

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01983

研究課題名(和文) 脳血管周囲スカベンジャー細胞の脳内恒常性維持における機能解析

研究課題名(英文) The functional role of perivascular scavenger cells in the maintenance of brain homeostasis

研究代表者

松野 仁美(鈴木) (Matsuno, Hitomi)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第三部・リサーチフェロー

研究者番号：40415302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脳常在マクロファージの一つである血管周囲性マクロファージ(PVM)の細胞の脳内動態と機能について解析を行った。PVMは血管周囲に集積して存在しており、血管内の色素を積極的に取り込み、細胞質内の顆粒構造に蓄積していた。

次にPVMの細胞機能を明らかにすることを目的として、慢性ストレスうつモデルを用いて、病態時のPVM動態を解析した。慢性的なストレスを与えるとPVM細胞数が有意に低下することが分かった。PVMは血中や血管周囲の老廃物を除去していると考えられ、慢性ストレスによるPVMの機能低下が脳の免疫及び恒常性異常を引き起こし、血管障害を伴う脳疾患発症につながっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では脳常在マクロファージの一つであるPVMについて、うつ病モデルマウスにおける動態変化を解析した。その結果、慢性ストレスはPVMの機能低下を引き起こすことが示唆された。本研究で得られた結果はうつ病だけでなく血管障害を伴う脳疾患の新規治療法やバイオマーカー開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In the central nervous system, resident macrophages play important roles for immune responses against inflammation, and brain repair mechanism. We performed in vivo imaging of cerebro-vascular structures, and identified brain perivascular macrophages (PVMs). We found that dye-labeled PVM is different cell type from microglia, and PVMs were apposed to blood vessel walls in both brain surface and deeper brain layers. They actively uptook fluorescence dyes, and persistently accumulated dyes in the granular structures of the cytoplasm. To characterize the functional roles of PVMs in the pathological condition, we investigated the dynamics of PVM in the stress-induced mouse depression model. Chronic restraint stress induced abnormal increase of vascular permeability as well as decline in the number of CD163-positive PVM. These results suggest that PVM may play principle functions for the clearance of waste materials in the perivascular spaces to maintain homeostasis balance.

研究分野：神経科学

キーワード：マクロファージ ミクログリア 血管脳関門 うつ病 ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系ではミクログリアが常在性マクロファージとして働き、老廃物や死細胞を除去していることが知られている。近年スカベンジャー受容体を有する血管周囲マクロファージ(PVM)という細胞が脳血管周囲に局在し、血管内老廃物の取り込みをしていることが報告された (Hawkes and McLaurin, 2009; Prinz and Priller, 2014)。我々は予備実験において、マウス第二運動野(M2野)における2光子脳血管イメージングを行ったところ、血管周辺部に血中の蛍光色素を取り込む細胞があることを見つけた。これらの細胞は色素投与直前には見られないが、翌日になると、血管周辺部に現れ、血管内色素を積極的に取り込む挙動を示す事から、我々はスカベンジャー細胞と名付けた。スカベンジャー細胞の多くは血管周囲部に局在しており、血管内から取り込んだ蛍光色素を細胞内顆粒構造に長時間留めるという特徴から、PVMであることが予想された。

## 2. 研究の目的

スカベンジャー細胞は非常に運動性が高く、血管周囲部に局在するアストロサイトやペリサイト、ミクログリアとは形態が異なっていた。また多くは血管周囲部に局在しており、血管内から取り込んだ蛍光色素を細胞内顆粒構造に長時間留めるという特徴から、PVMであることが予想された。本研究ではスカベンジャー細胞のセルタイプの同定、血管内分子取り込み機能解析、薬物投与による枯渇実験等を通じて、スカベンジャー細胞の脳における機能的役割を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

- 1) 実験動物：成熟 C57BL/6J (9週齢以上)、BALB/c (9週齢以上)、遺伝子組み換えマウス (Iba1-EGFP) を使用した。
- 2) 慢性拘束ストレス：拘束ストレスには拘束用袋 (デカピコーン) を使用した。ストレス群には1日6時間、2日間連続の拘束ストレスを負荷した。うつ行動の評価には、スクロース嗜好性試験 (SPT), 強制水泳試験 (FST) を用いた。
- 3) FITC ラベルデキストラン (分子量：70 kDa, 250 kDa, 2%溶液、4 ml / 体重 kg) またはエバンズブルー (2%溶液、4 ml / 体重 kg) を尾静脈投与した。
- 4) クロドロン酸リポソーム (10 mg/ml, 280 nm, 片山化学工業) を大槽内投与した。
- 5) 2光子イメージング：麻酔下において体性感覚皮質上の頭蓋骨に頭窓を設置した。2光子励起レーザー顕微鏡 (FV1000-MPE, Olympus) を用いて、細胞形態をリアルタイムで観察した。光源はモードロック Ti: sapphire レーザー (MaiTai HP DeepSee, Spectra-physics) を用いた。励起波長は FITC (800 nm), GFP (920 nm), SR101 (920 nm) で、水浸対物レンズ (XPLAN, 25XWMP2: NA 1.05) を使用した。
- 6) 免疫染色：4%PFA/PBS による灌流固定後、一次抗体 (NeuN, GFAP, Iba1, PDGFR, CD206, CD163), ビオチン標識レクチン, 二次抗体 (Alexa594-anti rabbit IgG, Alexa594-anti rat IgG), Alexa647-streptavidin, Hoechst33342 を用いて免疫染色を行った。
- 7) 定量 PCR：海馬、大脳皮質から total RNA を抽出し、TaqMan Gene Expression Probes (GAPDH (Mm99999915\_g1), CD163 (Mm00474091\_m1), CD206 (Mm01329362\_m1)) を用いてリアルタイム PCR を行った。

#### 4. 研究成果

##### スカベンジャー細胞のセルタイプ同定

FITC ラベルデキストランを尾静脈注射し、脳血管周囲部に観察されるスカベンジャー細胞についてセルタイプを調べた。その結果 FITC 陽性スカベンジャー細胞は、下記のような特徴を有していた。1) *in vivo* ミクログリア、アストロサイトイメージング(Iba1-EGFP Tg マウス、SR101 を使用)では、ミクログリアやアストロサイトとは異なる形態、局在を示した。2) 免疫組織染色では、顆粒状の FITC シグナルは、神経細胞 (NeuN)、アストロサイト (GFAP)、ミクログリア (Iba1)、ペリサイト (PDGFR) とは重ならず、マクロファージマーカーである CD163 及び CD206 陽性細胞に認められた。3) マクロファージ枯渇薬であるクロドロン酸リポソームを大槽内に投与したところ、FITC 陽性スカベンジャー細胞数の有意な減少が認められた。これらの結果より、スカベンジャー細胞は PVM であることが確認された (以下細胞の名称を PVM と記載)。

##### PVM の蛍光色素取り込み能力について

異なる分子量の FITC デキストラン (70kDa, 250kDa) を血中投与後、*in vivo* 脳血管イメージングを行い、PVM の色素取り込み能力を調べた。両者とも血管脳関門 (Blood Brain Barrier: BBB) を通過できないサイズの分子であるが、PVM によって同等の取り込みが観察され、PVM の蛍光色素取り込み能力には分子サイズ選択性がないことが示唆された。

##### PVM の機能解析

PVM は脳血管周囲に存在する分子の取り込みを行うことで、脳内及び脳血管内のクリアランスに働いていることが期待される。私達のこれまでの研究から、うつ病発症には脳血管障害や脳内炎症が関与している可能性が示唆された (Hattori et al., 2015)。うつ病のマウスモデルである、慢性拘束ストレスモデルを用いて、PVM がうつ発症時においてどのような動態を示すのかを解析した。当初2光子 *in vivo* イメージングによる解析を予定していたが、BBB が存在する深部脳領域では、PVM 内の顆粒状 FITC シグナルが非常に微弱であることから困難だった。そこで主に組織染色、遺伝子発現解析、薬物投与実験による解析を行った。

慢性ストレス群では有意な体重減少、副腎肥大が起きており、また FST における有意な無動時間の増加、SPT における有意なスクロース摂取量の低下が見られたことから、うつ様行動が増えていることが確認された。また尾静脈投与した蛍光色素の脳内漏出が複数の脳領域で観察され、BBB 破綻が起きていることが示唆された。次に PVM 局在変化について調べた。免疫組織染色の結果よりストレス群の脳皮質並びに海馬では、コントロール群と比べて CD163 陽性 PVM 細胞数が著しく減少していた。さらにリアルタイム PCR 解析においても拘束ストレス群の CD163 発現の有意な低下が認められた。一方1日間のみ拘束ストレスを与えたマウス (急性ストレスモデル) では、うつ様行動は見られず、CD163 発現レベルにもコントロール群との間に有意差が見られなかった。

末梢組織において CD163 陽性マクロファージは組織修復や抗炎症に働くことが知られている。研究結果より慢性ストレス負荷による脳 PVM の機能低下が、脳内や血管内老廃物のクリアランス低下を招き、BBB 破綻につながっていることが予想される。現在クロドロン酸

リポソーム投与のBBB透過性および脳機能への影響、PVMとミクログリアの相互作用についても解析を行っており、これらの研究成果について投稿準備中である。

<引用文献>

1. Cheryl A Hawkes and Joanne McLaurin (2009). Selective Targeting of Perivascular Macrophages for Clearance of Beta-Amyloid in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(4):1261-6. doi: 10.1073/pnas.0805453106.
2. Marco Prinz and Josef Priller (2014). Microglia and Brain Macrophages in the Molecular Age: From Origin to Neuropsychiatric Disease. *Nat Rev Neurosci*. 15(5):300-12. doi: 10.1038/nrn3722.
3. Kotaro Hattori, Miho Ota, Daimei Sasayama, Sumiko Yoshida, Ryo Matsumura, Tomoko Miyakawa, Yuuki Yokota, Shinobu Yamaguchi, Takamasa Noda, Toshiya Teraishi, Hiroaki Hori, Teruhiko Higuchi, Shinichi Kohsaka, Yu-ichi Goto, Hiroshi Kunugi (2015). Increased Cerebrospinal Fluid Fibrinogen in Major Depressive Disorder. *Sci Rep*, 5:11412. doi: 10.1038/srep11412.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuchimine Shoko, Matsuno Hitomi, O'Hashi Kazunori, Chiba Shuichi, Yoshimura Aya, Kunugi Hiroshi, Sohya Kazuhiro	4. 巻 525
2. 論文標題 Comparison of physiological and behavioral responses to chronic restraint stress between C57BL/6J and BALB/c mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 33~38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土嶺 章子、千葉秀一、吉村文、鈴木仁美、大橋一徳、惣谷和広、功刀浩
2. 発表標題 反復拘束ストレス負荷によるうつ様行動に対するマウス系統とストレス曝露期間の影響
3. 学会等名 第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本精神神経薬理学会(合同年会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shuichi Chiba, Shoko Tsuchimine, Aya Yoshimura, Hitomi Suzuki, Kazunori O'Hashi, Kazuhiro Sohya, Hiroshi Kunugi
2. 発表標題 The effect of mouse strain and duration of stress exposure on the depression like behavioral changes by repeated restraint stress.
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kazunori O'Hashi, Hitomi Matsuno, Shoko Tsuchimine, Shuichi Chiba, Kazuhiro Sohya and Hiroshi Kunugi
2. 発表標題 A role of brain macrophages to constitute Blood-brain barrier - 血液脳関門におけるマクロファージの役割-
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会 (Neuroscience2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hitomi Matsuno, Kazunori O'Hashi, Shoko Tsuchimine, Shuichi Chiba, Aya Yoshimura, Shingo Nakajima, Kazuhisa Sakai, Noritaka Ichinohe, Kazuhiro Sohya, Hiroshi Kunugi
2. 発表標題 Behavioral and neurobiological effects of repeated restraint stress.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会 (Neuroscience2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shuichi Chiba, Shoko Tsuchimine, Hitomi Suzuki, Kazunori O'Hashi, Mayumi Kando, Masazumi Nishimoto, Akihiko Okuda, Kazuhiro Sohya, Hiroshi Kunugi
2. 発表標題 Alterations in depression like behavior in the junctional adhesion molecule B knockout mice.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会 (Neuroscience2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shoko Tsuchimine, Hitomi Matsuno, Kazunori O'Hashi, Shuichi Chiba, Aya Yoshimura, Shingo Nakajima, Sayuri Ishiwata, Shintaro Ogawa, Kazuhiro Sohya, Hiroshi Kunugi.
2. 発表標題 Comparisons between C57BL6/J and BALB/c mice in behavioral test and physiological change after chronic restraint stress.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会 (Neuro2019).
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	大橋 一徳  (O'Hashi Kazunori)  (90617458)	日本大学・歯学部・助教    (32665)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第三部 客員研究員兼任

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	土嶺 章子 (Tsuchimine Shoko)  (60649044)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所・疾病研究第三部・研究生  (82611)	
研究協力者	千葉 秀一 (Chiba Shuichi)  (00510380)	岡山理科大学・獣医学部・助教  (35302)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第三部 客員研究員兼任
研究協力者	惣谷 和広 (Sohya Kazuhiro)  (80415207)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所・疾病研究第三部・室長  (82611)	
研究協力者	功刀 浩 (Kunugi Hiroshi)  (40234471)	帝京大学・医学部・教授  (32643)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第三部 客員研究員兼任