

審 査 の 結 果 の 要 旨

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

(マウス脳発達における HO-1 発現マクログリアの機能の解明)

氏 名 河野 玲奈

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 MRI 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。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。そこで河野は、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。

まず河野は、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。すると、脳内免疫細胞であるマクログリアが、非出血部位のマクログリア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、つまりマクログリアに貪食されていた。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、以降の解析ではマクログリアの出血応答に着目した。形態的特徴をもとに赤血球貪食マ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、マクログリアが赤血球を貪食していることが示された。

次に、マ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。非貪食マクログリアと比較して、赤血球貪食マクログリアでは 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。

上記の結果を受けて、生後初期健常脳におけるマクログリアの赤血球処理に HO-1 が必要かを検証するため、Cre-loxP システムによる遺伝子改変技術を利用してマクログリア特異的

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 (HO1-DsRed) では HO-1 プロモーターの活性化により HO-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。まずコントロールマウスにおいて、生後 0 日齢の出血部位における赤血球とマイクログリアを同時に観察したところ、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 DsRed を発現していた。一方、HO-1 KO マウスの出血部位では、DsRed 陽性マイクログリアによる赤血球の取り込みが抑制されていた。この結果はマイクログリアによる赤血球除去不全を示唆するものである。次に、赤血球及びヘムの有する細胞毒性を考慮すると、赤血球除去不全は細胞傷害を増加させると考えた。そこで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 KO により増加していた。以上の結果から、マイクログリアは HO-1 を介して脳内出血に応答し細胞保護的な役割を示すことが明らかとなった。

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。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 HO1-DsRed マウス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。その際、長距離の移動はなく DsRed 陽性集団はクラスター状のまま形態変化していた。続いて、in vivo 固定切片の観察を行った。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、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、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。

本研究ではまず、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。さらには、近年注目を集める発達期マイクログリアのヘテロ性に関して、その起源や機能に脳内出血が寄与する可能性を示唆しており、基礎生物学的な知見の創出に繋がることが期待される。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。