

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K14961

研究課題名(和文)「ヒト化マウス」を用いたヒトミクログリアの脳機能制御に関する研究

研究課題名(英文) Transplantation of human human induced pluripotent stem cell-derived microglia to the brain of mice

研究代表者

PARAJULI Bijay (Parajuli, Bijay)

山梨大学・大学院総合研究部・特任助教

研究者番号：00748783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミクログリアは神経再生、シナプス新生等、重要な脳機能に深く関与している。これまで、ミクログリアの研究は主にマウスミクログリアを中心に行われてきた。一方で、ヒトミクログリアの研究も行われているが、これらは主に *in vitro* 実験系で展開されている。しかし、マウスミクログリアとヒトミクログリアはその分子発現及び機能に大きな差があること、ミクログリアの性質は *in vivo* と *in vitro* で予想以上に乖離があること等が問題となっている。そこで本研究ではヒト iPS 細胞由来ミクログリアを移植し、条件の最適化により安定的に定着させる方法を確立し、「ミクログリアヒト化マウス」の作成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、国内外におけるミクログリアの研究は主にマウスミクログリアを中心に展開されている。また、一部のヒトミクログリアの研究は、脳内の環境を反映していない *in vitro* 系でしか行われていない。本研究は、ヒトミクログリアをマウスの脳内に移植し、定着させた「ヒト化マウス」を作成し、マウス脳内という *in vivo* 環境下でヒトミクログリア機能を解析する実験系の構築に成功した。本プロジェクトにより、ヒトミクログリアのヒト脳内での機能を、より忠実に外挿されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Microglia are the resident immune cells of the brain, and play essential roles in neuronal development, homeostatic function, and neurodegenerative disease. Human microglia are relatively different from mouse microglia. However, most research on human microglia is performed *in vitro*, which does not accurately represent microglia characteristics under *in vivo* conditions. To elucidate the *in vivo* characteristics of human microglia, methods to transplant induced pluripotent or embryonic stem cell-derived human microglia into neonatal or adult mouse brains is required. To address these issues, we developed a simplified method to transplant them into the brain in combination with a colony stimulating factor 1 receptor antagonist. We found that human microglia were able to migrate to different regions of the brain, proliferate, and become the dominant microglia in a region-specific manner by occupying the vacant niche when exogenous human cytokine is administered.

研究分野：神経科学

キーワード：ヒトミクログリア 移植 ヒト化マウス

## 1. 研究開始当初の背景

グリア細胞は神経細胞とともに脳を構成する細胞で、その形態、機能によって、主にアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、上衣細胞などに分類される。これまで、グリア細胞は単なる支持細胞と考えられていたが、神経細胞との積極的なコミュニケーションにより、脳機能を強力かつ積極的に制御していることが近年の研究で次々と明らかとなってきた。つまり、脳機能を解明するためには、グリア細胞の機能を解明することが不可欠であると言える。哺乳類の進化に伴ってグリア細胞は、その数を顕著に増加させ、形態及び性質は複雑となりより高度な脳機能制御に関与するようになって考えられている。マウスの脳内にヒトアストロサイトを移植した「アストロサイト・ヒト化マウス」は長期増強及び学習能力の亢進を呈し、ヒトアストロサイトがマウスアストロサイトよりも強力に神経活動及び脳機能を制御していることが証明された。これらは、ヒトミクログリアの脳機能に果たす役割の解明には、ヒトミクログリアを用いた *in vivo* 実験系構築の重要性を強く示唆するものである。

ミクログリアは、これまで脳内の免疫細胞として考えられたきたが、神経再生、シナプス新生、神経ネットワークの切り替えなど、実に多彩で重要な脳機能に深く関与していることが明らかになっている。これまで、ミクログリアの研究は主にマウスミクログリアを中心に発展されてきた。しかしマウスミクログリアは、ヒトミクログリアの性質を必ずしも反映してないため、ヒト脳内でのヒトミクログリア機能を理解するには不十分である。一方で、ヒトミクログリアの研究も一部行われているが、これらは主に *in vitro* 実験系で展開されている。しかし、マウスミクログリアとヒトミクログリアはその分子発現及び機能に大きな差があること、ミクログリアの性質は *in vivo* と *in vitro* で予想以上に乖離があること、等が問題となっており、ヒトミクログリアの *in vivo* 実験系の充実が急務となっている。

## 2. 研究の目的

ヒトミクログリアの機能を *in vivo* で調べる手法として、ヒトミクログリアをマウスの脳内に移植して「ミクログリア・ヒト化マウス」(以下「ヒト化マウス」)を作る方法がある。これにより、ヒトミクログリアの形態・機能が、マウス脳内ではあるが *in vivo* で解析可能となる。

本研究の目的は、マウスの脳内にヒトミクログリアを移植して「ミクログリア・ヒト化マウス」を作成し、マウス脳内という *in vivo* 環境下でヒトミクログリアの性質及び脳機能に果たす役割を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

ヒトミクログリアには、ヒト iPS 細胞由来ミクログリア (hiPSMG) を用いた。

コロナー刺激因子 1 (CSF1) 受容体の拮抗薬 (PLX5622) 投与によりホストのミクログリアを消失させた後、hiPSMG ( $1 \times 10^5$  cells /  $\mu$ L) をマウスの脳内に移植した。

移植後の生着を調べるために、移植後の各時点 (7, 14, 28, 60 日後) における脳を採取し、PFA 固定標本作製し、ヒト特異的な抗体抗 STEM121 抗体を用いて免疫組織学的解析を行い、移植技術の安定性を客観的に評価した。

移植 60 日後のミクログリア・ヒト化マウスの脳を採取し、PFA 固定標本作製し、マウス脳内におけるヒトミクログリアの細胞体の大きさ、突起の全長、突起数などの解析を行った。マウス及びヒトミクログリアはそれぞれ、抗 STEM121 抗体有無により区別した。

## 4. 研究成果

hiPSMG をマウス脳内に移植するにはホストのミクログリアを消失させる必要がある。そこでミクログリアの生存に必要なコロナー刺激因子 1 (CSF1) 受容体の拮抗薬 (PLX5622) 投与によりホストのミクログリアを消失させた。その後 hiPSMG を移植した。

移植後の生着を調べるために、移植後の各時点 (7, 14, 28, 60 日後) における脳を採取し、PFA 固定標本作製し、ヒト特異的な抗体抗 STEM121 抗体を用いて免疫組織学的解析を行い、移植技術の安定性を客観的に評価した。種々の条件の最適化により、持続的にヒトリコンビナントコロナー刺激因子 1 (hCSF1) とヒトランスフォーミング増殖因子-1 (hTGF-1) を供給することで hiPSMG を移植後少なくとも二ヶ月間は安定的に定着させる方法を確立した。

移植 60 日後のミクログリア・ヒト化マウスの脳を採取し、免疫組織学的解析を行い、マウス脳内におけるヒトミクログリアの形態を明らかにした。移植した hiPSMG は多数の突起を有した静止型のヒトミクログリアが観察され、脳部位特異的な形態を有し、マウス脳内に適応していた。また、マウス脳内におけるヒトミクログリアの細胞体の大きさ、突起の全長、突起数などをマウスミクログリアのそれらと相違点を明らかにした。マウスミクログリアと比較したところ hiPSMG は長い突起及び複雑な伸長パターンを有することが明らかにした。

本プロジェクトにより、ヒトミクログリアをマウスの脳内に移植する技術が確立されヒトミクログリアのヒト脳内での機能を外挿する実験系の構築ができた。本プロジェクトにより、ヒトミクログリアの脳内での生理学的役割の解明に大きく貢献できると期待される。さらに本研究の

成果は、中枢疾患におけるヒトミクログリアの関与を解明するために必要な研究基盤となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ミクログリア含有中枢神経系内移動剤、及びこれを含む中枢神経系疾患治療薬、並びにミクログリア導入動物、及びその製造方法	発明者 小泉修一、パラジュリ ビージェイ、繁富英治、篠崎陽一	権利者 山梨大学
産業財産権の種類、番号 特許、2020-196642	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------