

PLD4 欠損マウス脳組織学的解析

Histological analysis of the brain in
PLD4-deficient mice

| | |
|------|-------|
| 研究分野 | 薬理学 |
| 指導教授 | 馬場 広子 |
| 氏名 | 千葉 輝正 |

略語表

| | |
|-----------|---|
| APS: | ammonium persulfate |
| BSA: | bovine serum albumin |
| CD: | cluster of differentiation |
| DAB: | 3, 3'-diaminobenzidine |
| DAPI: | 4', 6-diamidino-2-phenylindole |
| EAE: | experimental autoimmune encephalomyelitis |
| GFAP: | glial fibrillary acidic protein |
| HE: | hematoxylin-eosin |
| Iba1: | ionized calcium-binding adapter molecule 1 |
| LPS: | lipopolysaccharide |
| MAG: | myelin associated glycoprotein |
| MBP: | myelin basic protein |
| MOG: | myelin-oligodendrocyte glycoprotein |
| MS: | multiple sclerosis |
| PBS: | phosphate-buffered saline |
| PCR: | polymerase chain reaction |
| PFA: | paraformaldehyde |
| PH: | pleckstrin homology |
| PLD: | phospholipase D |
| PLP: | myelin proteolipid protein |
| PVDF: | polyvinylidene difluoride |
| PX: | phox homology |
| RT-PCR: | reverse transcription-PCR |
| SDS: | sodium dodecyl sulfate |
| SDS-PAGE: | sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis |
| SPF: | specific pathogen free |
| siRNA: | small interfering RNA |
| tetO: | tetracycline operator |
| TBS: | Tris-buffered saline |
| T-TBS: | 0.1 % Tween 20/TBS |
| TEMED: | <i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine |

目次

略語表

| | |
|--|----|
| 緒言 | 1 |
| 第1節 第1節 実験材料及び実験方法 | 12 |
| 1-1 試薬類 | 12 |
| 1-2 実験動物 | 12 |
| 1-3 遺伝子組換え実験 | 13 |
| 1-4 灌流固定 | 13 |
| 1-5 パラフィン切片の作製 | 14 |
| 1-6 免疫組織化学的染色 | 14 |
| 1-7 Hematoxylin-Eosin (HE)染色 | 15 |
| 1-8 凍結切片の作製 | 15 |
| 1-9 蛍光免疫組織染色 | 15 |
| 1-10 リゾレシチン投与した坐骨神経 | 16 |
| 1-11 抗体 | 17 |
| 1-12 Iba1 陽性細胞輝度測定方法 | 18 |
| 1-13 CD68 陽性細胞輝度測定方法 | 18 |
| 1-14 GFAP 陽性像輝度測定方法 | 19 |
| 1-15 Olig2 陽性細胞数測定方法 | 19 |
| 1-16 組織ホモジネートの調整 | 19 |
| 1-17 Western blot 法 | 20 |
| 1-17-1 SDS-PAGE | 20 |
| 1-17-2 転写 | 21 |
| 1-17-3 免疫化学発光法によるタンパク質の検出 | 22 |
| 1-18 統計学的解析 | 22 |
| 1-19 クプリゾンモデルの作製 | 23 |
| 1-20 FluoroMyelin 染色 | 23 |
| 第2節 結果 | 24 |
| 2-1 PLD4 欠損マウスにおける発達期小脳の解析 | 24 |
| 2-1-1 PLD4 欠損マウスにおける発達期の脳構造 | 24 |
| 2-1-2 発達期の PLD4 欠損マウス小脳白質に局在する活性化ミクログリアの解析 | 26 |
| 2-1-3 発達期の PLD4 欠損マウス小脳白質に局在する活性化ミクログリアの表現型 | 30 |
| 2-1-4 発達期の PLD4 欠損マウス小脳プルキンエ細胞およびアストロサイトの解析 | 35 |
| 2-1-5 生後 10 日齢の PLD4 欠損マウス小脳におけるミクログリア, プルキンエ細胞およびアストロサイトの解析 | 39 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2-1-6 | 発達期マウス小脳におけるミクログリアの活性化とミelin形成との関連性の検討 | 41 |
| 2-1-7 | ミelin形成に対する PLD4 欠損ミクログリアによる影響 | 46 |
| 2-1-8 | PLD4 欠損マウス小脳におけるオリゴデント細胞の分化 | 50 |
| 2-2 | クプリゾン投与後の PLD4 欠損マウスの解析 | 55 |
| 2-2-1 | PLD4 欠損マウス成獣における脳梁の構造 | 55 |
| 2-2-2 | クプリゾン投与後の PLD4 欠損マウス脳梁におけるミelinの解析 | 55 |
| 2-2-3 | クプリゾン投与後の PLD4 欠損マウス脳梁における活性化ミクログリアの解析 | 55 |
| 第3節 | 考察 | 61 |
| | 総括 | 64 |
| | 謝辞 | 65 |
| | 参考文献 | 66 |

緒言

現在、ヒトの脳は、およそ 860 億個の神経細胞とほぼ同数のグリア系細胞により構成されていることが知られている¹⁾。グリアは日本語では膠 (glue: 接着剤として使われていたもの) を表すギリシア語の *glia* を語源として名づけられた細胞である。中枢神経のグリア細胞には、アストロサイト、オリゴデンドロサイトおよびミクログリアなどが存在する。グリア細胞はニューロンの軸索のような出力系をもたないため、情報伝達などの高次脳機能の発現に直接関与するとは考えられていなかった。このためグリア細胞は中枢組織構造の支持、栄養の供与および電氣的絶縁体として機能することで神経細胞の働きを補助すると長い間考えられてきた²⁾。しかしながら、近年、グリア細胞は中枢神経系において神経回路の調節に積極的に関わることにより、脳機能に対して重要な役割を果たすと考えられている^{3, 4)}。さらに、正常な脳機能の発現に加え、中枢神経系での様々な病態に関わることも示されている。このためグリア細胞の研究は、生命科学分野のみでなく、神経内科領域や精神科領域などの医学分野の研究においても注目されている⁵⁾。

グリア細胞の中で大部分を占めるアストロサイトは放射状の突起を持ち、中枢神経内微小環境の複雑な調整を行うことが知られている。その突起は血管や脳軟膜に広く接しており、毛細血管内皮細胞とともに血液脳関門を形成する⁶⁾。アストロサイトには様々な神経伝達物質に対する受容体、イオンチャネルおよびトランスポーターなどのタンパク質が存在しており、これによりグリア細胞内に電氣的あるいは生化学的な反応が誘発される²⁾。さらに、神経因性疼痛に対して脊髄神経結紮モデルマウスを用いた最近の研究では、神経因性疼痛の誘発にアストロサイトの活性化が関与することも示唆されている⁷⁾。

神経軸索にはミエリン (髄鞘) が一定の間隔で形成されている。中枢神経系において、オリゴデンドロサイトが突起を伸展して神経軸索を認識し何重にも巻き付け、細胞質成分を押し出すことによって密な多重膜構造を形成し、跳躍伝導を発生させる²⁾。一般に中枢神経系ミエリンを構成する主要なタンパク質の種類は比較的少数で、低分子量のものが多く、膜表在性タンパク質には *myelin basic protein (MBP)*、膜貫通タンパク質では *myelin associated glycoprotein (MAG)*、*myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG)*、*myelin proteolipid protein (PLP)* などが知られている。中枢神経系の自己免疫性脱髄疾患である多発性硬化症 (*multiple sclerosis: MS*) の疾患動物モデル、実験的アレルギー性脳脊髄炎 (*EAE*) では *MBP*、*MOG* あるいは *PLP* を抗原とすることで再発寛解型や慢性進行型の *EAE* を誘発させることが可能となっている。この様に *MS* の多様な症状経過に

即したモデルマウスが作成され、病態解析および治療法の開発が進められている (8, 9, 10)。

ニューロン及び他のグリア細胞は神経外胚葉由来の神経幹細胞から発生する。一方、ミクログリアは、単球やマクロファージと同様に中胚葉由来で胎生期卵黄嚢由来の造血細胞を起源にすると考えられている。ミクログリアは脳の免疫担当細胞として中枢神経に侵入した細菌などに対する殺菌・細胞傷害性を示し、また損傷を受けた組織片などの除去を行うと考えられている。通常は静止期ミクログリアあるいは形態的特徴からラミファイドミクログリアと呼ばれる。このミクログリアは分岐した細く長い突起を有し周囲の環境を監視するようにその突起を動かしている¹¹⁾。脳組織で発生した異常を感知し活性化すると突起を退縮し、細胞体が大きく丸くなり形態が劇的に変化する。活性化されたミクログリアは分裂・増殖するが、さらに遊走性を獲得してアメボイドミクログリアと呼ばれる状態になると、病変部に集積し貪食作用を發揮する (Fig.1)。哺乳類の発達過程の小脳では、過剰に作られたプルキンエ細胞軸索の刈り込みなどが行われるが、この過程に活性化ミクログリアが関与する¹²⁾。ミクログリアの活性化はアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患にも関連しており、新たな治療のターゲットとしても注目されている¹³⁾。更に自閉症のヒトではミクログリアが過剰に働いていることが分かっている¹⁴⁾。このように活性化ミクログリアは中枢神経系の発達過程や病態において多彩な性質を示し、多くの機能を担っている。さらにミクログリアは諸刃の剣とも呼ばれ、その活性化に伴い炎症性のサイトカインなどの神経傷害因子を産生する場合と神経栄養因子や神経保護因子を産生する場合があります。周囲の状況を検知しながら機能している¹⁵⁾。したがって、正常時および病態時におけるミクログリアの性質およびその役割の変化を把握することが、非常に重要だと考えられる。

Phospholipase D (PLD) は細胞膜構成主要リン脂質であるホスファチジルコリンをホスファチジン酸とコリンに加水分解する酵素である。哺乳類の PLD ファミリーは分子の特徴から大きく 2 つのグループに分けられる。古典的なタイプの PLD1 および PLD2, 分子構造の類似性から新しくファミリーに加えられた膜貫通タイプの PLD3, PLD4, PLD5 および PLD6 である (Fig.2)。PLD1 および PLD2 は Ras/MAPK カスケードのシグナルに関連する phox homology (PX) domain, PLD のパートナー分子として働く dynamin と結合する pleckstrin homology (PH) domain を有し、酵素活性に必要な HKD モチーフ [His-X-Lys-(X)₄-Asp-(X)₆] が 2 つある¹⁶⁾。PLD1 および PLD2 は、白血球の走化性や貪食作用などに関与することが示唆されている¹⁷⁾。

膜貫通タイプ PLD の中で PLD3 は PLD4 と最もホモロジーが高く、主に終脳のニューロン細胞膜に発現している¹⁸⁾。近年、PLD3 の変異が遅発性アルツハイマー病の危険因子になることが示唆されている¹⁹⁾。PLD6 は mitoPLD として知

られている酵素タンパク質で、ミトコンドリア膜に存在する脂質カルジオリピンを加水分解し、シグナル分子であるホスファチジン酸を産生する²⁰⁾。さらにミトコンドリアの融合過程および精母細胞発達過程に生じるミトコンドリアの変化に働いていることが知られている²¹⁾。

PLD4 は、当研究室と理化学研究所脳センターの古市貞一博士（現在は東京理科大学 教授）のグループとの共同研究により、ミクログリア以外の他のグリア系細胞およびニューロンには発現が認められず、活性化したミクログリアに発現増加するタンパク質として同定された分子である。PLD4 は他の PLD とは異なり、小脳では生後 3 日目から発現レベルが上昇し始め、生後 7 日目でその発現量が最大となり、その後は漸減し、生後 21 日目には消失する (Fig.3; Yoshikawa et al., 2010)。特に、発達過程のマウス小脳白質に存在する活性化ミクログリアに発現しており、また中枢神経の脱髄時に増加する活性化ミクログリアにもその存在が認められている²²⁾。脳組織以外では、脾臓、胸腺および肝臓などの細網内皮系組織にも発現している (Fig.3)。PLD4 は 503 のアミノ酸残基から構成され、N 末端側に 1 つの膜貫通 domain を有し、C 末端側には 2 つの HKD モチーフがある (Fig.2; Yoshikawa et al., 2010)。古典的な PLD ファミリーがリン脂質を加水分解する酵素活性を示すのに不可欠な領域である HKD モチーフを持っているにも関わらず PLD4 は PLD としての酵素活性を示さないため、その機能は未だ不明である。これまでに lipopolysaccharide (LPS) により活性化された培養系のミクログリアでは、発現量の増加した PLD4 はまず核質部に存在し、bioparticle を貪食させると食胞に集積することが明らかになっている²²⁾。最近、比較的日本人に多い自己免疫性疾患である全身性強皮症の罹患率の指標として PLD4 遺伝子が報告された²³⁾。ウシでは PLD4 遺伝子のナンセンス変異により、亜鉛欠乏症に似た症状を示す²⁴⁾ など免疫系が関与する病態との関連も報告されている。しかしながら、発達期の脳の白質に特徴的な発現様式を示す PLD4 の機能および脳の発達過程における役割については明らかにされていない。

そこで、生体内における PLD4 の機能を明らかにするために、当研究室で PLD4 欠損マウスが作製された。PLD4 は、マウス胎仔の *in situ* hybridization 法による mRNA 発現データベースで胎生 14.5 日目から胸腺に強く発現することが示されている [genepaint (<http://www.genepaint.org/>), EH4997, Embryo C4027 3 4A]。そのため、PLD4 欠損マウスでは胎生致死に至る可能性も考えられたことからコンディショナルノックアウトマウスとして作製された。コンディショナルノックアウトマウスの作製には Flexible Accelerated STOP Tetracycline Operator (tetO)-knockin (FAST) system²⁵⁾ (Fig.4) のターゲティングベクターを用いた²⁶⁾。このマウスでは PLD4 遺伝子開始コドンの前に STOP-tetO cassette が挿入されているため、ホモ接合体マウス (Ho) では、PLD4 を発現しない (Fig.5)。一方、Cre リコンビナーゼを発現するマウスとの掛け合わせにより STOP 配列の除去

が可能であり，正常マウスに戻すことができる．さらにテトラサイクリン制御性トランス活性化因子の存在下で，PLD4 を強制的に発現させることも可能である．現在系統を維持している PLD4 欠損マウスでは PLD4 は完全に欠損しているが胎生致死は生じず，メンデルの法則に従って生まれることが確認されている．また体重増加など以前に認められた表現型の変化も認められていない．しかし発達段階や病的状態で出現するミクログリアにおいて PLD4 欠損がどのような影響を与えるかは明らかではない．そこで本研究では PLD4 欠損マウスの小脳発達時および白質病変における変化を解析し PLD4 の役割を明らかにすることを目的とした．

小脳は橋と延髄の背側にあり小脳皮質と小脳白質から成る．成熟した小脳皮質は3層から構成されており，外側から分子層，プルキンエ細胞層および顆粒層が存在し，その内側に白質が位置している (Fig.6)．プルキンエ細胞層にはほぼ等間隔でプルキンエ細胞の大きな細胞体が一列に並んでおり，分子層に樹状突起を伸展している．分子層には顆粒細胞からの軸索線維が伸び，プルキンエ細胞の樹状突起とシナプスを形成している．プルキンエ細胞の近傍にはバークマングリアと呼ばれるアストロサイトの一種が存在して，小脳表面に向けて放射状に数本の突起を伸ばし，プルキンエ細胞のシナプス活動に関与している．小脳白質には入力線維として顆粒細胞へ伸びる苔状線維 (mossy fiber) およびプルキンエ細胞に伸びる登上線維 (climbing fiber) がある．小脳唯一の出力系線維であるプルキンエ細胞の軸索もある．これら神経線維はオリゴデンドロサイトで形成される髄鞘 (ミエリン) で覆われている．小脳深部にはプルキンエ細胞の軸索からの信号により調節される神経細胞が集合している小脳核 (cerebellar nucleus) が存在する．マウス小脳は生後に発達し，約 20 日で成熟した組織として完成する．プルキンエ細胞は脳室帯から移動し，顆粒細胞は表層の外顆粒層からプルキンエ細胞層を越えて内顆粒層に移動することで成熟する．小脳の成熟に伴い，白質では生後 5 日目頃からオリゴデンドロサイトがミエリンの形成をはじめ，この時期の白質には活性化されたミクログリアおよびアストロサイトが存在する．これらの知見から，活性化されたミクログリアに発現増加する PLD4 は，小脳白質形成に関与する可能性が考えられる^{27, 28, 29)}．

多発性硬化症は中枢神経脱髄疾患であり，寛解と増悪を繰り返しながら多様な中枢神経障害を示すことが特徴となる疾患である^{30,31)}．この多発性硬化症では，脱髄によって，オリゴデンドロサイトの変性および軸索の障害を病巣部に生じることが知られている^{32, 33)}．本研究室のこれまでの解析により，PLD4 は正常発達時だけでなく，脱髄病態時の活性化ミクログリアでもその発現レベルの上昇が示されている²²⁾．そこで本研究では脱髄病態および髄鞘再生過程でのミクログリアに着目した．脱髄性疾患モデル動物には，クプリゾンモデルを用いた³⁴⁾．クプリゾン (bis-cyclohexanone-oxaldihydrazone) は銅キレート剤の一種であり，投

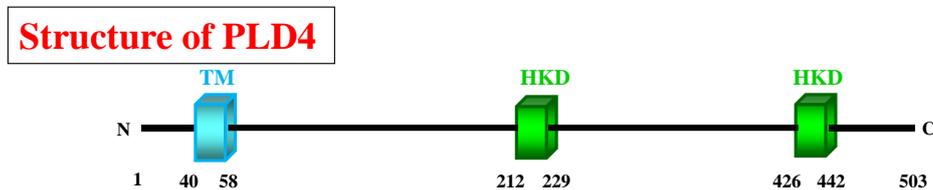
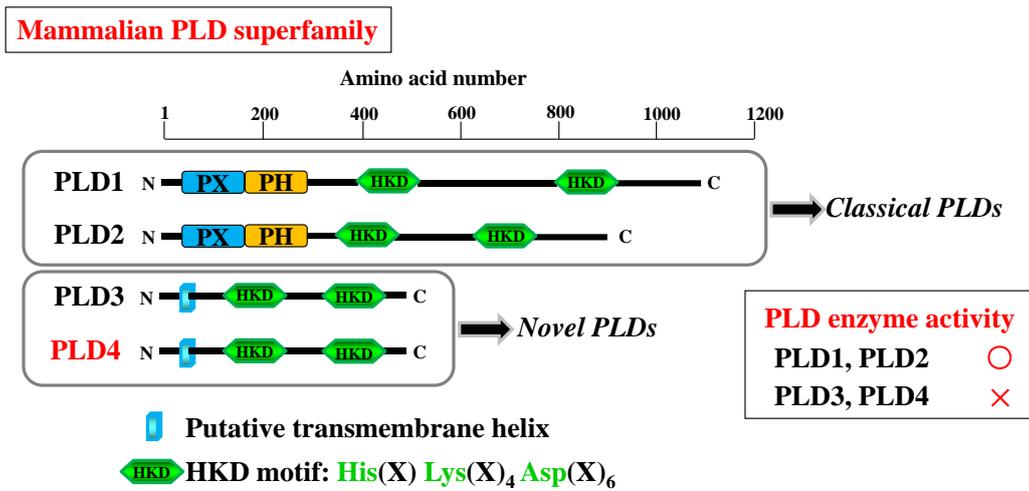
与されたマウスでは数週間以内に脳の白質，特に脳梁で脱髄を生じる^{35, 36)}。この病態モデルを利用することで脱髄病態およびミエリン再生過程におけるミクログリアの働きを調べることが可能となる。

上述したように，ミクログリアは正常な脳形成に関与するだけでなく，炎症，神経変性疾患あるいは発達障害などの様々な脳の病態の発症および進展にも関与するため，この分子機序を明らかにすることが重要である。本研究では，PLD4に着目し，その脳組織での機能を明らかにすることを目的とし，PLD4欠損マウスの組織学的な解析を行った。まず，脳の生後発達段階におけるPLD4の役割を調べるために，PLD4欠損マウスの小脳を中心に免疫組織染色法を用いて解析した。小脳は層構造およびその回路が大腦よりも単純であるため，グリア細胞の変化などが見やすいという利点がある。そこでPLD4の発現レベルが高い状態にある発達段階の小脳を中心に各種抗体を用いた免疫組織染色を行い，PLD4欠損マウスにおける変化を野生型との比較により *in vivo* 解析した。次に，主に脱髄時に活性化されるミクログリアにおけるPLD4の役割について調べるために，PLD4欠損マウスと野生型マウスに0.2% クプリゾン含有飼料を摂取させ，脱髄モデルマウスを作製した。脱髄が最も進行する5週後の凍結切片を用いて各種抗体による免疫組織染色を行い，野生型とPLD4欠損マウスにおけるミクログリアの変化を比較した。



Fig. 1 The three states of microglia.
(modified from Neuroglia pp.86, 1995)

Microglia are classified into three states. The ramified microglia has small cell body with long branched processes in resting state. The activated microglia with thick processes has proliferative capacity. The round amoeboid microglia is in phagocytotic state.



(modified from Yoshikawa et al., 2010)

Fig. 2 Structural comparisons of PLD superfamily members.

Protein structures and domains of mouse PLD family members (PLDs); PLD1, PLD2, PLD3, and PLD4. Top line represents amino acid position. Mammalian PLDs are divided into two types; the classical type including PLD1 and PLD2 and the novel type including PLD3 and PLD4. PLD4 is a protein composed of 503 amino acids and has a transmembrane domain and two HKD motifs but does not have either a PX or PH domain. The HKD motif is necessary for the enzymatic activity of PLD1 and PLD2 but PLD4 does not exhibit phosphatidyl choline-specific phospholipase activity.

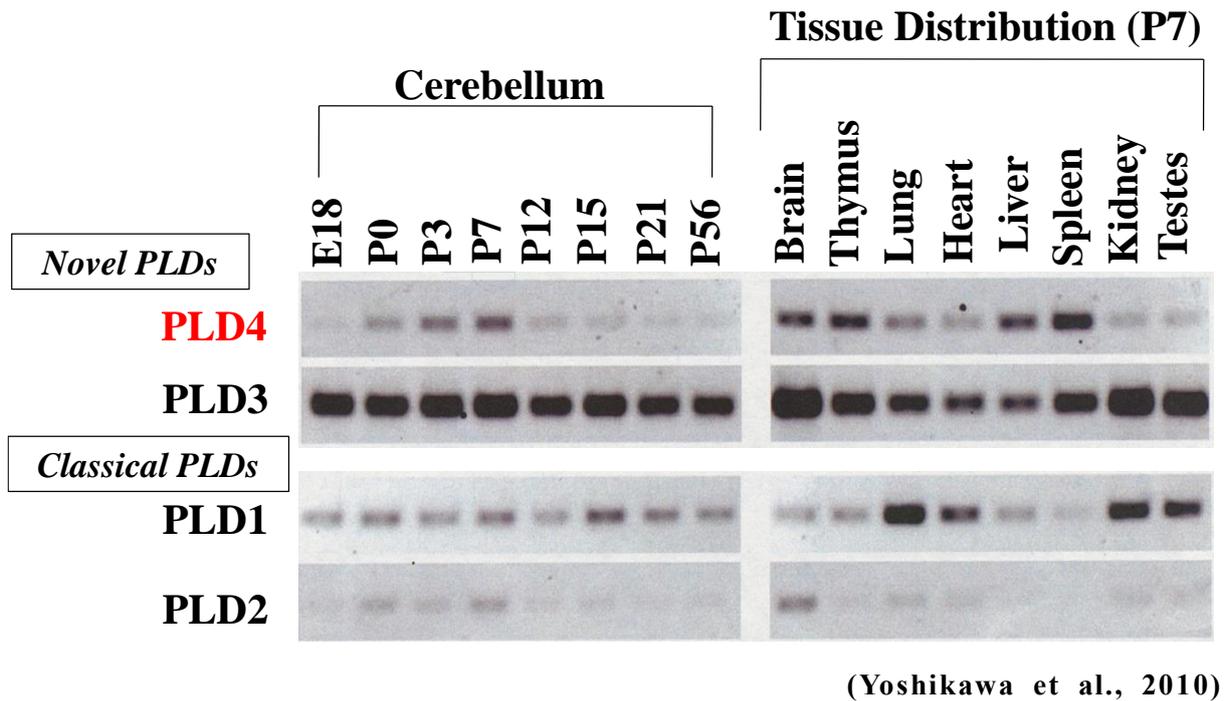


Fig. 3 Developmental change in cerebellum and tissue distribution of PLD family mRNA.

Semi-quantitative real time PCR (qRT-PCR) analysis of PLD family mRNA in cerebellum at embryonic day18 (left), postnatal day (P) 0, P3, P7, P12, P15, P21, and P56. The expression of PLD4 was detected gradually from P0, peaked at P7 and rapidly decreased to adult level at P21 in mouse cerebellum. Analysis of PLD family mRNA in various tissues at P7 (right). PLD4 was detected in the thymus, liver, and spleen.

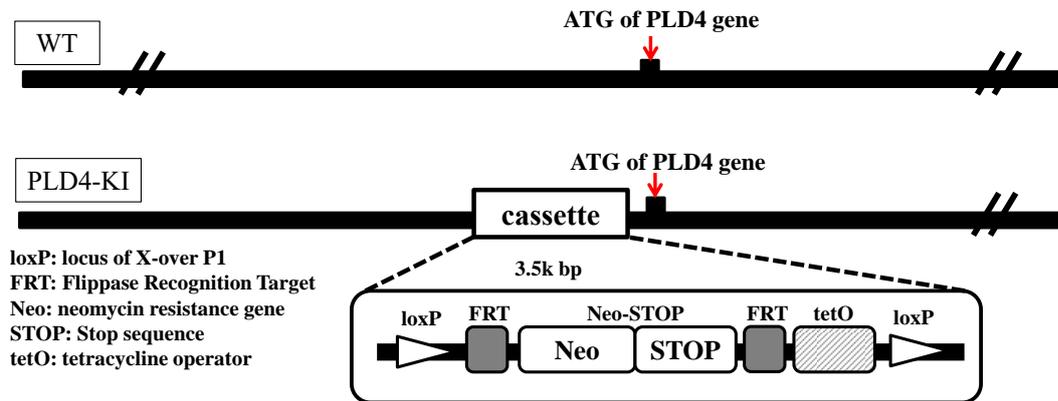


Fig. 4 Genome structure of the *PLD4* gene in PLD4 knock-in (PLD4-deficient) mice.

The PLD4 knock-in (PLD4-deficient) mice (PLD4-KI) were generated by the homologous recombination using the PLD4-targeting vector containing a STOP-tetO cassette inserted in front of the start codon, The STOP-tetO cassette contained sequences for; loxP, FRT, a neomycin resistant gene, STOP, FRT, tetO, and loxP in order. WT, wild type.

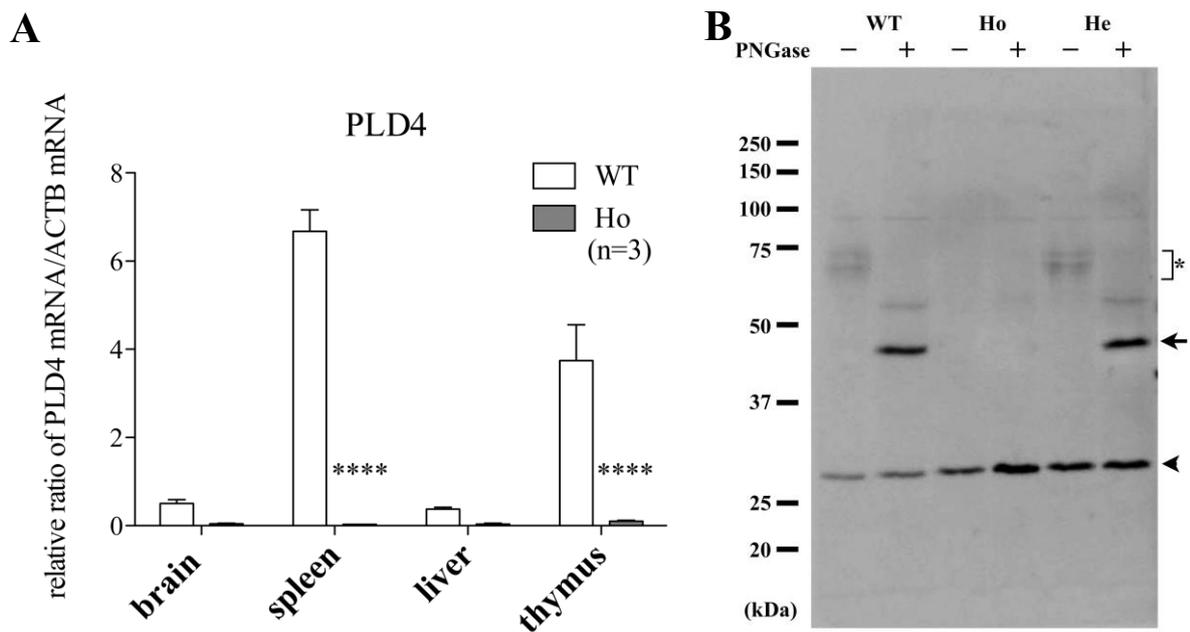


Fig. 5 Elimination of PLD4 mRNA and protein in PLD4-deficient mice.

A, Expression of PLD4 mRNA by qRT-PCR in brain, spleen, liver and thymus of wild type (WT) and PLD4-deficient (Ho) mice. Graphs show the relative ratio of the level of PLD4 and β -actin mRNA from samples run in triplicate from 3 independent experiments. In wild type, PLD4 mRNA was expressed in brain and various reticuloendothelial tissues, including the spleen, liver and thymus. In PLD4-deficient mice, PLD4 mRNA was completely eliminated in these tissues. B, PLD4 protein levels in adult wild type (WT), homozygote (Ho), and heterozygote (He) mice. Spleen homogenates (10 μ g) with or without deglycosylation were separated by 10.5% sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analysis was performed using an anti-PLD4 antibody. Since PLD4 has multiple glycosylation sites, various PLD4-related bands (70~75 kDa; indicated by *) were shown in non-treated samples. The arrow indicates deglycosylated PLD4 (~45 kDa) by PNGase F (peptide-N-glycosidase F) treatment. The arrowhead indicates an unrelated protein product detected by the anti-PLD4 antibody. Note that this protein was also detected in PLD4-deficient spleen samples while PLD4 bands with or without sugars were completely eliminated.

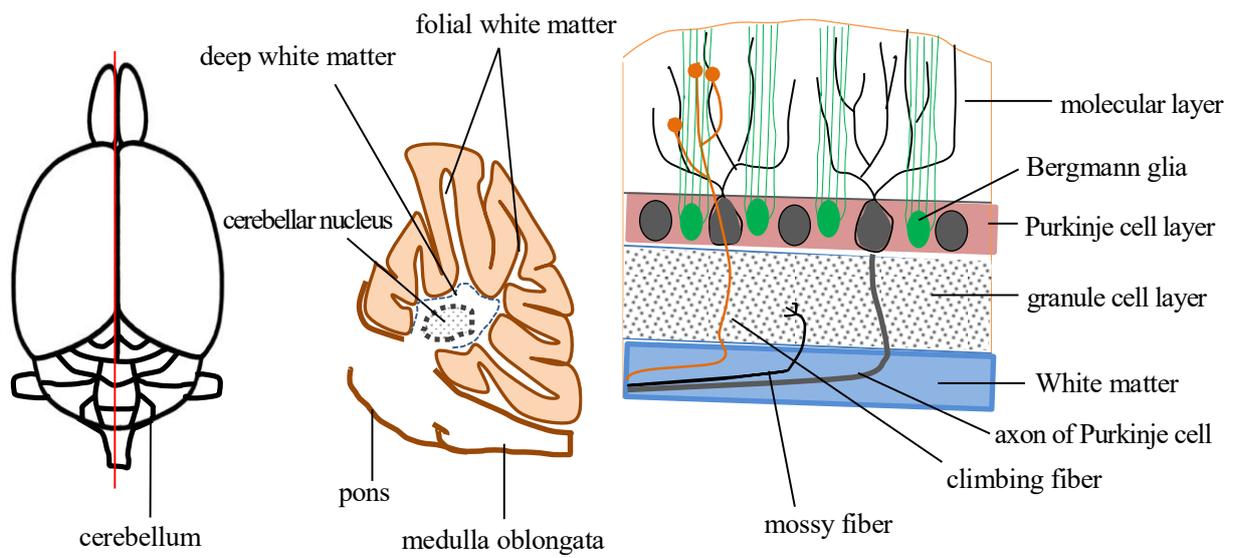


Fig. 6 The anatomy of the cerebellum

Schematic diagrams of overview of brain (A), median sagittal section of cerebellum (B), and three layers of cerebellar cortex (C) were depicted.

第 1 節 実験材料及び実験方法

1-1 試薬類

特に明記していない一般試薬は和光純薬，関東化学およびシグマ-アルドリッチジャパンの特級を使用した．各種溶液の調製には超純水 (MilliQ 水; Millipore) を用いた．

1-2 実験動物

系統維持用の C57BL/6N マウスは，日本エスエルシーから購入した．当研究室で作製した PLD4 KI マウス²⁶⁾ に関しては交配により生まれた仔の遺伝子型を polymerase chain reaction (PCR) 法で診断し，野生型 (WT) およびホモ接合体 (Ho, PLD4 欠損マウス) を実験に使用し，ヘテロ接合体 (He) をマウスコロニーの維持に用いた．

DNA の抽出は，アルカリ溶解法により行った．生体試料 (生後 4 週齢マウスの尾，2 mm 程度) に 50 mM NaOH を 180 μ l 加え混合し，95°C，10 min インキュベートした．その後，1 M Tris-HCl (pH 8.0) を 20 μ l 加え混合し，12000 rpm，5 min で遠心分離した (MX-200, TOMY)．上清を DNA 抽出液として用い，下記の条件で PCR を行った．

<診断用プライマー>

PLD4-upstream: 5'-TGGAAGCATTCTAGGGCTGTGAA-3'

tetO-upstream: 5'-AGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGT-3'

PLD4-downstream: 5'-AAGTGACCGAGGCAGCTTCAGAAA-3'

<PCR 条件>

| | | | | | |
|-------------------------|-------------|---|------|----------|------------|
| KOD 2×PCR buffer | 7.5 μ l | } | 95°C | 2 min | } 30 cycle |
| dNTP | 3 μ l | | 98°C | 10 sec | |
| primer up (upstream) | 0.3 μ l | | 60°C | 30 sec | |
| primer low (downstream) | 0.3 μ l | | 68°C | 90 sec | |
| MilliQ | 2.6 μ l | | 4°C | ∞ | |
| KOD Fxneo (TOYOBO) | 0.3 μ l | | | | |
| DNA | 1 μ l | | | | |
| 合計 | 15 μ l | | | | |

PCR 後の溶液は、1/5 量の 6×loading buffer を添加し 1.2% アガロースゲルにて 135V, 30 分間電気泳動を行い (i-MyRun.NC, コスモ・バイオ), エチジウムブロマイド染色を行った。野生型 では PLD4-upstream と PLD4-downstream のプライマーから 1.5-kbp に, PLD4 欠損マウス では tetO-upstream と PLD4-downstream のプライマーから 850-bp に PCR 産物としてバンドが検出される。

本実験で使用された実験動物は、東京薬科大学実験動物施設内の specific pathogen free (SPF) 区域において恒温 (23±1°C), 恒湿 (55±5%), 12 時間周期の定時照明下で飼料と水を自由に与えて飼育された。動物の取り扱いに関しては、東京薬科大学動物実験規程に基づいて行われた。本実験計画は東京薬科大学実験動物委員会で審査され、学長からの承認を受けた後に実施された (P12-23, P13-31, P14-09, P15-26, P15-27)。

1-3 遺伝子組換え実験

本研究計画は東京薬科大学組換え DNA 実験安全委員会で審査され、学長からの承認を受けた (Y2012-12, Y2013-9, Y2014-23, Y2015-23)。本実験は「東京薬科大学組換え DNA 実験安全管理規則」に則って行われた。

1-4 灌流固定

生後 0, 3, 5, 7 および 10 日目 (P5, 7, および P10)のマウスをジエチルエーテルによって吸入麻酔し、仰臥位で保定した後に開胸した。右心耳を切開し、先端を鈍化した 26G の針を心尖部より左心室内に刺入後、最終濃度が 0.1 %になるようにヘパリン (持田製薬) を加えた室温の生理食塩水 (大塚製薬) を体重と同量灌流し、血液を洗い流した。引き続き、氷上にて冷却した体重 2 倍量の 4%

paraformaldehyde (PFA)/0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4) で灌流固定し，脳を摘出した．摘出された脳組織を 4% PFA/PB で 24 時間浸漬固定した．

1-5 パラフィン切片の作製

1-4 で浸漬固定した組織サンプルを Tissue-Tek VIP (サクラファインテックジャパン) を用いパラフィン包埋した．

室温下，マイクローム (大和光機工業) で厚さ 6 μm に組織を薄切した．その切片を MAS コートスライドガラスあるいは FRONTIER コートスライドガラス (松浪硝子工業) にのせ，37°C に設定した伸展機 (大和光機工業) で 1 晩乾燥させた後，組織解析に使用した．

1-6 免疫組織化学的染色

1-5 で作製したパラフィン切片を室温下，脱パラフィン処理し (キシレン 15 分間 3 回)，続いて親水性処理 (100% エタノール 3 分 3 回，90%，80%，70% エタノール各 3 分 1 回) を行った．続いて抗原賦活化のために 0.1 M クエン酸溶液に浸漬し，電子レンジで沸騰させた後，容器ごと 40 分間放置し，室温に戻した．その後，phosphate buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 81 mM Na_2HPO_4 , 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , pH7.4) にて 5 分間洗浄後，3% H_2O_2 中で 10 分間反応させることにより内因性のペルオキシダーゼを失活させ，PBS で 5 分間洗浄した．その後，Blocking 溶液 [10% normal donkey serum (Dako), 0.3% TritonX-100, PBS] で 1 時間処理することにより抗体の非選択的吸着を防止するための blocking を行った．Blocking 溶液で希釈した一次抗体を 4°C で一晩反応させた．その後，室温にて PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄し，ビオチン化二次抗体を 30 分間反応させ，ABC-kit (Vector Laboratory) の ABC 混合液で 30 分間処理した．PBS で 3 回洗浄した後，3,3-diaminobenzidine (Dako) \cdot H_2O_2 反応液を用いて顕微鏡下で随時観察しながら発色させ，水道水で洗浄することで反応を停止させた．その後，70%，80%，90%，95%のエタノールに各 1 分間ずつ，さらに 100% エタノールに 1 分間 3 回浸し，脱水処理を行い，MGK-S (松浪硝子工業) を用いてカバーガラスで封入した．使用した抗体を 1-11 に示す．画像をデジタルカメラ付き光学顕微鏡で撮影した (Axio Imager M1 with AxioCam HRc; Carl Zeiss あるいは BZ-X700; キーエンス)．

1-7 Hematoxylin-Eosin (HE)染色

1-5 で作製したパラフィン切片を脱パラフィン処理 (キシレン 15 分間 3 回)後に, 親水性処理 (100% エタノール 3 分 3 回, 90%, 80%, 70% エタノールに各 3 分 1 回) を行い, hematoxylin (Mayer's hematoxylin solution; Sigma) に 10 分間浸した後, 流水で 10 分間洗浄した. さらに純水を満たした染色バットで軽く洗浄した後, Eosin (1% eosin Y solution; Sigma) に 1 分間浸し, その後純水にて 1 分間洗浄を行い, 脱水および透徹し, MGK-S で封入した. 画像はデジタルカメラ付き光学顕微鏡で撮影した (Axio Imager M1 with AxioCam HRc あるいは BZ-X700).

1-8 凍結切片の作製

1-4 で作製した浸漬固定後の組織を PBS にて 5 分間 3 回洗浄し, 4°C の 10% sucrose/PBS, 15% sucrose/PBS, 20% sucrose/PBS に一晩ずつ浸し, Tissue-Tek O.C.T. compound (サクラファインテックジャパン) に包埋し, ドライアイスで凍結させた. クライオスタット (LEICA CM 1850; Leica) で 10 μm に薄切した組織切片を MAS コートあるいは FRONTIER コートしたスライドガラス上で風乾させた後, 使用時まで -40°C で保存した.

1-9 蛍光免疫組織染色

凍結切片は PBS 中で O.C.T. Compound を除去した後, Blocking 溶液 [10% normal goat serum (Dako あるいは和光純薬), 0.3% Triton X-100, PBS または 10% normal donkey serum, 0.3 % Triton X-100, PBS] を用い室温で 1 時間処理を行った. 続いてブロッキング液で希釈した一次抗体を 4°C で一晩反応させた. その後, PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄し, PBS で希釈した二次抗体と 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) の混合液を暗所にて室温で 1 時間反応させた. PBS で洗浄後, VectaShield (VECTOR)とマニユキアを用いてカバーガラスで封入した. 使用した抗体を 1-11 に示す. 画像は共焦点レーザー顕微鏡で撮影した (FV1000D IX81 laser scanning microscope; Olympus).

1-10 リゾレシチン投与した坐骨神経

抗 arginase 1 抗体により小脳を免疫染色する際のポジティブコントロールとして lysolecithin 投与後 ICR マウス坐骨神経の切片を使用した。用いた切片の作製法は以下の通りである。

8 週齢雄の ICR マウスにソムノペンチル注射液 (共立製薬) を生理食塩水で 10 倍に希釈した溶液を体重あたり 10 ml/kg になるように腹腔内投与して麻酔した。1% lysolecithin [L- α -Lysophosphatidylcholine (Sigma)]/Locke's solution [154 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 5.6 mM KCl/10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine sulfonic acid (HEPES) buffer, pH 7.4] を 0.05% Fast Green (Sigma) で着色した溶液 1 μ l をマイクロシリンジ (HAMILTON) を用い実体顕微鏡 (Carl Zeiss) 下で ICR マウスの左坐骨神経内に投与した。その後、切開部の皮膚をアロンアルファ (コニシ) で接着し、14 日後に 1-4 と同様の方法で坐骨神経を摘出し、1-8 と同様の方法で凍結切片を作製した。

1-11 抗体

免疫組織染色で使用した抗体は以下の通りである.カッコ内には希釈倍率を示す.

一次抗体

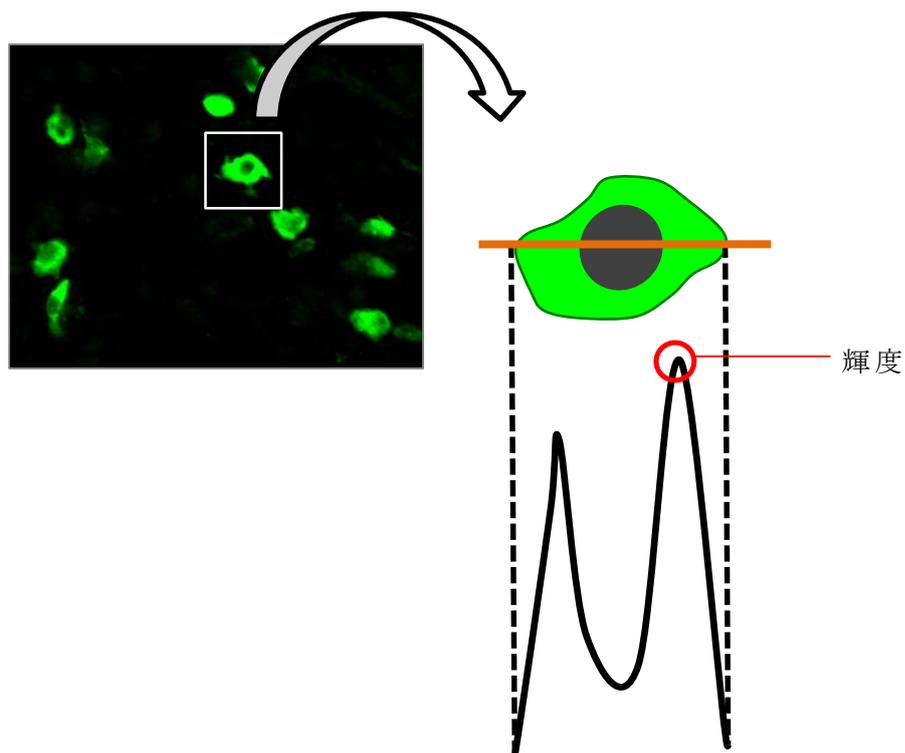
| | |
|--|---------|
| rabbit polyclonal anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) antibody (和光純薬) | (1:800) |
| rat monoclonal anti-myelin basic protein (MBP) antibody (Chemicon) | (1:100) |
| rabbit polyclonal anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody (DAKO) | (1:10) |
| rabbit polyclonal anti-calbindin D-28K antibody (Chemicon) | (1:200) |
| rat monoclonal anti-cluster of differentiation 68 (CD68) antibody (Abcam) | (1:100) |
| goat polyclonal anti-arginase 1 antibody (Santa Cruz Biotechnology) | (1:50) |
| rabbit polyclonal anti-NG2 proteoglycan antibody (Chemicon) | (1:500) |
| rabbit polyclonal anti-Olig2 antibody (IBL) | (1:200) |
| mouse monoclonal anti-adenomatous polyposis coli (APC/CC1) antibody (Merck Millipore) | (1:100) |

二次抗体

| | |
|---|----------|
| Biotin-SP-conjugated donkey anti-mouse IgG antibody (Jackson) | (1:250) |
| Alexa Fluor 488 or 594 goat anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen) | (1:2000) |
| Alexa Fluor 488 rat anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen) | (1:2000) |
| Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen) | (1:2000) |
| Alexa Fluor 594 donkey anti-goat IgG antibody (Invitrogen) | (1:2000) |

1-12 Iba1 陽性細胞輝度測定方法

画像解析ソフト(Image J) を用い, Iba1 陽性シグナル強度を測定した. 視野当たり存在する全ての陽性細胞のシグナル強度を各細胞の長軸を通るようにプロットし (下図), Plot Profile に示された最大値を細胞における輝度とした.

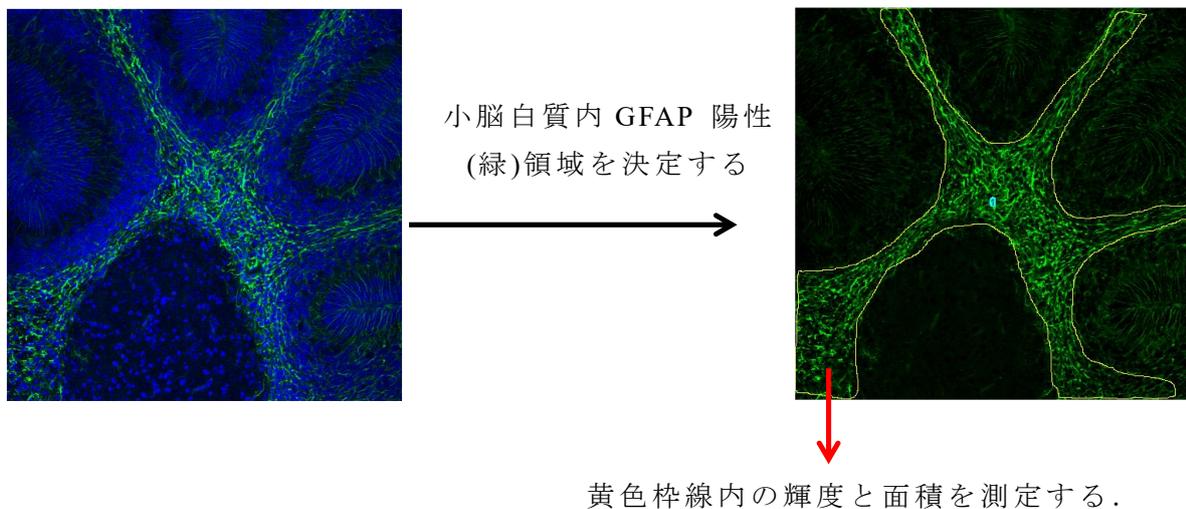


1-13 CD68 陽性細胞輝度測定方法

1-1-12 と同様の方法で行った.

1-14 GFAP 陽性像輝度測定方法

Image J を用い，GFAP 陽性像の輝度を測定するために視野内の陽性細胞が集まる白質領域（緑）を DAPI 染色像（青）をもとに決定し（下図），その面積と領域中の蛍光輝度を測定した．輝度を面積で割り，単位面積（ $1 \mu\text{m}^2$ ）あたりの輝度を GFAP 蛍光強度とした．



1-15 Olig2 陽性細胞数測定方法

観察視野内の小脳深部白質の Olig2 陽性細胞数を計測し，DAPI 陽性の全細胞数に対する割合を算出した．

1-16 組織ホモジネートの調製

生後 7 日目の野生型と PLD4 欠損マウスをジエチルエーテルによって吸入麻酔し断頭後，脳を摘出し，そこから小脳のみを採取した．小脳重量当たり 9 倍量の氷冷した Homogenization buffer [0.32 M sucrose, 0.75 μM aprotinin, 1 μM leupeptin, 1 μM pepstatin A, 0.4 μM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol (DTT)] を加え，ポッター型テフロンーガラスホモジナイザー (Digital Homogenizer, Iuchi) を用いて氷冷下でホモジナイズした．その後，冷却

遠心分離機 (MX-200, TOMY) にて遠心分離 (1000 ×g, 10 min, 4°C) し、核を除いた上清をホモジネートとした。得られた組織ホモジネートは bovine serum albumin (BSA) を基準とした BCA 法 (PIERCE あるいはタカラバイオ) でタンパク質濃度を定量した後に分注し、-80°C にて保存した。

1-17 Western blot 法

1-17-1 SDS-PAGE

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) は、Laemmli の方法に準じ、12% ポリアクリルアミド分離ゲルと 4% ポリアクリルアミド濃縮ゲルを用いて行った。それぞれのゲルの組成を Table 1 に示す。予め調製した 12% ポリアクリルアミドゲル溶液をゲルカセットの下端から 5.5 cm まで注いだ。その後、水飽和ブタノール溶液を重層し、分離ゲルを重合させた。分離ゲルが固まった後、水飽和ブタノールを除去し MilliQ 水で分離ゲル上部を洗浄した。次に、調整した 4% ポリアクリルアミド濃縮ゲル溶液を分離ゲルの上に注ぎ、プラスチックコームを挿入して重合させた。出来上がったポリアクリルアミドゲルをミニプロティアン 3 (BIO-RAD) にセットし、泳動槽には Electrophoresis buffer (25 mM Tris-base, 192 mM glycine, 0.1% SDS) を満たした。

タンパク質溶液には、等量の SDS sample buffer [0.5 M Tris-HCl, pH 6.0, 20% glycerol, 4% SDS, 0.2 M DTT, bromophenol blue (BPB)] を加えて懸濁した後、30 分間室温で静置し、タンパク質を SDS 化した。Electrophoresis buffer で洗浄したポリアクリルアミドゲルのウェルに SDS 化サンプルをのせ、200V の定電圧下 (PowerStation 1000XP, アトー) で電気泳動を行い、タンパク質を分離した。

Table.1 Recipes for polyacrylamide gels for SDS-PAGE

| | |
|---|----------|
| Separating gel | 12.0% |
| 4 × Tris-HCl, pH8.8 | 1.5 ml |
| 30% acrylamide/ 0.8% bisacrylamide mixture | 2.4 ml |
| 10% SDS | 0.06 ml |
| MilliQ 水 | 2.04 ml |
| TEMED | 0.004 ml |
| 10% APS | 0.02 ml |

| | |
|---|-----------|
| Stacking gel | 4.0% |
| 4 × Tris-HCl, pH6.8 | 0.9 ml |
| 30% acrylamide/ 0.8% bisacrylamide mixture | 0.48 ml |
| 10% SDS | 0.036 ml |
| MilliQ 水 | 2.16 ml |
| TEMED | 0.0036 ml |
| 10% APS | 0.018 ml |

APS: ammonium persulfate

TEMED: *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine

1-17-2 転写

1-17-1 で電気泳動が終了したゲル, メタノールで親水化処理した polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (9 × 6 cm) (Amersham GE Healthcare あるいは Merck Millipore), ろ紙 (10 × 7 cm) (Whatman 3M) 4 枚, ファイバーパッド 2 枚を Transfer buffer (25 mM Tris-base, 192 mM glycine, 10% methanol) 中で平衡化した. その後, マイナス側からファイバーパッド, ろ紙 2 枚, ゲル, PVDF 膜, ろ紙 2 枚, ファイバーパッドの順に空気が入らないように重ね合わせ, ゲルホルダーカセットに挟み込んだ. Transfer buffer で満たした ミニトランスブロットセル (BIO-RAD) にカセットをセットし, Transfer buffer を加え, 30V の定電圧下, 4°C, 16 時間の転写を行った.

1-17-3 免疫化学発光法によるタンパク質の検出

1-17-2 でタンパク質が転写された PVDF 膜を 0.1% Tween 20/Tris-buffered saline (T-TBS) (0.1% Tween 20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) で洗浄した後, Blocking 溶液 (0.3% skim milk (Becton Dickinson), T-TBS) 中にて室温で 1 時間処理した. その後, Blocking 溶液で希釈した一次抗体と PVDF 膜を室温にて 60 分間反応させた. 一次抗体反応後, PVDF 膜を T-TBS で 5 分間 3 回洗浄した. 更にペルオキシダーゼ標識二次抗体を T-TBS で希釈し, 洗浄後の PVDF 膜にのせ, 室温にて 60 分間反応させた後, T-TBS で 5 分間 3 回洗浄した. その後, PVDF 膜に ECL 溶液 (Amersham, GE Healthcare) を 1 cm^2 あたり 0.05 ml のせて 1 分間 反応させ, ルミノイメーリアナライザ LAS-3000 (富士フィルム) を用いて発光シグナルを検出した. 画像の解析は ImageGauge Ver. 4.23 にて行った. MBP 遺伝子は 1 つの転写産物から選択的スプライシングにより異なる分子量のタンパク質となることが知られている. 主要な 4 本のバンド (14, 17, 18.5, 21 kDa) の輝度を測定し, その合計を算出した. 内因性 control として β -actin を用いて定量化した.

Western blot 法で使用した抗体は以下の通りである. カッコ内には希釈倍率を示す.

一次抗体

rat monoclonal anti-MBP antibody (CHEMICON) (1:4000)

rabbit polyclonal anti- β -actin antibody (和光純薬) (1:2000)

二次抗体

HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Jackson Immuno Research) (1:10000)

HRP-conjugated goat anti-rat IgG antibody (Jackson Immuno Research) (1:10000)

1-18 統計学的解析

統計学的解析として, F 検定により分散の均一性を検定し, 等分散の場合には Student の t 検定を, 不等分散の場合には Aspin-Welch の t 検定を実施した. なお, 有意差検定は両側で実施し, $p < 0.01$ を統計学的に有意であると判断した. なお測定結果はいずれも平均値 \pm 標準誤差 (standard error of the mean ; SEM) で示した.

1-19 クプリゾンモデルの作製

1-2 で診断したマウスのうち, 野生型と PLD4 欠損マウスを 8~10 週齢まで通常の飼料で飼育した. その後, クプリゾン混餌を 5 週間, 自由摂食させた.

クプリゾン (bis-cyclohexanone-oxaldihydrazone; Sigma-Aldrich) は動物飼育用の MF 飼料 (オリエンタル酵母工業) に 0.2% (w/w) の含量で混合製造したものを使用した. 比較対照のマウスは, 通常の CE-2 (日本クレア) を摂取させた.

1-20 FluoroMyelin 染色

1-8 で作製した凍結切片は, PBS 中で O.C.T. Compound を除去した後, 0.3% TX-PBS にて 5 分間浸し, 0.3% TX-PBS で 1/200 に希釈した FluoroMyelin Green dye (Molecular Probes) を室温で 30 分間反応させた. その後, 0.3% TX-PBS に 5 分間浸し, PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄し, VectaShield (VECTOR) とマニユキアを用いてカバーガラスで封入した. 画像は共焦点レーザー顕微鏡で撮影した (FV1000D IX81 laser scanning microscope; Olympus).

第 2 節 結果

2-1 PLD4 欠損マウスにおける発達期小脳の解析

2-1-1 PLD4 欠損マウスにおける発達期の脳構造

これまでの RT-PCR 法などの解析により，マウス小脳の PLD4 遺伝子発現レベルは生後 0 日目 (P0) から上昇し始め，生後 7 日目 (P7) で最大となり，その後減少していくことが示されている (Fig. 3). この時期の野生型および PLD4 欠損マウスの脳の肉眼的形態，大きさおよび重量などの外見上の違いは観察されなかった. そこで，この時期の脳組織内部の構造的な違いを観察するため，HE 染色法を用いて P7 の脳を解析した (Fig. 7). 脳矢状断面では正中に近い内側と正中から遠い外側では発達過程および構造が異なるため，野生型 (Fig. 7A) と PLD4 欠損マウス (Fig. 7B) で観察する部位を，単に正中からの距離だけでは一致させることができない. そこで，矢状断面の正中からの位置は，小脳の葉数を指標に決定し観察することにした. その結果，野生型 と PLD4 欠損マウスでは脳組織としての構造的な違いは認められなかった. さらに小脳に関して，一部分を拡大し，層構造を観察したところ，外顆粒層 (#) やプルキンエ細胞層 (*) の構造にも野生型および PLD4 欠損マウス間での差異は見られなかった (Fig. 7A', B'). これらのことから HE 染色で観察される脳組織の構造および小脳層構造において，PLD4 欠損による明らかな影響が外見上は無いことが示された.

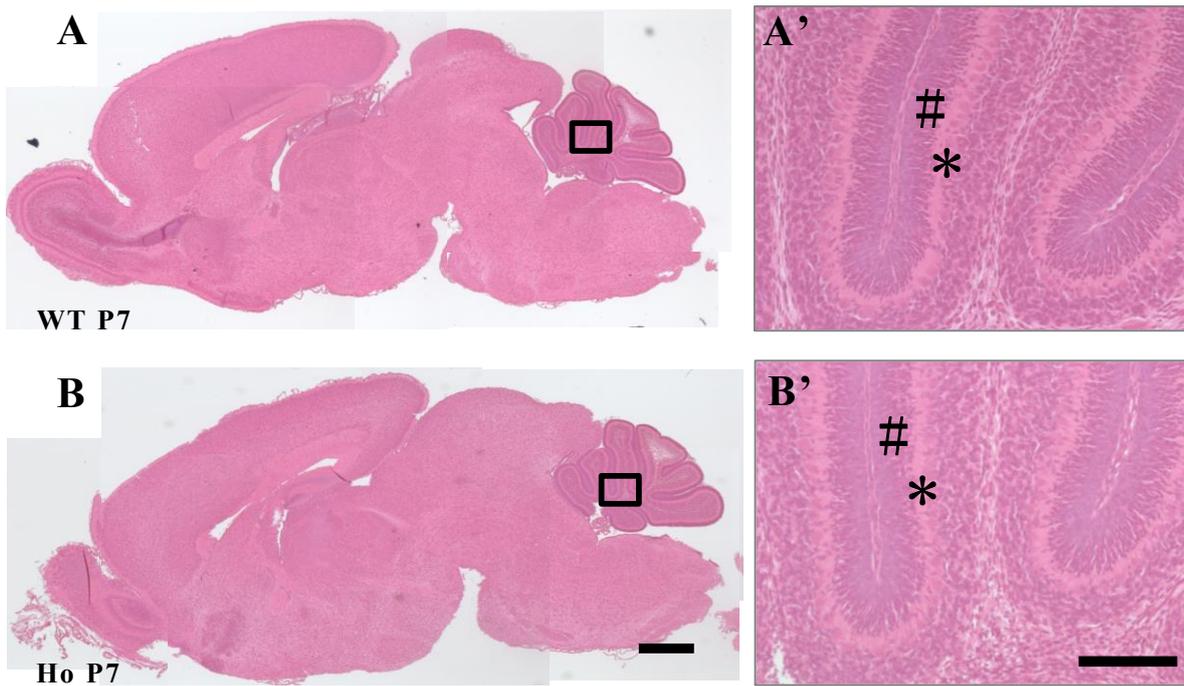


Fig. 7 Gross brain structures in PLD4-deficient mice at P7.

Comparison of gross brain structures observed in wild type (WT; A) and PLD4-deficient mice (Ho; B) at P7. Paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin. No significant differences in gross brain anatomy were observed. High magnification images of cerebellar cortex (black squares) are shown in the right panels (A', B'). No significant differences in external granular layer (#) and Purkinje cell layer (*) were observed. Scale bars in B and in the higher magnification image at right represent 500 μm and 100 μm , respectively.

2-1-2 発達期の PLD4 欠損マウス小脳白質に局在する活性化

ミクログリアの解析

HE 染色は脳全体の構造を比較するには優れているが、その一方で細胞種別の変化を観察することができない。そこで、PLD4 欠損による影響を各種の細胞マーカーに対する抗体を用いた免疫組織染色法を用いて観察した。特に小脳発達過程において PLD4 の発現レベルが著明に上昇する P5 および P7 の小脳について解析した。

まず、PLD4 が特異的に発現するミクログリアを観察するため、小脳の凍結切片を抗 Iba1 抗体を用いて免疫染色し、ミクログリアが集積する深部白質と小葉先端部における Iba1 陽性ミクログリアを観察した。その結果、P5 の深部白質では野生型あるいは PLD4 欠損マウスのいずれにおいても Iba1 の染色性が高く、活性化状態を示すアメボイド状のミクログリアが多数観察された (Fig. 8A, C)。小葉先端では、深部白質と比較して陽性細胞数は少ないもののアメボイド状のミクログリアが観察された (Fig. 8B, D)。一方、P7 の深部白質では Iba1 陽性細胞の形態および Iba1 染色強度から、P5 と比較して野生型および PLD4 欠損マウス共にミクログリアの活性化レベルが低下していた。特に野生型のミクログリアの低下の度合いが大きくなる傾向が見られた (Fig. 9A, C)。小葉先端では、P5 と比していずれのマウスでも Iba1 陽性細胞数が増加していた (Fig. 9B, D)。

P5 および P7 の深部白質で観察される Iba1 陽性シグナル強度の違いを定量的に比較するために、視野当たりに認められる全ての陽性細胞の個々の蛍光シグナル強度を長軸方向にプロットし、その最大値を各細胞の輝度として測定した (実験材料及び方法 1-1-12 を参照)。各個体における視野当たりの輝度の平均値を算出して、野生型と PLD4 欠損マウスで比較した。その結果、P5 および P7 ともに野生型より PLD4 欠損マウスで Iba1 陽性シグナル強度が有意に高かった (Fig. 10A, B)。

以上のことから、PLD4 が欠損した状態でもミクログリアはアメボイド状に変化することが分かった。さらに、P7 の PLD4 欠損マウスの深部白質では野生型とは異なり、ミクログリアの持続的な活性化が持続していることが示された。

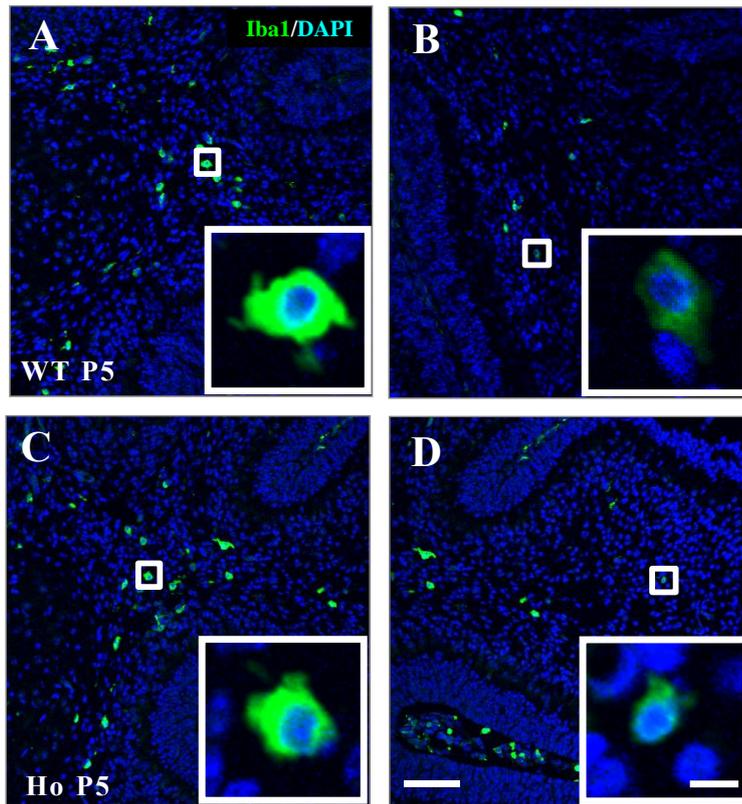


Fig. 8 Iba1-positive microglial activation in the cerebella of PLD4-deficient mice at P5.

Frozen sections of deep white matter (A, C) or folial white matter (B, D) of the cerebella obtained from wild type (A, B) and PLD4-deficient (C, D) mice were immunostained using an anti-Iba1 antibody. A representative Iba1-positive cell indicated by the white square in each panel is shown at higher magnification in the lower right corners. Note that the microglia at P5 are the rounded activated type. Scale bars represent 100 μm (D) or 10 μm (in the white square of D).

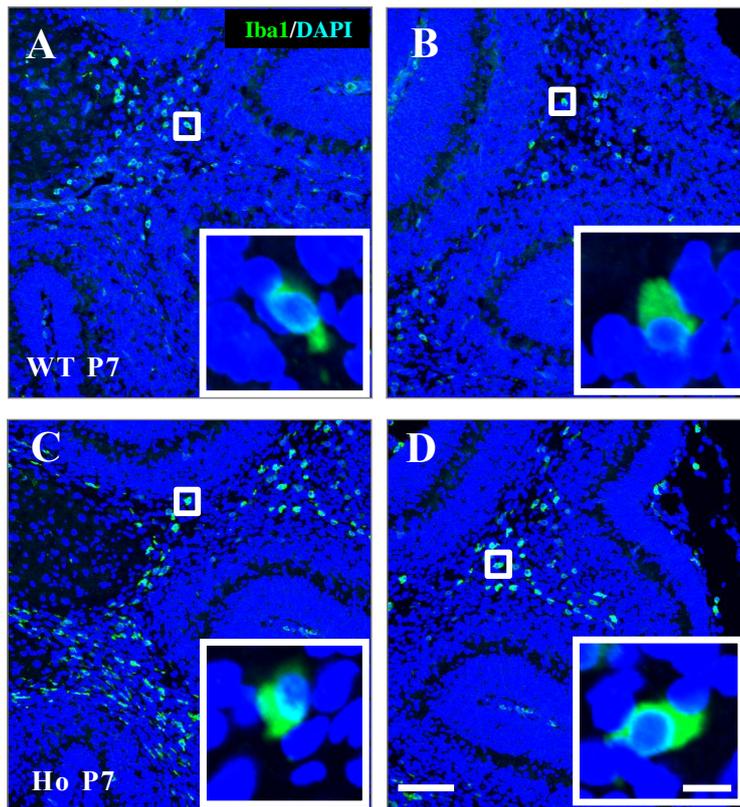


Fig. 9 Iba1-positive microglial activation in the cerebella of PLD4-deficient mice at P7.

Frozen sections of deep white matter (A, C) or folial white matter (B, D) of the cerebella obtained from wild type (A, B) and PLD4-deficient (C, D) mice were immunostained using an anti-Iba1 antibody. A representative Iba1-positive cell indicated by the white square in each panel is shown at higher magnification in the lower right corners. Note that the microglia at P7 are still the rounded activated type. Scale bars represent 100 μm (D) or 10 μm (in the white square of D).

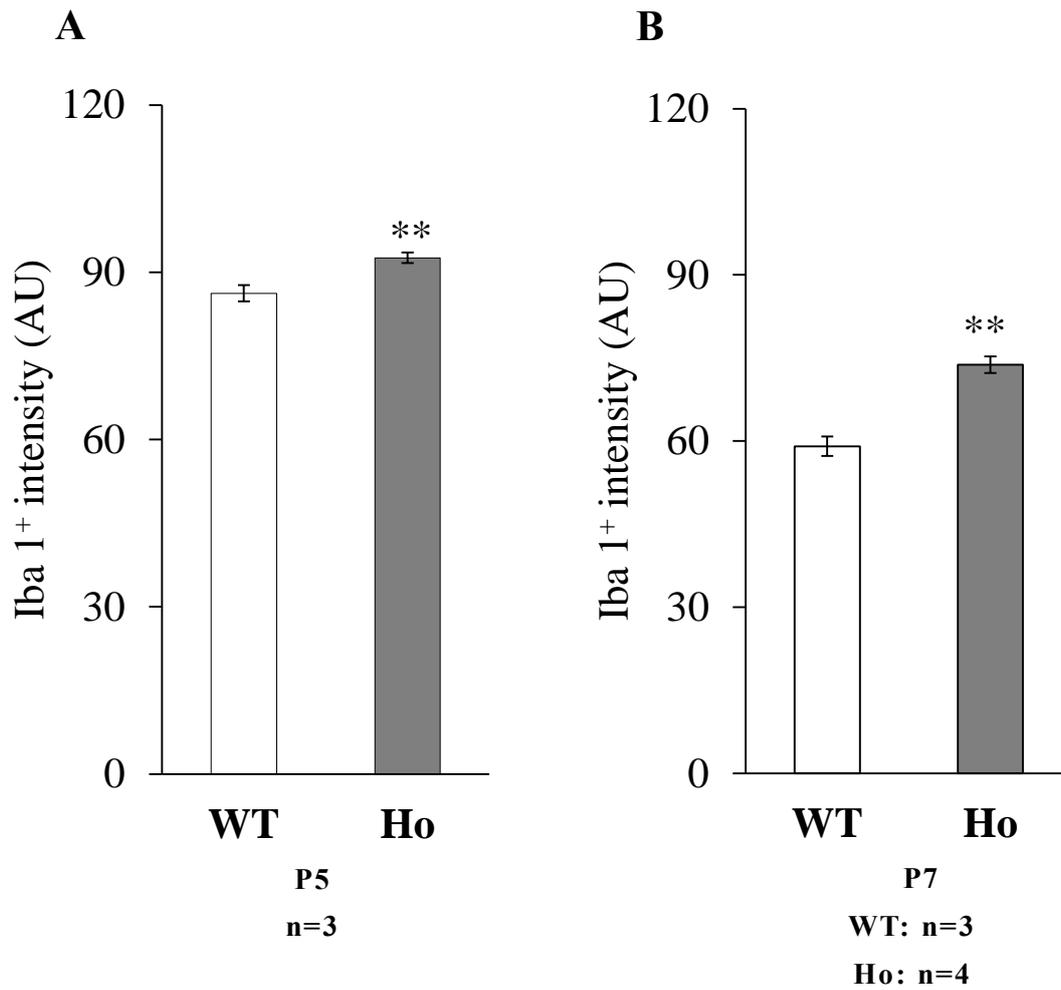


Fig. 10 Quantitative intensity analysis of Iba1-positive microglia in the deep white matter.

Intensities of Iba1 immunoreactivity in individual cells (see Materials and Methods 1-1-12) were measured in the deep cerebellar white matter at P5 (A) and P7 (B). Graphs indicate the mean \pm SEM. Data were obtained from: 92 WT cells and 98 Ho cells at P5, and 125 WT cells and 130 Ho cells at P7 (n: number of mice). Statistical analysis was performed using a Student *t* test. ** $P < 0.01$.

2-1-3 発達期の PLD4 欠損マウス小脳白質に局在する活性化ミクログリアの表現型

Iba1 陽性ミクログリアが刺激を受けて活性化されると、M1 ミクログリアあるいは M2 ミクログリアと呼ばれる 2 つのタイプに分けられることが知られている³⁷⁾。M1 タイプのミクログリアは炎症誘発を介して組織障害性の働きをするタイプであり、inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF α), あるいは interleukin-1 β (IL-1 β) などの炎症性のサイトカインの産生・分泌や CD68, CD32 あるいは CD86 などの炎症を促進させる細胞表面マーカーを発現させる。一方、M2 タイプのミクログリアは抗炎症作用に関与するタイプであり、IL-4, IL-10 あるいは arginase 1 などの炎症抑制性因子を産生する^{37, 38, 39)}。

PLD4 を欠損した小脳白質に存在する活性化ミクログリアのフェノタイプが野生型と異なるかどうかを調べるため、抗 Iba1 抗体と M1 マーカーである CD68 に対する抗体を用いた免疫組織二重染色を行った。Fig. 7 で示したように、Iba1 陽性ミクログリアが多く見られた P5 の小脳組織を用いた。その結果、深部白質に局在する全ての Iba1 陽性細胞 (赤) は CD68 陽性 (緑) であった (Fig. 11A, B)。一方、CD68 陽性シグナル強度は野生型と比較して PLD4 欠損マウスでは低かった。そこで CD68 陽性細胞の輝度を 1-12 と同様の方法で測定した結果、野生型に比べて PLD4 欠損マウスでは有意に減少していた (Fig. 11C)。小葉先端でも深部白質と同様に CD68 陽性シグナル強度は野生型と比べて PLD4 欠損マウスでは有意に減少していた (Fig. 12A, B, C)。このように野生型マウスの発達過程の小脳白質に存在するミクログリアは CD68 の発現が高いのに対して、PLD4 欠損マウスのミクログリアでは CD68 の発現量が減少していることが明らかとなった。

M2 タイプミクログリアのマーカーである arginase 1 に対する抗体を用い、抗 Iba1 抗体との免疫組織二重染色を P5 の小脳で行った。ポジティブコントロールとして、1% リゾレシチン投与により脱髄が誘発された坐骨神経切片を用いた。その結果、ポジティブコントロールでは Iba1 陽性 (緑) のマクロファージで arginase 1 陽性シグナル (赤) が検出された。しかしながら、野生型および PLD4 欠損マウスどちらの小脳の Iba 1 陽性ミクログリア (緑) においても arginase 1 陽性シグナル (赤) は観察されなかった (Fig. 12)。このため、発生過程の小脳深部並びに小葉先端の白質に局在するアメボイド状活性化ミクログリアは、arginase 1 を発現する典型的な M2 タイプミクログリアとは異なることが示唆された。

以上のことから、発達過程の小脳に存在するアメボイド状活性化ミクログリ

アは CD68 陽性の M1 タイプの性質を持つが，PLD4 欠損により CD68 の発現は抑制されることが分かった．

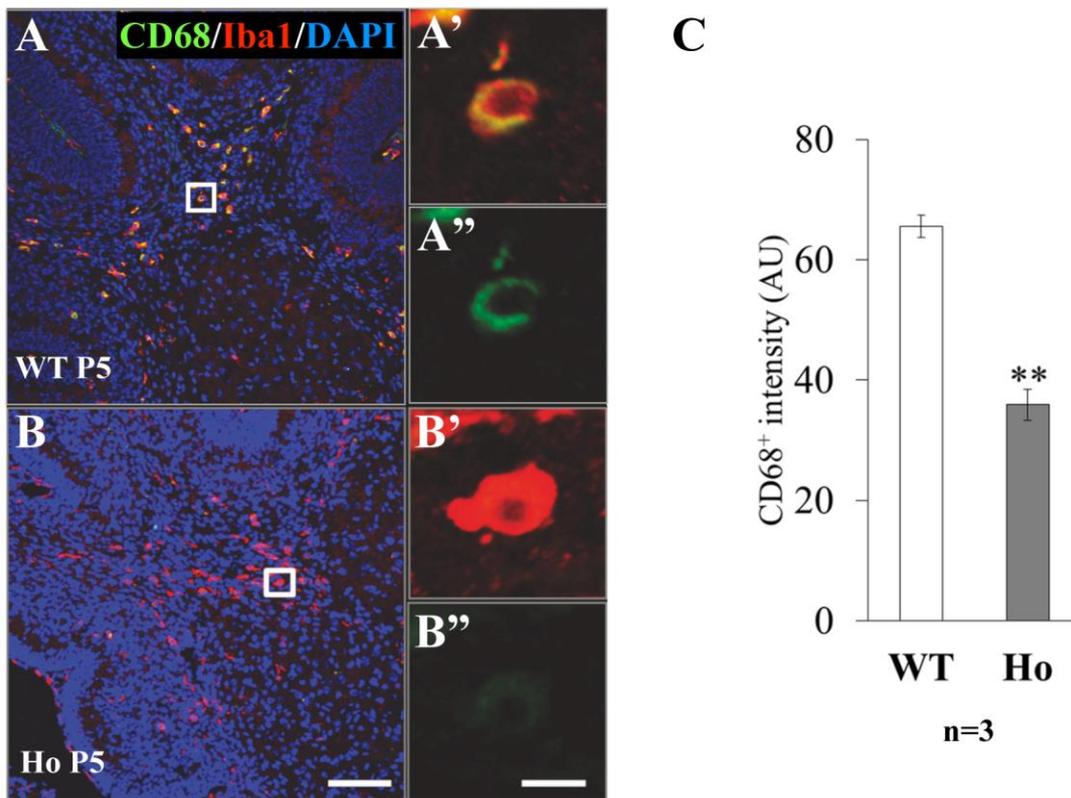


Fig. 11 CD68 immunoreactivity of Iba1-positive microglia in cerebellar deep white matter at P5.

The deep white matter of P5 cerebellum obtained from WT (A) or PLD4-deficient (B) mice was double-immunostained by anti-Iba1 (red) and anti-CD68 (green) antibodies. Higher magnification images of representative Iba1⁺/CD68⁺ cells were from the white squares in A, B. Scale bars indicate 100 μ m (B) or 10 μ m (B''). All Iba1-positive cells were also positive for CD68, however, the staining intensity of CD68 (see Materials and Methods 1-1-13) in PLD4-deficient cells was significantly lower than that in wild-type cells (C). Data were obtained from: 78 WT cells and 65 Ho cells in the deep white matter (n: number of mice). Graphs indicate mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using a Student *t* test. **P<0.01.

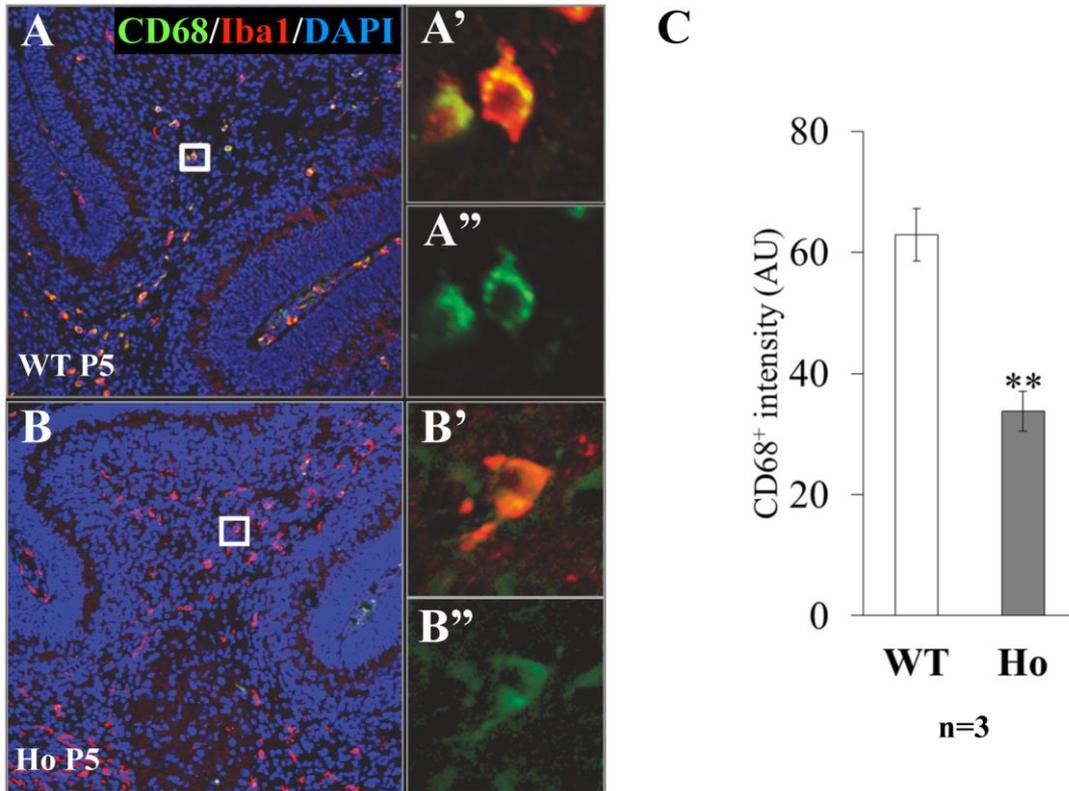


Fig. 12 CD68 immunoreactivity of Iba1-positive microglia in folial white matter at P5.

The folial white matter of P5 cerebellum obtained from WT (A) or PLD4-deficient (B) mice was double-immunostained by anti-Iba1 (red) and anti-CD68 (green) antibodies. Higher magnification images of representative Iba1⁺ CD68⁺ cells were from the white squares in A, B. Scale bars indicate 100 μ m (B) or 10 μ m (B''). All Iba1-positive cells were also positive for CD68, however, the staining intensity of CD68 (see Materials and Methods) in PLD4-deficient cells was significantly lower than in wild-type cells (C). Data were obtained from: 25 WT cells and 32 Ho cells in the folial white matter (n: number of mice). Graphs indicate mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using a Student *t* test. **P<0.01.

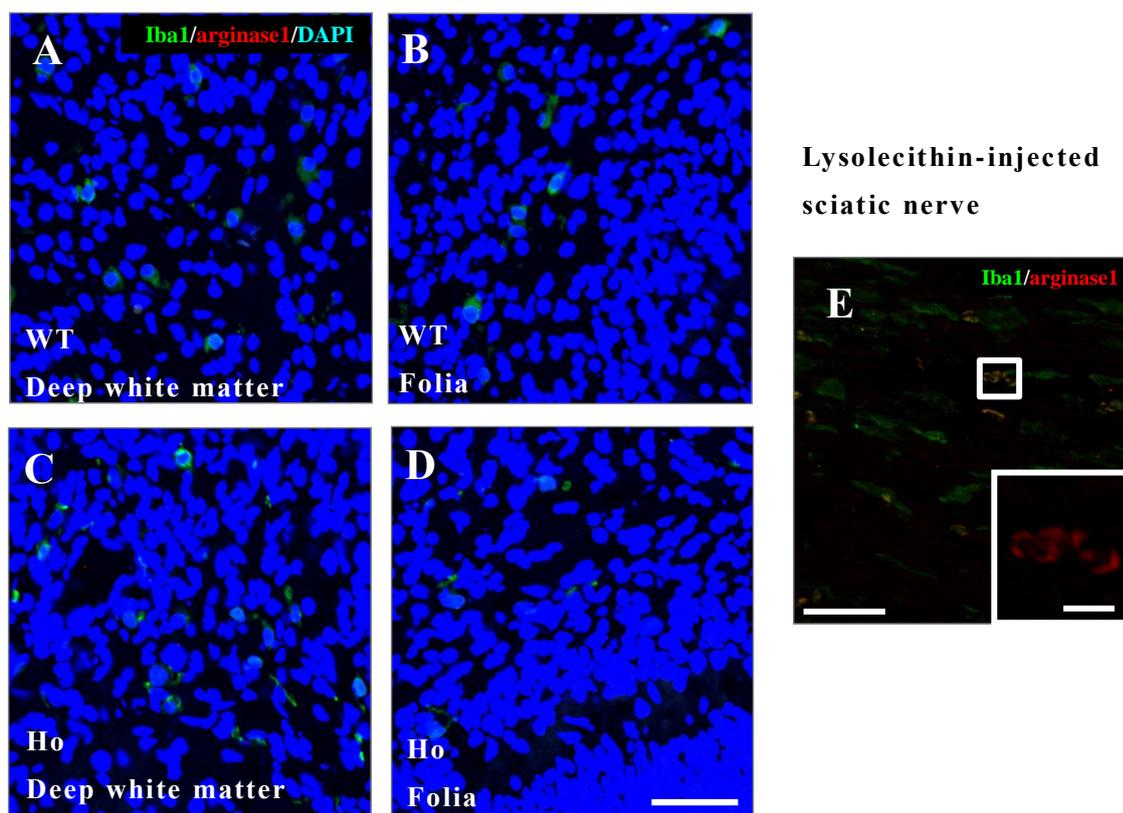


Fig. 13 Arginase 1 immunoreactivity of Iba1-positive microglia in cerebellar white matter at P5.

The deep white matter (A, C) and folial white matter (B, D) of P5 cerebellum obtained from WT (A, B) or PLD4-deficient (C, D) mice were double-immunostained by anti-Iba1 (green) and anti-arginase 1 (red) antibodies. No Iba1-positive microglia showed arginase 1 immunoreactivity in either genotype at P5. The positive control image of the section from the demyelinated lesion of lysolecithin-injected sciatic nerve was demonstrated (E). Representative arginase 1-positive cells indicated by the white square is shown at higher magnification in the lower right corner in (E). Scale bars indicate 50 μ m (D, E) or 10 μ m (in the white squares of E).

2-1-4 発達期の PLD4 欠損マウス小脳のプルキンエ細胞およびアストロサイトの解析

発達過程の哺乳類動物の脳において、一過性に出現する活性化ミクログリアは、貪食作用により主にアポトーシスを起こした不要なニューロンの除去や不要な神経軸索の刈り込み等を行うことで、正常な神経回路の形成に寄与すると考えられている。この時期にはアストロサイトおよび放射状グリアと直接的に相互作用することで脳の正常な発達に関与していると考えられている⁴⁰⁾。一方、ミクログリアの貪食能は PLD4 特異的な siRNA によって抑制されることが明らかとなっている²²⁾。これらのことから、PLD4 の欠損がミクログリアの貪食能を変化させ、脳の発達に影響する可能性が考えられる。そこで層構造や回路が、大脳よりも単純な構造の小脳において、皮質からの唯一の出力系である大型のプルキンエ細胞の発達に対する PLD4 欠損の影響について検討した。プルキンエ細胞の形態的な変化を調べるために、小脳ではプルキンエ細胞特異的に発現しているカルシウム結合タンパク質 calbindin に対する抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、P5 と P7 のいずれの PLD4 欠損マウス小脳においても野生型と同様にプルキンエ細胞の細胞体は整列してプルキンエ細胞層を形成し (Fig. 14A-D)、かつ樹状突起の伸展の仕方にも差異は見られなかった (Fig. 14A'-D')。

小脳では放射状グリアがバグマングリアに分化する。グリア線維性酸性タンパク質 (glial fibrillary acidic protein ; GFAP) はアストロサイトのマーカーとして用いられるが、小脳ではバグマングリアにも発現している。まず、P5 および P7 のアストロサイトおよびバグマングリアの状態を抗 GFAP 抗体を用いた免疫組織染色により調べた。免疫染色の結果、P5 と P7 の小脳ともに深部白質のアストロサイトの染色像に野生型と PLD4 欠損マウスの間で違いは観察されなかった (Fig. 15A-D)。加えて、P7 でプルキンエ細胞から分子層に向かって伸びたバグマングリアの放射状線維陽性の組織像にも差異は認められなかった (Fig. 15B, D)。

次に、この時期のアストロサイトは活性化状態にあり、GFAP 発現レベルが上昇することから、深部白質における GFAP 陽性像の蛍光強度の違いについて調べた。1-14 で示すように GFAP 陽性領域と領域全体の蛍光強度の面積を測定し、単位面積当たり ($1 \mu\text{m}^2$) の輝度を算出した。その結果、P5 よりも P7 での輝度の増大は認められたものの、PLD4 欠損マウスと野生型の違いは認められなかった (Fig. 16)。

以上の結果から、PLD4 欠損により活性化ミクログリアのフェノタイプが変化してもプルキンエ細胞やアストロサイトには影響しないことが示唆された。

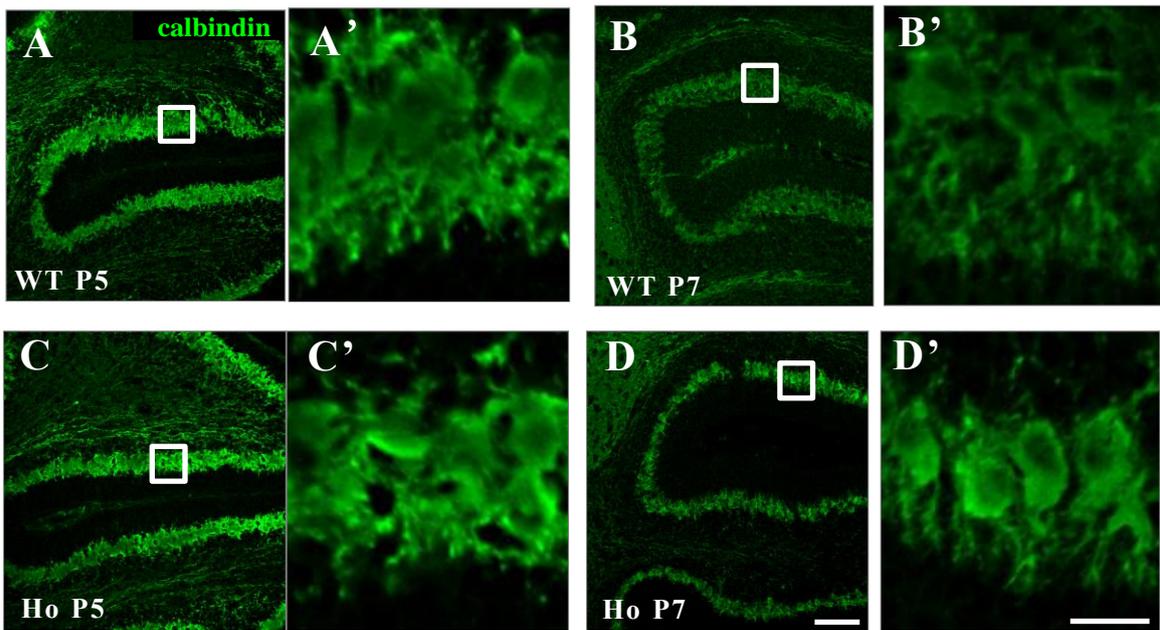


Fig. 14 Purkinje cells in the cerebella of PLD4-deficient mice.

Representative calbindin-positive Purkinje cells in wild type (WT; A, B) and PLD4-deficient (Ho; C, D) cerebella at P5 (A, C) and P7 (B, D) are exhibited. A' to D' are higher magnification images of the white squares in A to D. No apparent differences were observed between wild type and PLD4-deficient mice at both ages. Scale bars indicate 100 μm (D) or 20 μm (D').

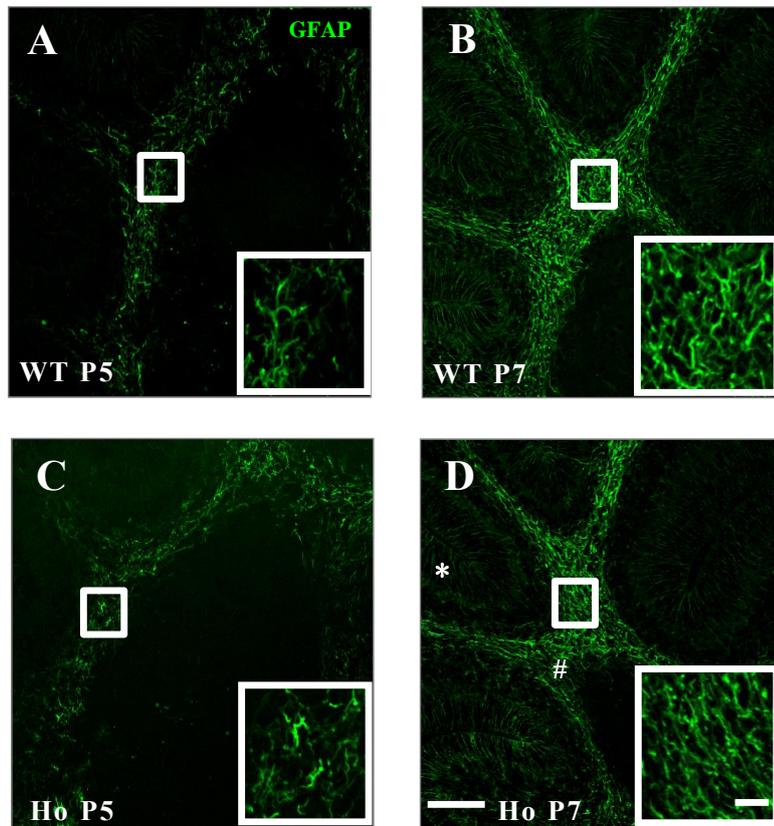


Fig. 15 Astrocytes in the cerebella of PLD4-deficient mice.

Representative GFAP-immunoreactive images of astrocytes in the deep white matter of wild type (A, B) and PLD4-deficient (C, D) cerebella at P5 (A, C) and P7 (B, D) are exhibited. The sharp (#) in D represents astrocyte signal in the white matter. The asterisk in D represents Bergmann glia signals. Higher magnification images of the white squares are shown in the lower right corners. Scale bars indicate 100 μm (D), or 20 μm (in the white squares of D).

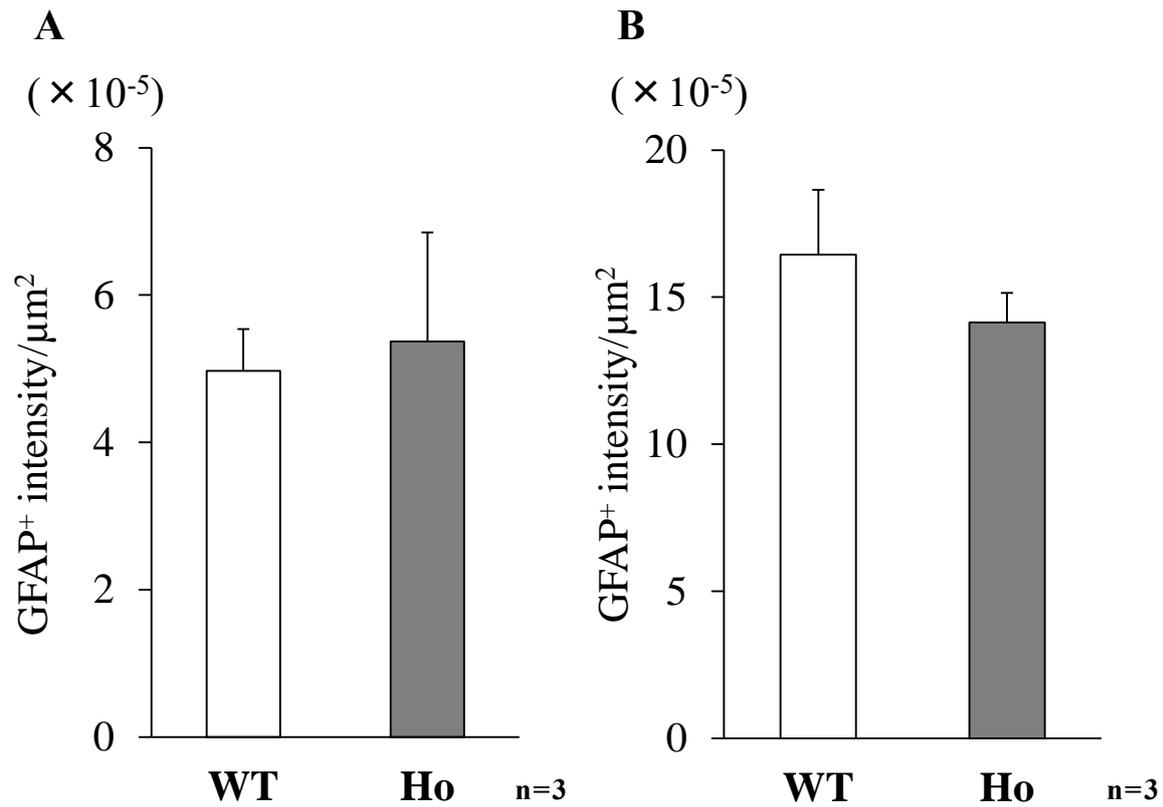


Fig. 16 Quantitative intensity analysis of GFAP-positive area in the deep white matter.

Intensities of GFAP immunoreactivity in the deep cerebella white matter of P5 (A) and P7 (B) cerebella obtained from wild type (WT) and PLD4-deficient (Ho) mice were quantified (see Materials and Methods 1-14). GFAP⁺ intensities are represented as intensity per unit area ($1 \mu\text{m}^2$). Graphs in A and B indicate the mean \pm SEM. Statistical analyses with Student *t* tests showed no significant difference between the two genotypes at P5 (A) and P7 (B).

2-1-5 生後 10 日齢の PLD4 欠損マウス小脳におけるミクログリア，プルキンエ細胞およびアストロサイトの解析

小脳のミクログリアにおける PLD4 発現レベルは，P7 以降急激に低下する (Fig. 3). そこで生後 10 日目 (P10) の小脳におけるミクログリア，アストロサイトおよびプルキンエ細胞に対する PLD4 欠損の影響を抗 Iba1 抗体，抗 GFAP 抗体および抗 calbindin 抗体を用いた免疫組織染色により調べた. その結果，PLD4 欠損マウスにおいても野生型と同様に小脳深部および小葉先端に存在するミクログリアの多くはラミファイドタイプに変化しており，P7 までに観察された野生型との差異は認められなかった (Fig. 17A-D). またアストロサイトにおける GFAP 陽性強度の減少 (Fig. 17E, E', F, F') および calbindin 陽性プルキンエ細胞の樹状突起の枝分かれの形状 (Fig. 17G-J) についても，PLD4 欠損マウスと野生型の違いは見られなかった.

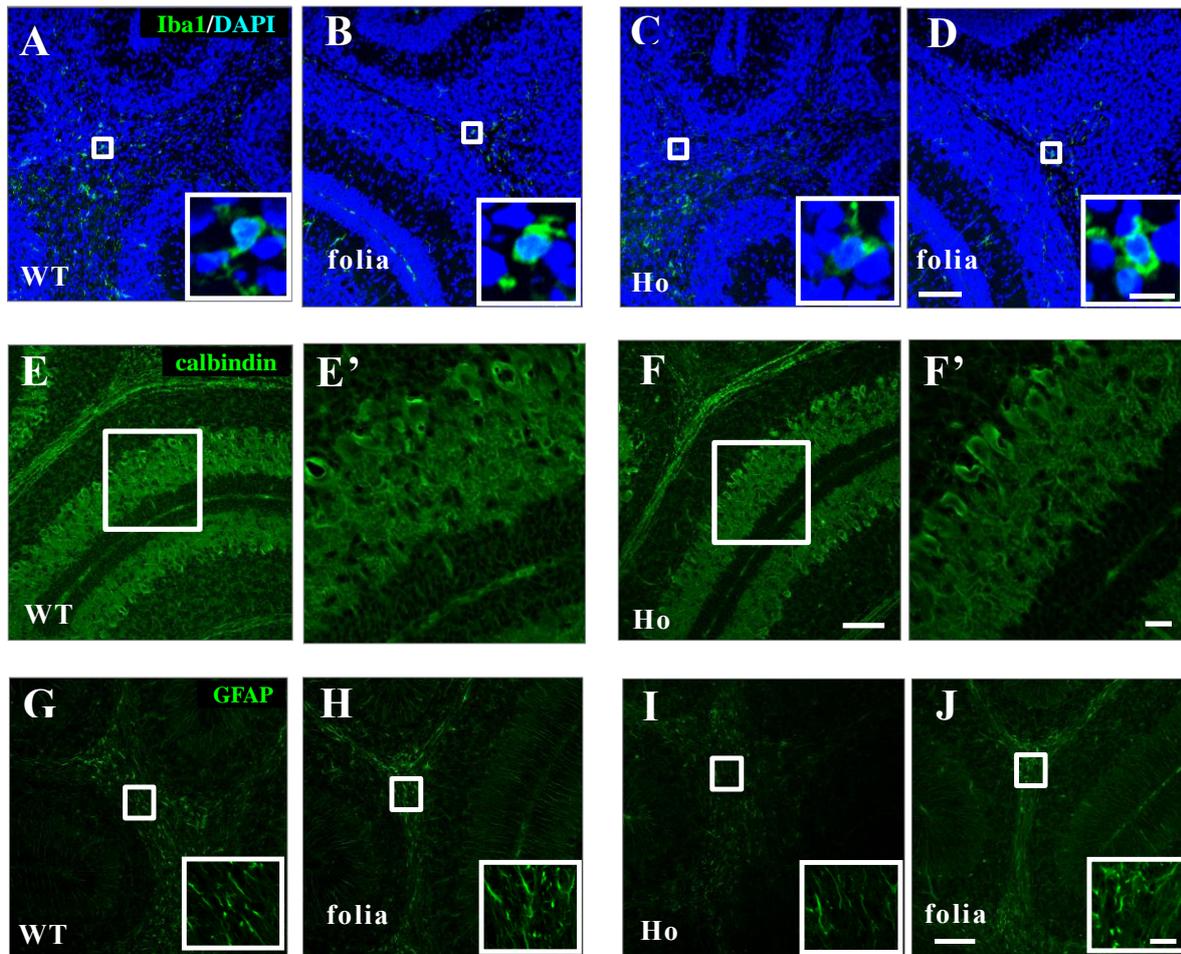


Fig. 17 Characteristics of microglia, Purkinje cells, and astrocytes in the cerebella of PLD4-deficient mice at P10.

Representative images of Iba1-positive microglia in wild type (WT; A, B) and PLD4-deficient (Ho; C, D) cerebella at P10 were exhibited. Higher magnification of a representative Iba1-positive microglia is shown in the lower right corner. At P10 process-bearing ramified microglia were found in both types of mice. Purkinje cells in WT (E) and Ho (F) cerebella at P10 were immunostained by anti-calbindin antibody (E, F). E' and F' are higher magnification images of the white squares in E and F. GFAP immunoreactive astrocytes in the deep white matter (G, I) and folial white matter (H, J) of WT and Ho mice were immunostained by anti-GFAP antibody. Higher-magnification images of white squares (G, H, I, J) were indicated in the lower right corners. No apparent differences of calbindin and GFAP positive staining were observed between two genotypes. Scale bars indicate 100 μm (D, F, J) or 10 μm (in the white squares of D) or 20 μm (F', in the white squares of J).

2-1-6 発達期マウス小脳におけるミクログリアの活性化とミエリン形成との関連性の検討

発達過程の小脳では、一過性の活性化ミクログリアが出現することが知られている。この活性化ミクログリアにおいて PLD4 の発現レベルが上昇している²²⁾。発達中の小脳における PLD4 の *in situ* hybridization 解析で、PLD4 陽性細胞は P0 では小脳脚近位で検出され始め、P3 以降では小葉の発達とともに白質内で陽性細胞数の増加が認められる²²⁾。PLD4 陽性細胞は、P5 で徐々に小葉内部の白質へ移動しながら増加し、P7 で最大となった後、P10 では PLD4 陽性細胞が白質から皮質の顆粒細胞層に移動する。その一方で、P21 では PLD4 陽性細胞数が減少する²²⁾。このように小脳発達過程では PLD4 陽性ミクログリアが主に白質に局在することからミエリン形成と何らかの関係があると推測された。また、先行研究により PLD4 欠損マウスの脳梁におけるミエリン形成の遅れが示されていることから²²⁾、PLD4 を発現する活性化ミクログリアとミエリン形成の関連に注目した。

まず、この相関を明らかにするために、活性化ミクログリアの変化を抗 Iba1 抗体による免疫染色で、かつミエリン形成を抗ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) 抗体による免疫染色を指標に観察した。C57BL/6 マウスの P0, 3, 5, 7 および 10 の小脳を用い免疫染色像を比較した (Fig. 18, 19)。出生直後 P0 の小脳はまだ明確な小葉には分かれておらず、小脳原基と呼ばれる状態にある。Iba1 陽性細胞は P0 の小脳内に既に存在し (Fig. 18A), P3 以降 P7 まで増加する傾向が見られた。特に P7 では、各小葉先端部内部にその分布を広げていた。この時期までのミクログリアの多くは、アメボイド状になっていた。さらに P10 では Iba1 陽性シグナル強度の減少とともにアメボイド状からラミファイド状に変化し始めていた (Fig. 18E)。一方、MBP 陽性像は P0 の小脳ではほとんど観察されず (Fig. 19A), P3 から徐々に白質内で検出されるようになり (Fig. 19B), P7 では各小葉先端内部にも有髄軸索の染色像が認められた (Fig. 19D)。その後、P10 では白質全体の MBP 陽性シグナルの強度が増大した (Fig. 19E)。これらの結果から、PLD4 陽性の活性化ミクログリアが多く存在する P7 以降に小脳基部付近の深部白質から先端部白質へ向けてミエリンが形成され、有髄軸索が増加することが明らかとなった。

次に、活性化ミクログリアとミエリン形成の相関性をさらに調べるために、抗 Iba1 抗体と抗 MBP 抗体を用い、P7 での小脳の免疫蛍光二重染色を行った (Fig. 20)。その結果、これからミエリンが形成される部位にアメボイドミクログリアが集積し (Fig. 20C), その一方でミエリンが既に形成された部位ではアメボイド

状ミクログリアの減少が観察された (Fig. 20B). これらの結果から, ミクログリアの形態変化はミエリン形成の状態とタイミングの点で相関する可能性のあることが示された.

以上のことからミエリン形成段階にあるオリゴデンドロサイトの近くに存在する活性化されたアメボイド状のミクログリアはミエリン形成に関与し, かつミエリン形成後にはラミファイド状に変化する可能性が示された.

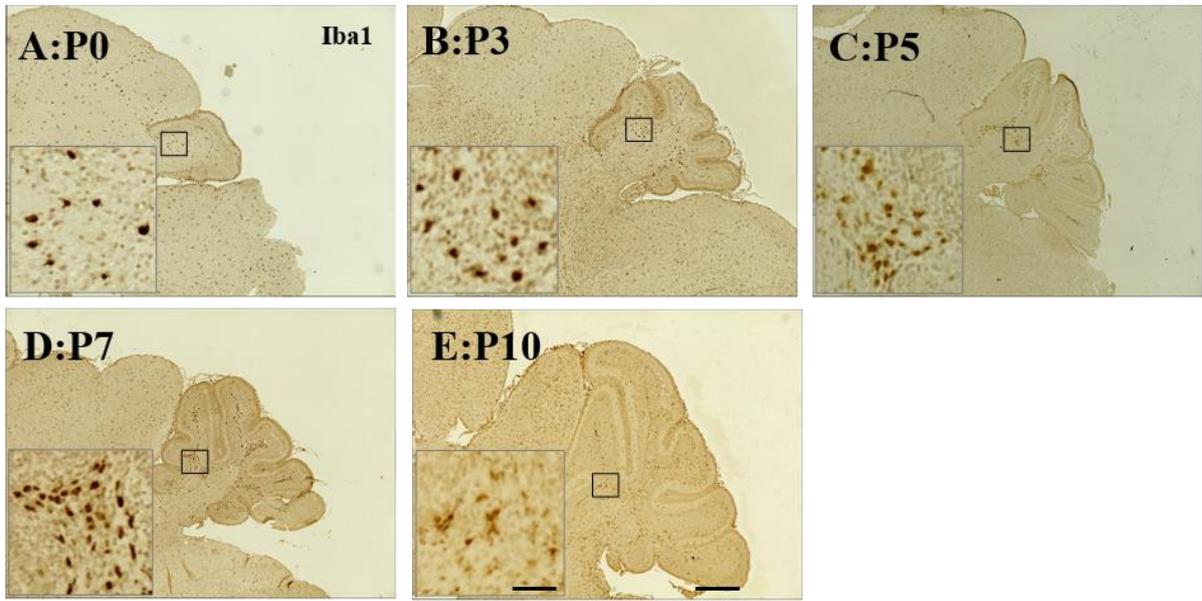


Fig. 18 Developmental change of microglial activation in normal C57BL/6 mouse cerebellum.

Frozen sagittal sections of P0, P3, P5, P7, P10 cerebella obtained from normal C57BL/6 mice were immunostained with an anti-Iba1 antibody. Scale bars indicate 200 μm (E) or 50 μm (in the grey squares of E).

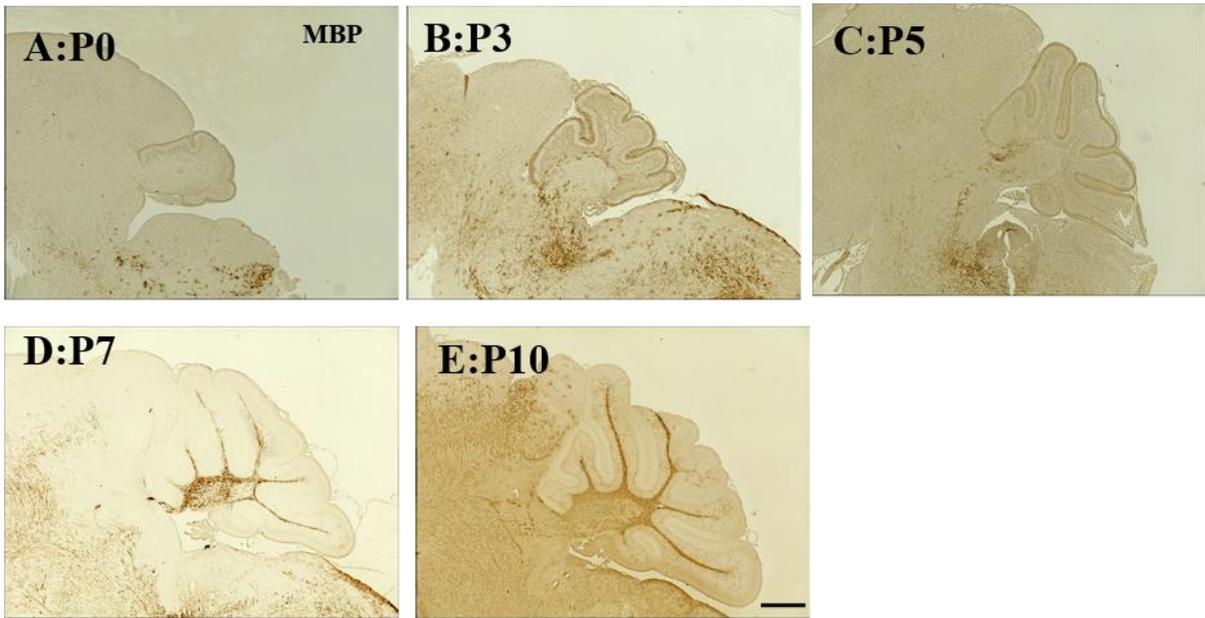


Fig. 19 Progress of myelination in normal C57BL/6 mouse cerebellum.

Frozen sagittal sections of P0, P3, P5, P7, P10 cerebella obtained from normal C57BL/6 mice were immunostained with an anti-MBP antibody. Scale bar indicates: 200 μ m (E).

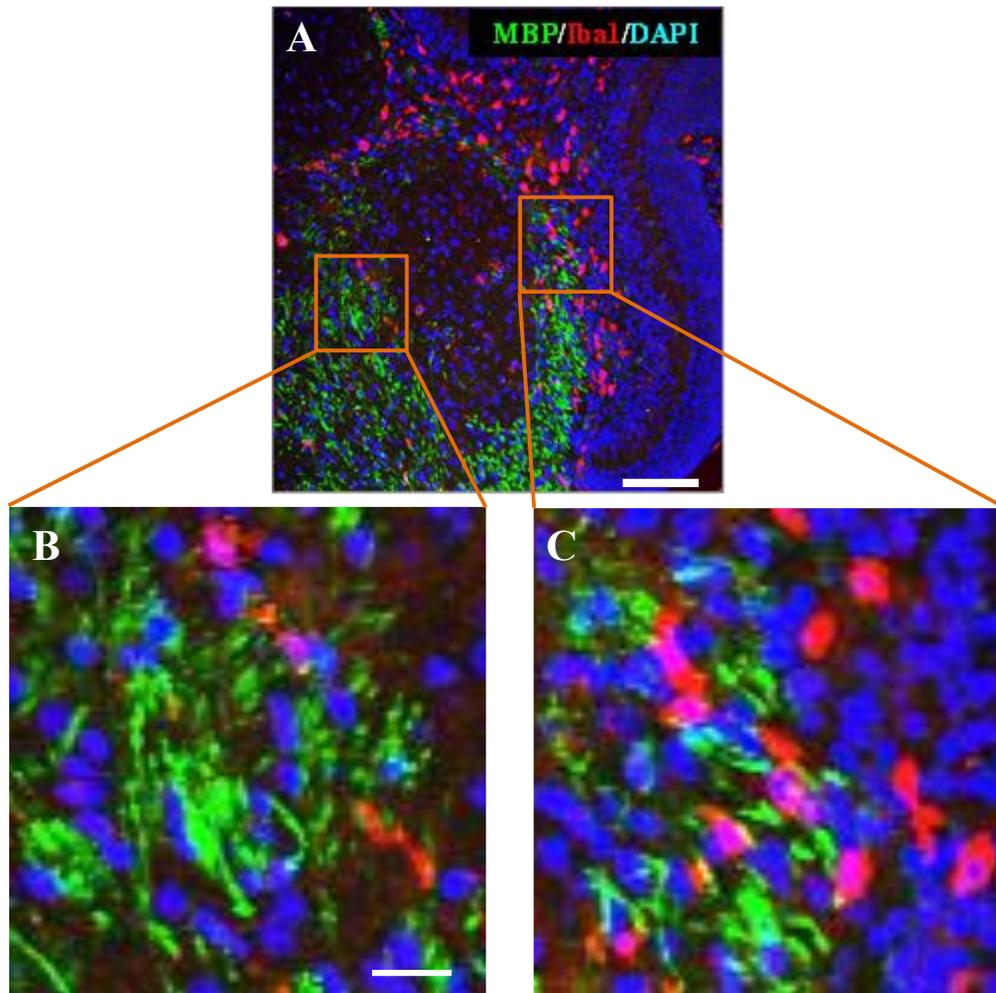


Fig. 20 Relationship between myelination and microglial activation during mouse cerebellar development.

Double immunostaining of the white matter in cerebellar folia at P7 with anti-Iba1 (red) and anti-MBP (green) antibodies. The DAPI staining pattern is overlaid to indicate the cerebellar region. B and C are higher magnification images of the white squares in A. In mice, clusters of rounded Iba1-positive activated microglia are present in the area where myelination is in progress (C). Scale bar in A represents 100 μm or B represents 20 μm .

2-1-7 ミエリン形成に対する PLD4 欠損ミクログリアの影響

ミクログリアの活性化がミエリン形成開始に関与する可能性が示されたことから、PLD4 欠損によるミクログリアの活性化状態の変化がミエリン形成に影響するとの仮説が考えられた。まず、ミエリン構成タンパク質に量的な変化について検討した実験では、抗 MBP 抗体を用いて P7 の小脳ホモジネートの MBP 量を Western blot 法で定量した。その結果、小脳全体を試料として用いた Western blot 解析では PLD4 欠損による MBP の量的な差は認められなかった (Fig. 21)。

次に、P5, 7, 10 の小脳凍結切片を用いて抗 MBP 抗体による免疫組織染色像を野生型と PLD4 欠損マウスで比較した (Fig. 22)。その結果、P5 の野生型では MBP 陽性有髄線維が深部白質に見られた (Fig. 22A' 白矢印)。これに対し PLD4 欠損マウスでは MBP 陽性ミエリンはほとんど観察されず、細胞体が MBP 陽性を示すミエリン形成前のオリゴデンドロサイト (premyelinating oligodendrocyte) が多く観察された (Fig. 22B' 白矢頭)。個体差はあるものの、このような変化は野生型と PLD4 欠損マウスのどちらも 5 匹中 4 匹に認められたため有意な変化であると考えられた。P7 では野生型、PLD4 欠損マウスで小脳核周辺の深部白質の染色像に違いはなく、どちらにも MBP 陽性有髄線維が観察された (Fig. 22C, D 白矢印)。一方、小葉部では野生型で既に MBP 陽性有髄線維が観察された (Fig. 22C' 白矢印) のに対し、PLD4 欠損マウスではミエリン形成前のオリゴデンドロサイトの細胞体に MBP 陽性像が多く観察された (Fig. 22D' 白矢頭)。P10 では深部白質および小葉ともに、抗 MBP 抗体による野生型および PLD4 欠損マウスの白質の染色性に違いは見られなかった (Fig. 22E, F)。これらの結果から、PLD4 欠損マウスでは野生型と比べてミエリン形成が遅延するが、P10 では野生型に追いつく可能性が示された。

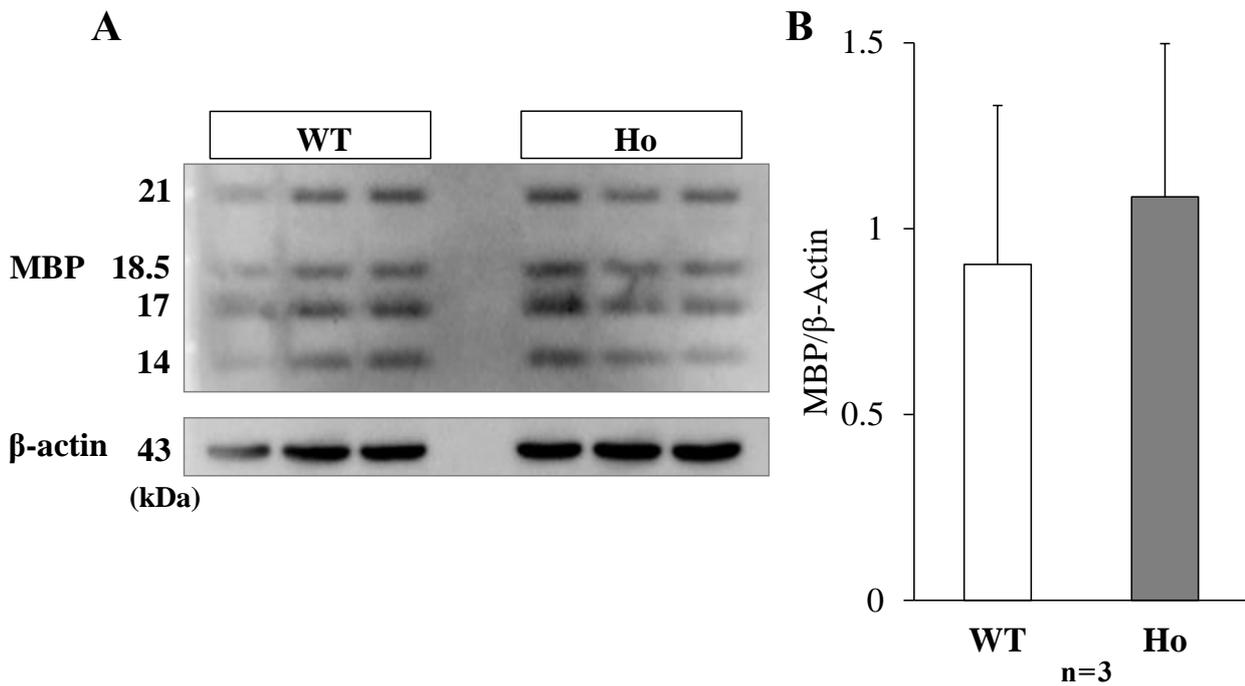


Fig. 21 Protein expression of MBP in the cerebella of PLD4-deficient mice at P7.

Proteins in P7 cerebellar homogenates (10 μ g) from wild type (WT) or PLD4-deficient (Ho) mice (three mice from each group) were separated by 12% SDS-PAGE and Western blot was performed using an anti-MBP antibody (A). After stripping off the antibody, the same blot was restained with an anti- β -actin antibody for quantification. The total intensity of each MBP band (14, 17, 18.5, and 21 kDa) was quantified for each animal and the ratio of MBP to β -actin for each genotype was calculated (B) (see Materials and Methods 1-17). Graph indicates mean \pm SEM. Statistical analysis with a Student *t* test shows no significant difference between the two groups.

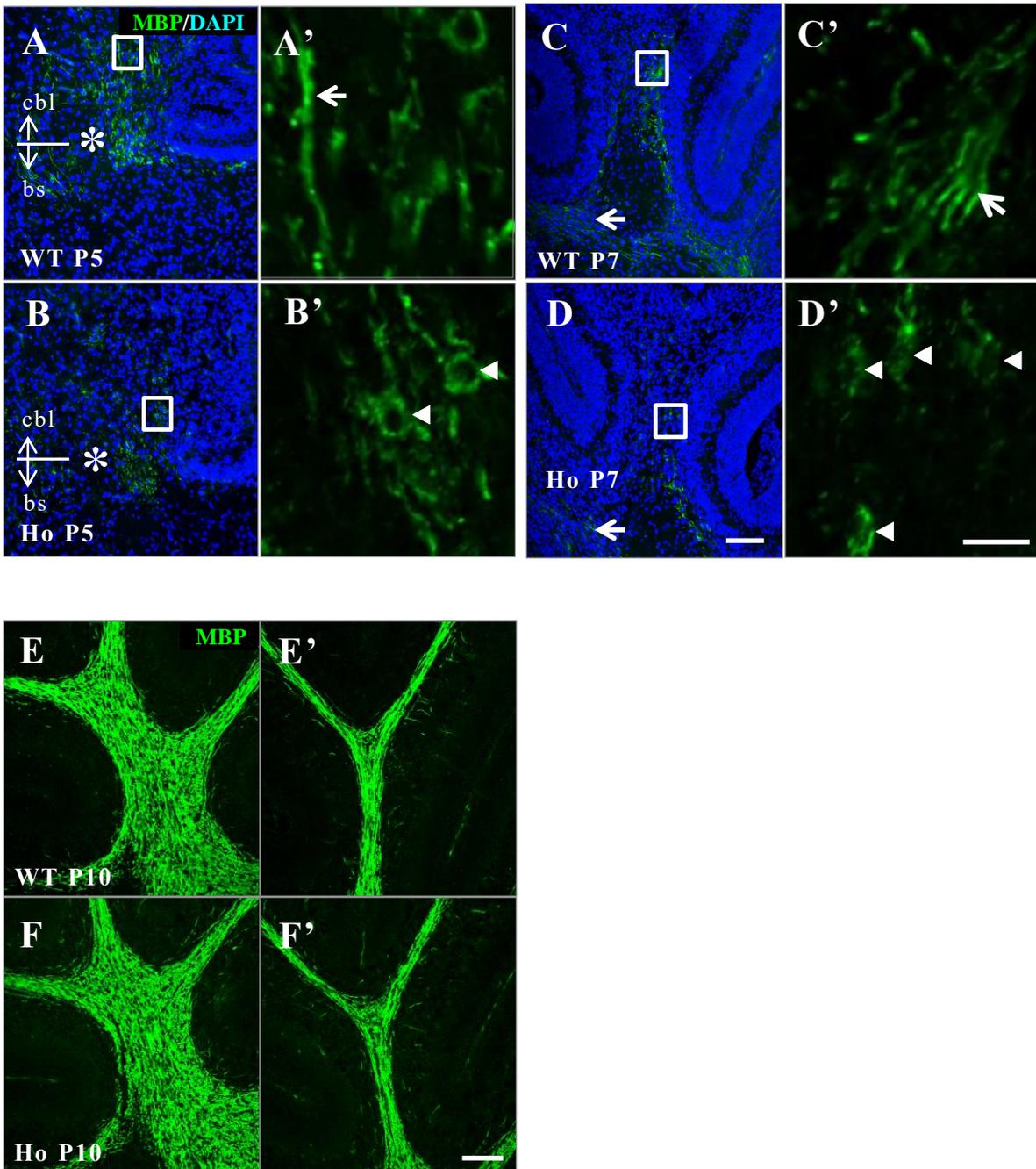


Fig. 22 Decrease of MBP-positive myelinated fibers in cerebellum of PLD4-deficient mice.

MBP immunoreactivities in wild type (A, C, E) and PLD4-deficient (B, D, F) cerebella at P5 (A, B), P7 (C, D) and P10 (E, F) were compared. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Representative images of 5 mice from each genotype were selected. As shown in Fig.19, myelination in the deep white matter is in progress at P5 and

progresses to the folial white matter by P7. Images in A, B or C, D show the deep white matter tracts, or folial white matter, respectively. A' and B' are higher magnification views of the white squares in A, B without DAPI. At P5, MBP-positive myelinated fibers were found in the deep white matter in wild type mice (white arrow in A'), while promyelinating oligodendrocytes with MBP-positive cell bodies (white arrowheads B') were present in PLD4-deficient mice. At P7, myelinated fibers were present in wild type folia (white arrow in C'), whereas promyelinating oligodendrocytes (white arrowheads in D') were still found in PLD4-deficient mice in the same region. Asterisk in A and B represents the border between the cerebellum (cbl) and the brainstem (bs) where myelination starts earlier than in cerebellum. No apparent differences in MBP staining patterns of the deep white matter (E, F) and the folial white matter (E', F') were observed between wild type and PLD4-deficient mice at P10. Scale bars indicate 100 μm (D, F') or 20 μm (D').

2-1-8 PLD4 欠損マウス小脳におけるオリゴデンドロサイトの分化

オリゴデンドロサイトの系譜は、脳形成の過程においてグリア系の幹細胞から生じるオリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte progenitor cell, migrating progenitor) から始まる。オリゴデンドロサイトの分化過程では、その分化に伴い突起数が増加し[初期前駆細胞 (early progenitor)→後期前駆細胞 (late progenitor)], ミエリンタンパク質の発現 (ミエリン形成前オリゴデンドロサイト, premyelinating oligodendrocyte) 後、軸索との相互作用を介して最終的にミエリン形成オリゴデンドロサイト (myelinating oligodendrocyte) へと成熟する (Fig. 23)。前駆細胞の段階では分裂能を有し、早期には移動能も高いが、ミエリンタンパク質が発現する段階に至るとこれらの能力が失われている。オリゴデンドロサイト系譜の細胞では、転写因子の Olig2 を発現しており、各分化段階は様々なマーカーにより特徴づけられる⁴¹⁾。

PLD4 欠損マウスのミエリン形成における変化がオリゴデンドロサイトの分化段階に及ぼす影響を調べるために代表的なマーカーを用いて解析した。まず、オリゴデンドロサイトの数自体に変化がないかどうかを調べるために、オリゴデンドロサイト系譜細胞マーカーの抗 Olig2 抗体を用いて深部白質における Olig2 陽性オリゴデンドロサイトの細胞数を計測した。その結果、P5 では野生型と PLD4 欠損マウスでオリゴデンドロサイト系譜細胞数に違いは見られなかった (Fig. 24A-C)。P7 でも同様の結果となった (Fig. 24D-F)。

次に、幼若なオリゴデンドロサイトで発現するコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (NG2) に対する抗体を用い、P5 での小脳で解析を行った。小葉先端部の染色性を比較したところ、PLD4 欠損マウスでは野生型と同様に P5 の段階で、既に小葉先端の白質部分に NG2 陽性オリゴデンドロサイト前駆細胞が存在していた (Fig. 25A, B)。その一方で、成熟オリゴデンドロサイトのマーカーである CC1 抗体を用いて P7 の小脳での免疫染色像を比較したところ、PLD4 欠損マウスの CC1 陽性成熟オリゴデンドロサイトは深部白質を中心に存在 (Fig. 26B) し、小葉内では少なくなっていた。一方、野生型では、CC1 陽性成熟オリゴデンドロサイトが深部白質から小葉先端部まで広く存在していた (Fig. 26A)。

これらの結果から、PLD4 欠損マウスではオリゴデンドロサイト系譜細胞の総数や幼若なオリゴデンドロサイトの数には大きな違いはなく、オリゴデンドロサイトの成熟の遅れが示唆された。

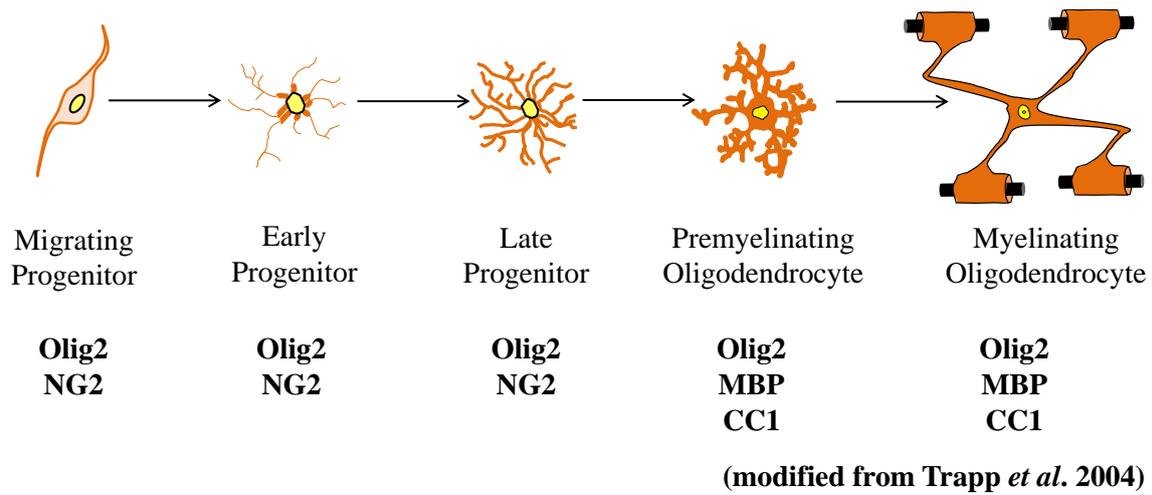


Fig. 23 Differentiation of oligodendrocyte lineage cells *in vivo* and their markers used in this experiment.

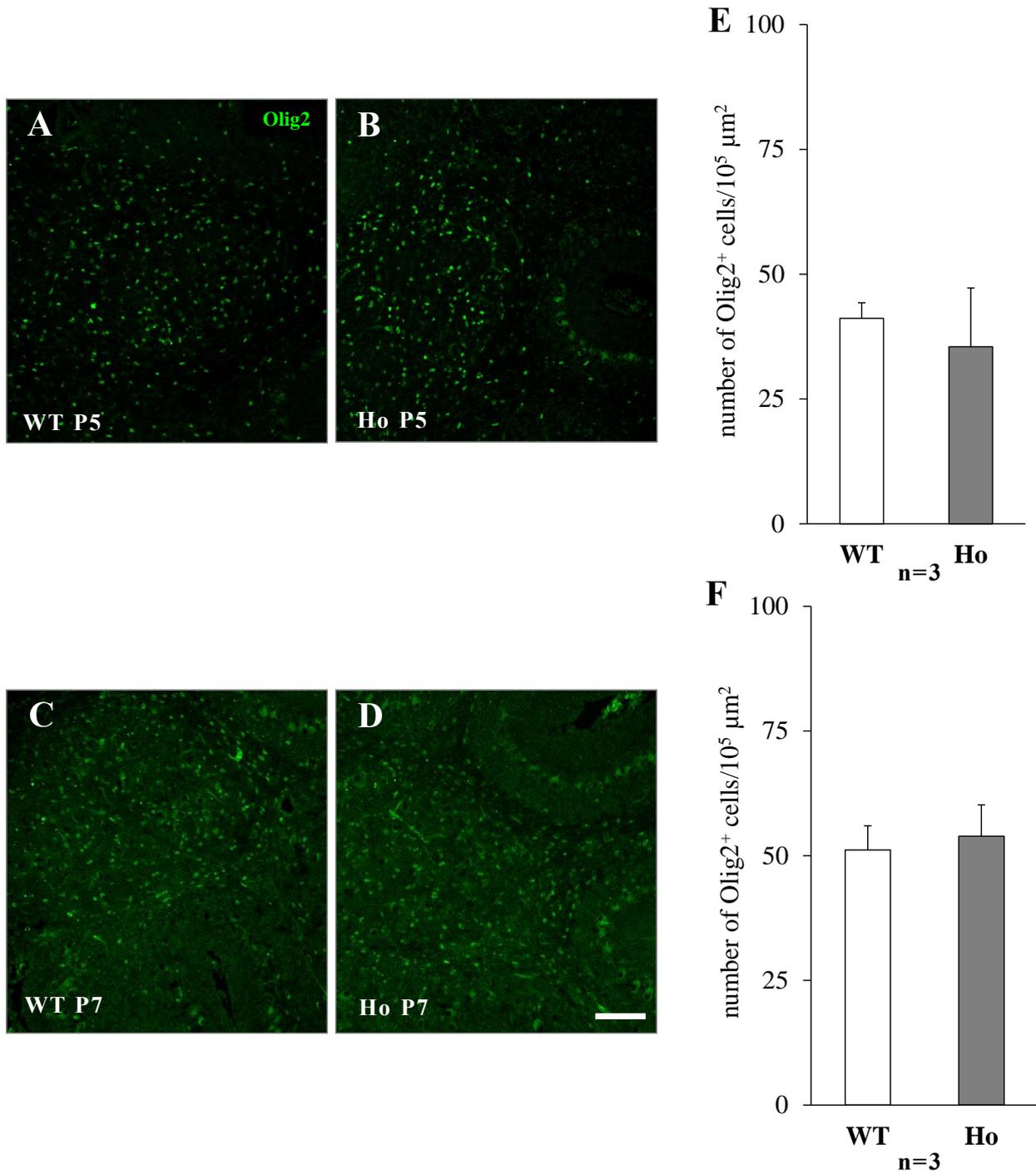


Fig. 24 Olig2 expression in oligodendrocytes in cerebellum.

Olig2 immunoreactivities in wild type (A, C) and PLD4-deficient (B, D) cerebella at P5 (A, B) and P7 (C, D) were compared. Olig2-positive cells in the deep white matter were counted and data are shown as the number per unit area (mean \pm SEM)(E, F). No significant differences were detected by Student *t* test. Scale bars represents 100 μ m.

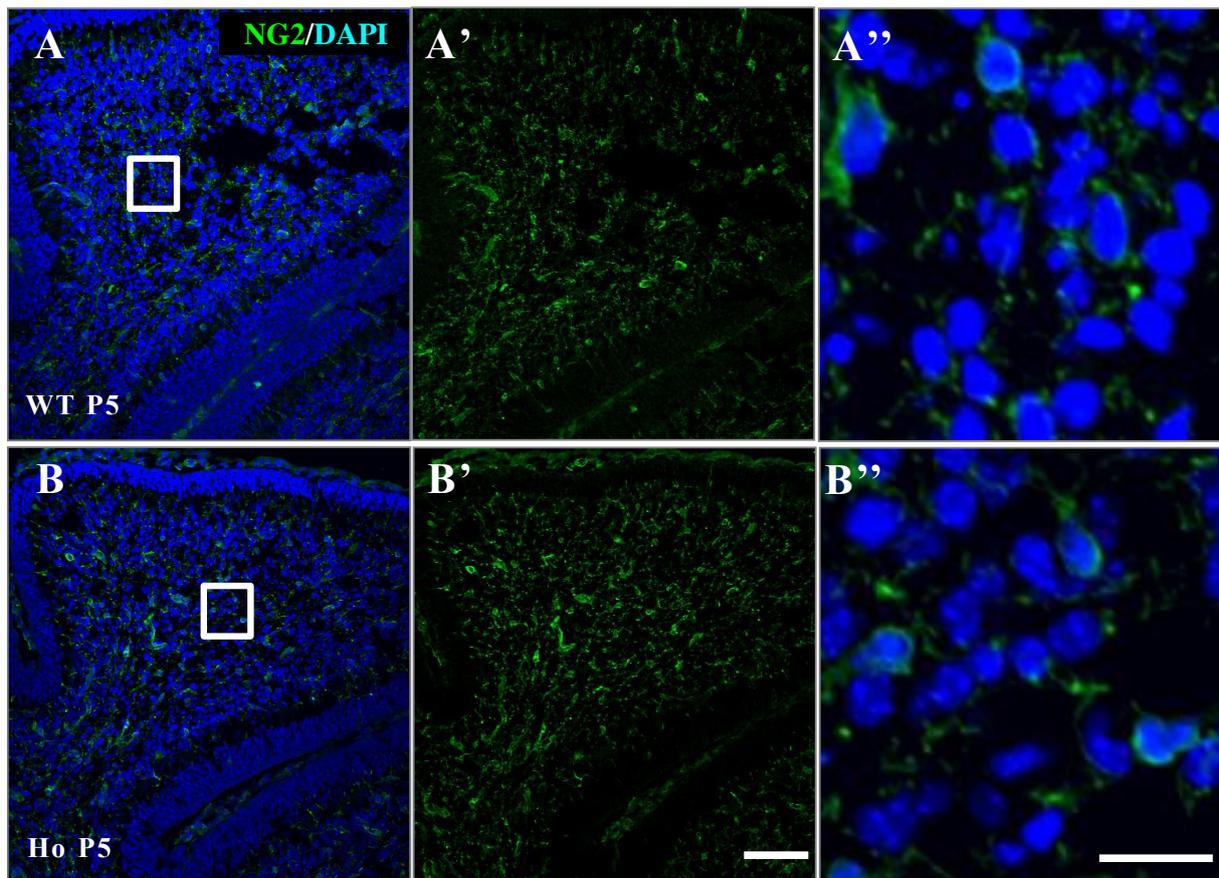


Fig. 25 Presence of NG2-positive oligodendrocyte progenitors in folial white matter.

Representative NG2 staining patterns in P5 cerebellar folia of wild type (A) and PLD4-deficient (B) mice were exhibited. A' and B' show the same images without DAPI. A'' and B'' are higher magnifications of the white squares in A and B. Note that NG2-positive cells were already present in the cerebellar folia at P5. Scale bars represents 100 μm (B') or 20 μm (B'').

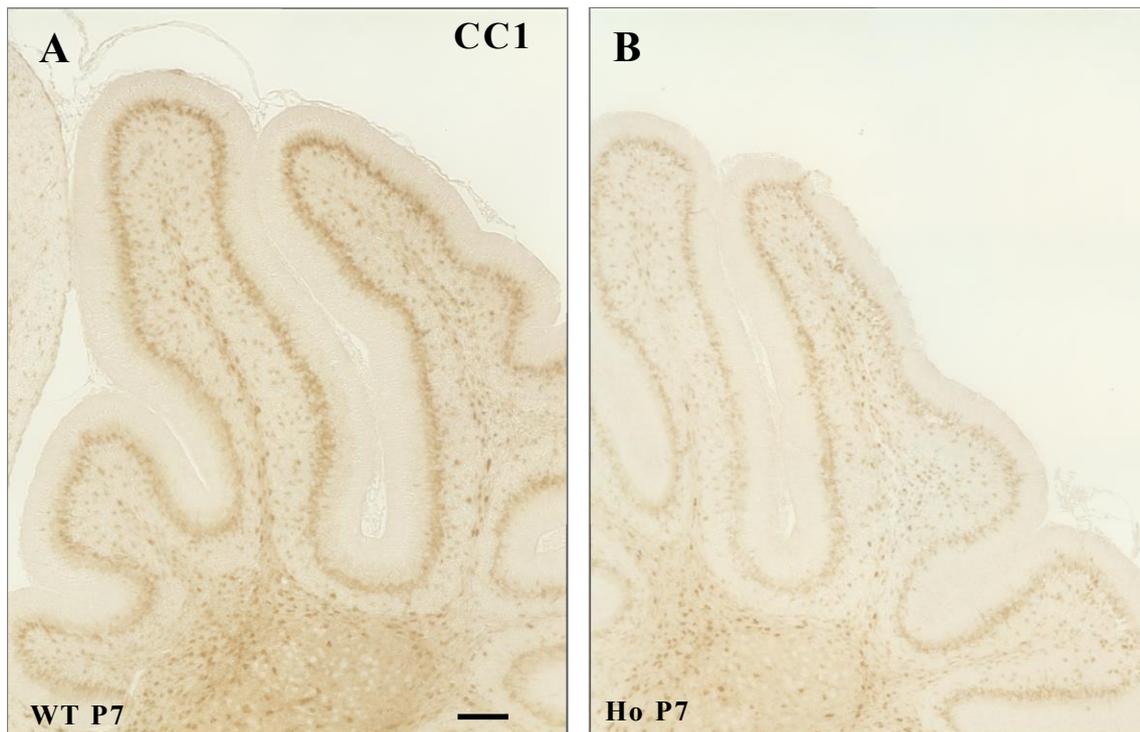


Fig. 26 CC1 expression in oligodendrocyte in cerebellum

Representative CC1 staining patterns in P7 cerebella of wild type (A) and PLD4-deficient (B) mice were exhibited. Fewer CC1-positive cells were present in the PLD4-deficient folia, although many CC1-positive cells were found in the deep cerebellar white matter of both types of mice. Scale bars in A represents 100 μ m.

2-2 クプリゾン投与後の PLD4 欠損マウスの解析

2-2-1 PLD4 欠損マウス成獣における脳梁の構造

クプリゾン投与誘発脱髄モデルマウスでは、主に脳梁で神経線維の脱髄が観察される³⁵⁾。本実験では、HE 染色法を用いて、正常飼料で飼育し成熟した PLD4 欠損マウスの脳梁における構造的な変化を調べた (Fig.27)。その結果、野生型 (Fig. 27A, A') と PLD4 欠損マウス (Fig. 27B, B') に構造的な違いは認められなかった。

2-2-2 クプリゾン投与後の PLD4 欠損マウス脳梁におけるミエリンの解析

脱髄病態における PLD4 欠損の影響を調べるために、成熟したマウスに 5 週間 0.2% クプリゾン含有飼料を摂取させ、野生型と PLD4 欠損マウスにおける脱髄状態を観察した (Fig. 28)。ミエリンを特異的に染色する FluoroMyelin を用いて脱髄状態を観察したところ (Fig. 28)、通常の飼料を自由摂取させた群では、野生型 (Fig. 28A) あるいは PLD4 欠損マウス (Fig. 28B) とともに脳梁のミエリンが濃く染色されて形態的な差は認められなかった。一方、クプリゾンを投与すると、野生型マウス (Fig. 28C) では脱髄が誘導され、ミエリン構造に異常が生じていた。一方、PLD4 欠損マウス (Fig. 28D) では脱髄の程度が低くなっていた。これらの結果から、クプリゾン投与後の 5 週目において、PLD4 の欠損により見かけ上脱髄は軽減されることが明らかとなった。

2-2-3 クプリゾンを投与した PLD4 欠損マウス脳梁における活性化ミクログリアの解析

クプリゾン投与による脱髄の過程でミクログリアが活性化される³⁴⁾。そこで、クプリゾン投与後の脱髄モデルマウスにおける PLD4 欠損がミクログリアの変化に及ぼす影響を調べるために、クプリゾン投与群の PLD4 欠損マウス切片に抗 Iba1 抗体と抗 MBP 抗体を用いた免疫組織二重染色を行った (Fig. 29)。その

結果，コントロール群では野生型 (Fig. 29A, A')と PLD4 欠損マウス (Fig. 29B, B')共に MBP 陽性のミエリンが染色 (Fig.29A, B)され，かついずれのマウスにおいても，組織内に少数の Iba1 陽性ミクログリアが観察された (Fig. 29 A', B'). クプリゾン投与した野生型では MBP 陽性像が，通常飼料を摂取させた群と比較して弱く，脱髄病巣には細長い形状をしたミクログリアが多数存在した (Fig. 29 C'). 一方，クプリゾン投与した PLD4 欠損マウスでは野生型とは異なりミエリンの染色像が残っており，太く丸い形状の活性化ミクログリアが多数観察された (Fig. 29 D').

以上のことから，PLD4 欠損によるクプリゾン誘導脱髄の減少は免疫染色においても観察され，またこのときのミクログリアの形態は脱髄を起こした野生型とは異なり，アメボイド状であることが明らかとなった。

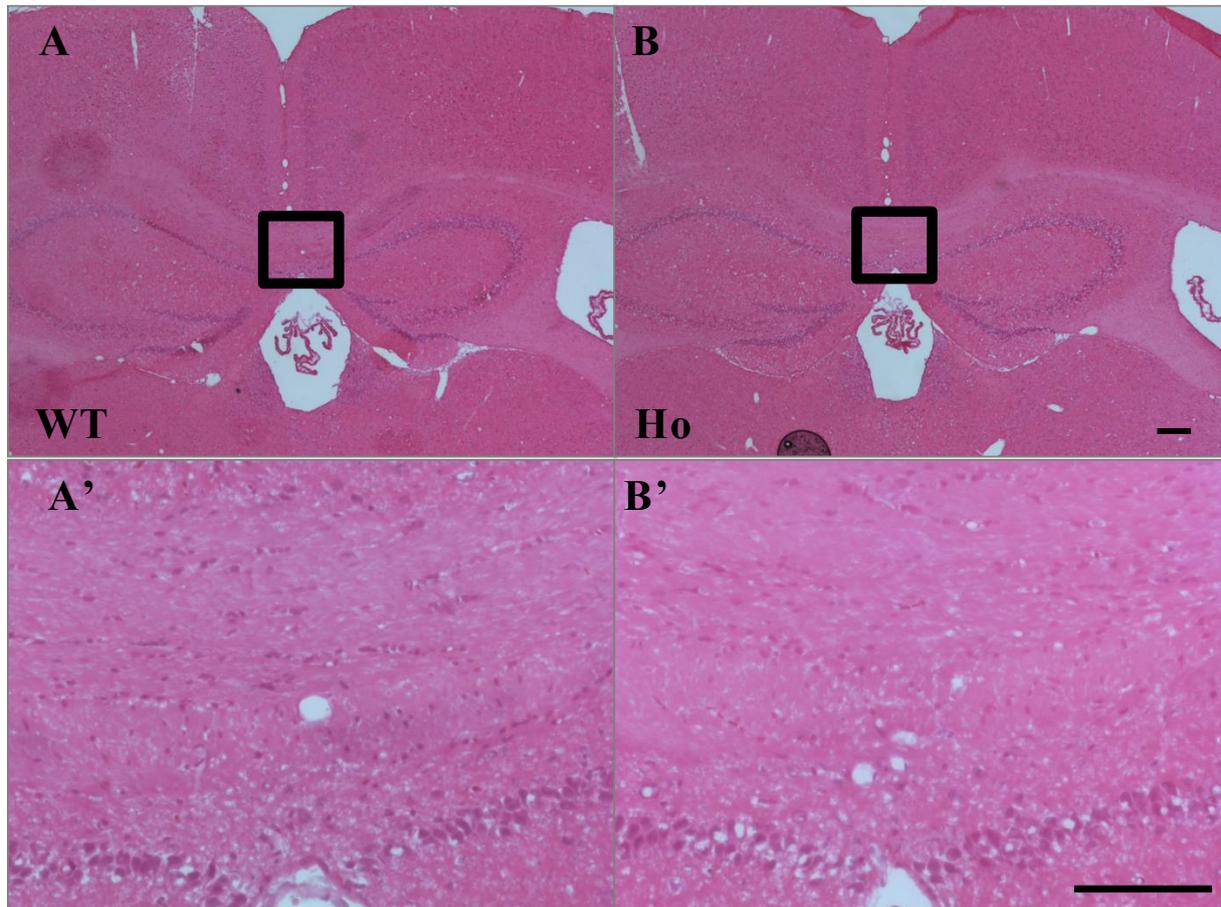


Fig. 27 Corpus callosum structures in adult PLD4-deficient mice.

Comparison of corpus callosum structures in wild type (WT; A) and PLD4-deficient mice (Ho; B). Frozen sections were stained with hematoxylin and eosin. No significant anatomical differences in corpus callosum were observed. High magnification images of corpus callosum (black squares) are shown in the lower panels (A', B'). Scale bars indicate 200 μm (B) or 100 μm (B').

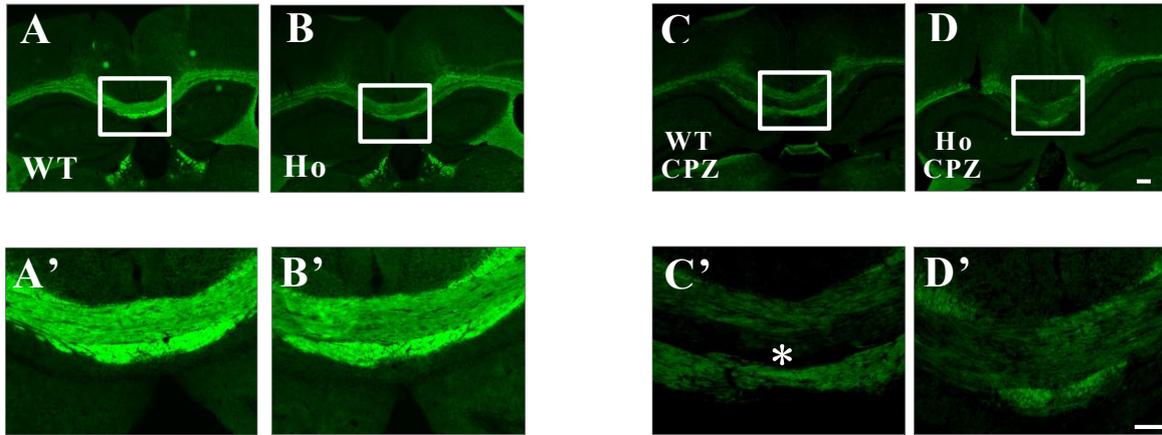


Fig. 28 Demyelination in the corpus callosum of cuprizone-treated adult PLD4-deficient mice.

Frozen coronal sections of corpus callosum obtained from adult wild type (A, C; WT) and PLD4-deficient (B, D; Ho) mice after 5 weeks of normal (A, B) or cuprizone (C, D, CPZ) feeding were stained by FluoroMyelin. A' to D' are higher magnification images of the white squares in A to D. Representative image from each group (n=3) was shown. No apparent differences in myelin staining were observed between A and B. In C and D, myelin staining was significantly reduced. Note that almost no stained area was observed in C (*). Scale bars indicate 200 μm (D) or 100 μm (D').

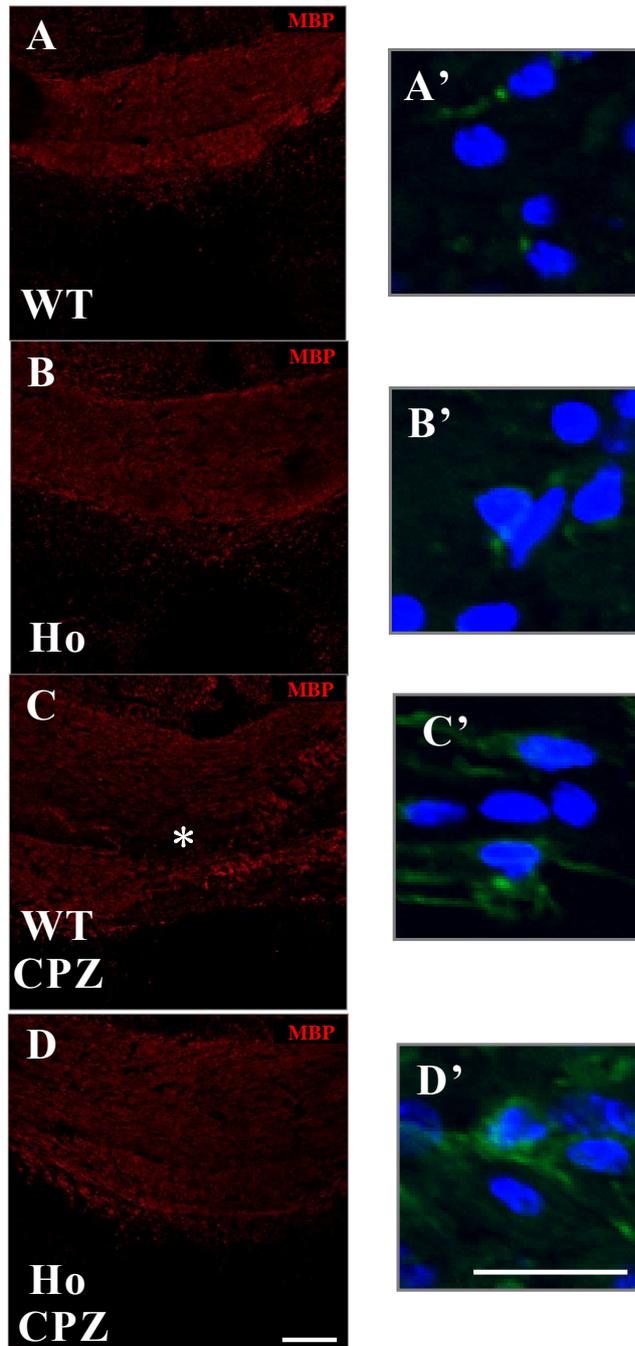


Fig.29 Relationship between demyelination and microglial activation in the corpus callosum of cuprizone-treated adult PLD4-deficient mice.

Frozen coronal sections of corpus callosum obtained from adult wild type (A, C; WT) and PLD4-deficient (B, D; Ho) mice after 5 weeks of normal (A, B) or cuprizone (C, D: CPZ) feeding were doubleimmunostained by anti-MBP (A-D, red) and anti-Iba1 (A'-D', green). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). A representative Iba1-positive cell indicated by the white square in each panel is shown at higher

magnification in the lower right corner. Note that microglia in cupizone-treated PLD4-deficient mice are the rounded activated type. Scale bars represent 200 μm (D) or 100 μm (D').

第3節 考察

本研究では、発達期小脳白質の活性化ミクログリアで発現量が増加する PLD4 の機能を明らかにするために、PLD4 欠損マウスを用い、その発達期小脳の変化を免疫組織染色法で解析した。その結果、野生型と PLD4 欠損マウスでは、小脳のミクログリアの活性化状態が異なることを見出した。小脳白質のミエリン形成が PLD4 欠損マウスで少し遅れることから、活性化ミクログリアに発現する PLD4 がミエリン形成に関与する可能性が示唆された。さらに、クプリゾン投与による脱髄モデルを野生型および PLD4 欠損マウスで作製し、それら組織染色標本を比較した。その結果、クプリゾン投与 5 週間目の PLD4 欠損マウスでは野生型に比べて脱髄の程度が低く、かつミクログリアの形態も異なることが示された。

発達過程の脳で、ミクログリアが一時的に活性化状態にあることはよく知られている^{42, 43, 44)}。この活性化ミクログリアに注目して、多くの研究が行われているものの、これらは主にニューロン新生、軸索伸長、シナプスのスパインおよび軸索の刈り込みなど、ニューロンに対する作用の解析であった¹²⁾。今回、本研究での PLD4 欠損マウスを用いた解析により活性化ミクログリアがミエリン形成に関与することが示唆された。特に、ミエリン形成直前の白質部分でミクログリアが、アメボイド状に活性化されていることから、ミエリン形成の最終段階で PLD4 の関与が考えられる。ミエリンの形成過程は、軸索の電気活動および他のグリア細胞からの様々な刺激により厳密に制御されている^{42, 43, 45)}。現時点では PLD4 の欠損状態にあるミクログリアのミエリン形成への影響の機序については未だに明らかにはされていない。しかしながら、PLD4 特異的な siRNA により PLD4 の発現が抑制されたミクログリアでは、その貪食能が低下することから²⁶⁾、ミクログリアによる不要な軸索あるいはアポトーシスを起こした細胞などの貪食がミエリン形成の引き金として重要であり、PLD4 欠損による貪食能の低下がミエリン形成に影響したと考えられた。一方、活性化ミクログリアは、ニューロンとの接触あるいはミエリン形成促進因子を分泌することで直接形成開始の合図を出すことも考えられる。これらのことを勘案すると今後 PLD4 欠損ミクログリアの形態および分泌因子などの解析も重要と考えられる。

今回、PLD4 が欠損した P5 および P7 での発達期小脳白質に存在するアメボイド状の形状でかつ Iba1 陽性の活性化ミクログリアでは CD68 の発現量が少ないことを見出した。CD68 はマクrofage、単球および好中球などの骨髄系細胞の細胞表面あるいはリソソームの膜上にある分子量 110 kDa の糖タンパク質で^{46, 47)}、通常は活性化状態にあるミクログリアのマーカーとして用いられている^{48, 49)}。PLD4 欠損の CD68 発現レベル低下への直接関与の有無については不明

であるが、PLD4 は細胞内およびファゴソームに存在することから CD68 と PLD4 の関連性に関しても検討する必要がある。

ミクログリアは脳の損傷時、周囲の状況により主に抗炎症因子を放出する場合と主に炎症促進因子を放出する場合があり、いわゆる諸刃の刃として作用することが知られている³⁹⁾。現在、炎症促進性因子（神経傷害因子）を放出する M1 ミクログリアと抗炎症因子（神経保護因子）を放出する M2 ミクログリアに分類されている^{50, 51)}。多発性硬化症モデルマウスの脱髄病態において、病態の憎悪が見られる時には M1 ミクログリア数が増加する。これら M1 ミクログリアから M2 ミクログリアへの転換がオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化を促進させ、神経組織の修復、すなわち再ミエリン化を進行させると報告されている^{51, 52, 53)}。しかしながら、発達期の脳に存在するミクログリアのフェノタイプは未だ明らかにされていない。本研究では、発達期の小脳に存在する活性化ミクログリアは、少なくとも arginase 1 陽性の典型的な M2 ミクログリアではないことが示された。生後初期の脳室下帯では、IL-1 β 、IL-6、TNF α および IFN γ などの炎症促進性サイトカインが神経細胞およびオリゴデンドロサイトの新生に促進的に働くことが報告されている⁴⁴⁾。その一方で、P3 マウス脳から分離したミクログリアでは iNOS、TNF α および arginase 1 の発現量が高い状態にあり、単純に M1 あるいは M2 のフェノタイプだけでは言い表せないことも示唆されている³⁷⁾。今後、発達段階の白質に存在する活性化ミクログリアのフェノタイプを各種マーカーの免疫染色により詳細に解析する必要があると考えられる。

クプリゾンモデルマウスは、多発性硬化症の疾患モデルとして汎用されており、クプリゾンの経口投与後数週間で脱髄が誘発され、特に、脳梁部において顕著な脱髄が観察される^{33, 35)}。このモデルマウスでは、オリゴデンドロサイトの細胞死による脱髄の過程でミクログリアが集積し活性化すると考えられている^{34, 36)}。

これまでの報告から、クプリゾン投与 4 週から 5 週後の脳梁では脱髄が最も進行しており、かつミクログリアも活性化状態にある^{34, 54)}。その一方で、6 週目では、再ミエリン化が進行するため脱髄の程度が軽減されており、その際ミクログリアの細胞数は減少すると報告されている³⁴⁾。投与 5 週後の PLD4 欠損マウスでは、野生型と比較してミクログリアの活性化が生じていたが脱髄の程度は減弱していたことから、クプリゾンによる脱髄の誘導が遅延しているか、あるいは既に再ミエリン化が開始しているかの 2 つの可能性が考えられた。

本研究では、PLD4 欠損が、ミクログリアの活性化状態を変化させ、ミエリン形成の遅延を引き起こすことを示した。加えて、クプリゾンの 5 週間投与による脳梁での脱髄の程度が、野生型と PLD4 欠損マウスで異なることを見出した。今後は PLD4 欠損マウス由来のミクログリアの貪食能や分泌因子の変化を調べることで、ミクログリアがミエリン形成に及ぼす影響を解析していくことが可能になると考えられる。また、クプリゾンを 3~4 週間など短期間投与した場合や、6

週間以上に長期間投与した場合の PLD4 欠損マウスにおける変化を調べることで、ミクログリアでの PLD4 の役割と脱髄との関係が明らかとなることも考えられる。

総括

本研究は、PLD4 のミクログリアでの機能を明らかにするために計画された。実験には PLD4 欠損マウスを用い、脳の生後発達段階および脱髄病態時における変化について解析を行った。

まず、発達期の野生型と PLD4 欠損マウスを用い各種組織染色による比較を行った。HE 染色では脳全体の構造、大きさおよび小脳皮質の層構造には PLD4 欠損による影響が見られないことが確認された。抗 Iba1 抗体を用いた免疫染色の結果、野生型では生後 5 日目には数多く見られていたアメボイド状のミクログリアが 7 日目の深部白質では少なくなった。一方、PLD4 欠損マウスでは多数のアメボイド状ミクログリアが依然として観察されることから PLD4 の欠損により活性化状態が続くことを明らかにした。ミクログリアの活性化タイプを抗 CD68 抗体を用いた免疫染色で解析したところ、この時期の正常な小脳白質に存在するミクログリアは CD68 の発現が高いのに対し、PLD4 欠損ミクログリアではその発現量が減少したことから、ミクログリアのフェノタイプが異なる可能性を見出した。さらに、arginase 1 抗体を用いた染色の結果から発生過程の小脳白質に存在するアメボイド活性化ミクログリアは典型的な M2 タイプとは異なることを明らかにした。抗 MBP 抗体を用いた染色では、生後 5 日目の深部白質および生後 7 日目の小葉部において PLD4 欠損マウスではミエリン形成前の未成熟なオリゴデンドロサイトが多く観察され、ミエリン形成が遅延していることを示した。加えて、PLD4 欠損マウスではオリゴデンドロサイト系譜細胞の総数や幼若オリゴデンドロサイトの数には大きな違いは無く、ミクログリアでの PLD4 欠損は、オリゴデンドロサイトの成熟を遅らせた可能性が示された。

次に、多発性硬化症の病態モデルを成熟マウスの野生型と PLD4 欠損マウスで作製し、脱髄時における PLD4 の役割を検討した。脱髄モデルにおいて、PLD4 欠損マウスでは脱髄の遅延あるいは再ミエリン化が起きている可能性が考えられた。さらに、脱髄病巣で観察されたミクログリアに形状の違いがあることから、PLD4 欠損によるミクログリアの変化が脱髄状態の違いに関わることも示された。

以上、本研究の結果から PLD4 の欠損はプルキンエ細胞やアストロサイトには明らかな影響は与えないが、ミクログリアの活性化状態に影響し、ミエリン形成や脱髄に変化が生じることが示された。発達期において、活性化ミクログリアはミエリン形成時期と密接に関連し、少なくともその役割の一部を PLD4 が担うことを明らかにした。PLD4 コンディショナルノックアウトマウスは様々なマウスとのかけ合わせによって PLD4 の発現量や発現時期を変えることができることから、今後の PLD4 の機能解析に有用であると期待される。

謝辞

本研究の実施にあたり，御多忙の中で終始温かい御指導，御鞭撻を賜り，また本論文の御校閲を懇切丁寧にして戴きました本学機能形態学教室，馬場広子教授に心から感謝の意を表します．

PLD4 に関する試料を供与して下さった東京理科大学教授 古市貞一博士に心から感謝致します．

PLD4 knock in マウスを作製して下さった慶應義塾大学 医学部 精神・神経科学准教授 田中謙二博士，新潟大学 脳研究所 細胞神経生物学分野教授 崎村健司博士，大谷嘉典博士に心から感謝致します．

さらに当研究に際し，数々の御指導，御助言，御協力を戴きました山口宜秀准教授をはじめ，林明子講師，石橋智子助教，濱恵美子さん，および機能形態学教室の山崎礼二さん，岩澤まりなさん，村田佳那恵さん，三谷勇樹さん，谷真琴さん，佐藤咲さん，渡辺広夢さん他多数の後輩方皆様に心から御礼申し上げます．

参考文献

- 1) Azevedo FA., Carvalho LR., Grinberg LT., Farfel JM., Ferretti RE., Leite RE., Jacob Filho W., Lent R., Herculano-Houzel S., *J Comp Neurol*, **513**, 532-41 (2009).
- 2) Mark F. Bear., Barry W. Connors., Michael A. Paradiso., Translation supervised by Kato K., Goto K., Fuji S., Yamazaki Y., “Sinkei Kagaku,” Nishimura-shoten Co., Ltd., Tokyo, 2007, pp. 19-42.
- 3) Haydon PG., *Nat Rev Neurosci*, **2**, 185-93 (2001).
- 4) Kudo Y., Koizumi S., Wada K., Hashimoto K., *Folia Pharmacol Jpm*, **130**, 185-192 (2007).
- 5) Tanaka H., Ma J., Tanaka KF., Takao K., Komada M., Tanda K., Suzuki A., Ishibashi T., Baba H., Isa T., Shigemoto R., Ono K., Miyakawa T., Ikenaka K., *J Neurosci*, **26**, 8363-71 (2009)
- 6) Ito M., “Nou Shinkei Kagaku,” Miwa-shoten Co., Ltd., Tokyo., 2003, pp.108-127.
- 7) Shibata K., Sugawara T., Fujishita K., Shinozaki Y., Matsukawa T., Suzuki T., Koizumi S., *PLoS One*, **6**, e23510 (2011).
- 8) Mikoshiba K., Shimizu T., “Nounohassei • bunka • kasosei,” Kyoritsu-shuppan Co., Ltd., Tokyo, 2002, pp. 67-111
- 9) Tuohy VK., Lu Z., Sobel RA., Laursen RA., Lees MB., *J Immunol*, **142**, 1523-7 (1989).
- 10) Mendel Il., Kerlero de Rosbo N., Ben-Nun A., *Eur J Immunol*, **25**, 1951-9 (1995)
- 11) Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Helmchen F., *Science*, **308**, 1314-8 (2005).
- 12) Pont-Lezica L., Béchade C., Belarif-Cantaut Y., Pascual O., Bessis A., *J Neurochem*, **119**, 901-8 (2011).

- 13) Marco Prinz & Josef Priller., *Nat Rev Neurosci*, **15**, 300-12 (2014).
- 14) Suzuki K., Sugihara G., Ouchi Y., Nakamura K., Futatsubashi M., Takebayashi K., Yoshihara Y., Omata K., Matsumoto K., Tsuchiya KJ., Iwata Y., Tsujii M., Sugiyama T., Mori N., *JAMA Psychiatry*, **70**, 49-58 (2013).
- 15) Dudvarski Stankovic N., Teodorczyk M., Ploen R., Zipp F., Schmidt MH., *Acta Neuropathol*, **131**, 347-63 (2016).
- 16) Yoshikawa F., Banno Y., Otani Y., Yamaguchi Y., Nagakura-Takagi Y., Morita N., Sato Y., Saruta C., Nishibe H., Sadakata T., Shinoda Y., Hayashi K., Mishima Y., Baba H., Furuichi T., *PLoS One*, **5**, e13932 (2010).
- 17) Gomez-Cambronero J., Di Fulvio M., Knapek K., *J Leukoc Biol*, **82**, 272-81 (2007).
- 18) Pedersen KM., Finsen B., Celis JE., Jensen NA., *J Biol Chem*, **273**, 31494-504 (1998).
- 19) van der Lee SJ., Holstege H., Wong TH., Jakobsdottir J., Bis JC., Chouraki V., van Rooij JG., Grove ML., Smith AV., Amin N., Choi SH., Beiser AS., Garcia ME., van IJcken WF., Pijnenburg YA., Louwersheimer E., Brouwer RW., van den Hout MC., Oole E., Eiriksdottir G., Levy D., Rotter JI., Emilsson V., O'Donnell CJ., Aspelund T., Uitterlinden AG., Launer LJ., Hofman A., Boerwinkle E., Psaty BM., DeStefano AL., Scheltens P., Seshadri S., van Swieten JC., Gudnason V., van der Flier WM., Ikram MA., van Duijn CM., *Nature*, **520**, E2-3 (2015).
- 20) Choi SY., Huang P., Jenkins GM., Chan DC., Schiller J., Frohman MA., *Nat Cell Biol*, **8**, 1255-62 (2006).
- 21) Gao Q., Frohman MA., *BMB Rep*, **45**, 7-13 (2012)
- 22) Otani Y., Yamaguchi Y., Sato Y., Furuichi T., Ikenaka K., Kitani H., Baba H., *PLoS One*, **6**, e27544 (2011).
- 23) Terao C., Ohmura K., Kawaguchi Y., Nishimoto T., Kawasaki A., Takehara K.,

- Furukawa H., Kochi Y., Ota Y., Ikari K., Sato S., Tohma S., Yamada R., Yamamoto K., Kubo M., Yamanaka H., Kuwana M., Tsuchiya N., Matsuda F., Mimori T., *Arthritis Rheum*, **65**, 472-80 (2013).
- 24) Jung S., Pausch H., Langenmayer MC., Schwarzenbacher H., Majzoub-Altweck M., Gollnick NS., Fries R., *BMC Genomics*, **22**, 623 (2014).
- 25) Tanaka KF., Ahmari SE., Leonardo ED., Richardson-Jones JW., Budreck EC., Scheiffele P., Sugio S., Inamura N., Ikenaka K., Hen R., *Biol Psychiatry*, **67**, 770-3, (2010).
- 26) Otani Y., Dr. Thesis, (2012).
- 27) Eric R. Kandel., James H. Schwartz., Thomas M. Jessell., Steven A. Siegelbaum., A.J. Hudspeth., "Principles of neural science," Fifth ed., McGraw-Hill, 2013, chapter forty two.
- 28) Sidman RL., Rakic P., *Brain Res*, **62**, 1-35, (1973).
- 29) Yamada K., Watanabe M., *Anat Sci Int*, **2**, 94-108, (2002).
- 30) Peferoen LA., Gerritsen WH., Breur M., Ummenthum KM., Peferoen-Baert RM., van der Valk P., van Noort JM., Amor S., *Acta Neuropathol Commun*, **3**, 87, (2015).
- 31) Sinha S., Boyden AW., Itani FR., Crawford MP., Karandikar NJ., **10**, 619, (2015).
- 32) Kariya Y., Kariya Y., Saito T., Nishiyama S., Honda T., Tanaka K., Yoshida M., Fujihara K., Hashimoto Y., *BBA Clin*, **3**, 126-34 (2015).
- 33) Tanaka T., Yoshida S., *Biomol Concepts*, **5**, 289-98, (2014).
- 34) Praet J., Guglielmetti C., Berneman Z., Van der Linden A., Ponsaerts P., *Neurosci Biobehav Rev*, **47**, 485-505, (2014).
- 35) Liu L., Belkadi A., Darnall L., Hu T., Drescher C., Cotleur AC.,

- Padovani-Claudio D., He T., Choi K., Lane TE., Miller RH., Ransohoff RM., *Nat Neurosci*, **13**, 319-26, (2010).
- 36) Matsushima GK., Morell P., *Brain Pathol*, **11**, 107-16, (2001).
- 37) Crain JM., Nikodemova M., Watters JJ., *J Neurosci Res*, **91**, 1143-51 (2013).
- 38) Liao B., Zhao W., Beers DR., Henkel JS., Appel SH., *Exp Neurol*, **237**, 147-52 (2012).
- 39) Miron VE., Franklin RJ., *J Neurochem*, **130**, 165-71, (2014).
- 40) Pont-Lezica L., Béchade C., Belarif-Cantaut Y., Pascual O., Bessis A., *J Neurochem*, **119**, 901-8, (2011).
- 41) Bruce D. Trapp., Steven E. Pfeiffer., Mihaela Anitei., Grahame J. Kidd., "MYELIN BIOLOGY and DISORDERS", San Diego, California, 2004, chapter two.
- 42) Ahrendsen JT., Macklin W., *Neurosci Bull*, **29**, 199-215, (2013).
- 43) Nave KA., Werner HB., *Annu Rev Cell Dev Biol*, **30**, 503-33, (2014).
- 44) Shigemoto-Mogami Y., Hoshikawa K., Goldman JE., Sekino Y., Sato K., *J Neurosci*, **34**, 2231-43, (2014).
- 45) Taveggia C., Feltri ML., Wrabetz L., *Nat Rev Neurol*, **6**, 276-87, (2010).
- 46) Holness CL., Simmons DL., *Blood*, **6**, 1607-13, (1993)
- 47) Matsumoto H., Kumon Y., Watanabe H., Ohnishi T., Shudou M., Ii C., Takahashi H., Imai Y., Tanaka J., *J Neurosci Res*, **5**, 994-1009, (2007).
- 48) Graeber MB., Streit WJ., Kiefer R., Schoen SW., Kreutzberg GW., *J Neuroimmunol*, **27**, 121-32, (1990).
- 49) Hoogland IC., Houbolt C., van Westerloo DJ., van Gool WA., van de Beek D., J

Neuroinflammation, **12**, 114, (2015).

- 50) Appel SH., Zhao W., Beers DR., Henkel JS., *Acta Myol*, **1**, 4-8, (2011).
- 51) Mikita J., Dubourdieu-Cassagno N., Deloire MS., Vekris A., Biran M., Raffard G., Brochet B., Canron MH., Franconi JM., Boiziau C., Petry KG., *Mult Scler*, **1**, 2-15, (2011).
- 52) Butovsky O., Landa G., Kunis G., Ziv Y., Avidan H., Greenberg N., Schwartz A., Smirnov I., Pollack A., Jung S., Schwartz M., *J Clin Invest*, **4**, 905-15, (2006).
- 53) Miron VE., Boyd A., Zhao JW., Yuen TJ., Ruckh JM., Shadrach JL., van Wijngaarden P., Wagers AJ., Williams A., Franklin RJ., ffrench-Constant C., *Nat Neurosci*, **9**, 1211-8, (2013).
- 54) Gudi V., Gingele S., Skripuletz T., Stangel M., *Front Cell Neurosci*, **8**, 10.3389, (2014).