

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関名	山梨大学 山梨 GLIA センター
職名・氏名	特任助教 坂井 謙斗 ㊞

1 研究テーマ

ミクログリア由来の細胞外小胞によるアレルギー性皮膚炎に対する制御機構の解析

2 研究の目的

近年、脳と末梢臓器間の積極的な情報のやりとりが生体機能に与える重要性が注目されている。この脳・末梢臓器連関のインターフェースとして、ミクログリアに注目が集まっている。ミクログリアは脳内免疫細胞として、脳内環境変化を鋭敏に感知し応答することで、脳の恒常性維持において重要な役割を果たしている。近年、末梢の炎症等の脳外環境の変化をも感知することが明らかとなり、ミクログリアは末梢臓器の監視及び制御においても重要な役割を有すると考えられるようになっている。

ミクログリアと末梢臓器の情報伝達ツールの 1 つとして、細胞外小胞 (EV) が注目を集めている。多くの細胞が EV を産生し、ミクログリアも脳内 EV 産生細胞として注目され、実際ミクログリア由来の EV により脳の生理及び病態機能が制御されることが報告されている。申請者は、接触性皮膚炎モデルマウスにおいて、ミクログリアが EV の 1 つであるマイクロベシクル (MV、粒子径:100 nm-1 μ m) を血中に放出することを見出している。そこで、ミクログリア由来 MV を介した皮膚炎の制御機構を明らかにすることで、「脳 - 皮膚相関」の実態解明を計画するに至った。本研究では、「①脳はミクログリアを介して皮膚炎症を感知し、②MV を血中に放出することで皮膚炎症を制御している (図 1)」との仮説をたて、本研究では特に②に着目し、分子メカニズムとともにその検証を行う。

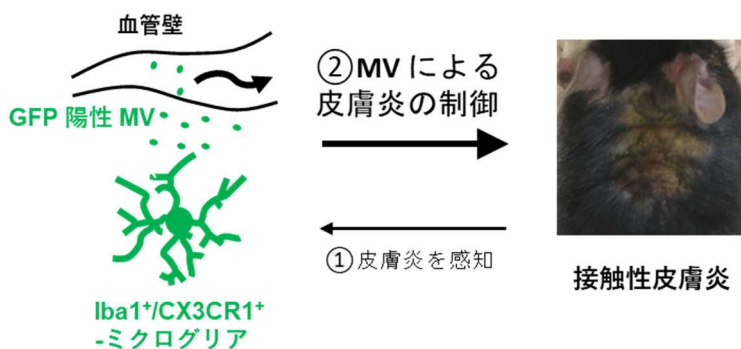


図 1. ミクログリア由来 MV による皮膚炎の制御機構の解明

3 研究の方法

・脳血管内におけるミクログリア由来 MV の観察

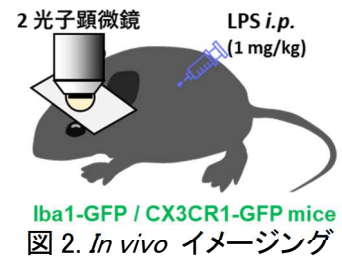
ミクログリアを可視化できる Iba1-GFP もしくは CX3CR1-GFP マウスの頭蓋骨に cranial window を作製後、2 光子顕微鏡を用いて脳頭頂部の *in vivo* イメージングを行うことで、GFP 陽性 MV を観察した (図 2)。末梢炎症は、リポポリサッカライド (LPS) を腹腔内投与、もしくは

留意事項

① 3 枚程度で作成してください。

② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

は、皮膚への 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) 塗布 (接触性皮膚炎モデル) により引き起こした。細胞除去として、PLX5622 を 2 週間負荷 (ミクログリア除去) もしくはクロドロン酸リポソームを腹腔投与 (マクロファージ除去) を用いた。



・ DNFB 誘導性接触性皮膚炎マウスモデル

背中 of 毛 (約 $1 \times 1 \text{ cm}^2$) を電気シェーバーで毛刈りをした後、0.5 % (w/v) DNFB (acetone : olive oil=4:1 溶液) $150 \mu\text{L}$ を毛刈りをした背中に塗布し感作を引き起こし、4 及び 5 日目それぞれに 0.2 % (w/v) DNFB (acetone : olive oil=4:1 溶液) $75 \mu\text{L}$ を塗布し接触性皮膚炎を引き起こした。行動実験用アリーナにマウスをいれ、マウスの自発的なひっかかり行動をビデオカメラで撮影した。マウスのひっかかり行動をカウントした。

4 研究の成果

・末梢炎症時におけるミクログリア由来の GFP 陽性 MV の検出

LPS を腹腔投与した後、*in vivo* イメージングを行ったところ、脳血管内に 2 種類の GFP 陽性の小胞 (大型:約 $10 \mu\text{m}$ /小型:約 $1 \mu\text{m}$) を認めた (図 3)。大型 GFP 陽性小胞は、LPS 投与後、1 日目に多く観察され、2 日目以降に一気に消失した。一方、小型 GFP 陽性小胞は、2 日目に最大となり、7 日目も認められ、14 日目に消失した。大型 GFP 陽性小胞は、末梢の単球・マ

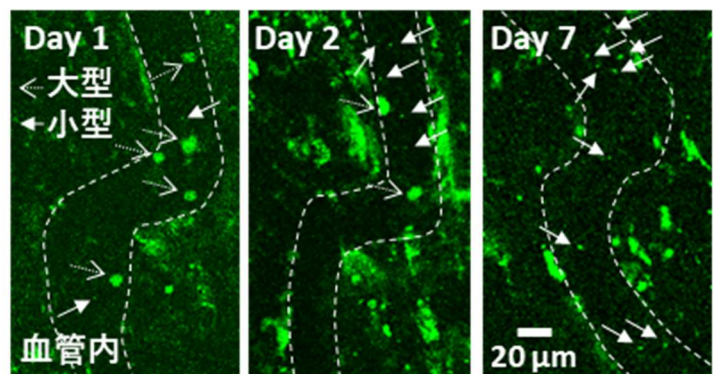


図 3. LPS 誘導性の大型および小型 GFP 陽性小胞の観察

クロファージを除去すると消失した。一方で、小型 GFP 陽性小胞はミクログリア除去により観察されなくなった。従って、大型 GFP 陽性小胞は末梢の単球もしくはマクロファージ由来、小型 GFP 陽性小胞はミクログリア由来であると考えられた。これらの実験結果から、LPS による末梢炎症を感知したミクログリアが MV に相当する EV を放出し、これが血管を介して末梢に輸送されていることが示唆された。

・ DNFB 誘導性接触性皮膚炎モデルにおけるミクログリア由来の GFP 陽性 MV の検出

DNFB 誘導性接触性皮膚炎モデルを Iba1 GFP マウスに適応し、*in vivo* イメージングで小型 GFP 陽性小胞を観察した。その結果、接触性皮膚炎モデルマウスにおいて、小型 GFP 陽性小胞が血中に認められた (図 4)。LPS による全身性の炎症のみならず、接触性皮膚炎モデルにおいても小型 GFP 陽性小胞が認められたこと

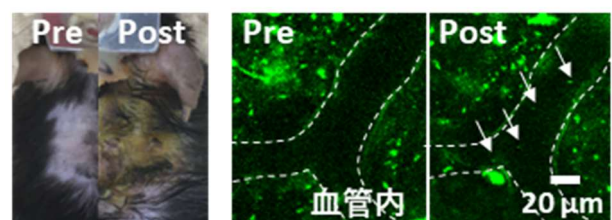


図 4. 接触性皮膚炎モデルマウスにおける小型 GFP 陽性小胞の観察

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

から、ミクログリアの MV 放出は一部末梢炎症に共通した現象であり、ミクログリアはこの MV により末梢炎症を制御している可能性が示唆された。

・ DNFB 誘導性接触性皮膚炎モデルの自発ひっかき行動におけるミクログリアの影響

PLX5622 を 2 週間負荷しミクログリアを除去したマウスで DNFB による接触性皮膚炎を引き起こしたところ、コントロール群 (AIN 負荷群) と比較し、ミクログリア除去による皮膚炎に対する影響は認められなかった (図 5)。一方で、ひっかき行動に対しては、ミクログリア除去群で、減少傾向が認められた。従って、ミクログリアは、接触性皮膚炎モデルにおいて皮膚の炎症には関与しない一方で、本モデルの痒みには関与していることが示唆された。

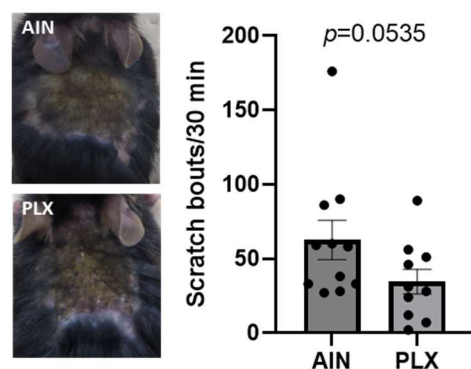


図 5. ミクログリア除去による皮膚症状およびひっかき行動に対する影響

5 今後の展望

本研究により、ミクログリアが LPS 投与や DNFB 塗布による接触性皮膚炎モデルといった一部末梢炎症に対し、MV を放出することで末梢炎症に応答するメカニズムが存在することが示唆された。さらに、ミクログリア除去により DNFB 誘導性接触性皮膚炎モデルの痒みが抑制されたことから、ミクログリアが痒みの経路に何らかの影響を与えていることが示唆された。

今後は、ミクログリア由来 MV が皮膚炎症部位に到達しているか、また痒み抑制効果を有するかを明らかにするため、ミクログリア由来 MV のトレーサー実験および皮膚へ投与時のひっかき行動実験を行う。トレーサー実験：Iba1-GFP もしくは CX3CR1-GFP マウスに DNFB 誘導性接触性皮膚炎モデルを適応し、遠心機を用いて血漿中の小型 GFP 陽性小胞を単離する。これを、接触性皮膚炎モデルを適応した C57BL6/J マウスに投与 (i.v.) した後、炎症及び非炎症部位の皮膚を採取し、GFP 陽性 MV が皮膚に到達したかを評価する。ひっかき行動実験：単離した GFP 陽性 MV を DNFB 誘導性接触性皮膚炎部位に投与し、痒みの抑制効果を検討する。

6 研究成果の発信方法 (予定を含む)

引き続き実験を続け、データが揃い次第、論文化する。また、下記 1 の学会発表を既に行っており、2024 年には下記 2 の学会発表を予定している。

1：第 96 回日本薬理学会 (2022 年)、一般口頭、3-B-O07-3、抹消の急性および慢性炎症モデルマウスにおけるミクログリア由来のマイクロベシクル分泌の観察、坂井 謙斗¹、小泉修一^{1、2}、¹山梨大 院医 山梨 GLIA センター、²山梨大 院医 薬理

2：NEURO2024 (2024 年)、一般ポスター (予定)、LPS による末梢炎症および接触性皮膚炎モデルにおけるミクログリアのマイクロベシクル放出、坂井 謙斗¹、小泉修一^{1、2}、¹山梨大 院医 山梨 GLIA センター、²山梨大 院医 薬理

留意事項

① 3 枚程度で作成してください。

② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。