

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06904

研究課題名（和文）末梢神経系に存在するマクロファージの起源と機能の解明

研究課題名（英文）Origin and function of macrophages in the peripheral nervous system

研究代表者

小西 博之（Konishi, Hiroyuki）

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90448746

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：末梢神経内に存在するマクロファージは、中枢神経系マクロファージであるミクログリアと同様に、血中単球から置き換わることのない常在型であることを見出した。また、末梢神経内マクロファージの機能解析を目的とし、細胞特異的遺伝子改変技術を確立した。それを用い、末梢神経損傷後のワラー変性において、末梢神経内マクロファージは血中単球由来の浸潤マクロファージと異なる機能を持つ可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経系のマクロファージであるミクログリアは近年急速に機能が明らかになってきているのに対し、末梢神経内に存在するマクロファージは機能がほぼ不明である。本研究で確立した末梢神経内マクロファージ特異的な遺伝子操作技術や細胞除去技術は、今後の機能解明に有用であると考えられる。また、本研究で見出された神経損傷時における末梢神経内マクロファージと血中単球由来マクロファージの相違点は、末梢神経損傷や神経因性疼痛の治療法開発の基礎になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aims to reveal functions as well as origin of macrophages in peripheral nerve. Peripheral nerve macrophages were demonstrated as the tissue-resident macrophages. For functional analysis of peripheral nerve macrophages, gene manipulation system was also established. By using this technique, some differences between peripheral nerve macrophages and monocyte-derived macrophages were found.

研究分野：神経再生

キーワード：マクロファージ ミクログリア 末梢神経 神経損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経系のマクロファージとして有名な中枢神経系のミクログリアは、卵黄嚢の erythromyeloid progenitor cells を起源とする組織常在型マクロファージであり、神経回路の発生/発達や維持、さらには神経損傷後の神経再生にも関わることが示されている。その一方で、末梢神経の軸索内にもマクロファージが存在することが知られているが、その起源と機能は明らかにされていない。

2. 研究の目的

末梢神経内マクロファージの起源と機能を明らかにすることを目的とした。本研究を進めることが、脱髄疾患など末梢神経疾患の発症メカニズム解明につながることを期待した。

3. 研究の方法

(1) 末梢神経内マクロファージの常在性

マクロファージは、血中単球が組織内に浸潤し分化した浸潤型と、組織内に発生期から常在している常在型に分けられる。野生型マウスをグリーンマウスと結合する parabiosis や、グリーンマウス由来骨髄を野生型マウスへ移植する骨髄移植により血中単球を GFP ラベルした。一定期間経た後、坐骨神経を採取し末梢神経内マクロファージの GFP 陽性率を調べた。

(2) 末梢神経内マクロファージの起源

単球系統細胞特異的に遺伝子組換え酵素 CreERT2 が発現する CX3CR1^{CreERT2} マウスと、Cre 存在下で蛍光レポーター YFP が発現する Rosa26^{YFP} マウスを交配した。そのダブルノックイン妊娠マウスに Tamoxifen を投与することにより、時期特異的にマクロファージ前駆細胞を YFP ラベルした。産仔から坐骨神経を採取し、末梢神経内マクロファージの YFP 陽性率を調べた。

(3) 末梢神経内マクロファージ特異的遺伝子改変技術

細胞の機能解析には細胞特異的 Cre ドライバーマウスの確立が重要である。しかし、末梢神経内マクロファージは中枢神経系のミクログリアと遺伝子発現が非常に似ているため、マクロファージ類縁細胞の解析に良く用いられる CX3CR1^{CreERT2} マウスや LyzM^{CreERT2} マウスでは、末梢神経内マクロファージとともにミクログリアも遺伝子改変されてしまう。そこで、末梢神経内マクロファージには発現するがミクログリアには発現しない CD206 のプロモーターにより CreER がドライブされる CD206-CreER マウスを搬入し (Nawaz et al., Nat Commun, 2017) そのマウスが末梢神経内マクロファージ特異的遺伝子改変に有効か、Rosa26^{TdTomato} レポーターマウスと交配することにより検討した。

(4) 末梢神経内マクロファージ特異的除去技術

細胞の機能解析には細胞特異的除去技術が重要である。しかし、末梢神経内マクロファージは中枢神経系のミクログリアと遺伝子発現が非常に似ているため、マクロファージ類縁細胞の除去に用いられる PLX3397 (CSF1 受容体阻害剤) などの試薬では、末梢神経内マクロファージとともにミクログリアも除去されてしまう。そこで、CD206-CreER マウスと Rosa26^{DTA} マウスを交配したダブルノックインマウスに Tamoxifen を投与することにより、末梢神経内マクロファージ特異的な除去が可能か検討した。

PLX3397 の投与により、全身のマクロファージが除去されることが知られている。ミクログリア数には影響を与えず末梢神経内マクロファージ数を減少させることが可能な PLX3397 の投与方法と投与量を検討した。

(5) ワーラー変性における末梢神経内マクロファージの機能解析

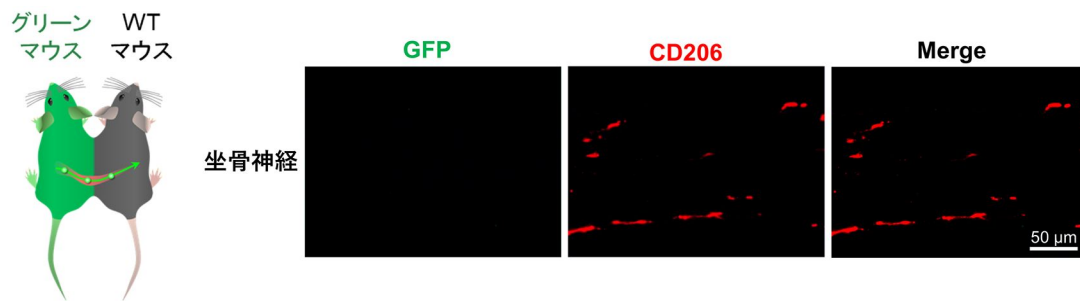
組織に浸潤した単球由来マクロファージは CCR2^{RFP} マウスにより可視化される。そこで、末梢神経内マクロファージを単球由来マクロファージを区別するために、3 系統を交配し CD206-CreER: Rosa26^{YFP}: CCR2^{RFP} マウスを作成した。坐骨神経を切断後 7 日目に採取し、両マクロファージの局在や形態に加え、髄鞘の貪食量を比較した。

4. 研究成果

(1) 末梢神経内マクロファージの常在型

骨髄移植実験により末梢神経内マクロファージは単球由来であることが報告されていた。しかし、骨髄移植の前処置で行う X 線照射は、神経系組織には大きなダメージであり単球の浸潤を引き起こすことが近年示されているため、過去の研究結果は X 線照射によるアーチファクトである可能性を考えた。そこで、野生型マウスの片足を鉛板で覆うことで X 線を遮断し、骨髄移植を行った結果、X 線を遮断しなかった足の坐骨神経では GFP 陽性のマクロファージが見られたのに対し、X 線を遮断した足では坐骨神経内に GFP 陽性マクロファージはほぼ見られなかった。この結果から、過去の報告は X 線照射によるアーチファクトによるものであり、末梢神経内マクロファージは常在型であることが示唆された。そこで、その結果を確かめるために、野生型マウスを

グリーンマウスと結合する parabiosis 実験を行った。その結果、坐骨神経内に GFP 陽性マクロファージはほぼ見られなかった (parabiosis 6 ヶ月後: $1.9 \pm 0.6\%$: $N=5$) (下図) ことから、末梢神経内マクロファージは単球から置き換わることのない常在型マクロファージであることが示された。

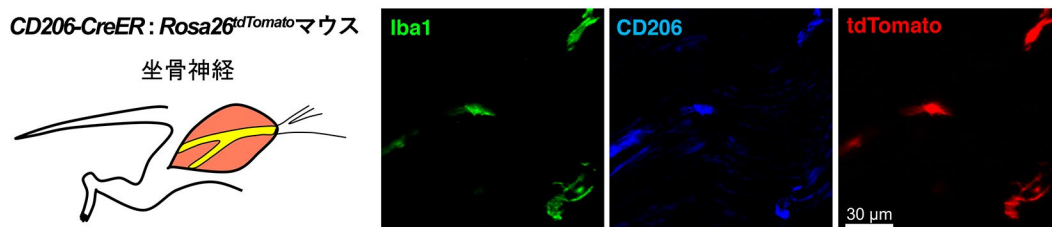


(2) 末梢神経内マクロファージの起源の探索

常在型マクロファージは、胎生期にマクロファージ前駆細胞が各組織に浸潤し定着したものであると考えられている。そこで、 $CX3CR1^{CreERT2}$ マウスと $Rosa26^{YFP}$ マウスを交配後、妊娠期に Tamoxifen を投与することでマクロファージ前駆細胞を YFP ラベルし、成獣における末梢神経内マクロファージの YFP 陽性率を調べた。末梢神経内マクロファージの起源は胎生期マクロファージ前駆細胞であるという予想通りの結果が得られつつあったが、その fate mapping 実験中に、海外のグループから同様の結果が報告されたため (Ydens et al., Nat Neurosci, 2020) 起源の同定に関する実験は中断した。

(3) 末梢神経内マクロファージ特異的遺伝子改変技術の確立

$CD206-CreER$ マウスを $Rosa26^{TdTomato}$ マウスと交配し、そのダブルノックインマウスに Tamoxifen を皮下投与した結果、ほぼ全ての坐骨神経内マクロファージが TdTomato でラベルされた (下図)。それに対し、中枢神経系のミクログリアが全くラベルされていなかったことから、 $CD206-CreER$ マウスは神経系における末梢神経内マクロファージ特異的遺伝子改変に有効であることが示された。



(4) 末梢神経内マクロファージ特異的除去技術の確立

$CD206-CreER$ マウスの有用性が分かったため、 $CD206-CreER$ マウスを $Rosa26^{DTA}$ マウスと交配し、そのダブルノックインマウスの腹腔内に Tamoxifen を投与した結果、約 70% の坐骨神経内マクロファージが除去された。それに対し、中枢神経系のミクログリアは全く除去されなかったことから、 $CD206-CreER : Rosa26^{DTA}$ マウスは神経系における末梢神経内マクロファージ特異的除去に有効であることが示された。

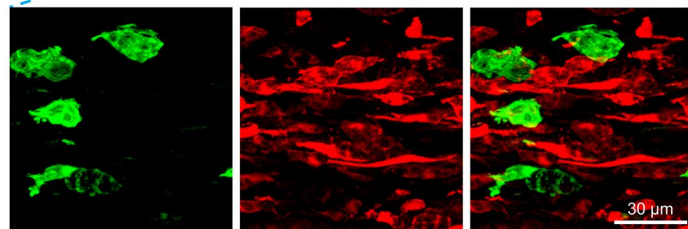
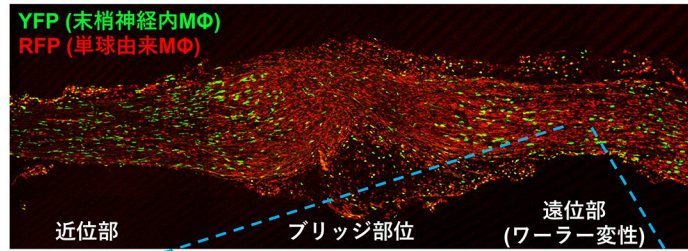
遺伝子改変マウスの使用に加え、薬剤による特異的除去の実験系も樹立した。CSF1 阻害剤 PLX3397 に対する感受性は、ミクログリアに比べ末梢神経内マクロファージは高いことが判明した。そこで、PLX3397 を低濃度で含有する餌を作成することにより、ミクログリア数には影響を与えず末梢神経内マクロファージ数を減少させることに成功した。

(5) 末梢神経内マクロファージのワラー変性における機能解析

末梢神経損傷後のワラー変性において、マクロファージは軸索や髄鞘の残骸を貪食することが良く知られている。しかしながら、そのマクロファージは浸潤してきた単球が分化したものであると考えられており、損傷前から末梢神経内に常在していたマクロファージの関与は不明であった。そこで、3 系統の交配により $CD206-CreER : Rosa26^{YFP} : CCR2^{RFP}$ マウスを作成し、ワラー変性における末梢神経内マクロファージと単球由来マクロファージの違いを組織学的に解析した。その結果、損傷軸索の近位端と遠位端を結ぶブリッジ部位に単球由来マクロファージは存在するが、末梢神経内マクロファージは存在しないことが示された (次ページ図)。また、損傷遠位部において、末梢神経内マクロファージは単球由来マクロファージより細胞サイズが大きいこと (次ページ図) さらに髄鞘の貪食量が多い傾向が見られた。これらの結果から、ワラー変性において、末梢神経内マクロファージは単球由来マクロファージと異なる機能を持つこ

とが示唆された。

CD206-CreER: Rosa26^{tdTomato}: CCR2^{RFP}
マウス



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Konishi Hiroyuki, Koizumi Schuichi, Kiyama Hiroshi	4. 巻 70
2. 論文標題 Phagocytic astrocytes: Emerging from the shadows of microglia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 1009 ~ 1026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.24145	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 Li Chenmin, Konishi Hiroyuki, Nishiwaki Kimitoshi, Sato Katsuaki, Miyata Takaki, Kiyama Hiroshi	4. 巻 173
2. 論文標題 A mouse model of microglia-specific ablation in the embryonic central nervous system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 54 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.06.002	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 Sato Takehito, Konishi Hiroyuki, Tamada Hiromi, Nishiwaki Kimitoshi, Kiyama Hiroshi	4. 巻 384
2. 論文標題 Morphology, localization, and postnatal development of dural macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 49 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-020-03346-y	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 Konishi Hiroyuki, Okamoto Takayuki, Hara Yuichiro, Komine Okiru, Tamada Hiromi, Maeda Mitsuyo, Osako Fumika, Kobayashi Masaaki, Nishiyama Akira, Kataoka Yosky, Takai Toshiyuki, Udagawa Nobuyuki, Jung Steffen, Ozato Keiko, Tamura Tomohiko, Tsuda Makoto, Yamanaka Koji, Ogi Tomoo, Sato Katsuaki, Kiyama Hiroshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Astrocytic phagocytosis is a compensatory mechanism for microglial dysfunction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e104464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020104464	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 該当する

1. 著者名 Konishi Hiroyuki, Kiyama Hiroshi	4. 巻 141
2. 論文標題 Non-pathological roles of microglial TREM2/DAP12: TREM2/DAP12 regulates the physiological functions of microglia from development to aging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104878 ~ 104878
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2020.104878	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 Koshimizu Hiroyuki, Ohkawara Bisei, Nakashima Hiroaki, Ota Kyotaro, Kanbara Shunsuke, Inoue Taro, Tomita Hiroyuki, Sayo Akira, Kiryu-Seo Sumiko, Konishi Hiroyuki, Ito Mikako, Masuda Akio, Ishiguro Naoki, Imagama Shiro, Kiyama Hiroshi, Ohno Kinji	4. 巻 263
2. 論文標題 Zonisamide ameliorates neuropathic pain partly by suppressing microglial activation in the spinal cord in a mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 118577 ~ 118577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2020.118577	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 Sayo A, Konishi H, Kobayashi M, Kano K, Kobayashi H, Hibi H, Aoki J, Kiyama H	4. 巻 16
2. 論文標題 GPR34 in Spinal Microglia Exacerbates Neuropathic Pain in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-019-1458-8	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 Shindo R, Ohmuraya M, Komazawa-Sakon S, Miyake S, Deguchi Y, Yamazaki S, Nishina T, Yoshimoto T, Kakuta S, Koike M, Uchiyama Y, Konishi H, Kiyama H, Mikami T, Moriwaki K, Araki K, Nakano H	4. 巻 15
2. 論文標題 Necroptosis of Intestinal Epithelial Cells Induces Type 3 Innate Lymphoid Cell-Dependent Lethal Ileitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 536-551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.05.011	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 Konishi H, Kiyama H, Ueno M	4. 巻 77
2. 論文標題 Dual Functions of Microglia in the Formation and Refinement of Neural Circuits During Development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Dev Neurosci	6. 最初と最後の頁 18-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijdevneu.2018.09.009	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 Haruwaka K, Ikegami A, Tachibana Y, Ohno N, Konishi H, Hashimoto A, Matsumoto M, Kato D, Ono R, Kiyama H, Moorhouse AJ, Nabekura J, Wake H	4. 巻 10
2. 論文標題 Dual Microglia Effects on Blood Brain Barrier Permeability Induced by Systemic Inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 5816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13812-z	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 該当する

1. 著者名 小西博之、木山博資	4. 巻 37
2. 論文標題 活性化ミクログリアの新たなタイプとその活性化誘導のメカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 872-877
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23件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 小西博之、木山博資
2. 発表標題 ミクログリアを含めた神経系マクロファージのサブタイプ
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroyuki Konishi
2. 発表標題 Interplay of microglia and astrocytes in phagocytosis
3. 学会等名 The third international symposium on brain science: University of Yamanashi (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小西博之、木山博資
2. 発表標題 ミクログリアと中枢神経系境界部に存在するマクロファージの相違点
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 李 晨旻、小西 博之、西脇 公俊、佐藤 克明、宮田 卓樹、木山 博資
2. 発表標題 胎児ミクログリア機能を研究するためのミクログリア特異的アブレーションシステム
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小西博之、木山博資
2. 発表標題 貪食におけるミクログリアとアストロサイトの連携
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoko Ishibashi, Takei Yuika, Ohshima Shiho, Hashimoto Kouichi, Konishi Hiroyuki, Kiyama Hiroshi, Baba Hiroko
2. 発表標題 発達期白質のMac2陽性細胞の分布
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小西博之、岡本峻幸、佐藤克明、木山博資
2. 発表標題 Astrocytic phagocytosis compensates for microglial dysfunction
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小西博之、岡本峻幸、佐藤克明、木山博資
2. 発表標題 アストロサイトの貪食作用はミクログリア機能不全を補完する
3. 学会等名 第80回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroyuki Konishi
2. 発表標題 Astrocytic phagocytosis is a compensatory mechanism for microglial dysfunction
3. 学会等名 第3回名古屋大学CIBoGリトリート
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小西博之、岡本峻幸、佐藤克明、木山博資
2. 発表標題 アストロサイトはミクログリア機能低下時に貪食作用を発揮する
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋優太、小西博之、木山博資
2. 発表標題 脳虚血は硬膜の組織的構造を変化させる
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroyuki Konishi, Hiroshi Kiyama
2. 発表標題 Astrocytic phagocytosis as a compensated function of microglial dysfunction
3. 学会等名 XIV European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小西博之、佐藤克明、木山博資
2. 発表標題 Complementarity between microglia and astrocytes in phagocytosis
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小西博之、木山博資
2. 発表標題 アストロサイトによるミクログリア貪食作用の補完性
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大迫史佳、小西博之、木山博資
2. 発表標題 末梢神経の発達や恒常性維持における末梢神経内マクロファージの機能解析
3. 学会等名 第9回生理学研究所・名古屋大学医学系研究科 合同シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小西博之、佐藤克明、木山博資
2. 発表標題 ミクログリア貪食能不全はアストロサイトにより補完される
3. 学会等名 第79回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小西博之、佐藤克明、木山博資
2. 発表標題 ミクログリア貪食能低下はアストロサイトにより補完される
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

個人ホームページ https://www.med.nagoya-u.ac.jp/anatomy2/konishi.htm

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		
米国	National Institutes of Health		
イスラエル	Weizmann Institute of Science		