

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14841

研究課題名（和文）脳の発生過程における免疫細胞の役割の解明

研究課題名（英文）The role of immune cells in the developing brain

研究代表者

森本 桂子（Morimoto, Keiko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：40815429

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）：神経系と免疫系は多様性・特異性を兼ね備えた特殊な仕組みであり、これらのクロストークが近年注目を集めている。本研究において、ミクログリアだけでなく、T細胞、B細胞などの獲得免疫系の細胞および顆粒球、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞といった自然免疫系の細胞が発生の比較的早い時期から脳に存在することが明らかになった。また獲得免疫の細胞の大脳皮質層形成における影響を検討したが明らかな異常は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成体脳だけでなく、発生期の脳においても種々の免疫細胞が存在しており、これらが協調して働き我々の精巧な中枢神経系の構築に関与している可能性が示された。今後、免疫細胞と神経細胞、グリア細胞との関係の観点からも脳発生の仕組みに迫っていくことで、将来的には自閉症や注意欠陥・多動性障害(ADHD)などの neurodevelopmental disorderやアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患、脳外傷などの治療法解明につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The central nervous system and the immune system are special mechanism with extraordinary specificity and diversity, and their crosstalk has attracted much attention. In this study, we found that not only microglia, but also acquired-immune cells such as B cells and T cells and innate immune cells such as granulocytes, dendritic cells, and natural killer cells were also invaded into the relatively early stage of the developing brain. We also examined the cortical layer formation using B and T lymphocytes deficient mice, however, we could not find significant difference between wild type and mutant mice.

研究分野：神経発生

キーワード：神経 免疫 発生

### 1. 研究開始当初の背景

神経系は限られた数の細胞が高度に秩序化された様式で統合されることで特異性と柔軟性を兼ね備えているが、その基本となる仕組みは胎生 (Embryonic Day: E) 期から生後 (Postnatal Day: P) 早期にかけて主に形成される。すなわち脳表面近くで生まれた神経細胞が脳表面へ向かって移動し、神経細胞の誕生時期に依存した inside-out 様式をとり、その後各層の神経細胞は各々異なった部位の神経から投射を受けシナプスを形成する。さらに神経活動依存的にシナプス刈り込みが起き髄鞘が形成されることで効率的な神経伝達回路が形成される(図 1)。

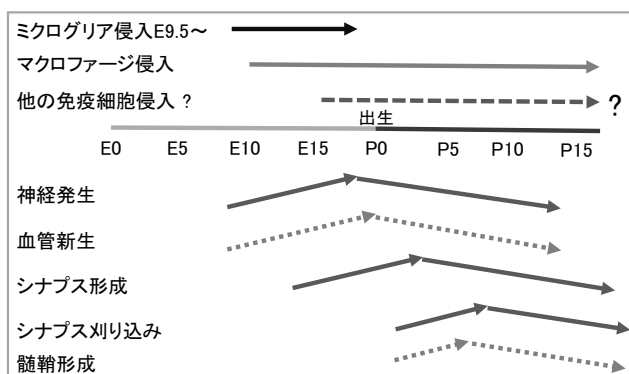


図1. マウス脳発生の過程

一方、免疫系は自然免疫系のマクロファージなどが初期の感染防御として非特異的に働くとともに、T細胞、B細胞といった獲得免疫系細胞が V(D)J 遺伝子再編成により各々が特異な抗原を認識できるようになることであらゆる異物に特異的に柔軟に対応できる仕組みを獲得している。ともに多様性/柔軟性を持つということから神経と免疫の関連は古くから注目され、共通して発現する分子は多々見つかっている。しかし発生の過程における相互作用に関しては、特殊な免疫細胞であるミクログリアが神経幹細胞を食食することによって神経細胞の数を制御していること、シナプスの刈り込みを行うことで緻密な神経回路形成に寄与している (Neuron. 74(4):691-705, 2012) といった報告に限られ、体内に多数存在する他の免疫細胞が脳発生の中枢神経系においてどこに局在しどのように機能しているかに関しては未解明である。

### 2. 研究の目的

本研究では「これまで脳の唯一の免疫細胞と言われてきたミクログリア」以外の免疫細胞、すなわち自然免疫系のマクロファージや獲得免疫において働く B 細胞、T 細胞などの神経発生、神経回路形成過程における役割を明らかにすることを目的とした。これまでに多発性硬化症やアルツハイマー病、脳梗塞などの病的状態において局所に好中球、マクロファージ、B 細胞、T 細胞などが侵入し、サイトカイン産生を介してアストロサイトやミクログリアの性質を変化させることにより、また神経への直接的な作用によりこれらの病的状態を正にも負にも制御していることが明らかになっている。また、定常状態においても T 細胞が認知機能に関与することが明らかにされつつある。しかし、脳形成期においてこれらの細胞がいつ頃から CNS に侵入しどのような機能を担っているかは未解明である。

申請者は脳形成期においても髄膜に B 細胞などの獲得免疫系細胞が存在することを見出しており、ともに多様性と柔軟性を兼ね備えた免疫系と神経系が発生の過程で如何に相互作用しているかが明らかになれば、進化の最高傑作と言われる我々の脳形成の仕組みに新しい観点から迫ることが可能と考えた。また新たな細胞群の脳形成における役割が明らかになれば、自閉症や注意欠陥・多動性障害(ADHD)などの neurodevelopmental disorder への新たな治療法につながると思われ、研究テーマとしての発案に至った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 発生期脳の免疫細胞プロファイリング

発生期脳に存在する免疫細胞の数・割合の変化を検討するために、胎生期から新生仔期のマウス脳をコラゲナーゼを用いてシングルセルに分離、Percoll 法で濃縮し、各種マーカー分子で染色を行いフローサイトメトリーにより解析を行なった。マーカーとしては既報 (Nat Neurosci. 20(9),1300-1309,2017) を参考に、ミクログリア (CD45<sup>int</sup>, CD11b<sup>+</sup>)、単球/マクロファージ (CD45<sup>hi</sup>, CD11b<sup>+</sup>)、B 細胞 (CD45<sup>hi</sup>, CD19<sup>+</sup>)、CD4<sup>+</sup> T 細胞 (CD45<sup>hi</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>)、CD8<sup>+</sup> T 細胞 (CD45<sup>hi</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>)、好中球 (CD11b<sup>+</sup>, Gr-1<sup>+</sup>)、ナチュラルキラー細胞 (CD45<sup>hi</sup>, NK1.1<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>)、ナチュラルキラー T 細胞 (CD45<sup>hi</sup>, NK1.1<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>)、Type A 樹状細胞 (CD11c<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>)、Type B 樹状細胞 (CD11c<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>) を用いた。

#### (2) 発生期脳における免疫細胞の分布

4%PFA で固定した凍結切片またはアセトン固定切片を用いて免疫組織染色を行い、免疫細胞の分布を確認した。さらに、脳実質に存在する免疫細胞が少ないため免疫染色で得られたシグナルが本当のシグナルであるか確定するために胎生 13 日のマウス肝臓に全身の全ての細胞が光る

Green マウス（胎生 13 日）の肝臓から回収した細胞（造血幹細胞を多量に含む）を移入しこれらの細胞が脳実質に侵入するかを検討した。

### (3) 獲得免疫系の細胞の脳皮質形成における役割の解明

獲得免疫系の B 細胞、T 細胞の脳皮質形成における役割を明らかにするために B 細胞、T 細胞の欠損した *Rag2* KO マウスを用いて、脳皮質層形成や神経細胞の移動を免疫組織染色や子宮内胎仔電気穿孔法を用いて評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 発生期脳の免疫細胞プロファイリング

胎生期から新生仔期まで同一のプロトコールで脳からの免疫細胞の回収を行うことで脳発生期における脳内免疫細胞のプロファイルが明らかになった。胎生 15 日において、数は少ないものの検索したすべての種類の免疫細胞が脳に存在すること、また出生後その数が急増することが明らかになった。獲得免疫系の細胞に関しては T 細胞に比べて B 細胞の方が発生期脳には多く存在しており、自然免疫系の細胞では好中球、単球/マクロファージが胎生 17 日から生後 0 日にかけて 5 倍以上増加していた。また樹状細胞も胎生 17 日から生後 0 日、生後 0 日から生後 7 日にかけてそれぞれ 10 倍以上増加することが明らかになった。脳における免疫細胞の中での割合としては成体での報告と大差なく約 80%前後をミクログリアが占めていることが明らかになった。

さらに、出生前後における免疫細胞の急激な増加の原因として、産道を通ることによる物理的ストレスが影響を与える可能性を考え、帝王切開で娩出した仔と経膈分娩で生まれた仔を比較したが、明らかな免疫細胞の数や割合の違いは認めなかった。このことからマウスにおいては物理的刺激ではなく、自発呼吸や哺乳が始まること、全身からの様々な刺激が中枢神経系に伝達されるなど他の様々な原因により免疫細胞プロファイルの変化が引き起こされる可能性が考えられた。

### (2) 発生期脳における免疫細胞の分布

免疫組織染色により発生期脳においても確かに髄膜に B 細胞や T 細胞といった免疫細胞が存在することが確認された

(図 2)。しかし、脳実質におけるシグナルは弱く、特異的な蛍光シグナルであるのか判別しにくいいため、胎生 13 日の Green マウスの肝臓の細胞（造血幹細胞を多く含む）を同じ

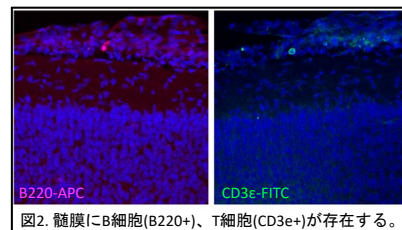


図2. 髄膜にB細胞(B220+)、T細胞(CD3e+)が存在する。

時期の胎仔の腹腔に glass capillary を用いて子宮壁越しに投与し、緑色の蛍光を持つ細胞が脳実質に移行するかを確認した。その結果、腹腔に投与した細胞は確かに脳に移行していることが確認され、脳に存在するものは CD45 陽性の血球系の細胞であることが確認された。また髄膜や脈絡叢だけでなく、脳実質内にも免疫細胞が存在することが明らかになった(図 3)。神経細胞と免疫細胞の直接の接触を介した作用を想定するには免疫細胞の数が少ないように思われるが、免疫細胞から局所に分泌される因子を介して神経発生やシナプス形成などに影響を与えている可能性は十分あると考えられた。

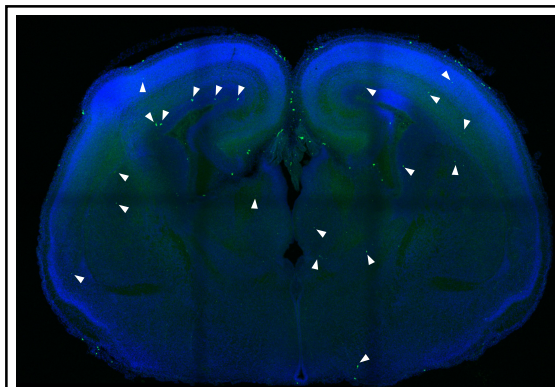


図3. 脳実質に緑色で標識された免疫細胞が存在する。(胎生17.5日)

### (3) 獲得免疫系の細胞の脳皮質形成における役割の解明

B 細胞、T 細胞の欠損した *Rag2* KO マウスを用いて脳皮質層形成への影響を調べるために、upper layer のマーカーとして *Cux1*、deep layer のマーカーとして *Ctip2* を用いて免疫組織染色で調べたが明らかな層形成の違いは認めなかった。また somatostatin, parvalbumin, reelin といった interneuron marker の発現に関しても明らかな差は認めなかった。また子宮内胎仔電気穿孔法を用いて胎生 14.5 日生まれの神経細胞を蛍光標識し胎生 18.5 日で評価したが、明らかな移動の異常は認めなかった。このことから獲得免疫系の細胞の欠損により脳皮質の大きな構造的変化は認めないことが明らかになった。今後、シナプス形成など微細な構造についても評価していく必要があると考えられる。

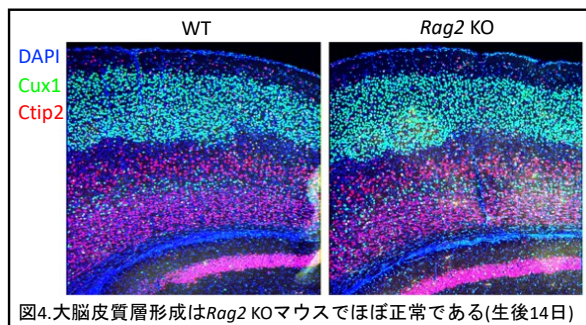


図4. 脳皮質層形成は *Rag2* KO マウスでほぼ正常である(生後14日)

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 1件）

1. 著者名 Keiko Morimoto and Kazunori Nakajima	4. 巻 13
2. 論文標題 Role of the Immune System in the Development of the Central Nervous System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2019.00916	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

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

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
---------	---------