

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830050

研究課題名(和文) Siglec-Hの新規ミクログリアマーカーとしての可能性とその機能に関する研究

研究課題名(英文) Expression and function of Siglec-H in the nervous system

研究代表者

小西 博之(Konishi, Hiroyuki)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90448746

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)：Sialic acid binding Ig-like lectin (Siglec)-Hがミクログリア特異的マーカー分子となる可能性を検討した。免疫組織化学やRT-PCRにより、Siglec-Hは、神経系でミクログリアには発現するが、脳内の常在性マクロファージや末梢のマクロファージには発現しないことを示した。さらに、Siglec-H遺伝子座へのノックインマウスを用いた解析から、Siglec-H遺伝子座のミクログリア特異的遺伝子改変への有用性を示した。また、Siglec-H欠失マウスの解析から、Siglec-Hがミクログリアの炎症性反応を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the possibility that sialic acid binding Ig-like lectin (Siglec)-H was a novel microglial marker. We revealed that Siglec-H was expressed in microglia but not macrophages and furthermore that Siglec-H locus is useful for microglia-specific gene targeting using Siglec-H knock-in mouse. We also performed functional analysis of Siglec-H-deficient mouse and found that Siglec-H might suppress inflammatory responses of microglia after neuronal injury.

研究分野：神経損傷・再生

キーワード：ミクログリア マクロファージ マーカー 炎症 グリア

## 1. 研究開始当初の背景

ミクログリアは卵黄嚢の骨髄性前駆細胞に由来するという説が近年有力視されている。それに対し、生体での大部分のマクローファージ/単球は骨髄に由来する細胞で、ミクログリアとは起源が異なると考えられている。しかしながら、発現分子には共通のものが多く、両細胞を明瞭に区別するマーカー分子が存在しなかった(図1)。そのため、血管損傷を伴う中枢神経損傷時や、血液脳関門の破綻を伴う脳の炎症性疾患などにおいて、脳や脊髄の実質に浸潤したマクローファージとミクログリアの区別は困難であった。また、ミクログリア特異的遺伝子改変マウスの作成に有効な遺伝子座も明らかでなかった。

図1: 既存のミクログリアマーカーの特性

ミクログリア研究に主に使用されるマーカー	ミクログリア	炎症性単球/マクローファージ【脳への浸潤】
CD11b	++	++
Iba-1	++	++
CX3CR1	++	+
CCR2	-	++
CD45	+	++

※ 浸潤した細胞でも弱く発現  
※ ミクログリアは検出不可

## 2. 研究の目的

*In situ* hybridization を用いた予備実験から、シアル酸結合レクチン sialic acid binding Ig-like lectin (Siglec)-H がミクログリア特異的マーカー分子となる可能性を得ていた。そこで、本研究期間に Siglec-H の発現特異性や機能について以下の3項目を検討した。

### (1) Siglec-H のミクログリア発現特異性

神経系で Siglec-H はミクログリアに発現するが、単球・マクローファージには発現しないことを示す。

### (2) Siglec-H 遺伝子座の遺伝子改変マウス作成への有用性

Siglec-H の遺伝子座がミクログリア特異的遺伝子改変マウスの作成に有用であることを示し、ミクログリア特異的 Cre マウス (Siglec-H プロモーター-Cre マウス) を作成する。

### (3) Siglec-H のミクログリアにおける機能解明

ミクログリア特異的分子はミクログリアの機能発現に重要である可能性が考えられる。Siglec-H の神経系での機能は分かっていないため、ミクログリアにおける Siglec-H の機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) Siglec-H のミクログリア発現特異性

マーカー分子としての検討には免疫組織化学に使用できる抗体が必要である。実績のある市販の抗体は存在しなかったため、Siglec-H モノクローナル抗体を自身で作成

した。また、Dundee 大学 Dr. Crocker からポリクローナル抗体の供与を受けた。これらの抗体を用いた免疫組織化学や RT-PCR により、Siglec-H の発現特異性を検討した。

### (2) Siglec-H 遺伝子座の遺伝子改変マウス作成への有用性

Siglec-H の遺伝子座にジフテリア毒素受容体をノックインしたマウス (Siglecd<sup>tr/+</sup>) (Takagi et al, *Immunity*, 2011) はジフテリア毒素の投与により、Siglec-H 発現細胞のみが死に至ると考えられる。このノックインマウスで、マクローファージには影響なく、脳内からミクログリアのみが除去されることを確認することで、Siglec-H 遺伝子座の有用性をまず検討する。その後、ミクログリア特異的に Cre を発現する Siglec-H プロモーター-Cre マウスを作成する。

### (3) Siglec-H のミクログリアにおける機能解明

前述のノックインマウスのホモ接合体 (Siglecd<sup>tr/tr</sup>) は Siglec-H ノックアウトマウスとして使用することができる。神経損傷後の活性化ミクログリアで Siglec-H の発現が上昇するという予備データを得ていたため、このマウスを用い神経損傷後のミクログリア活性化における Siglec-H の機能を解析した。また、Siglec-H のリガンドは同定されていないため、Siglec-H のリガンド探索を生化学的手法で行った。

## 4. 研究成果

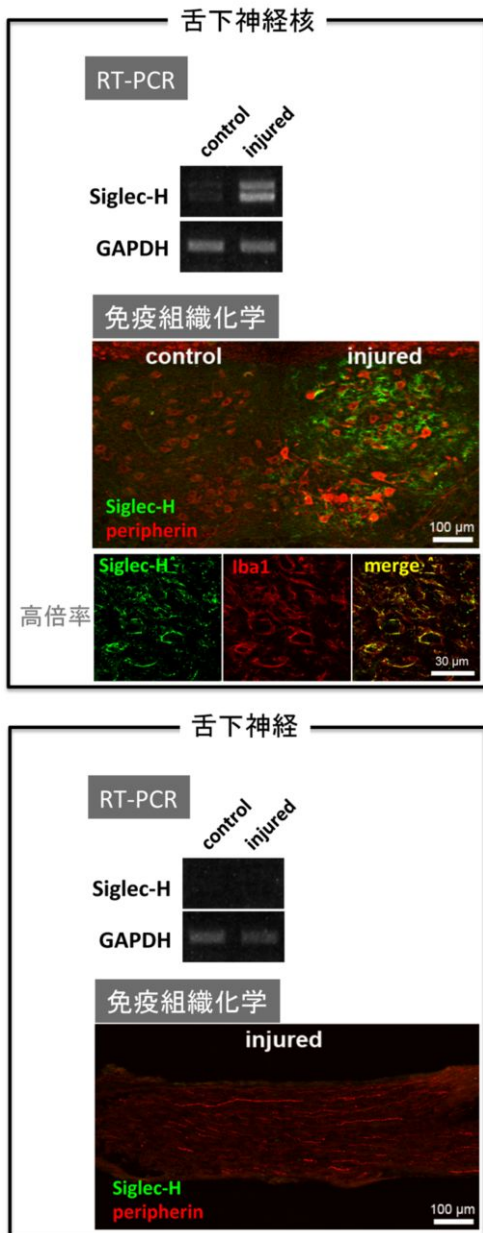
### (1) Siglec-H のミクログリア発現特異性

Siglec-H-Fc リコンビナントタンパク、または Siglec-H 細胞内ドメインの合成ペプチドを免疫したラットから、リンパ節法により、Siglec-H 抗体を作成した。免疫組織化学でミクログリアが染色されるモノクローナル抗体を得たが、染色性は悪く、かつ染色条件が限られたため、今後の使用に適さないと判断した。それに対し、Dr. Crocker から供与を受けたポリクローナル抗体は、自身でのアフィニティーカラム精製後にミクログリアが強く染まったため、以下のマーカーとしての検討実験に使用した。

まず、舌下神経切断モデルマウスを用い、Siglec-H のミクログリア発現特異性を検討した。このモデルでは、起始核である舌下神経核でミクログリアが活性化し増殖することが知られている。この活性化ミクログリアでは Siglec-H の発現が見られた。それに対し、ワラー変性中の損傷軸索に浸潤してきたマクローファージでは Siglec-H の発現は見られなかった(図2)。次に、脳内マクローファージにおける Siglec-H の発現検討を行った。脳内には、髄膜、血管周囲や脳室周囲器官に CD206 陽性の特殊なマクローファージが常在することが知られているが、これらの脳内マクローファージでは Siglec-H の発現は見ら

れなかった。これらの結果から、Siglec-Hはミクログリアには発現するが、マクロファージには発現しないことが示された。

図2: Siglec-Hのミクログリア発現特異性

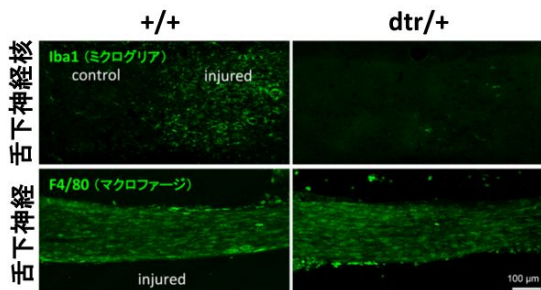


## (2) Siglec-Hの遺伝子座の遺伝子改変 マウス作成への有用性

*Siglecho<sup>dtr/+</sup>*マウスの腹腔内にジフテリア毒素を投与した結果、2~3日で脳内からミクログリアが除去された。それに対し、末梢マクロファージや脳内マクロファージには変化がなかった(図3)。よって、Siglec-H遺伝子座はミクログリア特異的な遺伝子改変に有用であることが示された。研究期間内にSiglec-Hプロモーター-Creマウスの作成までは至らなかったが、このような遺伝子座を特定できたことはミクログリア研究への貢献になると考えられる。また、このミクログリアを特異的に生体内から除去できる実験系の確立は、ミクログリアの機能解析に有効な

ツールとなると予想される。

図3: Siglec-H遺伝子座を用いたミクログリア除去



## (3) Siglec-Hのミクログリアにおける 機能解明

*Siglecho<sup>dtr/dtr</sup>*マウスを用いて、末梢神経損傷時のミクログリア活性化におけるSiglec-Hの機能解析を行った。リアルタイムPCRを用い、炎症性分子やM1/M2型分子の発現変動を検討した結果、*Siglecho<sup>dtr/dtr</sup>*で一部の炎症性サイトカインの発現上昇が見られた。よって、*in vivo*でSiglec-Hがミクログリアの炎症性反応を抑制する可能性が考えられた。今後さらに解析を進めることでSiglec-Hの炎症性反応への関与を明らかにしたいと考えている。

また、Siglec-Hのリガンド探索をSiglec-H-Fcリコンビナントタンパクを用いた共沈実験などで行ったが、同定には至らなかった。リガンドがタンパクまたは糖タンパクであることを想定して行ったため、今後はそれ以外の生理活性物質も含めた検討が必要であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Rashwan A, Konishi H, El-Sharaby A, Kiyama H.

Ontogeny and innervation of taste buds in mouse palatal gustatory epithelium.

*J Chem Neuroanat*, 71, 26-40, 2016.

DOI: 10.1016/j.jchemneu.2015.11.003.

査読有.

Jung J, Uesugi N, Jeong NY, Park BS, Konishi H, Kiyama H.

Increase of transcription factor EB (TFEB) and lysosomes in rat DRG neurons and their transportation to the central nerve terminal in dorsal horn after nerve injury.

*Neuroscience*, 313,10-22, 2016.

DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.11.028.

査読有.

Kobayashi M, Konishi H, Takai T, Kiyama H.

A DAP12-dependent signal promotes

pro-inflammatory polarization in microglia following nerve injury and exacerbates degeneration of injured neurons.

*Glia*, 63(6), 1073-72, 2015.

DOI: 10.1002/glia.22802.

査読有.

Tokizane K, Konishi H, Yasui M, Ogawa T, Sasaki K, Minamino N, Kiyama H. Continuous stress promotes expression of VGF in melanotroph via suppression of dopamine.

*Mol Cell Endocrinol*, 372(1-2), 49-56, 2013.

DOI: 10.1016/j.mce.2013.03.012.

査読有.

Konishi H, Matsumoto S, Namikawa K, Kiyama H.

N-terminal cleaved pancreatitis-associated protein-III (PAP-III) serves as a scaffold for neurites and promotes neurite outgrowth. *J Biol Chem*, 288(15), 10205-13, 2013.

DOI: 10.1074/jbc.M112.395301.

査読有.

〔学会発表〕(計9件)

<ポスター発表>

Handa M, Yoshimura T, Torii T, Konishi H, Kiyama H, Ikenaka K.

6-sialyl-lewisc on n-glycan may be involved in microglial phagocytosis of neuron.

25th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, 15<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> August 2015, Cairns, (Australia).

<ポスター発表>

Konishi H, Kobayashi M, Takai T, Kiyama H. Augmentation of neuropathic pain by DAP12 mediated signal in microglia.

XII European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease, 15<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> July 2015, Bilbao (Spain).

<ポスター発表>

Kobayashi M, Konishi H, Takai T, Kiyama H. A DAP12-dependent signal promotes pro-inflammatory polarization in microglia following nerve injury and exacerbates degeneration of injured neurons.

XII European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease, 24<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> July 2015, Bilbao (Spain).

<シンポジウム>

小西博之、小林正明、木山博資。

ミクログリアが形成する脳内環境と損傷運動ニューロンの運命。

第120回日本解剖学会総会・全国学術集会。2015年3月23日。神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)。

<ポスター発表>

小林正明、小西博之、高井俊行、木山博資。ミクログリア DAP12 による炎症反応は神経損傷後の神経細胞死を増悪させる。

第37回日本神経科学学会。2014年9月13日。

パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)。

<シンポジウム>

小西博之、小林正明、木山博資。

神経損傷後のミクログリア活性化制御因子。

第37回日本神経科学学会。2014年9月12日。

パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)。

<口頭発表>

小西博之、小林正明、高井俊行、木山博資。DAP12 を介した神経損傷後のミクログリア活性化。

第119回日本解剖学会総会全国学術総会。2014年3月27日。自治医科大学キャンパス(栃木県・下野市)。

<ポスター発表>

小林正明、小西博之、木山博資。

ミクログリアの抗炎症作用機序-神経損傷反応性に発現する Siglec-H について。

第56回日本神経化学学会大会。2013年6月22日。京都国際会議場(京都府・京都市)。

<ポスター発表>

時實恭平、小西博之、安井正佐也、小川登紀子、佐々木一樹、南野直人、木山博資。

持続的ストレス負荷により下垂体のメラノトロフに発現する VGF とその発現制御。

第56回日本神経化学学会大会。2013年6月20日。京都国際会議場(京都府・京都市)。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/Anatomy2/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 博之 (KONISHI, Hiroyuki)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 90448746

(2) 研究分担者

なし