

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19365

研究課題名（和文）免疫系の役者が脳の発生過程において果たす役割の解明

研究課題名（英文）Elucidating the role of immune system actors in brain development

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）：胎生期には母由来の免疫グロブリン(Ig)が胎盤経由で流れ込んでいるが、まだ血液脳関門が未熟なため、脳傷害性のIgが脳に流入するリスクがあり、それを凌駕する意義があると考えられる。本研究では、まず胎生期脳に検出されるIgはほぼ全てが母由来IgGであることを示した。次に、母由来IgGを受け取る胎児脳側の細胞を同定した。さらに、母由来の特に胎生期のIgGが欠損すると生後に大脳皮質抑制性ニューロンが異常に減少してしまうことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎生期の脳に母由来の免疫グロブリン（抗体分子Ig）が存在していることは古くから知られており、感染予防のためと考えられている。しかしながら、通常の胎生期脳には明らかな感染や炎症はなく、何らかの未知の機能が母由来Igにはあるのではないかと考えた。本研究では、母由来Igが生後の大脳皮質抑制性ニューロンの生存維持に重要な役割を有することを見出したが、抑制性ニューロンの異常は様々な精神神経疾患の病態と関係することが注目されており、臨床的にも意義のある成果と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Maternal immunoglobulins (Ig) flow into the offspring across the placenta. However, there is a risk of influx of brain-injurious Ig into the developing brain, because the blood-brain barrier is still immature. This may suggest some unknown surpassing significance of the mother-derived Ig during brain development. In this study, we first showed that almost all of the Ig detected in the embryonic brain is mother-derived IgG. Next, we identified cells in the embryonic brain that receive mother-derived IgG. Furthermore, we found that loss of mother-derived IgG, especially during the embryonic period, leads to an abnormal decrease in cortical inhibitory neurons after birth.

研究分野：発生神経生物学

キーワード：母由来免疫グロブリン 抑制性ニューロン 大脳皮質発生

1. 研究開始当初の背景

母親の免疫グロブリン (Ig) は胎盤を介して胎児に移行しており、その意義として、発達途上の胎児及び新生児を感染から守るためであると考えられている。一方で、母血清には自己反応性の抗体が含まれることがあり、実際に自己免疫疾患合併妊娠において母抗体が子の組織を攻撃することにより子に重篤な障害が生じることや、自閉症の子を持つ一部の母の血清中には脳に存在するタンパク質を認識する抗体が存在することも知られている。すなわち、発生過程において、特に血液脳関門が未熟な胎生期に母体由来の Ig が胎児脳に流れ込むことには、脳に反応する Ig が胎児脳に移行して障害を引き起こすリスクがあると考えられる。胎児脳に存在する母体由来 Ig には、そのリスクを凌駕する重要な存在意義がある可能性が想定できるが、その実態はまだよくわかっていない。

申請者は本研究開始前までの研究で、マウスの胎仔脳に存在している Ig は *Rag2* (recombination activating gene 2) 遺伝子ノックアウト (KO) マウスを母に持つ子では子の遺伝子型に関わらず検出されない (図 1A) ことを見出し、胎仔脳の Ig はほぼ全て母体由来 IgG であり胎仔自身に由来するものではないことを示唆する結果を得ていた。ただし、*Rag2* KO マウスでは Ig 以外にも B 細胞欠損や T 細胞欠損など様々な異常があるため、それらによる免疫異常の二次的影響が否定しきれない状況であった。

2. 研究の目的

発生の過程では明らかな感染や炎症が存在しないにも関わらず、自己反応性抗体が流入する大きなリスクを冒してまで積極的に母由来抗体を受け入れている理由を明らかにしたい。

具体的には、まずは胎仔脳に存在する IgG のうち、経胎盤的に母体から供給される IgG と、胎仔自身が産生する IgG とがそれぞれどの程度を占めるのかを明らかにする。次に、母由来 IgG を受け取る胎仔脳側の細胞種を同定する。さらに、母由来 IgG を受け取れない子の脳に、その後どのような変化が生じるのかを明らかにすることにより、発生期脳が母由来 IgG を受け取る生理的な意義を明らかにすることを目的として本研究を行なった。

3. 研究の方法

(1) 母体から胎仔に IgG が移行しない、*Rag2* KO マウスとは別系統のマウスとして、胎児性 Fc 受容体 (FcRn) の遺伝子 (Fc gamma receptor and transporter, *Fcgrt*) KO マウスを利用し、子の脳に検出される IgG を調べた。

(2) 胎仔脳 / 新生仔脳において IgG が検出される細胞や構造を免疫組織化学染色によって検討した。

(3) IgG の既知の受容体の発生期脳における発現を、マウス胎生 7.5 日から 18 日の single cell RNA sequencing (scRNA-seq) の公開データ (<http://mousebrain.org/development/downloads.html>) で検討した。さらに IgG の Fc 受容体である FcγRI、FcγRIII が細胞内へのシグナル伝達に共通して用いる FcRγ の欠損マウス (*Fcer1g* KO マウス) を i-GONAD (improved Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery) 法で作成し、KO マウスの脳における IgG を免疫組織化学染色で検討した。

(4) 母由来 IgG を欠損した 2 つのマウスモデルを用いて、生後の大脳皮質抑制性ニューロンへの影響を免疫組織化学染色により検討した。

モデル 1 : 母が IgG を産生できないマウス (*Rag2* KO マウスを母にもつ仔)

モデル 2 : 胎盤における IgG の輸送が障害されたマウス (*Fcgrt* KO の仔)

4. 研究成果

(1) 母体 IgG の子への輸送が障害されているマウスにおいても、子の脳の IgG は検出されない。

生後(P)0 日目の *Fcgrt* KO マウスの脳と、ヘテロマウスの脳における IgG の分布を免疫組織化学染色で調べたところ、後者では検出されたものの、前者では検出されなかった (図 1B)。

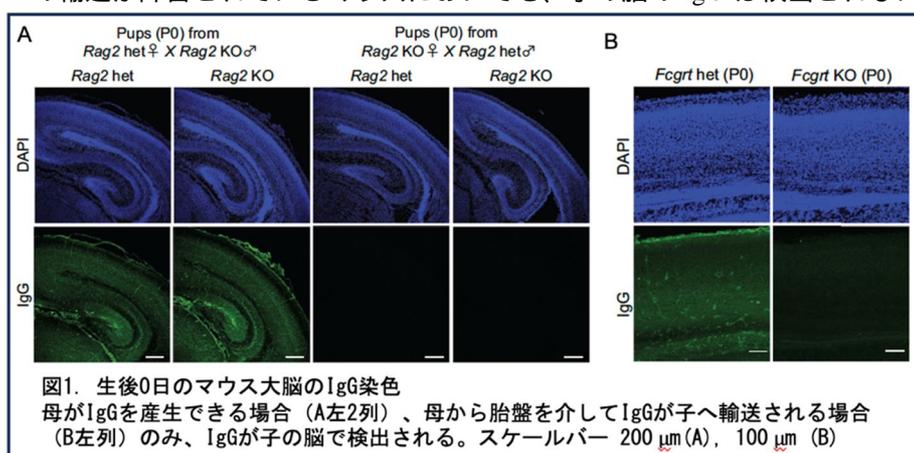


図1. 生後0日のマウス大脳のIgG染色

母がIgGを産生できる場合 (A左2列)、母から胎盤を介してIgGが子へ輸送される場合 (B左列) のみ、IgGが子の脳で検出される。スケールバー 200 μm (A), 100 μm (B)

(2) 胎生期 / 新生仔期の脳において母由来 IgG が検出される細胞や構造を同定した。

野生型の脳組織切片を用いて検討したところ、IgG のシグナルは髄膜、軸索束及びミクログリアなどに認められた。髄膜においては境界関連マクロファージ (Border associated macrophages, BAMs) や内皮細胞、線維芽細胞などが抗 IgG 抗体で染色された(図 2)。これらの細胞における IgG のシグナルは胎生期及び新生仔期には強く認めるが出生後徐々に減弱し、生後 3 週間もするとほとんど検出されなくなった。

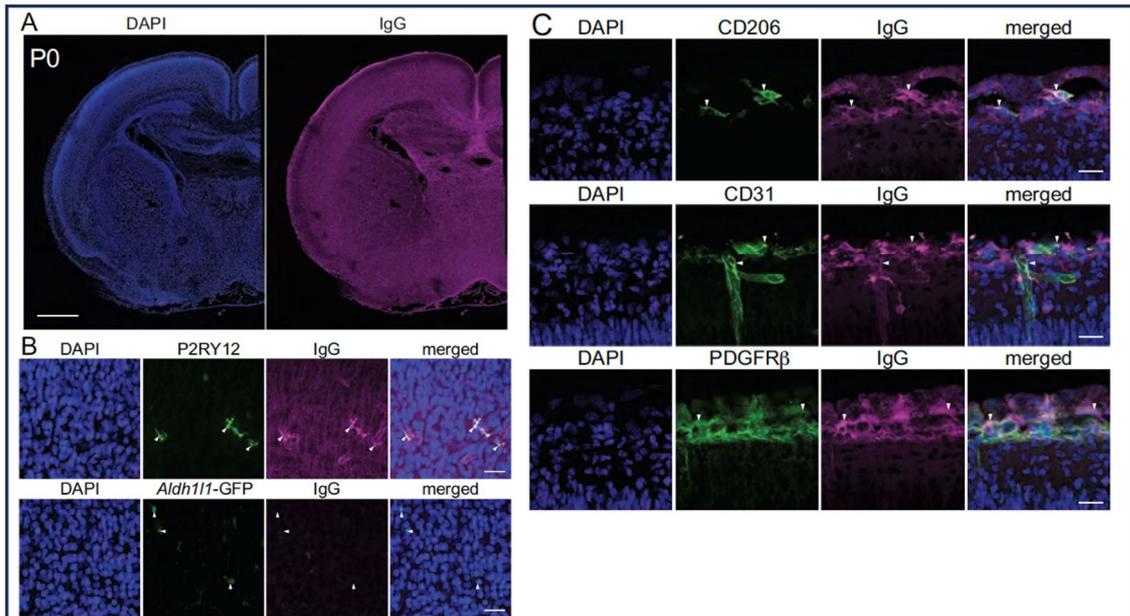


図2. P0マウス脳におけるIgGの免疫組織化学染色

脳全体にIgGが沈着しているが特に軸索束がIgGで強く染色される(A)。P2RY12陽性のミクログリア(B)、CD206陽性のBAM(C)、CD31陽性の内皮細胞(C)、PDGFRβ陽性の線維芽細胞(C)などがIgG陽性であるが、Aldh111陽性のアストロサイトはIgG陰性である(B)。

(3) ミクログリア及び BAMs は FcRγ を介して IgG を受け取る。

マウスの IgG の Fc 受容体として FcRγI、FcRγIIB、FcRγIII、FcRγIV が知られているが、公開されている scRNA-seq のデータベースを使って解析したところ、このうち特に FcRγI、FcRγIII が胎生期のミクログリア及び BAMs に強く発現することが見出された。これらは細胞内にシグナルを伝えるために共通して FcRγ を用いることから、FcRγ をコードする *Fcer1g* 遺伝子の KO マウスを作成して、胎生期 / 新生仔期の脳に IgG が検出されるか調べたところ、*Fcer1g* KO マウスにおいてミクログリア及び BAMs における IgG 陽性シグナルは消失するのに対し、髄膜及び軸索束における IgG 陽性シグナルは消失しなかった(図 3)。このことから、母由来 IgG は複数の方法で異なる機構によって利用されている可能性が示唆された。

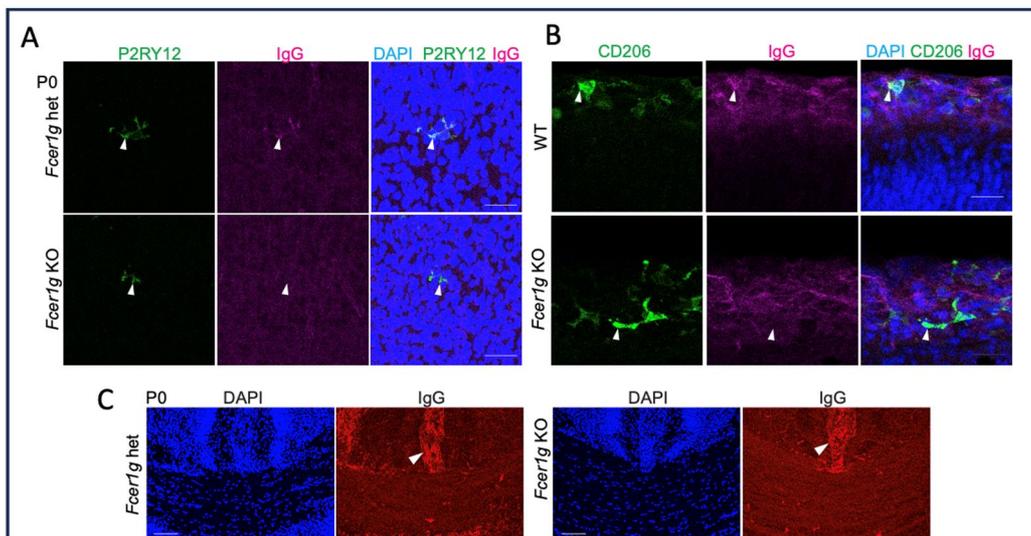
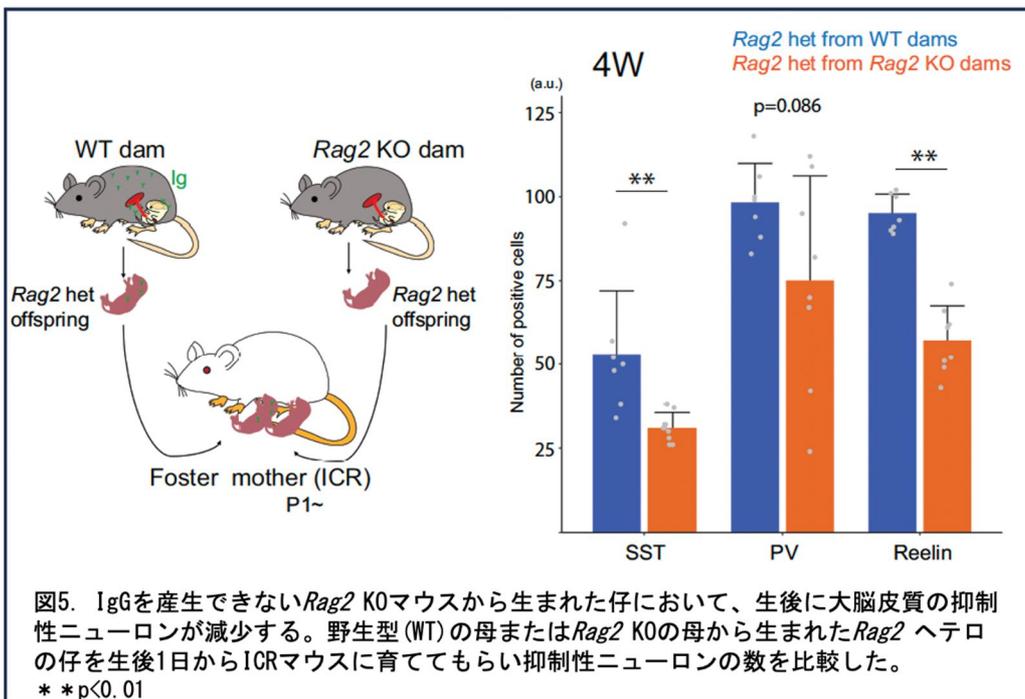
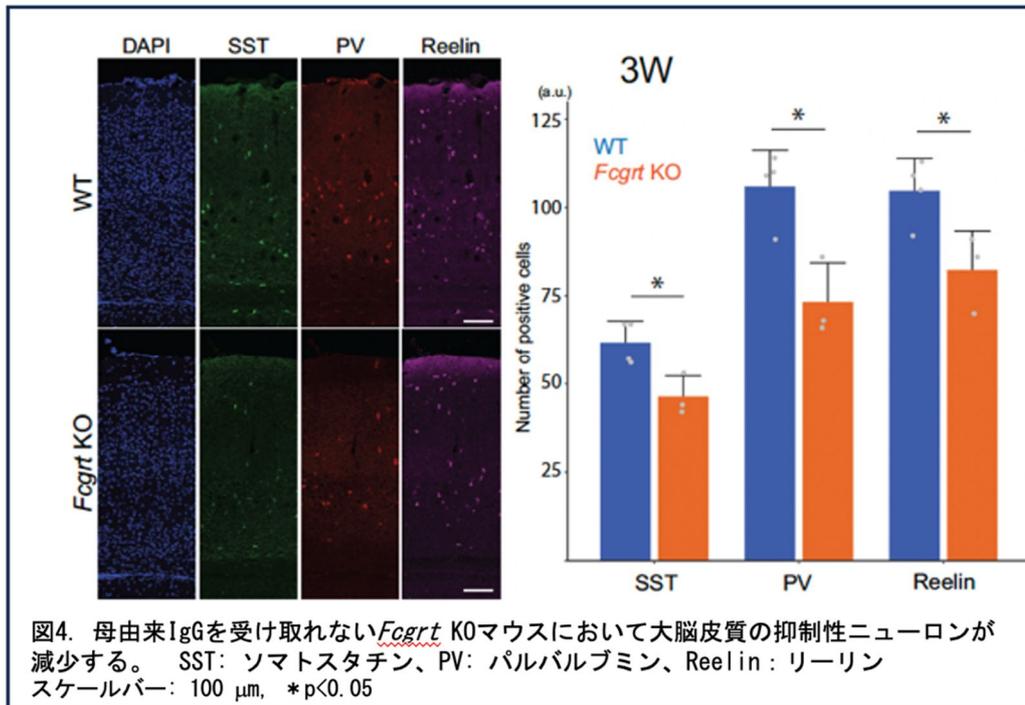


図3. ミクログリア及びBAMsはFcRγを介してIgGを取り込む

FcRγをコードする *Fcer1g* 遺伝子のKOマウスにおけるIgGの分布を免疫組織化学染色で検討した。P2RY12陽性のミクログリア及びCD206陽性のBAMsにおいてKOマウスでIgGのシグナルが消失(A, B)したのに対し、髄膜及び軸索束におけるIgGシグナルは消失しなかった(C)。

(4) 母由来 IgG は、生後の大脳皮質抑制性ニューロンの数の維持に必要である。

母由来 IgG の生理的意義を明らかにするために母が IgG を産生できない *Rag2* KO マウスから生まれた仔及び胎盤における IgG の輸送が障害された *Fcgrt* KO マウスを用いて解析を行なった。その結果、いずれのモデルにおいても大脳皮質の抑制性ニューロンが減少していることを見出した(図4、図5)。大脳皮質における抑制性ニューロンの数は、抑制性ニューロンの大脳皮質基底核原基等における産生、大脳皮質への移動、生後1-2週間の間におきる細胞死で制御されていると考えられる。そこで、どの過程に異常が生じているかを明らかにするために、全ての抑制性ニューロンが GFP で標識される GAD67-GFP マウスと *Fcgrt* KO マウスを交配し、GFP 陽性細胞の数で抑制性ニューロンの数の評価を行ない、IgG を欠損したマウスで抑制性ニューロンが減り始める時期を調べた。その結果、生後0日では *Fcgrt* KO マウスにおいて抑制性ニューロンの数は *Fcgrt* ヘテロマウスと比較して差を認めなかったが、生後7日では有意に減少を認めた。このことから、母由来 IgG は生後の抑制性ニューロンの細胞死を抑制していると考えられた。*Rag2* KO マウスを使った実験では、生後1日以降に野生型 ICR マウスに里子に出した場合であっても、それまでに母体由来 IgG を受け取れなかったマウスではその後の抑制性ニューロンの減少が生じたこと(図5)、血液脳関門の成熟により IgG の脳実質への流入は生後0日前後にはほぼ見られなくなることを鑑みると、母由来 IgG のうち特に胎生期に胎盤経由で受け取った IgG が、生後の抑制性ニューロンの数の維持には重要な役割を担うことが示唆された。



本研究によって、母由来の IgG は感染防御とは異なる、脳発生そのものに関与することが明らかになった。特に抑制性ニューロンは自閉スペクトラム症などの neurodevelopmental disorders において異常が報告されており、その発生過程を理解することは臨床の観点からも非常に重要である。今後、母由来 IgG がどの細胞を介して抑制性ニューロンに影響を与えるのか等を明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morimoto Keiko, Takahashi Rikuo, Takahashi Goro, Miyajima Michio, Nakajima Kazunori	4. 巻 44
2. 論文標題 Maternal immunoglobulins are distributed in the offspring's brain to support the maintenance of cortical interneurons in the postnatal period	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	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） 10.1186/s41232-024-00336-3	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 仲嶋一範
2. 発表標題 動く細胞が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 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, mini-symposium: "Cell Biology in Nervous System" (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

1. 発表者名 仲嶋一範
2. 発表標題 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 2023年

1. 発表者名 Rikuo Takahashi, Keiko Morimoto, Michio Miyajima, Hitomi Sano, Noriko Hiroi, and Kazunori Nakajima (高橋陸央、森本桂子、宮島倫生、佐野ひとみ、広井賀子、仲嶋一範)
2. 発表標題 Immunoglobulins in developing brains (発生期脳における免疫グロブリン)
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
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 Invited seminar at Center for Neuroscience Research, Children's National Hospital, Washington, D.C. (U.S.A.) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 仲嶋一範
2. 発表標題 大脳皮質ニューロンの挙動を制御するメカニズム
3. 学会等名 生理研研究会「神経活動パターンと遺伝子発現から紐解く脳・神経回路発達メカニズムの解明」(招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 森本桂子、高橋陸央、佐野ひとみ、広井賀子、宮島倫生、仲嶋一範
2. 発表標題 脳発生における母由来免疫グロブリンの役割
3. 学会等名 Neuro2024 (第47回日本神経科学大会、第46回日本生物学的精神医学会年会、第67回日本神経化学会大会、第8回アジアオセアニア神経科学 連合コンgres 合同大会)
4. 発表年 2024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