

<研究課題> 海馬—髄膜境界域における細胞老化、老化細胞除去メカニズムの解明

代表研究者：東京医科大学 組織・神経解剖学分野 准教授 大山恭司

共同研究者：長崎大学大学院医歯薬学総合研究科（医学系）病理学 准教授 森 亮一

【まとめ】

生後初期のマウス海馬—髄膜境界域にプログラム老化細胞を見出した。プログラム老化細胞は、細胞表面マーカーCD271、細胞老化マーカーSA β gal/GLB1, p21 を発現し、細胞死マーカーEndoG, TUNEL 陽性の神経堤由来の細胞であると考えられた。プログラム老化細胞は、ニワトリ胚予定髄膜領域にも存在することが明らかとなった。そこで、ニワトリ胚組織培養によるプログラム細胞老化解析プラットフォームを作成した。また、プログラム老化細胞周囲には、CD206+/CD80-の M2 マクロファージが認められた。この結果は、M2 マクロファージによるプログラム老化細胞除去を示唆する。

マクロファージの貪食能を制御する mir-142 のノックアウトマウス(142KO)を解析した。その結果、海馬溝および周辺髄膜において、プログラム老化細胞の増加が認められた。また、海馬ニューロン前駆細胞は、野生型マウスと比べて、生後3日目(P3)で一過性に増加、P14で減少することが示唆された。上記結果は、マクロファージの機能不全が、プログラ

ム老化細胞蓄積を介して、海馬ニューロン新生に影響する可能性を示唆する。

1. 研究の目的

細胞老化は加齢のみならず、器官発生に必須な生理的現象である。我々は、発生期から加齢期に至るまで、マウス海馬—髄膜境界域で細胞老化が起きること、老化細胞除去にマクロファージが関与することを独自に見出した。同様の現象をニワトリ胚でも観察しており、海馬—髄膜境界域における細胞老化、老化細胞除去は、多様な種で保存された、一生を通じて見られる生理的現象と考えられる。また、本研究に先立ち、マクロファージの貪食を制御する miR-142 のノックアウトマウス(142KO)を解析したところ、142KO 髄膜において SA β gal 陽性プログラム老化細胞の増加を見出した。

そこで、本研究目的は、1) 海馬—髄膜境界域におけるプログラム老化細胞の性状解明、2) プログラム細胞老化解析プラットフォームの確立、3) 海馬—髄膜境界域マクロファージの性状解明、4) 142KO におけるプログラム老化細胞蓄積が海馬ニューロン新生に及ぼす

影響の解明である。

2. 研究方法と経過

2-1 免疫組織染色

マウス、ニワトリ胚組織を4%パラホルムアルデヒド(4%PFA)で4°C一晩固定。翌日、PBS洗浄、30%スクロースに浸漬。OCT包埋後、凍結切片を作製。

1次抗体(p21, EndoG, 活性型 caspase3 など)で4°C一晩反応した。PBS洗浄後、蛍光2次抗体反応を行った。PBS洗浄、封入し、共焦点レーザー顕微鏡で観察、画像撮影を行った。使用した1次抗体は、プログラム細胞老化マーカーp21、GLB1、細胞死マーカーEndoG、活性型 Caspase3、細胞表面マーカーCD271、マクロファージ/ミクログリアマーカーF4/80, M1マクロファージマーカーCD80, M2マクロファージマーカーCD206。また、TUNEL反応による細胞死検出を行った。

2-2 MACS 磁気ビーズによるマクロファージ精製及びライブイメージ観察

マウスから、F4/80+ MACS 磁気ビーズによりマクロファージを精製、培養、ライブイメージ観察を行った。

2-3 髄膜細胞及び海馬神経幹細胞によるオルガノイド形成

マウス新生仔から髄膜あるいは海馬を採取し、ピペットで機械的に解離した。MACS 磁気ビーズを用いて、髄膜細胞(CD271+)、神経幹細胞(CD133+)を精製した。マトリゲル中、FGF2, EGF 存在下、3週間培養、オルガノイド形成を行った。

2-4 ニワトリ胚頭部予定髄膜領域におけるプログラム細胞老化解析系

孵卵2日目(E2)のニワトリ胚頭部予定髄膜領域を単離した後、コラーゲンゲル中で7日間培養した。4%PFA固定後、PBS洗浄、30%スクロースに浸漬した。OCT包埋後、凍結切片を作製し、SA β gal染色を行った。

3. 研究の成果

まず、髄膜プログラム老化細胞の性状を解析した(3-1)。次に、プログラム老化細胞表面マーカーに対する抗体を吸着させた磁気ビーズ(MACS)を用いて髄膜細胞を精製、オルガノイド形成することで、プログラム細胞老化解析プラットフォーム確立を試みた(3-2)。また、髄膜マクロファージの精製、培養、ライブイメージ観察を試みた。また、髄膜マクロファージの高純度精製に必要な細胞表面マーカーを解析した(3-3)。さらに、142KOにおける老化細胞蓄積およびニューロン新生に関する組織学的解析を行った(3-4)。

3-1 プログラム老化細胞の性状

胎生11日目(E11)～生後初期マウス海馬の凍結切片を作製し、SA β gal/GLB1染色による老化細胞検出、細胞老化マーカーp21、細胞死マーカーEndoG、活性型 Caspase3の免疫染色、TUNEL染色を行った。その結果、生後初期の海馬周辺の髄膜および海馬溝にSA β gal+/GLB1+/p21+/EndoG+/TUNEL+

の老化細胞が認められた。

プログラム老化細胞の高純度精製に向けて、免疫染色により老化細胞表面抗原を解析した。その結果、神経堤幹細胞マーカーCD271 が発現することが明らかとなった。この結果は、髄膜細胞が神経堤由来であるという知見と一致する。

以上の結果から、生後初期のマウス海馬周辺の髄膜および海馬溝において認められたプログラム老化細胞は、細胞表面抗原 CD271、細胞老化マーカー p21 を発現し、EndoG, TUNEL 陽性を示す、神経堤由来細胞であると考えられる。

3-2 プログラム細胞老化解析プラットフォームの確立へ向けて

3-2-1 マウス髄膜および海馬神経幹細胞を用いたオルガノイド形成

髄膜を機械的に解離した後、CD271 MACS 磁気ビーズにより精製した。CD271+髄膜細胞を EGF, FGF 2 存在下、3 週間培養した。神経幹細胞についても Prominin+ MACS を用いて、オルガノイド形成を試みた。オルガノイド形成を認めたが、多くのオルガノイドは小サイズであった。また、細胞生存率、オルガノイド形成効率は低かった。実験条件を改善し、再現性を確認する必要がある。

3-2-2 ニワトリ胚髄膜におけるプログラム老化細胞の性状解明

孵卵 4 ~ 14 日目 (E4-E14) のニワトリ胚予定髄膜領域における細胞老化マーカー SA β gal の発現を検討した。その結果、E4 で陽性細胞は見られなかったが、

E6-8 になると、予定髄膜領域において SA β gal 陽性細胞が認められた。E10-14 になると SA β gal 陽性細胞が多数見られ、それらは、CD271 免疫陽性であった。その一部は、細胞老化マーカー SA β gal/GLB1 及び p21 を共発現していた。これらの結果は、マウス及びニワトリ髄膜において、プログラム細胞老化が起きることを示唆する。

3-2-3 ニワトリ胚を用いた「髄膜プログラム細胞老化」解析系の確立

孵卵 2 日目 (E2) のニワトリ胚頭部予定髄膜域を単離して、コラーゲンゲルで 7 日間培養した。その結果、*in vivo* 同様、SA β gal 陽性細胞が検出された。先行研究において、プログラム細胞老化への TGF β シグナルの関与が示唆されている。そこで、TGF β シグナル阻害剤 SB431542 の存在下、培養した後、SA β gal 染色を行った。しかしながら、SA β gal 染色結果に顕著な変化は見られなかった。今後、本計画で確立したプログラム細胞老化解析系を用いて、他のシグナル系の関与を検証する。

3-3 髄膜マクロファージの性状解明

F4/80+MACS 磁気ビーズによりマクロファージを精製した。予備結果として、F4/80+マクロファージの初代培養、ライブイメージング観察に成功した。しかしながら、F4/80 はミクログリアにも発現することが知られている。そこで、髄膜マクロファージ特異的に発現する細胞表面抗原を免疫染色にて検索した。そ

の結果、CD206 は髄膜マクロファージに発現するが、ミクログリアには発現しないことを見出した。一方、髄膜マクロファージは M1 マクロファージマーカー CD80 に免疫陰性であった。つまり、髄膜マクロファージは、CD206+/CD80- の M2 マクロファージであると考えられる。

3-4 142KO 髄膜における老化細胞蓄積および海馬ニューロン新生能解析

miRTarBase を用いて、mir-142-3p および-5p の標的遺伝子を検索した結果、標的遺伝子候補として老化細胞分泌サイトカイン IL6 を見出した。142KO および野生型マウスにおける IL-6 免疫染色を行ったところ、142KO 髄膜における IL-6 発現上昇が示唆された。

142KO 海馬凍結切片を作製し、ニューロン前駆細胞マーカー Tbr2 の免疫染色を行った。Tbr2+ニューロン前駆細胞が、生後 3 日目(P3)で一過性に増加した後、P8 及び P14 で減少するという予備結果を得た。この結果は、142KO における神経幹細胞の一過性活性化、その後の枯渇を示唆する。

4. 今後の課題

4-1 オルガノイド形成：マウス「髄膜細胞老化」解析系の確立へ向けて

髄膜細胞の懸濁法やマトリゲル濃度を変えて、細胞生存率、オルガノイド形成率を上げる必要がある。オルガノイド構成細胞の性状を免疫染色により明らかにする必要がある。また、SA β gal, p21 染色により老化細胞を検出することを

考えている。

4-2 マウス「髄膜マクロファージによる老化細胞除去」解析系の確立

CD206+MACS 磁気ビーズを用いて、髄膜マクロファージを高純度精製、培養、ライブイメージ観察系を確立する。そして、マウス髄膜細胞および髄膜マクロファージのオルガノイド共培養により、老化細胞除去の *in vitro* 解析系を確立する。

4-3 「プログラム細胞老化シグナル」解明に向けて

ニワトリ胚予定髄膜領域を培養し、プログラム細胞老化制御シグナルの解明を目指す。先行研究により、Wnt シグナルの関与が考えられる。シグナル阻害実験などにより、その関与を明らかにする。

4-4 髄膜における IL6 発現上昇が海馬ニューロン新生に及ぼす影響の解析

142KO の解析個体数を増やして、IL6, Tbr2 免疫染色データの再現性を確認する。野生型マウス海馬スライスに IL6 存在下で培養、Tbr2 免疫染色により、IL6 が海馬ニューロン新生に及ぼす影響を明らかにする。また、CD133+ MACS 磁気ビーズで海馬神経幹細胞を精製、オルガノイド形成を行う。IL6 存在下、培養した後、Tbr2 免疫染色にて IL6 がニューロン新生に及ぼす影響を明らかにする。

5. 研究成果の公表方法

本研究成果の一部を日本解剖学会全国学術集会で発表した（日本解剖学会（山口）2020）。今後、原著論文にまとめて学術雑誌に投稿する予定である。