

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H01024

研究課題名（和文）ミクログリアの時空的転写制御変容による脳恒常性機能低下機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of brain homeostasis dysfunction by spatiotemporal transcriptional dysregulation of microglia.

研究代表者

榑木 俊聡 (Ohteki, Toshiaki)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：50233200

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、転写性エンハンサー（transcribed enhancer, TE）を高塩基解像度で計測可能なNET-CAGE法を用いて、老化およびアルツハイマー病（Alzheimer's disease, AD）発症に伴うミクログリアの転写制御変容機構を解明することを目的として研究を推進した。その結果、約44,000領域のミクログリアTEの同定に成功、そのうち半数以上は新規TEであり、ライフステージの進行やAD発症に伴いダイナミックに変動していることが明らかになった。また、ミクログリアは、老化とAD発症において異なるTEランドスケープを獲得して、各々独自の細胞機能を発揮していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来法ではTEだけでなくpoised enhancerも検出されてしまうため、TEの識別が困難であったが、NET-CAGE法を用いることで真のミクログリアTE（機能的エンハンサー）の検出が可能になった。また、ミクログリアにおける老化やAD特異的TE並びに両者に共通するTEの同定は、それらの近傍制御遺伝子情報と統合することによって、より正確な病態理解につながると考えられた。さらに、同定したマウスミクログリアTEを、既存の高齢者やAD患者ミクログリアのATAC-seqデータと比較解析することで、種間の共通点や独自性を明らかにすることができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we used the NET-CAGE method to measure transcribed enhancers (TE) at high nucleotide resolution to elucidate the mechanisms of microglial transcriptional regulation and alteration associated with aging and the development of Alzheimer's disease (AD). As a result, we succeeded in identifying approximately 44,000 microglial TEs, more than half of which are new TEs, and revealed that they dynamically change with life stage progression and the onset of AD. In addition, microglia acquired different TE landscapes in aging and AD pathogenesis, each exhibiting unique cellular functions.

研究分野：免疫学、組織幹細胞学

キーワード：ミクログリア 老化 アルツハイマー病 転写性エンハンサー NET-CAGE

1. 研究開始当初の背景

脳のマクロファージであるミクログリアは、卵黄嚢血島から産生された原始マクロファージに由来する。原始マクロファージは、胎生9日 (E9.0) 頃に卵黄嚢で検出され、その後血流を介して脳へ移行してミクログリアに分化する (Immunity 2016, 44:439)。ミクログリアは自己複製能に優れ、長寿命で生涯維持されると考えられている (Nat Immunol 2016, 17:797)。

一方、ミクログリアの機能は生涯を通じて均一ではない。若齢期野生型マウスのミクログリアは、神経栄養因子 BDNF を産生して神経細胞の増殖や生存を促し、過剰なシナプスを刈り込み、死んだ神経細胞やアミロイドの処理等を通じて恒常性を維持している。ところが、加齢に伴い、ミクログリアは炎症形質に変化して正常な神経細胞やシナプスを破壊、BDNF 産生や貪食能が低下するため、神経細胞の減少やアミロイドプラーク形成が促され、脳機能が徐々に低下していく (Immunity 2017, 46:943; Nature 2013, 497:211)。従って、ミクログリアの加齢性機能変化は転写制御変容によると考えられ、これが脳機能の低下を誘導、個体老化に至ることを示唆している。しかしながら老化に伴うミクログリアの炎症形質転換に関する転写制御変容は不明であった。

2. 研究の目的

エンハンサー領域の活性化は細胞機能変化に先立って最も初期に起こるイベントであり (Science 2014, 345:943)、同じ標的遺伝子でも細胞種ごとに時空特異的に異なる転写性エンハンサー (transcribed enhancer, TE) によって誘導される (Nat Rev Cancer 2016, 16:483)。疾患関連 SNPs の大多数がエンハンサー領域に集中していることも報告されている (Cell 2013, 155:934)。従って、ミクログリア特異的 TE が同定できれば、脳機能維持ならびに老化や認知症に伴う脳機能低下のメカニズムの解明、さらにはミクログリアを基軸とした制御法開発に繋がりが得る。従来、エンハンサー解析は、ChIP-seq によりヒストンのメチル化やアセチル化を指標にして行われてきた。しかしながら、この方法では TE だけでなく poised enhancer も検出されてしまうため、両者を識別して TE のみを検出できる技術が必要であった。この問題点を克服したのが村川泰裕博士 (研究分担者) の開発した NET-CAGE 法である (Nat Genet 2019, 51:1369)。

本研究では、①TE を高塩基解像度で計測可能な新技術 NET-CAGE 法を用いて、さまざまなライフステージの野生型マウス及びアルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) モデルマウスのミクログリア TE を同定すること、②老化野生型マウスと AD 発症モデルマウスのミクログリアに共通する TE、それぞれ固有の TE 及び制御遺伝子を明らかにすること、③②で同定した TE の機能発現に関する転写因子を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス

1週齢、8-11週齢、24週齢、1年齢、1.5年齢、2年齢のC57/BL6Nマウス (三協ラボ)、24週齢 C57/BL6-*App*^{M-G-F}マウス (理研BRC、筑波) (Nat Neurosci 2014, 17:661) を実験に供した。すべての実験は東京医科歯科大学実験動物委員会の定める規則に従って行われた。

(2) ミクログリアの回収

マウスから脳を単離し、Collagenase (Sigma-Aldrich:Cat#1010357800) 及び DNaseI (Roche) を含む酵素溶液中で細切、37° C で 30 分間処理後、100 μ m cell strainer にて夾雑物を除去した。遠心後、30% 及び 70% Percoll™ (GE Health Care) を用いてミクログリアを含む層を分離・回収した。さらに BD FACSAria III を用いて、CD45^{int}CD11b⁺CX3CR1⁺CCR2⁻分画をミクログリアとして単離・回収後、液体窒素により急速凍結し-80°Cで保存した。

(3) TE 解析および網羅的遺伝子発現解析

TE 解析は NET-CAGE 法を、網羅的遺伝子発現解析は CAGE 法を用いた。Total RNA および nascent RNA 抽出、ライブラリー作製からシークエンスまでの一連の解析は DNAFORM 社 (横浜) にて行った。ATAC-seq は村川博士 (分担研究者) の研究室で行なった。また、既存の ATAC-seq データである、ミクログリアおよび他組織マクロファージ (GSE63338) とグリア細胞・神経細胞 (GSE111586) を用いて組織特異性を検討した。

(4) GO 解析

Metascape version 3.5 (<http://metascape.org>) を用いて、選択された遺伝子における GO タームの濃縮を解析した。

(5) GSEA

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) は、GSEA software (ver4.3.2) および各種 Gene set を用いて行なった。

(6) 定量的PCR (qPCR)

RNeasy micro kit (Qiagen) を用いて、細胞から Total RNA を抽出し、5 x FastGene Scriptase II ReadyMix (FastGene) を用いて cDNA を合成した。qPCR は、LightCycler480 SYBR Green I Master Mix (Roche) および LightCycler 480 Machine (Roche) を用いて行い、発現量は、Hprt をハウスキーピング遺伝子として Δ Ct 値から算出した。

(7) 免疫組織染色

各種マウスから脳を採取し、4%PFA で 4 時間固定後、15%および30%スクロースで置換した。Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek Japan) を用いて組織を包埋後、CM3050S III、IV (Leica) にて薄切した。PBSで洗浄後、0.5% Triton X-100/PBSで膜透過処理を行い、5%BSA/PBSで2 時間ブロッキングした。anti-Iba1 Rabbit (FUJIFILM WAKO)、Rabbit IgG-UNLB (SouthernBiotech) で4°C、24時間1次抗体反応を行った。洗浄後、AF488 anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson) で4°C、2時間2次抗体反応を行った。再度洗浄液で洗浄後、DAPIで核染色を行った。PBSで洗浄し、Fluoromount-G (SouthernBiotech) で封入して風乾後、Leica Sp8で観察した。

(8) 統計解析

統計解析は、Microsoft ExcelまたはPrismソフトウェアバージョン3.02 (GraphPad) を用いて評価した。2群間比較の統計解析にはtwo-tailed Student's t-testを用いた。多群間比較は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Tukey-Kramer多重比較検定で行った。有意性の基準は、 $p < 0.05$ とした。すべての結果は、平均値 \pm 平均値の標準誤差 (SEM) で表示した。

4. 研究成果

(1) ライフステージの進行およびAD発症に伴うミクログリアの形態変化

新生児（1週間）、若齢（8週間）、老齢（1年齢、1.5年齢、2年齢）の野生型マウスと、AD発症後（6ヶ月齢）のADモデルマウス（C57BL/6-*App*^{M-G-F} mice）から脳組織を収集し、免疫蛍光染色にてミクログリアの形態変化を観察した。その結果、既報と一致して、老化およびAD発症に伴い、ミクログリアの形態は、ミファイド型からアメボイド型へ変化していた（図1）（*Immunity* 2017, 46943）。老化マウスミクログリアでは、老化マーカーである CD22（*Nature* 2019, 568:187）の発現も亢進していた（論文作製中）。

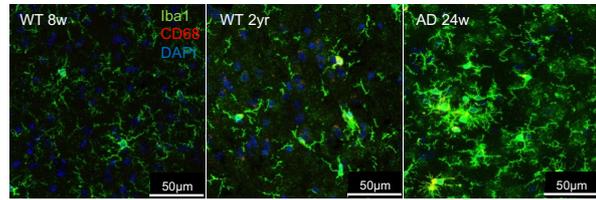


図1 老化およびAD発症に伴うミクログリアの形態変化

(2) ライフステージの進行およびAD発症に伴うミクログリア転写性エンハンサーの変化

さまざまなライフステージの野生型マウスおよびAD発症モデルマウス脳からミクログリアを単離精製して、NET-CAGE法を実施した結果、約44,000箇所の転写性エンハンサー（TE）領域を特定することに成功した。それらの半数以上は、既存のENCODE 3データベースで報告されていない新しいエンハンサー領域であった。また、NET-CAGEは高塩基解像度でeRNAを検出しており、ATAC-seqでは不可能な転写性エンハンサーと静止エンハンサーを区別することができた（図2）。さらに、得られたミクログリアエンハンサーカタログを用いて、実際に各週齢の転写性エンハンサー活性化レベルについて比較検討したところ、ミクログリアTEは、ライフステージの進行やAD発症に伴いダイナミックに変化することが明らかになった（論文作製中）。

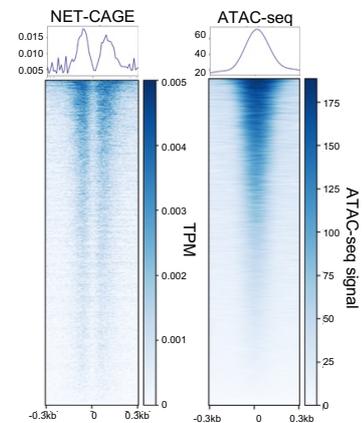


図2 NET-CAGE法によるミクログリアTEの検出

(3) 老化およびAD発症に伴うミクログリア転写性エンハンサーの変動

ミクログリアは老化に伴い、1257箇所のTEが（524箇所上昇、733箇所低下、 $p < 0.05$, $1 < FC$ ）、AD発症に伴い735個のTEが（153箇所上昇、582箇所低下、 $p < 0.05$, $1 < FC$ ）、各々変動していた（図3、未発表）。興味深いことに、90%以上のTEが老化またはAD発症特異的に上昇しており（老化特異的TE：500箇所、AD特異的TE：129箇所）、老化及びADの両者で共に上昇するTEは24箇所と僅かであった（図3）。老化特異的TEの近傍遺伝子の

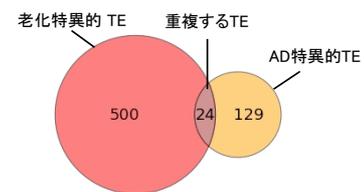


図3 ミクログリアの老化・AD特異的TEの同定

GO解析を行ったところ、炎症反応、細胞移動、ミエロイド細胞分化等、炎症関連経路が濃縮されていた。また、上位GOに含まれる遺伝子を制御するエンハンサーが老化特異的に活性化していることを確認した。同様に、AD特異的TEの近傍遺伝子のGO解析を行ったところ、アクチン細胞骨格形成および細胞形態変化、さらには異常タンパク質処理に関与する経路が濃縮されていた。上位GOに含まれる遺伝子を制御するエンハンサーがAD特異的に活性化していることも確認した。

これらの結果は、ミクログリアにおいて、老化に伴い活性化するエンハンサーとAD発症に伴い活性化するエンハンサーの多くは異なっており、異なる機能を持つ遺伝子群を制御すること

を示唆している。すなわち、老化とAD発症において、ミクログリアは独自の異なる転写性エンハンサーランドスケープを獲得して、各々のエンハンサーによって独自のミクログリア機能を発揮していると考えられた（論文作製中）。

（4）老化およびAD発症に伴い変動するミクログリア転写性エンハンサーのモチーフ解析

転写因子（transcription factor, TF）は細胞のクロマチン状態を制御し、エンハンサーやプロモーター領域に結合して遺伝子発現を誘導する。そこで、老化およびADミクログリアで変動したTEのTFモチーフ解析を行なった。Spi1(PU.1)やIrf8などの転写因子群はマクロファージの分化・成熟に必須の転写因子であり、老化およびADに重複するTFとして検出された（図4）。また、老化に特徴的なTFおよびAD特異的TFも同定することに成功した（図4）（論文作製中）。

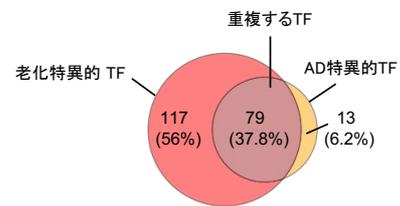


図4 ミクログリアの老化・AD特異的TFモチーフの検出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 泉湧太、金山剛土、樗木俊聡	4. 巻 40
2. 論文標題 マクロファージ分化経路とその治療標的としての可能性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学（羊土社）	6. 最初と最後の頁 68-73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Ohteki Toshiaki、Kawamura Shunsuke、Onai Nobuyuki	4. 巻 51
2. 論文標題 Commitment to dendritic cells and monocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 323-329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab031	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 泉湧太、金山剛土、川村俊輔、樗木俊聡	4. 巻 83
2. 論文標題 単球・マクロファージの分化経路	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 血液内科（科学評論社）	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 石川駿、佐藤卓、村川泰裕、樗木俊聡	4. 巻 51
2. 論文標題 NET-CAGE法を用いたエンハンサー解析と病態解明	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 糖尿病・内分泌代謝科（科学評論社）	6. 最初と最後の頁 323-329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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9件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shun Ishikawa, Taku Sato, Toshiaki Ohteki
2. 発表標題 Transcriptional mechanisms responsible for functional alteration of microglia in aging and Alzheimer's disease.
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shun Ishikawa, Taku Sato, Toshiaki Ohteki
2. 発表標題 Elucidation of transcriptional regulation mechanism of age-related microglia
3. 学会等名 The 27th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中川舞、石川駿、佐藤卓、村川泰裕、樽木俊聡
2. 発表標題 ミクログリア特異的エンハンサー領域の機能解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川駿
2. 発表標題 加齢性ミクログリアの転写制御機構の解明
3. 学会等名 難治疾患研究所・大学院生・若手研究者研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川駿、佐藤卓、平林茂樹、山田翔太、村川泰裕、榑木俊聡
2. 発表標題 ミクログリアの加齡性機能変容を引き起こす転写制御機構
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榑木俊聡
2. 発表標題 単球・マクロファージの分化経路と疾患標的としての可能性
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榑木俊聡
2. 発表標題 マクロファージ・樹状細胞の分化と機能
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榑木俊聡
2. 発表標題 単球・マクロファージの発生分化と疾患標的としての可能性
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樽木俊聡
2. 発表標題 単球・マクロファージの分化経路と疾患標的としての可能性
3. 学会等名 第1回北陸免疫研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 樽木俊聡（分担執筆）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 434
3. 書名 標準免疫学 第4版（監修宮坂昌之、編集小安重夫・椋島健治）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立大学法人 東京医科歯科大学（TMDU）難治疾患研究所 生体防御学分野 https://tmdu.ohteki-lab.com

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 分担者	村川 泰裕 (Murakawa Yasuhiro) (50765469)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・ チームリーダー (82401)	

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