

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15916

研究課題名(和文)免疫グロブリン及び似た分子による脳発生制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism underlying brain development by immunoglobulin and related molecules.

研究代表者

森本 桂子(Morimoto, Keiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：40815429

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)：我々の中枢神経系は神経幹細胞由来のニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトだけでなく、造血幹細胞由来のミクログリアとも相互作用することで複雑なネットワークを形成し、高度な機能を可能にしている。近年これらの脳に常在する細胞だけでなくB細胞やT細胞といった末梢から侵入する細胞も脳発生・機能に影響することが明らかになりつつある。本研究により従来免疫細胞のみが発現すると考えられてきた免疫グロブリン(Ig)のmRNAが神経細胞において発現すること、また母由来Igが脳実質の細胞に特異的に取り込まれておりその受容体が脳に発現することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常な妊娠過程では感染や炎症を認めないにも関わらず発生期脳において母由来免疫グロブリン(Ig)が脳に存在する意義に関しては全く未知である。本研究により脳においてIgの受容体がミクログリアに発現することが明らかになったことは母由来Igがミクログリアを介して脳発生に何らかの影響を及ぼしている可能性を示唆している。また神経細胞自体がIgのmRNAを発現しているという新たな知見は、これらが脳発生において何らかの未知の機能を持つことを想起させる結果である。

研究成果の概要(英文)：Our brain is composed not only of neurons, astrocytes and oligodendrocytes that derive from neural stem cells, but also of microglia derived from hematopoietic stem cells. These cells interact with each other, resulting in the establishment of highly organized brain functions. Recently, it has been elucidated that not only brain resident cells but also peripheral cells such as B cells and T cells are involved in the development and function of our brains. In this study, we found that mRNA of the constant region of IgM was expressed in neurons and that maternal IgGs penetrated into the developing brain parenchyma. We also found their receptors were expressed in the brain, suggesting that they have some function in brain development and functions.

研究分野：脳発生

キーワード：脳発生 免疫グロブリン

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系の発生過程においては脳実質の回路網を形成する神経細胞及びアストロサイト・オリゴデンドロサイト・ミクログリアなどのグリア細胞だけでなく、脳に存在する血管やそのまわりに存在するマクロファージや末梢から侵入する B 細胞や T 細胞などの獲得免疫系の細胞も関与することが明らかになりつつある。さらには、腸内細菌叢も関与する腸管免疫の影響など脳以外の組織の影響も受けることが明らかになりつつある。Maternal Immune Activation (MIA) モデルにおいて神経細胞の産生や移動に異常を認めることや、仔の血液脳関門の透過性が亢進することなどが報告されているように、脳発生過程においては仔自身の遺伝的な背景だけでなく母体の状態も子の脳発生に強く影響する。マウスやヒトの発生過程においては免疫グロブリン (Ig) が胎盤に発現する胎児性 Fc 受容体 (neonatal Fc Receptor: FcRn) を介して母から子に受け渡されることが知られているが、感染や炎症がない状態の正常発生過程においてこれらがどのような機能を持つかは未知である。さらには、脳において Ig が産生されている可能性に関しても全く未知である。

2. 研究の目的

神経系と免疫系はともに多様性と特異性を最大の特徴として持つことから共通の分子群を用いていることが想定される。これまでに神経ガイダンス因子であるセマフォリンや Eph / Ephrin、ケモカイン、サイトカイン、補体など多くの分子が両者で共通して用いられていることが明らかになりつつある¹。しかし、これまでは自然免疫系の分子の神経系での役割の報告が主であり、獲得免疫系に関わる分子の神経系への関与は十分明らかになっていない。免疫グロブリンはほぼ無限の相手を特異的に認識することができ、これらが神経系の多様性を担保するのに関与している可能性を考え、脳発生期において母から仔に移行する Ig 及び、脳において Ig 自体が発現する可能性に関して検証したいと考えた。

3. 研究の方法

母由来 Ig が存在しないモデルとして Ig を産生できない *Rag2* KO マウスを母に持つ仔、及び Ig の胎盤や腸管における輸送に関わる胎児性 Fc 受容体 (neonatal Fc receptor, FcRn) の KO マウスである *Fcgrt* KO マウスを用いた。*Rag2* KO マウスに関しては Jackson laboratory から購入したマウス (Strain #:008449) を用い、*Fcgrt* KO マウスに関しては経卵管ゲノム編集法 (improved-Genome-editing via Oviductal Nucleic Acid Delivery, i-GONAD 法) を用いて、*Fcgrt* の coding sequence が全て除去できるように exon2 と exon7 に crRNA を設計し 10.8kb 除去した KO マウスを独自に作成した。

脳に存在する Ig の検出には通常二次抗体として用いる蛍光標識された Goat または Donkey の抗マウス IgG 抗体を用いた。

さらに Ig の Fc 領域に対する受容体の発現の検索には PRJNA637987 のデータを用いた²。

IgM の重鎖定常領域 (*Ighm*) の発現部位を調べるために *in situ* hybridization chain reaction 法 v3.0 に従って染色を行なった³。

また *Ighm* の mRNA の発現を調べるために Polymerase chain reaction (PCR) も行った。

4. 研究成果

1. 発生期脳に母由来 Ig が存在する。

母由来 Ig の脳における存在を調べるため Ig の産生に必要な *Rag2* が欠損した *Rag2* KO、または Ig の産生できる *Rag2* ヘテロの母から生まれた仔 (仔の遺伝子型は *Rag2* ヘテロまたは *Rag2* KO) の脳切片を用いて免疫染色を行った結果、仔の遺伝子型に関わらず母が IgG を産生できないと発生期脳において IgG が存在しないことが明らかになった (Fig. 1)。また胎盤における Ig の取り込みに障害のある *Fcgrt* KO マウスを i-GONAD 法を用いて新たに作成し同様の染色

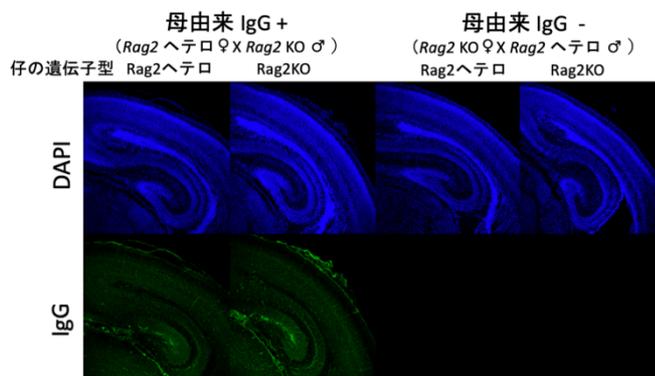


Fig.1 母がIgを産生できない*Rag2* KOマウスから生まれた仔では脳実質にIgGが存在しない。

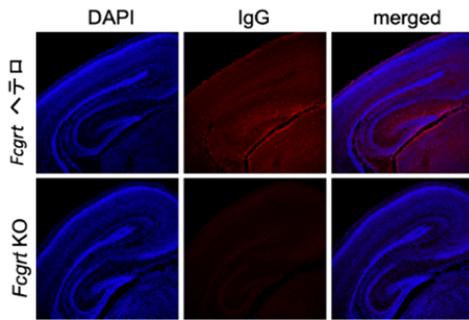


Fig.2 胎盤でのIgG吸収障害のあるFcgrt KOマウスでは脳実質にIgGが存在しない。

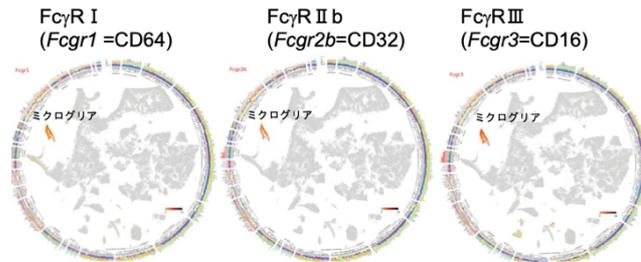


Fig.3 ミクログリアがIgのFc受容体のmRNAを発現する。

を行った結果、*Fcgrt* KO マウスにおいても脳に IgG が存在しないことが確認された (Fig 2)。このことから発生期の脳の IgG は仔が産生したものではなく母由来であることが明らかになった。

2. Ig の Fc 受容体が脳に発現する。

脳における Ig 取り込みのメカニズムを解明するために Ig の Fc 部分に対する受容体である FcγR I、FcγR II b、FcγR III の mRNA (それぞれ *Fcgr1*、*Fcgr2b*、*Fcgr3*) の発現をデータベースを用いて検索した結果、胎生 7 日から 18 日のマウス脳において主にミクログリアがこれらの受容体の mRNA を発現していることが明らかになった (Fig. 3)。また免疫組織染色においてもこれらがミクログリアに発現することが確認された。このことから、母由来 Ig がミクログリアにおいて Fc 受容体を介して取り込まれることが示唆された。

3. IgM 重鎖の定常領域 (*Ighm*) の mRNA が発生期から成体期の脳において発現する。

IgM の重鎖定常領域である *Ighm* の発現を *in situ* hybridization chain reaction 法を用いて調べたところ、*Ighm* mRNA が大脳皮質深層に発現していることが明らかになった (Fig. 4)。そこで、免疫染色を併用して発現細胞を検討したところ、*Ighm* mRNA は NeuN 陽性の神経細胞で発現することが明らかになった。さらに大脳皮質深層の神経細胞には *Ighm* mRNA 陽性の細胞と陰性の細胞が混在することから大脳皮質深層の特定の細胞種が *Ighm* mRNA を発現することが示唆された。

次に生後 0 日 (P0) 及び 8 週齢のマウス大脳皮質から調整した RNA を用いて rtPCR を行ったところ *Ighm* mRNA が成体のみならず脳発生期においても発現していることが明らかになった (Fig. 5)。このバンドが *Ighm* の配列であることはシークエンスによって確認した。

これらのことから発生期の脳においては母由来の Ig が存在するのみならず、脳の細胞自身によっても Ig が産生される可能性があることが明らかになった。これらが複雑な脳発生の過程でどのように機能しているかについては今後の課題である。

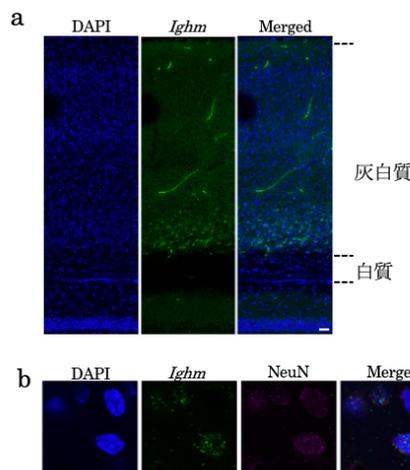


Fig.4 大脳皮質の一部の神経細胞が *Ighm* mRNA を発現する。
a) *in situ* HCR。 *Ighm* が灰白質の深層の細胞で発現する。スケールバー: 50µm
b) *in situ* HCR + 免疫組織染色。一部の NeuN 陽性の神経細胞で *Ighm* mRNA が発現する。スケールバー: 5µm



Fig.5 P0 及び 8 週齢のマウス脳で *Ighm* mRNA が PCR で検出された。

参考文献 :

- Nervous System. *Front. Neurosci.* **13**, 916, doi:10.3389/fnins.2019.00916 (2019).
- 2 La Manno, G. *et al.* Molecular architecture of the developing mouse brain. *Nature* **596**, 92-96, doi:10.1038/s41586-021-03775-x (2021).
- 3 Choi, H. M. T. *et al.* Third-generation in situ hybridization chain reaction: multiplexed, quantitative, sensitive, versatile, robust. *Development* **145**, doi:10.1242/dev.165753 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------