

令和2年4月3日

胎児の脳の不思議！

～ 脳づくりが適切に進むよう、あえて“離れて見守る”ミクログリア ～

名古屋大学大学院医学系研究科細胞生物学の服部祐季特任助教、宮田卓樹教授の研究グループは、お母さんのお腹の中にいる赤ちゃんの時期（胎生期）の脳において、免疫系細胞のミクログリア^{※1}が脳づくりにいかに関わっているかについて明らかにしました。

ミクログリアの大人の脳における機能については比較的研究が進んでいる一方、胎児の脳での役割や存在意義についてはまだ分からない点が多く残されています。この時期のミクログリアは興味深い分布変化を示すことが知られていますが、胎生期のほんの一時的な期間において、皮質板と呼ばれる領域（分化を遂げた神経系細胞が積み重なる場所）から不在となります。しかしながら、その仕組みや生理学的意義はこれまで不明でした。研究グループは、脳組織片や生きたマウスの脳を直接ライブ観察することにより、ミクログリアの動きを3次元的に捉え、皮質板から抜け出す際の移動の特徴を見出し、その移動に関わる分子メカニズムを明らかにしました。一方で、皮質板からの一時的な不在の意義についても調べ、皮質板にミクログリアを強制的に配置させたところ、その近くにいる神経系の細胞が影響を受け、将来適切に機能発揮するために重要な分子群の発現パターンに乱れが生じることが明らかとなりました。この結果は、ミクログリアが皮質板から一時的にあえて離れて、一つ一つの神経系の細胞が本来あるべき性質を獲得し、生後の脳で正しく機能できるように見守る仕組みがあることを意味し、その巧みな分布調節機能が脳づくりに重要であることを示唆します。本研究成果は、母体が感染症等を罹患した際の過度な炎症が胎児の脳に与える影響の解明にもつながり、それを未然に防ぐための予防法・治療法の開発へ向けた研究の展開が期待されます。

なお、本研究は同研究科の和氣弘明教授、大阪大学大学院医学系研究科の長澤丘司教授、基礎生物学研究所の野中茂紀准教授、国立長寿医療研究センターの津川陽司博士の協力を得て行われました。

本研究成果は、2020年4月2日付（日本時間18時）、英国科学誌「Nature Communications」に掲載されました。本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業の基盤研究（A）（課題番号：JP16H02457）、挑戦的萌芽研究（課題番号：JP16K15169）、特別研究員奨励費（課題番号：JP16J06207）、若手研究（課題番号：JP18K15003）、上原記念生命科学財団寄附金の研究奨励金（助成番号：201910147）の助成を受けたものです。

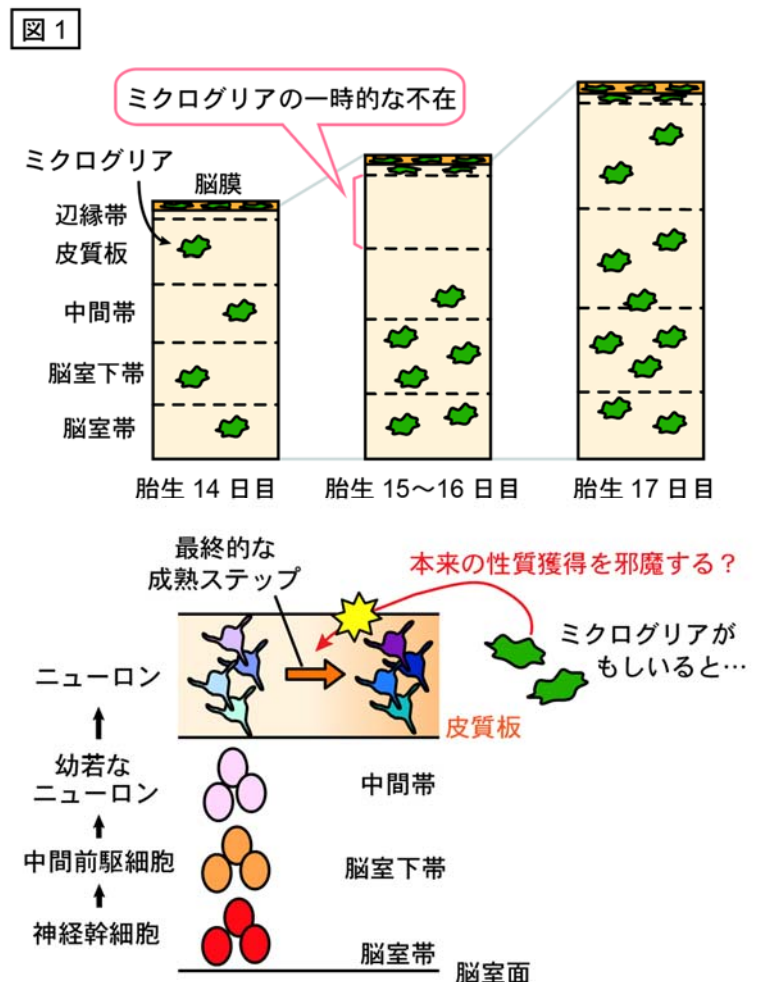
ポイント

- 大脳の発生過程におけるミクログリアの移動・分布変化の仕組みとその生理学的意義を初めて示した。
- 本成果は母体の過度な炎症による胎児の脳への影響の解明へとつながり、それを未然に防ぐための予防法・治療法の開発に向けた展開が期待される。

1. 背景

私たちの脳を構成する細胞には、神経系細胞のほかに免疫系の細胞であるミクログリアが存在し、脳の機能が保たれています。大人の脳におけるミクログリアの機能に関しては、脳内の環境整備（死んだ細胞やゴミを貪食^{※2}して除き、清掃する）や神経回路が適切につくられるよう監視するなどの役目のほか、神経変性疾患や感染症等の罹患時には、炎症に対する反応や脳構造の修復に関わることが知られます。一方で、お母さんのお腹の中にいる赤ちゃんの時期（胎生期）における脳内でのミクログリアの役割や存在意義については、まだ不明なことが多く残されています。

胎生期の脳では、神経系細胞の産生や分化に伴う移動が細やかに制御され、未分化な神経幹細胞から分化を遂げた神経系細胞（ニューロン^{※3}）が適切に配置されていきます。一方で、ミクログリアも少数ながら存在します。この時期のミクログリアは興味深い分布変化を示すことが知られており、マウス胎生 14 日目までは大脳壁（おもに、脳室帯、脳室下帯、中間帯、皮質板、辺縁帯、脳膜から構成）全体にほぼ均一に存在していますが、胎生 15～16 日目をかけて皮質板と呼ばれる領域（分化を遂げた神経系細胞が積み重なる場所）から不在となり、脳室帯や脳室下帯、中間帯といった領域（未分化な神経前駆細胞^{※4}が存在する場所）に偏って分布するようになります（図 1）。さらに不思議なことに、胎生 17 日目になると、ミクログリアは再び皮質板に分布するようになります。しかしながら、この「皮質板から一時的に不在」となる仕組みや生理学的意義はこれまでよく分かっていませんでした。

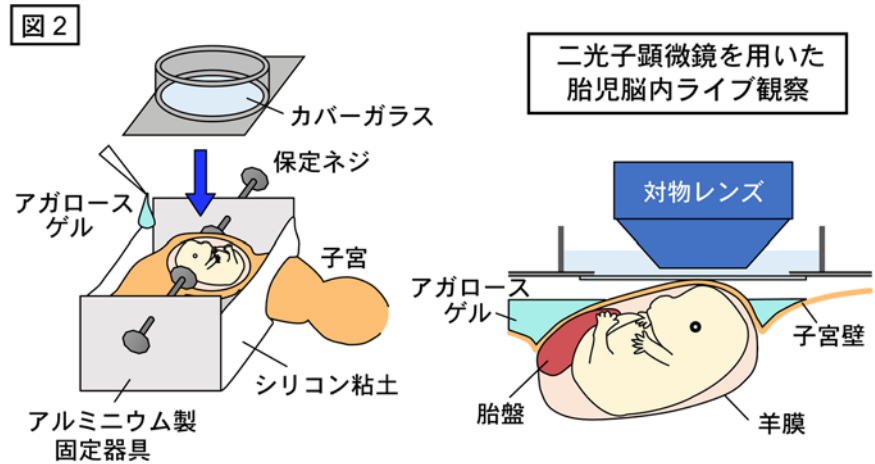


研究グループは、マウス胎生期の脳壁においてミクログリアが不均一に分布する仕組みを明らかにするため、ミクログリアの分布変化や移動の様子をライブイメージングにより詳細に観察し、

その特徴を見出しました。そして、その移動を促す分子メカニズムに迫りました。さらに、胎生 15～16 日目においてミクログリアが一時的に皮質板から抜け出す意義について、「ミクログリアは、ニューロンが生後の脳で本来の機能を発揮するために必要な成熟ステップを妨げないよう、一時的に皮質板から退出するのではないか。」との仮説を立て、皮質板にミクログリアを強制的に配置するなどの実験方法を構築し、これを検証しました。

2. 研究成果

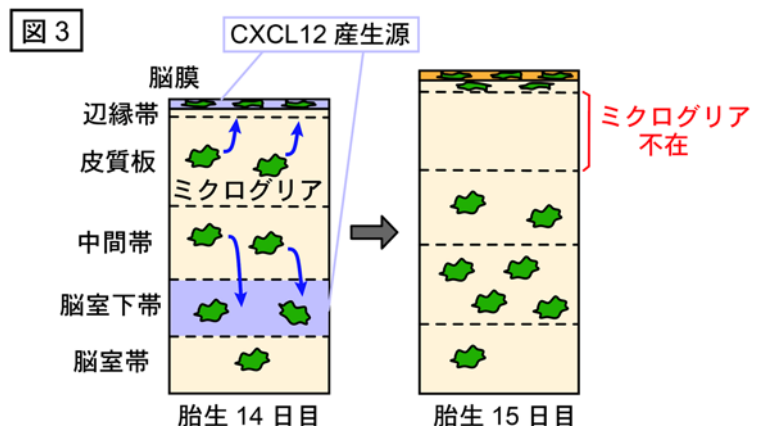
はじめに、ミクログリアがいかにして胎生 15～16 日目に皮質板から不在となるのかを探るため、切り出した脳の組織片を培養しながら 3 次元的に細胞の動きを観察するスライス培養法^{※5} 及び二光子顕微鏡^{※6} を用いてマウスが生きたままの状態での脳内の現象を観察する生体内ライブ観察法 (図 2) により、ミクログリアの動態を経時的に観察しました。



その結果、胎生 14 日目の脳においてミクログリアが脳壁内を移動する様子を捉えました。重要な点として、ミクログリアがもとも存在していた位置によって移動の方向性が決まり、皮質板内にあるものは脳膜方向 (外側) へと進み辺縁帯へと蓄積すること、また、中間帯にいるものは脳室下帯の方向 (内側) へ向かうという、両方向性に移動する性質が認められました。このライブ観察から、胎生 14 日目に移動がなされることによって、胎生 15 日目には皮質板から不在となる可能性が示唆されました。

次に、このミクログリアの両方向性の移動を制御する分子を探索しました。ケモカイン^{※7} の一種である CXCL12^{※8} が胎生 14 日目の大脳において脳膜と脳室下帯で特異的に産生されること、及び、ミクログリアが CXCL12 の受容体である CXCR4^{※9} を発現することから、ミクログリアの移動を促すシステムとして CXCL12-CXCR4 を候補として考え、これを検証しました。研究グループは CXCR4 を欠損した遺伝子改変マウスを用いてミクログリアのライブ観察をおこなったところ、正常マウスで認められたような両方向性の移動が阻害され、移動できずにその場にとどまるミクログリアが増加しました。

さらに胎生 15 日目におけるミクログリアの分布を調べた結果、皮質板に存在するミクログリアが増加していました。以上のことから、



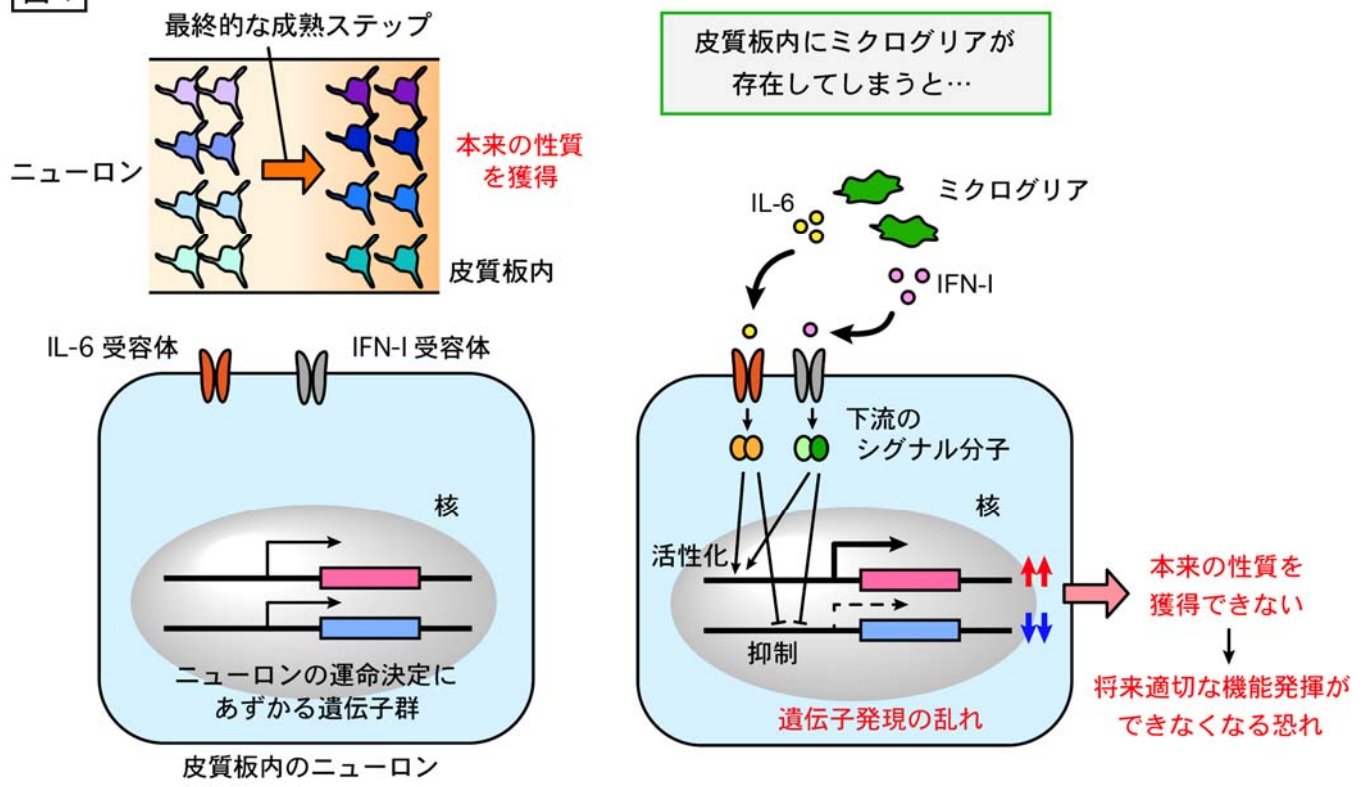
脳膜や脳室下帯が産生する CXCL12 をミクログリアが CXCR4 を介して感知し、その産生源に向かって脳壁内を両方向に移動することによって皮質板から不在となることが示唆されました(図 3)。

続いて、ミクログリアが皮質板から一時的に抜け出す意義についても調べました。「ミクログリアの不在が、ニューロン成熟の進行を適切に進ませるために必要なのではないか。」という仮説を検証するため、研究グループは、ミクログリアを人工的に皮質板へと配置させることによって、ニューロンがどのような影響を受けるのかを調べました。様々な手法を用いてミクログリアを皮質板へと強制的に滞在させ(皮質板へと移動を終えたニューロンのみが CXCL12 を発現するようなシステムを利用した生体内での解析や、脳から別途集めてきたミクログリアを皮質板に直接移植するなどの方法)、これらの結果、皮質板内に集積するミクログリアの近傍に存在するニューロンにおいて、将来の機能・性質を決める重要な分子群の発現パターンに乱れが生じていました。胎生 15~16 日目の皮質板に存在するニューロンは、おおよその運命は決まっているものの、まだ完全には成熟しておらず最終的な調整をこの場で受けることが知られています。したがって、この結果は過剰なミクログリア分布によってニューロンの成熟プロセスが乱されることを意味し、脳づくりの正しい進行にはミクログリアが適切なタイミングでニューロンが蓄積する皮質板から退出する必要があることが初めて明らかとなりました。

さらに研究グループは、ミクログリア由来のどの分子がこの現象に関わっているのかについて探索しました。培養皿の上で用意した皮質板を構成するニューロンと、ミクログリアを加えて一緒に培養したニューロンからそれぞれに全遺伝子を回収し、RNA シークエンス解析^{※10}により両者の遺伝子発現の比較を行なうことにより候補分子を探しました。その結果、ミクログリアと共に培養したニューロンにおいて、サイトカイン^{※11}の一種である 1 型インターフェロン (IFN-I) ^{※12} とインターロイキン 6 (IL-6) ^{※13} によって活性化される細胞内シグナル経路に関わる分子群の発現が高まっていることがわかりました。この結果に基づき、IFN-I と IL-6 がニューロンの運命決定にあずかる重要な分子群の発現変化に直接関わっている可能性を検証するため、細胞レベルおよび生体レベルで解析を行いました。これらの分子のはたらきを阻害した場合には、ミクログリアによるニューロンの性質変化が有意に抑えられたことから、ミクログリアから産生される IFN-I と IL-6 がニューロンの運命決定に関わる分子群の発現変化を促す要因であることが明らかとなりました(図 4)。

以上の結果から、ミクログリアは CXCL12-CXCR4 の相互作用を利用して皮質板を開け放し、胎生 15~16 日目の皮質板において自身が産生する IFN-I や IL-6 によってニューロンの成熟ステップが乱されないよう巧みに分布を調節していることが示唆されました。一つ一つの神経系の細胞が将来生後の脳で正しく機能を発揮できるように、ミクログリアはこの時期にあえて皮質板から離れ、神経系細胞の成熟を遠くから見守っていると考えられます。

図 4



3. 今後の展開

本研究による発見は、胎生期のミクログリアの機能解明にとどまらず、生後から成体にわたる脳形成の過程や機能成熟の理解に大きく貢献するものと期待されます。一方で、母体の免疫が過度に活性化（感染症、糖尿病、自己免疫疾患、肥満・低栄養状態など）した「母体炎症時」において、胎児脳内のミクログリアが活性化することがこれまでに報告されています。しかしながら、それによる脳発生等への影響については可能性が示唆されているものの、知見は乏しく分子メカニズムの多くが明らかにされていません。ミクログリアの異常な活性化によって胎児脳内の環境に変化が生じ、病態へと進行する可能性も有します。本研究による正常の脳におけるミクログリア動態の詳細な情報は、母体炎症時などの病態時における胎児の脳発生の異常の有無、またはその分子メカニズムを紐解くためのきっかけとなり得、将来的にそれを未然に防ぐための予防法・治療法の開発へと繋がることを期待されます。

4. 用語説明

- ※1) ミクログリア： 中枢神経系グリア細胞の一種であり、他のグリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト）とは由来が異なる免疫系の細胞。マクロファージと形態や性質が類似する。
- ※2) 貪食： 細胞が不必要なものを取り込み、消化し、分解する作用である。貪食する対象は、アポトーシス（プログラムされた細胞死）によって死滅した細胞、異物や病原体等である。
- ※3) ニューロン： 神経系を構成する細胞で、脳内の情報処理を担う。胎生期においては、脳室面で誕生する神経幹細胞（最も未分化な神経前駆細胞）から分化し、脳膜側へと移動しながらやがて

ニューロンとなる。

- ※4) 神経前駆細胞：神経系の未分化な細胞であり、限られた分裂回数後に分化を遂げるよう運命づけられた細胞を指す。
- ※5) スライス培養法：細胞を生かしたまま解析する培養技術のうち、三次元構造を保持しつつ行なう組織培養手法の一つである。本研究では、胎児の脳に対してスライス処理を施した後、その組織片を培養しながら断面視における細胞の動態を観察している。本研究では、ミクログリアが特異的に緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する遺伝子改変マウスを用いて、ライブ観察をおこなっている。
- ※6) 二光子顕微鏡：フェムト秒超短パルスの高出力のレーザーを光源として用い、試料へのダメージを抑え、かつ、より深部を観察できる顕微鏡。本研究では、胎児を子宮・羊膜から取り出すことなく、生かしたままの状態、母親マウスの子宮壁越しにライブ観察をおこなっている。
- ※7) ケモカイン：サイトカインの一群であり、白血球などの遊走に関与する。走化性の（chemotactic）サイトカイン（cytokine）を意味する。
- ※8) CXCL12：ケモカインの一種。Stromal cell-derived factor (SDF1)としても知られる。CXCR4に受容される。
- ※9) CXCR4：ケモカイン受容体の一つ。CXCL12を認識し、細胞内へとシグナルを伝える。CD184としても知られる。
- ※10) RNA シークエンス解析：次世代シーケンサーにより遺伝子の全転写物の塩基配列を決定する方法。遺伝子発現の変動を網羅的に解析することができる。
- ※11) サイトカイン：細胞から分泌される低分子のタンパク質で生理活性物質の総称。細胞間相互作用に関与し、周囲の細胞に影響を与える。
- ※12) 1型インターフェロン：サイトカインの一種。インターフェロンファミリーのうち、インターフェロン α (IFN- α) とインターフェロン β (IFN- β) などを含めた総称である。
- ※13) インターロイキン6：サイトカインの一種。T細胞やマクロファージ等の細胞により産生される。IL-6受容体はgp130と会合して細胞内にシグナルを伝える。

5. 発表雑誌

掲雑誌名：Nature Communications（日本時間4月2日18時付の電子版）

論文タイトル：Transient microglial absence assists postmigratory cortical neurons in proper differentiation

著者：Yuki Hattori^{1,2}, Yu Naito¹, Yoji Tsugawa^{3,4,5}, Shigenori Nonaka^{6,7}, Hiroaki Wake^{8,9,10,11}, Takashi Nagasawa¹², Ayano Kawaguchi¹, Takaki Miyata¹

所属：

1 Department of Anatomy and Cell Biology, Graduate School of Medicine, Nagoya University, Nagoya, Japan

2 Research Fellow of Japan Society for the Promotion of Science

3 Department of Aging Intervention, National Center for Geriatrics and Gerontology, Obu, Japan

4 Laboratory of Molecular Biotechnology, Graduate School of Bioagricultural Sciences Nagoya University,

Nagoya, Japan

5 Drug Discovery Research, iBody Inc., Nagoya, Japan

6 Spatiotemporal Regulations Group, Exploratory Research Center on Life and Living Systems, Okazaki, Japan

7 Laboratory for Spatiotemporal Regulations, National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan

8 Division of Homeostatic Development, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan

9 Department of Physiological Sciences, The Graduate School for Advanced Study, Okazaki, Japan

10 Division of System Neuroscience, Graduate School of Medicine, Kobe University, Kobe, Japan

11 Department of Anatomy and Molecular Cell Biology, Graduate School of Medicine, Nagoya University, Nagoya, Japan

12 Laboratory of Stem Cell Biology and Developmental Immunology, Graduate School of Frontier Biosciences and Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan

DOI : 10.1038/s41467-020-15409-3

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Nat_Com_200402en.pdf