

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21467

研究課題名（和文）発生期の脳に免疫関連分子が存在するのはなぜか？

研究課題名（英文）Why do immunity-related molecules exist in developing brains?

研究代表者

仲嶋 一範（Nakajima, Kazunori）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：90280734

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：胎生期においては母親から胎盤を介して母由来の免疫グロブリンが絶えず供給されている。血液脳関門が完成するまではこの母由来免疫グロブリンは胎仔の体循環からさらに脳の実質内に移行することが想定されるが、脳の抗原と反応して障害を引き起こすリスクも想定できる。本研究では、母由来の免疫グロブリンが胎仔の脳実質に移行しているのかを調べた結果、確かに移行していること、それらはミクログリアやマクロファージなどが取り込んでいること、さらに、一部の免疫グロブリン遺伝子が脳の細胞で発現していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経系と免疫系はともに多様性・特異性を最大の特徴としているが、免疫系のうち特に多様性・特異性に関わる獲得免疫系の分子群が脳の発生過程に何らかの役割を有しているのかについては、未だよくわかっていない。本研究では、獲得免疫系の分子群が発生期の脳の実質に侵入したり、脳細胞自身がその一部の遺伝子を発現していることを示し、脳発生において何らかの未知の機能を有している可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：During the embryonic period, there is a continuous supply of mother-derived immunoglobulins from the mother via the placenta. Until the blood-brain barrier is formed, it is assumed that these mother-derived immunoglobulins are transferred from the fetal body circulation further into the brain parenchyma, but the risk of reacting with brain antigens can also be assumed. In this study, we examined whether the mother-derived immunoglobulins penetrate into the brain parenchyma of the fetus, and found that they do indeed penetrate, that they are taken up by microglia and macrophages, and that some immunoglobulin genes are expressed in brain cells.

研究分野：発生神経生物学

キーワード：神経科学 発生・分化 脳・神経 大脳皮質 免疫系

1. 研究開始当初の背景

神経系は様々なインプットに対して特定の神経回路が応答して特異的なアウトプットを惹起するために多様性・特異性を最大の特徴としている。近年の単一細胞レベルでの網羅的トランスクリプトーム解析の結果、脳を構成する細胞群自体も多種多様な集団に分けられることが明らかになりつつあるが、その分子的基盤の解明は未だ不十分である。一方、同様に多様性・特異性を特徴とする系として免疫系もあげられる。免疫系においては、B細胞の産生する免疫グロブリン(Ig)にほぼ無限とも言える多様性を持たせることで体内に侵入するあらゆる異物(抗原)に対して特異的な免疫応答を引き起こすことを可能としている。また同じようにT細胞も多様性を備えたT細胞受容体(TCR)を持つことで、特定の抗原を発現する細胞に対してそれを認識できるTCRを持つT細胞が特異的に応答できるようになっている。このように神経系と免疫系はともに多様性・特異性を最大の特徴としているが、免疫系のうち特に多様性・特異性に関わる獲得免疫系の分子群が脳の発生過程に何らかの役割を有しているのかについては、未だよくわかっていない。

2. 研究の目的

胎生期においては母親から胎盤を介して母由来Igが絶えず供給されている。血液脳関門(BBB)が完成するまではこの母由来Igは胎仔の体循環からさらに脳の実質内に移行することが想定されるが、Igが正常胎仔脳の抗原と誤って反応して障害を引き起こすリスクを考えると、本当に実質内に移行しているのだろうか。もしそうであるとしたら、通常の妊娠過程では感染や炎症は認めない脳において、これらのIgはどのような役割を担っているのだろうか。我々はこれらが発生期脳において感染防御を超えた何らかの未知の機能を有している可能性を検討するため、まずは母由来Igが胎仔の脳実質にも侵入しているのかを明らかにしたいと考えた。そして、侵入しているとしたらそのIgの詳細な分布を明らかにするとともに、さらに脳細胞自体が内在性のIg遺伝子を発現している可能性も検証してみたいと考えた。

3. 研究の方法

母由来Igが存在しないマウスとして、Igを産生できないRag2 KOマウス(Strain #:008449, Jackson laboratory)を母に持つ仔を用いた。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由来の抗マウスIgG抗体を用いた。

IgGがBBBを通過できるか調べるために、ウサギIgGまたはコントロールとしてリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を心臓から灌流した。その後、脳を摘出して4%パラホルムアルデヒド中で浸漬固定し、クリオスタットを用いて凍結切片を作成した。BBBを通過して脳実質に漏れこんだウサギIgGを検出するために、蛍光標識された抗ウサギIgG抗体を用いて免疫組織化学染色を行なった。さらに母由来IgGを取り込む細胞を同定するためにミクログリア及び髄膜に存在するマクロファージ(Border associated macrophage: BAM)のマーカーであるP2RY12及びCD206に対する抗体を用いてIgGと共染色を行なった。

また、IgMの重鎖定常領域(Ighm)の発現を調べるために、マウス脳及び脾臓からRNeasy mini kit(Qiagen)を用いてRNAを抽出した。そして、SuperScript III Reverse Transcriptase(Thermo)を用いてcDNAを作成し、Polymerase chain reaction(PCR)を行なった。また、Ighmの発現部位や発現細胞を調べるために、*in situ* hybridization chain reaction(HCR)法による染色をversion 3.0の方法¹に従って実施した。

4. 研究成果

(1) 胎生期脳に母由来IgGが存在する。

母親由来のIgが胎盤を通じて仔に輸送され、それが脳にも侵入するかを調べるために、Igを産生できないRag2 KOマウスから生まれた仔を用いて免疫組織化学染色を行なった。その結果、母マウスがRag2 KOである場合、通常二次抗体として用いる抗マウスIgG抗体だけを用了染色で全くシグナルを認めないのに対して、母がRag2ヘテロでIgGを産生できる場合は胎仔脳の髄膜に強いシグナルを、脳実質に弱いシグナ

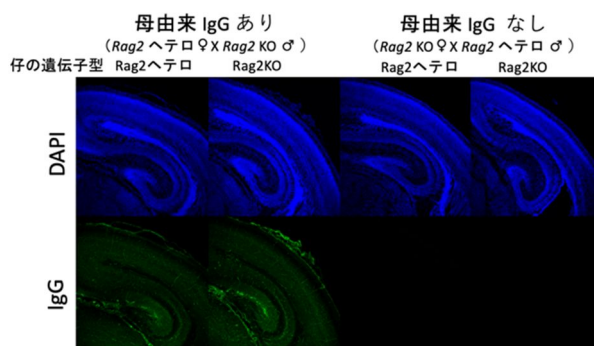


Fig.1 母がIgを産生できないRag2 KOマウスから生まれた仔では脳実質にIgGが検出されない。

ルを認め
ることが
明らかにな
った
(Fig. 1)。
仔が *Rag2*
ヘテロで
あっても
母が *Rag2*
KOであれ
ば IgG の
シグナル
を全く認
めな
ないこ

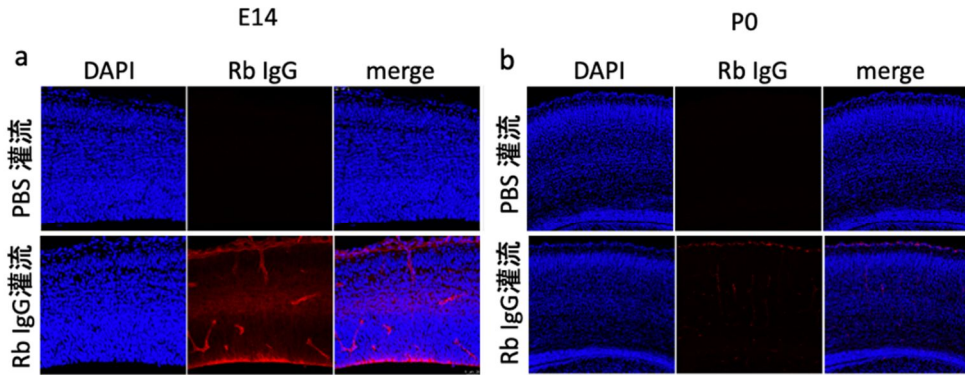


Fig.2 E14ではIgGがBBBと通過するがP0では通過できない。

PBSまたはRb IgGによる経心臓灌流後のマウス大脳皮質。a. E14日, b. P0の大脳皮質

とから、胎生期脳には仔自身が産生した IgG ではなく母親に由来する IgG が存在することが明らかになった。次に、BBB の透過性を調べるために胎生 (E) 14 日目と生後 (P) 0 日のマウスを用いて心臓からウサギ IgG を灌流したのち、脳を固定して抗ウサギ IgG 抗体で免疫組織化学染色を行なったところ、E14 では脳実質が IgG で染色されるのに対し、P0 では脳実質に IgG のシグナルを認めなかった (Fig. 2)。このことから、BBB の形成が未熟な胎生期においてのみ母由来 IgG は脳実質に移行すると考えられた。

(2) ミクログリア及び髄膜のマクロファージが母由来 IgG を取り込む

脳実質の Ig の分布及び陽性細胞の形態からミクログリアが IgG を取り込むことが予想されたため、IgG とミクログリアのマーカーである P2RY12 の共染色を行なった。その結果、脳実質において P2RY12 のシグナルと IgG のシグナルが重なり、ミクログリアが IgG を取り込んでいることが明らかになった (Fig. 3)。また髄膜に存在するマクロファージである BAM における IgG 取り込みを調べるため抗 CD206 抗体を用いて共染色を行なったところ BAM も IgG を取り込むことが明らかになった (Fig. 3)。

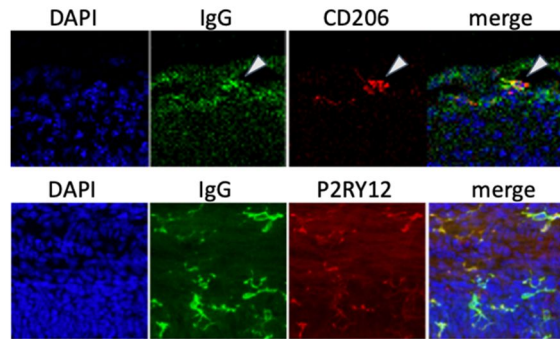


Fig.3 BAM及びミクログリアがIgGを取り込む。
P0 マウスの大脳皮質の免疫組織染色

(3) IgM の重鎖定常領域 (*Ighm*) の mRNA が脳の一部の神経細胞で発現する。

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 RT-PCR を行なったところ IgM の重鎖定常領域

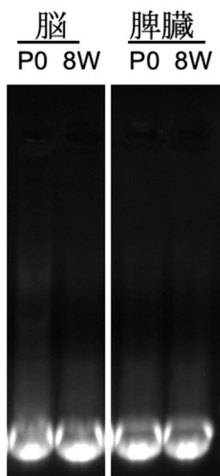


Fig. 4 P0及び8週齢のマウス脳で *Ighm* mRNAがPCRで検出された。

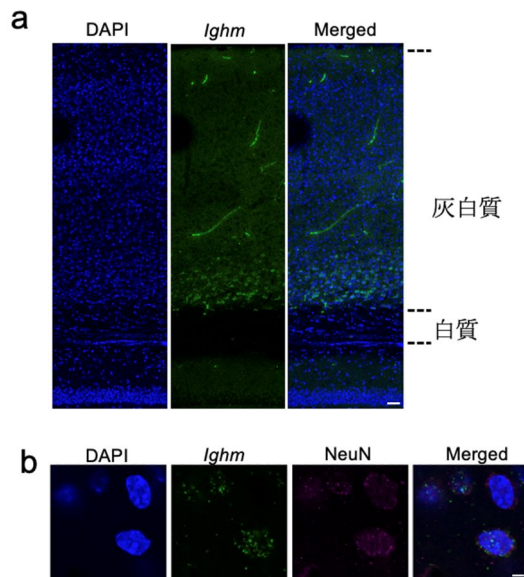


Fig.5 大脳皮質の一部の神経細胞が *Ighm* mRNA を発現する。

a) *in situ* HCR (*Ighm*)。

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 (*Ighm*) と NeuN 抗体染色。

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

(*Ighm*)の mRNA が両者において検出されることを見出した (Fig. 4)。このバンドをゲルから切り出してシーケンスを決定することにより、確かに特異的に *Ighm* の配列が増幅されていることを確認した。次に、脳において *Ighm* を発現する細胞を同定するために *in situ* hybridization を行なったところ、成体の脳において *Ighm* mRNA が大脳皮質深層で発現しており、NeuN の染色と重なることから一部の神経細胞が *Ighm* mRNA を発現することが明らかになった。また同部位には *Ighm* mRNA 陽性の神経細胞と *Ighm* mRNA 陰性の神経細胞の両者が混在することも明らかになった (Fig. 5)。

本研究により胎生期の脳には母由来の Ig が存在し特にミクログリアや BAM に取り込まれていること、また Ig の定常領域の遺伝子が神経細胞において発現することが明らかになった。これらが脳の発生過程や機能にいかに関与しているのかは今後の課題である。

< 参考文献 >

1. 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14件（うち招待講演 13件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 仲嶋一範
2. 発表標題 動く細胞たちが脳を作るしくみ
3. 学会等名 慶應義塾大学薬学部「先端医科学研究」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲嶋一範
2. 発表標題 動く細胞による大脳皮質の構築機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 シンポジウム“遺伝子発現制御から探る神経発生メカニズム”（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲嶋一範
2. 発表標題 大脳皮質形成機構とその破綻
3. 学会等名 和歌山県立医科大学大学院特別講義（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazunori Nakajima
2. 発表標題 Control of astrocyte dispersion in the developing cerebral cortex
3. 学会等名 International Symposium on Development and Plasticity of Nervous Systems（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲嶋一範
2. 発表標題 中枢神経系の構造と発生過程
3. 学会等名 東京大学理学部生物学科生物科学特別講義II (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲嶋一範
2. 発表標題 動く細胞が大脳皮質を作るしくみ
3. 学会等名 東京大学大学院理学系研究科生物科学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲嶋一範
2. 発表標題 動く細胞が大脳皮質を作るしくみ
3. 学会等名 JKIC医学部研究紹介セミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲嶋一範
2. 発表標題 教育講演 “動く細胞が大脳皮質層構造を作るしくみ”
3. 学会等名 第64回日本小児神経学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲嶋一範
2. 発表標題 大脳皮質が作られるしくみ
3. 学会等名 慶應義塾大学薬学部「先端医科学研究」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲嶋一範
2. 発表標題 大脳皮質を作る細胞が発生期に適切に分布するしくみ
3. 学会等名 日本解剖学会第110回関東支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazunori Nakajima
2. 発表標題 Cell migration in the developing cerebral cortex
3. 学会等名 14th International Congress of Cell Biology (ICCB) & 9th Asian Pacific Organization for Cell Biology (APOCB) Joint Meeting (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲嶋一範
2. 発表標題 動く細胞たちが大脳皮質を作るしくみ
3. 学会等名 岐阜薬科大学大学院薬学研究科・薬学科創薬育薬コース特別講義(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲嶋一範
2. 発表標題 動く細胞たちが大脳皮質を作るしくみ
3. 学会等名 東京医科大学大学院特別講義・神経発生セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazunori Nakajima
2. 発表標題 Cell migration in the developing cerebral cortex
3. 学会等名 International Symposium on Neural Development and Diseases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>アウトリーチ活動：</p> <p>仲嶋一範 中高生向けゼミ "脳が作られるしくみ1（高校1年）"、"脳が作られるしくみ2（中学1年～高校3年）"、栄光学園、鎌倉（神奈川県）、2020年9月2日</p> <p>世界脳週間2020オンラインイベント「脳学問のすゝめ」（高校生対象）：研究講演 仲嶋一範 “細胞たちが脳を作るしくみ” &バーチャルラボツアー（2021年1月24日-3月31日）、ライブイベント「研究者と話そう」（2021年2月7日）</p> <p>世界脳週間2021オンラインイベント「脳学問のすゝめ」（高校生対象）：研究講演 仲嶋一範 “細胞たちが脳を作るしくみ” &バーチャルラボツアー（2022年1月23日-3月31日）</p>

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