

## 論文の内容の要旨

論文題目 網膜内活性化マイクログリアの機能解析

氏名 森内 裕太

### 【研究背景】

マイクログリアは中枢神経に常在する組織マクロファージ様細胞であり、中枢神経系の恒常性維持や免疫機能を担っている。神経傷害時や神経変性疾患では、マイクログリアは活性化を受け、病変部に集積する。正常網膜ではマイクログリアは内網状膜層(IPL)と外網状膜層(OPL)に存在している。一方、視細胞変性疾患ではマイクログリアは視細胞層へ遊走し、サイトカインの産生や視細胞をファゴサイトーシスすることで変性の悪化、あるいは変性からの回復に寄与すると報告されているが、不明の点が多い。変性網膜ではマイクログリアのみならず、ミュラーグリアなどの複数の細胞種が病態形成に関与し、複雑な炎症ネットワークを形成することが想定される。既存の網膜変性モデル動物では、視細胞変性を初発段階として様々な細胞系列が活性化するため、活性化マイクログリアの役割を正確に評価することは困難である。一方で、視細胞変性は加齢と深く関わっているが、加齢による末梢の炎症が、マイクログリアを弱く活性化させ視細胞変性発症の背景となることも想定されている。マイクログリアの活性化に関与するシグナルの受容体として CSF1 受容体、Fcγ 受容体、TREM2 が報告されている。これら受容体の共通する下流シグナル経路として Ras シグナルが存在する。そこで Ras の活性化によりマイクログリアを活性化させ、この影響を評価する事で、視細胞変性の時のマイクログリアの役割を明らかにすることを目標とした。

### 【方法】

マイクログリアで Ras シグナルを活性化させるため、Ras 恒常的活性化型変異体である RasV12 をマイクログリアに発現可能なマウスを作成した。マイクログリア/マクロファージ特異的に CreER が発現する *Cx3cr1<sup>CreER/CreER</sup>* マウスと Cre 組換え依存的に *Ras V12* と *EGFP* の発現を誘導可能な *CAG-LSL-RasV12-IRES-EGFP* マウスと交配し、両アレルを有する *Cx3cr1<sup>CreER/+</sup>; CAG-LSL-RasV12-IRES-EGFP* マウス(Cx3cr1-RasV12 マウス)を作出した。このマウスはタモキシフェン投与によって、マイクログリア/単球・マクロファージ特

異的に Ras V12 の発現を誘導でき、かつ *IRE5-EGFP* カセットにより、RasV12 発現細胞を EGFP で可視化することができる。単球・マクロファージは骨髄の血液幹細胞から常に産生されているため、一時的に RasV12 を発現したマクロファージが出現しても、時間とともに正常マクロファージに置換されることが予測される。一方、マイクログリアは幹細胞より常に産生されないため、Cre により RasV12 の発現が誘導されたマイクログリアは網膜内にとどまることが予測される。さらに、*Cx3cr1<sup>CreER/+</sup>* マウスと組換え依存的に *EGFP* の発現を誘導可能な *CAG-LSL-EGFP* マウスと交配し、両アレルを有する *Cx3cr1<sup>CreER/+</sup>; CAG-LSL-EGFP* マウス(Control マウス)を作出した。このモデルを用いて、Ras シグナルを介したマイクログリアの活性化が網膜に与える影響を解析した。

## 【結果】

**Ras シグナルはマイクログリアの活性制御に関与する。**

生後 14 日目の *Cx3cr1-RasV12* マウスに、タモキシフェンを皮下投与し、投与後 1、3、5、7 日後に解析を行った。*Cx3cr1<sup>CreER</sup>* はマイクログリアだけでなく末梢血中に存在する単球にも発現しているため、タモキシフェン投与後 7 日目に単球での組換えをフローサイトメトリーで解析した。Control、*Cx3cr1-RasV12* いずれのマウスにおいても、CD11b 陽性の単球に占める EGFP 発現細胞の割合は、3%以下であった。次に、RasV12 を発現したマイクログリアの網膜内での分布を評価するため、マイクログリア特異的マーカーの *Tmem119* と EGFP を染色した結果、タモキシフェン投与 5、7 日後に正常網膜ではマイクログリアが存在しない視細胞層と神経節細胞層付近で EGFP *Tmem119* 共陽性細胞が分布していた。また、増殖細胞マーカー *Ki67* の染色を行った所、EGFP *Ki67* *Tmem119* 共陽性が確認できた。以上の結果から、Ras シグナルの活性化はマイクログリアの視細胞層への遊走、増殖を誘導することが明らかになった。さらに、タモキシフェン投与後 7 日目に活性化マイクログリアが産生しうる典型的なサイトカイン類の遺伝子発現を RT-qPCR 法で定量した結果、*Cx3cr1-RasV12* マウスの網膜でサイトカイン、ケモカイン類の遺伝子発現が有意に上昇していた。従って、Ras シグナルの活性化によってマイクログリアの活性化が誘導されることが明らかになった。

**Ras 活性化マイクログリアは視細胞変性を引き起こす。**

RasV12 を発現したマイクログリアが網膜に与える影響を調べるため、Hematoxylin and Eosin 染色を行った。その結果、Cx3cr1-RasV12 マウスの視細胞層で細胞が欠落している部位が確認された。次に、Ras 活性化マイクログリアによる視細胞変性誘導のメカニズムを明らかにすることを試みた。網膜色素変性症モデルの rd10 マウスでは活性化マイクログリアが IL-1 $\beta$  を産生し、視細胞に傷害を与え、その視細胞をファゴサイトーシスすることで変性の悪化に寄与することが報告されている。傷害を受けた視細胞はフォスファチジルセリン(PS)の細胞外へ露出させ、PS はファゴサイトーシス開始の合図となる Eat-me シグナルとして働き、マイクログリアによるファゴサイトーシスを促すことが知られている。まず、Cx3cr1-RasV12 マウスでサイトカインの遺伝子発現を定量した。その結果、神経変性に関与する *Il1b* と *Tnf* の発現が Cx3cr1-RasV12 マウスで有意に上昇していた。活性化マイクログリアは一酸化窒素合成酵素である iNOS を利用して神経傷害因子の一酸化窒素(NO)を合成する。Ras 活性化マイクログリアが NO を合成している可能性を検討するため、iNOS を染色した。その結果、Ras 活性化マイクログリアで iNOS が強く発現していた。従って、Ras 活性化マイクログリアが NO を合成していることが示唆された。次に Ras 活性化マイクログリアがファゴサイトーシスを介して視細胞変性を誘導している可能性を検証した。Cx3cr1-RasV12 マウスの網膜をファゴサイトーシスマーカーの CD68 を染色した結果、視細胞変性部位で EGFP CD68 Tmem119 共陽性細胞が集積していた。また、Cx3cr1-RasV12 マウスの視細胞で PS の細胞外露出を検出するため、網膜細胞を PS マーカーの Annexin V と視細胞マーカーの CD73 を染色し、フローサイトメトリーで解析した。Cx3cr1-RasV12 マウスの CD73 陽性分画で Annexin V 陽性細胞の割合が有意に増加していた。従って、Cx3cr1-RasV12 マウスでは視細胞特異的に PS が細胞外へ露出していることが明らかになった。さらに、実際に Ras 活性化マイクログリアが視細胞をファゴサイトーシスする様子をタイムラプスイメージングで観察した結果、Ras 活性化マイクログリアが視細胞の細胞核をファゴサイトーシスしている様子が観察された。以上から、Ras シグナルの活性化は視細胞のファゴサイトーシスを亢進させ、視細胞変性を誘導することが明らかになった。

#### **Ras 活性化マイクログリアの動態は網膜の領域によって異なる。**

Ras 活性化マイクログリアは視細胞層だけでなく、IPL にも分布している。しかし、これらの細胞層を構成している細胞の変性は観察されなかった。さらに、視細胞層に存在する Ras

活性化マイクログリアと IPL に存在する Ras 活性化マイクログリアの動態をタイムラプスイメージングで観察した。その結果、視細胞層に存在するマイクログリアは仮足を積極的に運動させているが、IPL に存在するマイクログリアの運動性は低かった。以上から、マイクログリアの活性状態が網膜内のニッチによって制御されることが示唆された。IPL で Ras 活性化マイクログリアの活性を制御した因子の候補として IL-33 が挙げられる。IL-33 は内顆粒層に存在するミューラグリアが特異的に発現し、マイクログリアを神経保護的な表現型にシフトさせることが報告されている。IL-33 が Ras 活性化マイクログリアの活性を制御しているかどうかを検討するため、Cx3cr1-RasV12 マウスに IL-33 タンパクを硝子体内注射した。IL-33 を投与した Cx3cr1-RasV12 マウスで、マイクログリアの神経傷害的な活性化を抑制する *Tgfb1* の遺伝子発現が上昇した。しかし、マイクログリアの分布と視細胞変性の程度は PBS を硝子体内注射した Cx3cr1-RasV12 マウスと同程度であった。

#### 【考察・今後の展望】

本研究により、Ras シグナルの活性化はマイクログリアの増殖、網膜内での遊走を引き起こすだけでなく、視細胞のファゴサイトーシスと視細胞変性の原因となることが示された。本研究の結果は、マイクログリアの活性化は、神経毒性を有するという仮説を初めて示したものである。一方、Ras 活性化マイクログリアの動態が網膜の領域によって異なり、かつ、視細胞特異的に変性が生じることを観察した。多くの網膜変性症は視細胞のみが変性を起こし、なぜ視細胞が特異的に変性するのか、という点についての合理的な説明はされておらず、本モデルはこの課題の解明にも有用なツールであることが明らかになった。本研究では IPL で Ras 活性化マイクログリアの活性を制御した因子の候補として IL-33 に着目した。しかし、IL-33 投与によって神経傷害的な Ras 活性化マイクログリアの活性を完全に抑制することはできなかった。この理由として IPL でのマイクログリアの制御は IL-33 のみならず、IL-34、CX3CL1、TGF- $\beta$ などの複数の因子によって制御されていることが挙げられる。例えば、IL-34 は網膜神経節細胞で特異的に発現しており、活性酸素種の不活化する抗酸化タンパク HO-1 の発現をマイクログリアで誘導することが報告されているため、Ras 活性化マイクログリアが産生する NO による神経傷害を保護した可能性がある。これらの候補因子がどのようなメカニズムを介して Ras 活性化マイクログリアの活性化を制御したか、本モデルにおける分子機構を明らかにすることが今後の課題である。 以上 3698 字