, Ikawa, M, Okabe, M, Sawada, M: Migration of Exogenous Immature Hematopoietic Cells into Adult Mouse Brain Parenchyma under GFP-Expressing Bone Marrow Chimera. *Biochem Biophys Res Commun*, 262: 610-614, 1999.

- Imai, F., Sawada, M., Suzuki, H., et al.: Exogenous microglia enter the brain and migrate into ischaemic hippocampal lesions. *Neurosci. Lett.*, 272:127-130, 1999.
- Inoue, H., Sawada, M., Ryo, A., Tanahashi, H., Wakatsuki, T., Hada, A., Kondoh, N., Nakagaki, K., Takahashi, K., Suzumura, A., Yamamoto, M., Tabira, T.: Serial analysis of gene expression in a microglial cell line. *Glia*, in press, 1999.
- Sawada, M., Imai, F., Suzuki, H., Hayakawa, M., Kanno, T., Nagatsu, T.: Brain-specific gene expression by immortalized microglial cell-mediated gene transfer in the mammalian brain. *FEBS Lett.*, 433:37-40, 1998.
- Imai, F., Sawada, M., Suzuki, H., Kiya, N., Hayakawa, M., Nagatsu, T., Marunouchi, T., Kanno, T.: Migration activity of microglia and macrophages into rat brain. *Neurosci. Lett.*, 237:49-52, 1997.
- 澤田誠：ミクログリアの新規な性質と脳での役割 -ミクログリアは脳で何をしているか-。細胞工学, 18 550-558, 1999.
- 澤田誠：ミクログリア細胞とアポトーシス、日本薬理学雑誌、112:15-19, 1998.

## 2. 口頭発表

- 澤田誠 (1998) シンポジウムオーガナイザー：ミクログリアの細胞生物学と脳での役割、第 71 回日本生化学会、名古屋、October.
- 澤田誠 (1998) ミクログリアの新規な性質、第 28 回新潟神経学夏期セミナー、新潟、July.
- 澤田誠 (1998) ミクログリアの新規な性質と脳での役割、第 9 回高次脳機能障害シンポジウム、京都、Oct.
- 澤田誠 (1997) ストレスと神経、グリア応答、シンポジウム-脳とストレス、JST 異分野研究者交流フォーラム、敦賀、February
- 澤田誠 (1997) ミクログリアの脳に対する高親和性と脳特異的遺伝子導入への応用、神経化学公開シンポジウム「グリア細胞の分子・細胞生物学」、第 40 回日本神経化学会、松山、October.
- 澤田誠 (1997) ミクログリアの脳に対する高親和性と脳特異的遺伝子導入への応用、特別講演、第 3 回グリアクラブワークショップ、札幌、August.

## 3. 新聞報道

- 中日新聞 1996.11.1 第 1 面、手術なし脳治療に道、世界初の手法開発--抗がん剤や遺伝子細胞が患部に運搬
- 中日新聞 1999.10.20 第 3 面、脳細胞死滅を防ぐ作用・ミクログリア研究・アルツハイマー治療に道

## 4. 特許

- 国内特許出願 株化ミクログリア 特願平 9-50448, 1997.3.5
- 国際特許出願 株化ミクログリア PCT/JP98/99948, 1998.3.5