

## 160. マイクログリアの異常活性化と精神神経疾患の関連

岡部 圭介

慶應義塾大学 医学部 形成外科学

Key words : マイクログリア, 精神神経疾患, 神経変性

### 緒言

近年の研究結果から、マイクログリアは単なる免疫細胞ではなく、定常状態においても盛んに機能し、中枢神経系の発達や恒常性維持において重要な役割を果たすことが分かりつつある。統合失調症、自閉症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病などにおいていずれもマイクログリアの異常な活性化や病変部への集積が観察され、その機能異常がこれら疾患の発症に関与しているのではないかと考えられている。本研究は、もともと血管新生研究において見出された Toll-like receptor (以下、TLR) の homologue である新規遺伝子 *Lrrc33* 欠損マウスの予想外の表現型、すなわち中枢神経系においてマイクログリアが恒常的に活性化しており、自閉症や統合失調症に類似した精神神経症状を呈するという、我々の予備的知見に端を発する。本マウスは、生後5か月以降になると四肢麻痺などの神経症状が出現し、生後10か月以内に全例が死亡する転帰を辿ることが分かり、マイクログリアの恒常的活性化が生体にもたらす影響を評価する上で格好のモデルマウスであると考えられた。*Lrrc33* 欠損マウスの表現型解析を行うことにより、ヒトにおける統合失調症や自閉症発症機構の解明、新規治療法の開発に寄与する知見を得るべく研究を行った。

### 方法、結果および考察

#### 1. マイクログリアの異常な活性化が起こるメカニズム

*Lrrc33* 欠損マウスのマイクログリアは組織学的にその形態的变化と Mac-2/Galectin-3 の高い染色性から活性化した状態にあることが示され (図1)、また、FACS でマイクログリアをソーティングし、real-time RT-PCR で遺伝子発現を調べた結果、炎症性サイトカインの発現が格段に上昇していることが確認された (図1)。さらに、マイクログリア/マクローファージ特異的に *Lrrc33* を欠損するコンディショナルノックアウトマウス (*Csf1r-iCre* × *Lrrc33-flox* マウス) を作製し解析したところ、全身のノックアウトマウスと同様のマイクログリアの変化が認められたが、血管内皮特異的に *Lrrc33* を欠損するコンディショナルノックアウトマウス (*VE-Cadherin-Cre* × *Lrrc33-flox* マウス) においては対照と比較して明らかな異常が認められなかった。以上より、*Lrrc33* 欠損マウスのマイクログリアは、*Lrrc33* 遺伝子欠損による cell-autonomous なメカニズムによって恒常的に活性化した状態であることが示唆された。

*Lrrc33* はその遺伝子配列から Toll-like receptor (以下、TLR) の homologue であることが予想されているため<sup>1,2)</sup>、TLR3、TLR4 のリガンドである poly I:C と LPS をそれぞれ野生型新生仔マウスに投与したところ、poly I:C を投与した場合に *Lrrc33* 欠損マウスと類似したマイクログリアの変化が観察されることが分かった。そこで、*Tlr3* と *Lrrc33* を同時に欠損するダブルノックアウトマウスを作製してマイクログリアの観察を行ったが、恒常的活性化の所見は残存していた。他の TLR 分子により代償されている可能性を考え、TLR の adaptor protein である MyD88、TRIF と *Lrrc33* のトリプルノックアウトマウスの作製を試みたが、特に MyD88 ノックアウトマウスは産仔数が少ない上に成長過程での死亡率が高いことから現在までに目的とするマウスが得られていない状況である。現状では *Lrrc33* 欠損マイクログリアが活性化する詳細な分子機序については不明であり、今後の研究で明らかにする必要がある。

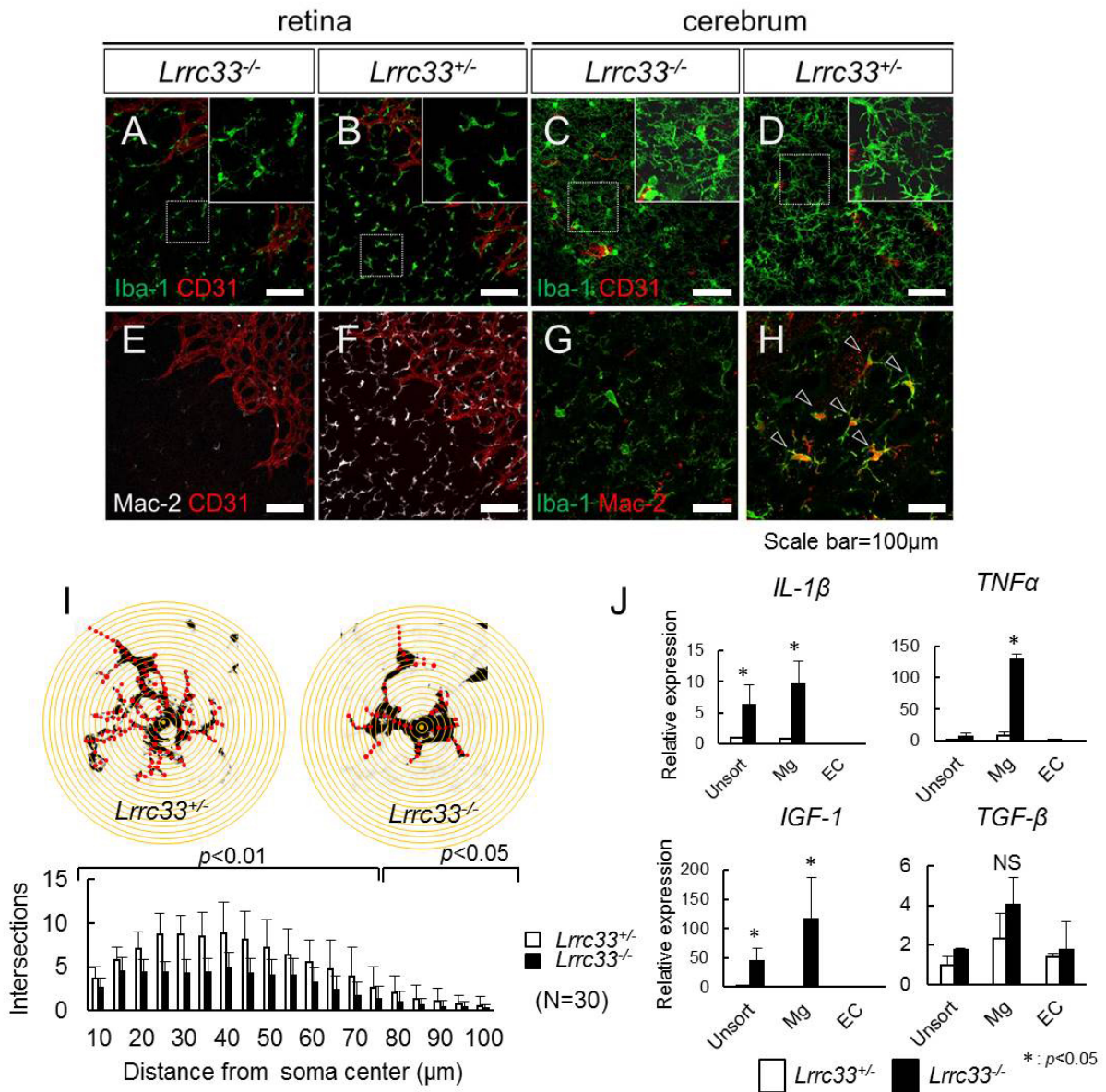


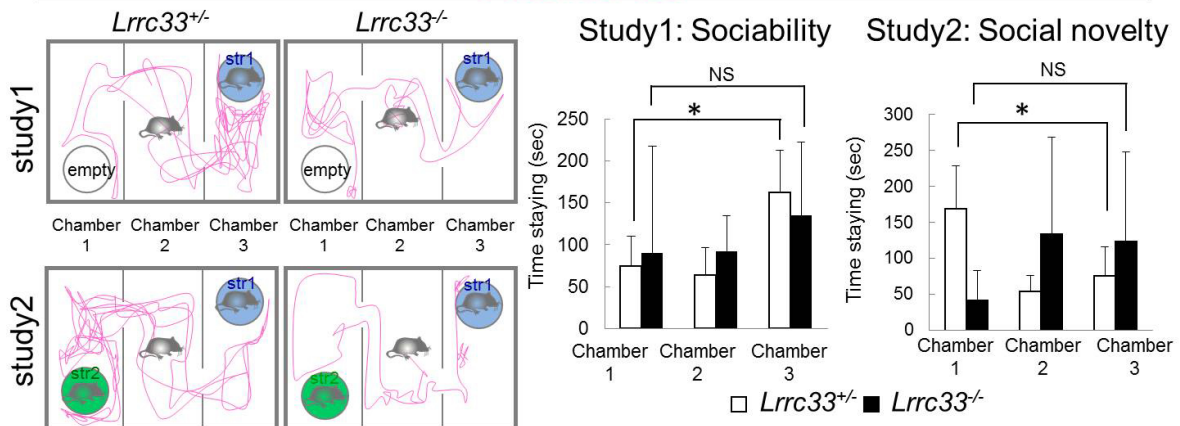
図1. *Lrrc33*欠損マウスのマイクログリアは恒常的に活性化している

*Lrrc33*欠損マウスの網膜および大脳皮質のマイクログリアはMac-2/Galectin-3を強く発現し、突起の複雑性が有意に低下していた。また炎症性サイトカインを高発現していた。(Student's t-test)

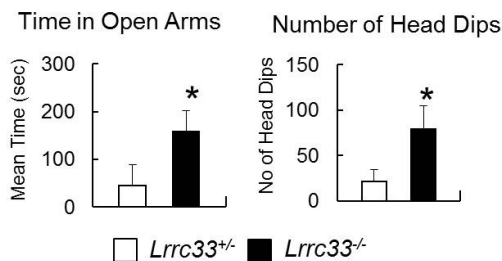
## 2. マイクログリアの恒常的活性化が個体にもたらす影響

近年、統合失調症の患者死後脳やモデル動物の脳組織においてマイクログリアの活性化が認められるとの報告が複数あり、マイクログリアの機能異常と精神神経疾患との関連に注目が集まっている。そこで、*Lrrc33*欠損マウスの行動異常の有無について調べた。3-chamber testにより社会性を調べたところ *Lrrc33*欠損マウスは対照と比較して有意に社会性が乏しかった。また、Elevated plus maze testで不安行動の強さを調べたところ *Lrrc33*欠損マウスは対照と比較して用心深さを欠くことが分かった。さらにはNest building testの結果、生存に不可欠な行動である巣作りを全く行わないことが分かった(図2)。これらの行動異常は自閉症や統合失調症のモデルマウスで認められる行動パターンと類似しており、*Lrrc33*欠損マウスはこれら精神疾患のモデルとして有用と考えられた。尚、*Lrrc33*欠損マウスは雌雄ともに生殖能に欠陥があることが分かっているものの、そのメカニズムについては現在不明である。

### 3-chamber test



### Elevated plus maze test



### Nest building test

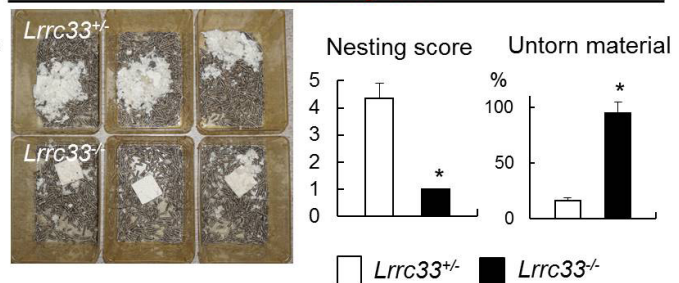


図 2. *Lrrc33* 欠損マウスで認められる行動異常

3-chamber test において、*Lrrc33* 欠損マウスは有意に社会性が乏しいことが分かる。Elevated plus maze test で不安行動の強さを調べたところ、*Lrrc33* 欠損マウスは open arm に滞在する時間が有意に長く、また arm から下を覗き込む行動が多かったことから、用心深さを欠くことが分かった。Nest building test では *Lrrc33* 欠損マウスは全く巣作りを行わないことが分かった (\*:  $p < 0.05$ , Student's t-test)。

*Lrrc33* 欠損マウスはおよそ 12 週齢以降になると上記のような行動異常を呈するが、同時に突然死亡する個体が散見されるようになる。体重の変化と生存率について調べたところ、*Lrrc33* 欠損マウスは有意に低体重であり、また死亡率が高いことが分かった (図 3)。マイクログリア特異的なコンディショナルノックアウトマウスでも体重と死亡率について同様の結果であったが、血管内皮特異的なコンディショナルノックアウトマウスでは有意な変化を認めなかった。組織学的な解析で得たマイクログリア活性化の所見と矛盾しない結果であった。

さらに、*Lrrc33* 欠損マウスは生後 6 カ月を過ぎた頃から、後肢の麻痺症状が出現する個体を認めることが分かった。8 カ月まで生存していた個体のうち、約 8 割に後肢麻痺症状を認めた (図 3)。

以上のように、*Lrrc33* という単一の遺伝子異常によってマイクログリアの恒常的な活性化が起こると、個体としての精神神経症状が出現し、生命予後を大きく左右する結果がもたらされることが明らかとなった。

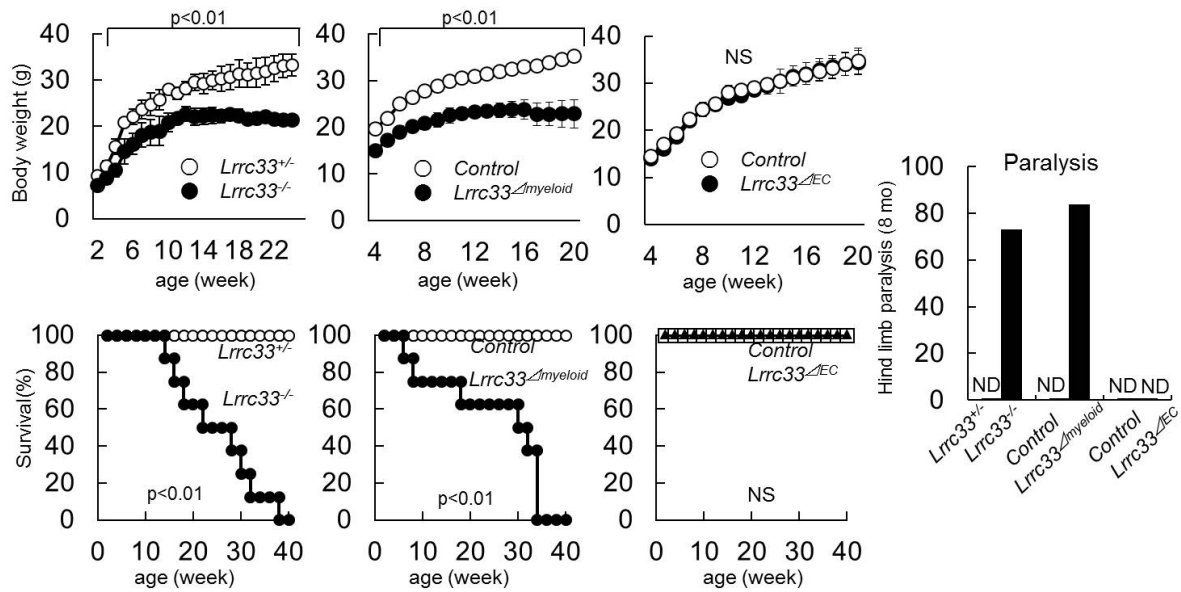


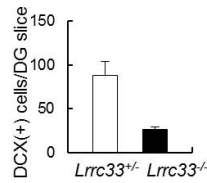
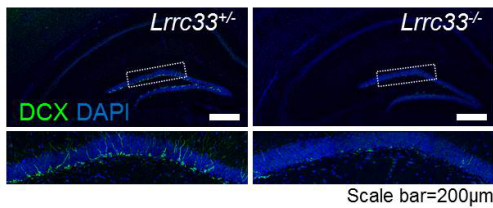
図3. *Lrrc33* 欠損マウスは低体重で死亡率が高い

*Lrrc33* 欠損マウスは対照と比較して有意に低体重であり、死亡率が高い (Log-rank test)。マイクログリア特異的コンディショナルノックアウトマウスでも同様であるが、血管内皮特異的コンディショナルノックアウトマウスでは有意な変化を認めない。また生後8カ月の時点で約8割の個体が後肢麻痺症状を呈する。

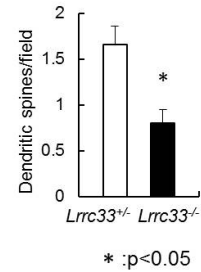
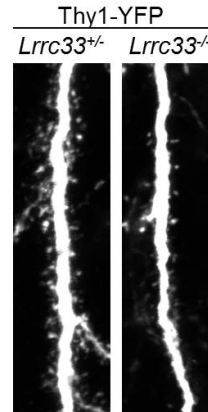
### 3. マイクログリアの活性化に伴う組織学的異常

上記のような精神神経学的な異常が出現する組織学的な基盤を構築するべく、脳の組織切片を作製し *Lrrc33* 欠損マウスの脳における異常を検索した。Thy1-eYFP-H トランスジェニックマウス<sup>3)</sup> は、成長に伴って特定の神経のみで (同種の細胞が全て蛍光を発するのではなく) YFP を発現することから、ニューロンの観察のために近年よく用いられる。本マウスと *Lrrc33* 欠損マウスを交配して組織学的検索を行ったところ、海馬の歯状回に大きな差異が認められた。すなわち、対照のマウスでは歯状回の顆粒細胞のうち YFP を発現しているのは10%未満であったのに対し、*Lrrc33* 欠損マウスでは80%以上の細胞が YFP を発現していた。そこで、歯状回に異常がある可能性が高いと考え、さらに検索したところ、subgranular zone における neurogenesis が対照の約30%に低下していること、海馬の幼若性を示唆する異所性の顆粒細胞が増加していること、CA1 領域における dendritic spine が減少していること、海馬のアストロサイトが増加していることなどの異常を認めることが分かった (図4)。これらの所見が前述の精神神経学的異常の組織学的基盤となっていることが示唆されたが、活性化したマイクログリアがどのようなメカニズムによってこれらの異常を引き起こしているのかについては、さらに検討が必要である。今後、本研究のヒト疾患との関連についても検討を加える予定である。

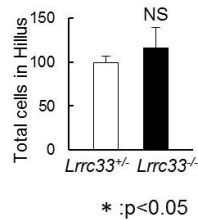
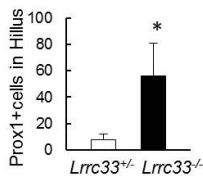
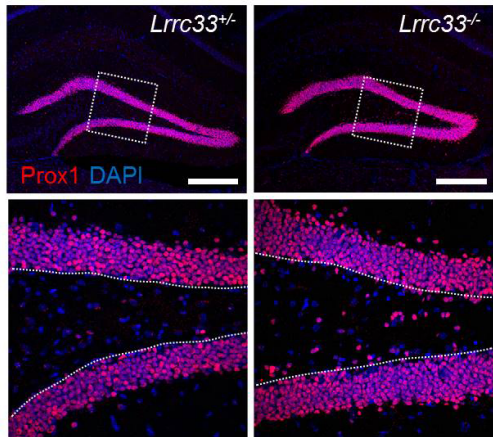
### Aberrant adult neurogenesis



### Decreased dendritic spines



### Increased ectopic granule cells



### Activation of astrocytes

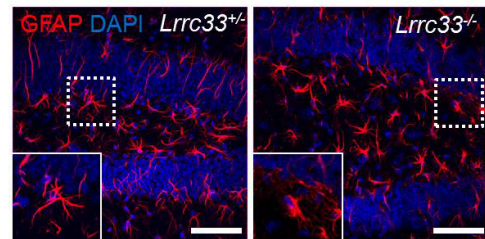


図 4. *Lrrc33* 欠損マウス海馬の組織学的異常所見

*Lrrc33* 欠損マウスの海馬では、歯状回 subgranular zone における neurogenesis の低下、異所性の顆粒細胞の増加、CA1 領域における dendritic spine の減少、アストロサイトの増加などの異常を認めた (Student's t-test)。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、慶應義塾大学医学部の久保田義顕教授、滋賀医科大学の依馬正次教授である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深謝いたします。

### 文献

- 1) Liu J, Zhang Z, Chai L, Che Y, Min S, Yang R. Identification and characterization of a unique leucine-rich repeat protein (LRRC33) that inhibits Toll-like receptor-mediated NF- $\kappa$ B activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;26;434(1):28-34. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.071.
- 2) Su X, Mei S, Liang X, Wang S, Liu J, Zhang Y, Bao Y, Chen Y, Che Y, Chunhua Zhao R, Zhang Z, Yang R. Epigenetically modulated LRRC33 acts as a negative physiological regulator for multiple Toll-like receptors. *J Leukoc Biol.* 2014;96(1):17-26. doi: 10.1189/jlb.0813457.
- 3) Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron.* 2000;28(1):41-51. PMID: 11086982