

## 統合失調症関連キネシン KIF17 がミクログリア形態変化において果たす役割の解明

日向寺 光洋 (筑波大学生物学類)

指導教員: 武井 陽介 (筑波大学医学医療系)

## 【背景・目的】

キネシンスーパーファミリータンパク質 (KIFs) は微小管に沿って積み荷 (カーゴ) を輸送するモータータンパク質であり、哺乳類において 45 種類の遺伝子が同定されており、15 のファミリーに分類される<sup>1</sup>。

KIF17 は、kinesin-2 ファミリーに属する順行性キネシンであり、神経細胞の樹状突起において NMDA 受容体サブユニット 2B(NR2B)を輸送することで、シナプス可塑性に寄与することが知られている<sup>1,2</sup>。また、KIF17 の機能障害は精神疾患と関連しており、先行研究では統合失調症患者一例において、KIF17 の遺伝子内にナンセンス変異を有することが確認されている<sup>3</sup>。この変異は KIF17 のカーゴ結合領域の欠失を引き起こすため、KIF17 による輸送が障害されると考えられる。

一方で、ミクログリアは中枢神経系の免疫機能を担うグリア細胞の一種であり、脳内環境の変化に応じて自身の形態を柔軟に変化させることが知られる。ミクログリアは *in vitro* において、恒常条件下では突起を伸ばした形態 (ramified shaped) を取るが、リポ多糖 (LPS) や IFN $\gamma$  に代表される活性化刺激を受け取ると、アメーバ状の形態 (ameboid shaped) に変化して、炎症プロセスを亢進させる。また、抗炎症性サイトカインとして知られるインターロイキン 4 (IL-4) は、ミクログリアの代替活性化状態を誘発し、棍棒状の形態 (rod shaped) に変化して抗炎症プロセスを促進する<sup>4</sup>。このミクログリア形態変化による炎症・抗炎症バランスの制御は、脳の恒常性維持において重要な役割を果たすと考えられる。

近年、統合失調症患者のミクログリアが異常な活性化形態をとること<sup>5</sup>や、ミクログリアの形態変化には微小管のダイナミックなリモデリングが伴うことが報告されている<sup>4</sup>が、微小管をレールとして輸送する分子モーターの役割については未だ十分な議論がなされていない。

そこで本研究では、活性化刺激によるミクログリアの形態操作が可能な初代培養系を確立し、精神疾患との関連が示唆されるいくつかの *Kifs* mRNA (*Kif1a*, *Kif1b*, *Kif3a*, *Kif17*, *Kif13a*) が形態変化に伴って発現を変化させるかを明らかにするとともに先行研究<sup>3</sup>において報告された KIF17 の変異を持つマウス (KIF17 mut マウス) 由来ミクログリアと、野生型マウス (WT マウス) 由来ミクログリアの形態を比較することで、統合失調症関連キネシン KIF17 がミクログリア形態変化において果たす役割を明らかにすることを目的とした。

## 【方法】

## 1. ミクログリア初代培養

生後 0–4 日までの WT および KIF17 mut 仔マウス (C57BL/6J) から大脳半球を取り出し、破碎した後に 0.25%トリプシン処理を 37°C で 40 分間行った。上清を丁寧に除去し、HBSS による洗浄を 2 回行った後、10% BSA と GlutaMax I (Gibco) を含む DMEM 培地中で 13–15 日間培養した。コンフルエンスに達したのち、培養フラスコを数回叩いてミクログリアを単離し、先行研究<sup>6</sup>で示さ

れた生存因子を含む無血清培地に移した。単離 24 時間後に、100 ng/mL LPS と 20 ng/mL IFN $\gamma$  もしくは 20 ng/mL IL-4 を加え、活性化形態および代替活性化形態を誘導した。刺激 48 時間後に溶出もしくは固定の操作を行った。

## 2. 逆転写定量 PCR (RT-qPCR)

細胞溶出物中の RNA を逆転写して cDNA を得た。cDNA サンプルは GeneAmp SYBR<sup>TM</sup> qPCR Mix II (NIPPON GENE) を用い、QuantStudio 5 real-time PCR system (Applied Biosystems) で反応させ、恒常条件群 (Homeo 群) に対する LPS+IFN $\gamma$  投与群および IL-4 投与群での *Kifs* mRNA の相対発現量を定量した。

## 3. 免疫細胞化学染色 (ICC)

刺激 48 時間後の細胞を 4% PFA/PBS 中で 10 分間固定処理した。固定後の細胞を 0.1% Triton X-100 で透過処理し、5% BSA で 20 分間ブロッキングした後に、抗 Iba1 抗体 (Fujifilm) を加え、4°C で一晩反応させた。翌日、二次抗体として Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Invitrogen) を加え 1 時間室温でインキュベートし、同時に DAPI によって核を染色した。画像取得は共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP8, Leica) で行った。形態学的解析には ImageJ Fiji を用い、細胞の面積や固体度 (=面積÷凸包面積) の定量を行った。

## 【結果・考察】

RT-qPCR の結果、LPS+IFN $\gamma$  投与群ではいずれの *Kifs* mRNA についても発現量の有意な変化は見られなかった (Fig1-a)。一方で、IL-4 投与群では、*Kifs* mRNA のうち *Kif3a*, *Kif17*, *Kif13a* に有意な発現上昇が確認された (Fig1-b)。この結果は、IL-4 投与により誘導された代替活性化ミクログリアの維持において KIF3A, KIF17, KIF13A が重要な働きを持つことを示唆している。

現在解析中の結果と考察については、発表会にて報告する。

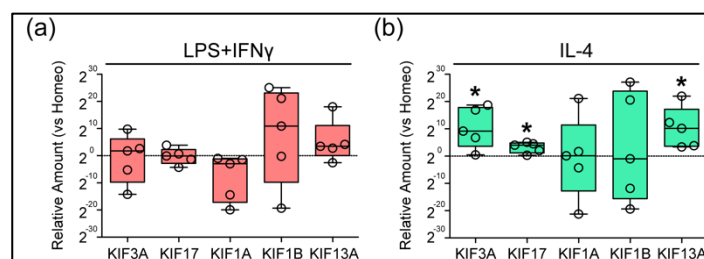


Fig. 1. RT-qPCR による *Kifs* mRNA 発現量の解析結果

Homeo 群に対する (a) LPS+IFN $\gamma$  投与群、(b) IL-4 投与群における *Kifs* mRNA の相対発現量

n = 5 independent cultures. \*P < 0.05, Paired t-test versus Homeo.

## 【参考文献】

- Hirokawa et al. (2009) *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 682-696
- Yin et al. (2011) *Neuron* 70, 310-325
- Tarabeux et al. (2010) *Biol Psychiatry* 68, 649-656
- Rosito et al. (2023) *Cell Rep* 42, 112104
- Li et al. (2023) *Front Psychiatry* 14, 1126632
- Bohlen et al. (2017) *Neuron* 94, 759-773.e8.