

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591522

研究課題名(和文) 中枢神経疾患動物モデルにおけるミクログリアのトランスクリプトーム解析

研究課題名(英文) Transcriptome analysis of microglia using animal model of brain diseases

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・主席研究員

研究者番号：50425683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウス実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)急性期のミクログリアでトランスクリプトーム解析を行い、MHC分子などの炎症関連分子のほかに、I型インターフェロン誘導因子、脂質代謝関連分子などが上昇することを見いだした。骨髄未分化細胞とアストロサイトの共培養系を用いた実験で、アストロサイトが産生するIL-34がミクログリアの増殖と分化に重要な役割を果たすことを見いだした。中枢神経系の炎症におけるミクログリアのプリン受容体の役割を解析し、アデノシンA2A受容体が炎症の存在化で発現が上昇し、A1、A2A受容体の阻害薬投与により上清中へのIL-1 $\beta$ の分泌は増加した。

研究成果の概要(英文)：Transcriptome analyses of microglia revealed that not only inflammatory but interferon- and lipid metabolism-associated genes were upregulated at the peak stage of experimental autoimmune encephalomyelitis. Using co-culture model of bone marrow immature cells and astrocytes, interleukin34 proved to be crucial for the proliferation and differentiation of microglia. Microglial adenosine A2A receptor was upregulated in the context of inflammation and negatively regulated interleukin 1 $\beta$  production.

研究分野：神経免疫学

キーワード：ミクログリア 神経炎症 トランスクリプトーム

## 1. 研究開始当初の背景

小児の神経疾患の中で感染・免疫性神経疾患が占める割合は成人よりも高い。またてんかんや神経変性疾患であっても、感染を契機に発症、増悪あるいは緩解することが稀でない。

中枢神経系の細胞の中で、免疫反応の中核を担うのはミクログリアである。ミクログリアは単球・マクローファージなどと同様に骨髄系細胞に由来し、胎生期中枢神経系内に移動して定着すると考えられている。ミクログリアは感染・免疫性神経疾患に加えて神経変性疾患、脳血管傷害、脳腫瘍、てんかんなどにおいても活性化が見られる。また中枢神経系以外の感染症に対してもミクログリアは遠隔的に反応して活性化されることが知られている。このことは、ミクログリアが中枢神経系の炎症、神経変性、細胞死、組織の修復と再生など様々な過程に関与することを示している。実際にミクログリアは多様な機能分子を発現し、周囲の環境に応じて様々な異なる作用を発揮する。

このように多彩なミクログリアの機能は、主に *in vitro* の培養細胞を用いた研究から明らかにされてきたが、一方で疾患という環境の中でミクログリアが果たす役割は十分解明されていない。ある疾患に対するミクログリアの機能を善玉/悪玉という単純な価値基準で判断するのは適切でなく、個々の病態においてミクログリアが発現する分子や細胞内シグナルの変化を詳細に解析する必要がある。

## 2. 研究の目的

小児の様々な中枢神経疾患においてミクログリアの活性化が見られるが、その作用は炎症の形成、死細胞の貪食、組織の修復や再生など多岐にわたる。ミクログリアの役割は疾患によって異なり、かつ一つの疾患の中でも病相に応じて刻々と変化すると推定されるが、疾患動物モデルを用いてその機能を横断的/縦断的に解析した研究はほとんどない。本研究では多発性硬化症、非炎症性脱髄性疾患、てんかんなど様々な疾患動物モデルを使用し、疾患の急性期/慢性期におけるミクログリアの活性化状態をトランスクリプトーム解析の手法で包括的に解析する。これにより疾患特異的に発現が変化する候補分子を同定し、分子生物学的手法や *in vitro* の培養系を用いてさらに詳細な解析を加える。またこれらの分子の機能を解析するために疾患動物モデルを使用して阻害実験などを

行う。このように疾患動物モデルにおけるミクログリアの動態を直接的に解析することで、病態の形成に重要な分子やシステムを探索するとともに、これらを修飾することでミクログリアの機能を調節するという新たな治療戦略の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) ミクログリアの活性化や分化に関する因子を同定するため、マイクロレイによるトランスクリプトーム解析を行った。C57BL/6 マウスに実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導し、急性期および回復期の脳・脊髄を採取した。これらからフローサイトメトリー法でミクログリアを単離し、RNA を抽出してマイクロレイを行った。同様に cuprizone 経口投与による脱髄モデルを誘導し、脳からミクログリアを単離した。これらを正常脳・脊髄のミクログリアと比較検討した。さらに脾臓および腹腔内のマクローファージを単離し、ミクログリアとの間の比較も行った。

(2) アストロサイトとの共培養により骨髄細胞からミクログリアを誘導する培養系において、抗 IL-34 抗体の投与による中和効果を検討した。IL-34 の存在下で誘導したミクログリア様細胞と M-CSF 存在下で誘導した細胞について、細胞表面マーカーの発現や貪食能を比較した。

(3) ミクログリアのトランスクリプトーム解析の結果、マクローファージと比較してミクログリア特異的に高発現する因子として EBF3 を抽出した。そこでマウスアストロサイト上で骨髄未分化細胞を共培養してミクログリアへ分化誘導する実験系を用いて、EBF3 がミクログリアの分化へ及ぼす影響を調べた。また EBF3 が EAE に及ぼす影響を検討するため、EAE を誘導したマウスに EBF3 siRNA を *in vivo* で投与して臨床症状を観察した。

(4) グリア伝達物質である細胞外の ATP がミクログリアの遊走や突起の伸展を制御し、プリン受容体である P2Y12, P2Y13 受容体の発現がミクログリアで特異的に高いことが注目されている。しかしこれらの受容体がミクログリアの炎症とどのような関わりを持つかについては知られていない。

不死化ミクログリア細胞株である MG6 細胞 (独立行政法人農業生物資源研究所 遺伝子組換え家畜研究センター 木谷 裕 先生より、理研バイオリソースセンターを介して供与) ならびにマウス一次混合グリア培養より単離したミクログリアを用いた。これら

の細胞を LPS および ATP で刺激し, IL-1 の産生を解析した. またミクログリアにおけるプリン受容体, CD39, CD73 の発現を解析した.

#### 4. 研究成果

(1) EAE の脊髄では MHC 分子などの炎症関連分子のほかに, いくつかの共通の機能を持つ因子群の発現が上昇していた. これらには I 型インターフェロン誘導因子, 脂質代謝関連分子などが含まれ, またいくつかの機能未知の分子も同定された. 一方でマクロファージと比較してミクログリアで特異的に発現が高い因子もいくつか同定され, この中にも機能未知の分子が含まれていた. これらの結果は定量 PCR 法によっても裏付けられた. ミクログリアの増殖にはマクロファージの成長因子である M-CSF が重要であるが, M-CSF と受容体を共有する新規サイトカイン interleukin 34(IL-34)もミクログリアを増殖させることが知られている. 我々はアストロサイトとの共培養により骨髄細胞からミクログリアを誘導する培養系を用いて, IL-34 がミクログリアの増殖だけでなくその分化にも重要であることを証明した. IL-34 で誘導した細胞はよりミクログリアに近い形態と機能を獲得した. 神経細胞とアストロサイトは IL-34 を産生しており, IL-34 が中枢神経系におけるミクログリアの分化に重要であることが示された.

(2) 共培養系において抗 IL-34 抗体の投与により IgG 投与群と比較してミクログリア様細胞への分化が有意に阻害された. IL-34 の存在下で誘導したミクログリア様細胞と M-CSF 存在下で誘導した細胞では MHC class I 分子, co-stimulatory molecule, F4/80, CD68, CD206 の発現は両者の間で明らかな差を認めず, IL-34 投与により M1/M2 シフトに相当するミクログリア形質の変化は認められなかった. また zymosan でコートされたマイクロビーズの貪食能についても差を認めなかった. またヒト末梢血から分離した単球をヒトアストロサイトと共培養した場合にもミクログリア様細胞が誘導され, この変化は IL-34 の添加により促進された.

(3) 共培養系において EBF3 siRNA を投与したところ, ミクログリアにおける EBF3 は 1/4 程度に抑制された. 骨髄未分化細胞より誘導されるミクログリアは EBF3 siRNA 投与により有意に増加した. 表面マーカー解析からこれらの細胞はミクログリアとしての基本的な性質を保っており, M2 マクロファージのマーカーである CD206 の発現がわずかに低下し

ていたものの, 多くの表面分子の発現に変化は認められなかった.

また MOG ペプチドによって誘導された実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) のマウスで, ミクログリアにおける EBF3 の発現が上昇していた. EAE を誘導したマウスに EBF3 siRNA を in vivo で投与した結果, EBF3 siRNA を投与したマウスでは EAE が重症化する傾向が認められた. しかしマウスから単離したミクログリアにおける EBF3 の発現は低下していなかった.

(4) ミクログリアを LPS と ATP で刺激すると上清中への IL-1 分泌が認められた. ATP と共にアデノシン A1, A2A 受容体の阻害薬である DPCPX, SCH-58261 を投与すると, IL-1 mRNA の発現に変化は見られなかったが, 上清中への IL-1 の分泌は増加した. アデノシン A1, A2A 受容体の刺激薬は IL-1 の産生に影響しなかった. 従ってミクログリアにおいてアデノシン A1, A2A 受容体を介するシグナルはインフラマソームの活性化を負に制御することにより IL-1 の分泌を調整していると考えられた. また LPS 刺激はミクログリアにおけるアデノシン A2A 受容体の発現を上昇させたが, A1 受容体の発現に変化は見られなかった. さらにミクログリアは ATP を ADP に変換する CD39 を発現していた. 以上よりアデノシン A2A 受容体は炎症の存在化で発現が上昇して, ATP の分解により生じたアデノシンの刺激により炎症を抑制する方向に働き, 炎症の負のフィードバック機構として作用すると推定された.

#### 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1件)

1. Noto D & Sakuma H (double first authors), Takahashi K, Saika R, Saga R, Yamada M, Yamamura T, Miyake S. Development of a Culture System to Induce Microglia-like Cells from Haematopoietic Cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014 40:697-713. doi: 10.1111/nan.12086. 査読あり

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔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 主席研究員）

研究者番号：50425683

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし