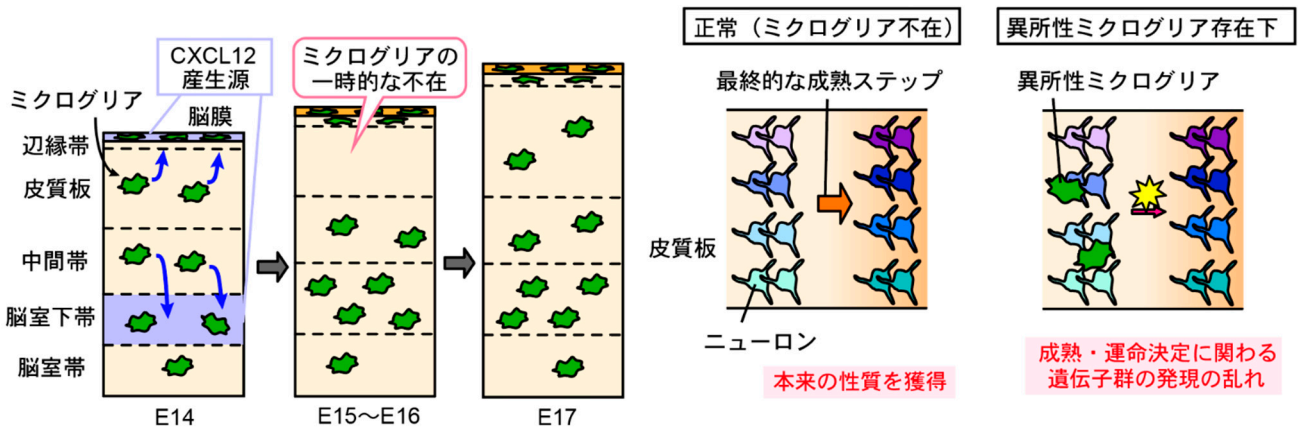
158　ニューロンの適切な個性化とミクログリア分布の関連性	服部　祐季

【目的】胎生期の大脳実質において、ミクログリアは胎齢の進行に伴い分布変化を示す。すなわち、マウス胎生 14 日目（E14）までは大脳実質全体に均一に存在しているが、E15 から E16 において皮質板から不在となる。そして、E17 以降には再び皮質板に分布する。そこで本研究では、ミクログリアが胎生中期皮質板から一過性に不在となる分子メカニズム、および、その生理学的意義について明らかにすることを目指した。

【方法】ミクログリアが皮質板から不在となる現象を理解するため、ミクログリア可視化 CX3CR1-GFP マウスの脳スライス培養下ライブイメージングを行った。その結果、ミクログリアは E14 で最も活発に動き、脳実質内を両方向に移動する傾向を見出した。ミクログリアの移動に関わる分子候補として CXCL12/CXCR4 を同定し、*Cxcr4* $^{-/-}$ マウスを用いたライブイメージングおよび組織学的解析を通じて、CXCL12/CXCR4 の相互作用がミクログリアの移動や分布に関わる可能性について検証した。次に、ミクログリアが胎生中期皮質板から離脱する意義を問うため、この時期にミクログリアを皮質板内に強制的に配置させることを試みた。例えば、脳スライスの髄膜側に CXCL12 ビーズを配置する方法、単離したミクログリアを直接皮質板に移植する方法、*in vivo* で皮質板へと移動を終えたニューロン特異的に CXCL12 を過剰発現させミクログリアを誘引する方法を選択した。ミクログリア近傍のニューロンへの影響を組織学的に解析した結果、ニューロンの機能成熟に関わる重要な遺伝子群の発現に乱れが生じていることを見出した。さらに、ミクログリアと共培養したニューロンについて RNA シークエンス解析を行い、ニューロンの成熟を乱すミクログリア由来分子を探索した。その結果、1 型インターフェロン（IFN-I）とインターロイキン 6（IL-6）が候補として浮上した為、上述の *in vivo* でミクログリアを強制的に皮質板へと誘引する方法と、候補分子に対する中和抗体の脳室投与を組み合わせ、その分子の関与について検証した。

【結果】ライブイメージングの結果、ミクログリアは E14 において脳実質内を両方向に移動する性質を有することを発見し、皮質板内に存在するミクログリアは髄膜方向へと、中間帯に存在するものは脳室方向に向かって移動することが分かった。そして、ミクログリアが髄膜および脳室下帯が産生する CXCL12 を感知して移動した結果、皮質板から離脱することを明らかにした。また、本来皮質板から不在となる胎生中期にミクログリアを皮質板へと強制的に配置すると、近傍のニューロンにおいてⅡ～Ⅳ層ニューロンマーカーである Satb2 や Cux1 等の発現が異常に高まり、逆に Ctip2 等のⅤ層ニューロンマーカーの発現は低下することを見出した。さらに、この発現変化をきたす要因としてミクログリア由来の IFN-I と IL-6 を同定した。以上の結果は、ミクログリアが一時的に皮質板から離れることによって皮質板に存在するニューロンの適切な成熟の進行を乱さないように自身の居場所を調節していることが示唆された。

胎生中期皮質板内の異所性ミクログリアはニューロンの成熟ステップを乱す



158. ニューロンの適切な個性化とミクログリア分布の関連性

服部　祐季

名古屋大学 大学院医学系研究科 細胞生物学分野

Key words：ミクログリア，ニューロン，大脳，脳発生，ライブイメージング

緒　言

生後や成体脳におけるミクログリアの機能については、異物や死細胞を貪食して除去することにより脳内の環境を整備する［1］ことや、神経回路が適切に構築されるように監視する［2］などが知られる。一方で、胎生期における役割や存在意義についてはまだ不明な点が多い。

胎生期の大脳の発生は、神経系細胞の産生や分化に伴う移動が緻密に制御されて進行する。脳構成細胞のうち神経系細胞が大部分を占めるが、ミクログリアも胎生早期から存在する。ミクログリアは少数（約 1%）ながらも細胞突起を遠くへ伸ばして周辺の多数の神経系細胞と接することができる。過去の研究により、ミクログリアが神経幹細胞から中間前駆細胞への分化を促進し、脳実質内を広範囲に動くことでその機能を効率的に果たすことを明らかにした［3］。加えて、海外の研究グループの研究成果により、ミクログリアが貪食により神経系中間前駆細胞の数を調節していること［4］や、介在ニューロンの配置にも貢献していること［5］がわかってきている。

興味深いことに、ミクログリアは胎齢の進行に伴い大脳実質内での分布を変化させることが知られている。すなわち、マウス E14 までは脳室側から髄膜側にわたって大脳実質全体に均一に存在しているが、E15 から E16 において皮質板（分化を遂げたニューロンが積み重なる領域）から不在となる。そして、E17 になると再び皮質板に分布する（図 1）。ミクログリアが本来存在する場所（脳室帯、脳室下帯、中間帯）における機能は、上述のようなことが明らかとなってきている一方、胎生中期に皮質板から一時的に不在となるしくみや意義はこれまで問われていなかった。そこで本研究では、マウス胎生期の大脳実質におけるミクログリアの分布変化のメカニズムと、胎生中期皮質板からの一過性離脱の生理学的意義について明らかにすることを目指した。

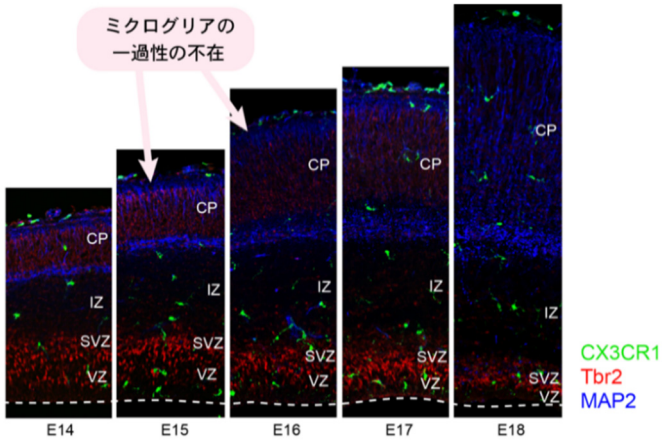


図 1. マウス胎生期大脳におけるミクログリアの分布変化

各胎齢の大脳実質におけるCX3CR1（ミクログリア）、Tbr2（神経系中間前駆細胞）、MAP2（成熟ニューロン）の免疫染色画像。ミクログリアはE15からE16において皮質板から一過性に不在となる。CP：cortical plate 皮質板、IZ：intermediate zone 中間帯、SVZ：subventricular zone 脳室下帯、VZ：ventricular zone 脳室帯。スケールバー：100 μm。

本研究により、ミクログリアは E14 で実質内を活発に移動し、皮質板内に存在するミクログリアは髄膜方向へと、中間帯に存在するものは脳室方向に向かって移動することがわかった。さらに、ミクログリア（CXCR4 を発現）が髄膜もしくは脳室下帯が産生する CXCL12（CXCR4 のリガンド）を感知して移動した結果、皮質板から離脱することを見出した。また、ミクログリアが皮質板から不在となる E15〜E16 の時期にミクログリアを皮質板内に強制的に配置させ、近傍のニューロンへの影響を解析した。その結果、ミクログリアが過多に集積した領域のニューロンにおいて、機能成熟あるいはニューロンサブタイプの決定に関わる重要な遺伝子群の発現に乱れが生じていることを発見した。さらに、この遺伝子発現変動をきたす要因として、ミクログリアが産生する 1 型インターフェロン（IFN-I）とインターロイキン 6（IL-6）を同定した。以上の結果から、ミクログリアは CXCL12／CXCR4 依存的に脳実質内を移動し皮質板から離脱すること、そしてこの移動機構は、ニューロンの機能成熟が適切になされるために必要であることが示唆された。

本研究成果は、2020 年 4 月 2 日付、Nature Communications 誌に掲載された。

発表雑誌：Hattori Y et al. Transient microglial absence assists postmigratory cortical neurons in proper differentiation. Nat Commun. 2020 Apr 2; 11(1): 1631. PMID: 32242005 DOI: 10.1038/s41467-020-15409-3

方法および結果

1. ミクログリアは大脳実質内を両方向に移動し皮質板から不在となる

はじめに、ミクログリアが皮質板から不在となる現象を理解するために、ミクログリア可視化マウスである CX3CR1-GFP マウスを用いて、脳スライス培養下ライブイメージングによりミクログリアの動態を経時的に観察した。E14 のライブイメージングを実施した結果、まず脳壁外側である皮質板内のミクログリアは、髄膜方向へと進み辺縁帯へと集積する傾向があることを見出した（図 2）。

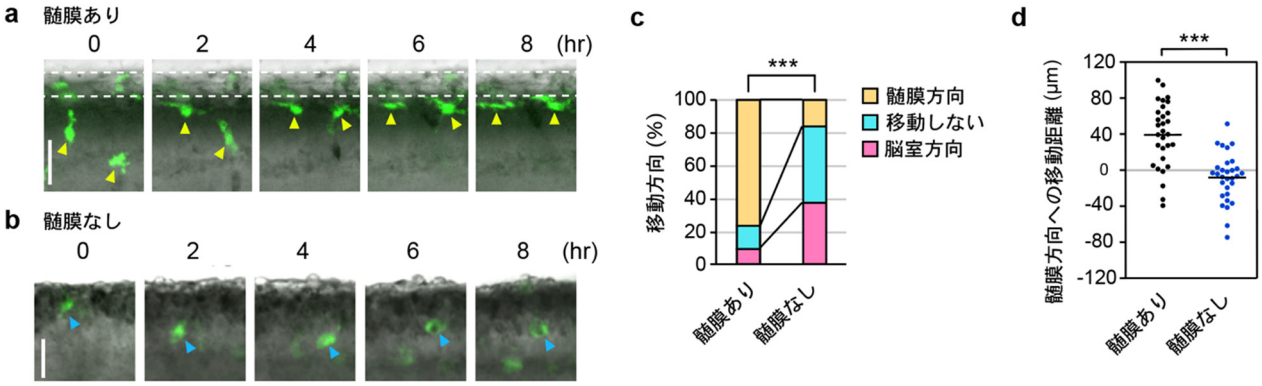


図 2. 皮質板内のミクログリアは髄膜に向かって移動し辺縁帯に集積する

a) 脳スライス培養下ライブ観察による 8 時間タイムラプス画像で、皮質板領域を示す。皮質板内のミクログリアが髄膜方向へと移動し、辺縁帯に集積する様子を捉えている。白点線領域：髄膜。スケールバー：50 μm。

b) 髄膜を剥いだ場合の 8 時間タイプラプス画像。移動できずにその場にとどまるミクログリアが示されている。スケールバー：50 μm。

c) 髄膜ありとなしの条件で培養した場合のミクログリアの移動方向の割合を比較したグラフ（Pearson's chi-squared test、P=2.2×10^{-16}）。

d) 観察前（t=0 hr）と後（t=8 hr）の差を移動距離として算出し、髄膜ありとなしの条件で比較したグラフ（Mann–Whitney U test、P=5.1×1^{-7}）。

一方、脳壁内側（脳室帯、脳室下帯、中間帯）でのミクログリアの動態観察を行ったところ、皮質板内ミクログリアとは逆に、脳室方向に向かって移動する傾向が認められた（図 3）。

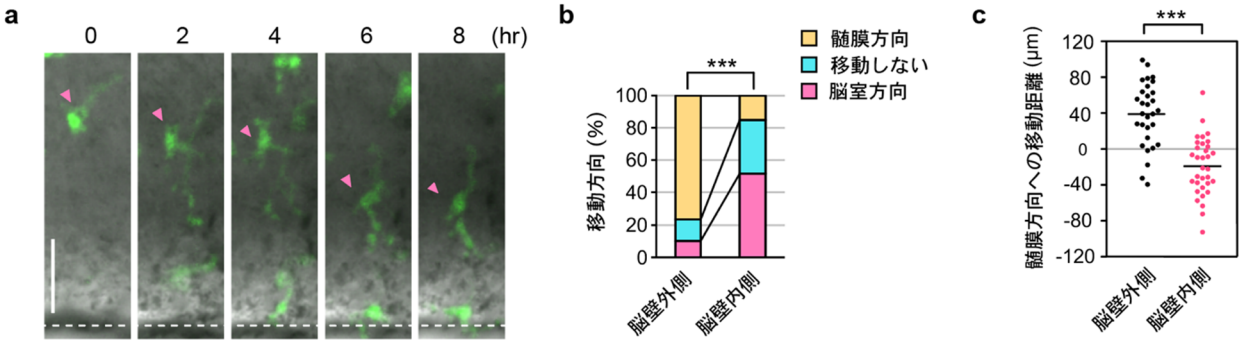


図 3. 大脳実質内側のミクログリアは脳室方向に向かって移動する

a) 脳スライス培養下ライブ観察による 8 時間タイムラプス画像で、大脳実質内側領域を示す。ミクログリアが脳室方向へと向かって移動する様子が観察される。白線領域：脳室面。スケールバー：50 μm。

b) 脳壁外側（皮質板）と内側（脳室帯、脳室下帯、中間帯）のミクログリアの移動方向の割合を比較したグラフ（Pearson's chi-squared test、$P=2.2\times10^{-16}$）。

c) 観察前（t=0 hr）と後（t=8 hr）の差を移動距離として算出し、脳壁外側と内側のミクログリアの移動距離を比較したグラフ（Mann–Whitney U test、$P=3.1\times10^{-8}$）。

2. ミクログリアは CXCL12/CXCR4 を介して移動する

次に、ミクログリアの髄膜方向あるいは脳室方向への移動を制御する分子を探索した。ケモカインの一種である CXCL12 が E14 の大脳において髄膜と脳室下帯で特異的に産生されることに着目した（図 3a）。一方、ミクログリアは CXCL12 の受容体である CXCR4 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 を候補として考え検証した。CX3CR1-GFP$^{+/-}$：*Cxcr4* $^{+/-}$マウス胎仔のライブ観察を実施したところ、*Cxcr4* $^{+/+}$野生型マウスで認められた両方向性の移動傾向がなくなり、移動できずにその場にとどまるミクログリアの割合が増加した。この結果から、髄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実質内を両方向に移動した結果、皮質板から不在となることが示唆された（図 4）。

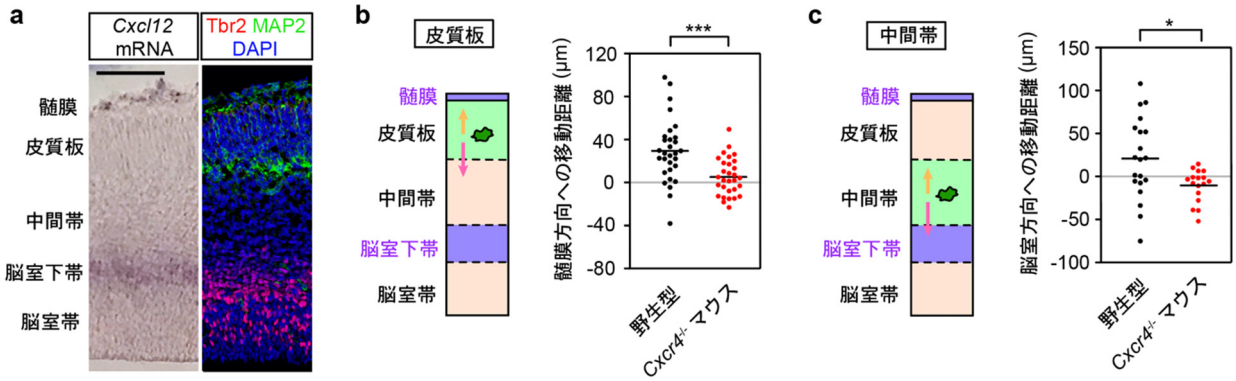


図 4. ミクログリアは CXCL12/CXCR4 依存的に脳壁内を両方向に移動する

a) E14大脳実質における*in situ* hybridizationによる*Cxcl12*のmRNA発現（左）と隣接切片のTbr2／MAP2／DAPIの免疫染色画像（右）。スケールバー：100 μm。

b) 皮質板に局在するミクログリアの髄膜方向への移動距離について、野生型マウスと*Cxcr4*$^{-/-}$マウスで比較した（Mann–Whitney U test、$P=1.5\times10^{-4}$）。

c) 中間帯に局在するミクログリアの脳室方向への移動距離について、野生型マウスと*Cxcr4*$^{-/-}$マウスで比較した（Mann–Whitney U test、$P=0.017$）。

3. 人工的な皮質板へのミクログリア誘引によるニューロンへの影響の解析

次に、ミクログリアが胎生中期に皮質板から一時的に抜け出すことが脳発生過程でどのような意味をなすのか調べることにした。「ミクログリアの皮質板からの不在がニューロン成熟の適切な進行に必要なのではないか」との仮説を立て、その検証のために、ミクログリアを人工的に皮質板へと配置させ、ニューロンへの影響の有無を調べることにした。皮質板内のニューロンが特異的に CXCL12 を発現する遺伝子導入システムの利用や、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を用いて、ミクログリアを皮質板へと強制的に誘引したところ、ミクログリア近傍の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た。すなわち、Ⅱ～Ⅳ層ニューロンのマーカーである Satb2 や Cux1 等の発現が異常に高まり、逆に Ctip2 等のⅤ層ニューロンのマーカーは発現が低下していた。一般的に、ニューロンの運命は脳室帯や脳室下帯に存在する頃の神経前駆細胞の時点である程度決まる［6］ことが知られるが、まだ完全には決まっておらず最終的な調節を皮質板に移動し終えた後で受けるとの報告がある［7］。したがって、上述の結果は、過剰なミクログリアによってニューロンの成熟プロセスが乱れることを意味し、脳づくりの進行にはミクログリアが適切なタイミングで皮質板から退出する必要がある可能性が示唆された。

4. ミクログリア由来の IFN-I と IL-6 がニューロン成熟ステップを乱す

さらに、ニューロンにおける遺伝子発現パターンの変化をきたすミクログリア由来分子を探索した。培養下で用意した皮質板を構成するニューロンを、ミクログリア存在下、および、非存在下で培養した後、ニューロンのみから全遺伝子を回収し RNA シークエンス解析を実施した。両群の遺伝子発現を比較したところ、ミクログリアと共培養したニューロンにおいて、サイトカインの 1 型インターフェロン（IFN-I）とインターロイキン 6（IL-6）によって活性化される細胞内シグナル経路に関連する分子群の発現が高まっていることが確認された。この結果に基づき、IFN-I と IL-6 が関与する可能性を検証する為、皮質板内のニューロンが特異的に CXCL12 を発現する遺伝子導入システムと、これらの分子に対する中和抗体の脳室投与を組み合わせ、生体レベルで解析を行った。その結果、中和抗体投与条件では、ミクログリアによるニューロンの性質変化が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示唆された（図 5）。

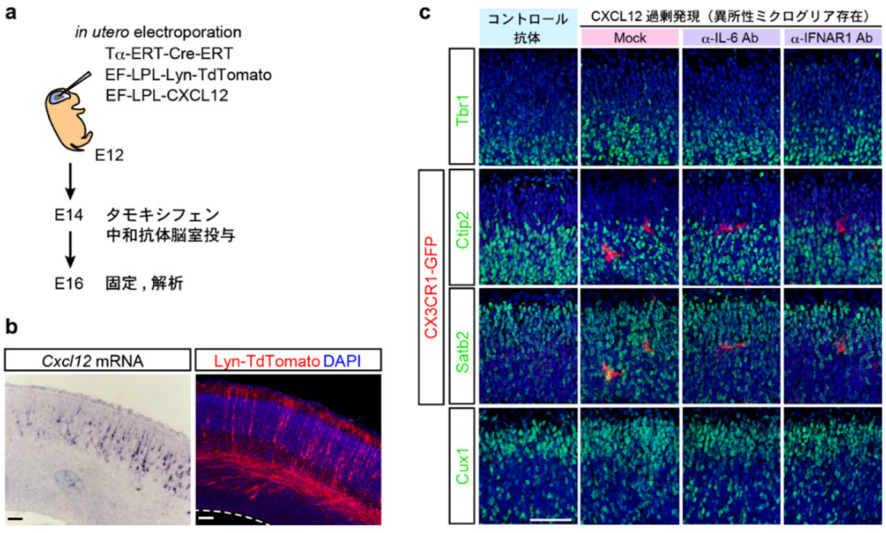


図 5. IFN-I または IL-6 の中和抗体脳室投与で異所性ミクログリアによるニューロンへの影響が緩和された

a) 皮質板まで移動したニューロン特異的にCXCL12を過剰発現させるシステムのタイムスケジュールを示す。E12で遺伝子導入し、E14でタモキシフェン投与、E16で脳を固定し組織学的解析を行った。

b) E16 大脳実質における *in situ* hybridization による *Cxcl12* の mRNA 発現（左）と隣接切片の RFP（Lyn-TdTomatoの発現領域を検知）の免疫染色画像（右）。スケールバー：50μm。

c) a) による実験で固定したE16脳切片の免疫染色写真。CX3CR1 (red)、Tbr1／Ctip2／Satb2／Cux1 (green)、DAPI（blue）。スケールバー：50μm。

考　察

以上の結果から、ミクログリアは胎生中期に CXCR4 を介して髄膜や脳室下帯で産生される CXCL12 を感知し皮質板を一時的に抜け出すこと、そして、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に局在をうまく調節していることが示唆された。一つ一つのニューロンが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、ニューロンの成熟を遠くから見守っていると考えられる。

近年、感染症、低栄養・肥満等による母体の免疫活性化が胎児の統合失調症、自閉症等の発症リスクを高めることが報告されており、ミクログリア活性化による影響も懸念されている。しかしながら、そのメカニズムや実態はまだ分かっていない。本研究による「正常脳におけるミクログリア挙動」の理解は、母体炎症時の異常所見を見出すのに役立つと考えられ、今後はこれまでに得たミクログリア動態の情報を手がかりに、母体炎症に起因する病態の理解を目指して研究を展開していきたい。

共同研究者・謝辞

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、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（当時）の津川陽司博士の協力を得て行われた。

文　献

1） Matcovitch-Natan O et al. Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. Science. 2016 Aug 19;353(6301):aad8670. PMID: 27338705 DOI: 10.1126/science.aad8670

2） Wake H et al. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. J Neurosci. 2009 Apr 1;29(13):3974-80. PMID: 19339593 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009

3） Hattori Y and Miyata T. Microglia extensively survey the developing cortex via the CXCL12/CXCR4 system to help neural progenitors to acquire differentiated properties. Genes Cells. 2018 Oct;23(10):915-922. PMID: 30144249 DOI: 10.1111/gtc.12632

4） Cunningham CL et al. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. J Neurosci. 2013 Mar 6;33(10):4216-33. PMID: 23467340 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3441-12.2013

5） Squarzoni P et al. Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. Cell Rep. 2014 Sep 11;8(5):1271-9. PMID: 25159150 DOI: 10.1016/j.celrep.2014.07.042

6） Molyneaux BJ et al. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. Nat Rev Neurosci. 2007 Jun;8(6):427-37. PMID: 17514196 DOI: 10.1038/nrn2151

7） Kwan KY et al. SOX5 postmitotically regulates migration, postmigratory differentiation, and projections of subplate and deep-layer neocortical neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Oct 14;105(41):16021-6. PMID: 18840685 DOI: 10.1073/pnas.0806791105