



The transcription factor Hhex regulates inflammation-related genes in microglia

坂手，里彩

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2022-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8432号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100477858>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学 位 論 文 の 内 容 要 旨

The transcription factor Hhex regulates inflammation-related genes in microglia

転写因子Hhexはミクログリアにおいて炎症関連遺伝子を制御する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
薬理学
(指導教員：古屋敷 智之教授)

坂手 里彩

ミクログリアは脳内において免疫を担う細胞である。脳損傷や神経疾患の病態において、ミクログリアは細胞のデブリによって活性化し、活性化したミクログリアは炎症性物質を分泌すること、ニューロンのダメージを増悪させることなどが知られている。さらに昨今では疼痛におけるミクログリアの機能や静止状態でのダイナミックなミクログリアの形態が報告されている。近年では、ミクログリアがシナプスやニューロンの活性化を負あるいは正に制御していることが報告され、ミクログリアの生理的役割の解明が進んでいく。

このようにミクログリアの生理的および病理学的な機能は多様であり、この多様性を解明するためミクログリアのトランスクriptオーム解析が行われた。その結果、神経障害性疼痛と神経疾患におけるミクログリアの遺伝子発現プロファイルは異なることが示された。これらの研究の中にはそれぞれの疾患における必須転写因子を同定した報告もあるが、現在のところ、特に生理的条件下におけるミクログリアの機能の多様性を説明するには至っていない。

一方で、我々は以前、うつ病の行動モデルである反復社会挫折ストレス（R-SDS）において、内側前頭前皮質（mPFC）ではミクログリア活性化の組織学的マーカーの発現が増加するが側坐核（NAc）では増加しないことを報告した。このミクログリアの活性化には自然免疫受容体であるToll-like receptor (TLR) 2とTLR4が関与しており、これらはうつ病に関連する行動の発現に必須であることが知られている。そこで我々は反復社会挫折ストレスに供したマウスのミクログリアのトランスクriptオームから、ミクログリアの機能に関連する新規転写因子を探索し、さらに初代ミクログリアにおける役割を評価した。

最初に、R-SDSに供した、あるいは供していない野生型およびTLR2/4欠損マウスのmPFCとNAcから単離したミクログリアを用いたDNAマイクロアレイのデータを再解析した。続いてR-SDSに供すことによって発現量が2倍以上増減した差次の発現遺伝子

（DEGs）を抽出した。さらに遺伝子オントロジーを行い、このDEGsに含まれる17個の転写因子を見出した。これら17個のうち、mPFCおよびまたはNAcにおいて、野生型マウスとTLR2/4欠損マウスで発現量の異なる遺伝子に注目したところ、Tfdp2、Klf4、Tsc22d3、Cebpb、Zkscan17、Hhex、Batf3を含む11個の転写因子が抽出された。

この11個の転写因子について更なる解析を行ったところ、ストレスによるミクログリア活性化におけるmPFCの特異性と一致するように、いくつかの転写因子はmPFCで優先的に増加（例えば、Tfbp2、Klf4、Cebpb）または減少（例えば、Zkscan17、Batf3）していることが分かった。一方、NAcのミクログリアとmPFCのミクログリアでは、Tsc22d3などの増加やHhexなどの減少がみられた。これらのことからTLR2/4シグナルがmPFCとNAcの両方のミクログリアに関与が示唆された。

TLR2/4シグナルは、これらの転写因子の遺伝子発現変化をミクログリア内であるいは他の細胞を介して誘導する。このことから、TLR4のリガンドであるリポポリサッカライド（LPS）あるいはTLR2のリガンドであるリポテイコ酸（LTA）で初代ミクログリアを刺激し、ミクログリア内つまり細胞自律的に発現が調節される転写因子を探索した。初代ミクログリアは8~10週齢のC57BL/6N雌成体マウスから単離した。単離したミクログリアは、M-CSF、TGF-β およびFBSを含むDMEM/F12で培養し、培養開始から4日目にLPSまたLTAを培地に添加し、6時間後にミクログリアを回収した。回収したミクログリアからトータルRNAを精製し、cDNAを合成後、リアルタイムPCRに供し解析を行った。その結果、前述の11の転写因子のうち、LPSの添加により発現量が有意に増加したのはRel、

Atf3、Cebpbであり、有意に減少したのはHhexであった。LTAの添加時でも同様の発現変化が見られた。これらの結果はR-SDSによって引き起こされる発現変化と同じであった。

これら4つの転写因子について、Rel、Atf3およびCebpbはミクログリアの反応において重要であること、またHhexはHomeobox転写因子であり造血や血管新生を制御していることが報告されている。しかし、我々の結果は成体マウスの脳のmPFCとNAcにおけるミクログリアにおいて、Aif1などの従来のミクログリア遺伝子と比較してHhexのmRNAが富んでいること、Hhexの発現はミクログリアと内皮細胞に高度にエンリッチされていることを示した。そこでミクログリアにおけるHhexの役割を調べるために、レンチウイルスベクターを用いて初代ミクログリアにHhexを過剰発現させ、LTA/LPSによるHhexの発現量の減少を相殺させた際の変化を調査した。HAタグをHhexのN末端あるいはC末端を付加したHhex過剰レンチウイルスベクターを作製し、これら過剰発現系を1日間初代ミクログリアに曝露することで感染させ、除去後3日間培養したのち、LPSあるいはLTAを添加した。これにより初代ミクログリアでのHhexの発現量が増加することを確認した。

我々は以前、R-SDSがmPFCミクログリアにおいて多くの炎症性遺伝子を増加させることを報告した。そこでこれらの遺伝子の発現に対するLTAとLPSの影響を調べた。LTAとLPSはTNF α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、Ccl3、Ccl4、Cxcl10、そして誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現量を増加させることが示された。また、Hhex過剰発現は、HAタグの位置に関係なく、前述の炎症関連遺伝子およびiNOSなどの遺伝子のLPSによる発現量の増加を抑制することを示した。さらに注目すべきことに、Hhexの過剰発現はLTAの刺激に対してLPSとは異なる効果、つまりN末端にHAタグを付加したHhexの過剰発現ではCxcl10とIL-1 α の発現が抑制されたが、C末端の場合はその抑制が解除されるという結果を得た。これらの結果はHhexがミクログリアにおける炎症関連遺伝子を負に制御していること、さらにはTLR2/4活性化によってTLR2/4の活性化がHhexの発現を低下させ、TLR4を介した神経炎を促進することが示唆するものである。

以上の結果から、Hhexはミクログリアにおいて構成的に発現し、TLR2/4刺激により減少して炎症反応を促進することが明らかになった。このことから、Hhexは恒常的な炎症制御因子として特異的な役割を担っている可能性が示唆される。一方でHhexの機能はミクログリア特異的なノックアウトマウスでの検証のみであり、作用機序は不明のままである。また、複数の転写因子が高分子複合体を形成し転写の活性化や抑制を行っていることを踏まえると、Hhexは、おそらく直接的な相互作用を介して、Rel、Atf3、Cebpbの作用を抑制する可能性が考えられる。さらにHhexの過剰発現では、TLR4刺激でのみ減少することから、HhexはTLR4特異的、TRIF依存的なシグナル伝達経路に作用している可能性も考えられる。したがってHhexの役割と作用を解明するためには、慢性ストレスを含む様々な神経炎状態におけるクロマチン-免疫沈降法を用いたゲノムワイドな解析が必要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3204 号	氏名	坂手 里彩
論文題目 Title of Dissertation	<p>転写因子 Hhex はミクログリアにおいて炎症関連遺伝子を制御する The transcription factor Hhex regulates inflammation-related genes in microglia</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 青井 賢之 副査 Vice-examiner 矢野 靖子 副査 Vice-examiner 坂手 里彩</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【目的】

脳内の免疫を担う細胞であるミクログリアは、生理的および病理学的に多様な機能を持つ。そのメカニズムを調べるために網羅的遺伝子発現解析が行われ、疼痛、脳虚血、神経変性疾患といった病態時のミクログリア活性化のメカニズムの理解は進んだ。一方、ミクログリアの生理的機能のメカニズムには不明な点が多い。以前マウスのうつ病モデルである反復社会挫折ストレスでは、内側前頭前皮質 (mPFC) のミクログリアが活性化されること、側坐核 (NAc) のミクログリアは活性化されないことが示された。このミクログリアの活性化には自然免疫受容体である TRL2 および TLR4 が必須であり、うつ様行動の発現に重要であることも示された。そこで、反復社会挫折ストレスに供したマウスから採取したミクログリアを網羅的遺伝子発現解析に供し、そのデータからミクログリアの生理的機能に関わりうる新規転写因子を探査し、その一部の機能について初代培養ミクログリアを用いて解析した。

【方法】

反復社会挫折ストレスに供した野生型・TRL2/4 欠損マウスと対照群の mPFC と NAc から単離したミクログリアの網羅的遺伝子発現解析のデータを再解析した。反復社会挫折ストレスにより発現量が 2 倍以上増減した遺伝子 (differentially expressed genes; DEGs) のうち、mPFC か NAc のいずれかで、野生型マウスと TLR2/4 欠損マウスで発現量の異なる遺伝子を抽出した。その 11 個の転写因子のうち、ストレスによるミクログリア活性化と同様に mPFC に選択的に変化する転写因子を探査した。

次に初代培養ミクログリアを TLR4 リガンドであるリポ多糖 (LPS) や TLR2 リガンドであるリボタイコ酸 (LTA) で刺激し、定量的 RT-PCR により発現が変化した転写因子を探査した。

さらに Hhex の役割に迫るため、レンチウイルスベクターを用いて初代培養ミクログリアに Hhex を過剰発現し、LPS や LTA による炎症関連遺伝子の発現への影響を調べた。

【結果】

上記の DEGs のうち転写因子に関する遺伝子オントロジーを持つものとして、Tfdp2、Klf4、Tsc22d3、Cebpb、Zkscan17、Hhex、Batf3 を含む 11 個の転写因子が抽出された。これらの転写因子には mPFC に選択的に増加（例えば、Tfdp2、Klf4、Cebpb）または減少（例えば、Zkscan17、Batf3）するものが含まれていた。一方 Tsc22d3 の増加や Hhex の減少は mPFC と NAc のミクログリアの両方で観察された。この結果は、反復社会挫折ストレスによるミクログリアの TLR2/4 活性化は mPFC と NAc ともに生じていることを示唆する。

初代培養ミクログリアでは、LPS による TLR4 刺激により発現量が有意に増加したのは Rel、Atf3、Cebpb であり、有意に減少したのは Hhex であった。LTA 刺激でも同様の発現変化が見られた。これらの発現変化は反復社会挫折ストレスによるものと合致していた。

これまでの研究から Rel、Atf3、Cebpb がミクログリア活性化に重要であることはよく知られてきた。一方、Hhex は主に血管内皮細胞や血液細胞で研究され、ミクログリアにおける役割は不明であった。一細胞 RNA-seq のデータベースの解析では、成体マウスの

脳の mPFC と NAc では Hhex はミクログリアと内皮細胞に高選択的に発現していること、Aif1 (Iba-1)など代表的なミクログリア発現遺伝子と比べても十分発現していることがわかった。そこで本研究では Hhex の役割を初代培養ミクログリアにより解析した。初代培養ミクログリアでは LPS による TLR4 刺激、LTA による TLR2 刺激により TNF α 、Ccl3 等のサイトカインや誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現量が増加した。Hhex の過剰発現は LPS によるこれらの遺伝子発現增加を抑制した。しかし LTA による発現増加には影響しなかった。

【結論】

以上の結果は、Hhex がミクログリアにおける炎症関連遺伝子の発現を負に制御すること、TLR2/4 活性化が Hhex の発現抑制を介して TLR4 による炎症応答を促進することを示している。Rel、Atf3、Cebpb はミクログリアの炎症反応を促進することから、Hhex は何らかの機序を介してこれら転写因子の働きを抑制する可能性がある。Hhex の過剰発現が TLR2 と TLR4 のうち TLR4 による炎症応答を選択的に抑制した。TLR を介した細胞内シグナル伝達について、MyD88 依存性の経路は全ての TLR により活性化されるのに対し、TRIF を起点とするシグナル伝達経路は TLR4 を介して活性化する一方で TLR2 を介しては活性化しないことがこれまでに知られている。これらから、Hhex は TLR4-TRIF を介するシグナル伝達経路に選択的に作用する可能性がある。慢性社会ストレスなど様々な生理的刺激によるミクログリア活性化における Hhex の役割について、今後さらなる研究が求められる。

以上、本研究は、ミクログリアにおいて転写因子 Hhex が炎症応答を負に制御し、その発現抑制が TLR4 刺激による炎症応答を促進する可能性を明らかにしたものであり、ミクログリアの生理的機能のメカニズムを理解する上で重要な貢献をしたものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。