

神経活動を感知するミクログリアのメカニズム解明

顧 伊晨 (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・目的】

ミクログリアは脳内で免疫を担当する細胞として知られている。主な働きとして脳内の異物や死細胞の貪食を行うことが挙げられる。近年では発達段階において、ミクログリアが神経細胞のシナプスと相互作用し、神経回路構築に寄与することが明らかとなってきた。マウスでは出生後、シナプス形成が盛んに行われ、成体脳のシナプス数よりも大幅に多いシナプス結合が作られ、その後ミクログリアによって除去される。例えば、マウス大脳皮質では、生後10日前後(P10)でシナプスが活発に産生され、3-4週目に不必要なシナプスがミクログリアによって刈り込まれる。これらのミクログリア-シナプス相互作用によって、適切な数のシナプスが産生され、より精密で適切な神経回路が形成される。近年、これらミクログリア-シナプス相互作用が神経活動によって調節される可能性が示唆されている。しかし、ミクログリアがどのように神経活動を感知しているのか、またどのような分子がこれら現象を制御しているのか、詳細なメカニズムはほとんど解明されていない。

私は、ミクログリアの制御因子として当研究室で見出したカドヘリンファミリーFAT3が、神経活動依存的なミクログリア-シナプス相互作用に関わるのではないかと考えた。本研究課題では、神経活動がミクログリアに及ぼす影響をライブイメージングで解析し、FAT3がこれら変化に関わるか明らかにすることを目的とした。本研究を介して、FAT3が神経活動依存的なミクログリア-シナプス相互作用に関わる因子になりうるか解明していく。

【方法】

(1) 細胞培養

胎生14日(E14)のマウス大脳皮質から単離した初代培養神経細胞、マウスのミクログリア細胞株(BV2)、ヒト胎児腎細胞(HEK293T)を実験に用いた。初代培養神経細胞はNeurobasal、BV2はDMEM/F12、HEK293TはDMEMを培地として用いた。

(2) プラスミドの作製

ミクログリアマーカー(CD68, CX3CR1)とFAT3のプロモーター領域をマウスゲノムからクローニングして、アデノ随伴ウイルス(AAV)のベクター、ならびにルシフェラーゼレポーターアッセイ用のプラスミド(pGL3)、EGFP並びにmCherryの発現ベクターに組み込んだ。

(3) アデノ随伴ウイルスの作製

HEK293TにDREADD(hM3Dq)ならびにGCaMPが組み込まれたAAV用のベクターをPHPeBならびにヘルパープラスミドpAdΔF6と一緒に導入し、ウイルスを作製した。作製したウイルスは、OptiPrepを用いた密度勾配遠心分離法で精製した。

(4) ルシフェラーゼアッセイ

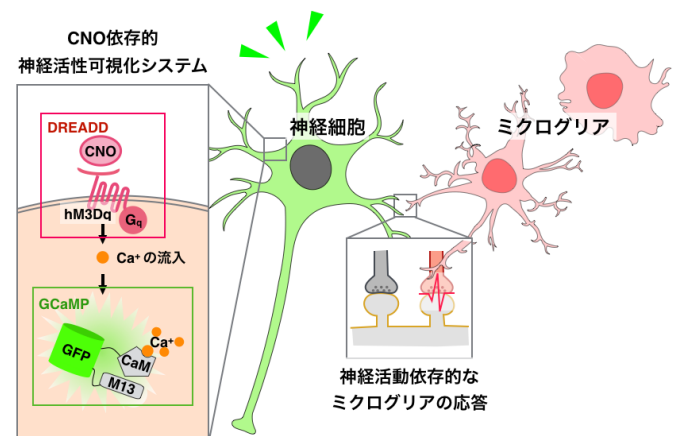
ルシフェラーゼ遺伝子上流に特定のプロモーター領域を組み込んだベクターと内部コントロールのpRL-TKベクターをBV2とHEK293Tにトランスフェクションし、レポーターアッセイを行った。

【結果】

まず、化学遺伝学的に神経細胞を活性化させる遺伝子改変型Gタンパク質共役受容体DREADD(hM3Dq)とCa²⁺センサーであるGCaMP6のアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を作製し、このAAVを初代培養神経細胞に導入した。その後、DREADDのアゴニストであるCNOを添加し、hM3Dqが発現した神経細胞を活性化させた。その結果、遺伝子導入された神経細胞で、GCaMP6の蛍光が強くなったことから特定の神経細胞で神経活動を誘発することが可能となった。続いて、ミクログリア形質を解析するため、ミクログリアマーカーであるCD68やCX3CR1、そしてFAT3のプロモーターをクローニングし、これらを分割したのち、ルシフェラーゼのレポータープラスミドに挿入した。その後、これらレポータープラスミドをBV2に導入し、レポーターアッセイによってどの領域にプロモーター活性があるか特定することができた。さらに特定したプロモーターの下流に蛍光タンパク質を挿入し、ミクログリア活性をモニタリングする新しい蛍光プローブを作成した。現在、これらプローブを用いて、詳細な解析を進めているところである。

【展望】

今後はこれまでの研究で獲得したツールを用いて実験系の確立を目指し、*in vivo*と*in vitro*の両方で神経活動依存的なミクログリアの形質変化について観察する予定である。



(図) 実験系の概略図

DREADDとGCaMP6をトランスフェクションした初代培養神経細胞とFAT3蛍光プローブをトランスフェクションしたBV2を共培養する。CNOを投与してDREADDが導入された特定の初代培養神経細胞の神経活動を活性化・抑制させた時にBV2やFAT3の発現が変わるかどうかがプローブを用いて観察する。