

## 脳の発達過程における cGAS とミクログリア多様性の関連

平木 智尋 (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

脳内の免疫担当細胞であるミクログリアは、胎仔期から出生後にかけて機能や形態が大きく変化する。出生直後は突起が少なくアミーバ状の形態を示し、死細胞の貪食などを行うのに対し、発生が進むにつれ突起を伸ばし、シナプスの刈り込みなど正常な神経回路形成に必須の機能を担う。これまでに所属研究室では、発生過程の脳における神経細胞が微小核という構造を形成し、この微小核の伝播によって発達期ミクログリアの形質が制御されることを見出している。微小核はDNAを含む微細な核様構造であり、先行研究において cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) を活性化することが報告されている。cGAS は細胞質の外來二重鎖DNAを感知し、自然免疫経路である cGAS-STING経路を活性化することで、I型インターフェロンの発現を誘導する。微小核を受け取ったミクログリアでは、発生が進んだ段階においても、周囲のミクログリアとは異なりアミーバ状の形態を示すとともに、脳実質外に存在する境界関連マクロファージ (BAMs) のマーカーであるCD206 の発現が上昇する。このことから、微小核は cGAS を介したミクログリアの新しい制御因子であると考えられることができる。しかしながら、微小核によって活性化された cGAS がミクログリアの形態を制御するメカニズムは、明らかとなっていない。そこで本研究では、cGAS の活性化によるミクログリアの制御メカニズムの解明を目的とした。

### 実験方法

#### (1)パニング法

抗IgG抗体、および抗CD11b抗体でコーティングしたペトリディッシュを前日に作成した。生後 14日の野生型およびcGASノックアウトマウスをPhosphate-Buffered Saline (PBS) で灌流し、脳を摘出した。その後、脳にDulbecco's PBS (DPBS)にカルシウムとマグネシウムを加えた溶液 (DPBS+/+) を加え、ホモジェナイズした。ホモジェナイズ溶液に 90% Percoll/dPBSを加え、1500 rpmで15分遠心した。沈澱をMPEP solution (2% Milk Peptone/PBS)で溶かし、70  $\mu$ m のセルストレーナーを通した後、抗CD11b抗体でコーティングしたディッシュに添加して常温で 20 分静置した。ディッシュをDPBSで洗浄した後、Isogen II (Nippongene)を加えて細胞を回収した。

#### (2) RT-qPCR

total-RNA はIsogen II (Nippongene)を用いて抽出し、Revertra Ace (TOYOBO) およびRandom primer (TOYOBO)を用いて逆転写した。Thunderbird SYBR qPCR Mix (TOYOBO)を用いて、Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, 7900HT)にて反応させ、5Sをインターナルコントロールとして  $\Delta\Delta$ Ct値を算出し、IBA1のmRNA の発現を比較定量した。

#### (3)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 分ブロッキングした。一次抗体として抗IBA1抗体 (1:1000, Wako) 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。核の染色にはDAPI (1.0  $\mu$ g/ml, Dojindo)を用いた。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。

### 結果と考察

初めに、cGASによるミクログリア形質制御への関与の有無を検証するため、反応性ミクログリアで発現が高いIBA1に着目した。IBA1は、細胞骨格の一種であるアクチンと相互作用し、貪食時の細胞膜形態制御に関与することが示唆されている。cGASによってIBA1が制御されるかを調べるために、野生型およびcGASノックアウトマウスのミクログリアにおけるIBA1の発現量を比較した。野生型とcGASノックアウトマウスの脳から、パニング法によってミクログリアを単離し、IBA1についてqPCRを行った。その結果、cGASノックアウトマウスのミクログリアでIBA1のmRNA量が減少していることが明らかとなった。

次に、IBA1がミクログリアの形態にどのような影響を及ぼすのかを調べるために、GFPとIBA1が融合したプラスミドを構築した。このプラスミドをミクログリア培養細胞株BV2に導入し、形態解析を行った。その結果、IBA1を過剰発現させた細胞では、GFPのみのプラスミドを導入した細胞と比較して、突起の伸長した細胞の数が減少した。

以上の結果から、cGAS の下流で IBA1 の発現が制御されると共に、IBA1 の過剰発現によって形態が制御されることが示唆された。当研究室の先行研究において、微小核の形成には領域特異性があることを見出している。これによって、微小核を起点としたcGASの活性化が生じ、一部のミクログリアが領域特異的に形質を変化させる可能性が考えられた。また、IBA1はアクチンの制御を介して、貪食時の細胞の波打ち構造やファゴサイティックカップの形成に寄与することが示唆されている。このことから、IBA1の高い発現は、ミクログリアの反応性に際する形態の維持に重要である可能性が考えられる。しかしながらcGASおよびIBA1がどのようにミクログリアの反応性を誘導するのかは明らかではない。今後は、cGASがミクログリアの多様性にどのように影響するのかを探るとともに、IBA1によるミクログリアの形態制御メカニズムを検証していく予定である。