

神経血管の老化における核構造の異常と微小核伝播の影響

前田 ちひろ (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】

老化した脳では、血液脳関門(BBB)の機能不全が引き起こされ、脳血管障害が発症する。脳内免疫担当細胞であるミクログリアは、BBBの維持に関わり、老化に伴い活性化することが報告されている。しかし、老齢期におけるミクログリアの制御メカニズムや、これらがBBBの完全性に対してどのような影響を及ぼすのかについては明らかになっていない。これまでに所属研究室では、神経細胞由来の微小核がミクログリアの多様性を制御していることを見出してきた。微小核は、神経細胞の移動に伴い形成され、ミクログリアに取り込まれて形質を変化させる。これら微小核は、発達期における神経細胞の移動のみならず、老化に伴う核構造の異常によっても形成される可能性がある。そこで、本研究では、老化した神経細胞核のミクログリア制御に対する影響を検証し、最終的にBBBの完全性にどのような影響を与えるのか、その生理的関連性を解析することを目的とした。

【実験方法】

(1) 免疫組織染色

神経細胞の核膜が特異的に標識されたマウス(NexCre; Sun1-GFP)を、4% PFA/PBSで灌流固定し、脳を摘出後、4% PFA/PBSで一晩浸透させた。その後、30%スクロース/PBSに置換し、30%スクロース/OTCコンパウンド(1:1)で包埋後、クライオスタットで50 μ mの凍結切片を作成した。切片の染色には、神経細胞の核膜を標識するために抗GFP抗体(1:1000, Abcam)と、ミクログリアのマーカーであるIba1(1:200, Abcam)、核のマーカーであるDAPI(1.0 μ g/ml, Dojindo)を用いた。染色画像は、共焦点レーザー顕微鏡(Carl-Zeiss, LSM710)で取得した。

(2) プラスミド作製

50アミノ酸欠損したLaminA/Cの変異体(Δ 50 LaminA/C)は、mCherry-LaminA/Cのプラスミドを鋳型とし、inverse PCRによってDNA産物を得た。その後、セルフライゲーションを行い、BglIIIとBamHIで切り出した。核膜タンパク質であるSun1のsun1ドメインを欠損させたGFP-Sun1 Δ Sと、sun1ドメイン及びcoiled-coilドメインを欠損させたGFP-Sun1 Δ CSは、GFP-Sun1プラスミドを鋳型とし、それぞれPCRによってDNA産物を得た。その後、pCS4-GFPのEcoRI切断箇所に挿入し、さらにBglIIIで切断し、WT LaminA/C及び、 Δ 50 LaminA/Cを挿入し、GFP-WT LaminA/C-Sun1 Δ S、GFP- Δ 50 LaminA/C-Sun1 Δ Sを作製した。

(3) 免疫細胞染色

神経芽細胞腫Neuro-2aを播種したカバーガラスをPBSで洗浄したのち、4% PFA/PBSに置換し、氷上で10分間固定した。PBSで洗浄した後、5% BSA/0.4% TritonX-100/PBSを添加し、室温で30分間透過処理とブロッキングをした。一次抗体として、抗GFP抗体(1:1000, Abcam)、抗RFP抗体(1:1000, Rockland)を添加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。核の染色にはDAPI(1.0 μ g/ml,

Dojindo)を用いた。染色画像は蛍光顕微鏡(Keyence, BIOREVO BZ-9000 fluorescence microscope)で観察した。

(4) 培養細胞における微小核の定量

数値解析ソフトウェアであるMATLAB(MathWorks)の微小核定量プログラムCAMDi (Calculating automatic micronuclei distinction)を用いて、作製したプラスミドを過剰発現させた神経芽細胞腫Neuro-2aにおける微小核数の定量を行った。¹⁾

【結果・考察】

加齢に伴う神経細胞の核構造異常が微小核形成を誘導するか検証するため、NexCre; Sun1-GFPマウス(3ヶ月齢と19ヶ月齢)の脳皮質を染色し、MATLABプログラムCAMDiを用いて微小核数を定量した。その結果、老化に伴い、神経細胞で微小核形成が増加することが示唆された。

次に、老齢期の神経細胞由来の微小核がミクログリアに取り込まれているか検証した。そこで、脳皮質のミクログリアを観察した結果、予備的ながら、神経細胞微小核を取り込んだミクログリアを観察することができた。

また、老化した神経細胞がミクログリアを介してBBBに影響を与えるか解析するために、神経細胞特異的に核膜を老化させる系の立ち上げを試みた。先行研究において、LaminA/Cに部分欠損が生じることで早老症に至ることが報告されている。そこで、早老症を引き起こすLaminA/Cの部分欠損変異体LaminA/C Δ 50を作製した。また、LaminA/C Δ 50を核膜移行に必要なSun1のドメインであるGFP-Sun1 Δ Sと融合し、神経芽細胞腫Neuro-2aへ導入した。その結果、加齢に伴い形成される核膜の構造異常や微小核形成がGFP- Δ 50 LaminA/C-Sun1 Δ Sの過剰発現によって形成された。

以上の結果から、老齢期では、神経細胞由来の微小核がミクログリアに取り込まれ、ミクログリアを制御する可能性が示唆された。また、GFP- Δ 50 LaminA/C-Sun1 Δ Sによる老化誘導プラスミドが、人為的な老化誘導に有用なツールであることが示唆された。今後は、神経細胞由来の微小核がどのように形成されるのか、また、微小核がどのようにミクログリアの形態変化を制御しているのかを検証し、ミクログリアの形態制御や周囲の血管に及ぼす影響のメカニズムを明らかにしていく。また、AAVを用いて、神経細胞特異的にGFP- Δ 50 LaminA/C-Sun1 Δ Sを発現させ、血管周囲の神経細胞がミクログリアやBBBに与える影響を*in vivo*で検証する予定である。

【参考文献】

- 1) Yano S, et al. A MATLAB-based program for three-dimensional quantitative analysis of micronuclei reveals that neuroinflammation induces micronuclei formation in the brain. (2021). Sci Rep, 11(1), 18360