

脳内オートファジー異常が引き起こす微小核の形成メカニズムと生理的意義

矢野 更紗 (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)

【背景と目的】

オートファジーとは、オートファゴソームと呼ばれる扁平膜で細胞質成分を取り込み、リソソームで分解を行う主要な代謝制御機構の一つである。近年、オートファゴソーム形成に必須のタンパク質として、Autophagy-related protein が複数同定されている。中でも Autophagy-related protein 7 (Atg7) は、オートファジーの誘導経路の上流因子として知られている。先行研究では、Atg7^{fllox/fllox};NestinCre (神経幹細胞特異的 ATG7 KO) マウスの脳で、重篤な神経細胞の脱落や異常タンパク質の蓄積が起ることが報告されている。このことから、脳の正常な機能にはオートファジーが必須の分子機構であることが考えられる。しかしながら、オートファジー機構の異常が脳内恒常性維持を破綻させるメカニズムの全貌は明らかになっていない。

私は、オートファジーがどのように脳内恒常性維持に寄与するか解析していく過程で、偶然にも神経幹細胞特異的 ATG7 KO マウス脳の細胞に微小核が蓄積していることを初めて発見した。微小核とは、正常な核とは別に存在する小型の核様構造体であり、染色体異常の指標の1つとされている。しかしながら、脳神経系における微小核の形成メカニズムや生理的意義は解明されていない。そこで、本研究では、神経系オートファジー異常により蓄積する微小核の形成メカニズムを解析するとともに、脳内恒常性制御に対する生理的意義を考察することを目的とした。

【方法】

(1) マウスおよび細胞培養

神経幹細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス (NestinCre マウス) と ATG7^{fllox/fllox} マウスを交配し、神経幹細胞特異的 ATG7 KO マウスを産出した。細胞は、野生型 ICR マウス胎児 (E13.5) から単離した大脳皮質神経細胞、マウスミクログリア細胞株 BV2 を用いた。

(2) 組織免疫染色

P16 の WT、ATG7 KO マウスの脳を摘出し、パラフィンで包埋した。5 μm の厚さで切片を作製し、抗 NeuN 抗体 (1:1000, Millipore)、抗 Iba1 抗体 (1:1000, Wako)、抗 GFAP 抗体 (1:1000, SIGMA) を用いて、神経細胞、ミクログリア、アストロサイトの染色を行った。核は Hoechst33342 (1:2000, Invitrogen) を用いて染色した。

(3) 細胞免疫染色

細胞を播種したカバーガラスを 4% パラホルムアルデヒド (PFA)/リン酸生理食塩水 (PBS) に浸し、室温で 10 分間固定した。PBS で洗浄した後、5% BSA/0.4% Triton X-100/PBS でブロッキングした。一次抗体として抗 Iba1 抗体 (1:1000, Wako) を用いて反応させた。核の染色は Hoechst33342 (1:2000, Invitrogen) を用いた。

(4) 微小核形成メカニズムの解析

初代培養神経細胞の培地にオートファジーリソソーム系阻害剤である BafilomycinA1 (300 nM)、コントロールとして PBS を

添加した。2 時間培養した後、PBS で洗浄し、その後新しい培地を入れ、3 時間培養し、その培地上清をミクログリア細胞株 BV2 の培地と置換した。神経細胞の条件培地で BV2 を 6 時間培養した後、細胞を固定し、免疫染色した。蛍光顕微鏡の 40 倍の対物レンズを用いて、5 視野以上を無作為に選び、微小核を有する細胞数の定量を行った。

【結果・考察】

神経幹細胞特異的 ATG7 KO マウスの脳で微小核が観察されたことから、脳内のどの細胞に微小核が蓄積するか神経幹細胞特異的 ATG7 KO、野生型マウス脳を用いて解析した。その結果、神経幹細胞特異的 ATG7 KO マウスにおいて、微小核はオートファジーが機能しない神経細胞、アストロサイトに多く蓄積していた。一方、ミクログリアは胎生期に卵黄嚢に発生した原始骨髄前駆細胞を起源とするため、神経幹細胞特異的 ATG7 KO マウスのミクログリアではオートファジーが正常に機能していることが考えられる。しかしながら、神経幹細胞特異的 ATG7 KO マウスのミクログリアにおいても微小核の蓄積が観察された。これらの結果から、脳内オートファジー経路には、細胞自律的ならびに非自律的に微小核蓄積を抑制するメカニズムがあることが考えられた。

つぎに、神経系のオートファジー異常によるミクログリア微小核の形成メカニズムを検証するため、『オートファジー異常な神経幹細胞由来の細胞から分泌された因子がミクログリアの微小核形成を誘導する』という仮説を設定した。この仮説を検証するため、オートファジー阻害剤処理をした初代培養神経細胞の培地上清で BV2 細胞を刺激し、微小核を有する細胞数を定量した。その結果、条件培地による刺激がミクログリア微小核の形成を誘導することが示唆された。また、微小核形成誘導因子として、当研究室の先行研究で同定した、神経幹細胞特異的 ATG7 KO マウスの脳で発現上昇する細胞外分泌タンパク質 Chemokine (C-C motif) ligand 3 (Ccl3) に着目した。Ccl3 リコンビナントタンパク質を BV2 細胞に添加し、微小核を有する細胞数の変化を検証したところ、Ccl3 処理によってミクログリアの微小核形成が誘導された。このことから、Ccl3 がミクログリアの微小核形成を誘導する因子の有効な候補であることが示唆された。

本研究により、オートファジーが破綻した神経系細胞はミクログリアに非自律的な作用を及ぼし、微小核形成を誘導することが明らかになった。予備的ながら、神経幹細胞特異的 ATG7 KO マウスの脳において、活性型ミクログリアマーカーである Iba1 が発現するミクログリアの数が多く、脳内炎症性反応が亢進することを確認している。ミクログリアは、時期並びに領域ごとに性質が変化していく不均一な細胞集団であること、また、微小核は、ゲノム不安定性の指標のみならず、ゲノム再構成にも寄与することが報告されている。今後は神経系のオートファジー異常が引き起こす微小核の形成とミクログリア活性化との関連を明らかにし、ミクログリア不均一性がもたらす脳内恒常性の調節機構を解明していきたい。