

論文の内容の要旨

論文題目 The role of HO-1-expressing microglia in developing mouse brain

(マウス脳発達における HO-1 発現マイクログリアの機能の解明)

氏名 河野 玲奈

【序論】

脳内出血は従来、脳に悪影響をもたらすものだと捉えられてきた。脳内で多量の出血が生じると、脳圧の亢進や細胞毒性を有する血中成分の放出により脳組織に損傷が生じ、脳機能障害につながる。その一方で、近年 fMRI をはじめとする脳イメージング技術の進歩により、一部の健常な新生児で脳内出血が見られるという現象が報告されている (Kumpulainen et al., 2020)。脳内で生じる出血は、潜在的には生命維持に関わるほどの危険性を伴うにも関わらず、正常な発達に伴う脳内出血が生体に与える影響は明らかではない。そこで私は、健常な生後初期マウス脳内で生じる出血に対する短期的な細胞応答とその機構、及び出血が及ぼす長期的な影響の解明を目的とした研究を行った。

【結果・考察】

1. 健常な生後初期マウス脳内で出血が生じ、マイクログリアが赤血球を貪食している

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、通常のマイクログリア（分枝した複雑な突起を有する）とは異なる特徴的な球状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。球状のリソソーム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。

2. 赤血球貪食マイクログリアでは HO-1 が高発現している

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 *Hmox1* が最も大きな発現変動を示していた。*Hmox1* はヘムオキシゲナーゼ 1 (Heme oxygenase-1、以降 HO-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。HO-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 HO-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。

3. マイクログリアの HO-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る

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 HO-1 が阻害されると、組織傷害が生じるのではないかと考えた。そこで、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 HO-1 を欠損したマウスを作製した。なお本マウスで

は、HO-1 の欠損に加え、赤色蛍光タンパク質である DsRed が HO-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 (HO-1-DsRed) では HO-1 プロモーターの活性化によりマイクログリアでは HO-1 と DsRed の双方が発現するのに対し、ノックアウト (HO-1 cKO) 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、HO-1 cKO により増加していた。よって、マイクログリアの HO-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 HO-1 cKO マウスの間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が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、HO-1 cKO マウスの出血部位では、マイクログリアの細胞体は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、HO-1 cKO 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 HO-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. HO-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 HO-1-DsRed マウス (HO-1 プロモーターの下流で HO-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 日齢においては、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 HO-1 を高発現したと考えら

れるる DsRed 陽性マイクログリアの性質を探索するため、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、*Ftl1* 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 *P2ry12*, *Tmem119* などは低発現であった。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 HO-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。

最後に、これらの遺伝子発現変動を誘導するのに赤血球が十分であるかを検証するため、切片培養系に赤血球を処置したところ、マイクログリアで HO-1 の発現上昇と、CD63 の発現上昇傾向や P2RY12 の発現低下が確認された。マイクログリアのマーカーとして多用される P2RY12 は、単なるマーカーに留まらず ATP 受容体として多彩な機能を有する。例えば、マイクログリアは P2RY12 を介して神経活動依存的に放出される ATP を感知し、神経細胞の活動抑制やシナプス可塑性の変化を誘導する。よって HO-1 発現に伴う P2RY12 の発現低下は神経サーキットの精緻化に影響を及ぼす可能性が考えられる。

【総括・展望】

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 HO-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。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、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、病理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。