

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461556

研究課題名(和文) 発達期の脳におけるミクログリアの発生と分化の追跡

研究課題名(英文) Tracking of microglial development and differentiation in the developing brain

研究代表者

佐久間 啓 (SAKUMA, Hiroshi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：50425683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系の免疫担当細胞であるミクログリアが発達期の脳においてどのように発生・分化するかについて、培養細胞を用いた実験系で解析した。最初にミクログリアを混合グリア培養から一時的に除去すると、ミクログリアの数は速やかに増加すること(再分布現象)を確認した。次に骨髄未分化細胞をアストロサイトと共培養するとミクログリア様細胞へ分化し、この過程にIL-34とTGF $\beta$ が重要であることを示した。最後にミクログリアに発現するプリン受容体P2Y<sub>12</sub>Rがインフラマソームの活性化を促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Development and differentiation of microglia in the developing brain were studied using in vitro co-culture model. After microglial depletion using CD11b-conjugated microbes, the number of microglia rapidly increased. When bone marrow lineage-negative cells were co-cultured with astrocytes, they differentiated into microglia-like cells with assists of IL-34 and TGF $\beta$ . Microglial P2Y<sub>12</sub> purinergic receptor played pivotal role in the activation of NLRP inflammasome.

研究分野：小児神経学

キーワード：ミクログリア アストロサイト インターロイキン34 P2Y<sub>12</sub>受容体 NLRP3 インフラマソーム

## 1. 研究開始当初の背景

ミクログリアは発生学的に他のマクローファージとは異なり、造血幹細胞由来ではなく胎生期の卵黄嚢に出現するマクローファージ前駆細胞に由来する。さらに生後も生理的な条件化では骨髄由来の細胞がミクログリアに分化することはないとされている。このため生後の脳においてミクログリアがどのように維持・供給されるのかという新たな疑問が生じている。

一方で血液脳関門の透過性亢進と骨髄未分化細胞の末梢血への動員という二つの事象が重なれば、これらの細胞は脳内に入りミクログリアとして定着することを示す報告も数多くある。従って骨髄未分化細胞を一定の条件下で培養すればミクログリアに文化誘導できる可能性があり、この考え方に基いて神経疾患に対する骨髄移植療法が実際に行われている。

ミクログリアが独自の形質を獲得するためには、中枢神経系という環境に置かれることが重要と考えられており、神経細胞や他のグリア細胞との接触に加え、何らかの液性因子やシグナルが関与すると推定されているが、その詳細は未だ不明である。

ミクログリアの重要な機能の一つとして炎症の制御が挙げられるが、これについても中枢神経系という環境化で独自に進化したミクログリアが何らかの独特の性質を持つと考えられる。

## 2. 研究の目的

1) ミクログリアが生後の脳において維持・供給されるメカニズムを明らかにする。マウス新生仔脳より作成した混合グリア培養からミクログリアを除去し、その後ミクログリアが時間とともに再び増加する過程を *in vitro* で追跡する。

2) マウスの骨髄未分化細胞をアストロサイトと共培養してミクログリアに類似した性質を持つ細胞（以下ミクログリア様細胞）を分化誘導し、分化を促進する因子の解析を行う。

3) 上記の共培養系を用いて、microRNA がミクログリアの分化誘導に果たす役割を明らかにする。MicroRNA inhibitor library を用いて骨髄未分化細胞からミクログリアへの分化に影響を及ぼす因子を抽出する。

4) ミクログリアの炎症を制御する分子として、ミクログリア特異的に発現する P2Y12 プリン受容体の役割を明らかにする。P2Y12 受容体がミクログリアのサイトカイン産生に及ぼす影響を調べる。

## 3. 研究の方法

1) 混合グリア培養から抗 CD11b 抗体結合磁気ビーズを用いてミクログリアを除去した。この細胞を再び培養し、細胞の組成並びに性質を経時的に観察した。

2) マウスの骨髄未分化細胞をアストロサイ

トと共培養してミクログリア様細胞への分化過程で細胞に起こる変化を追跡した。

3) 上記の共培養系に microRNA inhibitor library を投与し、細胞の数や形態に顕著な変化が現れるものをスクリーニングした。これらの microRNA がミクログリアの炎症反応に及ぼす影響を解析した。

4) マウス不死化ミクログリア細胞株 MG6 を用いて、P2Y12R の特異的阻害剤 PSB0739 および siRNA により P2Y12R の作用を阻害し、さらに CRISPR/Cas9 システムを用いて P2Y12R 欠損ミクログリア細胞株を作成して、LPS および ATP 刺激 に対するサイトカイン産生能を評価した。

## 4. 研究成果

1) 混合グリア培養から抗 CD11b 抗体結合磁気ビーズを用いてミクログリアを除去すると、残存する CD11b 細胞の割合は除去前の 15~20% から 0.2% に減少した。その後 day 3 では CD11b+細胞の割合に変化は見られないが、day 7 には 2~3%、day 14 には 7~9% へと増加し、day 21 になる 25~30% と急激に増加して元の割合を超えた。これらの細胞における CD11b、CD45 分子の発現を見ると、day 3~7 に出現する細胞では混合グリア培養中のミクログリアと比較して明らかに低く、割合が増加するにつれて CD11b、CD45 の発現が高い細胞が増える傾向が見られた。

以上より、ミクログリアは残存量 0.2% まで除去しても活発な増殖により 3 週間余りで元の割合まで回復することが明らかとなった。また増殖過程のミクログリアは成熟したミクログリアとは異なる性質を持ち、これらの細胞は成熟したミクログリアの分裂ではなく、何らかの異なる性質の細胞に由来する可能性を示唆している。

2) 骨髄未分化細胞はアストロサイトと共培養することで CD11b の発現が上昇すると共に、活発に分裂増殖してその数を増やすことがわかった。この分裂増殖は M-CSF、IL-34 等の CSF1R リガンドに加え、GM-CSF と TGFβ によっても促進されることがわかった。しかし GM-CSF の存在下で分化した細胞は骨髄由来マクローファージに似た性質を示す一方、ミクログリアに特異的に発現する CX3CR1 の発現は低かった。また TGFβ 存在下で分化した細胞はミクログリアと類似した表面分子の発現パターンを示すものの、形態的に突起の進展に乏しかった。CSF1R リガンド、特に IL-34 で分化誘導した細胞はミクログリアに極めて類似した性質を示した。IL-34 と TGFβ の両者を投与することにより、細胞表面マーカーの発現パターンからもミクログリアに類似した細胞を誘導することができた。またこれらの細胞は形態的にも細く分枝に富む突起を多数持ち、これらはミクログリアと同様に活発に伸縮していた。TGFβ は中枢神経系に発現していることから、IL-34 と協調的に作用することによりミク

グリアの形質獲得に重要な役割を担っていると考えられた。

3) 骨髄未分化細胞からミクログリアへの分化過程に影響を及ぼす microRNA inhibitor を複数同定した。次にこれらの microRNA の mimic を培養を用いて同様の解析を行ったところ、miR-101a のみが inhibitor と正反対の作用を示したことから、miR-101a に注目して以後の解析を行った。miR-101a の存在かで誘導されたミクログリア様細胞は CX3CR1 や TREM-2 を高発現し、ミクログリアのより近い性質を示すことがわかった。また miR-101a はミクログリアのサイトカイン産生にも変化をもたらした、miR-101a はマウスの脳に発現が見られることから、ミクログリア以外の中枢神経系の細胞が産生する miR-101a がミクログリアの形質獲得に重要な役割を果たすことが分かった。

4) P2Y12R の阻害により LPS 刺激に対する MG6 の IL-6 産生は低下し、その機序として NF- $\kappa$ B のリン酸化が P2Y12R 阻害により減少することが原因であることがわかった。LPS+ATP 刺激に対する MG6 の IL-1 $\beta$  産生も低下した。ミクログリアはエクトヌクレオチダーゼである CD39 により細胞外 ATP を ADP、AMP に変換するが、ADP の非加水分解型アナログである ATP- $\beta$ S を加えると LPS+ATP による IL-1 $\beta$  産生は著しく増加し、この作用は P2Y12R 阻害によりキャンセルされたことから、ADP が P2Y12R を介してミクログリアによる IL-1 $\beta$  産生を促進することが明らかとなった。ADP が P2Y12R に作用するとミトコンドリアの膜電位が変化し、最終的に NLRP3 インフラマソームの構成分子である caspase-1 が活性化して IL-1 $\beta$  の成熟を促していた。さらにこの ADP の作用は細胞外カリウム濃度に依存し、特定のカリウムチャネル阻害剤により著しく減弱することから、P2Y12R が何らかのカリウムチャネルとカップリングしていることが示唆された。以上より、ミクログリアにおいて細胞外 ADP は P2Y12R を介して NF- $\kappa$ B ならびに NLRP3 インフラマソームを活性化し、IL-6 および IL-1 $\beta$  の産生を増強することが証明された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Igarashi A, \*Sakuma H, Hayashi M, Noto D, Miyake S, Okumura A, Shimizu T. Cytokine-induced differentiation of hematopoietic cells into microglia-like cells in vitro. Clin Exp Neuroimmunol 2018 9:139-149. doi: 10.1111/cen3.12429 (査読あり)

Shima T, \*Sakuma H, Suzuki T, Kohyama K, Matsuoka T, Hayashi M, Okumura A, Shimizu T. Effects of antiepileptic drugs on microglial

properties. Epilepsy Seizure 2018 10: 22-32. doi: 10.3805/eands.10.22 (査読あり)

Saika R, Sakuma H, Noto D, Yamaguchi S, Yamamura T, Miyake S. MicroRNA-101a regulates microglial morphology and inflammation. J Neuroinflammation. 2017 14:109. doi: 10.1186/s12974-017-0884-8 (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

Sakuma H, Suzuki T, Kohyama K, Hayashi M, Miyake S. Self-renewal accounts for microglial repopulation after depletion in vitro. XIII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease. 2017

佐久間啓、鈴木智典、五十嵐鮎子、嶋泰樹、西田裕哉、神山邦子、松岡貴子、林雅晴. In vitro におけるミクログリアの再分布は自己複製によって起こる 第 29 回日本神経免疫学会学術集会 2017

佐久間啓、鈴木智典、五十嵐鮎子、神山邦子、林雅晴、三宅幸子. CD11b 養成細胞を除去した混合グリア培養におけるミクログリアの再増殖. 第 27 回日本神経免疫学会学術集会. 2015

Sakuma H, Suzuki T, Hayashi M, Noto D, Saika R, Yamamura T, Miyake S. Interleukin-34 facilitates commitment of hematopoietic cells to microglia-like cells (English session). 第 57 回日本小児神経学会学術集会. 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
特記事項なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐久間 啓 (SAKUMA, Hiroshi)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発  
達・神経再生研究分野・プロジェクトリーダ  
ー

研究者番号：50425683

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

五十嵐 鮎子 (IGARASHI, Ayuko)

雑賀 玲子 (SAIKA, Reiko)

鈴木 智典 (SUZUKI, Tomonori)

嶋 泰樹 (SHIMA, Taiki)