京都工芸繊維大学

氏　　名	たかぎ　しょうへい **髙木　翔平**
学位(専攻分野)	博　士（学術）
学位記番号	博甲第 1028 号
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科　バイオテクノロジー専攻
学位論文題目	Functional analysis of microglia in the circumventricular organs of the adult mouse brain （成体マウス脳の脳室周囲器官におけるミクログリア機能の解析）
審査委員	(主査)教授　宮田清司 教授　片岡孝夫 准教授　吉村亮一

論文内容の要旨

人を含む哺乳類は、細菌やウイルスの固有構成成分である病原体関連分子パターンを、パターン認識受容体によって認識することで感染を認識している。最も良く研究されているパターン認識受容体は Toll-like receptors (TLRs)であり、これらは感染～神経炎症発症メカニズム解明の動物モデルに良く用いられている。パターン認識受容体を介した自然免疫系の発動は、サイトカインの産生と放出を促し、最終的には脳の自律神経系、免疫系、内分泌系を活性化し全身性の炎症反応を引き起こす。しかし、末梢から脳への感染情報の伝達経路については良く分かっていない。これは、全世界で猛威を振るっている新型コロナウイルス感染による重症化に対して、人類が有効な対策方法をなかなか見いだせなかったことからも分かる。本申請論文では、マウスの脳室周囲器官に存在する免疫担当細胞であるミクログリアに着目し、TLR2 を介した脳の神経炎症応答経路についての研究をまとめた。

本申請論文は、序論、第 1 章「マウス脳室周囲器官に存在するミクログリアの特性と持続的活性化」、第 2 章「脳室周囲器官のミクログリアに発現している TLR2 を介した体温調節機構」から構成されている。序論では、脳内の免疫担当細胞であるミクログリアの正常状態並びに感染時における働きを解説している。特に、末梢由来の免疫担当細胞であるマクロファージの活性型には M1 型と M2 型があることを概説した。次に、脳室周囲器官が、血液と脳のバリアである血液脳関門を欠く有窓性血管を有し、血液中の分子を直接認識するセンサー受容体が発現していること、さらに脳内免疫系の活性化に重要な部位であることを解説している。第 1 章では、脳室周囲器官に存在するミクログリアの形態学的性質と M1 型と M2 型のマーカータンパク質発現が極めて特徴的であることを解説している。第 2 章では、脳室周囲器官のミクログリアに発現している TLR2 を介して NF-κB シグナリングと Fos シグナリングが生じ、これが体温調節に関与していることを解説している。

第 1 章では、マウスを用いて脳室周囲器官及び複数の脳部位でミクログリアの形態学的特徴を調べたところ、正常状態でも脳室周囲器官でのみミクログリアが静止型である Ramified 形状ではなく、活性型の Amoeboid 形状を示すことが分かった。さらに、M1 型マーカータンパク質

（CD16/32, CD86）と M2 型マーカータンパク質（CD206, Ym1）の発現を調べたところ、脳室周囲器官のミクログリアでは M1 型と M2 型マーカータンパク質発現が顕著に高いことが分かった。一方で、M1 型の CD16/32 や M2 型の Ym1 は海馬や弓状核において高い発現が認められた。さらに、脳室周囲器官ではミクログリアと神経幹細胞との間に空間的に密な相互作用があることが明らかになった。以上の結果は、脳室周囲器官のミクログリアは、正常状態でも Amoeboid 形状を示し M1 型と M2 型マーカータンパク質を高発現していることから、活性化状態にあることが明らかになった。

第 2 章では、脳室周囲器官に存在する TLR2 を介した神経炎症シグナリングと体温調節について調べた。TLR2 agonist である Zymosan を腹腔内投与すると、脳室周囲器官のミクログリアに TLR2 の下流シグナルである NF-κB の活性化が認められた。また、Zymosan を蛍光標識して腹腔内投与すると脳室周囲器官の実質に到達していることが観察されたことより、Zymosan は直接的に脳室周囲器官の TLR2 を活性化したものと考えられる。次に、Clodronate-liposome を脳内に投与しミクログリアを特異的に除去すると、脳室周囲器官のアストロサイトや神経の Fos 発現が顕著に抑制された。最後に、Clodronate-liposome 処理によりミクログリアを除去したマウスでは、Zymosan を腹腔内投与すると、コントロールマウスが敗血症様の体温低下を示したのに対して、顕著な体温低下は観察されなかった。以上の結果は、血液中のサイトカインとは別に、脳室周囲器官に存在するミクログリアが TLR2 を介して Zymosan を直接的に受容することで神経炎症を引き起こし、体温変化を生じることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

人類は、長い間、細菌やウイルスなどによる感染症に苦しめられてきた。哺乳類では、細菌やウイルスの固有構成成分を認識して自然免疫系の炎症応答が誘導される。自然免疫系の活性化は、サイトカインの産生と放出を促し、最終的には脳の神経炎症を生じ、全身性の炎症となる。軽微な炎症は、発熱により免疫系などを高めるが、重症化すると敗血症になり死に至る場合もある。新型コロナウイルス感染症も重症化した場合、サイトカインシンドロームを生じ敗血症になり死に至ると考えられている。末梢の炎症情報は脳へ伝えられ神経炎症を生じることで、自律神経系、情動系、免疫系が活性化される。しかし、末梢から脳への感染情報の伝達経路については未解明な部分が多い。申請者は、マウスの脳室周囲器官に存在する免疫担当細胞であるミクログリアに着目し、TLR2 を介した脳の神経炎症応答経路についての研究を行った。

第 1 章では、申請者はマウスを用いて脳室周囲器官のミクログリアが正常状態にもかかわらず活性型の Amoeboid 形状を示すことを明らかにした。さらに、脳室周囲器官のミクログリアは、M1 型と M2 型マーカータンパク質発現が顕著に高いことを明らかにした。この結果は、感染などの刺激がなくても脳の特定部位ではミクログリアが活性化状態にあることを示している。これは、脳室周囲器官が血液脳関門を欠いているため、血液成分などの脳実質への流入による異物を除去する必要があり、常にミクログリアが活性化状態にあると考えられる。さらに、M1 型の CD16/32 や M2 型の Ym1 は、神経新生がある海馬や弓状核において高発現していることを明らかにしている。また、脳室周囲器官ではミクログリアと神経幹細胞との間に空間的に密な相互作用がある

ことを明らかにしている。以上の結果は、生体のミクログリアでは、各々の脳部位の特殊性に応じ、活性化状態や M1 型や M2 型タンパク質発現が多様であることを明らかにした。

第 2 章では、末梢の Zymosan 投与によって、脳室周囲器官のミクログリアに存在する TLR2 に Zymosan が直接作用し NF-κB を活性化することを明らかにした。次に、Clodronate-liposome を脳内に投与しミクログリアを特異的に除去すると、Zymosan による脳室周囲器官の活性化が抑制されていること、並びに敗血症様の体温低下が抑制されることを明らかにした。以上の結果から、脳室周囲器官に存在するミクログリアの TLR2 が Zymosan を直接的に受容することで神経炎症を引き起こす新しい経路があることを明らかにした。

これらの研究は、脳室周囲器官におけるミクログリアの特性を明らかにするとともに、微生物感染などによる炎症時におけるミクログリアの TLR2 の機能的意義を証明した学術的意義が非常に高い研究である。また、これらの研究は、医学・薬学的意義も大きく、感染症による敗血症治療方法の開発や原因解明に貢献する可能性がある。

学位論文は、申請者が筆頭著者である査読制度の確立されている下記の国際科学論文 2 編に掲載されている。

[公表論文]

1) Shohei Takagi, Eriko Furube, Yousuke Nakano, Mitsuhiro Morita, Seiji Miyata. Microglia are continuously activated in the circumventricular organs of mouse brain. Journal of Neuroimmunology, Vol. 331, pp. 74-86, 2019.

2) Shohei Takagi, Saki Murayama, Katsuhiro Torii, Shoko Takemura-Morita, Erkin Kurganov, Sumiharu Nagaoka, Akio Wanaka, Seiji Miyata. Depletion of microglia and macrophages with clodronate liposomes attenuates zymosan-induced Fos expression and hypothermia in the adult mouse. Journal of Neuroimmunology, Vol. 344, 577244, 2020.

参考論文として、下記の国際科学論文 1 編に掲載されている。

[参考論文]

1) Eriko Furube, Shintaro Kawai, Haruna Inagaki, Shohei Takagi, Seiji Miyata. Brain Region-dependent Heterogeneity and Dose-dependent Difference in Transient Microglia Population Increase during Lipopolysaccharide-induced Inflammation. Scientific Reports, Vol. 8, 2203, 2018.