©2024 筑波大学生物学類

脳室周辺のグリア細胞による脳実質の恒常性制御

宇野　めぐみ（筑波大学 生物学類）　　指導教員：鶴田　文憲（筑波大学 生命環境系）

【背景と目的】

哺乳動物は、体温を一定の温度域に維持するために環境の変化に応じて体温制御を行っている。この体温制御機構は、脳の視床下部に存在する神経細胞によって制御されている。これまで当研究室では、体温制御に関わる候補因子として、RNA binding motif protein3（RBM3）に着目してきた。RBM3 は低温応答性の RNA 結合タンパク質で、脳内では視床下部で強く発現することを見出している。また、この RBM3 を全身で欠損させた RBM3 ノックアウト（KO）マウスでは、低温刺激に対して体温が維持できなくなることから、RBM3 は体温を一定に留めておく制御因子であることが示唆されている。しかしながら、脳内における RBM3 発現制御機構の詳細は明らかになっていない。

先行研究から、哺乳動物における RBM3 の発現は周期性を持ち、体温が低下する睡眠時に発現が上昇することが報告されている。興味深いことに、近年、睡眠時の哺乳動物の脳内では、脳と脊髄を循環する組織液である脳脊髄液（CSF）の流量が増加することも報告されている。また CSF は様々な成長因子や栄養因子を含み、脳の恒常性維持に重要である。例えば、IGF1 などの成長因子は、脳室壁の表面に存在する上衣細胞に取り込まれ、突起の先端に輸送される。上衣細胞は周辺のアストロサイトと相互作用することから、CSF から取り込まれた因子がアストロサイトを制御し、脳室近傍の神経細胞の機能を調節している可能性が考えられた。そこで本研究では、脳室の CSF 流入に伴う上衣細胞とアストロサイト間の連絡が、神経細胞における RBM3 発現を制御するか解明することを目的とした。

【方法】

（1）免疫組織染色

アストロサイトの解析は、アストロサイトを GFP で蛍光標識させた遺伝子改変マウス（ALDH1L1-GFP マウス）を使用した。P20 の ALDH1L1-GFP マウスを灌流し、脳を摘出した後に 4 % PFA/PBS 溶液を用いて一晩浸透固定した。その後 30 %スクロース/PBS 溶液で置換し、30 %スクロース/OCT compound（1:1）で包埋した。その後クライオスタットを用いて厚さ 30 μm の冠状断面の切片を作製した。作製した凍結切片は、5 %BSA/0.25 %Triton X-100/PBS 溶液を用いて室温で 1 時間処理した。染色は、アストロサイトを検出するため抗 GFP 抗体（1:500）を、核を染色するために DAPI（1:1000）および Hoechst33342（1:1000）を用いた。染色画像は共焦点レーザー顕微鏡（ZEISS, LSM710）で Z-stack 画像を 1 μm 間隔で 30 枚撮影した。

（2）エバンスブルーの局所投与

P20 の野生型（WT）マウスおよび RBM3 KO マウスに、CSF 中のアルブミンを染色するエバンスブルーを局所投与した。はじめにイソフルランで麻酔し、脳定位固定装置（Narishige, IMS-20、Narishige, SR-AM）に固定した。側脳室に注入するために、5 μL ハミルトンシリンジ（Hamilton, 75N）をブレグマから AP: +0.5 mm, ML: +1.0 mm, DV: −2.5 mm の位置に挿入した。その後エバンスブルーを 0.2 μL/min で 1 μL 投与した。注入後、ハミルトンシリンジは逆流を防ぐために 5 分間静置した。注入後 24 時間後に灌流固定を行い、サンプルを作成した。

【結果】

はじめに、視床下部に位置する第三脳室周辺のアストロサイトの発現を観察するため、ALDH1L1-GFP マウスの免疫組織染色を行った。この際 E18 と P20 という異なる発達段階のマウスを用いて、神経細胞やグリア細胞の分化が未完成な胎児期と、分化が完了した成熟期について比較実験を行った。その結果、E18 では ALDH1L1 陽性細胞は第三脳室周辺の上部で多く、下部ではほとんど観察されなかった。一方 P20 では一様な分布が観察された。このことから、成熟期と比べて胎児期ではアストロサイトが第三脳室周辺において特徴的な分布パターンを示すことが分かった。

次に、このような分布パターンと CSF の脳実質への流入場所に関係があるかを検証するため、P20 の WT マウスにおいてエバンスブルーの局所投与を行った。その結果、エバンスブルーの脳実質への流入場所は各脳室で一様に観察された。P20 の ALDH1L1-GFP マウスでは ALDH1L1 陽性細胞が一様に分布していることから、アストロサイトの分布と CSF の流入場所が一致していることが示された。

次に、CSF の脳実質への流入量が RBM3 の発現の有無によって変化するかを検証するために、WT マウスと RBM3 KO マウスを用いて同様の実験を行った。その結果、RBM3 KO マウスの流入量は WT マウスと比べて減少していた。このことから、RBM3 KO マウスでは CSF の脳実質への流入効率が低下している可能性が考えられた。

【展望】

本研究では、ALDH1L1-GFP マウスを用いて発達段階における第三脳室周辺のアストロサイトの異なる分布パターンを示した。今後は、P20 の WT マウスにおける脳室周辺の上衣細胞や神経細胞の発現を観察するために、免疫組織染色を行いたいと考えている。また、TGF β や IGF1 などの成長因子を導入した AAV を作成し各脳室に導入することで、上衣細胞とアストロサイト間の成長因子の連絡を観察したいと考えている。また、RBM3 KO マウスでは CSF の流入量が WT マウスに比べて少なかったことから、CSF 中の成長因子の透過性が低下している可能性が考えられる。RBM3 は神経新生に働くことから、RBM3 KO マウスでも上記の実験を行うことで、CSF の流入に伴う成長因子の神経細胞への影響は、神経新生に関与するか明らかにしたいと考えている。