

令和 2 年 7 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00541

研究課題名(和文) 蛍光ライブイメージングによる脳内免疫細胞ミクログリアの放射線応答全容を解明

研究課題名(英文) Live imaging for activated microglia in response to radiation-induced brain injury by utilizing transgenic medaka

研究代表者

保田 隆子 (Yasuda, Takako)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任准教授

研究者番号：40450431

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)：小型魚類モデルであるメダカ胚は、体外で発生し脳が透明なので放射線により脳内へ誘発されたアポトーシス細胞とそれらを貪食するミクログリアの動態を *in vivo* イメージングにより観察が出来る利点がある。本研究では、放射線損傷を受けた脳内で誘起される活性化ミクログリアを L-plastin, ApoE 両遺伝子をプロモーターとしたトランスジェニックメダカ(TGメダカ)の作製を試みた。放射線により誘発されたアポトーシスは活性化したミクログリアにより42時間以内に除去されたが、ミクログリアの活性化がその後も長時間にわたり継続している可能性を、ApoEを可視化できるTGメダカのライブイメージングにより見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メダカ胚は、体躯が透明で脳内を容易に観察できるうえ、その脳のサイズは哺乳類と比較して大変小さく脳全体を俯瞰的に観察することが可能なモデル生物である。これらの利点を活かして、脳全体で誘発される放射線被ばくによるミクログリアの動態を可視化できるトランスジェニックメダカを作出し、その全容を明らかにするためライブイメージングを試みた。その結果、放射線誘発性のアポトーシスが貪食除去された後も数日に亘りミクログリアの活性化は継続している現象を見出した。本研究は発達期の脳を放射線の損傷から守る放射線防護剤の開発、さらに脳腫瘍などの放射線治療における小児の医療被ばく影響を回避する研究に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Japanese medaka fish, *Oryzias latipes*, have an advantage over the mouse model: their embryos are small size and highly transparent, that enable us to observe the detailed process of induction of neuronal death and their removal by microglia in irradiated brains. We have demonstrated that the microglial activation includes two steps throughout the phagocytotic process, which can be indicated by the specific two biomarkers; L-plastin (lymphocyte cytosolic protein 1) at the initial phase of irradiation-induced phagocytosis and Apolipoprotein E (ApoE) at the later phase, respectively. In this study, I established the transgenic medaka embryos with fluorescent microglia to conduct live-imaging of microglial dynamics post-irradiation. Collectively, it was revealed that the recruitment of activated microglia was sustained for longer than several days even after injured neurons had been largely eliminated within 2 days post-irradiation.

研究分野：放射線神経生物学

キーワード：ミクログリア 放射線 アポトーシス ライブイメージング トランスジェニックメダカ 貪食 ApoE Lplastin

1. 研究開始当初の背景

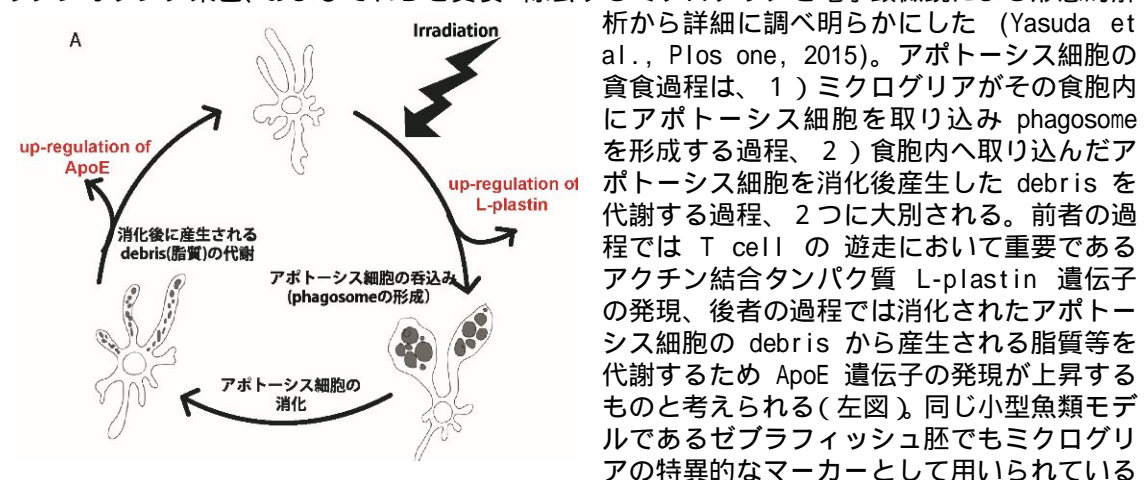
現在脳腫瘍の治療では外科手術で腫瘍を摘出し、悪性腫の場合は摘出した腫瘍の周縁に浸潤するがん細胞を死滅させるためにさらに放射線治療が施される。X線の強度変調治療等の放射線治療の技術的向上により正常組織の不要な放射線被ばくが大きく低減されるようになったが、脳腫瘍の治療では大線量の放射線照射を行うために照射後の慢性炎症や認知機能障害が大きな臨床的課題となっている。放射線被ばくによって惹起された脳内炎症が放射線照射後も長時間にわたって持続し、脳組織損傷を引き起こしているものと考えられている。放射線照射によってアポトーシスを起こした神経細胞の炎症反応が隣接する正常細胞へ拡がり、その後の脳の発達へ悪影響を及ぼす可能性があるため、アポトーシスした神経細胞は直ちに除去されることが脳組織を守るために非常に重要である。ミクログリアは脳における免疫担当細胞であり、放射線照射によって神経細胞がアポトーシスを起こすと活性化して死細胞をファゴサイトーシス(phagocytosis)によって貪食・除去し、脳組織の修復・維持に必須な役割を果たしている。放射線照射等によって神経細胞がアポトーシスを起こすと、神経細胞の表面に露出された CRT (calreticulin)あるいはフォスファチジルセリン(PS)が活性化したミクログリアにとっての "eat-me signal" となり、CRT は LRP (low-density lipoprotein receptor related protein) を、PS は VNR (vitronectin receptor) あるいは MERTK (MER receptor tyrosine kinase) 等を介して Rho-family small GTPase 系を活性化し、ミクログリアのアクチン細胞骨格系が再構築されてアポトーシス細胞の貪食、ファゴソームの形成などファゴサイトーシスに伴うダイナミックな細胞形態変化が惹起される。一方、アルツハイマー病あるいは多発性硬化症などの神経変性疾患においては活性化したミクログリアが過剰な炎症を引き起こし様々な疾患の原因となっていると考えられており、ミクログリアは中枢神経系疾患治療薬開発の主要なターゲットともなっている。このような神経保護的に働く活性化したミクログリア (M2型) に相反して神経傷害性に働く活性化型ミクログリア (M1型) を制御することが神経変性疾患治療の主要なターゲットとなっている。

2. 研究の目的

活性化したミクログリアの極性転換に関わる分子スイッチの候補が明らかになり始めているが、マウス脳内における薬剤投与後のミクログリアの挙動・動態を長時間観察することは極めて困難であり極性スイッチの解明が課題として残されている。脊椎動物に共通する基本的かつ普遍的なメカニズムを研究する上で小型魚類のモデル生物であるメダカ胚は、哺乳類と異なり体外で発生し、かつ脳が透明なので、放射線により脳内へ誘発されたアポトーシス細胞とそれらを貪食するミクログリアの活性化を *in vivo* イメージングによって非侵襲的・継続的に観察が出来る利点がある。同じ小型魚類モデルであるゼブラフィッシュはミクログリアを GFP で標識したトランスジェニック魚が作製され、ライブイメージングによりミクログリアの動態を解析する研究が盛んに進められている。ゼブラフィッシュが受精後 2 日で孵化するのに対して孵化までに 9 日間を要しゆっくりとした成長過程を経るメダカ胚は、放射線により脳内へ誘発されたアポトーシス細胞とそれらを貪食するミクログリアの活性化をより詳細に観察することが出来る利点がある。筆者は放射線照射後の脳内で誘発されたアポトーシス細胞がミクログリア細胞により貪食、除去される過程を詳細に観察するため、メダカをモデル生物として研究を行った。

3. 研究の方法

筆者はまず、放射線照射後にメダカ胚脳内へ誘発されるアポトーシス細胞の経時変化をアクリジンオレンジ染色、およびそれらを貪食・除去するミクログリアを電子顕微鏡による形態的解析から詳細に調べ明らかにした (Yasuda et al., Plos one, 2015)。アポトーシス細胞の貪食過程は、1) ミクログリアがその食胞内にアポトーシス細胞を取り込み phagosome を形成する過程、2) 食胞内へ取り込んだアポトーシス細胞を消化後産生した debris を代謝する過程、2つに大別される。前者の過程では T cell の遊走において重要であるアクチン結合タンパク質 L-plastin 遺伝子の発現、後者の過程では消化されたアポトーシス細胞の debris から産生される脂質等を代謝するため ApoE 遺伝子の発現が上昇するものと考えられる(左図)。同じ小型魚類モデルであるゼブラフィッシュ胚でもミクログリアの特異的なマーカーとして用いられている

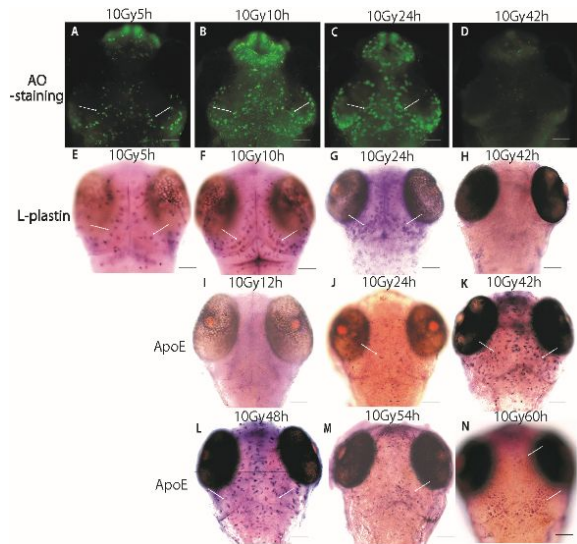


L-plastin, ApoE それぞれの遺伝子をプローブとして、メダカ胚全体で *in situ* ハイブリダイゼーション (WISH) 解析を行い、放射線被ばく後の脳内で活性化するミクログリアの経時変化を空間的に明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

(1) 放射線照射後、メダカ胚脳で観察されたミクログリアの動態

放射線照射 24 時間後までは A0 染色で確認されたアポトーシス細胞が誘発される場所とはほぼ完全に一致して L-plastin 遺伝子の発現上昇が観察された。照射 42 時間後には放射線誘発アポトーシスはミクログリアの食胞内で完全に消化されて除去されるため、アクリジンオレンジ染色によるシグナルは検出されず、L-plastin 遺伝子の発現も消失していた。一方、ApoE 遺伝子の発現は照射 24 時間後に少数のミクログリアにおいて観察され、照射 42 時間後には ApoE を発現するミクログリアが急激に増加し、かつ脳全体へ広がった。多数のミクログリアが活性化し ApoE 遺伝子を発現した様相は照射 54 時間後に至るまで継続しており、活性化したミクログリアがアポトーシス細胞の貪食を終えた後も 10 時間以上の長時間にわたり脳内全体を遊走することを見出した(右図)。放射線照射後のメダカ胚脳内では、アポトーシスした神経細胞は照射 40 時間後内に活性化したミクログリアによってすべて貪食・除去されるが、その後もミクログリアの過剰な活性化状態はすぐに収まることなく、照射後 3 日(72 時間)が経過しても活性化が沈静化することなく持続していることを見出した(Yasuda et al., 2015, 2017)。筆者は、活性化したミクログリアの貪食過程の異なるフェーズで発現が上昇する 2 つの遺伝子、L-plastin と ApoE をプローブに用いることにより、活性化したミクログリアがアポトーシスした神経細胞を貪食・除去する一連の動態を明らかにすることに成功した。

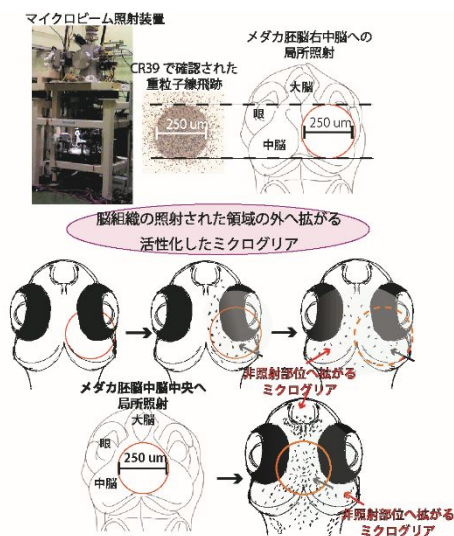


このようにメダカ胚の脳内において貪食過程が終了した後も、過剰に活性化したミクログリアがサイトカインを放出して脳内炎症を持続的に誘導している可能性が考えられたことから、選択的にミクログリアの過剰な活性化を抑制することによって放射線治療予後に誘起される脳機能障害を回避できるとの着想に至った。そこで筆者は放射線治療のさらなる最適化の可能性を検討するため、量研機構との共同研究により重イオンマイクロビーム照射装置を用いてメダカ胚脳へ局所照射をする技術を確認し、局所的な放射線照射により誘発・活性化するミクログリアの動態を明らかにすることを試みた。

(2) メダカ胚中脳局所照射部位以外へ広がる活性化したミクログリアの動態

メダカ胚脳へ局所照射が可能な重イオンマイクロビーム照射装置を利用して、250 μm 径の重粒子炭素線マイクロビーム(10 Gy)をメダカ胚中脳(視蓋)の右葉のみに照射した。メダカ胚中脳視蓋の最大幅は 500 μm なので 250 μm 径マイクロビームはちょうど視蓋右葉のみを照射できる。照射 24 時間後に照射胚頭部の組織切片を作製してアポトーシスが誘発された部位を確認したところ、狙い通り右網膜、右視蓋に多数の核凝縮した細胞死が検出され、左脳には細胞死が観察されず、A0 染色により脳全体で放射線誘発アポトーシスを検討した結果においても、マイクロビームを限局照射した右葉のみにアポトーシスが誘発されていた。

活性化したミクログリアの脳内分布を L-plastin 遺伝子をプローブとして局所照射 24 時間後に WISH 解析した結果、照射された右葉視蓋でのみミクログリアが活性化されており、ミクログリアが脳全体で活性化される全体照射とは大きく異なっていた。さらに ApoE 遺伝子をプローブとして、損傷した神経細胞が貪食除去される照射 42 時間後に活性化しているミクログリアの分布を WISH 解析した結果、照射した領域の外の視蓋左葉へも活性化したミクログリアが分布を拡げていた。重粒子炭素線(10 Gy)の 250 μm 径マイクロビームを使メダカ胚の中脳中央部を狙って局所照射後、ApoE 遺伝子をプローブとして照射 42 時間後に WISH 解析した結果、メダカ胚の脳の中脳中央部のみへの局所照射でも視蓋中央の照射域以外の部位、さらに照射の外の大脳へも活性化したミクログリアの分布が広がるとの結果が得られた(Yasuda et al., 2017)。



活性化したミクログリアの脳内分布を L-plastin 遺伝子をプローブとして局所照射 24 時間後に WISH 解析した結果、照射された右葉視蓋でのみミクログリアが活性化されており、ミクログリアが脳全体で活性化される全体照射とは大きく異なっていた。さらに ApoE 遺伝子をプローブとして、損傷した神経細胞が貪食除去される照射 42 時間後に活性化しているミクログリアの分布を WISH 解析した結果、照射した領域の外の視蓋左葉へも活性化したミクログリアが分布を拡げていた。重粒子炭素線(10 Gy)の 250 μm 径マイクロビームを使メダカ胚の中脳中央部を狙って局所照射後、ApoE 遺伝子をプローブとして照射 42 時間後に WISH 解析した結果、メダカ胚の脳の中脳中央部のみへの局所照射でも視蓋中央の照射域以外の部位、さらに照射の外の大脳へも活性化したミクログリアの分布が広がるとの結果が得られた(Yasuda et al., 2017)。

L-plastin を発現する前期活性化型のミクログリアは照射部位に限局したのに対して、ApoE を発現する後期活性化型のミクログリアはより数が増加し、さら

に照射域を超えて脳全体へ分布した。これらの結果は、放射線を照射後に脳損傷を除去するため活性化したミクログリアが損傷部位に局在する前期のフェーズと、脳組織の損傷を除去した後には損傷部位から脳全体へ活性化ミクログリアが広がる後期のフェーズに大別できることを示していると推察された(上図、Yasuda et al., 2017)。

(3) 将来の研究展望

筆者は放射線の照射により損傷してアポトーシスした神経細胞が提示する eat me シグナルを受け取ったミクログリアが活性化して L-plastin 遺伝子を発現し、細胞形状を変化させアポトーシス細胞を貪食・除去する照射 6 - 24 時間後の M2 型神経保護的なフェーズから、貪食の役割を終えたミクログリアが活性化した状態を継続したまま、ApoE 遺伝子を発現しながら脳全体へ蔓延する神経傷害性に働く M1 型のフェーズ(照射 40 時間 - 3 日後)へと移行することを明らかにした(Yasuda et al., 2015, 2017)。さらに、量研機構との共同研究により重イオンマイクロビーム照射装置を用いてメダカ胚脳の右葉中脳視蓋、脳中央部、特定の領域を狙った局所照射技術を確立し、局所的な放射線照射により誘発・活性化されるミクログリアの動態を調べたところ、照射 40 時間後には ApoE 遺伝子を発現した活性化ミクログリアが照射域以外の部位へ拡散することを明らかにした(Yasuda et al., 2017)。この様相は、M1 型にスイッチした活性化ミクログリアが炎症性のサイトカインを放出し、非照射域のミクログリアへ炎症反応を増幅して活性化させたと推察された。これらの結果から、メダカ胚を用いた *in vivo* 系薬剤スクリーニングにより ApoE を発現する過剰に活性化し脳内へ蔓延したミクログリアを制御することが新規な脳腫瘍放射線治療法の提案となると考えられた。筆者は L-plastin, ApoE 両遺伝子のプロモーターを用いて活性化の前期と後期を可視化できる 2 種類のトランスジェニックメダカ、TG(L-plastin::EGFP)および TG(ApoE::EGFP)を作成し現有しており(現在投稿準備中)、ミクログリア活性化抑制剤投与による M1 型・M2 型両者の活性化ミクログリアの挙動を TG メダカを使用してライブでモニターできる準備を整えた。

脳内免疫細胞としての役割を担うミクログリアは、神経傷害性にも保護的にも働く作用を有する諸刃の剣にたとえられる。神経傷害性に働く M1 型ミクログリアはサイトカインやケモカインを慢性的に放出し神経障害痛の要因になっており、M1 型ミクログリアの活性化を制御して炎症性物質の放出を制御することが神経障害痛の発生防止と治療になることが明らかになっている。一方で、神経保護的に働く M2 型ミクログリアから M1 型ミクログリアへ極性転換が起こるタイミングに関しては不明な点が多く、活性化したミクログリアの相反する 2 つの極性を選択的に制御することが神経変性疾患治療の主要な課題となっている。胚が体外で発生し脳が極めて透明でライブイメージングによって胚発生の過程、損傷した組織再生を詳細に観察可能な利点を有するメダカ胚を簡易なモデルとして利用し、アポトーシス細胞の貪食・除去、脳組織修復など神経保護的な M2 型の役割を抑制することなく過剰な M1 型ミクログリアの活性を制御するのに最適な薬剤、およびその投与時期に関する詳細な検証を行い、脊椎動物全般に共通する普遍的知見を得ていきたいと考えている。過剰な免疫系の活性化(免疫系の暴走)がもたらす悪影響は、放射線脳腫瘍治療予後に認められる副作用のみではなく、最近問題となっている新型コロナウイルス感染症の重症化の一因であるという報告もあり、免疫系の暴走を制御することを目的とする本研究が社会的な他の問題を解決する一助となることも期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yasuda Takako, Ishikawa Yuta, Shioya Noriko, Itoh Kazusa, Kamahori Miyuki, Nagata Kento, Takano Yoshiro, Mitani Hiroshi, Oda Shoji	4. 巻 13
2. 論文標題 Radical change of apoptotic strategy following irradiation during later period of embryogenesis in medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 13(8)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201790	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 該当する

1. 著者名 Yasuda T, Kamahori M, Nagata K, Watanabe-Asaka T, Suzuki M, Funayama T, Mitani H, Oda S.	4. 巻 18(7)
2. 論文標題 Abscopal Activation of Microglia in Embryonic Fish Brain Following Targeted Irradiation with Heavy-Ion Microbeam.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 1428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18071428	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 -

1. 著者名 保田隆子、舟山知夫、三谷啓志、尾田正二	4. 巻 53
2. 論文標題 メダカ胚で明らかになった放射線により活性化された脳内免疫細胞ミクログリアの動態	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 31-43
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 4件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takako Yasuda
2. 発表標題 Specific Recruitment of Brain Immune Cell of Microglia Following Irradiation-Induced Brain Injury in Embryonic Medaka Model
3. 学会等名 第10回国際放射線神経生物学会大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 保田隆子、中澤拓哉、三谷啓志、尾田正二
2. 発表標題 メダカ胚で明らかになった放射線損傷した網膜の再生へ寄与するSOX2発現前駆細胞
3. 学会等名 第62回大会日本放射線影響学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takako Yasuda
2. 発表標題 Dynamics of activated microglia in response to radiation-induced brain injury
3. 学会等名 ElyT meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takako Yasuda, Kei Hirakawa, Kento Nagata, Takuya Nakazawa, Hiroshi Mitani and Shoji Oda
2. 発表標題 Retinal regeneration by ectopic proliferation of SOX2-positive Muller glia cells in embryonic retina of medaka (<i>Oryzias latipes</i>)
3. 学会等名 小型魚類研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 保田隆子、平川慶、中澤拓哉、釜堀みゆき、永田健斗、三谷啓志、尾田正二
2. 発表標題 メダカ胚網膜で見出された休止組織幹細胞の増殖再開による放射線損傷の修復機構
3. 学会等名 日本放射線影響学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takako Yasuda*, Takuya Nakazawa, Kei Hirakawa, Kento Nagata, Hiroshi Mitani and Shoji Oda
2. 発表標題 SOX2 expressing Muller glia is essential for tissue regeneration in irradiated embryonic retina of medaka (<i>Oryzias latipes</i>)
3. 学会等名 国際放射線神経生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保田 隆子, 永田 健斗, 釜堀 みゆき, 鈴木 芳代, 横田 裕一郎, 舟山 知夫, 尾田 正二, 三谷 啓志
2. 発表標題 メダカ胞胚期における致死線量以下の放射線被ばくは孵化時の脳の形態形成異常を誘導しない
3. 学会等名 日本放射線影響学会第60回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takako Yasuda, Kento Nagata, Michiyo Suzuki, Tomoo Funayama, Hiroshi Mitani, Shoji Oda
2. 発表標題 Medaka embryo at blastula stage can restore the irradiation-induced damages and avoid malformations but late stage embryo cannot do so
3. 学会等名 第8回国際放射線神経生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takako Yasuda
2. 発表標題 Abscopal Activated Immune Cell of Microglia Following Targeted Irradiation with Heavy-Ion Microbeam in Embryonic Fish Brain
3. 学会等名 63rd Annual International Meeting of Radiation Research Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 保田 隆子、尾田 正二、舟山 知夫、三谷 啓志
2. 発表標題 量子ビーム技術を活用した放射線生物物理学の最前線；メダカ胚で観察された重イオン局所照射によって誘発される照射野以外への影響
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 保田隆子、五十嵐健人、浅香智美、永田健斗、鈴木芳代、横田裕一郎、尾田正二、舟山知夫、三谷啓志
2. 発表標題 メダカ胚をモデルとした小児がん脳腫瘍放射線照射に伴う脳内免疫細胞ミクログリアの応答
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 保田隆子、五十嵐健人、舟山知夫、尾田正二、三谷啓志
2. 発表標題 メダカ胚をモデルとした免疫細胞ミクログリアの放射線応答と脳腫瘍治療への応用
3. 学会等名 日本放射線影響学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 保田隆子、五十嵐健人、浅香智美、永田健斗、鈴木芳代、横田裕一郎、尾田正二、舟山知夫、三谷啓志
2. 発表標題 メダカをモデルとした小児がん脳腫瘍放射線照射に伴う脳内免疫細胞ミクログリアの応答
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Takako Yasuda
2. 発表標題 Embryonic medaka model unveiling efficient apoptotic cell clearance by specific microglial recruitment in response to irradiation
3. 学会等名 国際放射線神経生物学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

メダカ胚で明らかになった活性化したミクログリアが脳内損傷部位から脳全体へ拡がる可能性
http://www.k.u-tokyo.ac.jp/info/entry/7_entry56/

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