

研究終了報告書

「棍棒型ミクログリアの神経変性における機能解析」

研究期間: 2020年11月～2024年3月

研究者: 橋本 翔子

1. 研究のねらい

アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症等の神経変性疾患において、内在性抗酸化因子であるグルタチオンの減少が報告されている。申請者は、グルタチオン減少と神経変性との関係を明らかにするため、グルタチオン合成の律速酵素 Glutamyl Cysteine Ligase Catalytic subunit (GCLC) の神経細胞特異的コンディショナルノックアウトマウス (GCLC^{flox} X CamKII-Cre: 以下 GCLC-KO) について、脳の病理学的解析を行った。GCLC-cKO マウスでは、特に海馬 CA1・大脳皮質第2, 3層における顕著な神経変性、そして同領域でのミクログリア・アストロサイトの活性化を伴う強い神経炎症が観察された。また、ミクログリアの形態に着目すると、神経変性が顕著な領域において、アメーバ型 (Ameboid-shaped) のミクログリアが密に局在することと、突起を長く伸長した棍棒型 (Rod-shaped) のミクログリアが存在することが見出された。棍棒型ミクログリアは、アメーバ型ミクログリアに比べて数は圧倒的に少ないが、突起を伸ばすことで広範囲の細胞と接していた。以上のことから、これらの特徴的形態を示すミクログリアが、GCLC-cKO における神経変性に深く関与している可能性が高い。

通常ミクログリアは、多数の突起を伸ばしている「ラミファイド型」の形態をとる。そして何らかの刺激が加わると、細胞体を肥大化・突起を縮小した「アメーバ型」になることで、移動・サイトカイン産生・貪食等の能力を獲得し、神経障害・保護の役割を果たすと考えられている。一方、「棍棒型」のミクログリアについては、外傷性脳障害や双極性障害の剖検脳で観察されることなどが報告されているが、その機能はほとんど明らかにされていない。本研究では GCLC-KO マウスに現れる棍棒型ミクログリアについて、遺伝子発現プロファイリングに基づいたキャラクター化及び、神経変性における機能を明らかにすることを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

棍棒型ミクログリアは、GCLC-KO マウスにおいて観察される。組織化学的解析により、棍棒型ミクログリアの挙動について月齢を追って観察し、大脳皮質・海馬において神経変性の初期段階に現れ、その後減少していくことが明らかになった。また、GCLC-KO マウスの脳サンプルを用いたシングルセル RNA-seq (scRNA-seq) による、ミクログリアを遺伝子発現プロファイルに基づく細分化 (クラスター分類)、および RNAScope を用いた in situ hybridization 解析を行った。その結果、棍棒型ミクログリアは、より活性化型のミクログリアに近い遺伝子発現様式を示すことが明らかとなった。さらに、棍棒型ミクログリアにおいては、細胞の遊走性に関わる因子が発現することが明らかとなった。これらのことから、棍棒型ミクログリアは、遊走性に富んだ活性型ミクログリアの一部であると考えられる。

(2) 詳細

①研究目的

ミクログリアは、中枢神経系におけるマクロファージ様免疫応答を担当する細胞であり、病理学的状況下で活性化され、損傷した細胞や異物の貪食、サイトカインなどの可溶性因子の分泌を行う。応募者は、グルタチオン欠乏による酸化ストレス亢進マウス(グルタチオン合成酵素神経細胞特異的ノックアウトマウス; GCLC^{flox} X CaMKII-Cre; GCLC-KO)において、棒状に長く伸びた形態(棍棒型)のミクログリアが現れることを発見した。この棍棒型ミクログリアに関して、遺伝子発現プロファイリングを通して機能を明らかにすることを目的として研究を進めた。

②棍棒型ミクログリアの形態的特徴

棍棒型ミクログリアの形態について、GCLC-KO マウスの脳切片を用いた免疫染色によって評価した。大脳皮質においては第Ⅴ層から第Ⅱ/Ⅲ層に、海馬においてはCA1錐体細胞層から歯状回に向かってほとんどのミクログリアが同じ方向(周辺神経細胞の樹状突起に沿って)に伸長していた。また、複数の細胞が連なって長い構造を取ることで、周辺に向かって突起を伸ばしていることも観察された。このことから、突起を介して神経細胞からのシグナルを受け取りながら伸長していることが考えられた

③GCLC-KO における神経細胞死誘導と棍棒型ミクログリアの関係性

棍棒型ミクログリアは、GCLC-KO マウスの大脳皮質においては、2-3 か月齢をピークにその後減少することが明らかとなった。GCLC-KO マウス脳においては、ミクログリアによる細胞貪食に関わる補体(C1q)の活性化や、炎症性細胞死を司る GasderminD (GSDMD), GasderminE (GSDME)の活性化が認められる。これらの活性化は 4-5 か月齢をピークに活性化するのに対し、棍棒型ミクログリアの形成はそれ以前をピークとした。このことから、神経変性のより初期において棍棒型ミクログリアは現れることが示唆された。

④in situ hybridization(RNAscope)による各種マーカーの発現について

まず、ミクログリアマーカー(Iba1)の免疫染色と、各種マーカーの RNAscope を同一切片上で共染色する条件検討を行った。棍棒型ミクログリアを鮮明に染色させるため、Iba1 の免疫染色の明瞭さを落とさず RNAscope を行う条件を吟味した。In situ hybridization 解析の結果、棍棒型ミクログリアは、活性化ミクログリアの一種である可能性が示唆された。

⑤GCLC-KO マウスの scRNA-seq と、同定したミクログリアクラスターマーカーの発現について

棍棒型ミクログリアが多く現れる月齢の GCLC-KO マウス大脳皮質サンプルを用いて、scRNA-seq 解析をし、ミクログリアについて遺伝子発現プロファイリングに基づきクラスター分類を行った。scRNA-seq 解析に基づき選出した因子には、細胞遊走性や神経細胞の形態形成に関わる因子が含まれていた。さらに選出した因子の発現パターンを in situ hybridization(RNAscope)によって解析した。

⑥結論

以上の結果から、棍棒型ミクログリアは、神経細胞からの障害シグナル(酸化ストレス等)を受け

取って、DAM 様に活性化したミクログリアであり、遊走性の高いミクログリアであると考えられる。

3. 今後の展開

これまでの研究成果より、棍棒型ミクログリアは、神経細胞からの障害シグナル(酸化ストレス等による)を受け取って、活性化、高い遊走性を獲得したミクログリアであることが明らかとなった。しかし、「棍棒型」を形成させるための「神経細胞からの障害シグナル」の正体は不明である。今後は、この神経からの「シグナル」を同定する研究を展開していきたい。

4. 自己評価

棍棒型ミクログリアは、出現頻度が低く、あまり着目されてこなかったことから、これまでの知見が少なかった。GCLC-KO マウスでは、棍棒型ミクログリアが高頻度に現れることを見出し GCLC-KO マウスを駆使して解析を進められたこと、知見が少ない中で棍棒型ミクログリアのキャラクタライズを進めたことについて評価したい。また、ミクログリアの免疫染色と RNAscope の両方を鮮明に行う方法を確立したことで、棍棒型ミクログリアの遺伝子発現解析が進んだ。実験条件をきちんと整えることで、研究成果を得られたことも評価したい。最終年度は、複数の学会において、本成果を発表する機会があった。多くの研究者が関心を持ってくださり、多数の質問を受けて議論を深めることもできた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 4件

- | | |
|----|---|
| 1. | Hashimoto S (Corresponding) , Matsuba Y, Kamano N, Watamura N, Sasaguri H, Takado Y, Yoshihara Y, Saito T, Saido TC “Neuronal glutathione loss leads to neurodegeneration involving gasdermin activation.” <i>Scientific reports</i> 13(1) 1109, 2023 |
| 2. | Ishii A, Matsuba Y, Mihira N, Kamano N, Saito T, Muramatsu S, Yokosuka M, Saido TC and Hashimoto S (Corresponding) “Tau-binding protein PRMT8 facilitates vacuole degeneration in the brain” <i>The Journal of Biochemistry</i> mvac058, 2022 |
| 3. | Watamura N, Sato K, Shihashi G, Iwasaki A, Kamano N, Takahashi M, Sekiguchi M, Mihira N, Fujioka R, Nagata K, Hashimoto S , Saito T, Ohshima T, Saido TC and Sasaguri H “An isogenic panel of App knock-in mouse models: profiling β -secretase inhibition and endosomal abnormalities” <i>Science Advances</i> 8 (23) eabm6155, 2022 |
| 4. | Watamura N, Kakiya N, Nilsson P, Tsubuki S, Kamano N, Takahashi M, Hashimoto S , Sasaguri H, Saito T, Saido TC “Somatostatin-evoked $A\beta$ catabolism in the brain: Mechanistic involvement of α -endosulfine-KATP channel pathway”. <i>Molecular psychiatry</i> 27, 1816–1828, 2022 |

(2)特許出願

研究期間全出願件数： 0 件(特許公開前のものも含む)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

● 総説

Hashimoto S, Saido TC “Generation of sophisticated Alzheimer’s disease mouse models and research advances utilizing them” Translational and Regulatory Sciences 5(2) 40–52, 2023

Sasaguri H, **Hashimoto S**, Watamura N, Sato K, Takamura R, Nagata K, Tsubuki S, Ohshima T, Yoshiki A, Sato K, Kumita W, Kitazume S, Nilsson P, Winblad B, Saito T, Iwata N, Saido TC “Recent Advances in the Modeling of Alzheimer’s Disease” Frontiers in neuroscience 16 807473–807473 2022

● 主要な学会発表

橋本翔子「グルタチオン異常によるアルツハイマー病病理形成・神経細胞死誘導について」第 45 回日本分子生物学会(幕張)(2022 年 12 月 1 日)(シンポジウム)

Shoko Hashimoto, Yukio Matsuba, Kenich Nagata, Takaomi C Saido “Characterization of rod-shaped microglia by gene expression profiling” 第 64 回日本神経病理学会総会学術研究会 第 66 回日本神経化学学会大会 合同大会(神戸)(2023 年 7 月 6 日)(シンポジウム)

Shoko Hashimoto, Yukio Matsuba, Kenich Nagata, Takaomi C Saido “Characterization of rod-shaped microglia in the brain of glutathione-deficient mouse” 第 46 回日本神経科大会(仙台)(2023 年 8 月 4 日)(シンポジウム)

橋本翔子、盛戸貴裕、綿村直人、永田健一、松葉由紀夫、笹栗弘貴、斉藤貴志、西道隆臣「「ノックイン」手法によるマウスモデル開発のあゆみと、それらを用いた研究」 第 42 回日本認知症学会学術集会(奈良)(2023 年 11 月 24 日)(シンポジウム)

橋本翔子、松葉由紀夫、永田健一、佐原成彦、西道隆臣「酸化ストレス下における神経変性誘導とミクログリアの形態変化について」第 46 回日本分子生物学会(神戸)(2023 年 12 月 7 日)(シンポジウム)