

脳内の免疫細胞ミクログリアが脳に定着するための“新しいルート”を発見

国立大学法人東海国立大学機構名古屋大学大学院医学系研究科細胞生物学分野の服部祐季 講師、宮田卓樹 教授の研究グループは、脳内の免疫細胞であるミクログリア^{注1}が脳に定着するしくみの一端を明らかにしました。

あらゆる全身の機能を司る脳は、神経系細胞^{注2}以外にも免疫系の細胞や血管など多種多様な細胞から成り立っており、それら細胞のはたらきがうまく制御されることによって脳の機能や恒常性が保たれています。脳を構築する細胞の大部分が神経系の細胞であるのに対し、ミクログリアは由来が異なる免疫系の細胞です。ミクログリアは脳内を監視しながら環境を整備したり、神経系細胞の成熟や配置、ネットワーク形成を手助けしたりしています。しかしながら、ミクログリアがいつ・どのようにして脳にたどりつくのかはこれまでよく分かっていませんでした。

脳には、ミクログリアとよく似た性質を持つものの異なる細胞であるマクロファージ^{注3}が存在しています。マクロファージとミクログリアは起源が同じで、どちらも胎生初期に卵黄嚢^{注4}に存在する前駆細胞^{注5}から誕生します。これまで、両者の運命は卵黄嚢に存在する頃に枝分かれして、ミクログリアはその性質を備えてから脳に居付くと考えられてきました。そして、マクロファージとミクログリアは別グループとして脳で暮らし、どちらかからどちらかへと変わるとは想定されていませんでした。ところが、今回本研究グループは、新たに開発した胎生早期のマウスに対する生体イメージングシステムや細胞追跡技術等を用いた解析を通じて、ミクログリアやマクロファージが脳に定着を始めた後、つまり発生がさらに進んだ段階で、脳室^{注6}と呼ばれる脳の内側の空間に存在するマクロファージが脳実質に侵入し、周囲の環境に呼応してミクログリアに分化するということを発見しました。言い換えると、一部のミクログリア集団を供給するための「追加ルート」が脳には備わっていることを見つけました。

本研究は、哺乳類脳におけるミクログリアおよびマクロファージの細胞動態、両者の細胞の移動・定着の新たなしくみを捉えました。ミクログリアは機能的にも遺伝子発現的にも多様性があることが報告されていますが、いかにしてその多様性を獲得したのかはまだ明らかにされていません。今回の研究成果は、ミクログリアが脳に定着するまでのプロセスの違いが、将来の性質を左右する可能性があることを示唆します。

近年、母体の過度な免疫活性化が胎児脳内の環境を変化させ、精神疾患の発症につながる可能性が報告されています。正常時におけるミクログリアの性質や挙動について理解を深めることは、病態時の現象の理解を助け、将来的にミクログリアを標的とした新たな診断・治療法の開発に役立つことが期待されます。

尚、本研究は名古屋大学大学院医学系研究科分子細胞学分野の和氣弘明 教授、加藤大輔 講師、同研究科機能組織学分野の小西博之 准教授、岡山大学の川口綾乃 教授、九州大学の増田隆博 教授、フライブルグ大学の Marco Prinz 教授の協力を得て行われました。

本研究成果は、2023年2月7日(火)付で米国科学誌「Cell Reports」にオンライン掲載されました。

ポイント

- マウスにおいてミクログリアが脳に定着するための新しいルートを発見した
- ミクログリアの一部の細胞集団は脳室に存在するマクロファージに由来する
- マクロファージは脳実質に侵入した後に周囲の環境に呼応してミクログリアへと分化する
- マウス胎生 12.5 日目に対する生体イメージングシステムを確立した

1. 背景

あらゆる全身の機能を司る脳は、神経系細胞以外にも免疫系の細胞や血管を構成する細胞など多種多様な細胞から成り立っており、それら細胞のはたらきがうまく制御されることによって脳の機能や恒常性が保たれています。脳を構築する細胞の大部分が神経系細胞であるの対し、ミクログリアは由来が異なる免疫系の細胞です。ミクログリアは比較的少ない細胞集団ながらも、脳実質内をパトロールしながら環境を整備したり、神経系細胞の成熟や配置、ネットワーク形成、あるいは、血管新生やリモデリングを手助けしたりすることが知られています。しかしながら、ミクログリアがいつ・どのようにして脳にたどりつくのかはこれまでよく分かっていませんでした。

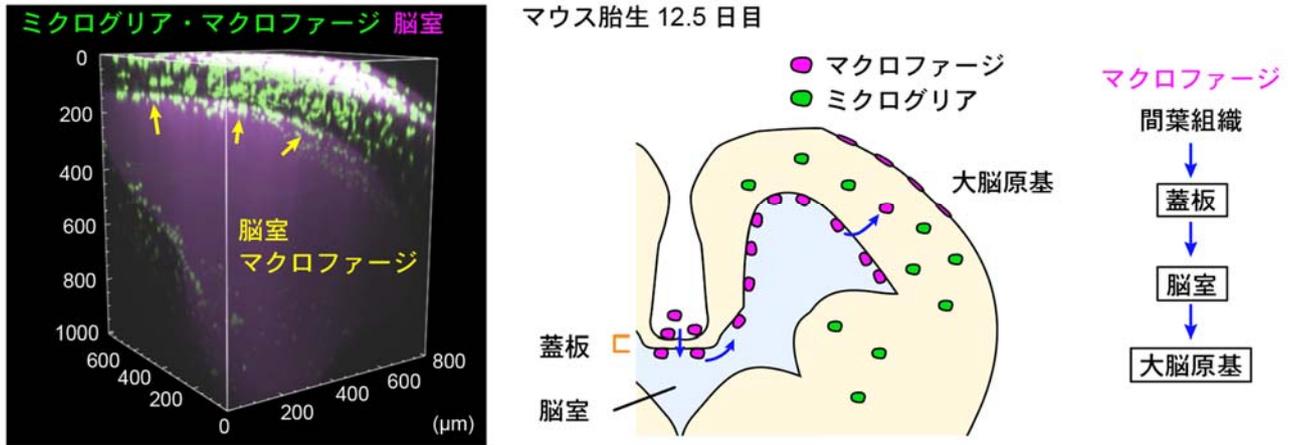
2. 研究成果

脳には、ミクログリアとよく似た性質を持つものの異なる細胞であるマクロファージが存在しています。マクロファージとミクログリアは起源が同じで、どちらも胎生初期に卵黄嚢に存在する前駆細胞から誕生します。これまで、両者は卵黄嚢に存在する頃に枝分かれして、ミクログリアはその性質を備えてから脳に居付くと考えられてきました。そして、マクロファージとミクログリアは別グループとして脳で暮らし、どちらかからどちらかへと変わるとは想定されていませんでした。ところが、今回研究グループは、新たに開発した胎生早期のマウスに対する生体イメージングシステムや細胞追跡技術等を用いた解析を通じて、ミクログリアやマクロファージが脳に定着を始めた後、つまり発生がさらに進んだ段階で、脳室と呼ばれる脳の内側の空間に存在するマクロファージが脳実質に侵入し、周囲の環境に呼応してミクログリアに分化するというのを発見しました。言い換えると、一部のミクログリア集団を供給するための「追加ルート」が脳には備わっていることを見つけました。

(1) 胎生 12.5 日目頃に起こる脳室から大脳原基へのマクロファージ流入

はじめに研究グループは、マウス胎生 12.5~13.5 日目の大脳原基^{注7}には、ミクログリアとマクロファージが混在することを発見し(胎生 14.5 日目以降から出生までは明瞭に分布が分かれる)、マクロファージが外部から供給される可能性を検証しました。そこで脳室面に付着するマクロファージに注目し、脳スライス培養下ライブイメージング^{注8}を行ったところ、マウス胎生 12.5 日目に脳室マクロファージが大脳原基内へと高頻度に侵入することを発見しました。胎生 13.5 日目以降ではその侵入が激減することから、胎生 12.5 日目がマクロファージの流入が起こる特有の時期であると考えられます。また、脳室マクロファージが背側の間葉組織^{注9}から蓋板^{注10}と呼ばれる部分を通り抜けて供給されることも併せて捉えたことから、ミクログリアが脳にたどり着く一つのルートとして、「蓋板→脳室→大脳原基」という流れを見出しました(図 1)。

図 1

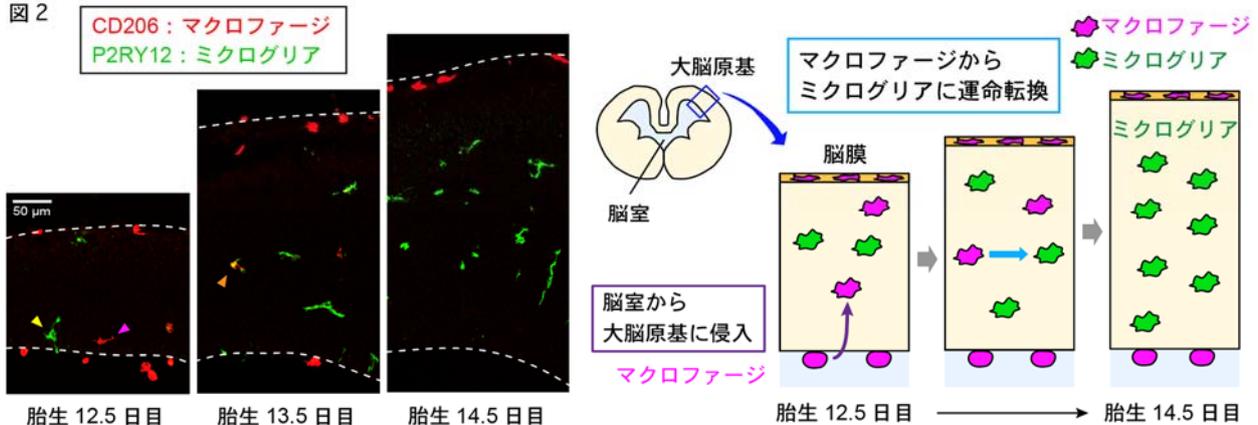


(2) 大脳原基に侵入したマクロファージがミクログリアに分化する

次に研究グループは、脳室から大脳原基に侵入したマクロファージがその後ミクログリアに分化する可能性を検証するために、マクロファージが特異的に緑色蛍光を発する遺伝子改変マウスから単離したマクロファージを野生型マウスの脳室に移植するという実験を行いました。移植から 2 日後にその細胞の性質を調べた結果、脳室に存在する時点ではまだマクロファージの性質を保有していましたが、大脳原基に侵入した細胞はマクロファージの性質を失い、ミクログリアの性質を獲得していることが分かりました。また、脳室内腔マクロファージのみに色をつける方法(Flash tag 法^{注11}を改変)を用いた追跡実験でも、標識された細胞が大脳原基内に入った後にミクログリアの性質を獲得していることを見出しました。これらの結果から、マクロファージは大脳原基の環境に呼応してミクログリアに分化することが分かりました(図 2)。

さらに、実質中のミクログリアのうち、マクロファージ由来の細胞がどのくらい存在するのかを Fate-mapping 法^{注12}という特殊な技術を使って調べたところ、大脳原基に存在するミクログリアのうち約 6 分の 1 程度がマクロファージ由来であることを発見しました。

図 2

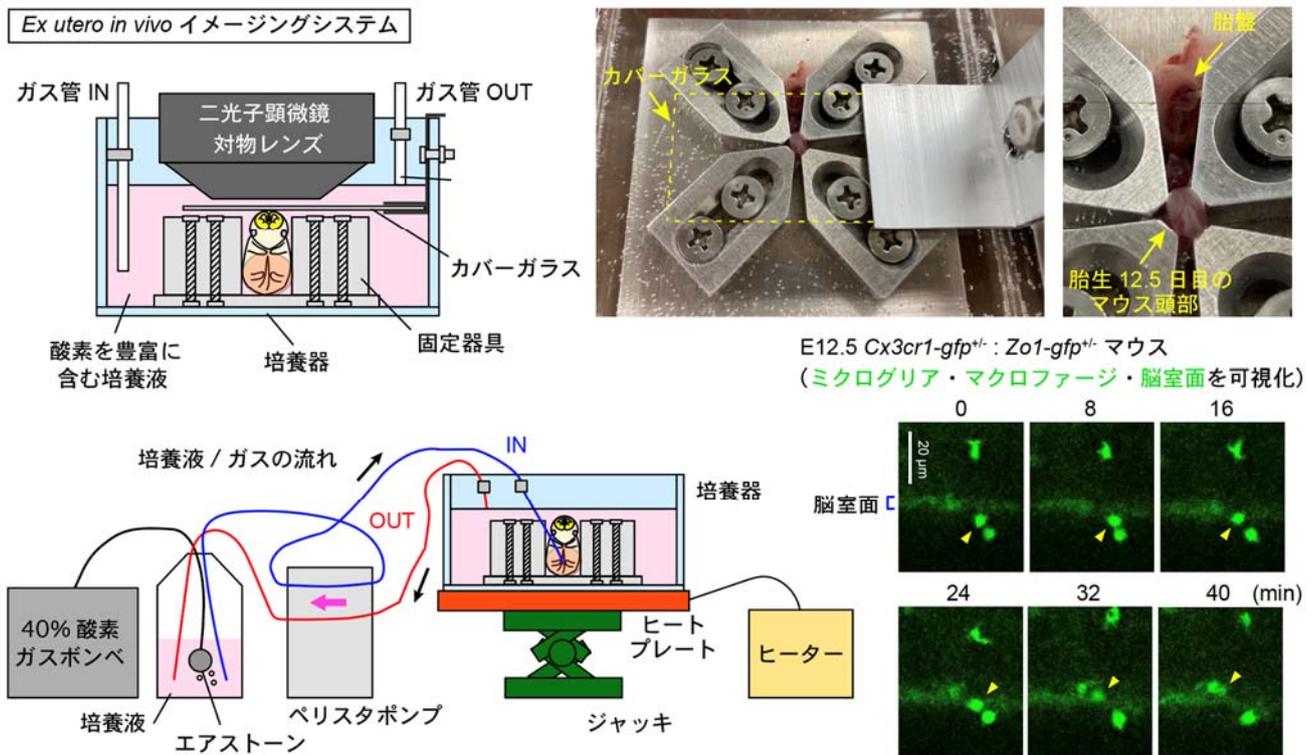


(3) マウス胎仔の生体イメージングによるマクロファージ侵入の実証

さらに研究グループは、これまで観察されたマクロファージの侵入が果たして実際に生体内で起きているのかを調べるために、マウス胎仔脳の生体イメージングに取り組みました。

研究グループは過去に胎生 14.5 日目のマウス胎仔脳の *in vivo* imaging に成功した実績があります。この方法は、胎仔を母体の子宮・羊膜内にとどめたまま観察する方法(Hattori et al., *Nat Commun.*, 2020)でしたが、胎生 12.5 日目の胎仔は体が小さいため子宮外からの固定が難しく、応用することは困難でした。そこで新たに、胎仔を子宮から取り出して、外部環境で生育させながらライブイメージングを行う方法を開発しました(*Ex utero in vivo* イメージングシステム)。二光子顕微鏡^{注13}を用いて、胎生 12.5 日目マウスの脳の深部を観察したところ、マクロファージが脳室から大脳原基に侵入する瞬間を実際に捉えることができました。この観察結果から、マクロファージの大脳原基への流入が真の生体内現象であることを実証しました(図 3)。

図 3



3. 今後の展開

本研究は、哺乳類脳におけるミクログリアおよびマクロファージの細胞動態、両者の細胞の移動・定着の新たなしくみを捉えました。近年の一細胞遺伝子発現解析の発展により、ミクログリアは機能的にも多様であるだけでなく、遺伝子発現的にも多様性があることが報告されています。しかしながら、いかにしてその多様性を獲得したのかはまだ明らかにされていません。今回の研究成果は、ミクログリアが脳に定着するまでのプロセスの違いが、将来の性質を左右する可能性を示唆しています。今後は、ミクログリアの由来の違いによって、将来獲得する機能に影響があるのか、あるとすればどのような違いがみられるのかを明らかにする必要があります。

近年、母体の過度な免疫活性化(感染症、栄養状態、環境要因など)が胎児脳内の環境を変化させ、

精神疾患の発症につながる可能性が報告されています。正常時におけるミクログリアの性質や挙動について理解を深めることは、病態時の現象の理解を助け、将来的にミクログリアを標的とした新たな診断・治療法の開発に役立つことが期待されます。

4. 用語説明

(注 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。

(注 2)神経系細胞:外胚葉由来の神経系を構成する細胞。脳室面で誕生する最も未分化な神経幹細胞、分化を始めた中間前駆細胞、成熟したニューロンの総称。

(注 3)マクロファージ:ミクログリアと同じ起源(卵黄嚢)を持つ、免疫系の細胞である。ミクログリアと似た性質、分子発現を示すが、それぞれに特有のマーカー分子を発現する。脳内では局在も異なる。

(注 4)卵黄嚢:妊娠初期の胎児に認められる膜状の嚢。発生の過程で、最初に造血が行われる場所として知られる。

(注 5)前駆細胞:最終的な分化に至るまでの途中段階の未熟な細胞。

(注 6)脳室:脳の内側に存在する脳脊髄液を満たす空間のこと。哺乳類の場合、左右一対の側脳室と、正中に第三脳室、第四脳室が一つずつの、計四つの脳室が存在する。

(注 7)大脳原基:胎生期の脳の発生段階における、将来「大脳」となる部分の呼び方。

(注 8)脳スライス培養下ライブイメージング:一定の厚みに切り出した大脳を、酸素や栄養を与えて培養しながらタイムラプス観察を行う方法。

(注 9)間葉組織:中胚葉から発生した疎性結合組織の一種。

(注 10)蓋板:脊椎動物における神経発生の過程で神経板が閉じて形成される神経管の背側正中領域のこと。

(注 11)Flash tag 法:Govindan らが発表した脳室に面する神経幹細胞を標識する方法(Govindan et al., Nat. Protoc., 2018)。CFSE という蛍光色素を脳室に注入し、色素が代謝されるまでの短い間に脳室面近傍に存在する神経前駆細胞のみが標識されるしくみ。

(注 12)Fate-mapping 法:GFP 等の蛍光タンパク質をレポーターとして、特定の時期や起源の細胞に由来する一群の細胞に恒常的に発現させ、レポーターの発現を追跡することにより、その細胞の起源を明らかにすることができる技術。

(注 13)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、より深い部位を観察できる顕微鏡。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、胎児を生かしたままライブイメージングを行っている。

5. 謝辞

本研究は、日本学術振興会科研費の若手研究(課題番号:JP18K15003・JP21K15330 [服部])、学術変革領域 A(JP21H05624 [服部]、JP21H05587 [加藤]、JP20H05699 [和氣])、学術変革領域 B(JP22H05062 [増田])、基盤 B(JP21H02656 [宮田]、JP21H02662 [和

氣]、JP21H02752 [増田]、JST 創発的研究支援事業(JPMJFR214C [服部])、新学術領域研究 (JP21H00204 [増田])、国際共同研究加速基金 (JP20KK0170 [和氣])、AMED(JP20gm6310016 早期ライフステージの脳内免疫細胞から紐解く正常脳形成と中枢性疾患発症・JP21wm0425001 慢性ストレス・老化による脳機能変容の炎症性機序の解明 [増田])、持田記念医学薬学振興財団研究助成金(服部)、成茂神経科学研究助成基金(服部)、上原記念生命科学財団研究奨励金(服部)、世界的課題を解決する知の「開拓者」育成事業 T-GEx 研究費(服部)の助成を受けたものです。

6. 発表雑誌

掲雑誌名: Cell Reports

論文タイトル: CD206⁺ macrophages transventricularly infiltrate the early embryonic cerebral wall to differentiate into microglia

著者:

Yuki Hattori^{1,*}, Daisuke Kato², Futoshi Murayama¹, Sota Koike¹, Hisa Asai¹, Ayato Yamasaki³, Yu Naito^{1,4}, Ayano Kawaguchi^{1,5}, Hiroyuki Konishi⁶, Marco Prinz⁷⁻⁹, Takahiro Masuda³, Hiroaki Wake^{2,10-12}, Takaki Miyata¹

(*責任著者)

所属:

¹ Department of Anatomy and Cell Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, 466-8550, Japan.

² Department of Anatomy and Molecular Cell Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, 466-8550, Japan.

³ Department of Molecular and System Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, 812-8582, Japan.

⁴ Department of Pathology, Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Diseases Center, Komagome Hospital, Tokyo, 113-8677, Japan.

⁵ Department of Human Morphology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, 700-8558, Japan.

⁶ Department of Functional Anatomy and Neuroscience, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, 466-8550, Japan.

⁷ Institute of Neuropathology, Faculty of Medicine, University of Freiburg, Freiburg, D-79106, Germany.

⁸ Center for Basics in NeuroModulation (NeuroModulBasics), Faculty of Medicine, University of Freiburg, Freiburg, D-79106, Germany.

⁹ Signalling Research Centres BIOSS and CIBSS, University of Freiburg, Freiburg, D-79106, Germany.

¹⁰ Department of Physiological Sciences, The Graduate School for Advanced Study, Okazaki, 444-0864, Japan.

¹¹ Division of Multicellular Circuit Dynamics, National Institute for Physiological Sciences, National Institute of Natural Sciences, Okazaki, 444-8585, Japan.

¹² Center of Optical Scattering Image Science, Kobe University, Kobe, 657-8501, Japan.

DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112092

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Cel_230214en.pdf