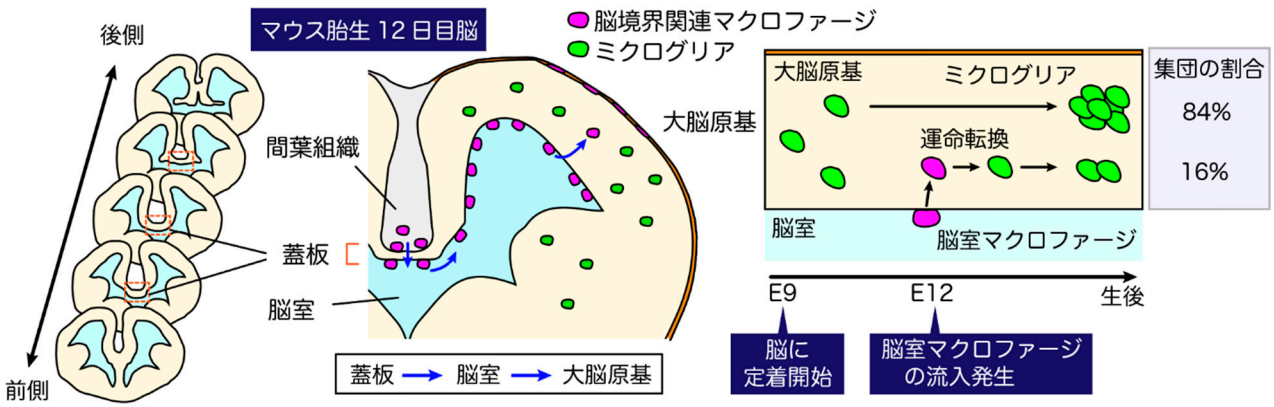
131　ミクログリアの脳定着プロセスと多様性獲得の連関	服部　祐季

【目的】脳には、神経細胞の他にも免疫系の細胞であるミクログリアが存在し、脳の機能を支えている。ミクログリアの成体脳におけるミクログリアの機能解明が進んできた一方、近年、胎生期や生後の脳においても神経前駆細胞の分化制御や血管形成・構造維持に関わるなどさまざまな役割を担うことが明らかになりつつある。一方で、近年急速に発展したシングルセル遺伝子発現解析により、ミクログリアには遺伝子発現的にも多様性があることが示されたが、どのようなプロセスを経て多様性を獲得するのかは依然不明である。そこで、ミクログリアがいかに多様性を獲得するのかについて明らかにするため、本研究では特に「ミクログリアが脳実質にたどりつくまでの分布経路あるいは定着時期が性質多様性に関係する可能性」について注目し、その検証とメカニズムを解明することを目的に、調べることにした。

【方法】中枢神経系には、ミクログリアに加えて、非常によく似た性質を持つも異なる細胞集団である脳境界関連マクロファージが存在する。脳境界関連マクロファージは、脳膜（胎生期での呼称）やその後の髄膜（硬膜、くも膜、軟膜）、脳室、血管周囲スペース、脈絡叢といった血管・間葉組織系と脳実質の境界に位置する細胞集団である。ミクログリアと脳境界関連マクロファージは起源が同じであることが知られており、どちらも卵黄嚢内で形成される血島から生じる Erythromyeloid progenitor（EMP）に由来する。しかし、両者の運命選択がいつ・どこでなされるのかについては未解明である。そこで私たちは、マウスの脳スライス培養下ライブイメージング、二光子顕微鏡を用いた胎仔脳 *in vivo* イメージング（胎生早期のマウスに対する観察システムを新たに構築）、マクロファージマーカーのフェイトマッピング、細胞標識・追跡解析等を通じて、胎生早期にミクログリアが脳に定着する際にたどる分布ルートの同定やその細胞動態および分子メカニズムの解析を行った。

【結果】マウススライス培養ライブイメージングの結果、脳室内腔に存在するマクロファージが胎生 12 日目に高頻度で大脳原基に侵入することを見出した。胎生 13〜14 日目ではほとんど侵入が起こらないため、胎生 12 日目が脳室マクロファージの流入が起こりやすく、侵入を許容できる特有の時期であることが示唆された。また、胎仔脳 *in vivo* イメージングでもこの結果を示唆する結果を得ることができた。さらに、細胞標識・追跡解析、フェイトマッピング解析を通じて、大脳原基に侵入した脳室マクロファージが周囲の環境に呼応してミクログリアへと分化することを明らかにした。以上の結果から、ミクログリア・マクロファージの運命決定は脳に移行してから行われることを示唆し、大脳に分布するミクログリアの一部は脳室マクロファージに由来することが明らかとなった。したがって、マウスにおいて脳内のミクログリアは少なくとも二つの異なる定着ルートをたどる細胞集団からなり、胎生 9〜10 日目頃にミクログリアの性質を備えて脳に定着を開始する群に加えて、その後遅れて（胎生 12 日目）脳室から流入する群が存在することが分かった。

脳室マクロファージを介したミクログリアの脳定着ルート



131. ミクログリアの脳定着プロセスと多様性獲得の連関

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，マクロファージ，脳発生，脳境界，ライブイメージング

緒　言

ミクログリアは、脳や脊髄などの中枢神経系に存在する免疫系の細胞である。ミクログリアは、アストロサイトやオリゴデンドロサイトとともにグリア細胞として分類されるが、ミクログリアだけは起源の異なる細胞集団である。すなわち、アストロサイトやオリゴデンドロサイトは神経細胞と同じく、脳実質の脳室面近傍に並ぶ神経幹細胞から生み出される。これに対し、ミクログリアは発生初期に卵黄嚢において生じる前駆細胞に由来する。

ミクログリアの細胞特性や機能については長年の研究から明らかになってきた。成体脳における機能に関しては、ニューロンのシナプスやスパインの形成・除去を通じて神経回路のリモデリングを行うこと、異物や死細胞を貪食することにより脳内環境を整えることなどが知られている［1］。また、神経変性疾患、感染症、脳梗塞等の病態時においては、炎症応答や組織修復に関わることが報告されている［2］。胎生期から生後にわたる脳発生過程での機能についても近年研究が進み、神経幹細胞からの分化促進、貪食を通じた神経前駆細胞の数の制御、ニューロンの移動・配置調節などが報告されている［3］。そしてこういった機能を適切な時期・場所で発揮するには、その分布を制御する機構が円滑に働くことが肝心であることが伺える。

中枢神経系には、ミクログリアに加えて、非常によく似た性質を持つも異なる細胞集団である脳境界関連マクロファージが存在する。脳境界関連マクロファージは、脳膜（胎生期での呼称）やその後の髄膜（硬膜、くも膜、軟膜）、脳室、血管周囲スペース、脈絡叢といった血管・間葉組織系と脳実質の境界に位置する細胞集団である［4，5］。

ミクログリアと脳境界関連マクロファージは起源が同じであることが知られており、どちらも卵黄嚢内で形成される血島から生じる Erythromyeloid progenitor（EMP）に由来する［6］。マウスにおいては胎生 7〜8 日目に卵黄嚢で前駆細胞の EMP が誕生し、胎生 9〜10 日目頃からミクログリアあるいは脳境界関連マクロファージとして脳に定着を始める（図 1）。

しかし、両者の運命選択がいつ・どこでなされるのかについては議論の余地がある。卵黄嚢に存在する前駆細胞のシングルセル解析により、脳境界関連マクロファージのマーカー分子である CD206 の発現の有無で細胞集団が分かれることが判明したことから、卵黄嚢に存在する前駆細胞の時点で両者の運命選択がなされるのではないかというモデルが提唱された［7］。しかし、別の研究グループらによる CD206 陽性細胞のフェイトマッピング解析によって、CD206 を発現する前駆細胞が脳境界関連マクロファージだけではなくミクログリアにも分化できることが実証された［8］。すなわち、卵黄嚢に存在する時点では運命が完全に決まるのではなく、運命選択にまだ“ゆらぎ”があることが示唆された。

このように CD206 陽性前駆細胞から脳境界関連マクロファージだけでなくミクログリアも生じることが明らかになった一方で、いつ・どこでそれぞれに運命づけられるのかについては未解明な点として残っていた。そこで我々は、ミクログリアあるいは脳境界関連マクロファージとして脳内に定着した後にまだ運命転換が起こり得る、つまり、周囲の環境に呼応して運命を選択する可能性を考え、その検証を行った。

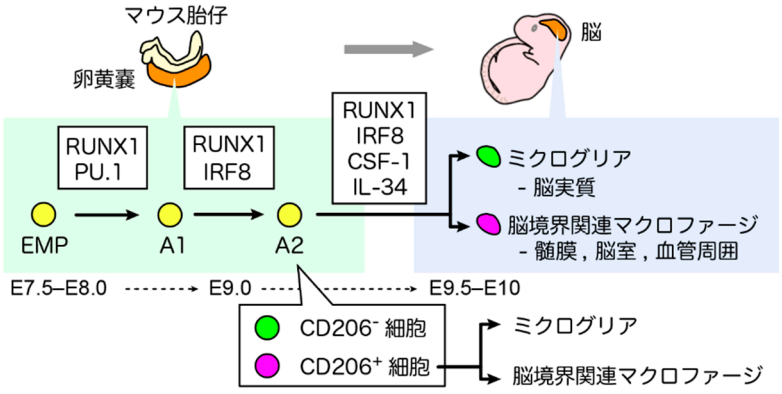


図 1. ミクログリアの脳境界関連マクロファージの分類と運命決定

マウスにおけるミクログリアおよび脳境界関連マクロファージの発生の経過を示す。どちらも卵黄嚢で発生する EMP を起源とし、A1 細胞、A2 細胞を経てそれぞれに分化する。過去の研究から、A2 細胞の段階で CD206 陽性と陰性の細胞集団に別れることが分かっている。

方法および結果

1. 脳スライス培養イメージングによる脳室マクロファージの大脳原基への流入の観察

まず、マウス胎生早期の脳におけるミクログリアおよび脳境界関連マクロファージの分布を免疫染色により調べた。胎生 14 日目以降は大脳原基に存在する CX3CR1 陽性細胞のほとんどが CD206 陰性・P2RY12 陽性でミクログリアの性質を示し、CD206 陽性・P2RY12 陰性の特徴を有する脳境界関連マクロファージは脳室や脳膜に限局し、両者の分布は明瞭に分かれていた。一方、胎生 12 日目では大脳原基内に CD206 陽性細胞が 50～60%を占めていた。詳細に観察すると、脳室内腔には多数のマクロファージが脳室面に張り付いた状態で存在しており、大脳原基に向かってその細胞突起を侵入させている様子が観察された。そこで、胎生早期に脳室からマクロファージが流入し、その後脳実質内でミクログリアへと運命を転換する可能性を考えた（図 2）。

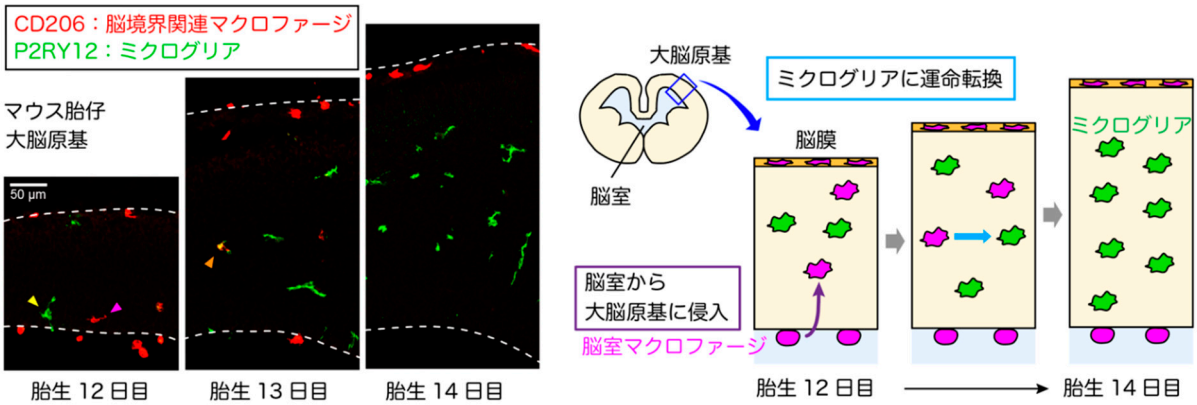


図 2. マウス胎生早期のミクログリアと脳境界関連マクロファージの分布と仮説

マウス胎生 12～14 日目の大脳原基および脳境界（脳室・脳膜）におけるミクログリアおよび脳境界関連マクロファージの分布を示す。胎生 14 日目では、両者の分布が大脳原基と脳境界で明瞭に分かれるのに対し、胎生 12～13 日目では脳境界関連マクロファージが大脳原基内に存在する（左）。したがって、胎生 12 日目前後で脳境界からマクロファージが大脳原基に侵入し、その後ミクログリアへと運命転換するという仮説を立てた（右）。

ミクログリアと脳境界関連マクロファージが緑色蛍光タンパク質 GFP を発現する Cx3cr1-gfp$^{+/-}$ マウスを用いて、脳スライスの培養下ライブイメージングを行った。脳室面に付着するマクロファージの挙動を観察したところ、マウス胎生 12 日目に大脳原基内へと高頻度で侵入することを見出した。これに対して、胎生 13 日目以降ではその侵入がほとんど起こらなかった。一方、胎生 12 日目から胎生後期にかけては、脳膜から大脳原基実質へのマクロファージ流入がほぼ起こらないことを確認した。これらの観察結果から、胎生 12 日目は脳室からのマクロファージ流入が起こりやすく、侵入を許容できる特有の時期であることが示唆された。

一方、脳室マクロファージが背側の間葉組織から蓋板と呼ばれる部分を通り抜けて供給されることを併せて捉えたことから、ミクログリアが脳にたどりつくまでの一つの経路として、「蓋板→脳室→大脳原基」という経路が存在することを見出した。

2. 胎仔脳 *in vivo* イメージングシステムによる細胞動態観察

しかし、脳スライス培養の観察では脳に外科的侵襲を加えるため、その影響を否定できなかった。そこで、観察した現象が実際に生体内で起こるのかを調べるため、胎生 12 日目のマウス胎仔に対する *in vivo* ライブイメージングシステムを新たに構築した（図 3）。胎生 12 日目のマウス胎仔に対し、胎盤を残した状態で母体から切り離し、温度・酸素供給を整えた外部環境下で生育することで、生きた状態で二光子顕微鏡による観察を行った。この方法を用いて、固定器具内で直立させた胎仔の頭頂部から脳内深部を観察し、脳室マクロファージが大脳原基に侵入する瞬間を実際に捉えることができた。従って、脳室からのマクロファージ流入は生体内でも起こる現象であることが示された。

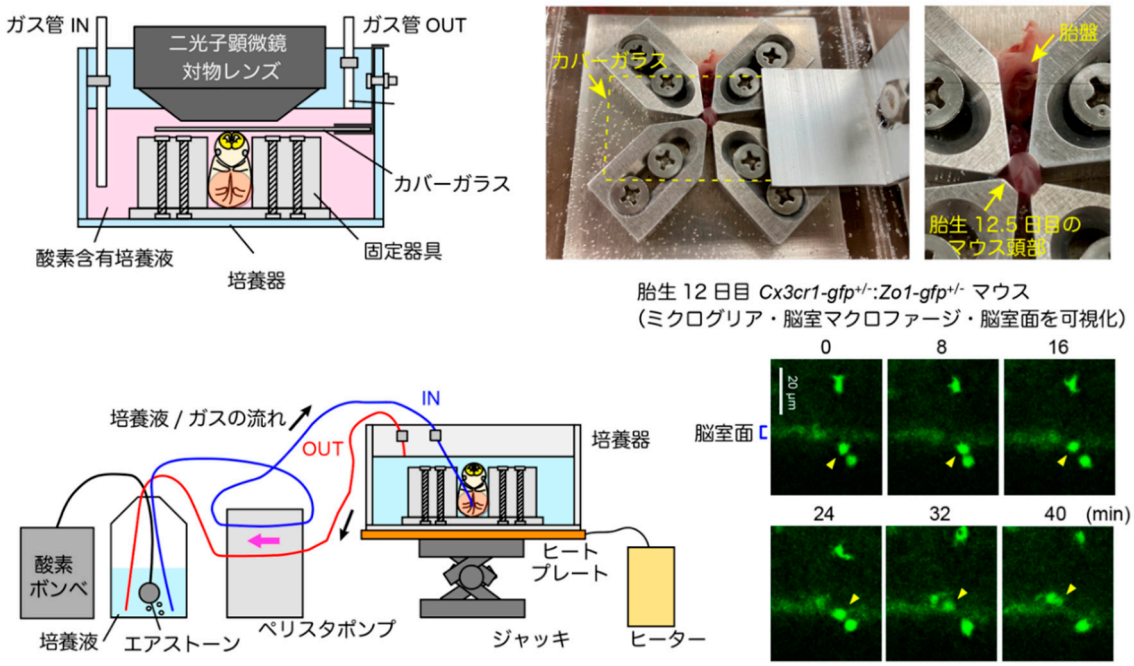


図 3. 二光子顕微鏡によるマウス胎仔脳 *in vivo* イメージングシステム

マウス胎生 12 日目の *in vivo* 脳内イメージングシステムの概要。酸素供給と胎仔の体温管理をすることで、胎仔の生育を維持しながら脳内の細胞動態を観察することができる。実験では、Cx3cr1-gfp マウスに Zo1-gfp マウスを掛け合わせ、脳室面も標識した。Zo1：脳室面近傍で形成されるタイトジャンクションで発現するタンパク質。

3. 脳室マクロファージは大脳原基に侵入後ミクログリアに分化する

次に、脳室から大脳原基に侵入したマクロファージがその後ミクログリアに運命転換する可能性について検証した。まず、Cx3cr1-gfp$^{+/-}$マウスから単離したマクロファージを野生型マウスの脳室内に移植し、その 2 日後に移植した細胞（GFP 陽性）の性質を調べるという実験を行った。その結果、GFP 陽性細胞は脳室に存在する時点ではまだマクロファージの性質を保持していたが、大脳原基に侵入した細胞はマクロファージの性質を失い、代わりにミクログリアの性質を獲得していることが分かった。また、脳室内に微量の蛍光色素を投与することによって脳室マクロファージのみに蛍光色素を取り込ませ、その後の分布や性質を追跡する解析も実施した。その結果、脳室に存在していたマクロファージが大脳原基内に入った後にミクログリアの性質を獲得することを確認した。以上の結果から、マクロファージは大脳原基内部の環境に呼応してミクログリアに分化できることが明らかとなった。

さらに、実質中のミクログリアのうち、マクロファージ由来の細胞がどのくらいの割合存在するのかを調べるため、CD206 陽性細胞のフェイトマッピング解析を行った。胎生 11〜12 日目頃に CD206 を発現していた細胞を標識し、その後の細胞の性質を追跡解析したところ、胎生 14 日目や生後 0 日目の時点で、大脳原基に存在するミクログリアのうち約 6 分の 1 の割合の細胞が過去に CD206 を発現していた細胞であることが示された（図 4）。

以上の結果から、ミクログリアには少なくとも 2 つの分布経路をつかって脳に定着し、胎生 9〜10 日目頃にミクログリアの性質を備えて脳に定着を開始する群に加えて、その後遅れて胎生 12 日目頃に脳室から流入する群が存在することが明らかとなった。

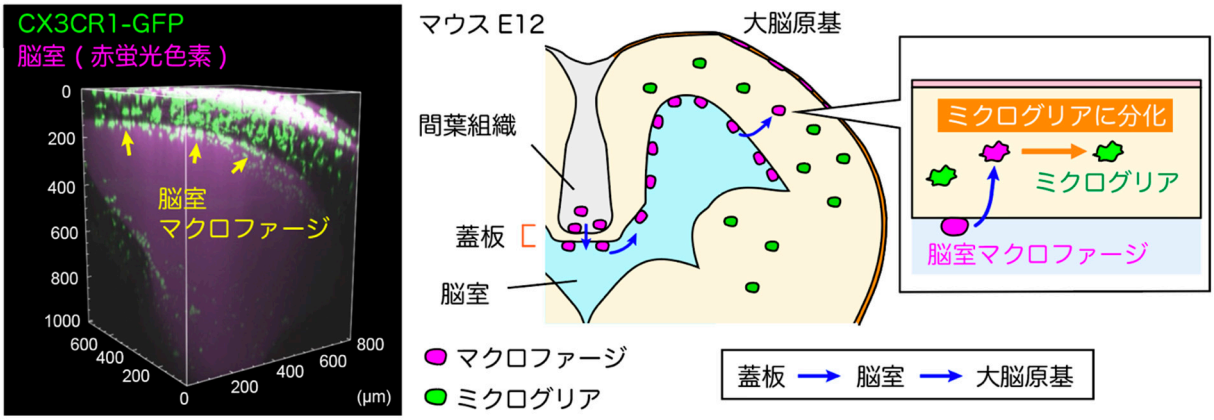


図 4. ミクログリアの脳室マクロファージを介する脳定着ルート

ミクログリアがたどると考えられる脳定着ルート。はじめに胎生 9〜10 日目頃にミクログリアの性質を備えた細胞集団の定着が起こり、その後胎生 12 日目頃に脳室マクロファージの流入が生じ一部のミクログリア集団を形成する。脳室マクロファージは、間葉組織から蓋板を通過して供給される。

尚、本研究成果は、2023 年 2 月 7 日（火）付で米国科学誌「Cell Reports」誌に掲載された。

発表雑誌：Hattori, Y. et al. CD206^{+} macrophages transventricularly infiltrate the early embryonic cerebral wall to differentiate into microglia. Cell Rep., 42(2):112092 (2023).

考　察

ミクログリアには多岐にわたる機能があることが見えてきた一方で、近年のシングルセル解析の発展により、胎生期から生後・成体期にわたって徐々に性質を変化させること、また、時間軸の変化だけでなく、同じ時期でも性質の異なる細胞集団が存在することが明らかとなっている［9, 10］。しかし、ミクログリアがどのようにし

て機能的あるいは性質的多様性を獲得するのかは明らかにされていない。本稿で示したように、ミクログリアには異なる分布ルートをつかって脳に定着する細胞集団が存在することが明らかとなった。由来・分布ルートの違いが将来獲得する性質を左右する可能性は有り得ると同時に、脳に定着したのちに周囲の環境によって性質が賦与される可能性も十分に考えられる。このような観点から、どの要因がミクログリアの多様性を制御しているのかについては今後解明が待たれる。また遺伝子発現の多様性が認められたとして、それが機能的な面で脳発生・高次脳機能にいかに貢献するのかといった、性質と機能の連関についても明らかにしていく必要がある。また生理条件下でのミクログリア機能の理解に加えて、さまざまな病態下における変容についても今後さらなる研究展開が期待される。

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、加藤大輔講師（当時。現、日本医科大学教授）、同研究科機能組織学分野の小西博之准教授、岡山大学の川口綾乃教授、九州大学の増田隆博教授、フライブルグ大学の Marco Prinz 教授の協力を得て行われた。

文　献

1） Borst, K., Dumas, A.A., Prinz, M. Microglia: Immune and non-immune functions. Immunity, 54(10): 2194–2208 (2021). PMID: 34644556 DOI: 10.1016/j.immuni.2021.09.014

2） Li, Q and Barres, B.A. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. Nat. Rev. Immunol., 18:225–242 (2018). PMID: 29151590 DOI: 10.1038/nri.2017.125

3） Hattori, Y. The behavior and functions of embryonic microglia. Anat. Sci. Int., 97(1):1–14 (2022). PMID: 34537900 DOI: 10.1007/s12565-021-00631-w

4） Kierdorf, K., Masuda, T., Jordão, M.J.C., et al. Macrophages at CNS interfaces: ontogeny and function in health and disease. Nat. Rev. Neurosci., 20(9):547-562 (2019). PMID: 31358892 DOI: 10.1038/s41583-019-0201-x

5） Prinz, M., Masuda, T., Wheeler, M.A., et al. Microglia and Central Nervous System-Associated Macrophages-From Origin to Disease Modulation. Annu. Rev. Immunol., 39:251–277 (2021). PMID: 33556248 DOI: 10.1146/annurev-immunol-093019-110159

6） Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science 330:841–845 (2010). PMID: 20966214 DOI: 10.1126/science.1194637

7） Utz, S.G., See, P., Mildenberger, W., et al. Early Fate Defines Microglia and Non-parenchymal Brain Macrophage Development. Cell 181:557–573, e518 (2020). PMID: 32259484 DOI: 10.1016/j.cell.2020.03.021

8） Masuda, T., Amann, L., Monaco, G., et al. Specification of CNS macrophage subsets occurs postnatally in defined niches. Nature 604(7907):740–748 (2022). PMID: 35444273 DOI: 10.1038/s41586-022-04596-2

9） Hammond, T.R., Dufort, C., Dissing-Olesen, L., et al. Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. Immunity 50:253–271, e256 (2019). PMID: 30471926 DOI: 10.1016/j.immuni.2018.11.004

10） Van Hove, H., Martens, L., Scheyltjens, I., et al. A single-cell atlas of mouse brain macrophages reveals unique transcriptional identities shaped by ontogeny and tissue environment. Nat. Neurosci., 22:1021–1035 (2019). PMID: 31061494 DOI: 10.1038/s41593-019-0393-4