

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15899

研究課題名（和文）ミクログリアヒト化マウスを用いたヒトミクログリアの形態及び機能に関する研究

研究課題名（英文）Elucidation of in-vivo characteristic of human microglia using microglia humanized mouse.

研究代表者

PARAJULI Bijay (Bijay, Parajuli)

山梨大学・大学院総合研究部・研究員

研究者番号：00748783

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：中枢神経系の免疫担当細胞として知られているミクログリアは神経活動制御や神経回路再編など、実に多彩で重要な脳機能に深く関与している。これらミクログリアの機能は主にマウスミクログリアを用いて明らかにされてきた。しかしマウスミクログリアは、ヒトミクログリアの性質を必ずしも反映してないため、ヒト脳内でのヒトミクログリア機能を理解するには不十分である。そこで本研究ではミクログリアヒト化マウスを作成し、in vivo でヒトミクログリアの性質を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミクログリアは、様々な神経疾患の発症や進行に大きく関係するとして注目されている。しかしこれまでの多くの研究はマウス等げっ歯類ならびにそのミクログリアを用いた研究で、ヒトのミクログリアが実際の脳内でどのような働きをし、どのように疾患や老化を制御しているのかについては明らかになっていない。本研究ではヒトiPS細胞由来ミクログリアをマウス脳への完全非侵襲的移植法の開発した。本研究により、ミクログリアが関係する種々の脳疾患がヒトミクログリアを使ったin vivo研究によって明らかになること、さらにはミクログリア移植による新しい「細胞治療法」が開発されることが期待されます。

研究成果の概要（英文）：Microglia are the resident immune cells of the brain, and play essential roles in neuronal development, homeostatic function, and neurodegenerative disease. Human microglia are relatively different from mouse microglia. However, most research on human microglia is performed in vitro, which does not accurately represent microglia characteristics under in vivo conditions. To elucidate the in vivo characteristics of human microglia, we developed a simplified method to generate induced pluripotent stem cell-derived human microglia and transplant them into the brain via a transnasal route in immunocompetent mice, in combination with a colony stimulating factor 1 receptor antagonist. We found that human microglia were able to migrate through the cribriform plate to different regions of the brain, proliferate, and become the dominant microglia in a region-specific manner by occupying the vacant niche when exogenous human cytokine is administered, for at least 60days.

研究分野：神経科学

キーワード：ヒトミクログリア ミクログリア移植

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳内の免疫細胞として知られるミクログリアは、神経活動監視及び調節、シナプス新生/除去、てんかん、パーキンソン病、アルツハイマー病など様々な神経疾患の発症や増悪など、種々の脳機能発現や疾患発症に深く関与する重要な細胞である。これまでミクログリアの研究は主にマウスミクログリアを中心に発展してきた。一方、ヒトミクログリアの研究は主に *in vitro* 実験系で展開されてきた。しかし、ミクログリアは特に *in vitro* と *in vivo* とで性質が大きく異なることが問題になっている。例えば *in vitro* ではミクログリアは P2ry12、Cx3Cr1 など恒常性遺伝子の発現が大きく低下するのに対し、Tlr6、Tnfa、Il6r など炎症性遺伝子の発現は逆に大きく亢進し、あたかも異なる細胞のような性質を獲得してしまう。このようにグリア細胞研究、特にミクログリア研究は、*in vitro* 研究から実際の脳内ミクログリアの性質を外挿することが難しい状況にある。他方では種差によるグリア細胞の性質の違いも問題になっており、例えばマウスとヒトではミクログリアの分子発現パターンが大きく異なる。従って、ヒトミクログリアの性質を明らかにするためには、ヒトミクログリアを使った *in vivo* 研究を遂行することが必須である。しかし、*in vivo* におけるヒトミクログリアの形態・機能を解析することは困難で、その生理的及び病態生理的意義についてはほとんど明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

以上の背景より、本研究の目的は、ヒトミクログリアの性質を *in vivo* で解析する実験系を構築し、ヒトミクログリアの性質及び脳機能に果たす役割を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

**ホストマウスのミクログリアの除去：** 内在性ミクログリア存在下では外来性ミクログリアはうまく移植できない。従って、PLX5622 で全脳ミクログリア除去後、ヒトミクログリアを移植する。

**ヒトミクログリアの移植：** 移植には、ヒト iPS 由来ミクログリア (hiPSMG) を使用する。内在性ミクログリアを除去後、完全非侵襲的な、経鼻移植法により移植する。

**ヒト及びマウスミクログリアの *in vivo* 形態の比較解析：** 移植 60 日後のミクログリアヒト化マウスの脳を採取し、PFA 固定標本を作製し、マウス脳内におけるヒトミクログリアの細胞体の大きさ、突起の全長、突起数など、免疫組織学的解析を行い、マウスミクログリアのそれらと類似点及び相違点を明らかにする。

### 4. 研究成果

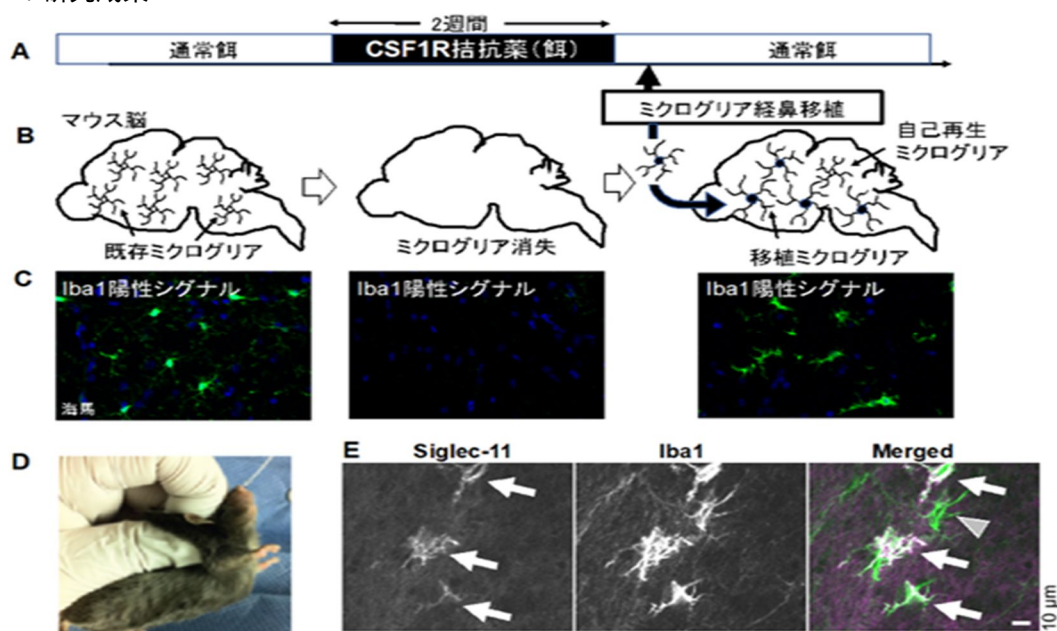


図1 経鼻移植法を用いた iPSMG の移植

A : スケジュール。B: CSF1R 拮抗薬投与前、投与中 (中)、及び断薬/ミクログリア移植後の模式図。C: CSF1R 拮抗薬投与前 (左)、投与中 (中)、及び断薬/マウスミクログリア移植後 5 日目 (右) の海馬 Iba1 陽性シグナル。D : 経鼻移植を行っている写真。E : ヒト iPS 由来ミクログリア (hiPSMG) の移植 (左、Siglec-11 陽性シグナル、ヒト由来)、Iba1 陽性シグナル (中)、及び merged (移植ミクログリア (矢印) 及び自己再生ミクログリア (矢頭))

本研究ではミクログリアの生存に必要な CSF1R 拮抗薬を用いてマウス脳内のミクログリアを除去後、iPSMG を完全非侵襲的な、経鼻移植法経鼻移植法により移植する方法を創出した (図 1 A-E)。種々の条件の最適化により、持続的にヒトリコンビナント コロニー刺激因子 1 (hCSF1) とヒトトランスフォーミング増殖因子- 1 (hTGF 1) を経鼻的に供給することによって iPSMG は移植後少なくとも二ヶ月間は安定的に海馬及び小脳に定着することを見出した。ミクログリアヒト化マウスでは多数の突起を有した静止型の iPSMG が観察され、脳部位特異的な形態を有し、マウス脳内に適応していた。また、iPSMG はマウスミクログリアより複雑な形態を有していた。本研究により、ミクログリアが関係する種々の脳疾患がヒトミクログリアを使った in vivo 研究によって明らかになること、さらにはミクログリア移植による新しい「細胞治療法」が開発されることが期待されます。

#### 「研究業績」

1. Parajuli B, Koizumi S. Strategies for manipulating microglia to understand their role in health and disease. *Neurochem*, (In press) 査読有り
2. Parajuli B, Shinozaki Y, Shigetomi E, Koizumi S. Transplantation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Microglia in Immunocompetent Mice Brain via Non-invasive Transnasal Route. *JOVE*, 183, 2022, 査読有り
3. Parajuli B, Saito H, Shinozaki Y, Shigetomi E, Miwa H, Yoneda S, Tanimura M, Omachi S, Asaki T, Takahashi K, Fujita M, Nakashima K, Koizumi S. Transnasal transplantation of human induced pluripotent stem cell derived microglia to the brain of immunocompetent mice *Glia* 69:2332-2348, 2021, 査読有り

#### 学会発表

パラジュリ ビージェイ、小泉修一：マウス脳にヒト人工多能性幹細胞由来ミクログリアの生理的および病理的役割解明に寄与する新しい移植法の開発、  
NEURO2022、2022 (口頭発表)

パラジュリ ビージェイ、小泉 修一  
Transnasal transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived microglia to the brain of immunocompetent mice  
日本薬理学会、2022 (口頭発表)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bijay Parajuli, Hiroki Saito, Youichi Shinozaki, Hiroto Miwa, Sosuke Yoneda, Miki Tanimura, Shigeki Omachi, Toshiyuki Asaki, Koji Takahashi, Masahide Fujita, Kinichi Nakashima, Schuichi Koizumi	4. 巻 69
2. 論文標題 Transnasal transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived microglia to the brain of immunocompetent mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2332;2348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23985	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 3. Bijay Parajuli, Youichi Shinozaki, Eiji Shigetomi and Schuichi Koizumi.	4. 巻 183
2. 論文標題 Transplantation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Microglia in Immunocompetent Mice Brain via Non-invasive Transnasal Route.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Vis Exp	6. 最初と最後の頁 e63574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/63574	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 該当する

1. 著者名 Bijay Parajuli, Schuichi Koizumi	4. 巻 48
2. 論文標題 Strategies for Manipulating Microglia to Determine Their Role in the Healthy and Diseased Brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochem Res	6. 最初と最後の頁 1066-1076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-022-03742-6	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 パラジュリ ビージェイ、小泉 修一
2. 発表標題 Transnasal transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived microglia to the brain of immunocompetent mice
3. 学会等名 日本薬理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 パラジュリピージェイ、小泉修一
2. 発表標題 マウス脳にヒト人工多能性幹細胞由来ミクログリアの生理的および病理的役割解明に寄与する新しい移植法の開発
3. 学会等名 日本神経化学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ミクログリア含有中枢神経系内移動剤、及びこれを含む中枢神経系疾患治療薬、並びにミクログリア導入動物、及びその製造方法	発明者 小泉修一、パラジュリピージェイ、繁富英治、篠崎陽一	権利者 国立大学法人山梨大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-196642	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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