

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430081

研究課題名(和文) 脳発達期におけるミクログリアのFc γ 受容体を介したシナプス形成制御の可能性研究課題名(英文) Role of microglia on brain development through maternal IgG-Fc γ receptor pathway.

研究代表者

大内田 理佳 (OUCHIDA, Rika)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80391887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期に母体から流入するIgG抗体とその受容体であるFc γ 受容体によるミクログリアの機能制御を通して、これまでに不明な点が多い脳発達期におけるミクログリアの生理的役割について解析することを目的とした。その結果、母体由来IgG抗体が実際に胎児脳内に流入し、特に胎生初期にミクログリア上で発現の高いFc γ 受容体を介して、脳発達期に大量に生じる神経細胞などによる死細胞の貪食除去に関わることを明らかにした。即ち、ミクログリアがIgG-Fc γ 受容体経路を介した貪食活性により生理的に脳機能構築に関わる可能性を示唆したと同時に、生体防御の要である抗体とその受容体の、脳内における新たな役割を提示した。

研究成果の概要(英文)：This research has been aimed to analyze the physiological role of microglia in the developing brain through the maternal IgG and its receptor Fc γ receptor expressed on microglia. As a result, the maternally derived IgG actually flowed into the fetal brain, and also the Fc γ receptors were highly expressed on the surface of microglial especially in the early stage of development. Through the IgG and Fc γ receptor pathway, a large amount of dead cells which are generated during brain development were taken up by the fetal microglia. These results suggested that the fetal microglia might regulate the brain construction physiologically by their phagocytosis function through IgG-Fc γ receptor pathway.

研究分野：脳内免疫学

キーワード：ミクログリア IgG抗体 Fc 受容体 貪食

1. 研究開始当初の背景

ミクログリアは、中枢神経系を構成するグリア細胞の一つである。その起源は胎児期の脳血管閉鎖が不完全な時期に、脳内に進入した単球・マクロファージ系の造血幹細胞が分化したものとされている。それを裏付けるように、ミクログリアはマクロファージと共通のマーカータンパク質を発現しており、脳内において免疫細胞としての機能を担っていると考えられている。これまでに、脳の損傷時や、神経変性疾患、多発性硬化症、脳梗塞、ウイルス感染などの病態時に、ミクログリアが活性化され組織修復に関わることが報告されてきた。しかしながら、正常の脳発達期におけるミクログリアの機能については不明である。

一方、Fc 受容体は、IgG 抗体の Fc 領域と結合する受容体で、成熟マクロファージやミクログリアに多く発現している。Fc 受容体の細胞内領域には ITAM (免疫受容体活性化チロシンモチーフ) があり、抗体が受容体に結合すると、ITAM の 2 つのチロシン残基がリン酸化され、そのリン酸化部位にチロシンキナーゼ Syk が結合することで、シグナル伝達が惹起される。マクロファージにおいては、ITAM からのシグナル伝達がアクチンなど細胞骨格の再構成を誘発し、受容体を介した抗原の取り込みにおいて重要であるという報告もあるが、ミクログリアの Fc 受容体の役割は全く不明である。

さらに、IgG 抗体は、唯一母体の胎盤を通過して胎児体内に移行し感染防御を補っていることが古くから知られており、一方、脳発達期における脳血管閉鎖は不完全で、抗体を含めたあらゆる液性因子が胎児脳内に流入し機能している可能性があるが、いまだその実証はない。

2. 研究の目的

本研究では、胎生期および出生直後の脳発達期において、母体由来の IgG 抗体とその受容体である Fc 受容体経路が果たすミクログリア機能制御機構を明らかにすることを目的とする。なかでも、脳発達期に生じる多量の神経細胞由来の死細胞や、不要なシナプスの除去において、ミクログリアの IgG 抗体

Fc 受容体経路の貪食機能が重要であるか否かを明らかにする。

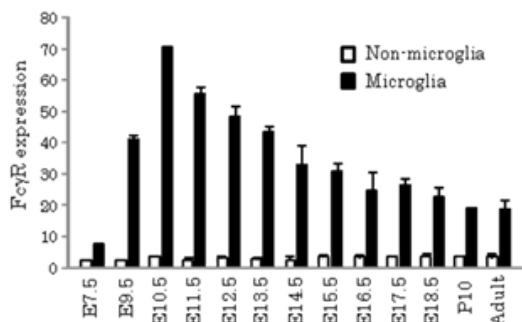
3. 研究の方法

(1) 脳発達期の脳内ミクログリアにおける Fc 受容体の発現と、脳内における母体由来 IgG 抗体の流入の有無について経時的な変化を検討する。次に、(2) IgG 抗体が存在しない免疫不全マウスを用いて、IgG 抗体 Fc RI 経路の破綻が、脳発達期における神経細胞によるアポトーシス除去や、変性シナプスの貪食除去を介したシナプス形成に与える影響を *in vivo* で検討する。マウスの胎生期から生後初期にかけての経時的な脳組織切片を用いて、アポトーシスおよびシナプス形成を可視化し、経時的に野生型と抗体不全マウスの間で比較検討する。また、(3) 初代培養ミクログリアを用いて、IgG 抗体、Syk 阻害剤または Fc 阻害剤がミクログリアの貪食活性に与える影響を *in vitro* で検討する。また、シナプス形成に異常が認められた場合は、(4) これまでにシナプス形成に寄与していることが示唆されている補体経路と Fc 受容体経路の相互作用の有無を、Fc RI 欠損マウスおよび補体成分 C1q、C3 または補体受容体 CR3 の遺伝子欠損マウスをそれぞれ掛け合わせた二重欠損マウスを作出し(2)と同様に *in vivo* で検証する。

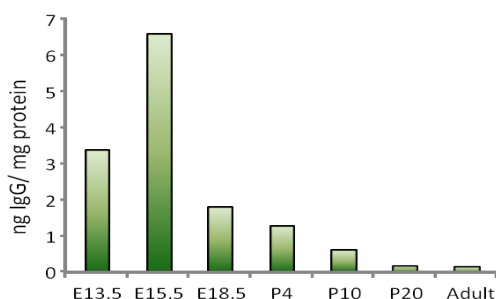
4. 研究成果

はじめに、脳発達期のミクログリアにおける Fc 受容体の発現を FACS で経時的に解析したところ、脳細胞懸濁液のなかで CD45⁺、CD11b⁺ を細胞表面マーカーとするミクログリアの細胞表面において、ミクログリア以外の細胞 (CD45⁻、CD11b⁻) と比較して、特異的に Fc 受容体 (Fc RI, II, III) を発現していること、その発現量は胎生初期 (E10.5) で最も高く、その後徐々に低下し、出生後 (P10) や成熟後 (Adult) では胎生期と比較して発現量が低いことが明らかとなった (図 1)。次に、脳内における IgG 抗体の有無を ELISA 法で検討したところ、Fc 受容体の発現と相関するように、胎生初期においてより高く検出され、その後徐々に減少し、

出生後においてはあまり多く存在しないことが判明した(図2)。以上の結果から、胎児脳内において、母体由来のIgG抗体が存在すること、また、IgG抗体の受容体であるFc受容体が胎生ミクログリアの細胞表面で高発現していることが明らかとなった。



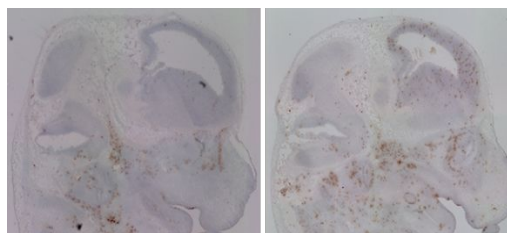
(図1)胎生期のミクログリアにおけるFc受容体の発現変化



(図2)胎生および出生後マウス脳内におけるIgG抗体

次に、脳発達期におけるIgG抗体とFc受容体を介したミクログリアの機能を解析するために、IgG抗体を持たない免疫不全マウスNSGを用いて、*in vivo*におけるミクログリアの貪食機能を野生型マウスと比較解析した。ミクログリアは、胎生期の胎児脳内において、大量に生じる神経細胞による死細胞を貪食除去することが示唆されていることから、胎児脳内の死細胞の割合を組織染色(TUNEL法)で確認した。その結果、死細胞発生のピークである胎生14日前後において、胎児脳内の死細胞の割合がNSGマウスで顕著に多いことが分かった(図3)。この結果は、ミクログリアによる死細胞の貪食除去が减弱した結果ではないかと推察された。しかしながら、胎生後期である胎生18日目や、出

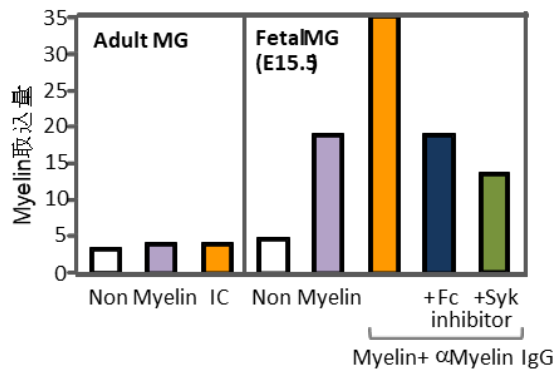
生後4日目における脳内の死細胞自体は少なく、また野生型およびNSGマウスでは違いが認められなかった。実際に、IgG抗体は出生後の脳内においてはあまり存在せず、さらにFc受容体の発現量も低いことから、IgG抗体Fc受容体経路が、胎生初期から中期にかけてのミクログリアの貪食活性に寄与している可能性が示唆され、出生後脳内におけるシナプス形成には積極的には関与しない可能性も示唆された。



野生型マウス (E13.5) 抗体不全マウス (E13.5)

(図3)胎生期脳内におけるアポトーシス

次に、初代培養ミクログリアを用いて、IgG抗体Fc受容体経路の貪食活性を評価するために、Syk阻害剤またはFc阻害剤などを用いた*in vitro*の系で検討を進めた。脳内蛋白であるミエリンを標的抗原として利用し、蛍光標識をした後、ミクログリアの培養上清に添加して一定時間培養を継続した。取り込まれた蛍光標識をFACS解析して貪食量を評価したところ、成熟ミクログリアは貪食活性をほとんど示さなかったのに対し、胎生期のミクログリアでは貪食活性が認められた。さらに、ミエリン抗原を予め抗ミエリン抗体と結合させ、その複合体を培養上清に添加したところ、ミエリン抗原の単独に比し取り込み量がさらに上昇した。この上昇は、抗原に結合させた抗体と、ミクログリア上のFc受容体を介した経路に依存すると考えられた。また、ミクログリアを予めFc阻害剤やSyk阻害剤で処理した際には、この抗原抗体の複合体の貪食活性は抑制された(図4)。以上の結果から、胎生ミクログリアは、Fc受容体の経路を介して標的抗原を貪食し、脳発達期に多量に生じる神経細胞由来の死細胞を除去することで、脳機能構築に生理的に関わる可能性が示唆された。



(図4) ミクログリアによる貪食活性

また、IgG 抗体 Fc 受容体経路の破綻によって観察された死細胞の蓄積が、脳機能構築にどのような影響を与えるのかについては検討課題であるが、HE 染色結果からは、少なくとも NSG の脳内における器質的な異常は認められていない。将来的には、シナプス形成を含む神経細胞の機能的な異常の有無について明らかにしていく必要がある。本研究は、生体防御の要である抗体とその受容体の、脳内における新たな役割の解明に繋がったと考えられる。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

第45回日本免疫学会学術集会(2016年12月, 沖縄)ポスター発表

6. 研究組織

(1)研究代表者

大内田 理佳 (OUCHIDA, Rika)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号: 80391887