

氏名	ふるべ えりこ 古部 瑛莉子
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第911号
学位授与の日付	平成31年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 バイオテクノロジー専攻
学位論文題目	Dynamics of neural stem cells and microglia in the circumventricular organs of the adult mouse brain (成体マウス脳室周囲器官の神経幹細胞とミクログリアのダイナミックス)
審査委員	(主査)教授 宮田清司 教授 山口政光 教授 片岡孝夫

論文内容の要旨

視床下部や延髄などの脳幹は、体温、浸透圧、イオン濃度、血圧などの恒常性を維持する生命活動に不可欠な機能を持つため、脳幹の機能障害は致命的な障害をもたらす。一般に、脳は血液中の分子が脳へ侵入しないように血液脳関門というバリアを持つ。しかし、脳室周囲器官と総称されるいくつかの脳幹部は血液脳関門を欠き血液情報を直接的に感知し、その情報を他の脳部位にフィードバックすることで恒常性を維持している。よって、このフィードバックシステムが攪乱されると様々な疾病を発症する。

本申請論文は、序論、第1章「脳室周囲器官における神経幹細胞のダイナミックス」、第2章「リポ多糖による炎症時のミクログリアのダイナミックス」から構成されている。序論では、脳室周囲器官が、血液と脳のバリアである血液脳関門を欠く有窓性血管を有し、血液中分子を直接認識するセンサー受容体を発現していること、さらに脳内免疫系の活性化に重要な部位であることを解説している。さらに、成体における神経幹細胞、脳内炎症反応の機序及びミクログリアの増殖について概説している。第1章では、脳室周囲器官に神経幹細胞が存在し、視床下部や延髄などの幅広い脳幹部に新しい細胞を供給していることをまとめている。第2章では、細菌感染による炎症時に、脳室周囲器官を含む多くの脳幹部でミクログリアの増殖が起きていることを解説している。

第1章では、成体マウスの脳室周囲器官における神経幹細胞の存在とその特徴について述べている。成体哺乳類における神経幹細胞については、20年ほど前に海馬と側脳室下帯でその存在が報告され確立しているが、視床下部や延髄などの脳幹における神経幹細胞の存在については確定していない。申請者は、神経幹細胞特異的に蛍光タンパク質を発現する Nestin-CreERT2/CAG-CAT^{loxP/loxP}-EGFP マウスやチミジンアナログ Bromodeoxyuridine を用いた免疫組織化学から、脳室周囲器官である終板脈管器官、脳弓下器官、最後野の3部位においてアストロサイト様神経幹細胞と上衣細胞層に存在するタニサイト様神経幹細胞の2種類の神経幹細胞があることを明らかにした。さらに、神経幹細胞の分化について調べたところ、脳室周囲器官だけでなく隣接した視床下部や延髄部位にも新しい神経細胞、オリゴデンドロサイト、あるいはアストロサイトが供

給されていることを明らかにした。また、グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分で内毒素であるリポ多糖の腹腔内投与により炎症刺激を与えたところ、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖が有意に抑制されることを示した。これらの結果は、神経幹細胞が新しい細胞を供給するシステムが、成体の脳幹においても存在することを始めて明らかにしたものであり、脳幹の機能修復に関与する可能性が示唆された。

第2章では、細菌感染による炎症時に脳室周囲器官を中心に幅広い脳部位でミクログリアが増殖することを述べている。ミクログリアは、脳の免疫担当細胞として不要な細胞や物質等を貪食し、脳環境の恒常性維持に関わっている。また、感染時にはミクログリアがサイトカインなどを放出することで、脳神経系を活性化し、体温上昇、自律神経系や免疫系を制御することが知られている。一方、鬱病や統合失調症などの精神疾患においてはミクログリアが異常に活性化されていることや脳梗塞やアルツハイマー病においてはミクログリアの増殖が疾病症状を悪化させるなどの負の作用も報告されている。申請者は、発熱を伴う程度の低濃度リポ多糖投与による炎症刺激によっても、脳室周囲器官およびその隣接脳部位において顕著なミクログリア増殖が起きることを明らかにした。一方で、敗血症様症状を引き起こす高濃度リポ多糖投与は、脳室周囲器官と隣接部位に限らず、視床下部、延髄および辺縁系を含む広い脳部位でミクログリア増殖を誘起した。これらのミクログリア増殖は一過的であり、ミクログリア密度は3週間以内に正常レベルに戻っていることを示した。以上の結果より、ミクログリア増殖は重篤な脳疾病だけでなく細菌感染などの炎症によっても内毒素の濃度と脳部位に依存して誘起されることが示された。このことは、細菌やウイルス感染によるミクログリア増殖が脳の炎症時に普遍的に起きていることを示し、重度の感染症が脳疾病を発症させる仕組みの解明に繋がると考えられる。

論文審査の結果の要旨

視床下部や延髄などの脳幹は、体温、体液組成、血圧などの恒常性維持に必要な不可欠な機能を持つので、生命維持に必須の脳部位である。脳はこの脳幹にある脳室周囲器官において血液情報などの末梢情報を感知し異常をモニターしており、この部位の機能障害は重篤な病気を発症する。

申請者は、脳幹にある脳室周囲器官における神経幹細胞とミクログリアのダイナミクスについて成体マウスを用いて研究を行った。まず、申請者は Nestin-CreERT2/CAG-CAT^{loxP/loxP}-EGFP トランスジェニックマウスとチミジンアナログを用いた免疫組織化学により、脳幹にある脳室周囲器官の3部位においてアストロサイト様神経幹細胞とタニサイト様神経幹細胞の2種類の神経幹細胞が存在することを明らかにした。さらに、神経幹細胞の分化について調べたところ、脳室周囲器官だけでなく隣接した脳部位にも新しい神経、オリゴデンドロサイト、アストロサイトが供給されていることを示した。この結果は、成体脳の視床下部や延髄において神経幹細胞が新しい細胞を供給していることを明らかにしたものである。さらに、これらの神経幹細胞は脳幹の機能障害による脳疾病の機能修復に関与することが示唆された。

次に、申請者は細菌感染によるモデルシステムであるグラム陰性菌由来内毒素リポ多糖の投与による炎症刺激でも脳内のミクログリアが増殖することを示した。申請者は、発熱を生じる程度の低濃度リポ多糖投与による炎症刺激により、脳室周囲器官およびその隣接脳部位において一過性のミクログリアの増殖が起きることを明らかにした。さらに、敗血症様症状を引き起こす高濃

度リポ多糖投与は、脳室周囲器官だけでなく、視床下部、延髄および辺縁系を含む広い脳部位でミクログリア増殖を誘起することを示した。従来、ミクログリア増殖は脳梗塞やアルツハイマー病などの重篤な病態時にのみ誘起されると考えられてきた。しかし、申請者の結果は、重篤な脳疾病だけでなく細菌感染などの炎症によってもミクログリア増殖が生じることを示した。細菌やウイルス感染によるミクログリア増殖は、炎症時に普遍的に起きていることが新たに判明し、炎症による脳疾病発症の原因となることが示唆された。

これらの研究は、脳幹の脳室周囲器官において、神経幹細胞の存在とその意義を証明しただけでなく、細菌感染などによる炎症時にミクログリアが増殖することを証明した学術的意義が非常に高い研究である。また、これらの研究は、医学・薬学的意義も大きく、脳幹の異常に派生する治療方法の開発や感染による脳疾病の原因解明に貢献する可能性がある。

学位論文の基礎となった論文は、申請者が筆頭著者である査読制度の確立されている下記の国際科学雑誌 2 編に掲載されている。

[公表論文]

- 1). Eriko Furube, Mitsuhiro Morita, and Seiji Miyata: Characterization of neural stem cells and their progeny in the sensory circumventricular organs of adult mouse. *Cell and Tissue Research*, Vol. 362, pp. 347-365, 2015.
- 2). Eriko Furube, Shintaro Kawai, Haruna Inagaki, Shohei Takagi & Seiji Miyata: Brain Region-dependent Heterogeneity and Dose-dependent Difference in Transient Microglia Population Increase during Lipopolysaccharide-induced Inflammation. *SCIENTIFIC REPORTS*, Vol. 8, 2203, 2018.

参考論文として、申請者が筆頭著者である 1 編を含む国際科学雑誌 12 編に掲載されている。

[参考論文]

- 3). Daishi Hiratsuka, Eriko Furube, Katsutoshi Taguchi, Masaki Tanaka, Mitsuhiro Morita, Seiji Miyata: Remyelination in the medulla oblongata of adult mouse brain during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 319, pp. 41-54, 2018.
- 4). Shohei Takagi, Eriko Furube, Yousuke Nakano, Mitsuhiro Morita, Seiji Miyata: Microglia are continuously activated in the circumventricular organs of mouse brain. *Journal of Neuroimmunology*, pii: S0165-5728(17)30384-3, 2017.
- 5). K. Nishikawa, E. Furube, S. Morita, N. Horii-Hayashi, M. Nishi, S. Miyata: Structural Reconstruction of the Perivascular Space in the Adult Mouse Neurohypophysis During an Osmotic Stimulation. *Journal of Neuroendocrinology*, Vol. 29 (2), 2017
- 6). Ayaka Yoshida, Eriko Furube, Tetsuya Mannari, Yasunori Takayama, Hiroki Kittaka, Makoto Tominaga & Seiji Miyata: TRPV1 is crucial for proinflammatory STAT3 signaling and thermoregulation-associated pathways in the brain during inflammation. *SCIENTIFIC REPORTS*, Vol. 6, 26088, 2016.
- 7). Shohei Fukushima, Kazunori Nishikawa, Eriko Furube, Shiori Muneoka, Katsuhiko Ono, Hirohide Takebayashi, Seiji Miyata: Oligodendrogenesis in the fornix of adult mouse brain; the effect of LPS-induced inflammatory stimulation. *BRAIN RESEARCH*,

Vol. 1627, pp. 52-69, 2015.

- 8). Shohei Fukushima, Eriko Furube, Masanobu Itoh, Toshihiro Nakashima, Seiji Miyata: Robust increase of microglia proliferation in the fornix of hippocampal axonal pathway after a single LPS stimulation. *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 285, pp. 31-40, 2015.
- 9). Shoko Morita, Eriko Furube, Tetsuya Mannari, Hiroaki Okuda, Kouko Tatsumi, Akio Wanaka & Seiji Miyata: Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell and Tissue Research*, Vol. 363, pp. 497-511, 2015.
- 10). Yousuke Nakano, Eriko Furube, Shoko Morita, Akio Wanaka, Toshihiro Nakashima, Seiji Miyata: Astrocytic TLR4 expression and LPS-induced nuclear translocation of STAT3 in the sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 278, pp. 144-158, 2015.
- 11). Shoko Morita, Eriko Furube, Tetsuya Mannari, Hiroaki Okuda, Kouko Tatsumi, Akio Wanaka and Seiji Miyata: Vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis and dynamic vascular plasticity in the sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell and Tissue Research*, Vol. 359, pp. 865-884, 2015.
- 12). Eriko Furube, Tetsuya Mannari, Shoko Morita, Kazunori Nishikawa, Ayaka Yoshida, Masanobu Itoh, Seiji Miyata: VEGF-dependent and PDGF-dependent dynamic neurovascular reconstruction in the neurohypophysis of adult mice. *Journal of Endocrinology*. Vol. 222, pp. 161-179, 2014.
- 13). Tetsuya Mannari, Hayato Sawa, Eriko Furube, Shohei Fukushima, Kazunori Nishikawa, Toshihiro Nakashima and Seiji Miyata: Antidepressant-induced vascular dynamics in the hippocampus of adult mouse brain. *Cell and Tissue Research*, Vol. 358, pp. 43-55, 2014.
- 14). Tetsuya Mannari, Shoko Morita, Eriko Furube, Makoto Tominaga and Seiji Miyata: Astrocytic TRPV1 Ion Channels Detect Blood-Borne Signals in the Sensory Circumventricular Organs of Adult Mouse Brains. *GLIA*, Vol. 61, pp. 957-971, 2013.