

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15003

研究課題名(和文)胎生期ミクログリアの時期依存的な分布変化・動態と機能発揮の関係性

研究課題名(英文)Spatiotemporal control of microglial distribution in the developing cerebral cortex and its biological significance

研究代表者

服部 祐季(Hattori, Yuki)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：10754955

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)：胎生期大脳においてミクログリアは胎齢の進行に伴い分布を変化させる。すなわち、胎生早期や後期では大脳実質全体にほぼ均一に存在しているが、胎生中期の胎生15-16日目において皮質板から不在となる。本課題では、このようなミクログリアの分布変化の分子機構と、皮質板から一過性に不在となる意義について明らかにすべく研究を推進した。ミクログリアはCXCL12/CXCR4の相互作用を利用して胎生中期の皮質板から不在となり、ニューロンの適切な成熟進行を妨げないように自身の居場所を調節していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、正常脳におけるミクログリアの動態や神経系細胞との関わり合いについて理解が深まった。胎生期のみならず生後にわたる脳形成・成熟メカニズムの包括的な理解に貢献すると考えられる。一方で、母体の過剰な免疫活性化(感染症、肥満・低栄養状態)が、胎児の統合失調症、自閉症、ADHD等の発症リスクを高めることが報告されており、近年社会的にも母体炎症による胎児脳発生への影響について関心が高まっている。そこで発展的展望として、母体炎症に起因する脳発生の異常を未然に防ぐための予防法や治療法の画策など社会的ニーズに応じた研究展開も考えていきたい。

研究成果の概要(英文)：Microglia change their distribution in a stage-dependent manner in the embryonic cerebral cortex. In mice, intrapallial microglial distribution is initially homogenous until embryonic day (E) 14, but these cells temporarily disappear from the cortical plate (CP) from E15 to E16. However, the mechanism and significance of this absence are unknown. We demonstrated that microglia bidirectionally migrate via attraction by CXCL12 released from the meninges and SVZ, and thereby exit the midembryonic CP. In addition, postmigratory neurons exposed to excessive microglia showed the disturbed expression pattern of genes implicated in functional neuronal maturation. Notably, this effect is primarily attributed to interleukin 6 and type I interferon secreted by microglia. These results suggest that "sanctuarization" from microglia in the midembryonic CP is required for neurons to appropriately fine-tune the expression of molecules needed for proper differentiation.

研究分野：神経科学

キーワード：ミクログリア ニューロン 脳発生 ライブイメージング CXCL12 CXCR4 大脳

### 1. 研究開始当初の背景

生後や成体脳におけるミクログリアの機能については、異物や死細胞を貪食して除去することにより脳内の環境を整備する [1] ことや、神経回路が適切に構築されるように監視する [2] などが知られる。一方で、胎生期における役割や存在意義についてはまだ不明な点が多い。

胎生期の脳の発生は、神経系細胞の産生や分化に伴う移動が緻密に制御されて進行する。脳構成細胞のうち神経系細胞が大部分を占めるが、ミクログリアも胎生早期から存在する。ミクログリアは少数 (約 1%) ながらも細胞突起を遠くへ伸ばして周辺の多数の神経系細胞と接することができる。過去の研究により、ミクログリアが神経幹細胞から中間前駆細胞への分化を促進し、脳実質内を広範囲に動くことでその機能を効率的に果たすことを明らかにした [3]。加えて、海外の研究グループの研究成果により、ミクログリアが貪食により神経系中間前駆細胞の数を調節していること [4] や、介在ニューロンの配置にも貢献していること [5] がわかってきている。

### 2. 研究の目的

興味深いことに、ミクログリアは胎齢の進行に伴い脳実質内での分布を変化させることが知られている。すなわち、マウス E14 までは脳室側から髄膜側にわたって脳実質全体に均一に存在しているが、E15 から E16 において皮質板 (分化を遂げたニューロンが積み重なる領域) から不在となる。そして、E17 になると再び皮質板に分布する (図 1)。ミクログリアが本来存在する場所 (脳室帯、脳室下帯、中間帯) における機能は、上述のようなことが明らかとなってきた一方、胎生中期に皮質板から一時的に不在となるしくみや意義はこれまで問われていなかった。そこで本研究では、マウス胎生期の脳実質におけるミクログリアの分布変化のメカニズムと、胎生中期皮質板からの一過性離脱の生理学的意義について明らかにすることを目指した。

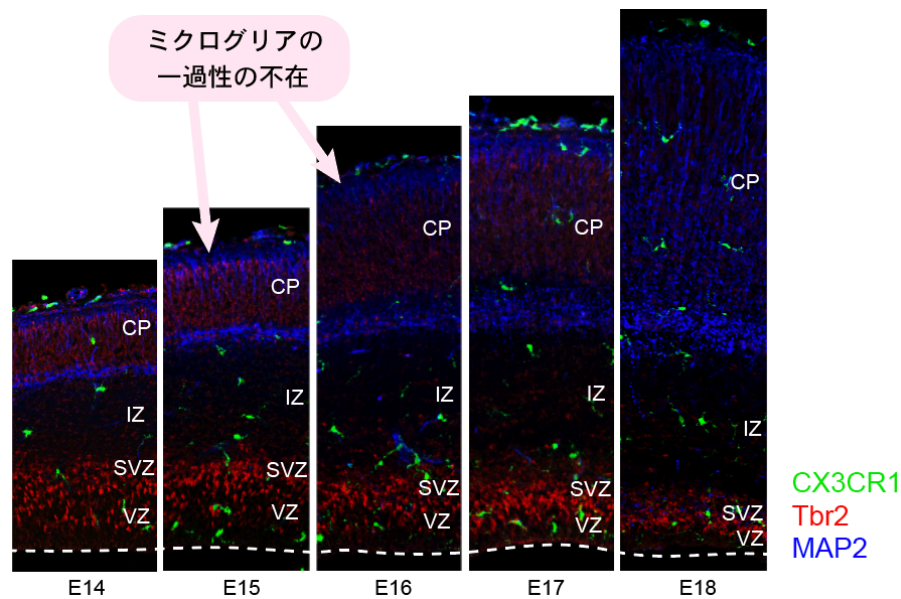


図 1. マウス胎生期脳におけるミクログリアの分布変化

各胎齢の脳実質における CX3CR1 (ミクログリア)、Tbr2 (神経系中間前駆細胞)、MAP2 (成熟ニューロン) の免疫染色画像。ミクログリアは E15 から E16 において皮質板から一過性に不在となる。

CP : cortical plate 皮質板、IZ : intermediate zone 中間帯、SVZ : subventricular zone 脳室下帯、VZ : ventricular zone 脳室帯。スケールバー : 100  $\mu$ m。

### 3. 研究の方法

ミクログリアが皮質板から不在となる現象を理解するため、ミクログリア可視化 CX3CR1-GFP マウスの脳スライス培養下ライブイメージングを行った。その結果、ミクログリアは E14 で最も活発に動き、脳実質内を両方向に移動する傾向を見出した。ミクログリアの移動に関わる分子候補として CXCL12/CXCR4 を同定し、*Cxcr4*<sup>-/-</sup>マウスを用いたライブイメージングおよび組織学的解析を通じて、CXCL12/CXCR4 の相互作用がミクログリアの移動や分布に関わる可能性について検証した。次に、ミクログリアが胎生中期皮質板から離脱する意義を問うため、この時期にミクログリアを皮質板内に強制的に配置させることを試みた。例えば、脳スライスの髄膜側に CXCL12 ビーズを配置する方法、単離したミクログリアを直接皮質板に移植する方法、*in vivo* で皮質板へと移動を終えたニューロン特異的に CXCL12 を過剰発現させミクログリアを誘引す

る方法を選択した。ミクログリア近傍のニューロンへの影響を組織学的に解析した結果、ニューロンの機能成熟に関わる重要な遺伝子群の発現に乱れが生じていることを見出した。さらに、ミクログリアと共培養したニューロンについて RNA シークエンス解析を行い、ニューロンの成熟を乱すミクログリア由来分子を探索した。その結果、1 型インターフェロン (IFN-I) とインターロイキン 6 (IL-6) が候補として浮上した為、上述の *in vivo* でミクログリアを強制的に皮質板へと誘引する方法と、候補分子に対する中和抗体の脳室投与を組み合わせ、その分子の関与について検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ミクログリアは大脳実質内を両方向に移動し皮質板から不在となる

はじめに、ミクログリアが皮質板から不在となる現象を理解するために、ミクログリア可視化マウスである CX3CR1-GFP マウスを用いて、脳スライス培養下ライブイメージングによりミクログリアの動態を経時的に観察した。E14 のライブイメージングを行った結果、まず脳壁外側である皮質板内のミクログリアは、髄膜方向へと進み辺縁帯へと集積する傾向があることを見出した (図 2)。

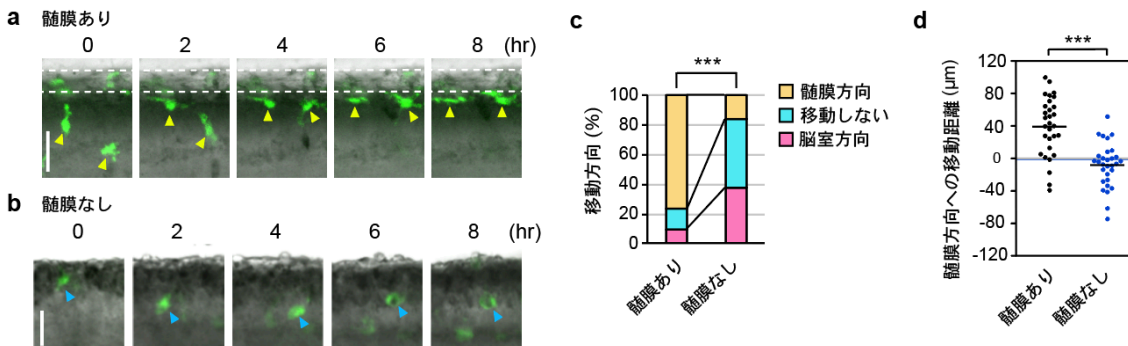


図 2. 皮質板内のミクログリアは髄膜に向かって移動し辺縁帯に集積する

- 脳スライス培養下ライブ観察による 8 時間タイムラプス画像で、皮質板領域を示す。皮質板内のミクログリアが髄膜方向へと移動し、辺縁帯に集積する様子を捉えている。白点線領域：髄膜。スケールバー：50 μm。
- 髄膜を剥いだ場合の 8 時間タイムラプス画像。移動できずにその場にとどまるミクログリアが示されている。スケールバー：50 μm。
- 髄膜ありとなしの条件で培養した場合のミクログリアの移動方向の割合を比較したグラフ (Pearson's chi-squared test;  $P = 2.2 \times 10^{-16}$ )。
- 観察前 ( $t = 0$  hr) と後 ( $t = 8$  hr) の差を移動距離として算出し、髄膜ありとなしの条件で比較したグラフ (Mann-Whitney U test;  $P = 5.1 \times 10^{-7}$ )。

一方、脳壁内側 (脳室帯、脳室下帯、中間帯) でのミクログリアの動態観察を行ったところ、皮質板内ミクログリアとは逆に、脳室方向に向かって移動する傾向が認められた (図 3)。

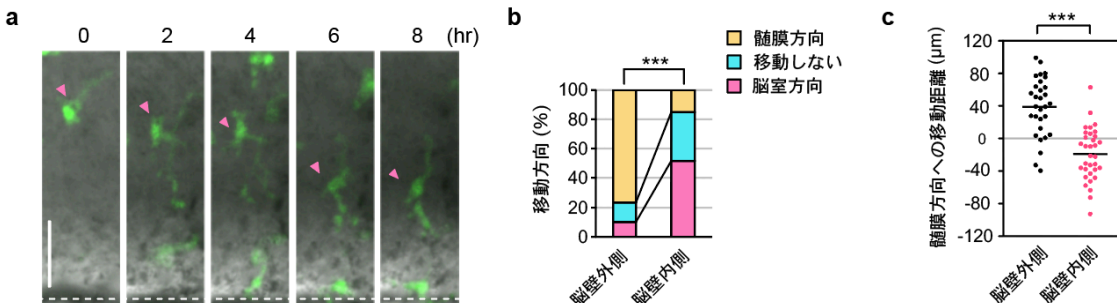


図 3. 大脳実質内側のミクログリアは脳室方向に向かって移動する

- 脳スライス培養下ライブ観察による 8 時間タイムラプス画像で、大脳実質内側領域を示す。ミクログリアが脳室方向へと向かって移動する様子が観察される。白線領域：脳室面。スケールバー：50 μm。
- 脳壁外側 (皮質板) と内側 (脳室帯、脳室下帯、中間帯) のミクログリアの移動方向の割合を比較したグラフ (Pearson's chi-squared test;  $P = 2.2 \times 10^{-16}$ )。
- 観察前 ( $t = 0$  hr) と後 ( $t = 8$  hr) の差を移動距離として算出し、脳壁外側と内側のミクログリアの移動距離を比較したグラフ (Mann-Whitney U test;  $P = 3.1 \times 10^{-8}$ )。



## (2) ミクログリアは CXCL12/CXCR4 を介して移動する

次に、ミクログリアの髄膜方向あるいは脳室方向への移動を制御する分子を探索した。ケモカインの一種である CXCL12 が E14 の大脳において髄膜と脳室下帯で特異的に産生されることに着目した (図 4a)。一方、ミクログリアは CXCL12 の受容体である CXCR4 を発現することから、ミクログリアの移動を促すシステムとして CXCL12/CXCR4 を候補として考え検証した。CX3CR1-GFP<sup>+/+</sup>:Cxcr4<sup>-/-</sup> マウス胎仔のライブ観察を行ったところ、Cxcr4<sup>+/+</sup> 野生型マウスで認められた両方向性の移動傾向がなくなり、移動できずにその場にとどまるミクログリアの割合が増加した。この結果から、髄膜や脳室下帯が産生する CXCL12 をミクログリアが CXCR4 を介して感知し、その産生源に向かって脳実質内を両方向に移動した結果、皮質板から不在となることが示唆された (図 4b, c)。

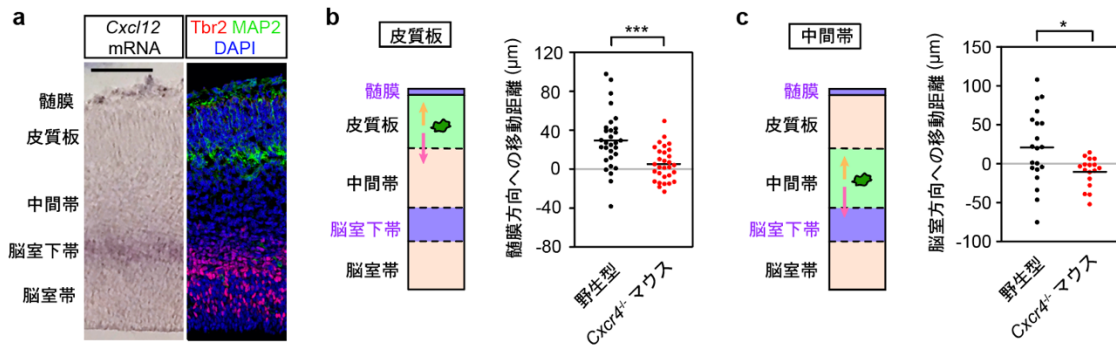


図 4. ミクログリアは CXCL12/CXCR4 依存的に脳壁内を両方向に移動する

- a) E14 大脳実質における *in situ* hybridization による *Cxcl12* の mRNA 発現 (左) と隣接切片の Tbr2/MAP2/DAPI の免疫染色画像 (右)。スケールバー: 100 μm。  
b) 皮質板に局在するミクログリアの髄膜方向への移動距離について、野生型マウスと *Cxcr4*<sup>-/-</sup> マウスで比較した (Mann-Whitney U test;  $P = 1.5 \times 10^{-4}$ )。  
c) 中間帯に局在するミクログリアの脳室方向への移動距離について、野生型マウスと *Cxcr4*<sup>-/-</sup> マウスで比較した (Mann-Whitney U test;  $P = 0.017$ )。

## (3) 人工的な皮質板へのミクログリア誘引によるニューロンへの影響の解析

次に、ミクログリアが胎生中期に皮質板から一時的に抜け出すことが脳発生過程でどのような意味をなすのか調べることにした。「ミクログリアの皮質板からの不在がニューロン成熟の適切な進行に必要なのではないか」との仮説を立て、その検証のために、ミクログリアを人工的に皮質板へと配置させ、ニューロンへの影響の有無を調べることにした。皮質板内のニューロンが特異的に CXCL12 を発現する遺伝子導入システムの利用や、脳から別途集めてきたミクログリアを皮質板に直接移植するなどの方法を用いて、ミクログリアを皮質板へと強制的に誘引したところ、ミクログリア近傍のニューロンにおいて、将来の機能・性質を決める重要な分子群の発現パターンに乱れが生じた。すなわち、II~IV 層ニューロンのマーカーである *Satb2* や *Cux1* 等の発現が異常に高まり、逆に *Ctip2* 等の V 層ニューロンのマーカーは発現が低下していた。一般的に、ニューロンの運命は脳室帯や脳室下帯に存在する頃の神経前駆細胞の時点である程度決まる [6] ことが知られるが、まだ完全には決まっておらず最終的な調節を皮質板に移動し終えた後で受けるとの報告がある [7]。したがって、上述の結果は、過剰なミクログリアによってニューロンの成熟プロセスが乱れることを意味し、脳づくりの進行にはミクログリアが適切なタイミングで皮質板から退出する必要がある可能性が示唆された。

## (4) ミクログリア由来の IFN-I と IL-6 がニューロン成熟ステップを乱す

さらに、ニューロンにおける遺伝子発現パターンの変化をきたすミクログリア由来分子の探索を行った。培養下で用意した皮質板を構成するニューロンを、ミクログリア存在下、および、非存在下で培養した後、ニューロンのみから全遺伝子を回収し RNA シークエンス解析を実施した。両群の遺伝子発現を比較したところ、ミクログリアと共培養したニューロンにおいて、サイトカインの 1 型インターフェロン (IFN-I) とインターロイキン 6 (IL-6) によって活性化される細胞内シグナル経路に関連する分子群の発現が高まっていることが確認された。この結果に基づき、IFN-I と IL-6 が関与する可能性を検証する為、皮質板内のニューロンが特異的に CXCL12 を発現する遺伝子導入システムと、これらの分子に対する中和抗体の脳室投与を組み合わせ、生体レベルで解析を行った。その結果、中和抗体投与条件では、ミクログリアによるニューロンの性質変化が抑えられたことから、ミクログリアから産生される IFN-I と IL-6 がニューロンの運命決定に関わる分子群の発現変化を促す要因であることが示唆された (図 5)。

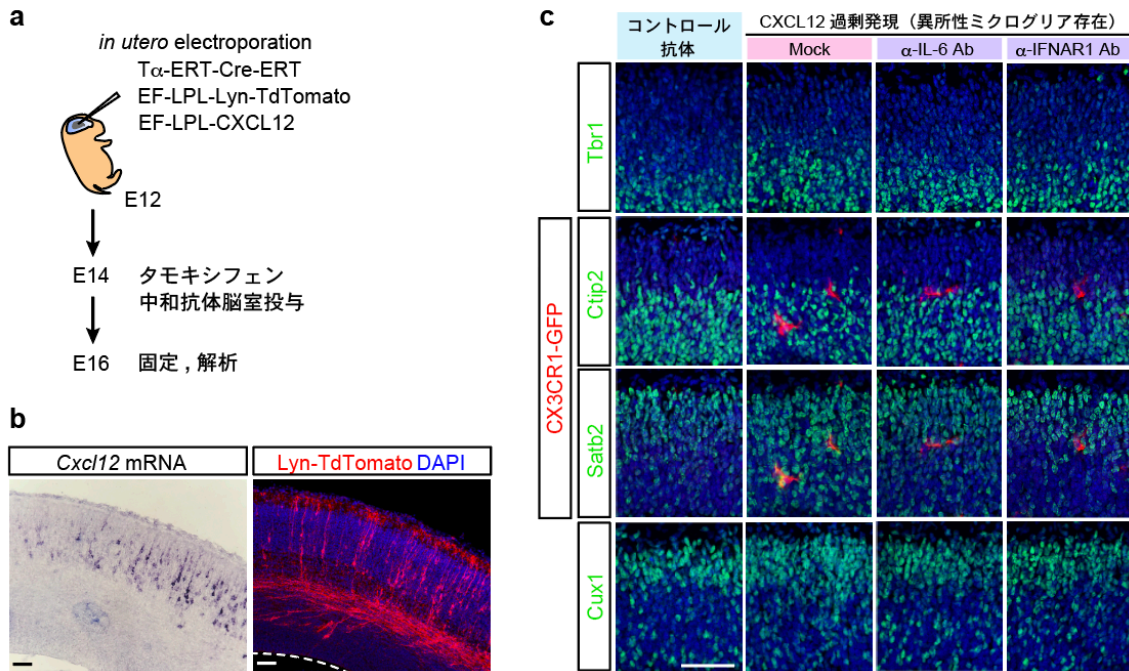


図 5. IFN-I または IL-6 に対する中和抗体の脳室投与により、異所性ミクログリアによるニューロンへの影響が緩和された

a) *in utero* electroporation による皮質板へと移動を終えたニューロン特異的に CXCL12 を過剰発現させるシステムのタイムスケジュールを示す。E12 で遺伝子導入、E14 でタモキシフェン投与、E16 で脳を固定し、組織学的解析を行った。

b) E16 大脳実質における *in situ* hybridization による *Cxcl12* の mRNA 発現 (左) と隣接切片の RFP (Lyn-TdTomato) の発現領域を検知) の免疫染色画像 (右)。スケールバー: 50  $\mu$ m。

c) a による実験で固定した E16 脳切片の免疫染色写真。CX3CR1 (red)、Tbr1/Ctip2/Satb2/Cux1 (green)、DAPI (blue)。スケールバー: 50  $\mu$ m。

尚、本研究成果は、2020 年 4 月 2 日付、Nature Communications 誌に掲載された。

発表雑誌: Hattori Y et al. Transient microglial absence assists postmigratory cortical neurons in proper differentiation. *Nat. Commun.* **11**, 1631 (2020).

#### <引用文献>

- 1) Matcovitch-Natan O et al. Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science* **353**, aad8670 (2016). DOI: 10.1126/science.aad8670
- 2) Wake H et al. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J. Neurosci.* **29**, 3974–3980 (2009). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009
- 3) Hattori Y and Miyata T. Microglia extensively survey the developing cortex via the CXCL12/CXCR4 system to help neural progenitors to acquire differentiated properties. *Genes Cells* **23**, 915–922 (2018). DOI: 10.1111/gtc.12632
- 4) Cunningham CL et al. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* **33**, 4216–4233 (2013). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3441-12.2013
- 5) Squarzoni P et al. Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. *Cell Rep.* **8**, 1271–1279 (2014). DOI: 10.1016/j.celrep.2014.07.042
- 6) Molyneaux BJ et al. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 427–437 (2007). DOI: 10.1038/nrn2151
- 7) Kwan KY et al. SOX5 postmitotically regulates migration, postmigratory differentiation, and projections of subplate and deep-layer neocortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 16021–16026 (2008). DOI: 10.1073/pnas.0806791105

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hattori Y, Naito Y, Tsugawa Y, Nonaka S, Wake H, Nagasawa T, Kawaguchi A, Miyata T	4. 巻 11, 1631
2. 論文標題 Transient microglial absence assists postmigratory cortical neurons in proper differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-020-15409-3	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 -

1. 著者名 Ryotaro Kawasoe, Tomoyasu Shinoda, Yuki Hattori, Mami Nakagawa, Trung Quang Pham, Yoshihiro Tanaka, Ken Sagou, Kanako Saito, Satoru Katsuki, Tomomi Kotani, Akihito Sano, Toshihiko Fujimori, Takaki Miyata	4. 巻 62(2)
2. 論文標題 Two-photon microscopic observation of cell-production dynamics in the developing mammalian neocortex in utero	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development, Growth and Differentiation	6. 最初と最後の頁 118-128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12648	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 -

1. 著者名 Hattori Y, Miyata T	4. 巻 5(6)
2. 論文標題 Embryonic neocortical microglia express Toll-like receptor 9 and respond to plasmid DNA injected into the ventricle: technical considerations regarding microglial distribution in electroporated brain walls	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eNeuro	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） 10.1523/ENEURO.0312-18.2018	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 -

1. 著者名 Hattori Y, Miyata T	4. 巻 23(10)
2. 論文標題 Microglia extensively survey the developing cortex via the CXCL12/CXCR4 system to help neural progenitors to acquire differentiated properties	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 915-922
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12632	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13件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 胎生期大脳におけるミクログリア分布の時空間的制御とその生理学的意義
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 胎生期大脳におけるミクログリア分布の時空間的制御とその生理学的意義
3. 学会等名 第10回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 Microglial dynamics and its contribution to neurogenesis in mouse embryonic cerebral cortex
3. 学会等名 第2回CIBoGリトリート
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 胎生期大脳におけるミクログリア動態とニューロン産生への貢献
3. 学会等名 第14回神経発生討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 胎生期大脳におけるミクログリア動態とニューロン産生への貢献
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 大会企画シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 胎生期大脳におけるミクログリア分布の時空間的制御とその生理学的意義
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 日本解剖学会奨励賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服部祐季、内藤裕、川口綾乃、宮田卓樹
2. 発表標題 大脳原基皮質板におけるニューロン個性化完遂にはミクログリアの一時退出が必要である
3. 学会等名 NEURO2019（第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Hattori
2. 発表標題 Transient absence of microglia underlies proper differentiation of the cortical plate
3. 学会等名 German-Japanese Developmental Neuroscience Meeting 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 服部 祐季、内藤 裕、宮田 卓樹
2. 発表標題 胎生中期皮質板からのミクログリアの一時的な抜け出しは、ニューロンの適切な個性化獲得に必要である
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Hattori
2. 発表標題 Spatiotemporally controlled microglial absence is required for cortical neuron subtype specification
3. 学会等名 第12回神経発生討論会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部 祐季、内藤 裕、宮田 卓樹
2. 発表標題 Spatiotemporally controlled microglial absence is required for cortical neuron subtype specification
3. 学会等名 第11回NAGOYAグローバルリトリート
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部 祐季、宮田 卓樹
2. 発表標題 Spatiotemporally controlled microglial absence is required for cortical neuron subtype specification
3. 学会等名 第8回生理学研究所・名古屋大学大学院医学系研究科合同シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 服部 祐季、内藤 裕、宮田 卓樹
2. 発表標題 胎生期大脳におけるCXCL12/CXCR4を介したミクログリアの局在変化は神経前駆細胞の分化状態とニューロンの個性化を調節する
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

神経化学トピックス 胎生期大脳におけるミクログリアの分布調節機構とその意義  
<https://www.neurochemistry.jp/mu0czb0qu-15/>  
 プレスリリース「胎児の脳の不思議！～脳づくりが適切に進むよう、あえて"離れて見守る"ミクログリア～」  
[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_J/research/pdf/Nat\\_Com\\_200402.pdf](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/research/pdf/Nat_Com_200402.pdf)  
 脳内へのDNA注入により、免疫系細胞ミクログリアが異常な分布を示すことを発見  
<https://research-er.jp/articles/view/75356>  
 IUE法による脳内への遺伝子導入でミクログリアが異常分布を示すことを発見 - 名大  
<http://www.qlifepro.com/news/20181121/microglia-abnormally-distributed-by-gene-transfer.html>  
 eNeuro Blog Editor's picks  
<http://blog.eneuro.org/2019/01/editors-pick-1-jan>

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