

神経細胞オートファジー異常によるグリア細胞活性化と行動変化の解析

秋山 海大 (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】

発達障害は注意欠陥障害、コミュニケーション障害、学習障害が見られる脳機能障害である。発達障害の発症機構として脳発達過程における神経回路形成異常が原因であると考えられている。また近年の研究から、発達障害の患者の脳では細胞内分解経路の一つであるオートファジーの異常が報告されている。しかし、オートファジーの異常がどのようにして脳の発達に影響し、発達障害を引き起こすのかは解明されていない。

先行研究から、脳内免疫担当細胞であるミクログリアが発達障害の発症に寄与することが示唆されている。ミクログリアは不要なシナプスの刈り込みや欠陥のある細胞の食食を行うことで正常な神経回路形成に寄与する。そこで本研究では神経細胞特異的オートファジー欠損マウスである *Atg7^{fl/fl}; NexCre (ATG7cKO)* マウスを用いることで神経細胞のオートファジー異常が引き起こす発達障害発症メカニズムをミクログリアに着目して解析した。

【実験方法】

(1) 免疫組織染色

野生型(WT)マウス、およびATG7cKOマウスを4% PFA/PBS 溶液で灌流固定後、脳を摘出し4% PFA/PBS 溶液により一晩4°Cで浸漬した。その後30%スクロースに置換し一晩浸漬した。脳を30%スクロース/O.C.T.コンパウンドで包埋し、クライオスタットで30 μm の厚さで切片を作製した。オートファゴソームアダプタータンパク質マーカーの抗 p62 抗体 (MBL) と神経細胞マーカーである抗 NeuN 抗体 (MilliPore) での染色を行った。さらに活性化ミクログリアのマーカーである抗 Iba1 抗体 (Wako)、食食型ミクログリアのマーカーである抗 CD68 抗体 (BioRed) での染色を行った。対比染色として核を DAPI (同仁堂) で染色した。染色画像は蛍光顕微鏡 (Keyence) および共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss) で観察した。

(2) オープンフィールドテスト

マウスの探索行動を検証するために、10 分間 60 cm 四方のフィールドを自由に行動させ、行動パターンを解析した。解析では画像解析ソフト Fiji のプラグインの Mouse behavioral Analysis Toolbox を用いることで、センターでの移動距離とセンターへの侵入回数を出力した。

(3) スリーチャンバーテスト

マウスの社会性行動を検証するために、20 cm x 60 cm の長方形のフィールドを3つのチャンバーにわけ、1つのチャンバーにマウスを入れたのち、10分間行動させることで社会行動を解析した。解析には数値解析ソフトウェアである Matlab (Mathworks) を用いて、ヒートマップを出力した。

【結果】

はじめに、ATG7cKOマウスの神経細胞でオートファジーの機能が欠損していることを確かめるために、オートファジーの機能欠損によって細胞に蓄積することが知られている p62 での染色を行

った。その結果、神経細胞において p62 の蓄積が観察されたことから、神経細胞でオートファジーの機能が欠損していることが確認できた。

次に、神経細胞のオートファジー異常がミクログリアに対して及ぼすか、活性化ミクログリアのマーカーである Iba1、食食型ミクログリアのマーカーである CD68 での染色を行なった。その結果、ATG7cKOマウス的大脑皮質帯状回第5層という領域において顕著に強いシグナルが観察された。また、食食型ミクログリアの割合を定量した結果、帯状回第5層で有意に食食型ミクログリアの割合が高いことが明らかになった。以上の結果から、神経細胞のオートファジー異常は帯状回第5層において食食型ミクログリアの増加を引き起こすことが示唆された。

また、ミクログリアの機能変化を誘導する因子として、神経細胞微小核に着目した。微小核とは2 μm 程度の核様構造体で、本研究室では神経細胞からミクログリアへ微小核が伝播することを見出している。そこで微小核陽性ミクログリアの割合を数値解析ソフトウェアである Matlab で解析したところ、ATG7cKOマウス的大脑皮質で有意に微小核陽性ミクログリアの割合が増加していた。そして、興味深いことに、ATG7cKOマウス的大脑皮質の中でも食食型ミクログリアの割合が高かった帯状回第5層において、微小核陽性ミクログリアの割合が有意に多いことが見出された。

さらに、本研究で用いた ATG7cKO マウスで発達障害の症状が見られるかを検証するために、オープンフィールドテストとスリーチャンバーテストを行なった。その結果、ATG7cKOマウスでは発達障害の症状として知られている探索行動の低下と社会性行動の減少が見られた。

【考察と展望】

本研究では、大脑皮質帯状回第5層という特定の領域において神経細胞におけるオートファジー異常は微小核の伝播を介し、食食型ミクログリアへの機能変化を引き起こすことを見出した。先行研究により帯状回第5層は大脑皮質の様々な領域をつなぐ中心の役割を担っていることが明らかになっている¹。このことから、帯状回第5層においてミクログリアが過剰な食食をすることで正常な神経回路が構築されないことがオートファジー異常による発達障害発症に関与している可能性が考えられる。しかしながら、食食型ミクログリアの増加が神経細胞に対してどのような影響をもたらすのかは明らかではない。今後は、帯状回第5層において食食型ミクログリアがシナプスの形成や神経細胞の脱落にもたらす作用を検証していく予定である。

【参考文献】

- Hagmann, P. *et al.* Mapping the structural core of human cerebral cortex. *PLoS Biol.* **6**, 1479-1493 (2008).