

## 発達過程におけるミクログリア cGAS-STING 経路の活性制御

窪谷 ひかり (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〉

発生過程の大脳皮質では、脳室帯で神経幹細胞が盛んに分裂を繰り返し、大量の神経細胞が産生され、これら細胞が所定の場所まで移動していく。その際に、神経細胞は様々なメカニカルストレスを受けて、ダメージを蓄積していく。ダメージを受けた神経細胞は、脳内の免疫担当細胞であるミクログリアによって除去される。当研究室では、発生過程で損傷を受けた神経細胞がミクログリアに微小核を伝播することを見出してきた。微小核とは、主核とは別に存在する直径 1 μm 程度の小型の核であり、DNA 損傷を受けた細胞の分裂や狭小な部位を通過する際の核膜の破裂と融合によって形成される。がん細胞において微小核に含まれる DNA は細胞質 DNA センサーである環状 GMP-AMP シンターゼ (cGAS) に認識され、合成されたセカンドメッセンジャーが Stimulator of Interferon Genes (STING) を活性化し、自然免疫応答を引き起こすことが知られている。しかしながら、ミクログリアにおける微小核の機能は、明らかになっていない。そこで、私は神経細胞から放出された微小核が、ミクログリアの cGAS-STING 経路の活性化の起点となるのではないかと考えた。本研究では、ミクログリアにおいて、微小核を起点に cGAS-STING 経路の活性化が起こるか解明することを目的とした。

### 〈実験方法〉

#### (1) 細胞培養

細胞は、マウス初代培養神経細胞、マウスミクログリア細胞株 (BV2)、ヒト胎児腎臓由来 293T 細胞を用いた。初代培養神経細胞は E14 のマウス ICR の胎仔大脳皮質から単離した。

#### (2) 遺伝子導入

リポフェクション法により、HT-DNA (SigmaAldrich 社)、polyI:C (SigmaAldrich 社)、pCAG-EGFP を BV2 細胞に遺伝子導入した。トランスフェクション試薬は 1.0 mg/ml Polyethylenimine MAX (Polysciences) を用いた。

#### (3) 微小核の in vitro 誘導法

初代培養神経細胞にリソソーム阻害剤 Bafilomycin A1 (300 nM) を 2 時間処理し、PBS で洗浄した後、新しい培地を添加した。3 時間培養した後、遠心分離を行い、死細胞や細胞断片を除去した上清を条件培地として回収した。ミクログリアを条件培地で 6 時間培養し、微小核形成を誘導した。

#### (4) 免疫染色

細胞を播種したカバーガラスを 4% PFA/PBS に浸し、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 p-STING 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology) を用いた。核の染色は Hoechst33342 (5 μg/ml, Invitrogen) を用いた。

#### (5) 微小核・リン酸化 STING のシグナルの定量

蛍光顕微鏡 BIOREVO BZ-9000 fluorescence microscope (KEYENCE) で観察した。蛍光顕微鏡の 40 倍の対物レンズを用いて、観察を行った。10 視野以上を無作為に選び、核を有す

る細胞、並びにリン酸化 STING のシグナルを有する細胞の定量を行った。

#### (6) RT-qPCR

total-RNA は Isogen II (Nippongene) を用いて抽出し、Revertra Ace (TOYOBO) を用いて逆転写した。Thunderbird SYBR qPCR Mix (TOYOBO) 用いて、Thermal Cycler Dice Real-Time System II (Takara, TP800) にて反応させ、I 型インターフェロン β (IFNβ)、CCL5 の mRNA の発現を定量した。

### 〈結果・考察〉

初めに、cGAS-STING 経路の活性化を定量した。細胞内に存在する DNA は、cGAS を介して、STING をリン酸化、IFNβ の産生を誘導する。このことから、リン酸化 STING は cGAS-STING 経路活性化の指標として用いることが出来る。そこで、リポフェクション法によって、合成 2 本鎖 DNA、合成 2 本鎖 RNA を細胞外から細胞内へ導入し、リン酸化 STING のシグナルが免疫染色でどのように観察されるかを検証した。リポフェクション効率が高いヒト胎児腎臓由来 293T 細胞で検証したところ、合成 2 本鎖 DNA を細胞内に導入した細胞では核の上、または、近傍にドット状に強い蛍光を発する細胞が多く観察されることを見出した。

次に、ミクログリアにおいて、微小核を起点として cGAS-STING 経路が活性化するか検証するため、微小核の出現と STING のリン酸化のタイムコース実験を行った。その結果、条件培地を処理して 4 時間、6 時間後に微小核陽性細胞が増加することが明らかになった。一方、条件培地処理から 2 時間後と 6 時間後の 2 回のタイミングでリン酸化 STING 陽性細胞が多いことが分かった。また、条件培地処理して 6 時間後のミクログリアでは、cGAS-STING 経路の下流で発現が誘導される IFNβ、CCL5 の mRNA の発現レベルが高かった。

条件培地を処理して 6 時間後のミクログリアでは、微小核の形成と cGAS-STING 経路の活性化がみられたことから、神経細胞で形成された微小核が、cGAS-STING 経路を活性化することが示唆された。また、条件培地を処理して 2 時間後のミクログリアでも cGAS-STING 経路の活性化がみられたことから、神経細胞由来の微小核ではない分泌因子がミクログリアに直接作用し、cGAS-STING 経路を活性化する可能性が示唆された。

今後の予定として、最初の cGAS-STING 経路の活性化が、2 回目の cGAS-STING 経路活性化にどのような影響を与えるのか検証するとともに cGAS の挙動も観察していく予定である。