

## 神経回路形成過程におけるミクログリアの形態変化とプリン代謝経路の関係性

照屋 林一郎 (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>

神経回路形成は、胎生期から出生後まで長い時間をかけて行われていくことが知られている。その神経回路形成には、神経細胞だけではなく、数多くのグリア細胞が関わっている。グリア細胞の一つであるミクログリアは、脳内の免疫機能を担当しており、脳の発達に重要である。出生直後までは、大半のミクログリアが、アメーバ状の形態をしたアメボイド型のミクログリアであるが、発生が進むにつれて、突起を伸ばしたラミファイド型に形態を変化させる。アメボイド型のミクログリアは、活性型ミクログリアと言われ、脳内の死細胞の貪食や、様々な液性因子の放出を行っていることが知られている。一方、ラミファイド型のミクログリアは監視型のミクログリアと言われ、炎症などの刺激に応じてアメボイド型に形態を変化させることが知られている。以上のように、神経回路形成に貢献しているミクログリアは、形態に合わせて機能も変化する事から、ミクログリアの形態変化と神経回路形成の間には密接な関係性があると考えられている。さらに、形態変化が起きるタイミングが、神経回路形成が行われる出生後初期と時期が一致している事から、神経回路形成には、ミクログリアの形態変化が重要であると考えられる。これまで所属研究室の先行研究で、*in vitro*においてプリン代謝の中間代謝産物ヒポキサンチンの細胞内濃度上昇がミクログリア形態変化に関わることを見出している。ヒポキサンチンは、プリン誘導体の一つであり、プリン代謝経路において、HPRT という酵素によって代謝される。しかしながら、ミクログリアの形態変化に HPRT 活性やプリン代謝がどのように関わっているのかは明らかになっていない。そこで本研究では、成熟過程におけるミクログリアの形態変化とヒポキサンチン濃度上昇や代謝がどのように関わっているのかを明らかにすることを目的とする。

### <方法>

#### (1) 免疫細胞染色

BV2 細胞を播種したカバーガラスを 4%PFA/PBS に置換し、室温で 10 分間固定した。PBS で洗浄した後、5%BSA/0.25% Triton X-100/PBS を添加し、室温で 30 分ブロッッキングした。一次抗体として抗 HPRT 抗体 (1:500, Abcam) を用いて、室温で 24 時間反応させ、その後、蛍光色素が結合した 2 次抗体で染色した。得られたサンプルは蛍光顕微鏡 (Keyence, BIOREVO BZ-9000 fluorescence microscope) を用いて観察した。

#### (2) 免疫組織染色

P7 から P14 まで薬剤投与を行ったマウスを灌流し、脳を摘出した後に 4%PFA/PBS を用いて浸透固定した。その後 30%スクロース/PBS 溶液で置換したあと、30%スクロース/OCT コンパウンド(1:1)で包埋し、これをクライオスタットで 30  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作成した。その後、5%BSA/0.25% Triton X-100/PBS を添加し、室温で 30 分ブロッッキングした。染色は、ミクログリアの形態を確認するために、抗 GFP 抗体(1:500, Abcam)を、核を染色するため

に DAPI(1:500)を用い、室温で 24 時間放置した。その後、蛍光色素が結合した二次抗体を反応させ、共焦点レーザー顕微鏡 (ZEISS, LSM710) で Z-stack 画像を 1  $\mu\text{m}$  間隔 30 枚撮影した。

#### (3) ミクログリアの形態の定量

共焦点レーザー顕微鏡で取得した Z 軸方向の連続画像を最大値投影法で一枚の画像に圧縮し、その後 ImageJ を用いて Skeletonize 処理を行なった。その後、ImageJ の Skeleton Analysis を用いてミクログリアの形態解析を行なった。

### <結果>

これまで当研究室では、ヒポキサンチンの細胞内濃度上昇がミクログリア細胞株 BV2 の形態変化を促すことを見出している。そこで、スクレオシドトランスポーター阻害剤ジピリダモールで細胞内のヒポキサンチン濃度を上昇させたときの HPRT 細胞内局在を観察した。その結果、細胞質に存在している HPRT は、ジピリダモール処理によって、核内にも局在することが観察された。以上の結果から、ヒポキサンチンの細胞内濃度が上昇することで、HPRT が核内に移行し、遺伝子発現をはじめとする細胞内現象の調節に関わっている可能性が示唆された。

次に、生体内におけるヒポキサンチン蓄積の影響を検証するため、新生仔マウスにジピリダモールを投与し、その後ミクログリア形態を観察した。その結果、ジピリダモール処理によって雄マウスでは、ミクログリアの突起が伸長し、分岐の数も増加していた。一方で、雌では、投与によつての突起の分岐の数、長さ共に有意な差は確認できなかった。以上の結果から、ジピリダモール投与は雄マウスでのみミクログリア形態に影響を与える可能性が考えられた。

### <展望>

本研究では、細胞内にヒポキサンチンが蓄積することで、HPRT の局在が変化する可能性を見出した。先行研究より、HPRT は、プリン代謝だけではなく、細胞分化や代謝の調節など様々な細胞内現象を制御することが報告されている。それゆえ、ヒポキサンチン依存的な HPRT の局在変化がミクログリア形質を制御する可能性が考えられる。また、HPRT の変異は精神遅滞を伴う Lesch-Nyhan 症候群発症の原因となる。HPRT 遺伝子が X 染色体上に存在すること、Lesch-Nyhan 症候群の発症はほぼ男性に限られることから、本研究で観察しているミクログリア性別による形質の違いが症状発症に関与するのではないかと考えている。今後、個体レベルでの解析を進めるために、Lesch-Nyhan 症候群モデルである HPRT のノックアウトマウスを iGONAD 法を用いて作成し、そのミクログリアの形態や異常な形態変化が神経回路形成にどのような影響を及ぼすのかを解析していく。