

氏名（本籍）	ちば　てるまさ 千葉　輝正（東京都）
学位の種類	博　士（薬学）
学位記番号	博第 274 号
学位授与の日付	平成 28 年 7 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	PLD4 欠損マウス脳組織学的解析
論文審査委員	（主査） 教授 馬場 広子 教授 平野 俊彦 教授 田野中 浩一

## 論文内容の要旨

ヒトの脳は、神経細胞とほぼ同数のグリア細胞で構成されており、中枢神経系のグリア細胞には、アストロサイト、オリゴデンドロサイト及びミクログリアがある。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。オリゴデンドロサイトは膜の多重層構造であるミエリン（髄鞘）を神経細胞の軸索上に一定の間隔で形成し、跳躍伝導に加え様々な神経細胞の活動に関与している。ミクログリアは脳の免疫担当細胞として殺菌・細胞傷害性を示し、異物や残骸の除去を行うと考えられている。特に、ミクログリアは様々な神経系の病態に関与することから、中枢神経疾患の治療のターゲットとして注目されている。通常は静止期ミクログリアあるいはラミファイドミクログリアと呼ばれ、脳内に均等に分布し、分岐した細く長い突起を持ち、周囲の環境を監視するように突起を動かしている。脳組織で発生した異常を感知すると突起を退縮させ、細胞体が大きく丸く変化し活性化状態へと変化する。活性化されたミクログリアは分裂・増殖し、さらに遊走性を獲得する。この状態のミクログリアはアメボイドミクログリアと呼ばれ、病変部へ遊走し貪食作用を発揮する (Fig. 1)。



**Fig. 1 The three states of microglia.**

(modified from Neuroglia pp.86, 1995)

Phospholipase D (PLD) は、細胞膜構成主要リン脂質の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。この PLD は一次配列の相同性からファミリーを形成している。古典的なタイプの PLD1 及び PLD2 は白

血球の走化性や食作用に関与することが示唆されている。一方、新しい膜貫通タイプとして PLD3 と PLD4 などが存在する。PLD3 は、遅発性アルツハイマー病との関連が示唆されている。PLD4 は、生後初期の発達段階において、脳白質で活性化するミクログリアに選択的に発現し、増殖および貪食に関与することが示唆されている。また、ミエリンが崩壊する脱髄病態時に病巣近傍で活性化するミクログリアでも発現の増加が明らかにされている (Otani et al., *PLoS One*, 2011)。しかしながら、PLD4 はホスファチジルコリンをホスファチジン酸へと加水分解する古典的タイプが持つ酵素活性を示さないため、その機能は未だ不明で、発達過程及び病態時の活性化ミクログリアにおける役割についても明らかにされていない。そこで本研究では脳発達期や白質病変時の PLD4 の機能を明らかにするため、PLD4 欠損マウスを用いて小脳を中心に組織学的な解析を行った。

### PLD4 欠損マウスにおける発達期小脳の解析

PLD4 欠損マウスは、PLD4 遺伝子の翻訳開始コドンの前に STOP 配列が挿入されているため、ホモ接合体 (Ho) で PLD4 を発現しないマウスである (Fig. 2)。

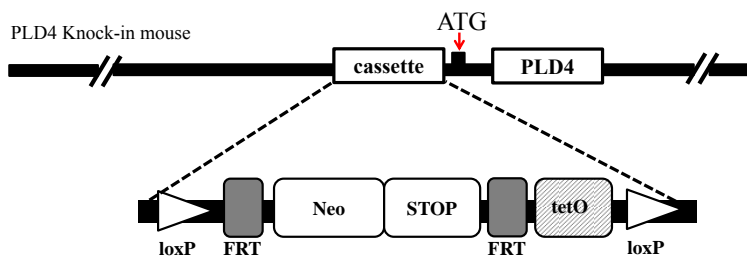
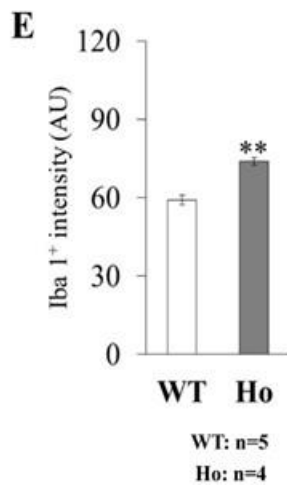
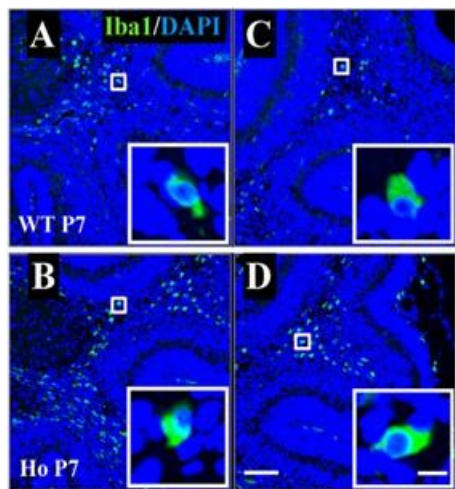


Fig. 2 Genome structure of the *PLD4* gene in PLD4 knock-in (PLD4-deficient) mice.

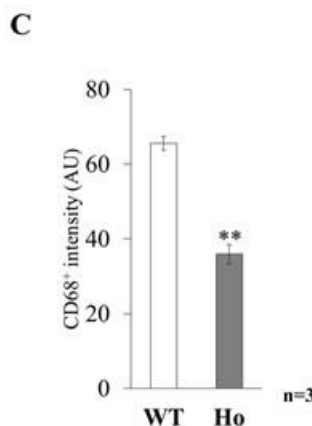
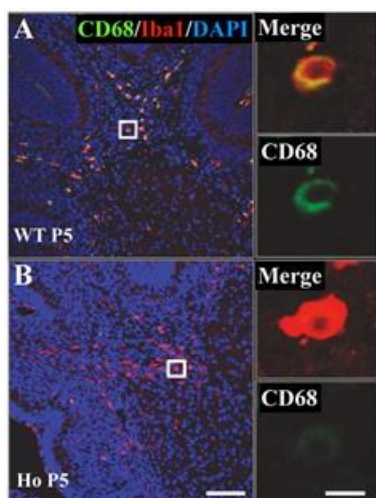
生後 7 日齢の脳のヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色では、脳全体の構造や小脳の層構造において PLD4 欠損による影響は観察されなかった。そこで発達過程の小脳白質で PLD4 を特異的に発現するミクログリアの状態を観察するため、活性化ミクログリアの指標となる Iba1 に対する抗体を用いて、生後 5 日 (P5) および 7 日 (P7) の小脳で、発達時期が早い深部白質とそれよりも遅れて発達する小葉先端部白質をそれぞれ比較した。その結果、野生型と PLD4 欠損マウス共に P5 と比較して P7 において、深部白質よりも小葉先端部白質でアメボイド状の Iba1 陽性細胞数が増加していた。特に、P5 および P7 の深部白質における個々の細胞の Iba1 陽性強度を定量的に比較したところ、野生型より PLD4 欠損マウスにおいて Iba1 陽性強度が有意に高いことが明らかとなった (Fig. 3)。



**Fig. 3 Microglial activation in the cerebella of PLD4-deficient mice at P7.**

Iba1-positive microglia in deep white matter (A, B) or folial white matter (C, D) of the cerebella obtained from wild type (WT; A, C) and PLD4-deficient (Ho; B, D) mice. Bar: 100  $\mu$ m (D), 10  $\mu$ m (in the white squares in D). (E) Intensities of Iba1 immunoreactivity in individual cells of the deep cerebellar white matter at P7. Graph indicates the mean  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.01$  by student *t* test.

Iba1 陽性ミクログリアの活性化は、主に炎症促進性の M1 ミクログリアと抗炎症性の M2 ミクログリアの 2 タイプに分けられる。そこで 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表現型が野生型と異なるかどうかを調べるため、M1 タイプのマーカーである CD68 と M2 タイプのマーカーである arginase 1 に対する抗体を用い、それぞれ Iba1 抗体との免疫二重染色を行った。その結果、深部白質に局在する全ての Iba1 陽性細胞は CD68 陽性であり、各々の CD68 陽性細胞の輝度は、野生型に比べて PLD4 欠損マウスで有意に減少していた (Fig. 4)。arginase 1 に関しては、野生型と PLD4 欠損マウス共に陽性シグナルは認められなかった。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。



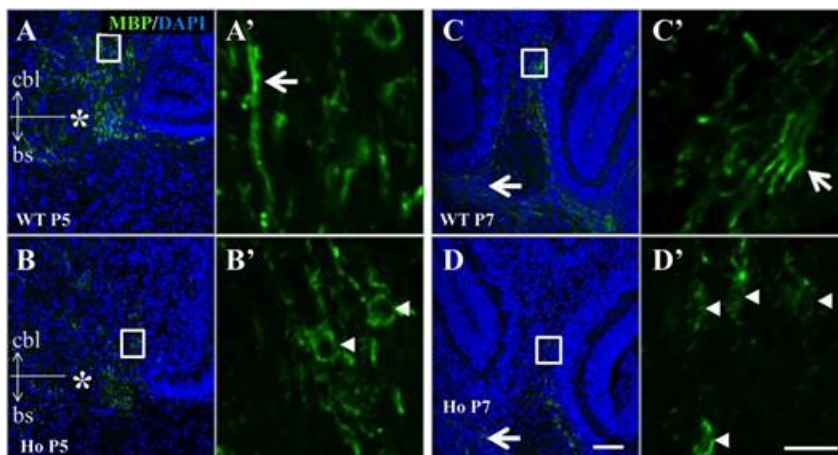
**Fig. 4 CD68 immunoreactivity of cerebellar microglia in PLD4-deficient mice.**

Double-labeling of cells by anti-Iba1 and anti-CD68 antibodies in the deep cerebellar white matter at P5 (WT, A; Ho, B). Bar: 100  $\mu$ m (B), 10  $\mu$ m (in the white square in B). (C) Intensities of CD68 immunoreactivity in individual cells of the cerebellar white matter at P5. Graph indicates the mean  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.01$  by student *t* test.

一方、小脳の発達過程で活性化するアストロサイトの状態および小脳皮質からの唯一の出力系であるプルキンエ細胞の発達に対しても PLD4 欠損の影響について調べた。その結果、アストロサイトの活性化指標マーカーである GFAP の陽性像およびプルキンエ細胞特異的マーカーである calbindin の陽性像に PLD4 欠損は影響しないことが示された。

### ミエリン形成に対する PLD4 欠損ミクログリアの影響

抗 Iba1 抗体とミエリンマーカーの MBP に対する抗体を用いた野生型での P7 小脳の免疫蛍光二重染色像から、ミエリン形成直前のオリゴデンドロサイトの近くに活性化したアメボイド状ミクログリアが多数局在していることが示された。このミクログリアの活性化とミエリン形成開始のタイミングから 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していると考えられた。そこで、P5, 7 および 10 の小脳の凍結切片を用いて抗 MBP 抗体による免疫組織染色を行った (Fig. 5)。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のに対し (Fig. 5A' 白矢印), PLD4 欠損マウスでは MBP 陽性ミ



**Fig. 5 Influence of PLD4 deficiency on cerebellar myelination.** Comparison of MBP immunoreactivity in the P5 cerebellar deep white matter tracts (WT, A; Ho, B) or the P7 cerebellar folial white matter (WT, C; Ho, D). A'-D' are higher magnification views of the white squares in A-D without DAPI.

White arrows, MBP positive myelinated fibers; white arrowheads, MBP positive premyelinating oligodendrocytes. Asterisk in A and B represents the border between the cerebellum (cbl) and the brainstem (bs) where myelination starts earlier than in cerebellum. Scale bar: 100  $\mu$ m (D), 20  $\mu$ m (D').

エリンはほとんど認められず、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が多く観察された (Fig. 5B' 白矢頭)。P7 の小葉部においても同様の変化が観察された (Fig. 5C' 白矢印, 5D' 白矢頭)。P10 では野生型と PLD4 欠損マウスの小脳で、このような差異は認められなかった。以上の結果から、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 では野生型に近づく可能性が示された。

次に、PLD4 欠損マウスのミエリン形成の遅延とオリゴデンドロサイトの分化との関連を調べるために代表的な分化マーカーを用いて解析した。オリゴデンドロサイト数の小脳における変化をオリゴデンドロサイト系譜細胞を染める抗 Olig2 抗体を用いて調べたところ、P5 と P7 共に深部白質における Olig2 陽性細胞数に違いは見られなかった。幼若なオリゴデンドロサイトマーカーである抗 NG2 抗体

で比較しても違いは見られなかった。一方，成熟オリゴデンドロサイトの出現を CC1 抗体を用いて比較したところ，CC1 陽性細胞は野生型では深部白質から小葉先端部まで広く存在していたのに対して PLD4 欠損マウスでは深部白質を中心に存在し小葉内では少なかった。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および幼若なオリゴデンドロサイト数には大きな違いはなく，オリゴデンドロサイトの成熟が遅れていることが示唆された。

### クプリゾン投与後の PLD4 欠損マウスの解析

さらに脱髄病態における 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与え，野生型と PLD4 欠損マウス脳梁の組織染色により脱髄状態を比較した。その結果，クプリゾン投与後 5 週目において PLD4 の欠損により見かけ上の脱髄が軽減されることを明らかにした。抗 Iba1 抗体と抗 MBP 抗体を用いた免疫蛍光二重染色の結果から，クプリゾン投与後において，野生型とは異なり PLD4 欠損マウスでは MBP 染色像がより残っており，太く丸い活性化したアメボイド状のミクログリアが多数存在することが明らかとなった。

### 総括

以上，本研究の結果から，PLD4 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ものの，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を生じさせることが示された。活性化ミクログリアはミエリン形成開始時期の決定や脱髄病態と密接に関連し，この過程に PLD4 が関与することを明らかにした。

### 【研究成果の掲載誌】

*Proceedings of the Japan Academy, Series B*, in press (2016)

## 論文審査の結果の要旨

近年、中枢神経系における各グリア細胞の役割が見直されてきている。特に本研究で注目しているミクログリアに関しては、正常脳においてセンサー細胞として神経細胞周囲の環境の変化を感知し、脳内ホメオスタシスにも重要な役割を果たしていることがわかってきた。また、正常脳の発達段階において、白質部分を中心として一過性に活性化ミクログリアが出現することも知られてきている。さらに、ひとたび脳内で病変を生じればミクログリアは活性化し、細胞障害性あるいは組織保護の両面に働き得る。このように脳の状態変化に応じて多様な役割を果たすミクログリアは、正常な脳構造の構築や維持のみでなく神経変性疾患などの病態にも深く関わることから、今後はミクログリアの役割を分子レベルで理解することが重要となる。

千葉氏の研究は、活性化ミクログリアに発現する **phospholipase D4 (PLD4)** に着目し、その役割を調べることにより活性化ミクログリアのはたらきを分子レベルで明らかにすることを目的としている。PLD4 は、発達期小脳白質で一過性に特徴的な発現様式を示す遺伝子として見出された。PLD4 はこれまでの研究により脳内では活性化ミクログリアに特異的に発現し、*in vitro* の解析からはミクログリアの貪食や増殖に関わることが示唆されている。千葉氏は、新潟大学崎村教授との共同研究で作成された PLD4 欠損マウスの正常発達段階および脱髄誘導後の脳組織を解析することにより、ミクログリアおよび他の脳構成細胞に対する影響を調べた。

まず、PLD4 が一過性に発現増加する生後発達期の脳における PLD4 欠損の影響を調べた。PLD4 の発現が増加する生後 5 日目 (P5) および 7 日目 (P7) の小脳凍結切片を各グリア細胞あるいは神経細胞マーカーの抗体を用いて免疫染色し、得られた結果を定量化した。その結果、PLD4 欠損マウスでは、活性化ミクログリアの出現時期に変化を生じ、さらに活性化ミクログリアの性質を示す分子の発現が野生型と異なり、活性化状態が異なることが明らかとなった。一方、小脳のプルキンエ細胞の発達やアストロサイトに対しては、免疫染色で明らかとなるような異常は観察されなかった。活性化ミクログリアが出現する P5 あるいは P7 の白質では、髄鞘形成が行われることが知られている。そこで、氏はこの時期の正常マウスの脳切片をミクログリアおよび髄鞘のマーカー抗体で 2 重染色することにより、活性化ミクログリアの出現部位と髄鞘形成との関係を調べた。その結果、活性化ミクログリアは主に髄鞘がこれから形成されていく白質部分に集積しており、髄鞘が形成された部分ではその形態が変化し、成熟した静止型ミクログリアの形状となることがわかった。氏は、さらに PLD4 欠損マウスでは髄鞘形成が野生型に比べて遅く開始されること、髄鞘形成細胞であるオリゴ

デンドロサイトの前駆細胞は欠損マウスでも野生型と同様に小脳内に移動しており、オリゴデンドロサイト系譜細胞（未熟な細胞から成熟して髄鞘を形成している細胞まで）数には有意な変化がないことを明らかにした。これらのことから、千葉氏の研究は、発達段階の白質で一過性に活性化するミクログリアが PLD4 を介して髄鞘形成の時期決めに関わることを明らかにした。

氏は、さらに PLD4 欠損マウスにクプリゾン含有飼料を 5 週間与えて脱髄モデルを作成し、脱髄が最も明らかな脳梁部位の組織染色により脱髄状態およびミクログリアの状態を野生型と比較した。その結果、PLD4 欠損マウスでは投与 5 週目において高度に活性化したアメボイド状のミクログリアが多数存在し、脱髄変化が野生型と比して明らかに軽度で、ミクログリアの PLD4 が病態に大きな影響を与えることを示した。

以上、本研究の結果から、ミクログリアにおける PLD4 欠損が発達期小脳ではミクログリアの活性パターンを変化させ、髄鞘形成に影響すること、クプリゾン誘導脱髄の病態を変化させることから、ミクログリアが髄鞘形成や脱髄病態に大きく関わり、PLD4 がそれに関与することを明らかにした。近年、白質障害と精神疾患との関わりも注目されていることから、千葉氏の研究成果が今後の脳発達および精神・神経疾患研究に生かされていくことが期待される。このように本論文は、今後の脳の基礎研究や疾患研究において価値ある情報を含んでおり、博士（薬学）の学位に十分値するものと判断した。