

令和元年6月16日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15669

研究課題名(和文)新規同定分子によるミクログリア分化誘導機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the function of newly identified gene in microglial development.

研究代表者

能登 大介 (Noto, Daisuke)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10598840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系内での部位ごとにミクログリア特異的遺伝子であるEBF3の発現を評価し、大脳と比較して脊髄ミクログリアにおいて高発現していることを明らかにした。EBF3のミクログリアにおける機能が、部位ごとに異なる可能性が示唆された。またEBF3コンディショナルノックアウトマウスを作成し脊髄ミクログリアを観察したところ、ミクログリアの形態、および密度については明らかな変化は認められなかった。今後、炎症条件下での脊髄ミクログリアにおけるEBF3の役割の解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ミクログリアは神経系の発達はもとより、免疫性神経疾患、神経変性疾患、虚血性疾患、精神疾患といった幅広い疾患においてもその役割が注目されている。我々が見いだしたEBF3は、他のマクロファージと比較してミクログリアに特異的に発現する遺伝子であり、その機能を明らかにすることで、神経疾患の病態におけるミクログリアの役割解明につながり、神経疾患の新たな治療法に結びつくと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Microglia have been reported to be involved in various neurological diseases. We identified microglia-specific gene, EBF3, which is a candidate gene for microglia regulation. We analyzed the expression EBF3 in central nervous system (CNS) and revealed that microglia in spinal cord expressed higher amounts of EBF3 as compared with microglia in cerebral cortex. This data indicated that the expression and roles of EBF3 in microglia may be regulated in CNS site-specific manner.

We developed microglia-specific EBF3 conditional KO (cKO) mice to analyze the function of EBF3 in microglia. We investigated the morphology and density of microglia in this cKO mice, and revealed that EBF3-KO did not affect microglial morphology and density. We will investigate the EBF3 function in microglia under inflammatory conditions and the roles in pathogenesis of CNS autoimmunity such as experimental autoimmune encephalomyelitis.

研究分野：神経免疫

キーワード：ミクログリア 神経炎症 神経性免疫疾患 多発性硬化症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、多発性硬化症のような神経免疫疾患のみならず、パーキンソン病やアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症といった変性疾患、脳梗塞に伴う再灌流傷害、さらにはうつ病や自閉症などの精神疾患など様々な中枢神経疾患病態の根底に炎症があることが注目されている。ミクログリアは中枢神経系の免疫担当細胞であり、組織常在マクロファージとして、死細胞の貪食、炎症性サイトカインや神経栄養因子の産生放出などの機能を担うが、それに加えシナプスの成熟や数の調節に関与し、脳の発達ならびに恒常性維持において非常に重要な機能を担うことが明らかとなってきた。したがって、炎症が根底にある中枢神経疾患において、ミクログリアの機能制御は極めて重要である。

ミクログリアは胎生期に卵黄嚢由来の前駆細胞が中枢神経へ移行し分化することが報告され、血中単球由来マクロファージとは分化や機能が異なることが明らかとなった。しかし、分子レベルではミクログリアのマスターレギュレーターやその他の特異的分子が未だ不明である。申請者は、マウス骨髄細胞やマウスおよびヒト末梢血単球をアストロサイト培養と共培養することで、ミクログリア様細胞へ分化することを確認し、ミクログリアへの分化誘導にはアストロサイトとの接着に加え、IL-34 が重要な役割を担っていることを発見しミクログリア様細胞誘導培養系を確立した (Noto D, Eur J Neurosci. 2010, Noto D, Neuropathol Appl Neurobiol. 2013)。さらに、ミクログリアに特異的な分化制御機構を明らかにするため、DNA マイクロアレイ解析を行い、他の組織常在マクロファージと比較しミクログリアに特異的に発現している遺伝子、EBF3 を同定した。EBF3 は early B-cell factor (EBF) family に属する転写因子であり、神経細胞の分化発達に関与するほか、腫瘍抑制遺伝子としての機能が報告されているが、ミクログリアにおける機能については未解明である。

EBF3 の役割を明らかにするため、多発性硬化症動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) に対し EBF3-siRNA を投与したところ、症状が増悪したことから中枢神経炎症に関わる因子と考えた。そこで、ミクログリアにおける EBF3 の機能を詳細に解析するため、EBF3 遺伝子に loxP 配列を導入したマウスを作成し、CX3CR1 プロモーター下にタモキシフェン誘導型 Cre リコンビナーゼを導入したマウスと交配し、タモキシフェン誘導 EBF3 コンディショナルノックアウトマウス (cKO マウス) を得た。このマウスを用いて混合グリア細胞培養を作成し、タモキシフェンを作用させミクログリアでの EBF3 発現をノックアウトしたところ、ミクログリアの著明な減少が観察された。この結果から EBF3 はミクログリアの機能制御のみならず、分化誘導にも重要な役割を担っている可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

以上の背景および予備実験の結果から、本研究ではミクログリアの分化誘導および機能における EBF3 の役割を明らかにすることを目的とし、さらに EBF3 による転写制御機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

#### 1. コンディショナルノックアウトマウスを用いたミクログリアにおける EBF3 の役割の解明

##### a) 一次混合グリア培養系を用いた in vitro での EBF3 機能の解析

我々が同定した EBF3 遺伝子に loxP 配列を導入した EBF3<sup>flx/flx</sup> マウスと、ミクログリアマーカーの一つである CX3CR1 プロモーター下にタモキシフェン誘導型 Cre リコンビナーゼ CreERT2 を導入した CX3CR1<sup>CreER</sup>/CreER マウスを交配させ、コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作成する (作成済)。作成した cKO マウスを用いて一次混合グリア細胞培養を作成、培地にタモキシフェンの活性型である 40H-タモキシフェンを添加し、遺伝子組換えを誘導、EBF3 ノックアウトによるミクログリアへの影響を解析する。すでに施行した予備実験では、タモキシフェン添加により一次混合グリア細胞培養内のミクログリアの形成が阻害されミクログリアが減少することを確認している。今後は予備実験の結果を再確認するとともに、既に分化した一次混合グリア細胞培養内成熟ミクログリアにおける EBF3 ノックアウトの影響の解析、培養上清中の各種サイトカイン、神経栄養因子の解析、生細胞イメージングシステムを用いたタイムラプス画像による形態学的解析などを行い、EBF3 のミクログリア分化、機能における役割を解明する。

##### b) コンディショナルノックアウトマウスを用いた生体内での EBF3 機能の解析

上述した作成済み cKO マウスに対し、タモキシフェンを投与することで、in vivo での EBF3 ノックアウト系を樹立する。すでに予備実験において、EBF3<sup>flx/flx</sup>:CX3CR1<sup>CreER</sup>/+マウスにタモキシフェンを投与することで、EBF3 mRNA の発現が著明に低下することを確認している。今後、タンパク質レベルでの EBF3 ノックアウトの確認を行う。本システムの大きな利点として、タモキシフェン誘導 Cre を用いているため、任意の時点で EBF3 のノックアウトを行える点がある。そこで、cKO マウスを用いて胎生期ならびに成長後における EBF3 の生体内ミクログリアにおける役割を解明する。具体的にはミクログリア分化前の妊娠早期、および分化後の妊娠後期ならびに成長後のマウスにタモキシフェンを投与し、分化段階毎に EBF3 ノックアウトがミクログリアに与える影響について解析する。解析手法としてはフローサイトメーターを用いたミクログリアの表面分子解析、免疫組織化学法によるミクログリアの数や形態異常の観察、炎症関

連分子の発現解析やトランスクリプトーム解析を行う。これらの解析を通して EBF3 ノックアウトが胎生期および成長後のミクログリアへ与える影響を解明する。

#### c) EBF3 による転写制御機構の解明

EBF3 のミクログリア内での遺伝子発現制御につき詳細に解析するため、クロマチン免疫沈降シークエンス(Chip-Seq)法を用いて、ゲノム DNA 上での EBF3 結合部位を明らかにし、EBF3 を機転とした遺伝子転写制御ネットワークを解析し、ミクログリア分化機構を解明する。

#### 2. 多発性硬化症モデルを用いた中枢神経炎症における EBF3 の解析

前年度に樹立した cKO マウスに対し、髄鞘タンパク質由来ペプチドを免疫することで実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル(EAE)を誘導し臨床症状並びに病理所見を解析する。免疫組織化学法によりミクログリア、アストロサイトの増殖について解析を行うと共に、炎症関連分子(IL-1 や TNF- 等)の発現解析を行う。また、フローサイトメトリーによる発現分子解析を行い、EBF3 が中枢神経炎症に与える影響を明らかにする。

#### 4. 研究成果

本研究では、申請者が同定した EBF3 のミクログリア分化誘導および機能における役割を解明するため、我々が同定した EBF3 遺伝子に loxP 配列を導入した EBF3<sup>fl/lox</sup> マウスと、ミクログリアマーカーの一つである CX3CR1 プロモーター下にタモキシフェン誘導型 Cre リコンビナーゼ CreERT2 を導入した CX3CR1-CreER マウスを交配させ、コンディショナルノックアウト作成し、試験管内、および生体内でのミクログリアにおける EBF3 機能の解析を行った。混合グリア細胞培養を作成し、タモキシフェンを作用させミクログリアでの EBF3 発現をノックアウトしたところ、ミクログリアの著明な減少が観察された(図1)。

生体内での EBF3 のミクログリアでの役割を解明するため、中枢神経系内での部位ごとの EBF3 発現を評価したところ、大脳と比較して脊髄ミクログリアにおいて、EBF3 が高発現していることが明らかとなった(図2)。このことから、EBF3 がミクログリアにおいて果たしている役割が、中枢神経内の部位ごとに異なっている可能性が示唆された。

しかし、上述の EBF3 コンディショナルノックアウトマウスを用い、生体内でのミクログリアにおける EBF3 ノックアウトの影響の解析を試みたが、タモキシフェン投与によるミクログリアでの EBF3 ノックアウトの効率が不安定であることから、同系統での実験の継続は困難と判断した。そのため、新たにタモキシフェン誘導型ではない Cre リコンビナーゼを導入した CX3CR1-Cre マウスを入手し、新たにコンディショナルノックアウトマウスを作成した。前述のとおり、脊髄ミクログリアで EBF3 が高発現していることが明らかとなったため、コンディショナルノックアウトマウスにおいて脊髄ミクログリアに変化が認められるか、免疫組織化学染色を用い検討した。ミクログリアの形態、および密度についてコントロールマウスと比較したが、EBF3 ノックアウトによる明らかな変化は認められなかった(図3)。今後、炎症条件下における EBF3 の役割を解析するため、同マウスに EAE を誘導、臨床症状を観察するとともに、病理解析や炎症関連分子の発現解析を行うことで、さらにミクログリア、特に脊髄ミクログリアにおける EBF3 の役割の解明を目指す。

図1 EBF3ノックアウトによるミクログリアの消失

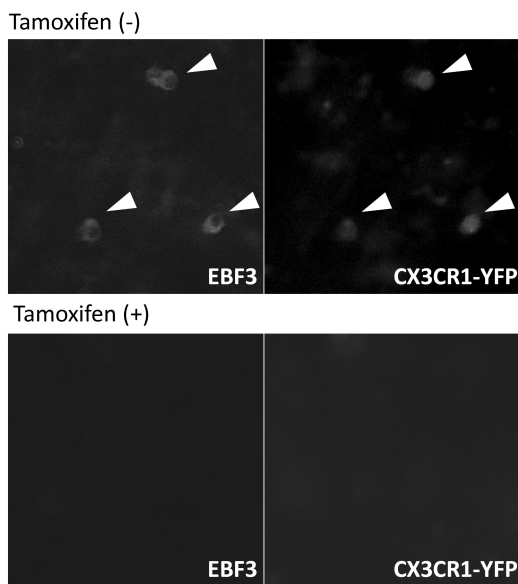


図2 脳、および脊髄におけるEBF3の発現

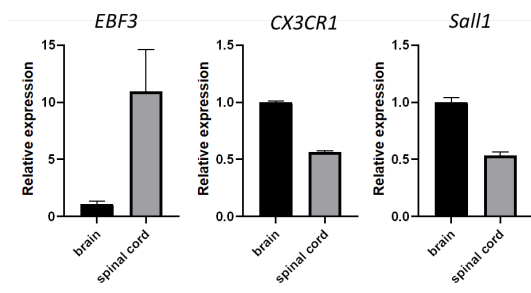
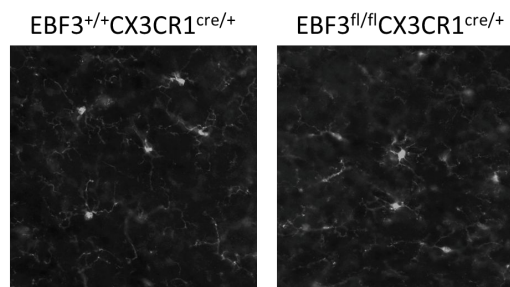


図3 脊髄でのミクログリアEBF3ノックアウトの影響



## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

Mizuno M, Noto D, Kaga N, Chiba A, Miyake S: The dual role of short fatty acid chains in the pathogenesis of autoimmune disease models. PLoS One 12: e0173032, 2017, 査読有り

Saika R, Sakuma H, Noto D, Yamaguchi S, Yamamura T, Miyake S: MicroRNA-101a regulates microglial morphology and inflammation. J Neuroinfla 14: 109, 2017, 査読有り

Igarashi A, Sakuma H, Hayashi M, Noto D, Miyake S, Okumura A, Shimizu T: Cytokine-induced differentiation of hematopoietic cells into microglia-like cells in vitro. Clin Exp Neuroimmunol 9: 139-149, 2018, 査読有り

### 〔学会発表〕(計10件)

Noto D, Chen T, Hoshino Y, Mizuno M, Miyake S. Short fatty acid chains suppress demyelination in vivo and in vitro. 14th International Congress of Neuroimmunology, Brisbane, Aug 27-31, 2018

Noto D, Hoshino Y, Chen T, Mizuno M, Miyake S: Gut microbiota and their metabolites affect cuprizone-induced demyelination. 第59回日本神経学会学術大会 札幌 5.25.2018

Nomura A, Noto D, Murayama G, Chiba A, Miyake S: Expansion of TLR7 expressing monocyte derived cells in imiquimod-induced Lupus model. 第47回日本免疫学会学術集会、福岡、12.11.2018

### 〔その他〕

ホームページ等

<https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/meneki/home.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。