

細胞外因子によるミクログリア活性制御機構の解析

岡島 智美 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 鶴田 文憲 (筑波大学 生命環境系)

[概要]

胎児期の脳は、神経幹細胞から神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへと分化し、秩序立った脳形成を行うことが知られている。転写を介したこれら一連のカスケード反応は遺伝子制御による先天的要因が大きい。一方、出生後の脳は、先天的要因のみならず、外環境からの外部刺激が高次脳機能を獲得する上で重要であると考えられている。最近、この一連の反応を制御する因子として、グリア細胞の一つ、ミクログリアの重要性が注目されている。ミクログリアは中枢神経系において免疫機構を担う細胞である。通常、ミクログリアは炎症性の刺激によって自身の形態を変化させ、ターゲットとなる領域へと遊走し、炎症性応答や食食反応を行うことが知られている。また近年、免疫機構のみならず、シナプス形成をはじめとする高次脳機能獲得過程においても重要であることが報告されている。しかし、発達期脳のミクログリア応答を制御する因子やその機構の全容は明らかになっていない。

そこで本研究では、ミクログリア応答を制御する新規因子の同定、また発達期における生理的役割の検証を試みた。その結果、マウスミクログリア細胞株の形態・増殖に作用する培養条件を特定し、その培養液中に含まれるヒポキサンチンが既知のカドヘリンファミリータンパク質の一つ (便宜上、以下 *Cadherin family protein 1* (CFP1) と記す) の発現上昇に寄与していることを見出した。現在、CFP1 の過剰発現系や CRISPR/Cas9 を用いたノックアウト系においてミクログリアの形態増殖における CFP1 の重要性を解析すると同時に、今回見出した現象が発達期の脳に及ぼす生理的意義についても検証している。

[方法]

(1) ミクログリアの増殖・形態の評価

マウスミクログリア細胞株 BV-2 を高栄養培地と汎用培地で 72 時間培養し、Cell Counting Kit-8 を用いて生細胞数を測定した。同様に 48 時間培養した BV-2 細胞を位相差顕微鏡の明視野で観察し、形態変化を引き起こす培養条件を検証した。

(2) Affymetrix GeneChip Array による遺伝子発現解析

BV-2 細胞を高栄養培地と汎用培地で 24 時間培養し、ISOGENII を用いて total RNA を回収した。その後、Ambion WT Expression Kit と GeneChip WT terminal Labeling and Hybridization Kit を用いてラベルした cDNA を合成し、GeneChip Mouse ST Array にハイブリダイゼーションさせ、シグナルを検出した。その後、Expression Console Software と TAC software を用いて遺伝子発現を解析した。

(3) qRT-PCR

BV-2 細胞を高栄養培地と汎用培地で 24 時間培養し、ISOGENII を用いて total RNA を回収した。その後、ReverTra Ace を用いて逆転写し、作成した cDNA を鋳型に Thunderbird SYBR qPCR Mix を用いて qRT-PCR を行った。

(4) ミクログリア応答を制御する細胞外因子のスクリーニング
GeneChip Array の実験結果で同定した CFP1 の発現量を指標に、CFP1 の発現上昇させる因子を qRT-PCR でスクリーニングした。まず、高栄養培地中のみ含まれる因子を非必須アミノ酸・金属・脂質/ビタミンの 3 つに大別し、別々に汎用培地に添加して qRT-PCR を行った。さらに、組成を細分化して qRT-PCR を行い、CFP1 の発現上昇に影響のある化合物ヒポキサンチンを特定した。

[結果]

ミクログリア応答を制御する新規因子を同定するため、ミクログリア細胞株 BV-2 を用いて、形態増殖を指標とした評価系を構築した。その結果、高栄養培地で培養した時、扁平状の形態を持つミクログリア数が増加し、細胞の増殖効率が減少していた。また高栄養培地で発現変動する遺伝子を GeneChip Array を用いて解析した結果、高栄養培地で培養した際、CFP1 が発現上昇することを明らかにした。さらに、CFP1 の発現上昇を誘導する因子を高栄養培地中からスクリーニングし、ヒポキサンチンの同定に成功した。ヒポキサンチンは ATP や GTP の再合成を行うサルベージ経路の資源として細胞にとって必須の化合物である。特に、脳において ATP/GTP などのプリンヌクレオチドの供給はこのサルベージ経路にかなりの部分が依存する。先行研究から、CFP1 は炎症性応答やヌクレオチド代謝との関連も示唆されており、本研究で見出したヒポキサンチン、CFP1 の新規経路が、ミクログリア応答に寄与していることが考えられた。

[考察・今後の展望]

本研究では、ミクログリア応答を制御する候補因子として、CFP1 とヒポキサンチンの 2 つを同定することに成功した。CFP1 は、胎生期ならびに周産期において、特定の脳領域で発現上昇することが報告されているが、ミクログリアとの関連は未だ報告されていない。ヒポキサンチンは、hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) によるイノシン酸生成の原材料になる化合物で、脳神経系におけるヌクレオチド代謝経路において重要な役割を担う。興味深いことに、この HPRT1 の欠損はレッシュナイハン症候群 (Lesch-Nyhan syndrome; LNS) 発症の原因となる。この疾患はヒポキサンチンの代謝不良によって発達段階から自傷行為をはじめとする重篤な脳障害を引き起こすが、その発症メカニズムについては明らかになっていない。今回のターゲットである CFP1 は HPRT1 との関与が先行研究から示唆されており、現在ミクログリア内における CFP1 と HPRT の関係性について検証を行っている。この関係性の解明によって発達期のミクログリアによる中枢神経系構築のメカニズムの一端を解明できるのではないかと期待している。