

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21457

研究課題名(和文) 発達脳における新規構造物BUDOの存在意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the significance of the novel structure BUDO in the developing brain

研究代表者

小山 隆太 (Koyama, Ryuta)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授

研究者番号：90431890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳内で多量の出血が生じると、血中の細胞毒性成分の放出等により脳組織に損傷が生じ、脳機能障害に繋がる。本研究では、健全な生後初期マウスを用いて、脳内出血に対する細胞応答とその機構の解明を目的とした研究を行った。その結果、マウスの脳内出血は生後約2週間にわたり脳内の広範な領域で生じており、出血部位ではマイクログリアが赤血球を貪食してBUDO構造をとることが明らかとなった。この赤血球貪食マイクログリアはヘムオキシゲナーゼ分解酵素(HO-1)の発現を介して細胞保護的な役割を果たすとともに、非赤血球貪食性マイクログリアとは異なる遺伝子発現パターンを有するようになることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、健全マウスにおいて生後初期限定的に脳内出血が生じていることを発見した。そして、マイクログリアが葡萄の様な構造をとり(BUDO構造)、HO-1を介して赤血球を貪食することで、発達期脳における細胞保護的な役割を担うことを明らかにした。さらに、赤血球除去がほぼ終了している生後2週齢においては、HO-1発現マイクログリアは成熟マイクログリアの形態を示す一方で、マイクログリア恒常性遺伝子の発現低下をはじめ特徴的な遺伝子発現を示すことを明らかにした。本研究は、脳内出血を生後初期マウスで初めて網羅的に解析し、それに対するマイクログリアの細胞応答や分子メカニズムを明らかにした点で意義深いと考える。

研究成果の概要(英文)：When a significant amount of bleeding occurs in the brain, it leads to the release of cytotoxic components from the blood, resulting in brain tissue damage and subsequent dysfunction. In this study, we aimed to investigate the cellular response to intracerebral hemorrhage and elucidate its underlying mechanism in early postnatal mice. Our results showed that intracerebral hemorrhage in mice occurs extensively throughout the brain at approximately two weeks after birth. Furthermore, we observed that microglia phagocytose erythrocytes and adopt a BUDO (Bubbly Dense Organization) structure at the site of hemorrhage. Notably, we found that erythrophagocytic microglia play a cytoprotective role through the expression of heme oxygenase-degrading enzyme (HO-1) and display a distinct gene expression pattern compared to non-phagocytic microglia.

研究分野：神経科学

キーワード：マイクログリア 貪食 血管 赤血球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は生後マウス脳において新規構造物の存在を発見し、葡萄のような形状のこの構造物を Bubbly Dense Organization (BUDO) と名付けた。BUDO は生後マウス脳の全域にわたって確認されたが、この構造物の正体は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では BUDO の細胞種を詳細に同定し、その機能や存在意義を探索することを目的とした研究を行った。本研究は、研究開始当時までその存在が報告されてこなかった構造物の種類や性質を同定しようとする探索的性質の強い挑戦的な研究である。また、BUDO の細胞種と機能、そして機能制御の方法の確立に成功すれば、脳発達や脳内免疫研究の学術的な方向性を転換させる潜在性を有する。

3. 研究の方法

方法 1 : BUDO の時空間的存在様式の同定。

C57BL/6J 系統もしくは ICR 系統のマウスを生後 0 日齢において無菌下で灌流固定し、その脳切片を観察したところ、局所的に赤色自家蛍光が散見された。自家蛍光の正体はおそらく細胞死に関連する死細胞片などであると考えられた。また、自家蛍光周囲には、リソソームのマーカー CD68 陽性の球が複数集まった葡萄のような構造を発見したため、これを BUDO と命名した。そして、各種マーカーの発現様式やタイムラプスイメージングから、BUDO はマイクログリアが構造を変化させたものであると考察した。そして、BUDO 構造が生じる時期や局在部位に関して、免疫組織化学的手法によって、詳細に検証した。

方法 2 : RNA シーケンスによる BUDO の遺伝子解析。

BUDO は CX3CR1GFP/+マウス (マクロファージやマイクログリアが GFP でラベルされている遺伝子改変マウス) の脳内で GFP 蛍光を発する。この性質を利用し、蛍光顕微鏡観察下、マウス脳切片内の GFP 陽性 BUDO を微小電極内に吸引した。このようにして得られた BUDO の RNA シーケンス (RNA-Seq) をおこなった。これにより、既知遺伝子の発現定量解析や未知の発現領域の同定と定量をおこない、BUDO のより詳細な同定をおこなった。特に、正常なマイクログリアとの遺伝子発現量を比較し、マイクログリアが BUDO に変化するために必要な遺伝子の同定を試みた。

方法 3 : 組織切片培養法を利用した BUDO のライブイメージング。

CX3CR1GFP/+マウスより脳切片を作成して培養した。この培養組織切片を共焦点顕微鏡によって蛍光タイムラプスイメージングすることで、マイクログリアが BUDO に変化する様子を検証した。組織切片培養系は薬理学的手法や遺伝学的手法の応用が可能であり、ライブイメージングと組み合わせることで BUDO の機能解析を進めた。

方法 4 : 脳発達における BUDO の存在意義の解明。

方法 1 ~ 3 によって得られた情報をもとに BUDO の存在意義を明らかにすることを試みた。特に、方法 2 によってマイクログリアから BUDO への変化に必要な遺伝子として、HO-1 を同定したため、その発現を抑制することで、周囲の組織に与える影響を検証した。また、HO-1 発現に伴って赤色蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変マウスを利用することによって、BUDO 構造をとったマイクログリアを長期的にトレースして、その遺伝子発現特性を検証した。これにより、発達期における脳内出血の意義を理解することを試みた。

4. 研究成果

【結果・考察】

4 - 1 . 生後初期マウス脳内で出血が生じ、赤血球を貪食したマイクログリアは BUDO 構造を形成した。

まず、健常な生後初期マウスにおいて脳内出血が生じているのかを確認した。生後 0 日齢の野生型 C57BL/6J マウスの脳切片を用いて、赤血球と血管マーカーの免疫組織染色により脳内出血の有無を全脳で網羅的に調べたところ、脳内出血が生じていることが再現よく確認できた。このような生理的条件下における脳内出血は、様々な脳領域で見られた。次に、出血に対する細胞応答を明らかにするため、脳内細胞の各マーカーと赤血球との共染色を行なった。その結果、脳内免疫細胞であるマイクログリアが、通常マイクログリア (分枝した複雑な突起を有する) とは異なる特徴的な球形の形態を有しており、出血に反応していることが示唆された。マイクログリアは脳内の不要なタンパク質や異物を感知すると、それらを貪食、分解することで脳内から除去し、恒常性維持に寄与する。実際に、赤血球も細胞内消化器官であるリソソームの中に内包されていたことから、マイクログリアに貪食されていることが示された。なお、他の脳内細胞 (神

経細胞やアストロサイトなど)は出血部位において顕著な形態変化を示さなかった。そこで、以降の解析ではマイクログリアの出血応答に着目した。球状の CD68 が集積した構造を細胞体内に持つという形態的特徴をもとに、赤血球貪食マイクログリアの存在時期を調べたところ、生後約 2 週間に集中して見られ、成体脳にはほとんど存在しなかった。以上より、健常マウスでは生後初期特異的に脳内出血が生じ、マイクログリアが赤血球を貪食していることが示された。

4 - 2 . 赤血球貪食マイクログリアでは H0-1 が高発現していた。

次に、マイクログリアの赤血球貪食機構を明らかにするため、赤血球貪食マイクログリアの網羅的な遺伝子解析を試みた。そのためには、赤血球貪食マイクログリアを生きた状態で単離する必要がある。そこで、マイクログリアが GFP で標識されたマウス脳より急性切片を作製し、形態的特徴より赤血球貪食マイクログリアを同定してガラス電極を用いて吸引することで単離した。非貪食マイクログリアと比較して、赤血球貪食マイクログリアでは Hmx1 が最も大きな発現変動を示していた。Hmx1 はヘムオキシゲナーゼ 1 (Heme oxygenase-1、以降 H0-1) をコードする遺伝子で、ストレス刺激に対し急性的な発現上昇を示し、ヘムの分解を担う。H0-1 のタンパク質発現を免疫組織染色により確認したところ、出血部位にて、赤血球貪食マイクログリア特異的に高発現していた。赤血球に豊富に含まれるヘムは強い細胞毒性を有することから、ヘムの無毒化を担う H0-1 は赤血球除去時のマイクログリアにおいて重要な役割を担うことが予想された。

4 - 3 . マイクログリアの H0-1 は赤血球の取り込みおよび細胞傷害の抑制に必要であった。

上記の結果を受けて、生後初期健常脳におけるマイクログリアの H0-1 が阻害されると、赤血球除去に異常が生じ組織傷害が生じるのではないかと考えた。そこで、赤血球の無毒化に重要と考えられる H0-1 を、Cre-loxP システムによる遺伝子改変技術を利用してマイクログリア特異的に欠損したマウスを作製した。なお本マウスでは、H0-1 の欠損に加え、赤色蛍光タンパク質である DsRed が H0-1 のレポーター遺伝子として挿入されている。よって、コントロールマウス (H0-1-DsRed) では H0-1 プロモーターの活性化により H0-1 と DsRed の双方が発現するのに対し、ノックアウト (KO) マウスでは DsRed のみが発現する系となっている。このマウスを用いて、まず生後 0 日齢の出血部位において細胞死マーカーである cleaved caspase-3 面積を解析したところ、H0-1 KO により増加していた。よって、マイクログリアの H0-1 は出血に由来する細胞毒性を抑制することが示唆された。また、意外なことに、出血部位においてマイクログリアの形態が、コントロールマウスと H0-1 KO マウスで異なることを発見した。コントロールマウスではこれまでの結果と一致して赤血球貪食マイクログリアは、突起を退縮させ細胞体が肥大化した形態を示していた。さらに、細胞体内部では赤血球を包含し球状になったリソソームが集積した構造を有していた。一方、H0-1 KO マウスの出血部位では、マイクログリアは細胞体が肥大化しているものの、球状のリソソームが集積した構造は見られなかった。この結果と一致して、マイクログリアに取り込まれた赤血球の数が、H0-1KO により減少していた。以上の結果から、発達期においてマイクログリアの H0-1 は赤血球の無毒化だけではなく取り込みにも必要であり、出血に対して細胞保護的な役割を示すことが明らかとなった。

4 - 4 . H0-1 発現が赤血球貪食後のマイクログリアに及ぼす影響の解析。

貪食とは、対象物の認識、取り込み、分解、放出及びリサイクルなど多数のステップからなる連続的な現象であり、マイクログリアによる貪食後の応答は貪食物に応じて異なる (Hamanaka et al., 2020)。これを踏まえると、マイクログリアの脳内出血への応答は、赤血球貪食に留まらず、より長期的な様相を呈すると考えられる。そこでまず、脳内出血に応答したマイクログリアの長期的なダイナミクスを視覚的に捉えるために、ex vivo でのタイムラプスイメージングを行なった。出血応答マイクログリアを特異的に観察するため、前述の H0-1-DsRed マウス (H0-1 プロモーターの下流で H0-1 と DsRed の双方が発現する) を用いて観察したところ、DsRed 陽性マイクログリアは時間経過に伴い丸型から複雑な突起を有する形へと変化した。続いて、同様の形態変化が in vivo でも生じているのかを調べるため、固定切片の観察を行った。その結果、生後 0 日齢では DsRed 陽性マイクログリアは赤血球を貪食し丸型の形態であったのに対し、赤血球除去がほぼ終了している生後 14 日齢において、DsRed 陽性マイクログリアは複雑な突起を有した形でクラスター状に存在しており、ex vivo の観察と矛盾しない結果が得られた。そこで、脳内出血により H0-1 を高発現した可能性のある DsRed 陽性マイクログリアの性質を探るため、1 細胞 RNA シーケンスを行なった。DsRed 高発現クラスターを解析した結果、Ft11 や Cd63 など鉄代謝に関連する遺伝子が高発現していた。その一方、恒常性マイクログリアに特異的とされる遺伝子は低発現であった。この性質は、生後初期マイクログリアのヘテロ性を主張した過去の報告における亜集団の 1 つと部分的に類似している (Li et al., 2019)。これらの結果より、出血応答に伴う H0-1 発現が生後初期のマイクログリアの遺伝子発現変化に関与する可能性が考えられる。

5 . まとめ

本研究では、健常マウスにおいて生後初期限定的に脳内出血が生じていることを発見した。そして赤血球が脳内に残存する生後 0 日齢において、マイクログリアは H0-1 を介して赤血球を貪食し細胞保護的な役割を担うことを明らかにした。そして、赤血球を貪食中のマイクログリアは、複数の赤血球を取り込むことで、葡萄の様な構造 (BUDO 構造) を保っていることが明らかにな

った。さらに、赤血球除去がほぼ終了している生後 14 日齢においては、ムオキシゲナーゼ 1(Heme oxygenase-1、以降 HO-1) 発現マイクログリアは成熟マイクログリアの形態を示す一方で、マイクログリア恒常性遺伝子の発現低下をはじめ特徴的な遺伝子発現を示すことを明らかにした。本研究は、病的条件下ではなく生理的条件下における脳内出血をマウスで初めて網羅的に解析し、それに対する細胞応答や分子メカニズムを明らかにした点で意義深い。今後は、P2RY12 低発現マイクログリアの集団が神経活動に及ぼす影響を検証することで、新たな発達期マイクログリアの機能が明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hoshi Yutaka, Shibasaki Koji, Gailly Philippe, Ikegaya Yuji, Koyama Ryuta	4. 巻 7
2. 論文標題 Thermosensitive receptors in neural stem cells link stress-induced hyperthermia to impaired neurogenesis via microglial engulfment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabj8080
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abj8080	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 Andoh Megumi, Koyama Ryuta	4. 巻 10
2. 論文標題 Comparative Review of Microglia and Monocytes in CNS Phagocytosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2555 ~ 2555
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10102555	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 Ogaki Ari, Ikegaya Yuji, Koyama Ryuta	4. 巻 22
2. 論文標題 Extracellular Vesicles Taken up by Astrocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10553 ~ 10553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221910553	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 Kono Rena, Ikegaya Yuji, Koyama Ryuta	4. 巻 10
2. 論文標題 Phagocytic Glial Cells in Brain Homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1348 ~ 1348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10061348	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 Andoh Megumi, Koyama Ryuta	4. 巻 81
2. 論文標題 Microglia regulate synaptic development and plasticity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Neurobiology	6. 最初と最後の頁 568 ~ 590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dneu.22814	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2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小山隆太
2. 発表標題 食食に伴って変化するミクログリア情報のデコーディング
3. 学会等名 第95回日本薬理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小山隆太
2. 発表標題 The role of erythrophagocytosis by microglia in brain development
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------