

平成 30 年 11 月 19 日

脳内への DNA 注入により、免疫系細胞ミクログリアが 異常な分布を示すことを発見

～脳発生研究における遺伝子導入法の技術的懸念が明らかに～

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長・門松 健治）細胞生物学分野の宮田 卓樹（みやた たかき）教授、服部 祐季（はっとり ゆき）研究員（日本学術振興会特別研究員）の研究グループは、脳発生・神経発生学の研究に汎用される子宮内電気穿孔（せんこう）法^{*1}（*in utero* electroporation, IUE）と呼ばれる脳内に遺伝子を導入する方法によって、免疫系細胞であるミクログリア^{*2}が異常な分布パターンを示すことを明らかにしました。

ミクログリアは脳を構成する全細胞のうち、割合としてはごく少数ですが、広範囲に移動するため周囲の多数の細胞と接することができ、未熟な神経系細胞の成熟を促したり、反対に、細胞を取り込んで分解すること（貪食）により、その数を制御するなどの機能を持っていることが明らかにされつつあります。一方、IUE はガラス製の非常に細い管を用いて子宮内の胎仔（たいし：動物の赤ちゃん）の脳室（大脳半球の内側にある空間）内にプラスミド DNA^{*3}を注入し、外部から局所的に電気刺激を与えることによって脳内の細胞に遺伝子導入を行うことのできる非常に有用なツールです。正常の脳では、ミクログリアは脳壁全体にわたって均一に存在していますが、本研究では IUE の「プラスミド DNA を脳室に注入する」というステップ（ガラス管による脳壁の貫通や電気刺激自体には問題がない）によって、バラバラに分布していたミクログリアが脳室面の近くに並ぶように集積する様子を認めました。そしてこの変化は、ミクログリアが発現する Toll 様受容体 9^{*4}（Toll-like receptor 9, TLR9）の DNA 認識によって引き起こされることが明らかとなりました。また、TLR9 に対する拮抗薬の ODN 2088（受容体に結合して、プラスミド DNA の結合を妨げる）をプラスミド DNA と同時に脳室内に注入することによって、ミクログリアの異常な集積が改善され、IUE をおこなった脳でもミクログリアのリアルタイムな動態の観察が可能となりました。

IUE の確立によって生体内での遺伝子導入が簡便に行えるようになり、脳発生の研究は飛躍的に発展しました。しかしながら、正常な脳発生メカニズムを包括的に理解する上では、IUE によるミクログリアの異常な分布は軽視できず、研究分野界に広く認識される必要があります。

本研究成果は米国科学誌「eNeuro」に公開されました。（米国東部時間 11 月 16 日付の電子版）

脳内への DNA の注入により、免疫系細胞ミクログリアが異常な分布を示すことを発見

～ 脳発生研究における遺伝子導入法の技術的懸念が明らかに ～

ポイント

- 脳発生・神経発生学の研究分野で広く利用される子宮内電気穿孔法 (*in utero* electroporation, IUE) と呼ばれる方法で遺伝子導入を行うと、脳室に注入された DNA が、脳内の免疫系細胞であるミクログリアを不必要に活性化し、分布を異常にすることが明らかとなりました。
- 大脳壁内のミクログリアは Toll 様受容体 9 (Toll-like receptor 9; TLR9) を介して脳室内のプラスミド DNA を認識し活性化することがわかりました。
- これまで IUE による脳細胞への影響や技術的な懸念について深くは議論されていませんでしたが、この事実は脳発生・神経発生学研究に携わる研究者に広く認識されるべきであり、さらなる研究発展に大きく貢献するものと期待されます。

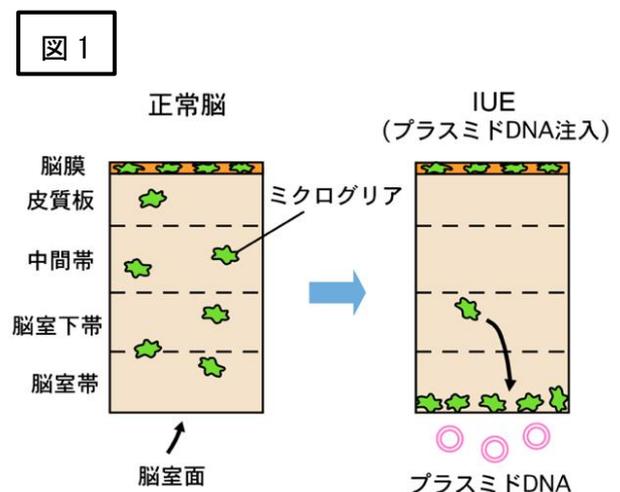
1. 背景

脳の成り立ちや機能を解明するにあたり、2001 年に報告された子宮内電気穿孔法 (*in utero* electroporation, IUE) は非常に有用なツールです。この手法は、非常に細いガラス管を用いて、子宮内の胎仔の脳室内にプラスミド DNA あるいは RNA を注入し、外部から局所的に電気刺激を与えることによって脳内の神経系細胞に遺伝子を導入します。IUE の確立により、生体内において目的の遺伝子を過剰に発現させたり、あるいは、抑制することが簡便にできるようになり、脳発生・神経発生研究は飛躍的に発展しました。このように大変便利な IUE ですが、今回研究グループは、大脳壁内の免疫系細胞のミクログリアが、この方法によって異常な分布パターンを示すことを見つけました。脳を構成する細胞のうち、神経系細胞 (ニューロン [成熟した神経細胞] 及びその前段階の細胞) がほとんどを占めることから、これまでの脳発生研究の多くが神経系細胞を対象に進められ、数の少ないミクログリアの役割や存在意義については、未だ不明な点が多く残されています。研究グループは、ミクログリアの役割・存在意義を調べるなかで、今回の事実を発見しました。IUE が確立されてから現在に至るまで、その技術的な懸念については深く議論されていなかったため、本研究結果が脳発生・神経発生学の研究分野界に一石を投じるとともに、さらなる研究の発展に大きく役立つものと考えられます。

2. 研究成果

胎生期中期頃の大脳壁は、脳室帯、脳室下帯、中間帯、皮質板から構成されます。中期 (胎生 14 日目) において、ミクログリアは正常であれば大脳壁全体に渡って均一に分布します (図 1 左)。しかしながら、IUE を施した脳 (胎生 12 日目に IUE、2 日後に解析) では、脳室下帯、中間帯のミクログリアは極端に減少し、脳室帯の脳室面近くに並ぶように集積する様子が観察されました (図 1 右)。

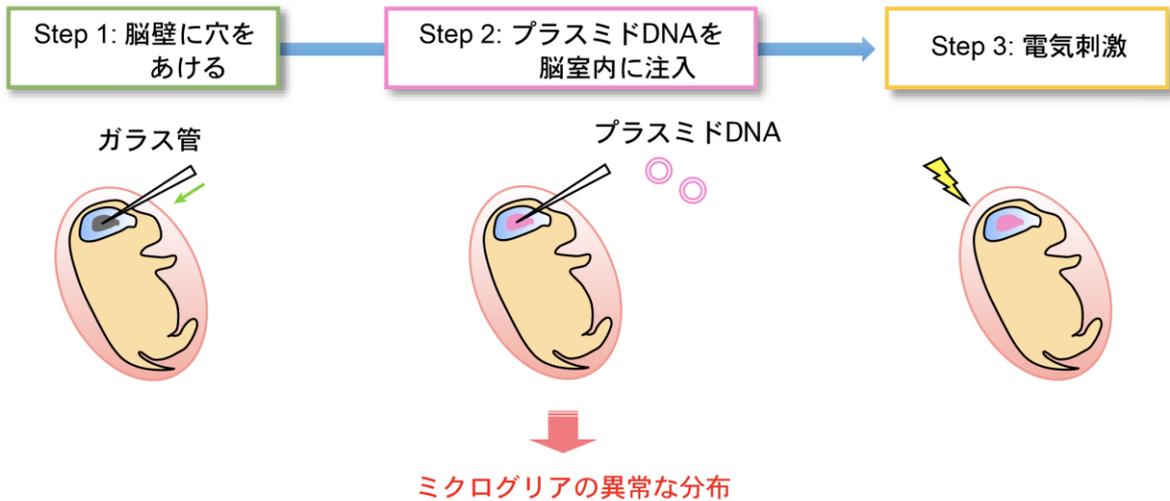
そこで、IUE のどのステップ (ステップ 1: ガラス管で大脳壁に穴をあける、ステップ 2: プラスミド DNA 溶液を脳室内に注入する、ステップ 3: 外部から電氣的刺



激を与える)に原因があるのかを調べたところ、ステップ1や3には問題なく、ステップ 2 のプラスミド DNA 溶液を脳室内に注入することによって、ミクログリアの活性化が促されることが明らかとなりました(図 2)。さらに、通常 IUE に用いるプラスミド DNA 量よりもはるかに少ない量でこの変化が引き起こされることも分かりました。

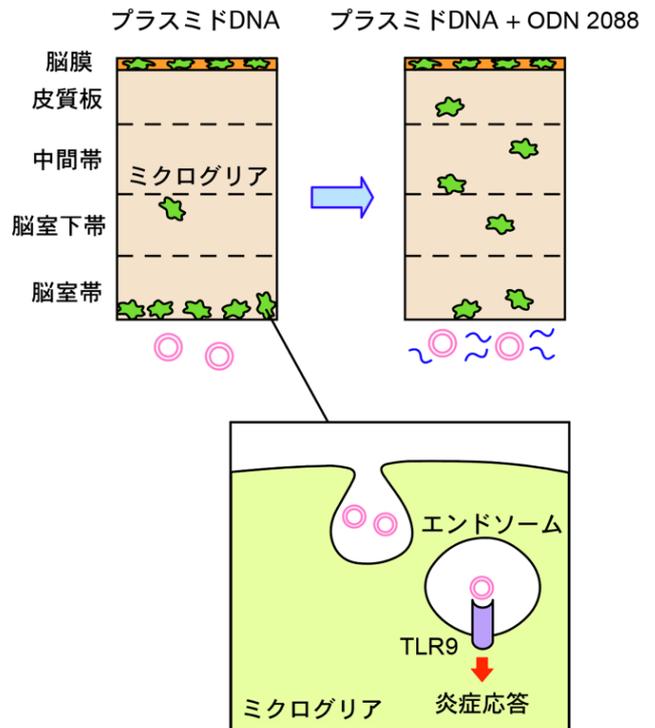
図 2

子宮内電気穿孔法 (IUE)



プラスミド DNA を含む細菌由来の DNA にはメチル化修飾を受けない CpG 配列^{*5}が高頻度に存在し、哺乳類の細胞がこれを取り込むと、細胞内のエンドソーム^{*6}と呼ばれる小胞に存在する Toll 様受容体 9 (Toll-like receptor 9; TLR9)を介してプラスミド DNA が認識され、炎症応答を引き起こします。遺伝子発現解析により、胎生期ミクログリアが TLR9 を高発現していることが分かったことから、TLR9 に対する拮抗薬(受容体には結合するけれども、細胞内へ情報は送らない)である ODN 2088(短い DNA 配列)をプラスミド DNA と混ぜて脳室内に注入してみたところ、ミクログリアの脳室面近くの異常な集積が改善され、脳室帯と中間帯にいるミクログリアが増加し、正常脳に近い分布パターンを示しました(図 3 上)。このことから、ミクログリアは TLR9 を介してプラスミド DNA を感知し、脳室面近くへと集まることが明らかとなりました(図 3 下)。また、プラスミド DNA と ODN 2088 を同時に脳室に注入することで、IUE を施した脳においても正常に近いミクログリアのリアルタイムな動態を捉えることも可能となりました。

図 3



一方で、研究グループはミクログリアの分布を変化させる要因として、プラスミド DNA 以外にも一つの懸念を提唱しました。それは、細菌の細胞壁構成成分であるリポ多糖^{*7}(Lipopolysaccharide, LPS)であり、Toll 様受容体 4(TLR4)に認識される分子です。プラスミド DNA は大腸菌から精製するため、その精製手段の選択によっては LPS がプラスミド DNA 溶液へと混入します。ミクログリアは TLR4 を発現しており、LPS 単独を脳室内に投与してもミクログリアが脳室面近くに集積したことから、プラスミド DNA 溶液中に含まれる LPS についても十分に注意を払う必要があることが示唆されました。

3. 今後の展開

本研究により、IUE の「脳室内にプラスミド DNA 溶液を注入する」というステップによって脳内のミクログリアが活性化し、脳室面近くに並ぶように異常に集まることが明らかとなりました。そして、プラスミド DNA を精製する過程で混入する恐れのある微量な LPS によっても同様な分布異常をおよぼす可能性があることが示されました。ミクログリアは脳壁を構成する全細胞のうち、割合としてはごく少数ですが、脳内を広く動きまわり神経系細胞の成熟に貢献することが分かっています。したがって、脳発生のメカニズムを問う上で、IUE によってミクログリアが異常なふるまいを示すということは軽視できず、注意が必要です。同時に、IUE に使われるプラスミド DNA の量や、プラスミド DNA の溶液中に含まれる LPS の量に依存して実験結果が左右される可能性も考えられ、現象の本質を探るうえでも、実験の再現性を確かめるうえでも、研究者に広く認識されなければならない重要な事実です。本研究による発見は、脳発生・神経発生学研究のさらなる発展に貢献するものと期待されます。

本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業科研費基盤研究(A)(課題番号:16H02457)、挑戦的萌芽研究(課題番号:16K15169)、特別研究員奨励費(課題番号:16J06207)、若手研究(課題番号18K15003)の助成を受けたものです。

4. 用語説明

1. 子宮内電気穿孔法(*in utero* electroporation, IUE):子宮内の胎仔の脳室に DNA や RNA を注入し、外部から電氣的刺激を与えることで細胞内に遺伝子導入する技術。
2. ミクログリア: 中枢神経系を構成するグリア細胞(ニューロンやその前駆細胞以外の細胞)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である。
3. プラスミド DNA: 大腸菌などの細菌や酵母の核外に存在する DNA 分子。一般的に環状 2 本鎖構造をとり、染色体 DNA とは独立して複製する。目的の遺伝子を組み込むことで、遺伝子導入に利用される。
4. Toll 様受容体(Toll-like receptor, TLR):細菌やウイルスなどが持つ特徴的な分子構造を認識する自然免疫受容体であり、感知すると炎症応答を引き起こす。主にマクロファージや樹状細胞などの細胞が発現する。
5. CpG 配列(CpG モチーフ):シトシンとグアニンと呼ばれる塩基が並んだ配列。哺乳類ではシトシンがメチル化修飾を受ける為、TLR9 には認識されず炎症応答を引き起こさない。一方、細菌やウイルス由来の DNA はメチル化されないため、TLR9 を活性化する。
6. エンドソーム:細胞が細胞外分子を取り込むことによって細胞内に形成される小胞であり、取り込まれた様々な物質の選別・分解・再利用に関わる。
7. リポ多糖(lipopolysaccharide, LPS):グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であり、TLR4 によって認識される。

5. 発表雑誌

論文タイトル : Embryonic neocortical microglia express Toll-like receptor 9 and respond to plasmid DNA injected into the ventricle: technical considerations regarding microglial distribution in electroporated brain walls

著者 : Yuki Hattori^{1,2}, Takaki Miyata¹

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

²Research Fellow of Japan Society for the Promotion of Science

雑誌名 : eNeuro (米国東部時間 2018 年 11 月 16 日付電子版)

DOI : [10.1523/ENEURO.0312-18.2018](https://doi.org/10.1523/ENEURO.0312-18.2018)

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/eNeuro_20181119en.pdf