

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15330

研究課題名（和文）ミクログリアのパトロール機構と神経系細胞との相互作用の時空間的解析

研究課題名（英文）Spatiotemporal analysis of microglial patrolling activity and their interaction with neural lineage cells

研究代表者

服部 祐季（Hattori, Yuki）

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10754955

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：脳には、神経系細胞の他にも免疫系の細胞であるミクログリアが存在し、脳の機能を支えている。本研究課題は、胎生期から生後にわたる時期における脳発生過程において、大脳原基内でのミクログリアの局在変化のメカニズムを明らかにし、その生理学的意義を明らかにすることを目標に研究を推進した。本研究により、マウスにおいてミクログリアが脳に移入し、その後定着・テリトリーを形成するプロセスについて、独自に開発した細胞動態解析等を通じてその一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ミクログリアの脳定着経路には複数存在することが明らかとなった。その違いによってどのような細胞特性が生まれ、それぞれがいかに脳機能に貢献するのかについて現在も研究を推進している。ミクログリアが脳定着後に周囲環境によって性質変化する可能性も考えられるため、今後はその両面からミクログリアの性質多様性がいかにして決定され、脳形成あるいは将来の脳機能に貢献するのか明らかにしていく。また、生理条件下での現象を十分に理解することで、神経発達障害等の病態理解に貢献できるよう努める。

研究成果の概要（英文）：In the brain, not only neural lineage cells but also immune cells called microglia exist and contribute to the brain various function. This research project aims to clarify the mechanism underlying how microglia change their distribution and migration pattern in the developing brain from the embryonic to postnatal period, and elucidate their physiological functions in the process of brain development. Through the in vivo live imaging system we newly established and other analyses, we revealed the process of microglial colonization into the developing brain and the mechanisms of their territory formation in the brain in mice.

研究分野：神経発生

キーワード：ミクログリア マクロファージ 脳発生 胎児 神経 グリア イメージング

1. 研究開始当初の背景

脳には、神経細胞の他にも免疫系の細胞であるミクログリアが存在し、脳の機能を支えている^{1,2}。ミクログリアの成体脳におけるミクログリアの機能解明が進んできた一方、近年、胎生期や生後の脳においても神経前駆細胞の分化制御や血管形成・構造維持に関わるなどさまざまな役割を担うことが明らかになりつつある³。一方で、近年急速に発展したシングルセル遺伝子発現解析により、ミクログリアには遺伝子発現的にも多様性があることが示されたが、どのようなプロセスを経て多様性を獲得するのかは依然不明であった。

2. 研究の目的

そこで、ミクログリアがいかに多様性を獲得するのかについて明らかにするため、本研究では特に「ミクログリアが脳実質にたどりつくまでの分布経路あるいは定着時期が性質多様性に関係する可能性」について注目し、その検証とメカニズムを解明することを目的に、調べることにした。

3. 研究の方法

中枢神経系には、ミクログリアに加えて、非常によく似た性質を持つ異なる細胞集団である脳境界マクロファージが存在する^{4,5}。脳境界マクロファージは、脳膜（胎生期での呼称）やその後の髄膜（硬膜、くも膜、軟膜）、脳室、血管周囲スペース、脈絡叢といった血管・間葉組織系と脳実質の境界に位置する細胞集団である。ミクログリアと脳境界マクロファージは起源が同じであることが知られており、どちらも卵黄嚢内で形成される血島から生じる Erythromyeloid progenitor (EMP) に由来する⁶。しかし、両者の運命選択がいつ・どこでなされるのかについては未解明である。そこで私たちは、マウスの脳スライス培養下ライブイメージング、二光子顕微鏡を用いた胎仔脳 in vivo イメージング（胎生早期のマウスに対する観察システムを新たに構築）、マクロファージマーカーのフェイトマッピング、細胞標識・追跡解析等を通じて、胎生早期にミクログリアが脳に定着する際にたどる分布ルートの同定やその細胞動態および分子メカニズムの解析を行った。

4. 研究成果

(1) 脳スライス培養イメージングによる脳室マクロファージの大脳原基への流入の観察

まず、マウス胎生早期の脳におけるミクログリアおよび脳境界マクロファージの分布を免疫染色により調べた。胎生 14 日目以降は大脳原基に存在する CX3CR1 陽性細胞のほとんどが CD206 陰性・P2RY12 陽性でミクログリアの性質を示し、CD206 陽性・P2RY12 陰性の特徴を有する脳境界マクロファージは脳室や脳膜に限局し、両者の分布は明瞭に分かれていた。一方、胎生 12 日目では大脳原基内に CD206 陽性細胞が 50~60% を占めていた。詳細に観察すると、脳室内腔には多数の脳境界マクロファージが脳室面に張り付いた状態で存在しており、大脳原基に向かってその細胞突起を侵入させている様子が観察された。そこで、胎生早期に脳室マクロファージが流入し、その後脳実質内でミクログリアへと運命を転換する可能性を考えた (図 1)。

ミクログリアと脳境界関連マクロファージが緑色蛍光タンパク質 GFP を発現する *Cx3cr1-gfp*^{tg} マウスを用いて、脳スライスの培養下ライブイメージングを行った。脳室マクロファージの挙動を観察したところ、マウス胎生 12 日目に大脳原基内へと高頻度で侵入することを見出した。これに対して、胎生 13 日目以降ではその侵入がほとんど起こらなかった。一方、胎生 12 日目から胎生後期にかけては、脳膜から大脳原基実質へのマクロファージ流入がほぼ起こらないことを確認した。これらの観察結果から、胎生 12 日目は脳室マクロファージの流入が発生しやすく、侵入を許容できる特有の時期であることが示唆された。

さらに、脳室マクロファージが背側の間葉組織から蓋板と呼ばれる部分を通り抜けて供給されることを併せて捉えたことから、ミクログリアが脳にたどりつくまでの一つの経路として、「蓋板→脳室→大脳原基」という経路が存在することを見出した。

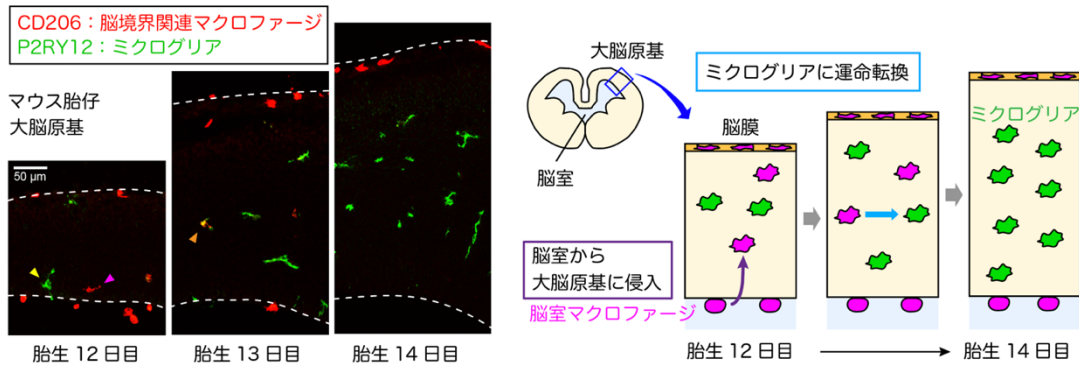


図1. マウス胎生早期のミクログリアと脳境界関連マクロファージの分布と仮説

マウス胎生12~14日目の大脳原基および脳境界（脳室・脳膜）におけるミクログリアおよび脳境界マクロファージの分布を示す。胎生14日目では、両者の分布が大脳原基と脳境界で明瞭に分かれるのに対し、胎生12~13日目では脳境界マクロファージが大脳原基内に存在する（左）。したがって、胎生12日目前後で脳境界からマクロファージが大脳原基に侵入し、その後ミクログリアへと運命転換するという仮説を立てた（右）。

(2) 胎仔脳 in vivo イメージングシステムによる細胞動態観察

しかし、脳スライス培養の観察では脳に外科的侵襲を与えるため、その影響を否定できなかった。そこで、観察した現象が実際に生体内で起こるのかを調べるため、胎生12日目のマウス胎仔に対する in vivo ライブイメージングシステムを新たに構築した（図2）。胎生12日目のマウス胎仔に対し、胎盤を残した状態で母体から切り離し、温度・酸素供給を整えた外部環境下で生育することにより、生きた状態で二光子顕微鏡による観察を行った。この方法を用いて、固定器具内で直立させた胎仔の頭頂部から脳内深部を観察し、脳室マクロファージが大脳原基に侵入する瞬間を実際に捉えることができた。従って、脳室マクロファージの流入は実際の生体内でも起こる現象であることが示された。

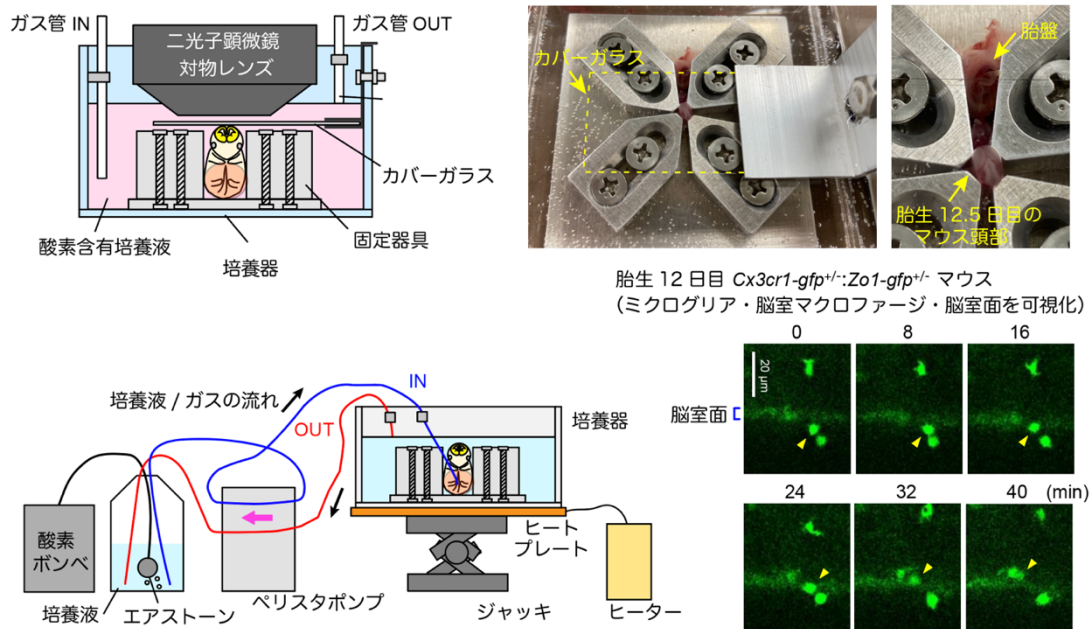


図2. 二光子顕微鏡によるマウス胎仔脳 in vivo イメージングシステム

マウス胎生12日目の in vivo 脳内イメージングシステムの概要。酸素供給と胎仔の体温管理をすることで、胎仔の生育を維持しながら脳内の細胞動態を観察することができる。実験では、*Cx3cr1-gfp* マウスに *Zol1-gfp* マウスを掛け合わせ、脳室面も標識した。Zol1: 脳室面近傍で形成されるタイトジャンクションで発現するタンパク質。

(3) 脳室マクロファージは脳原基に侵入後ミクログリアに分化する

次に、脳原基に侵入した脳室マクロファージがその後ミクログリアに運命転換する可能性について検証した。まず、*Cx3cr1-gfp*^{+/+}マウスから単離したマクロファージを野生型マウスの脳室内に移植し、その2日後に移植した細胞 (GFP 陽性) の性質を調べるという実験を行った。その結果、GFP 陽性細胞は脳室内に存在する時点ではまだマクロファージの性質を保持していたが、脳原基に侵入した細胞はマクロファージの性質を失い、代わりにミクログリアの性質を獲得していることが分かった。また、脳室内に微量の蛍光色素を投与することによって脳室マクロファージのみに蛍光色素を取り込ませ、その後の分布や性質を追跡する解析も実施した。その結果、脳室マクロファージが脳原基内に入った後にミクログリアの性質を獲得することを確認した。以上の結果から、脳境界マクロファージは脳原基内部の環境に呼応してミクログリアに分化できることが明らかとなった。

さらに、実質中のミクログリアのうち、脳室マクロファージ由来の細胞がどのくらいの割合存在するのかを調べるため、CD206 陽性細胞のフェイトマッピング解析を行った。胎生 11~12 日目頃に CD206 を発現していた細胞を標識し (*Mre11[CD206]-CreERT2:Ai14* マウス⁷ の使用による解析)、その後の細胞の性質を追跡解析したところ、胎生 14 日目や生後 0 日目の時点で、脳原基に存在するミクログリアのうち約 6 分の 1 の割合の細胞が過去に CD206 を発現していた細胞であることが示された (図 3)。

以上の結果から、ミクログリアには少なくとも 2 つの分布経路をつかって脳に定着し、胎生 9~10 日目頃にミクログリアの性質を備えて脳に定着を開始する群に加えて、その後遅れて胎生 12 日目頃に脳室から流入する群に由来することが明らかとなった。

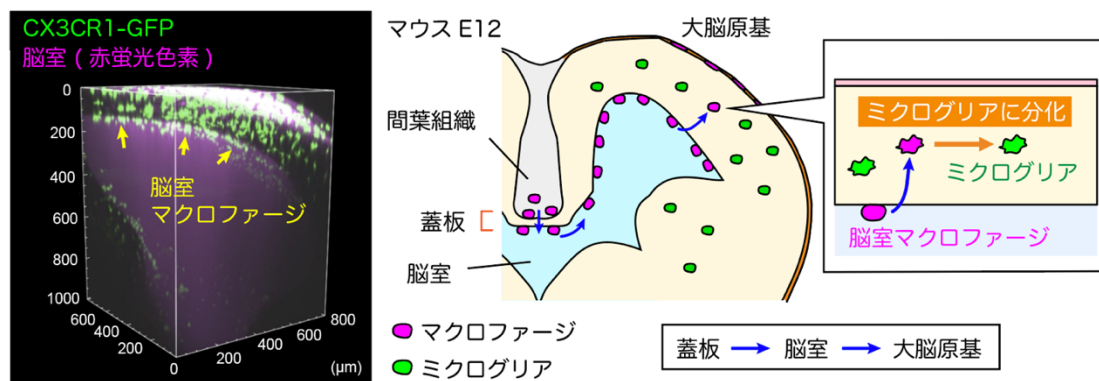


図 3. ミクログリアの脳室マクロファージを介する脳定着ルート

ミクログリアがたどると考えられる脳定着ルート。はじめに胎生 9~10 日目頃にミクログリアの性質を備えた細胞集団の定着が起これ、その後胎生 12 日目頃に脳室マクロファージの流入が生じ一部のミクログリア集団を形成する。脳室マクロファージは、間葉組織から蓋板を通過して供給される。

(4) 考察

ミクログリアには多岐にわたる機能があることが見えてきた一方で、近年のシングルセル解析の発展により、胎生期から生後・成体期にわたって徐々に性質を変化させること、また、時間軸の変化だけでなく、同じ時期でも性質の異なる細胞集団が存在することが明らかとなっている^{8,9}。しかし、ミクログリアがどのようにして機能的あるいは性質の多様性を獲得するのかは明らかにされていない。本稿で示したように、ミクログリアには異なる分布ルートをつかって脳に定着する細胞集団が存在することが明らかとなった。由来・分布ルートの違いが将来獲得する性質を左右する可能性は有り得ると同時に、脳に定着したのちに周囲の環境によって性質が賦与される可能性も十分に考えられる。このような観点から、どの要因がミクログリアの多様性を制御しているのかについては今後解明が待たれる。また遺伝子発現の多様性が認められたとして、それが機能的な面で脳発生・高次脳機能にいかに関与するのかといった、性質と機能の連関についても明らかにする必要がある。また生理条件下でのミクログリア機能の理解に加えて、さまざまな病態下における変容についても今後さらなる研究展開が期待される。

尚、本研究成果は、2023年2月7日（火）付で米国科学誌「Cell Reports」誌に掲載された。

発表雑誌 : Hattori, Y. et al. CD206⁺ macrophages transventricularly infiltrate the early embryonic cerebral wall to differentiate into microglia. *Cell Rep.*, 42(2):112092 (2023).

<引用文献>

- 1) Borst, K., Dumas, A.A., Prinz, M. Microglia: Immune and non-immune functions. *Immunity*, 54(10): 2194–2208 (2021).
- 2) Li, Q and Barres, B.A. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 18:225–242 (2018).
- 3) Hattori, Y. The behavior and functions of embryonic microglia. *Anat. Sci. Int.*, 97(1):1–14 (2022).
- 4) Kierdorf, K., Masuda, T., Jordão, M.J.C., et al. Macrophages at CNS interfaces: ontogeny and function in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 20(9):547-562 (2019).
- 5) Prinz, M., Masuda, T., Wheeler, M.A., et al. Microglia and Central Nervous System-Associated Macrophages-From Origin to Disease Modulation. *Annu. Rev. Immunol.*, 39:251–277 (2021).
- 6) Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330:841–845 (2010).
- 7) Masuda, T., Amann, L., Monaco, G., et al. Specification of CNS macrophage subsets occurs postnatally in defined niches. *Nature* 604(7907):740–748 (2022).
- 8) Hammond, T.R., Dufort, C., Dissing-Olesen, L., et al. Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity* 50:253–271, e256 (2019).
- 9) Van Hove, H., Martens, L., Scheyltjens, I., et al. A single-cell atlas of mouse brain macrophages reveals unique transcriptional identities shaped by ontogeny and tissue environment. *Nat. Neurosci.*, 22:1021–1035 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hattori Yuki, Kato Daisuke, Murayama Futoshi, Koike Sota, Asai Hisa, Yamasaki Ayato, Naito Yu, Kawaguchi Ayano, Konishi Hiroyuki, Prinz Marco, Masuda Takahiro, Wake Hiroaki, Miyata Takaki	4. 巻 42
2. 論文標題 CD206+ macrophages transventricularly infiltrate the early embryonic cerebral wall to differentiate into microglia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112092 ~ 112092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112092	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 Hattori Yuki	4. 巻 12
2. 論文標題 The Multiple Roles of Pericytes in Vascular Formation and Microglial Functions in the Brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 1835 ~ 1835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life12111835	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 Hattori Yuki	4. 巻 187
2. 論文標題 The microglia-blood vessel interactions in the developing brain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 58 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2022.09.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 TsujiKawa Koyo, Hamanaka Kohei, Riku Yuichi, Hattori Yuki, ..., Masahisa Katsuno	4. 巻 8
2. 論文標題 Actin-binding protein filamin-A drives tau aggregation and contributes to progressive supranuclear palsy pathology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabm5029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abm5029	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 Hattori Y*, Itoh H, Tsugawa Y, Nishida Y, Kurata K, Uemura A, Miyata T.	4. 巻 42(3)
2. 論文標題 Embryonic pericytes promote microglial homeostasis and their effects on neural progenitors in the developing cerebral cortex.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Neurosci	6. 最初と最後の頁 362-376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1201-21.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hattori Y*	4. 巻 97
2. 論文標題 The behavior and functions of embryonic microglia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anat Sci Int	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-021-00631-w	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17件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 胎生期脳におけるミクログリアの細胞動態と多様性獲得プロセスの理解
3. 学会等名 第128回日本解剖学会・全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 胎生期脳におけるミクログリアの細胞動態と多様性獲得プロセスの理解
3. 学会等名 若手・中堅脳科学研究者のオンライン勉強会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 細胞動態解析から読み解くミクログリア多様性獲得メカニズム
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 ミクログリアが脳原基に定着するまでの細胞動態メカニズム
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会 ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 ミクログリアが脳原基に定着するまでの細胞動態メカニズム
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 ワークショップ講演 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Hattori
2. 発表標題 Microglial cellular dynamics and heterogeneity in the developing brain
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 JST創発的研究支援事業共催フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Hattori
2. 発表標題 The cellular dynamics and mechanisms of microglial colonization into the embryonic cerebral wall
3. 学会等名 Heterogeneity of Glial Functions in Development and Disease (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 脳室内腔マクロファージが一部のミクログリアの供給源になる可能性
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 【グリアデコード】マウス胎生早期における脳室内腔マクロファージとミクログリアの細胞動態
3. 学会等名 JAAS第1回総会・キックオフミーティング
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 胎生早期大脳におけるミクログリアとマクロファージの細胞動態
3. 学会等名 日本発生物学会第55回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 ミクログリア多様性の理解と母体炎症による影響の解明
3. 学会等名 JST創発的研究支援事業「融合の場」第1回公開シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 胎生期ミクログリアの分布経緯と 多様性獲得との関連性
3. 学会等名 第127回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 胎生期における脳室内腔マクロファージとミクログリアの細胞動態
3. 学会等名 第5回Neurovascular meeting
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 The dynamics and functions of embryonic microglia in the developing cortex
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会 ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 胎生期大脳におけるミクログリア分布の時空間的制御とその意義
3. 学会等名 第23回プレミアムレクチャー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Hattori
2. 発表標題 Spatiotemporal control of microglial absence is essential for the proper maturation of postmigratory neurons
3. 学会等名 The 71th Annual Meeting Korean Association of Anatomists, Korea-China-Japan Webinar（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 服部祐季
2. 発表標題 Microglial dynamics and its contribution to neurogenesis in mouse embryonic cerebral cortex
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会/第1回 CJK 国際会議
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 服部祐季	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 Medical Science Digest 2022年12月号グリアデコード：新領域の発展性	

1. 著者名 服部祐季	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 実験医学2022年11月号 Vol.40 No.18「脳をしなやかに制御するミクログリアと脳内免疫系」	

1. 著者名 服部祐季	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日本薬学会	5. 総ページ数 6
3. 書名 ファルマシア 最前線 胎生期大脳におけるミクログリアの分布調節機構とその意義	

1. 著者名 服部祐季	4. 発行年 2022年
2. 出版社 名古屋大学医学部	5. 総ページ数 4
3. 書名 名大医学部学友時報 第868号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>脳内の免疫細胞ミクログリアが脳に定着するための"新しいルート"を発見 https://research-er.jp/articles/view/119211 Alternative route used by specialized immune cells https://www.eurekalert.org/news-releases/985758 New approach to fighting fetal brain dysfunction https://medicalxpress.com/news/2023-04-approach-fetal-brain-dysfunction.html 血管の周りを覆う細胞ペリサイトの新しい機能を発見～ミクログリアの恒常性を維持し脳発生をサポート～ https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/research/pdf/Jou_Neu_211124.pdf 胎生期大脳におけるミクログリア分布の時空間的制御とその生理学的意義 https://www.anatomy.or.jp/hiroba/award202004-4/</p>

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
---------	---------