

令和 4 年 4 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22687

研究課題名（和文）中枢神経系マクロファージの機能解明を目的とした新規研究基盤の創出

研究課題名（英文）Establishment of a research platform for studying CNS macrophages

研究代表者

増田 隆博（Masuda, Takahiro）

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：80615287

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：中枢神経系組織には、実質に存在するミクログリア細胞に加え、脳境界領域には脳境界マクロファージが存在する。これまで、それぞれの細胞機能を分けて解析する実験ツールが存在せず、いまだミクログリアおよび脳境界マクロファージの機能および生体維持における役割の解明には至っていない。本研究では、ミクログリアおよび脳境界マクロファージの遺伝子発現プロファイルの包括的比較解析によりミクログリア特異的遺伝子の特定し、特定した遺伝子のプロモーターを用いた細胞種特異的遺伝子改変マウスの作成およびその機能解析を進め、ミクログリアおよび脳境界マクロファージの機能解明に向けた研究基盤の創出を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミクログリアおよび脳境界マクロファージは、その発生メカニズムおよび遺伝子発現プロファイルに類似性が認められ、現存する遺伝子改変マウスではそれらを正確に分けて生理学および病態生理学的な機能を解析することは難しい。そのため、これまで“ミクログリアが関与する”と考えられてきた中枢性応答や疾患発症メカニズムにおいて、実はその役割がほとんど分かっていない脳境界マクロファージが重要な役割を担っている可能性も十分にある。そのため、本研究により開発された新規細胞機能操作ツールは、今後ミクログリアと脳境界マクロファージを区別して詳細な機能解明を進めていく過程において非常に有用なツールになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The central nervous system (CNS) hosts a variety of innate immune cells including macrophages, which are found either in the parenchyma, called microglia, or at the CNS interfaces, such as leptomeningeal, and perivascular macrophages (CNS-associated macrophages). To date, little is known about their cell-type-specific roles in the absence of suitable tools, allowing for functional discrimination between microglia and CNS-associated macrophages. To develop a new microglia gene targeting model, we first applied single-cell RNA-sequencing to identify a stably expressed microglia core gene during homeostasis and disease. Then, we generated novel mouse lines that specifically target microglia. In summary, our novel genetic tools will provide a valuable option to study microglia functions in the CNS.

研究分野：神経免疫学

キーワード：ミクログリア 脳境界マクロファージ 中枢神経系疾患 脳 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

脳および脊髄といった中枢神経系組織は、神経細胞やグリア細胞、血管系細胞など多種多様な細胞の複雑かつ非常にダイナミックな相互作用を介して非常に重要な中枢機能を担っている。その中でも、脳実質に存在するミクログリアは、死細胞の除去だけでなく、神経細胞の分化促進や神経シナプスの剪定、炎症性応答など様々な機能を担う免疫細胞である。それに加え、血管周囲や髄膜といった末梢との境界領域には、脳境界マクロファージ (CAMs: CNS-associated macrophages) と呼ばれるミクログリアとは種類の異なるマクロファージが存在している。ミクログリアおよび CAMs には、その発生メカニズムや遺伝子発現プロファイルといった様々な細胞特性に多くの類似性が認められ、現存する遺伝子改変マウスを用いた解析では、両者を正確に分けて生理学および病態生理学的な機能を解析することは難しく、これまで“ミクログリアが関与する”と考えられてきた中枢性応答や疾患発症メカニズムにおいて、実はその役割がほとんど分かっていない CAMs が重要な役割を担っている可能性も十分にある。そのため、今後ミクログリアと CAMs を区別して詳細な機能解明を進めていく必要があり、それぞれの細胞をターゲットとした新規遺伝子改変マウスの作成は必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、上述の問題点を克服すべく、以下2項目 **(項目1)** シングルセルトランスクリプトーム解析技術を用いたミクログリアおよび CAMs の遺伝子発現プロファイルの包括的比較解析によるミクログリア特異的遺伝子の特定、**(項目2)** ミクログリア特異的遺伝子のプロモーターを用いた細胞種特異的遺伝子改変マウスの作成およびその機能解明を進め、ミクログリアおよび CAMs の機能解明に向けた研究基盤の創出を目指す。

3. 研究の方法

項目1: シングルセルトランスクリプトーム解析技術を用いたミクログリアおよび CAMs の遺伝子発現プロファイルの包括的比較解析によるミクログリア特異的遺伝子の特定

本項目では、初めにシングルセル RNA-seq 法を用いて、正常および病態時のミクログリアおよび CAMs の遺伝子発現プロファイルを単細胞レベルで明らかにし、それぞれの遺伝子発現パターンを包括的比較解析することで、ミクログリアに特異的発現し、かつ病態時でも安定的に発現する遺伝子を同定する。

項目2: ミクログリア特異的遺伝子のプロモーターを用いたミクログリア細胞特異的遺伝子改変マウスの作成および機能解明

本項目では、項目1で特定したミクログリア特異的遺伝子に着目し、ミクログリア特異的なレポーターマウスおよびタモキシフェン依存的な Cre (CreERT) を発現するマウスを作成する。

4. 研究成果

まず初めに、シングルセル RNA-seq 解析技術を用いたミクログリアおよび CAMs の遺伝子発現プロファイルの包括的比較解析を行った。その結果、数種類のミクログリア特異的発現遺伝子を同定することに成功した。次に、正常マウスおよび病態モデルマウス (顔面神経切断モデル・多発性硬化症モデル・脱髄モデル) から単離したミクログリアを用いてシングルセル RNA-seq 解析を行い、

病態時に活性化したミクログリアにおいて、安定的に発現が維持される因子の特定を進めた。その結果、有望なミクログリア遺伝子として Hexosaminidase subunit beta (*Hexb*) 遺伝子が同定された。ミクログリアにおける *Hexb* の発現は、病態時においても維持され、また CAMs 内での発現は非常に低いことが分かった。

そこで次に、ミクログリア特異的な細胞機能操作を目的として、*Hexb* プロモーター依存的に tdTomato もしくは CreERT を発現する遺伝子改変マウスを作成した (*HexbtdTomato*, *HexbCreERT*)。 *HexbtdTomato* マウスに関しては、その脳組織サンプルを用いて免疫染色法およびフローサイトメトリー解析を行ったところ、蛍光タンパク質 tdTomato がミクログリア細胞特異的に発現していることが確認できた。さらに、二光子レーザー顕微鏡を用いて tdTomato 陽性ミクログリアの *in vivo* イメージングを行ったところ、ミクログリアの突起の動きを正確に捉えることができた。また、*HexbCreERT* マウスに関しては、Cre 依存的レポーターマウスと掛け合わせてその特異性は確認した。その結果、ミクログリア細胞において非常に特異性の強い Cre 活性を誘導することができた。その後、転写因子 IRF8 や Mafk を標的とした Flox マウスと掛け合わせを行い、タモキシフェンを投与することでミクログリア特異的遺伝子欠損マウスを作成したところ、ミクログリアの形態などの細胞特性に強い変化が見られた。つまり、転写因子 IRF8 や Mafk は、ミクログリアの恒常性維持において、重要な役割を果たしていると考えられる。

以上の結果、新たに *Hexb* を標的にして作成した遺伝子改変マウスの有用性が確認された。今後は、作製したツールを用いて、ミクログリアの機能解明を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masuda T, Amann L, Monaco G, Sankowski R, Staszewski O, Krueger M, Gaudio FD, He L, Paterson N, Nent E, Fernandez-Klett F, Yamasaki A, Frosch M, Fliegau M, Bosch LFP, Ulupinar H, Hagemeyer N, Schreiner D, Dorrier C, Tsuda M, Grothe C, Joutel A, Daneman R, Betsholtz C, Lendahl U, Knobloch KP, Laemmermann T, Priller J, Kierdorf K, Prinz M	4. 巻 in press
2. 論文標題 Specification of CNS macrophage subsets occurs postnatally in defined niches.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 -
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 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 Kohno Keita, Shirasaka Ryoji, Yoshihara Kohei, Mikuriya Satsuki, Tanaka Kaori, Takanami Keiko, Inoue Kazuhide, Sakamoto Hirota, Ohkawa Yasuyuki, Masuda Takahiro, Tsuda Makoto	4. 巻 376
2. 論文標題 A spinal microglia population involved in remitting and relapsing neuropathic pain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 86 ~ 90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.abf6805	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 Prinz Marco, Masuda Takahiro, Wheeler Michael A., Quintana Francisco J.	4. 巻 39
2. 論文標題 Microglia and Central Nervous System?Associated Macrophages?From Origin to Disease Modulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annual Review of Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1146/annurev-immunol-093019-110159	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 Masuda Takahiro, Amann Lukas, Sankowski Roman, Staszewski Ori, Lenz Maximilian, d'Errico Paolo, Snaidero Nicolas, Costa Jord?o Marta Joana, B?titcher Chotima, Kierdorf Katrin, Jung Steffen, Priller Josef, Misgeld Thomas, Vlachos Andreas, Meyer-Luehmann Melanie, Knobloch Klaus-Peter, Prinz Marco	4. 巻 21
2. 論文標題 Novel Hexb-based tools for studying microglia in the CNS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 802 ~ 815
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-020-0707-4	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8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 増田隆博
2. 発表標題 ミクログリアという小さな細胞の多彩な能力
3. 学会等名 脳科学若手の会 第24回談話会「Microglia」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田隆博
2. 発表標題 マウスおよびヒト脳内におけるミクログリアの多様性および可塑性
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田隆博
2. 発表標題 Diversity and plasticity of microglia in mouse and human brains
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田隆博
2. 発表標題 脳実質ミクログリアと脳境界マクロファージ
3. 学会等名 第43回日本疼痛学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田隆博
2. 発表標題 多様な脳内マクロファージと治療標的としての可能性
3. 学会等名 第2回SAMURAI研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田隆博
2. 発表標題 Cellular and molecular heterogeneity of CNS macrophages in health and disease
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田隆博
2. 発表標題 Decoding brain environment through single-cell analysis of microglia
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahiro Masuda
2. 発表標題 Single-cell analysis reveals spatial and temporal heterogeneity of microglia in human and mice
3. 学会等名 第63回 日本神経化学学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔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			
ドイツ	University of Freiburg	University of Leipzig	Max Planck Institute	他3機関
スウェーデン	Karolinska Institute	Uppsala University		
フランス	University of Paris			
米国	University of California			
英国	University of Edinburgh and UK DRI			
イスラエル	Weizmann Institute of Science			