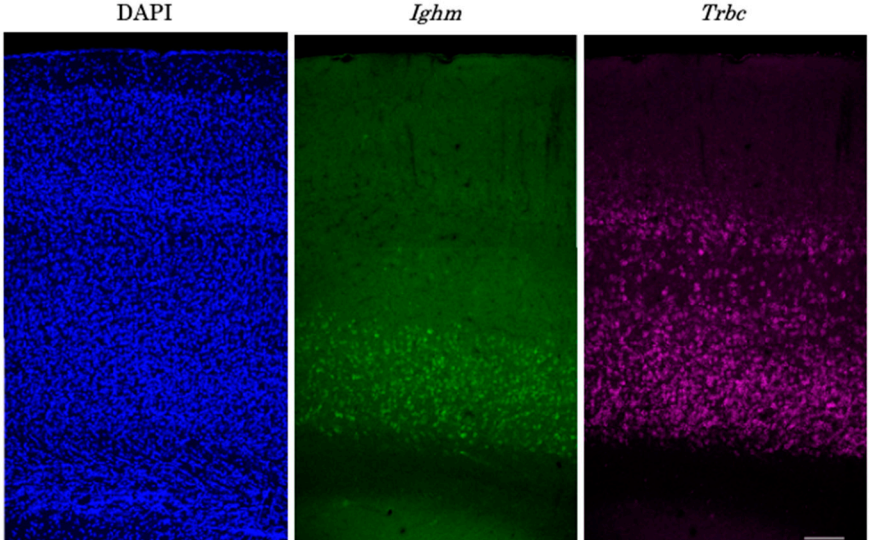
41　脳発生過程における免疫関連分子の意義の解明	仲嶋　一範

【目的】我々の大脳皮質は数百億個にのぼる神経細胞から構成され、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアといったグリア細胞とも複雑に相互作用して、多様かつ特異的な神経回路網を形成することで様々な入力に対して秩序だった適切な応答をすることができる。さらに近年、その機能には、脳実質の回路網に直接関わる細胞だけでなく、末梢組織から進入してくる B 細胞や T 細胞などの免疫細胞も関与することが明らかになりつつある。神経系と免疫系はともに多様性と特異性を最大の特徴として持つことから共通の分子群を用いていることが想定され、これまでに神経ガイダンス因子である Semaphorin や Eph／Ephrin、補体系、Toll 様受容体（Toll-like receptor：TLR）、ケモカイン、サイトカインなど多くの分子が両者で用いられていることが明らかになりつつある（Morimoto et.al., Front Neurosci. 2019）。一方、既報では自然免疫系に関わる分子の神経系での役割の報告が主であり、獲得免疫系に関わる分子については知見が乏しい。神経系の多様性を免疫関連分子で担保するには、ほぼ無限の相手を特異的に認識できる B 細胞受容体 （B cell receptor：BCR）すなわち免疫グロブリン（Immunoglobulin：Ig）や、T 細胞受容体（T cell receptor：TCR）が有力な候補になると予測し、本研究ではこれらの脳における発現の検討を行った。

【方法】発生期および成体のマウス脳を用いて、*in situ* hybridization chain reaction、免疫組織化学染色、逆転写後 PCR、single cell RNA-seq（scRNA-seq）のデータを用いた解析を行い、Ig と TCR をコードする mRNA を発現する細胞を調べた。

【結果】IgM の重鎖の定常領域である *Ighm* の成体脳における発現を *in situ* hybridization chain reaction 法を用いて調べたところ、大脳皮質深層神経細胞で発現することがわかった。皮質深層の神経細胞には *Ighm* mRNA 陰性の細胞も見出されたことから、同部位には *Ighm* を発現する神経細胞と発現しない神経細胞とが混在していることが示唆された。次に、生後 0 日及び 8 週齢のマウスの大脳皮質から調製した RNA を用いて逆転写後に PCR を行ったところ、*Ighm* mRNA は成体期のみならず発生期においても発現していることが見出された。次に TCR について生後 5 日のマウス大脳皮質の scRNA-seq のデータを用いて検討した結果、TCR α 鎖の定常領域をコードする *Trac* が少数の細胞に発現することが明らかになった。また、TCR β 鎖に関しては、*Trbc1* と *Trbc2* のうち *Trbc2* が主に発現していることが見出された。そこで次に *in situ* hybridization chain reaction を行ったところ、*Trbc* は生後直後は視床で発現するものの生後 4 日頃からは大脳皮質深層でも発現するようになり、その後大脳皮質での発現は浅層にも広がり成体においては広く大脳皮質に発現することが明らかになった。

大脳皮質における免疫グロブリン IgM 定常領域（*Ighm*）および T 細胞受容体定常領域（*Trbc*）の mRNA の発現



41. 脳発生過程における免疫関連分子の意義の解明

仲嶋　一範

慶應義塾大学 医学部 解剖学教室

Key words：大脳皮質発生，免疫グロブリ，T 細胞受容体，神経細胞

緒　言

我々の大脳皮質は数百億個にのぼる神経細胞から構成され、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアといったグリア細胞とも複雑に相互作用して、多様かつ特異的な神経回路網を形成することで様々な入力に対して秩序だった適切な応答をすることができる。さらに近年、その機能には、脳実質の回路網に直接関わる細胞だけでなく、末梢組織から進入してくる B 細胞や T 細胞などの免疫細胞も関与することが明らかになりつつある。神経系と免疫系はともに多様性と特異性を最大の特徴として持つことから共通の分子群を用いていることが想定され、これまでに神経ガイダンス因子である Semaphorin や Eph／Ephrin、補体系、Toll 様受容体（Toll-like receptor：TLR）、ケモカイン、サイトカインなど多くの分子が両者で用いられていることが明らかになりつつある［1］。一方、既報では自然免疫系に関わる分子の神経系での役割の報告が主であり、獲得免疫系に関わる分子については知見が乏しい。神経系の多様性を免疫関連分子で担保するには、ほぼ無限の相手を特異的に認識できる B 細胞受容体 （B cell receptor：BCR）すなわち免疫グロブリン（Immunoglobulin：Ig）や、T 細胞受容体（T cell receptor：TCR）が有力な候補になると予測し、本研究ではこれらの脳における発現の検討を行った。

方　法

1. 動物

マウスを用いた全ての動物実験は、慶應義塾動物実験委員会と慶應義塾大学医学部遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て、動物実験ガイドライン、日本の動物の愛護および管理に関する法律、および日本政府の動物の飼養と保管に関する通知などの法令を遵守して実施した。妊娠中の C57BL/6J マウスは、日本 SLC から購入した。マウスは、温度管理された部屋で 12 時間の明期及び 12 時間の暗期のサイクルで飼育され、膣栓を認めた日の午前 0 時を胎生　0 日（embryonic day 0：E0）とした。

2. *in situ* hybridization chain reaction（HCR）

4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後のマウス脳をビブラトーム（Leica）を用いて 100 μm 厚で切った脳切片を用いて、*in situ* HCR 法 v3.0 により染色を行った［2］。具体的には、脳切片を 0.1%ジエチルピロカーボネート入りリン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline：PBS）に入れて室温で 5 分インキュベーション後、hybridization solution（Molecular Instruments、Los Angeles、CA）に移して 37℃で 200 rpm にて 30 分振盪した。*Ighm*（プローブ数＝20）、*Trbc*（ENSMUST00000103299、プローブ数＝11）のプローブセットは Molecular Instruments から購入し、4 nM のプローブを入れて切片を 37℃で一晩振盪した。翌日あらかじめ温めた wash solution（Molecular Instruments）で 37℃で 15 分の洗浄を 3 回行った後、0.1% Tween20 入り 5×SSC（5×SSCT）を用いて室温で 5 分の洗浄を 3 回行った。蛍光標識されたヘアピン（B1-AlexaFluor647、B2-AlexaFluor647、B2-AlexaFluor488） を amplification solution（Molecular Instruments）で希釈したものに切片を移し、室温で 200 rpm にて一晩振盪した。5×SSCT で洗浄後、免疫組織染色を行うものに関しては 4%パラホルムアルデヒドを用いて固定し 0.05% TritonX100 入り PBS（PBST）で 5 分間 3 回洗浄した。その後、10%ヤギ血清を用いて室温で 1 時間ブロッキングし、1 次抗体

（ウサギ抗 NeuN ポリクローナル抗体、200 倍希釈（Merck Millipore、MA、USA、Cat.#ABN78））を用いて 4℃で一晩反応させた。PBST で 5 分間 3 回洗浄したのち、2 次抗体（Alexa Fluor 647 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG（H+L）、500 倍希釈（AB_2338078、Jackson Immuno Research、USA））と 4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）（2,000 倍希釈）を用いて室温で 2 時間反応させた。その後 PBST で 5 分間 3 回洗浄し、PermaFluor Aqueous Mounting Medium（TA-006-FM LVC、Richard-Allan Scientific）で封入した。画像は共焦点レーザー走査顕微鏡（Leica TCS SP8）で取得した。

3. Polymerase chain reaction（PCR）

生後 0 日（P0）及び 8 週齢（8W）のマウス大脳皮質及び脾臓をメスで切り出し、RNeasy mini kit（Qiagen, Cat No.74104）で RNA を調製した。調製した RNA をテンプレートに Superscript Ⅲ First-Strand cDNA Synthesis Kit（Invitrogen、Carlsbad、USA）を用いて cDNA を作製した。IgM 重鎖定常領域をコードする遺伝子（*Ighm*）を増幅するため、PCR 用のプライマーを 5’側と 3’側とにそれぞれ設計した。PCR は Extaq DNA ポリメラーゼ（Takara）を用いて、95℃（30 秒）→55℃（30 秒）→72℃（3 分）の 3 ステップを 35 サイクルで行った。

4. 単一細胞 RNA-seq（single cell RNA-seq,：scRNA-seq）データの解析

生後 5 日（P5）のマウス大脳皮質の scRNA-seq のデータ（SRX8492053）を National Center for Biotechnology Information（NCBI）のサイトからダウンロードした。これは、10X Genomics Chromium Single Cell Kit Version 2 によって得られたものである。Seurat で UMAP を作成し、TCR の定常領域を発現する細胞をプロットした。

結　果

1.　IgM 重鎖の定常領域（*Ighm*）の mRNA が発生期から成体期の脳において検出された。

IgM の重鎖の定常領域 である *Ighm* の成体脳における発現を *in situ* hybridization chain reaction 法を用いて調べたところ、*Ighm* mRNA が大脳皮質深層に発現していることが明らかになった（図 1a）。そこで、神経系を構成する各細胞種のマーカーに対する免疫組織化学染色を併用して発現細胞の種類を検討したところ、*Ighm* mRNA は NeuN 陽性細胞、すなわち神経細胞で発現することがわかった（図 1b）。皮質深層の神経細胞には *Ighm* mRNA 陰性の細胞も見出されたことから、同部位には *Ighm* を発現する神経細胞と発現しない神経細胞とが混在していることが示唆された。

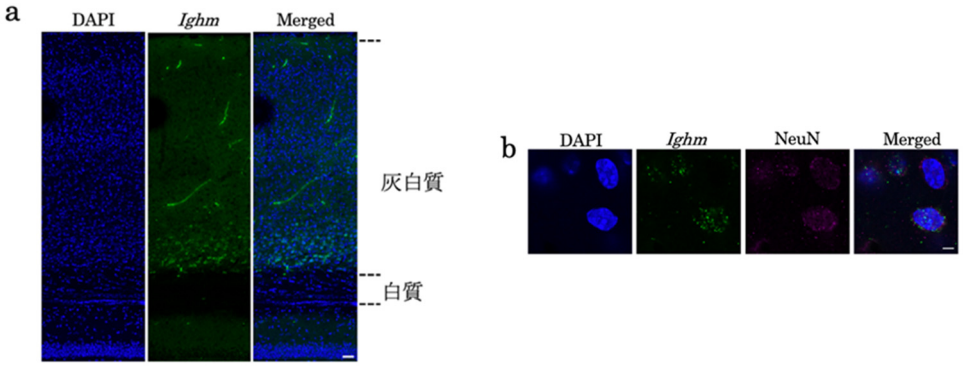


図 1.　成体（8 週齢）マウス大脳皮質における *Ighm* 発現細胞の *in situ* hybridization 及び免疫組織化学染色による検討

a）　*in situ* hybridization chain reaction により、*Ighm* が灰白質の深層の細胞で発現していることがわかった。スケールバー：50 μm。

b）　*Ighm* に対する *in situ* hybridization と免疫組織化学染色を重複して行うことにより、*Ighm* は NeuN 陽性の神経細胞で発現することが見出された。また、同じ深層の神経細胞であっても、*Ighm* 陽性の細胞と陰性の細胞とが混在していることがわかった。スケールバー：5 μm。

そこで次に、P0 及び 8 週齢のマウスの大脳皮質から調製した RNA を用いて逆転写後に PCR を行ったところ、*Ighm* の mRNA が確かに成体期大脳皮質に発現していることが確認され、さらに成体期のみならず発生期においても発現していることが見出された（図 2）。なお、得られたバンドが *Ighm* の配列であることは、シークエンスによって確認した。

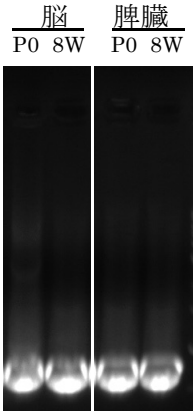


図 2. 逆転写後 PCR 法による *Ighm* mRNA の発現の検討
マウスの脳において、P0 及び 8 週齢（8W）の両方で脾臓と同様に *Ighm* mRNA が検出された。

2. TCR β 鎖の定常領域（*Trbc*）の mRNA が発生期から成体期の脳において検出された。

次に、TCR についても検討を行った。免疫系においては、TCR は α 鎖、β 鎖から構成されるものと、γ 鎖、δ 鎖から構成されるものとが存在することが知られている。そこで、脳においてこれらのうちいずれかの定常領域が発現しているかを調べるため、まずは P5 のマウス大脳皮質の scRNA-seq のデータを用いて検討することとした。Seurat を使って UMAP を作成し、それぞれの mRNA の配列が検出された細胞をプロットした結果を図 3 に示す。

その結果、P5 のマウス大脳皮質において TCR α 鎖の定常領域をコードする *Trac* が少数の細胞に発現することが明らかになった。また、TCR β 鎖に関しては、*Trbc1* と *Trbc2* のうち *Trbc2* が主に発現していることが見出された。そこで次に、発現細胞の分布を調べるため *in situ* hybridization chain reaction を行ったところ、生後直後は視床で発現するものの生後 4 日頃からは大脳皮質深層でも発現するようになり、その後大脳皮質での発現は浅層にも広がり成体においては広く大脳皮質に発現することが明らかになった（図 4）。

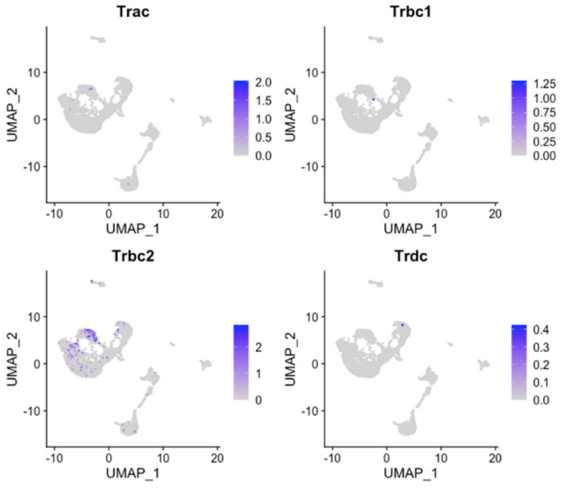


図 3. 生後 5 日（P5）のマウス大脳皮質における TCR の定常領域をコードする mRNA の発現
TCR の α 鎖、β 鎖の定常領域をコードする *Trac*、*Trbc2* が発現していることがわかった。

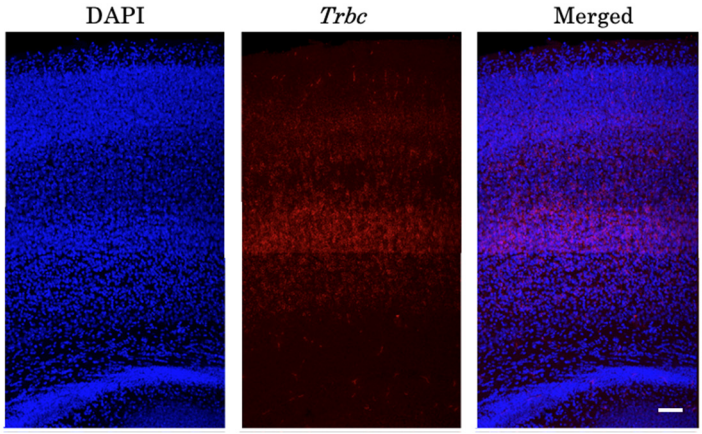


図 4. 生後 7 日（P7）マウス大脳皮質における *Trbc* の発現
P7 のマウス大脳皮質において、*Trbc* mRNA は深層を中心に多くの層で発現していることがわかった（スケールバー：75μm）。

考　察

今回の研究により、発生期から成体期のマウス脳において IgM や TCR の定常領域をコードする mRNA が神経細胞で発現することが明らかになった。今後、これらが脳においてタンパク質に翻訳されるのか、また、免疫細胞における分子と同様に可変領域と組み合わさった分子として機能するのか、Ig については重鎖と軽鎖が揃った形をとるのか、TCR についてはα鎖とβ鎖を伴い細胞内にシグナル伝達が可能であるのかなどを検討する予定である。大脳皮質の同一部位に陽性の神経細胞と陰性の神経細胞とが混在していることは、両者が機能的に異なっている可能性を示唆する。本研究はまだ萌芽的な段階であるが、今後解析を進めることにより、神経系と免疫系の新たなクロストークの様式が明らかになるかも知れない。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、慶應義塾大学医学部解剖学教室の森本桂子、佐野ひとみ、高橋陸央、宮本竜司、小山絢帆である。萌芽的な研究に対しご支援を頂いた上原記念生命科学財団に心から感謝申し上げます。

文　献

1） Morimoto K, Nakajima K. Role of the Immune System in the Development of the Central Nervous System. Front Neurosci. 2019 Sep 3;13:916. PMID: 31551681 DOI: 10.3389/fnins.2019.00916

2） Choi HMT, Schwarzkopf M, Fornace ME, Acharya A, Artavanis G, Stegmaier J, Cunha A, Pierce NA. Third-generation *in situ* hybridization chain reaction: multiplexed, quantitative, sensitive, versatile, robust. Development. 2018 Jun 26;145(12):dev165753. PMID: 29945988 DOI: 10.1242/dev.165753