

炎症性脱髄病巣におけるミクログリアの役割

山崎 亮¹⁾

要旨：実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルマウスの脱髄病変で活性化しているマクロファージには中枢神経ミクログリア由来のもの（MiDM）と末梢血単球由来のもの（MDM）があり、それぞれに特有の機序で病態形成に寄与する。単球は急性期に脊髄内に浸潤し脱髄を惹起するのに対し、ミクログリアは疾患ピーク時から回復期にかけて活性化し、髄鞘残渣を貪食する。MiDMとMDMは遺伝子発現パターンも大きくことなっており、これらの個別機能解析は脱髄性疾患のみならず他の神経炎症性疾患の病態解明および治療法開発に重要と思われた。

（臨床神経 2014;54:981-983）

Key words：多発性硬化症，実験的自己免疫性多発脳脊髄炎，単球，ミクログリア，マクロファージ

背景・目的

中枢神経疾患の病変部では、多数のミクログリア・マクロファージの活性化が観察される。これらの細胞はミクログリア由来のマクロファージ（Microglia derived macrophage; MiDM）と単球由来マクロファージ（Monocytes derived macrophage; MDM）からなる。しかしながら、これらの細胞はともにマクロファージであり、中枢神経病理組織染色でしばしばもちいられる Iba1 や CD45, CD68, CD11b などの表面マーカーでは区別不可能であることから、長年これらの細胞は「マクロファージ」と呼ばれ、ただ単に変性した神経細胞や髄鞘の残渣を貪食するために活性化しているものと考えられてきた。

ところが、2000年にマウスミクログリアを緑色蛍光タンパク EGFP で標識する方法が発明¹⁾されると、2005年に同マウス脳の *in vivo* イメージングによって“resting”ミクログリアが実は活発に活動していることが証明²⁾され、ミクログリアの平常時における機能について再検討がおこなわれるようになり、発生段階におけるミクログリアのシナプス刈り込みにかかわる重要な機能がみいだされた³⁾。さらに、2010年にマウス骨髄由来細胞、とくに単球に赤色蛍光タンパク RFP で標識する方法が開発⁴⁾されると、マウス中枢神経炎症性病変における MiDM と MDM との個別機能解析が可能となった。また、単球とミクログリアは発生学的にもまったくことなることが明らかとなり⁵⁾⁶⁾、ミクログリアが従来考えられてきた以上に中枢神経系のホメオスタシスに関与し、中枢神経疾患の病態形成にも深くかかわっていることが明らかとなりつつある。

今回われわれは、上記方法により作成された CCR^{2RFP/+}; CX3CR1^{GFP/+} マウスに実験的自己免疫性脳脊髄炎（Experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE）を誘導し、急性期病変を中心に MiDM および MDM の個別機能解析を組織学的・生化学的におこなった。なお、本研究内容の詳細は文献を参照されたい⁷⁾。

方法

CCR^{2RFP/+}; CX3CR1^{GFP/+} マウス（24～26 週齢，C57B6 系統）に、myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) peptide 35-55 をもちいて、常法にしたがい EAE を誘導し、急性期、極期、回復期における腰髄サンプルの組織学的評価をおこなった。また、これらのマウス脊髄から RFP 陽性 MDM と GFP 陽性 MiDM をセルソーターにて分離採取し、生化学的解析にもちいた。

結果

MiDM と MDM は CCR^{2RFP/+}; CX3CR1^{GFP/+} マウス EAE 病変部においてそれぞれ GFP 陽性細胞および RFP 陽性細胞として明確に区別された。これらの細胞は活性化の時期などがまったくことなっていた（Fig. 1）。MiDM, MDM の浸潤・活性化パターンは各細胞に特異的であったことから、病態形成におけるそれぞれ独立した機能が示唆された。また、これらの細胞をセルソーターで分離採取し mRNA の発現を病期ごとに比較したところ、MiDM と MDM では発現遺伝子の種類のみならず、その活性化時期もことなっていた（Table 1）。組織学的にも、MDM は iNOS, IL-1 β を発現していたのに対し、MiDM はこれら炎症性サイトカインの発現はほぼみられなかった。すなわち、MDM は急性期に活性化し、炎症性遺伝子を発現していたのに対し、MiDM は極期および回復期に活性化し、ホメオスタシスや神経保護的遺伝子を発現する傾向があった。これらの結果から、MDM は EAE 急性期に脊髄病変に浸潤し、脱髄を惹起するのに対し、MiDM は極期および回復期に活性化し、髄鞘残渣などを貪食することによってホメオスタシスの維持に寄与している可能性が示唆された。以上の結果をふまえ、電子顕微鏡においてさらに組織学的解析をおこなったところ、MDM はランヴィエ絞輪部に接

¹⁾ 九州大学大学院医学研究院神経治療学〔〒 812-8582 福岡県福岡市東区馬出 2-12-16-304〕

（受付日：2014 年 5 月 23 日）

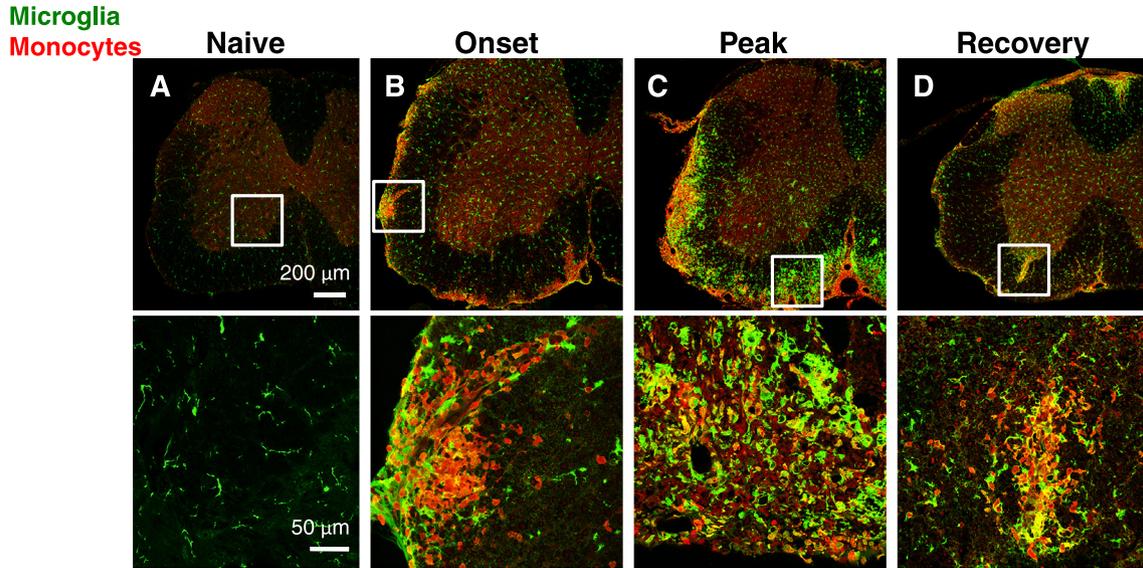


Fig. 1 EAE 腰髄病変での病期別病理組織画像.

A : EAE 誘導前は, 腰髄には ramified type microglia が GFP 陽性細胞として確認されたが, RFP 陽性細胞はみられない. B : 急性期には RFP 陽性の MDM が血管周囲および髄膜から浸潤する. C : 極期には GFP 陽性のミクログリアもいわゆる ameboid type の MiDM に活性化. D : 回復期には双方の細胞数減少がみられた. 赤 : RFP, 緑 : GFP. スケールバー : 上段 200 μm, 下段 50 μm.

Table 1 EAE 脊髄から分離採取した MDM および MiDM の病期別発現遺伝子解析結果 (一部).

病期	発症期		極期		回復期	
	MDM	MiDM	MDM	MiDM	MDM	MiDM
IL-1β	+++	±	++	+	+	+
iNOS	+++	+	+	±	+	±
IL-10	+	±	+	±	+	±
IL-6	+	-	-	++	-	++
IGF-1	+	++	+	+++	+	++
TGF-β	+	+	+	++	+	++
TNF-α	+	+	+	+	+	+

EAE 各病期別に採取した MDM, MiDM から mRNA を抽出し, 各遺伝子の発現レベルをリアルタイム rt-PCR にて定量解析した.

して髄鞘を破壊貪食していたのに対し, MiDM はランヴィエ絞輪部に接しているような所見はなかった. また, ファゴソームの大きさに関しても, MDM と比較し MiDM ではより大きな髄鞘残渣を内包している傾向がみられた. このことから, MDM は早期に浸潤して髄鞘を破壊貪食・消化するのにに対し, MiDM は周囲の比較的大きな髄鞘残渣を貪食している可能性が示唆され, 双方の病態形成における機能的分化が証明された.

考察

MDM は, 健常時は骨髄で分化した後に単球として脾臓にプールされ, 炎症発症時にその部位へ動員される. 一方, ミ

クログリアは神経細胞のシナプス刈り込みや髄鞘のターンオーバーに深く関与しており, 健常時も活発に活動しているが, 中枢神経系の異常を感知すると MiDM へと変化する. 従来はこの MiDM も, 髄鞘を貪食していることから髄鞘の破壊に直接関与しているものと考えられてきたが, 今回の研究では, MiDM は脱髄よりも髄鞘残渣のクリアに関与している可能性が示された. ミクログリアは元来, オプソニン化された物質表面の補体を補体受容体 (CR) 分子で認識し, 受動的貪食をおこなう一方, 単球は抗体でオプソニン化された物質を FcR で認識し能動的に貪食する⁸⁾. その際のサイトカイン放出は FcR を介した貪食でより多く, 炎症を惹起する方向に働くと考えられている. 今回 MDM が最初に浸潤し, 髄鞘貪食をランヴィエ絞輪部から開始していたことは, MDM が抗体

を認識し、炎症性脱髄を惹起していることを示していた。このことから、本モデルマウスにおいては、単球が急性期脱髄の原因細胞であることはほぼまちがいない。実際に、CCR2をノックアウトし単球の遊走を抑制すると、EAEの発症遅延と軽症化がみられる⁷⁾。しかし完全抑制はできないことから、単球だけが原因細胞ではないことも明らかである。さらに、単球の流入は初期のみで、極期および回復期はミクログリアが活性化していたことから、慢性進行期には末梢血の炎症細胞よりむしろ中枢神経系のグリア炎症が関与している可能性もある。

結論

今回の研究により、MDMとMiDMの組織学的・形態学的相違点のみならず、生化学的・遺伝学的相違に関してもより明確となり、EAE急性期病態形成における各細胞の機能的分化がはじめて示された。MDMはランヴェイ絞輪部を標的として脱髄を惹起し、MiDMはむしろ極期から回復期にかけて炎症反応を収束させる作用が示唆された。多発性硬化症およびその他の中枢神経疾患の病態解明および治療薬開発において、MDMとMiDMの個別解析の重要性が示唆された。

※本論文に関連し、開示すべきCOI状態にある企業・組織や団体神経治療学寄付講座(2012.10-) バイエル・シエリング・ファーマ、バイオジェン・アイデック、ノバルティスファーマ、田辺三菱製薬株式会社。

文 献

- 1) Jung S, Aliberti J, Graemmel P, et al. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 2000;20:4106-4114.
- 2) Davalos D, Grutzendler J, Yang G, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 2005;8:752-758.
- 3) Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 2012;74:691-705.
- 4) Saederup N, Cardona AE, Croft K, et al. Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. *PLoS One* 2010; 5:e13693.
- 5) Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 2010;330:841-845.
- 6) Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 2012;336:86-90.
- 7) Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, et al. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med* 2014;211:1533-1549.
- 8) Smith ME. Phagocytic properties of microglia in vitro: implications for a role in multiple sclerosis and EAE. *Microsc Res Tech* 2001;54:81-94.

Abstract

The role of microglia in inflammatory demyelination lesion in the central nervous system

Ryo Yamasaki, M.D., Ph.D.¹⁾

¹⁾Department of Neurological Therapeutics, Neurological Institutes, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

In the lesion of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), two different kinds of macrophages are activated: microglia derived macrophages (MiDM) and monocytes derived macrophages (MDM). These macrophages elicit different functions in the development of demyelination lesions in EAE. MDMs are infiltrated in the acute phase of EAE, and initiate demyelination at the nodes of Ranvier. On the other hands, MiDM always activated at the peak and the chronic stage of the disease. These macrophages express totally different cytokines at different time course of the disease: MDM are activated in the early stage of the disease and express genes that are mainly related to inflammation, while MiDM are activated at the peak and recovery stage and express genes that are related to homeostasis. Our findings provide the idea to develop new therapeutic strategy not only for demyelinating disease but also other neurological diseases with neuro-inflammation.

(*Clin Neurol* 2014;54:981-983)

Key words: multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, monocyte, microglia, macrophage