

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20014

研究課題名(和文) 脳梗塞辺縁部のNG2陽性マイクログリアの機能解析と脳梗塞治療への応用

研究課題名(英文) Functional analysis of NG2 positive microglia at the periphery of cerebral infarction and its application to cerebral infarction therapy

研究代表者

松本 調 (Matsumoto, Shirabe)

愛媛大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：30772503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞辺縁部に存在する活性化マイクログリアは、変性しアポトーシスする神経細胞を取り囲み貪食する。脳梗塞辺縁部で、mRNAの発現で、TREM2やeat-me signal のアポトーシス細胞の貪食に関連するMFG-E8, MerTK, Gas6, Protein S, 補体(C1q, C3)のmRNAが上昇していた。免疫組織染色で、活性化マイクログリアはCD68陽性ファゴソームをもち、C3, ProteinS陽性のNeuronに接着していた。マイクログリアは、これらの貪食関連の分子を介して、ニューロンを選択的に貪食していることが示唆され、緩徐な神経細胞死を抑制するターゲットとなりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Activated microglia present at the periphery of cerebral infarction surround and phagocytose degenerating and apoptotic neurons. The mRNAs of MFG-E8, MerTK, Gas6, Protein S, complement (C1q, C3) related to phagocytosis of apoptotic cells of TREM2 and eat-me signal are elevated at the periphery of the cerebral infarction. In the immunohistochemical staining, activated microglia had CD68 positive phagosome and adhered to C3, ProteinS positive Neuron. It was suggested that microglia selectively phagocytizes neurons via these phagocytosis - related molecules, suggesting the possibility of being a target to suppress slow nerve cell death.

研究分野：脳虚血

キーワード：脳虚血 マイクログリア 神経細胞死

1. 研究開始当初の背景

**脳梗塞病態のマクロファージとマイクログリア**

従来マイクログリアは、脳病態時に活性化し、最終的にはアメーバ型を呈する貪食細胞に変化すると考えられてきた。しかし、我々は、マイクログリアは虚血に弱く、極めて早期に死滅することを示し (Matsumoto et al. J Neurosci Res. 2007)、この概念が誤っていることを明らかにした。梗塞巣中心部で変性神経細胞等を貪食するのは骨髄由来(単球由来)のマクロファージである。これらのマクロファージの多くは、マクロファージ・マイクログリアのマーカーである Iba1 およびオリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカーである NG2 chondroitin sulfate proteoglycan (NG2) を発現することから、この細胞を BINCs (Brain Iba1+/NG2+ Cells)としてきた(Matsumoto et al. J Cereb Blood Flow Metab, 2008)。一方、脳梗塞中心部には、NG2 を発現しないマクロファージも集積し、これら 2 種類の細胞はマクロファージ活性化抑制分子 CD200 分子の発現の有無で分類できた(右図)(Matsumoto et al. J Neuroimmunol, 2015)。このように、脳梗塞中心部には、2 種類のマクロファージが存在し、分布も異なっていた。

**脳梗塞辺縁部でのマイクログリア : MFG-E8 および神経細胞の eat-me シグナル**

それでは、脳常在性マイクログリアは何をしているのか。虚血辺縁部で、マイクログリアは活性化し、NG2 を発現、変性神経細胞を取り囲み貪食している (Sugimoto et al. Glia, 2014)。脳梗塞中心部では、BINCs が TGF が高発現し、TGF は培養マイクログリアの NG2 や貪食細胞マーカーの発現が促進した(Glia, 2014)。TGF は、Milk fat globule-epidermal growth factor-factor 8(MFG-E8:アポトーシス細胞に結合し貪食を促進する分子)発現も増強する(Spittau et al.Glia, 2015)。

2. 研究の目的

上記の結果より、緩徐な神経細胞死が観察される脳梗塞巣辺縁部では、脳常在性マイクログリアの活性化像が観察される。この活性化マイクログリアの多くは NG2 コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (NG2) を発現している。我々はこの NG2+マイクログリアが、変性しつつある神経細胞を取り囲み貪食することを観察してきた。しかし、この細胞群が、神経細胞死を積極的に促進しているのか、虚血性神経細胞死が決定した後に貪食して再生修復を促しているのか、現在のところ明らかではない。本研究では、MFG-E8 などのアポトーシス細胞の貪食シグナル経路の経時的变化を解析し、NG2+マイクログリアの役割を見極め、脳梗塞への新たな治療応用を検討する。

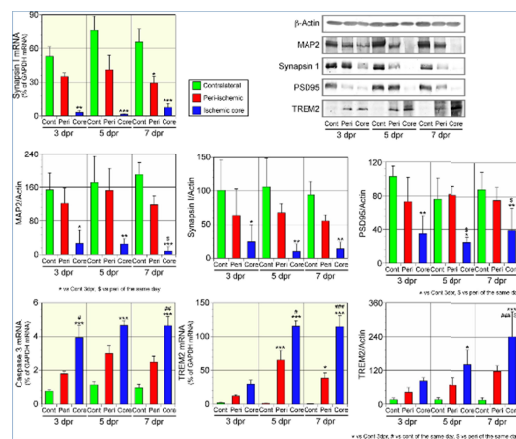
3. 研究の方法

生後 8 週の雄性ウィスターラット使用する。脳梗塞モデルとしてすでに確立されている一過性中 大脳動脈閉塞 tMCAO モデルを作成する。MCAO 作成 1 日、3 日、5 日、7 日経過後に、2 mm 厚の線条体位置でスライスを作成し、脳梗塞巣中心部、辺縁部、対側の組織から、電気泳動サンプル、total RNA を調整し、それぞれウエスタンブロットティング、定量的リアルタイム RT-PCR(qPCR)を行い、脳梗塞辺縁部における NG2+マイクログリアによる神経細胞の貪食に関わる分子を同定する。アポトーシス細胞貪食に関わる分子(MFG-E8, VNR, GAS6, ProteinS, MerTK,CD68, MMPs 等)の発現を調べる。また、IL-1、iNOS、PHOX など、神経細胞のアポトーシスを誘導する可能性のある因子、逆に神経細胞保護に関わる因子 HGF や IGF-1 等の発現も調べる。MFG-E8 発現を誘導する TGF 1 発現についても、丁寧な検索を行う。

免疫組織化学的研究 : MCAO 作成 1 日、3 日、5 日、7 日経過後にラットを灌流固定し、凍結切片を作成、活性化カスパーゼ 3 や MFG-E8, VNR, GAS6, ProteinS, MerTK 等とマイクログリアおよび神経細胞マーカーとの多重免疫組織染色を行い、これらの因子の時間的・空間的分布について高精度 /高倍率の対物レンズを用いた共焦点顕微鏡による観察を行う。例えば、GAS6 を発現していない神経細胞に MFG-E8 陽性のマイクログリアが密着していれば、マイクログリアの貪食プロセスが先にあることになり、マイクログリアが神経細胞死を誘導していることの証拠になる。逆ならば、先に決定した神経細胞死に追隨して、マイクログリアの活性化が起こることを示す。

4. 研究成果

**Caspase3 の上昇は、TREM2 上昇に先行して起**

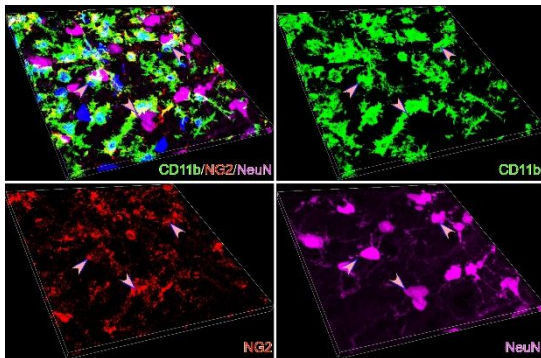


**こっている**

**神経細胞マーカー及びアポトーシス関連分子の虚血脳における発現変動**

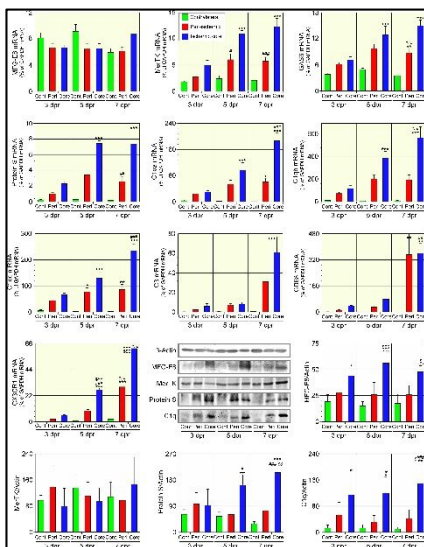
神経細胞マーカー(シナプシン 1、MAP2、

PSD95)、アポトーシス関連分子カスパーゼ3、TREM2 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 2)の mRNA、タンパク質発現の時間的空間的発現変化を定量的リアルタイム RT-PCR 及びウエスタンブロッティングで調べた。神経細胞マーカーの虚血部位での発現低下は 3、5、7dpr のいずれのポイントでも大差がない。また、アポトーシスに先立って発現上昇する Caspase 3-mRNA の発現も、虚血部位で高いままに経過している。一方、マイクログリアが発現するアポトーシス細胞認識分子 TREM2 は、5dpr 以降に発現が上昇する。これらの結果は、マイクログリアが神経細胞を死に追い込むとの考えとは一致しない。



**脳梗塞辺縁部での NG2 陽性活性化マイクログリアによる神経細胞の貪食像**  
**虚血巣辺縁部での活性化マイクログリアの神経細胞への密着**

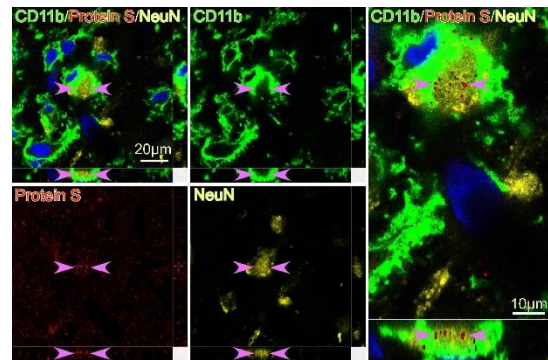
tMCAO 後 7 日の虚血周辺領域を共焦点顕微鏡により 3D 観察した。虚血周辺領域では多くのマイクログリアがオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC または NG2 グリア) マーカーの NG2 コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (NG2) を発現しており、これらは貪食能が高まったマイクログリアであると考えている。NG2 陽性マイクログリアは、神経細胞に密着して、それらを貪食していると考えている。



**Gas6, ProteinS, MerTK, C1q は 5dpr 以後、C3, CD68 は 7dpr 以後に上昇する**

**Eat-me signal 認識分子群 mRNA およびタンパク質の発現変動**

PS 認識分子の MFG-E8 mRNA 発現には空間的・経時的変動が見られない。一方、GAS6 と Protein S、その受容体の MerTK は 5dpr より増加する。補体 C1 も 5dpr より増加したが、C3 は 7dpr になって初めて顕著に増加した。更に興味深いことは、貪食細胞マーカー CD68 の mRNA は、7dpr のみで有意な増加を示した。MFG-E8 タンパク質は、mRNA と異なり、Core では 3dpr から上昇傾向を示した。mRNA とタンパク質の間で解離がある MFG-E8 の発現は、MFG-E8 がタンパク質レベルで制御されているとする Cheyuo ら (Neuropharmacology 2012)の報告と一致する。MerTK タンパク質は、mRNA と異なり大きな変化がない。Protein S は、mRNA と同様 5dpr から上昇した。C1q タンパク質は、やはり、mRNA と異なり 3dpr から上昇していた。



**貪食される神経細胞表面に ProteinS が結合している**

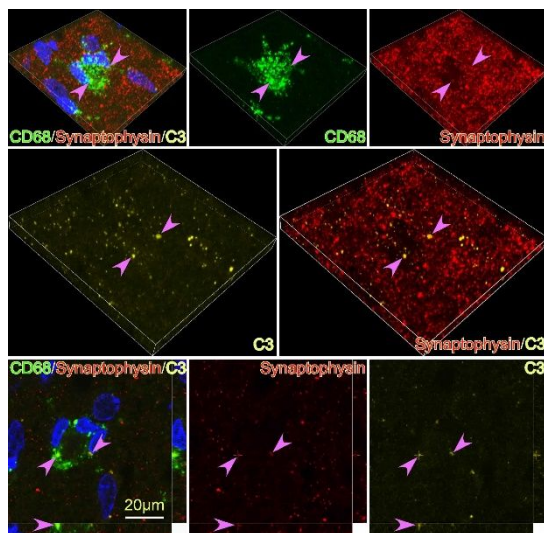
**7dpr 虚血周辺領域において、Protein S は貪食される神経細胞上に存在**

Eat-me signal 認識分子 Protein S、マイクログリアマーカー CD11b、神経細胞マーカー NeuN 及び DNA 結合色素 Hoechst 33258 による 4 重染色の共焦点顕微鏡による観察。マイクログリアは変性神経細胞を貪食しようとしているが、神経細胞表面に Protein S (矢尻) が結合しており、マイクログリアの貪食を促進するオプソニンとしての作用が推測される。

**神経細胞は C3 を発現し、CD68 陽性マクログリアによって貪食されている**

7dpr 虚血周辺領域において、C3 も貪食される神経細胞上に存在

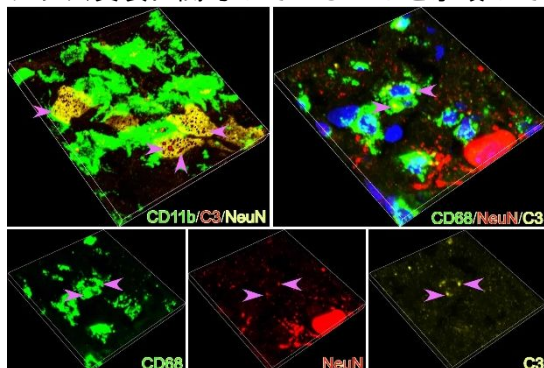
Eat-me signal 認識分子補体の C3、マクログリアマーカーCD11b または CD68、神経細胞マーカーNeuN、Hoechst 33258 による 4 重染色の共焦点顕微鏡による観察。マクログリアは変性神経細胞を貪食しようとしているが、神経細胞表面に C3 (矢尻) が結合していた。また、マクログリア細胞内 CD68 陽性ファゴソームに C3 が恐らく結合した NeuN タンパク質が取り込まれている。これらの結果は、C3 のマクログリアの貪食を促進するオプソニンとしての作用が推測される。なお CD11b は C3 の分解物である C3b の受容体を形成するタンパク質である。



**C3 はシナプトフィジンとともに、CD68 陽性マクログリアに貪食されている**

7dpr 虚血周辺領域において、C3 はシナプス貪食にも関与

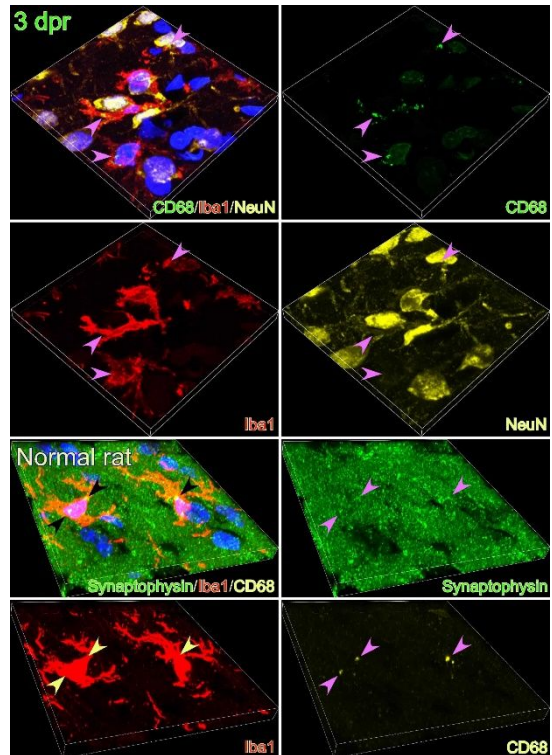
補体の C3、マクログリア/貪食細胞マーカーCD68、シナプス前終末マーカーシナプトフィジン、Hoechst 33258 による 4 重染色の共焦点顕微鏡による観察。マクログリア内 CD68 陽性ファゴソーム内に C3 とともにシナプトフィジンが局在。虚血周辺部で、C3 がシナプス貪食に関与していることを示唆して



いる。

**3dpr でもマクログリアは神経細胞と密着しているが、積極的な貪食像とはいえない**

3dpr 虚血周辺領域における CD68 陽性ファゴソームは小さく数も少なく、正常脳のマクログリアと大差がない



3 dpr 虚血周辺部でも、マクログリアは神経細胞に密着する像は頻りに観察されるが、それらのマクログリア細胞体内には CD68 陽性ファゴソームは数は少なく大きさも小さい。これらは、いわゆる synaptic stripping の像に類似するもので、神経細胞を積極的に貪食しているとは考えにくい。下図は正常成熟脳の CD68 (赤) と Iba1 (緑) の 2 重染色像であるが、正常脳でもマクログリア細胞体内にはしばしば CD68 陽性ファゴソームが存在する。3dpr のファゴソームはこれらと大きくは変わらない。また、正常脳内でもシナプス貪食をするマクログリアがしばしば見られる。

ラット tMCAO 脳梗塞モデル亜急性期 (3-7 dpr) の虚血辺縁部において NG2 陽性マクログリアによる神経細胞貪食が観察される。この脳梗塞モデルでは、caspase3 の発現より、3dpr までに大部分の神経細胞死が完了している。MFG-E8、GAS6、Protein S/MerTK、補体の 3 つの eat-me signal 認識分子群のうち、MFG-E8 を除くと、5dpr 以降に発現が上昇し、補体の C3 は 7dpr になって初めて有意な上昇を示した。ProteinS や C3 は貪食される神経細胞表面に発現している像が観察でき、Gas6、ProteinS/MerTK や補体が脳梗塞辺縁部の神経細胞の貪食に関わっている分子と考えられる。

これらの結果は、マクログリアは死が決定

された神経細胞を貪食するのであって、マイクログリアの貪食が神経細胞死を加速しているとは考えにくいことを示唆している。

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 3件)

1 Sustained anti-inflammatory effects of TGF-β1 on microglia/macrophages.

Islam A, Choudhury ME, Kigami Y, Utsunomiya R, Matsumoto S, Watanabe H, Kumon Y, Kunieda T, Yano H, Tanaka J.

**Biochim Biophys Acta.** 2018 1864(3) : 721-734 査読あり

2 Truncated CD200 stimulates tumor immunity leading to fewer lung metastases in a novel Wistar rat metastasis model.

Kuwabara J, Umakoshi A, Abe N, Sumida Y, Ohsumi S, Usa E, Taguchi K, Choudhury ME, Yano H, Matsumoto S, Kunieda T, Takahashi H, Yorozuya T, Watanabe Y, Tanaka J.

**Biochem Biophys Res Commun.**2018 496(2) : 542-548 査読あり

3 A Truncated form of CD200 (CD200S) Expressed on Glioma Cells Prolonged Survival in a Rat Glioma Model by Induction of a Dendritic Cell-Like Phenotype in Tumor-Associated Macrophages.

Kana Kobayashi, Hajime Yano, Akihiro Umakoshi, Shirabe Matsumoto, Ayano Mise, Yu Funahashi, Yoshitomo Ueno, Yoshiaki Kamei, Yasutsugu Takada, Yoshiaki Kumon, Takanori Ohnishi, Junya Tanaka

**Neoplasia.** 2016 April 18(4) : 229-41 査読あり

[学会発表](計 2件)

1 発表者名 松本 調

発表演題 ラット脳梗塞巣における IL-3 と GM-CSF 混合皮下投与の有効性の検討

学会 脳神経外科学会総会 2017  
2017-10

2 発表者名 松本 調

発表演題 脳梗塞に対する IL-3/GM-CSF の混合投与による骨髄刺激療法有効性の検討

学会 Stroke2017  
2017-3

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 調 (Matsumoto, Shirabe)

愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座  
助教

研究者番号：30772503