

加齢に伴う脳機能低下のメカニズム解明

Molecular mechanisms of neurodegeneration

島根大学医学部 医学科 発生生物学 教授 藤田 幸

要 約

加齢や疾患などにより神経回路が破壊されると、脳機能が障害は長期間残り続ける。正しく神経回路を修復するためには、神経細胞の軸索が再び伸長し、神経回路を再構築するという、脳発達期における神経回路の形成のような神経回路形成のステップをたどる必要がある。脳や脊髄の神経細胞は非常に脆弱で、かつ、神経細胞周囲には再生を妨げるような分子が発現することから、壊れた神経回路が自然に元通りになることはほぼない。神経回路を修復する有効な治療法の開発が強く求められている。これまでに私達は、パーキンソン病や、精神疾患など、様々な中枢神経機能障害モデル動物を用いて、神経再生を妨げる因子の発現を抑制する手法が、神経症状の一部を緩和することを見出してきた。また、脳内の免疫担当細胞であり、炎症反応等に関わるミクログリアが、新生仔期には神経細胞の生存や軸索維持に寄与することを明らかにした。近年の1細胞解析からミクログリアが、神経や血管など多様な細胞の保護に関わるような様々な因子を分泌することがわかってきた。そこで本研究では、高齢マウスにおけるミクログリアの機能解析を進めた。新生仔マウスと高齢マウスにおけるミクログリアの形態と遺伝子発現を解析した。その結果、加齢に伴いミクログリアでの遺伝子発現パターンに違いが生まれることが判明した。本研究成果を基盤として、神経細胞の周囲に存在する細胞の応答とその遺伝子発現変化を解明することで、神経変性の克服へ展開することを目指す。

緒 言

脳は精密なネットワークを形成して情報を伝達している。発達期の脳内ではこのネットワーク（神経回路）の構築が活発に行われている。神経回路の構成要素である神経細胞は、情報を伝達する導線となる軸索を伸長し、標的細胞と結びついてネットワークを形成する。発生・発達期の脳内では神経細胞とその周囲の環境の相互作用によって神経回路が構築され、神経回路や神経細胞を維持する仕組みが存在すると考えられてきた。しかしながら、神経細胞を取り巻く環境の中で、どのような細胞が、どのようなメカニズムによって神経回路の構築に寄与するのかについては未解明の部分が多く残されている。

哺乳類の脳皮質では、内側から外側に向かって第I層から第VI層の神経細胞層が形成されている。各層には特徴的な機能を有する細胞が存在している。脳皮質第V層に細胞体を有する皮質脊髄路神経細胞は、下方に向けて脊髄まで軸索を伸長し、運動機能を制御する神経細胞である。この神経細胞は脳皮質から脊髄まで、長距離にわたって軸索を伸ばしており、その生存維持には特定の栄養因子が必

要であることが培養細胞を用いた実験から示唆されている。しかし、このような栄養因子が生体内において脳皮質神経細胞の生存維持にはたらくメカニズムや、栄養因子の供給源などの詳細は不明であった。

従来、脳内の免疫担当細胞であるミクログリアは、損傷や病態下において脳内の炎症反応に関わる細胞として、神経障害への関与が広く研究されてきた。一方で近年の研究からは、生理的な条件下においてもシナプス除去や死細胞除去などに寄与し、中枢神経回路の構築に重要な役割を担うことが明らかになってきた。ミクログリアは炎症反応に関わるサイトカインのみならず、様々な栄養因子も産生している。発生期のようにダイナミックに神経回路が形成される過程で、ミクログリアは神経細胞の軸索が通過する白質に集積するという特徴的な脳内局在を示すことが古くから知られていた。このように特定の発生段階でみられるミクログリアの局在は、マウスからヒトまで広く哺乳類で報告されていたが、その特徴的な分布と役割の関連は長い間不明のままであった。これまでの私達の研究から、生後脳におい

て、ミクログリアから産生されるインスリン様成長因子 IGF-1 (insulin-like growth factor-1) が、大脳皮質第V層神経細胞の生存に必要であることが示された。本稿では、生後脳におけるミクログリアの神経保護作用、およびミクログリアが皮質脊髄路神経細胞の軸索に集積する分子メカニズムと病態下での変化について紹介する。

方法

1) 免疫組織化学染色

C57BL/6 マウスに3種混合麻酔（ドミトール (0.3 mg/kg, Zenoaq, Fukushima, Japan), ドルミカム (4 mg/kg, Astellas, Tokyo, Japan), ベトルファール (5 mg/kg, Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan)) を腹腔内投与して麻酔をかけ、4% PFA/PBSで、マウスを経心的に灌流固定した。脳を取り出し、4% PFA/PBS、4℃で一晩後固定を行った。続いて30% スクロース/PBS中に浸け、4℃でサンプルが沈むまで浸漬した。その後、組織をOCT (compound optimal cutting temperature) compound (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA, USA) で包埋し、凍結標本作製した。クライオスタットを使用し、冠状方向に厚さ20 μm、の凍結薄層切片を作製し、クエン酸処理により不活化を行った。クエン酸バッファーをブロックインキュベーター中で100℃に温めておき、その間に常温のクエン酸バッファーへ切片を浸し10分間慣らした。100℃に温めておいたクエン酸バッファーに切片を移し、浮かばないように完全に沈め100℃のブロックインキュベーター中で5分間インキュベートした。再び常温のクエン酸バッファーへ切片を浸し20分間慣らした後、PBS洗浄をした。5% BSA/PBSで室温1時間ブロッキングを行った。その後、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体を4℃で一晩静置した。切片をPBSで洗浄をした後、ブロッキング溶液で希釈した二次抗体を室温遮光下で1時間反応させた。PBSで洗浄後、Fluorescent mounting medium (Dako, Carpinteria, CA, USA) を用いて封入した。封入後のサンプルを観察、撮影した。観察、撮影には蛍光顕微鏡を使用した。

2) 遺伝子発現解析

マウスには、C57BL/6J (メスのみ) を用いた。各週齢で経時的にマウス脳からRNA抽出を行い、それぞれ逆転写しcDNAを得た。得られたcDNAに対し

primerとしてNtng1を用いて、real-time-PCRを行った。標準化のためGAPDHを用いた。同じ作業を繰り返し行い、結果にはその平均値を用いた。それぞれのprimerにおけるCT値を出し、comparative Ct法により各週におけるNtng1の発現量の相対比を求めた。

結果

1) ミクログリアの形態学的変化

生後の脳内において、ミクログリアは特徴的な形態や脳内分布を示す。生後5日目の脳内では、皮質脊髄路神経細胞の軸索が通過する白質部分（脳梁、内包、大脳脚）に、Ibal (ionized calcium binding adapter molecule 1) 陽性のミクログリアが集積している。胎生期や生後16日以降の脳内ではこのような特徴的なミクログリアの局在は認められず、ミクログリアは発生時期特異的に、このような特徴的な脳内分布を示す。緑色蛍光蛋白質GFP (green fluorescent protein) を発現するレンチウイルスベクターを用いて皮質脊髄路神経軸索を標識すると、実際にミクログリアが軸索付近に分布することがわかった¹。これらのミクログリアは、大脳皮質に分布するものと比較して大きな細胞体が大きく、特徴的な形態的を有している（図1）。一方で、高齢マウスや成体マウスでは、突起を伸ばした形状のミクログリアが多く観察された（図1）。

2) 加齢に伴う遺伝子発現変化

in situ hybridizationによる網羅的な解析の結果、ミクログリアが産生する既知のたんぱく質の中でも、IGF-1が生後脳の白質で特徴的な形態を示すミクログリアに多く発現していることがわかった。IGF-1のsiRNAや拮抗剤H-1356を生後マウスに投与すると、大脳皮質神経細胞に細胞死が誘導された。また、ミノサイクリン投与による大脳皮質神経細胞の細胞死は、IGF-1たんぱく質を投与しておくことで緩和された。このことから、ミクログリアから放出されるIGF-1が、生後脳における大脳皮質神経細胞の生存に必要であることが明らかになった¹。

次に、皮質脊髄路軸索にミクログリアが集積する分子メカニズムを解明することを目指した。ミクログリアは皮質脊髄路軸索に沿って集積することから、皮質脊髄路神経細胞に特異的に発現する因子が、ミクログリアの誘引に関わっている可能性を考えた。

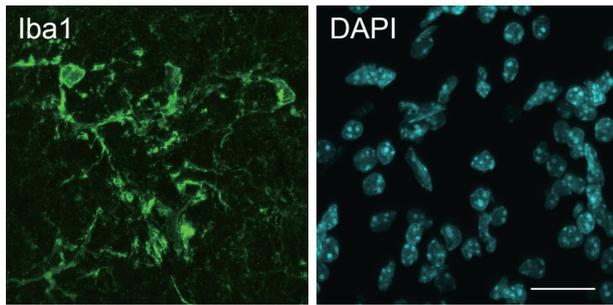


図1. 高齢マウス脳のIba1陽性細胞像 (Scale bar: 20 μm)

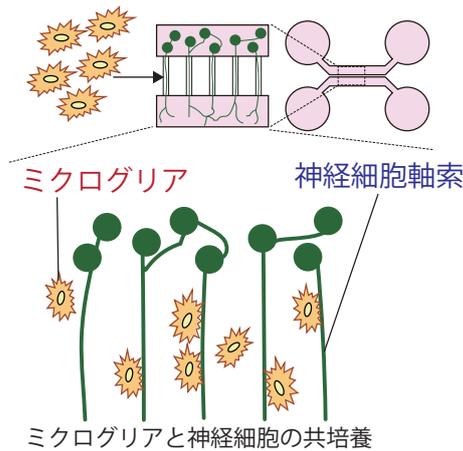


図2. ミクログリアの神経軸索への集積を評価する神経細胞培養系

これまでに報告されている皮質脊髄路神経細胞特異的に発現する遺伝子の中から、ミクログリアの軸索への集積に関わる因子の探索を試みた。脊髄より逆行性に皮質脊髄路神経細胞を標識し、大脳皮質神経細胞の中から標識された皮質脊髄路神経細胞のみをFACS (fluorescence activated cell sorting) を用いて回収、遺伝子発現解析によって皮質脊髄路神経細胞特異的に発現している複数の遺伝子が同定されている。これらの遺伝子の中からミクログリアの集積に関わる遺伝子を網羅的に探索するために、ミクログリアの神経軸索への集積を評価する神経細胞培養系を確立した²。生後マウスの脳から大脳皮質神経細胞を回収し、AXIS axon isolation device を用いて神経細胞の細胞体と軸索とを分離して培養した (図2)。その後、ミクログリアを加えて神経細胞とミクログリアの共培養を行うと、軸索に沿ってミクログリアが局在した。この実験系を用いて、皮質脊髄路特異的に発現することが知られている遺伝子の発現を抑制した大脳皮質神経細胞を軸索分離培養し、ミクログリアの軸索への集積を評価した。Nucleofector を用いて、候補遺伝子のshRNAを大脳皮質神経細胞へ

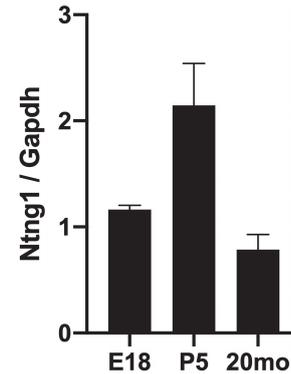


図3. マウス脳におけるNetrinG1の発現変化

導入し、コントロールshRNAを導入した細胞と比較して発現が抑制されることをreal-time PCRによって確認した。その結果、NetrinG1の発現を抑制した大脳皮質神経細胞の軸索に対して、ミクログリアの集積が減少することがわかった³。

以上から、神経細胞軸索周辺への神経保護性ミクログリアの集積には、NetrinG1を介したシグナルが重要であることが示唆された。そこで、加齢に伴うNetrinG1の発現量をqPCRにて検証した。その結果、マウス脳におけるNetrinG1の発現は、新生仔期に高く、加齢により減少することがわかった (図3)。

考 察

ミクログリアは脳内の免疫系の担い手として、神経障害性にも保護性にも働く二面性を有する細胞である。病態下では炎症細胞、免疫細胞としての機能が早くから解明され、ミクログリア由来の炎症性サイトカインが神経変性の本態に寄与する可能性が示唆されている。一方で、ミクログリアは変性した神経細胞からのシグナルによって活性化され、神経保護作用を示す可能性や、不要な変性神経細胞を貪食、処理して回路の修復に寄与することが示されている。また生理的な条件下では、ミクログリアは休止型 (Resting microglia) を保っていると考えられてきたが、シナプスや軸索と接触して神経細胞の機能を監視、調節していることがわかった⁴。特に、脳の発達期ではシナプス除去や神経幹細胞の制御など、中枢神経回路の構築に関わる重要な役割を担っている。また、加齢とともに、その状態は変化することが、近年の一細胞レベルの解析から明らかになった⁵。本研究から、NetrinG1シグナルは、脳発達期に皮質脊髄路の軸索周囲部へのミクログリア集積に寄与し、神経細胞生存や軸索の維持に関わる一方で、

加齢とともにその発現が減少することがわかった。加齢に伴うホルモンバランスの変化が、ミクログリアの形態や遺伝子プロファイルに与える影響について、メカニズム詳細の解明を継続する所存である。

謝 辞

本研究遂行にあたり、ご支援賜りました公益財団法人 神澤医学研究振興財団に深く御礼申し上げます。

参考文献

1. Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., et al., Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal

development. *Nat Neurosci.*(2013) 16(5): 543-551.

2. Fujita, Y., and Yamashita, T. Protocol for Co-culture of Microglia with Axons. *STAR Protocols.*(2020) 1(3):100111.
3. Fujita, Y., Nakanishi, T., Ueno, M., et al., Netrin-G1 regulates microglial accumulation along axons and supports the survival of layer V neurons in the postnatal mouse brain. *Cell Rep.*(2020) 31(4):107580.
4. Fujita, Y., Yamashita, T. Alterations in chromatin structure and function in the microglia. *Front Cell Dev Biol.*(2021) 8: 626541.
5. Matsudaira, T., Nakano, S., Konishi, Y., et al., Cellular senescence in white matter microglia is induced during ageing in mice and exacerbates the neuroinflammatory phenotype. *Commun Biol.*(2023) 6:665.

Abstract

Aging and diseases can lead to the destruction of neural circuits, resulting in long-lasting impairments in brain function. To effectively repair neural circuits, it is necessary to follow the steps of neural circuit formation, similar to the development of neural circuits during the brain's developmental period. Neural cells in the brain and spinal cord are extremely fragile, and molecules that inhibit regeneration are expressed around nerve cells, making it almost impossible for damaged neural circuits to naturally return to their original state. There is a strong demand for the development of effective therapeutic treatments to repair neural circuits. We have discovered methods to suppress the expression of factors that impede neural regeneration using various animal models such as Parkinson's disease and mental illnesses, leading to the partial alleviation of some neurological symptoms. Additionally, we have revealed that microglia, immune cells in the brain involved in inflammatory responses, contribute to the survival and maintenance of nerve cells during the neonatal period. Recent single-cell analyses have shown that microglia secrete various factors involved in the protection of diverse cells, including neurons and blood vessels. Therefore, this study advanced the functional analysis of microglia in aging mice, analyzing the morphology and gene expression of microglia in neonatal and aging mice. To elucidate the responses of cells surrounding nerve cells and their changes in gene expression in this study will contribute to overcoming neurodegeneration.