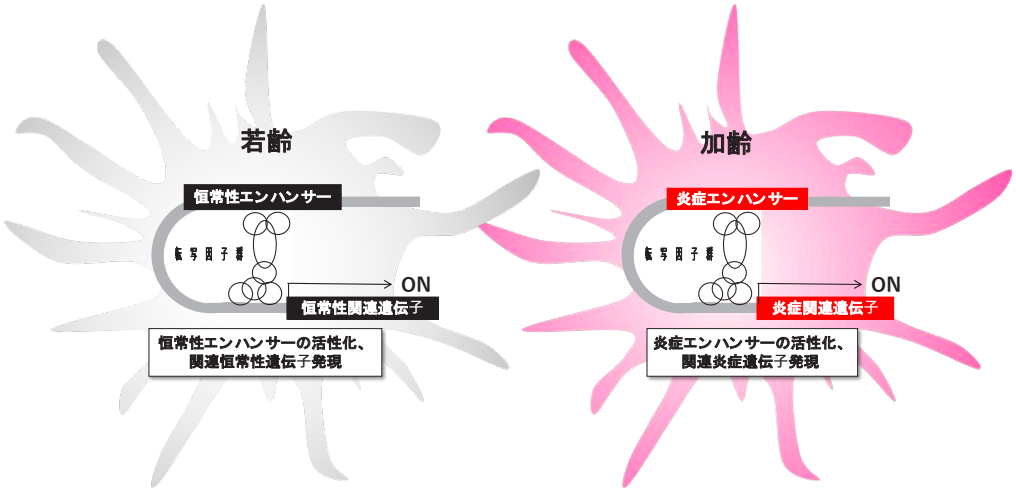
25　ミクログリア活性化エンハンサー変容による脳機能低下	樗木　俊聡

【目的】ミクログリアは脳のマクロファージであり、長寿命で自己複製能に優れ、生涯にわたって細胞数を保っている。若齢期健常脳において、ミクログリアは脳の恒常性維持に貢献しているが、加齢に伴い炎症形質に変化して脳機能低下の一因となる。しかしながら、加齢に伴うミクログリアの当該機能変容の分子基盤は不明である。本研究では、遺伝子発現の定量性に優れる Cap Analysis of Gene Expression（CAGE）法及びエンハンサーの活性化を高塩基解像度で計測可能な native elongating transcript-CAGE（NET-CAGE）法を用いて、ライフステージの進行に伴うミクログリアの転写制御変容機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】1 週齢、8 週齢、1 才齢の野生型マウスミクログリアからトータル RNA 及び新生 RNA を抽出、CAGE 法により遺伝子発現を、NET-CAGE 法によりエンハンサー解析を行った。各週齢ミクログリア間で変動のあった遺伝子群を用いて、GOTERM_BP カテゴリーを指標に Gene Ontology（GO）解析を行った。

【結果】CAGE 法により、8 週齢から 1 歳齢にかけて変動する遺伝子群が検出された。これらの遺伝子群を用いて GO 解析を行ったところ、489 個の遺伝子発現量が 1／2 以下に低下し、その中には細胞周期・分化・増殖に関連するものが多く含まれていた。対照的に、717 個の遺伝子発現量が 2 倍以上に増加しており、多くはインターフェロン誘導遺伝子であった。これら遺伝子群はミクログリアの機能変容に関わることが推測された。さらに NET-CAGE 法により活性化エンハンサー解析を行った結果、ライフステージの進行に伴いミクログリアにおいて特徴的に活性化または抑制されるエンハンサー領域が存在することが判明した。今後、Hi-C 法による標的遺伝子解析や当該エンハンサー欠損マウスの作製・解析を行うことにより、ミクログリアの加齢に伴う詳細な転写制御変容機構の解明が期待できる。

ライフステージ進行に伴うミクログリア活性化エンハンサー変容



25. ミクログリア活性化エンハンサー変容による脳機能低下

樗木　俊聡

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 先端分子医学研究部門 生体防御学分野

Key words：ミクログリア，活性化エンハンサー，NET-CAGE，ライフステージ

緒　言

ミクログリアは脳のマクロファージであり、長寿命で自己複製能に優れ、生涯にわたって細胞数を保っている［1］。若齢期健常脳において、ミクログリアは脳の恒常性維持に貢献しているが、加齢に伴い炎症形質に変化して脳機能低下の一因となる［2］。しかしながら、加齢に伴うミクログリアの当該機能変容の分子基盤は不明である。

遺伝子発現を制御するゲノム領域は「エンハンサー」と呼ばれ、同領域への転写因子の結合を起点として標的遺伝子のプロモーターを活性化することで遺伝子発現を制御する。本研究では、遺伝子発現の定量性に優れる Cap Analysis of Gene Expression（CAGE）法及びエンハンサーの活性化を高塩基解像度で計測可能な native elongating transcript-CAGE（NET-CAGE）法［3］を用いて、ライフステージの進行に伴うミクログリアの転写制御変容機構を明らかにすることを目的とした。解析の結果、各週齢のマウスにおいて特徴的に発現する遺伝子群や活性化エンハンサー領域が同定され、同細胞の性状や機能が各ライフステージにおいてダイナミックに変化していることが明らかになった。

方　法

1. ミクログリアの回収

1 週齢、8 週齢、1 才齢の C57/BL6N マウス（三協ラボ）から脳を単離し、酵素処理後、Percoll 遠心分離によりミクログリアを含む層を回収した。各種抗体で染色後、ミクログリア（$CD45^{int}$ $CD11b^{+}CX3CR1^{+}CCR2^{-}$）をソーティングにより単離した。

2. RNA の抽出

ミクログリアを Cell Lysis Buffer に懸濁し、QIAzol ならびに Nuclei Lysis Buffer を用いて、細胞質 RNA 及び核質 RNA 各々を除去した。DNase I 溶液に QIAzol（QIAGEN）を直接添加し、miRNeasy Kit（QIAGEN）を用いて新生 RNA を抽出した。

3. Cap Analysis of Gene Expression（CAGE）、native elongating transcript-CAGE（NET-CAGE）解析

一連のライブラリー作製、シークエンス、マッピング、遺伝子発現およびエンハンサー解析を行った。抽出された全 RNA または新生 RNA は CAGE“バーコード”タグと結合し、シークエンスされた CAGE タグを BWA Software を用いてマウス mm9 ゲノム上にマッピングした。近接する転写開始点をクラスターとしてまとめ各遺伝子の発現量を算出した。実際の各遺伝子のピークコールについては IGV（Integrative genomics viewer）で確認し、また発現に基づく階層的クラスタリングおよびヒートマップの作製には R Studio を用いた。

4. Gene Ontology（GO）解析

GO 解析には DAVID Bioinformatics Resources を用いた。各ミクログリアのサンプル間で変動のあった遺伝子群に多く含まれる生物学的な機能について、GOTERM_BP カテゴリーを指標に検討した。

結　果

1.　各ライフステージにおけるマウス脳ミクログリアの遺伝子発現変化

CAGE 法により検出された 17,452 個の遺伝子の発現量を各週齢のミクログリアで比較し、2 倍以上異なる 4,619 個の遺伝子を抽出した。階層的クラスタリングを行った結果、当該遺伝子の多くは 脳が顕著に発達する 1 週齢マウスのミクログリアにおいて特異的に発現が高く、8 週齢以降では発現が減少していた（図 1)。また、8 週齢から 1 歳齢にかけての遺伝子発現変化は発達期ほど顕著ではなかったものの、確かに変動する遺伝子群が見出された（図 1、赤枠)。これらの遺伝子は老化に伴うミクログリアの機能低下に関与する可能性がある。

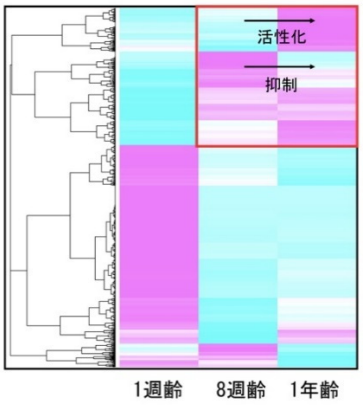


図 1.　ライフステージ進行に伴うミクログリア遺伝子発現パターンの変化
各週齢間で比較して、2 倍以上発現差があった 4,619 個の遺伝子は R Studio を用いて階層的クラスタリングを行い、発現パターンの似ている遺伝子ごとにクラスター分類した。

2.　ミクログリアにおいて加齢に伴い変化する遺伝子発現の生物学的機能

8 週齢から 1 歳齢にかけて発現変動があった遺伝子群を用いて Gene Ontology（GO）解析（Biological Pathway カテゴリー）を行った。加齢に伴い、489 個の遺伝子が 1／2 以下に低下し、逆に 717 個の遺伝子の発現量が 2 倍以上に増加していた。加齢により減少した遺伝子群は、細胞周期・分化・増殖に関連するものが多かった。一方、加齢により増加した遺伝子群にはIFN 誘導遺伝子が多く含まれており、ミクログリアの機能変容に関わることが推測された。

3.　各ライフステージにおけるミクログリア活性化エンハンサー領域の同定

加齢に伴うミクログリアの遺伝子発現変化を引き起こすメカニズムを明らかにするために、転写制御の中枢を担う活性化エンハンサーを NET-CAGE 法を用いて解析した。その結果、各週齢のミクログリアにおいて特徴的に活性化、あるいは抑制されるエンハンサー領域が存在することが判明した（図 2)。この中には、新規活性化エンハンサー領域を 36,320 領域が含まれており、今後のミクログリア研究において貴重なリソースになると考えられた。

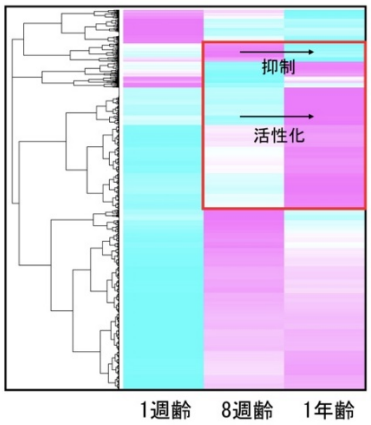


図 2. ライフステージ進行に伴うミクログリア活性化エンハンサーの変容
各週齢間で比較して 2 倍以上の活性レベルの差があった 3,837 個のエンハンサー領域について R Studio を用いて階層的クラスタリングを行い、活性化パターンの似ているエンハンサーごとにクラスター分類した。

考　察

ミクログリアでは、マウス個体の発達・加齢に伴い、遺伝子発現パターンならびに活性化エンハンサー領域がダイナミックに変化していることが判明した。今後、ミクログリア特異性の検証、当該エンハンサー欠損マウス作製・解析、Hi-C 法による標的遺伝子解析等を進めていく予定である。今回解析に用いた 1 歳齢マウスはヒトの 40 歳代に相当し、老化個体の表現型が十分に現れていない可能性が示唆される。現在、より老化表現型が顕著になる 1.5 歳齢及び 2 歳齢のマウス（各々ヒトの 60 歳代、80 歳代に相当）のミクログリアを解析中であり、真に老化した個体におけるミクログリア転写制御変容機構の解明が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京医科歯科大学難治疾患研究所生体防御学分野の石川駿、佐藤卓、理化学研究所生命医科学研究センターの平林茂樹、村川泰裕博士である。本研究の遂行にあたりご支援頂いた上原記念生命科学財団に心よりお礼申し上げる。

文　献

1） Herz J, Filiano AJ, Smith A, Yogev, N and Kipnis J. Myeloid cells in the central nervous system. Immunity 46, 943-956 (2017). doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.007.

2） Ginhoux F and Guilliams M. Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis. Immunity 44, 439-449 (2016). doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.024.

3） Hirabayashi S Bhagat S, Matsuki Y, Takegami Y, Uehata T, Kanemura A, Itoh M, Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Takeuchi O, Carninci P, Katayama S, Hayashizaki Y, Kere J, Kawaji H, and Murakawa Y. NET-CAGE characterizes the dynamics and topology of human transcribed cis-regulatory elements. Nat Genet 51, 1369-1379 (2019). doi: 10.1038/s41588-019-0485-9.

現在論文投稿準備中である。また、以下の総説執筆が決定している。

石川駿、佐藤卓、平林茂樹、山田翔太、村川泰裕、樗木俊聡。NET-CAGE 法を用いたミクログリアエンハンサーの同定。糖尿病・内分泌代謝科、第 51 巻 第 4 号