

筑波大学

博士（医学）学位論文

ミクログリアにおける MafB の機能解析

2015

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

越田 隆介

目次

要旨	1
1. 緒言	3
1.1. ミクログリアとは	
1.2. ミクログリアの発生	
1.3. ミクログリアに対する M-CSF と GM-CSF の作用	
1.4. MafB の発現部位と機能	
2. 研究目的	7
3. 研究方法	8
3.1. マウス	
3.2. 混合グリア培養及びミクログリア初代培養	
3.3. MTS アッセイ	
3.4. フローサイトメトリー	
3.5. 免疫組織化学	
3.6. 定量 RT-PCR	
3.7. 伸展細胞の計数	
3.8. 免疫細胞化学	

3.9. 活性型 RhoA に対するプルダウンアッセイ

3.10. 統計解析

4. 結果 14

4.1. GM-CSF は、*in vitro* において、M-CSF よりもミクログリアの増殖を強く促進させるとともに、大きな形質の変化を引き起こす

4.2. MafB の発現は、*in vivo* ではミクログリアが成熟するにつれて上昇し、*in vitro* では GM-CSF によって減少する

4.3. *Mafb* 遺伝子欠損ミクログリアでは、*in vitro* における GM-CSF の効果が増強される

4.4. *Mafb* 遺伝子欠損ミクログリアは、GM-CSF 存在下で、RhoA の過剰な活性化を一部介して、円形の細胞形態を示す

5. 考察 20

5.1. 結果のまとめ

5.2. ミクログリアにおける MafB の発現

5.3. ミクログリアにおける GM-CSF シグナリングと MafB のクロストーク

5.4. GM-CSF 存在下の *Mafb* 遺伝子欠損ミクログリアが示す形態変化

5.5. ミクログリアにおいて MafB がどのように GM-CSF シグナリングを

抑制しているのか

6. 結語	25
7. 謝辞	26
8. 参考文献	27
9. 図	37

要旨

ミクログリアは中枢神経系に存在する組織マクロファージである。近年の **Fate mapping** によって、ミクログリアが、造血幹細胞由来のマクロファージとは発生系譜が異なり、卵黄嚢由来であることが明らかになっている。またトランスクリプトーム解析でも、ミクログリアは、他の組織マクロファージとは異なった特有の遺伝子発現プロファイルを示しており、独自の分子ネットワークが形成されていることが示唆される。 **granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)** は骨髄球系細胞の分化に関わるサイトカインであり、ミクログリアに対しては細胞増殖を促進させるとともに、樹状細胞様に形質を変化させる。しかし、ミクログリアの細胞内で **GM-CSF** シグナリングがどのように調節されているかについては、不明な点が多く残されている。

MafB は **bZip** 型転写因子であり、単球・マクロファージ系列で高度に発現している。ミクログリアにおいても **MafB** の発現は報告されていたが、その機能については全く不明であった。そこで本研究では、初代培養ミクログリアを用いて、**MafB** と **GM-CSF** シグナリングの関連性について、解析を行った。**GM-CSF** 存在下で **Mafb** 遺伝子欠損ミクログリアは、野生型よりも高い増殖能を示すとともに、大きな形質変化を示した。一方、**M-CSF** 存在下では、細胞増殖や分化マーカーの発現に関して、両者の間に有意な違いは認められなかった。さらに

GM-CSF 存在下において、*Mafb* 遺伝子欠損ミクログリアは、RhoA の過剰な活性化を介して、円形の細胞形態を示した。以上の実験結果によって、著者らは、**MafB** がミクログリアにおける **GM-CSF** シグナリングの負の制御因子であることを明らかにした。本研究は、ミクログリアの **GM-CSF** シグナリングが転写因子によって調節されているという、新たな知見を与えるものである。

1. 緒言

1.1. ミクログリアとは

ミクログリア (microglia) は中枢神経系に存在する組織マクロファージであり、成体では、中枢神経系における全細胞の 10%程度を占めている。他のマクロファージと同様、免疫細胞として組織内を監視し、組織傷害や感染に伴って、炎症性サイトカインや活性酸素種 (ROS) を産生する。過剰なミクログリアの活性化は神経細胞に傷害を与えるが、その一方で、ミクログリアは brain-derived neurotrophic factor (BDNF) や insulin-like growth factor 1 (IGF-1) などの神経栄養因子も分泌している (1-3)。最近、ミクログリアが従来の免疫細胞としての働きに加え、神経ネットワークの形成や維持にも重要な働きを担っていると考えられている。例えば、ミクログリアは、平常時に高度に枝分かれした (ramified) 突起を活発に動かし、周辺のシナプスに接触していることから (4)、神経活動のモニタリングを行っていると予想されている。また、脳の発達期に不要なシナプスを貪食することで、神経の投射を調節していることが報告されている (synaptic pruning) (5,6)。

1.2. ミクログリアの発生

最近の Fate mapping によって、ミクログリアが、卵黄嚢で発生する c-kit

陽性の erythromyeloid progenitor (EMP) に由来することが明らかとなった (7,8)。ミクログリアの発生には、転写因子としては PU.1 や IRF8 が必須であるが、その一方で、造血幹細胞由来のマクロファージの発生に必須である Myb を必要としない (9)。卵黄嚢で発生した未成熟ミクログリアは、胎生期中枢神経系に遊走・定着し、生後に成熟する。その後、平常時は自己複製によって維持され、造血幹細胞からの供給は受けない (10,11)。トランスクリプトーム解析でも、ミクログリアは特有の遺伝子発現プロファイルを示しており (12)、独自の分子ネットワークを形成していることが示唆される。

1.3. ミクログリアに対する M-CSF と GM-CSF の作用

macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) と granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) は、どちらも骨髄球系細胞の分化を調節するサイトカインとして広く知られている (13)。

M-CSF は interleukin 34 (IL-34) とともに colony-stimulating factor receptor 1 (CSF-1R) に結合するが、CSF-1R シグナリングは、ミクログリアの発生および生存維持に必須である (7,14,15)。一方、GM-CSF は、平常時の中枢神経系では殆ど検出されないが、病的な状態でその産生が上昇する。例えば、多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune

encephalomyelitis; EAE) では、自己反応性 T 細胞によって GM-CSF が分泌される。GM-CSF は EAE の進展に必須であり、実際に GM-CSF 欠損マウスや、その受容体である CSF-2R 欠損マウスに対して EAE を誘導しても、その症状が著しく軽減される (16-18)。GM-CSF はミクログリアに対して、*in vitro* での細胞増殖を促進させるとともに (19)、形質を樹状細胞様に変化させる (20)。しかし、GM-CSF シグナリングがミクログリアの細胞内でどのように調節されるかについては、不明な点が多く残されている。

1.4. MafB の発現部位と機能

MafB は塩基性ロイシンジッパー型 (bZip) 型転写因子であり、MafA、c-Maf、Nrl と合わせて Large Maf family を形成している。それぞれ共通して、Maf 認識配列 (Maf recognition element; MARE) と呼ばれるシスエレメントを認識し、標的遺伝子の転写を活性化する (21)。MafB の発現部位は、成体では、膵 α 細胞、糸球体足細胞、単球・マクロファージ系列、大脳介在神経など多数である (22-24)。また発生の段階で一時的に発現される場合もあり、蓋板 (25)、膵 β 細胞 (22) が、その例である。

MafB は、特に単球・マクロファージ系列で強く発現しており (23)、*in vitro* でマクロファージへの分化を促進する一方 (26)、樹状細胞への分化を抑制する

ことが報告されている (27)。最近、Aziz ら (28) や Sarrazin ら (29) は (ともに Sieweke のグループ)、MafB がマクロファージや造血幹細胞の M-CSF に対する感受性を抑制していると報告した。なおそれらの論文では、MafB は GM-CSF に対する感受性に影響を与えないという結果であった。

ミクログリアにおいても MafB の発現は認められるが (8,12)、その機能については全く不明であった。

2. 研究目的

ミクログリアにおける MafB の機能を明らかにすることを目的とした。特に、ミクログリアの M-CSF または GM-CSF に対する反応性に、MafB がどのような影響を与えるのかについて検証した。

3. 研究方法

3.1. マウス

本研究では、当研究で既に作製された *Mafb* 遺伝子欠損マウスを使用した (23)。このマウスでは、*Mafb* 遺伝子座の翻訳領域が GFP 遺伝子に置換されており (ノックイン)、GFP の発現が *Mafb* 遺伝子の発現と一致することが確認されている。マウスを交配させ、臍栓を確認した日を胎生 0.5 日 (E0.5) とした。マウスは specific-pathogen free (SPF) の環境下で飼育された。全ての動物実験は国立大学法人筑波大学動物実験取扱規程に従って行われた。

3.2. 混合グリア培養及びミクログリア初代培養

先行研究を参考にして (30)、混合グリア培養を行った。E18.5 または日齢 1-3 日 (P1-3) のマウスから脳を無菌的に取り出した。可能な限り髄膜を取り除き、Accutase (Chemicon) にて室温で 15 分間消化させた。HBSS に移し、パスツールピペットでピペティングした。細胞懸濁液を 70 μ m セルストレイナー (BD Bioscience) に通し、単一細胞を得た。遠心分離後、細胞塊を細胞培養液 [DMEM, 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, PenStrep (Life technologies)] で再懸濁し、目的に応じて M-CSF (10 ng/ml, R & D systems) または GM-CSF (10 ng/ml, R & D systems) を添加した。全ての細胞懸濁液を

poly-D-lysine (Sigma) でコートされた 75 cm² フラスコに播種した。GM-CSF はミクログリアの増殖を強力に促進させるため、GM-CSF を添加する場合は、poly-D-lysine でコートされた 6 ウェルプレートに 2×10^4 cells /cm² の密度で播種した。37 °C、5% CO₂ のインキュベーターの中で培養を開始した。細胞培養液は 3-4 日毎に交換した。培養 8-10 日目に震盪もしくはピペッティングによって、ミクログリアをアストロサイト層から剥離させ、回収した。トリパンブルーにて染色し、血球計算板にて細胞数を計測した。回収した細胞を 8-well slide chamber (Tissue-Tek) に播種し、抗 Iba-1 抗体で免疫染色を行ったところ、ミクログリアの純度は 95 % 以上であった。

3.3. MTS アッセイ

種々の濃度の GM-CSF (0, 0.01, 0.1, 1.0, 10 ng/ml) で混合グリア培養を行った。培養 10 日目にミクログリアを単離し、MTS assay (CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) で生細胞数を測定した。データは 490 nm の吸光度で表した。

3.4. フローサイトメトリー

E18.5 の胎仔脳から得た細胞懸濁液、または培養 10 日目の初代培養ミクログ

リアを用いた。CD11b (M1/70, Biolegend) または F4/80 (BM8, eBioscience) に対する一次抗体を添加し、氷上で 30 分間反応させた。一次抗体には、PE または APC が結合した蛍光抗体を用いた。フローサイトメーターには LSR (BD Bioscience) を用い、データ解析には FlowJo software (Tree Star) を用いた。E18.5 脳の細胞懸濁液を解析する際は、先行研究に従って (31)、FSC/SSC による生細胞のゲーティングを行った。

3.5. 免疫組織化学

P7 と P30 のマウスを、麻酔下で左心室より PBS を還流させ、続いて 4% パラホルムアルデヒド (PFA)/PBS を注入し、還流固定を行った。また E18.5 胎仔の頭部を切断し、4% PFA/PBS にて浸漬固定を行った。その後、一晚固定し、サンプルを 30% スクロース/PBS に移した。サンプルが沈んだ後、Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek) で包埋し、クリオスタットを用いて、大脳皮質を含む凍結切片を 10 μ m の厚さで作製した。

切片は 0.3% Triton X-100/PBS の中に室温で 30 分間浸漬させ、10% 正常ヤギ血清/PBS を加え、室温で 30 分間ブロッキングした。ミクログリアの検出のために抗 Iba-1 抗体 (1:2,000, Wako) を添加し、4 $^{\circ}$ C で一晚反応させた。翌日、切片を PBS で洗浄した後、Alexa Fluor 594 標識二次抗体を添加し、室温で 1

時間反応させた。蛍光顕微鏡 BIOREVO BZ-9000 fluorescence microscope (KEYENCE) を用いて観察した。

3.6. 定量 RT-PCR

培養 10 日目の初代培養ミクログリアを回収し、Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel) を用いて total RNA を抽出した。その後、QuantiTect Reverse Transcription II kit (QIAGEN) を用いて cDNA を合成した。反応液には SYBR Green PCR master mix (Takara) を使用し、Thermal Cycler Dice Real Time System Single (Takara) にて Real-time PCR を行った。プライマーは以下のものを使用した。

Mafb forward, 5'-CATCACCATCATCACCAAGC-3';

Mafb reverse, 5'-AGAAGCGGTCCTCCACACTA-3';

Ccl2 forward, 5'-GGTCCCTGTCATGCTTCTGG-3';

Ccl2 reverse, 5'-TTGGGATCATCTTGCTGGTG-3',

P2ry12 forward, 5'-CGCCTGCCTTGATCCATTCA-3';

P2ry12 reverse, 5'-CTCTTCGCTTGGTTCGCCAC-3';

Hprt forward, 5'-TTGTTGTTGGATATGCCCTTGACTA-3';

Hprt reverse, 5'-AGGCAGATGGCCACAGGACTA-3'。

全てのサンプルを duplicate にして PCR を行い、標準曲線を作成して定量した。*Hprt* を内部標準にして mRNA 発現量の相対値を算出した。

3.7. 伸展細胞の計数

初代培養マイクログリアを 6 ウェルプレートに $2-4 \times 10^5$ cell 播種した。30 分後に位相差顕微鏡にて 200 倍の倍率で観察した。4-5 視野を無作為に選び、プレートの底で伸展している細胞の数を計測した。RhoA/ROCK 経路を阻害する際は、ROCK 阻害薬の Y27632 (10 μ M, Wako) を播種直前に添加した。

3.8. 免疫細胞化学

初代培養マイクログリアをカバーガラスの上に播種し、30 分後に 4% PFA/PBS に置換し、室温で 20 分間固定した。PBS で洗浄し、3%正常ヤギ血清/0.1% Triton X-100/PBS を添加し、室温で 30 分間ブロッキングした。一次抗体として抗 RhoA 抗体 (1:1000, Cytoskeleton) を添加し、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。Alexa Flour 647 標識二次抗体と、Alexa Flour 546 標識 phalloidin (1:40, Life technologies) を添加し、室温で 1 時間反応させた。63 倍の油浸対物レンズを用いて、共焦点顕微鏡 (TSC SP5, Leica Microsystems) で撮影した。

3.9. 活性型 RhoA に対するプルダウンアッセイ

RhoA Activation Assay kit (Cytoskeleton) を用いて GTP 結合 RhoA の量を測定した。初代培養ミクログリアを培養ディッシュに播種し、30 分後に細胞を溶解した。GST 融合 rhotekin-RBD を用いてプルダウンし、12% ポリアクリルアミドゲルにて SDS-PAGE を行った後、抗 RhoA 抗体 (1:1000, Cytoskeleton) にてイムノブロッティングを行った。バンドの濃さは、Image J software (National Institutes of Health) にて定量化した。3 回実験を行い、GTP-RhoA/総 RhoA の比を算出した。

3.10. 統計解析

全てのデータは平均値±標準誤差として表した。2 群間の差の検定には Student の t 検定を用いた。多重比較には分散分析を行い、Bonferroni 補正を用いた。R software (<http://www.r-project.org>) を用いて、統計解析を行った。5%を有意水準とした。

4. 結果

4.1. GM-CSF は、*in vitro* において、M-CSF よりもミクログリアの増殖を強く促進させるとともに、大きな形質の変化を引き起こす

マウスの初代培養ミクログリアを得るために、混合グリア培養を行った。すなわち、P1-3 の新生仔マウスから脳を採取し、そこから得た細胞懸濁液を培養した。本研究では、M-CSF (10 ng/ml) または GM-CSF (10 ng/ml) を添加し、その効果を比較した。先行研究通り (32)、まずアストロサイトが最も速く増殖し、培養 5-7 日目にコンフルエントとなった。そして培養 7 日目以降に、アストロサイト層の上に緩く接着した、円形のミクログリアを確認した。M-CSF 存在下では、FBS 単独と比較して、ミクログリアの細胞数に有意差は無かった。一方、GM-CSF 存在下では、細胞数が約 20 倍増加した (図 1A)。種々の GM-CSF 濃度 (0, 0.01, 0.1, 1.0, 10 ng/ml) で混合グリア培養を行うと、濃度依存的にミクログリアの細胞数が増加した (図 1B)。GM-CSF は、*in vitro* においてミクログリアの形質を樹状細胞様に変化させ、単球・マクロファージ系列の分化マーカーである CD11b の発現を減弱させることが報告されている (20)。そこで本研究では、M-CSF (10 ng/ml) または GM-CSF (10 ng/ml) によって起こる形質変化を比較した。培養 10 日目にフローサイトメトリーを用いて CD11b の発現量を測定したところ、M-CSF 存在下では CD11b の発現がわずかに減少した一

方、GM-CSF 存在下では顕著に減弱した (図 1C)。以上の結果によって、GM-CSF は M-CSF よりも、*in vitro* でのミクログリアの細胞増殖を促進させるとともに、形質を大きく変化させることを明らかにした。

4.2. MafB の発現は、*in vivo* ではミクログリアが成熟するにつれて上昇し、*in vitro* では GM-CSF によって減少する

ミクログリアにおける *in vivo* での MafB の発現を調べるため、当研究室で作製した *Mafb*-GFP ノックインマウス (*Mafb*^{GFP/+}) (23) を用い、大脳皮質の免疫染色を行った。E18.5 ではミクログリアはアメーバ様 (amoeboid) の未熟な形態を現し、かつ GFP のシグナルは弱かった。P7 でミクログリアは突起を伸ばし始め、P30 には、ラミファイド型 (ramified) の成熟した形態を現した。成熟ミクログリアでは、強い GFP シグナルが観察された (図 2A)。以上の結果によって、MafB の発現量はミクログリアの成熟度に相関することを示した。

次に、*Mafb*^{GFP/+}マウスを用いて混合グリア培養を行った。その際、M-CSF (10 ng/ml) または GM-CSF (10 ng/ml) を添加し、培養 10 日目に、フローサイトメトリーにて初代培養ミクログリアにおける GFP の蛍光強度を測定した。M-CSF 存在下では、FBS 単独と比較して、GFP の蛍光強度に変化は見られなかったが、GM-CSF 存在下では顕著に減弱した (図 2B)。定量 RT-PCR においても、

GM-CSF 存在下での *Mafb* mRNA の発現が、M-CSF 存在下の 20%以下に減少していた (図 2C)。以上の結果によって、GM-CSF は、初代培養ミクログリアにおける MafB の発現を減少させることを明らかにした。

4.3. *Mafb* 遺伝子欠損ミクログリアでは、*in vitro* における GM-CSF の効果が増強される

ミクログリアにおける MafB の機能を明らかにするために、*Mafb* 遺伝子欠損マウス (= *Mafb*^{GFP/GFP} : 以降、*Mafb*^{-/-}と表記) を用いて解析した。*Mafb*^{-/-}マウスは生後直後に死亡するため (23,33)、出産直前である E18.5 の胎仔脳を用いた。脳組織の免疫染色では、ミクログリアの分布や形態に関して、*Mafb*^{-/-}と野生型 (*Mafb*^{+/+}) との間に明らかな違いは認められなかった (図 3A)。さらに胎仔脳から得た細胞懸濁液を用いて、フローサイトメトリーを行ったところ、ミクログリア (CD11b⁺ F4/80⁺) の割合に関して、両者に有意差は無かった (図 3B)。

Aziz ら (28) や Sarrazin ら (29) は、MafB がマクロファージや造血幹細胞の M-CSF に対する感受性を抑制することを報告した。それらの論文では、MafB は GM-CSF に対しては影響を与えないという結果であった。そこで本研究では、*Mafb*^{+/+}と *Mafb*^{-/-}初代培養ミクログリアに対して、それぞれ M-CSF (10 ng/ml) または GM-CSF (10 ng/ml) を添加して、その効果を比較した。予想に

反して M-CSF 存在下では、培養 10 日目の細胞数について、両者に有意差は無かった (図 3C)。対照的に、GM-CSF 存在下では、*Mafb*^{-/-}ミクログリアは *Mafb*^{+/+}よりも速い増殖を示した (図 3D)。さらに培養 10 日目に、フローサイトメトリーにて CD11b の発現量を測定した。すると、GM-CSF 存在下では、*Mafb*^{-/-}ミクログリアにおける CD11b の発現が、*Mafb*^{+/+}よりも減弱していた。一方、M-CSF 存在下では、CD11b の発現について、両者に差は見られなかった (図 3E)。定量 RT-PCR にて、ミクログリアの成熟マーカーである *P2ry12* mRNA の発現量を比較した。先行研究通り (12)、M-CSF 存在下と比較して、GM-CSF 存在下ではミクログリアにおける *P2ry12* mRNA の発現が減少した。さらに、GM-CSF 存在下では、*Mafb*^{+/+}と比較して、*Mafb*^{-/-}ミクログリアにおける *P2ry12* mRNA の発現が有意に減少していた (図 3F)。以上の結果によって、*Mafb*^{-/-}ミクログリアでは、GM-CSF の効果が増強されることを明らかにした。

Sierra-Filardi らは、M-CSF で分化させたマクロファージでは chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) の発現が上昇することや、中和抗体で CCL2 を阻害すると GM-CSF で誘導される遺伝子群の発現が増強されることを報告した (34)。このことより、CCL2 が GM-CSF に対する反応性を抑制していることが示唆された。そこで本研究では、CCL2 が *Mafb*^{-/-}ミクログリアにおける GM-CSF の効果増強に関与しているか否かを検証した。すると GM-CSF 存在下

では、*Mafb*^{+/+}と比較して、*Mafb*^{-/-}マイクログリアにおける *Ccl2* mRNA の発現が有意に減少していた (図 3G)。

4.4. *Mafb* 遺伝子欠損マイクログリアは、GM-CSF 存在下で、RhoA の過剰な活性化を一部介して、円形の細胞形態を示す

Aziz らは、*Mafb* 遺伝子欠損マクロファージが M-CSF に反応して、野生型よりも多数の突起を伸ばすことを報告した (35)。*Mafb*^{-/-}マイクログリアでは GM-CSF の効果が増強されているため、著者は、GM-CSF 存在下において *Mafb*^{-/-}マイクログリアが *Mafb*^{+/+}とは異なった形態を示すと予想した。そこで、GM-CSF 存在下 (10 ng/ml) で培養した初代培養マイクログリアを単離し、別の培養プレートに播種して、30 分後に形態を観察した。すると *Mafb*^{+/+}マイクログリアでは、約半数の細胞が偽足を形成するにも関わらず、*Mafb*^{-/-}マイクログリアでは、約 90%の細胞が円形のままであった (図 4A)。

RhoA、Rac1、Cdc42 などの Rho GTPase が、細胞形態を調節する主要な因子であることは広く知られている (36)。先行研究において、GM-CSF がマクロファージの RhoA を活性化することや (37)、RhoA の過剰な活性化は偽足形成を阻害し、その結果、細胞が円形を示すことが報告されている (38, 39)。これらを踏まえて著者は、RhoA の過剰な活性化によって、*Mafb*^{-/-}マイクログリアの

偽足形成が阻害されていると予想した。それを検証するために、まずプルダウンアッセイにて、活性型である GTP 結合型 RhoA の量を測定した。すると *Mafb*^{-/-}マイクログリアでは、*Mafb*^{+/+}と比較して有意に GTP 結合型 RhoA が増加していた (図 4B)。RhoA は、活性化時に形質膜に移行するため (36)、免疫蛍光染色にて RhoA の局在を観察した。*Mafb*^{+/+}マイクログリアでは、RhoA が細胞質内に均質に分布していたが、対照的に *Mafb*^{-/-}マイクログリアでは、RhoA が形質膜に局在していた (図 4C)。以上の結果によって、*Mafb*^{-/-}マイクログリアでは、*Mafb*^{+/+}よりも RhoA が活性化していることを明らかにした。

ROCK は、RhoA のシグナル伝達における主要な下流分子である (36)。GM-CSF 存在下 (10 ng/ml) で培養した *Mafb*^{-/-}マイクログリアに ROCK 阻害剤である Y27632 (10 μM) を添加すると、伸展細胞数が増加した (図 4D)。以上の結果によって、GM-CSF 存在下では、RhoA の過剰な活性化を介して、*Mafb*^{-/-}マイクログリアが円形の細胞形態を示すことを明らかにした。

5. 考察

5.1. 結果のまとめ

本研究によって、著者が明らかにしたことは以下の通りである。[1] ミクログリアの成熟に伴って、転写因子 MafB の発現が上昇する。[2] *in vitro* では、GM-CSF によって、ミクログリアにおける MafB の発現が減少する。[3] *Mafb*^{-/-} ミクログリアでは GM-CSF の効果（増殖促進と形質変化）が増強される。[4] GM-CSF 存在下において、*Mafb*^{-/-} ミクログリアは、RhoA の過剰な活性化を介して円形の細胞形態を示す。以上の結果によって、MafB がミクログリアにおける GM-CSF シグナリングを負に制御することが明らかにした。

5.2. ミクログリアにおける MafB の発現

MafB は bZip 型の転写因子であり、単球・マクロファージ系列において高度に発現している (23)。ミクログリアにおいても MafB が発現することは報告されていたが (8,12)、その役割については全く不明であった。本研究では、*Mafb*^{GFP/+} マウスを用いて発現解析を行った。その結果、ミクログリアが成熟するにつれ、MafB の発現が上昇することが明らかとなった。実際に MafB がミクログリアの成熟に関与するのかどうか、次に興味を持たれるところである。しかし、*Mafb*^{-/-} マウスは中枢性呼吸不全によって生後直後に死亡してしまうため

(23,33)、*in vivo* でミクログリアの成熟過程を観察することができない。最近、当研究室は、Cre-loxP 系によるコンディショナル欠損マウスを得るために、*Mafb* floxed マウスを作製した (未発表)。また、*Cx3cr1-Cre* マウス (40) など、ミクログリアで Cre が作動するマウスは、いくつか存在する。今後、MafB のコンディショナル欠損マウスを用いて、ミクログリアの成熟過程を解析すれば、有用な知見が得られることが予想される。

5.3. ミクログリアにおける GM-CSF シグナリングと MafB のクロストーク

GM-CSF は骨髄球細胞に作用するサイトカインである (13)。ミクログリアに対しては、*in vitro* において細胞増殖を強く促進させ (19)、形質を樹状細胞様に変えることが知られていた (20)。しかし、GM-CSF シグナリングがミクログリアの細胞内でどのように調節されているかは、不明な点が多く残されている。本研究では、GM-CSF がミクログリアにおける MafB の発現を減少させることに加え、*Mafb*^{-/-}ミクログリアでは GM-CSF の効果が増強されることを示した。つまり、ミクログリアでは GM-CSF シグナリングと MafB が互いに拮抗し合うことが明らかにした。一方、M-CSF 存在下 (10 ng/ml) での細胞増殖については、*Mafb*^{+/+}と *Mafb*^{-/-}との間に有意差は無かった。しかし、Aziz ら (28) と Sarrazin ら (29) のマクロファージや造血幹細胞を用いた研究では、MafB は

M-CSF に対する感受性を抑制するが、GM-CSF に対する感受性には影響を与えないという結果であった。この結果の違いは、ミクログリアの「独自性」によるものかもしれない。ミクログリアは卵黄嚢より発生し、自己複製によって維持されている。造血幹細胞由来のマクロファージとは発生系譜が異なり (7,8)、加えて発生に必要な因子も異なるため (例: ミクログリアは Myb を必要としない) (9)、ミクログリアは独自の分子ネットワークを形成していることが示唆される。事実、最近のトランスクリプトーム解析によって、ミクログリアが特有の遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかになっている (12)。このような網羅的なデータを詳細に解析することで、今回の違いを生みだした分子機序の解明につながるかもしれない。

5.4. GM-CSF 存在下の *Mafb* 遺伝子欠損ミクログリアが示す形態変化

本研究では、*Mafb*^{-/-}ミクログリアが、GM-CSF 存在下で円形の形態を示すことを見いだした。*Mafb*^{-/-}ミクログリアでは、活性型 RhoA が増加しており、かつ ROCK 阻害薬 Y27632 を加えることで伸展細胞数が増加した。以上の結果によって、RhoA の過剰な活性化が、*Mafb*^{-/-}ミクログリアが示す形態変化の一因であることを明らかにした。*in vivo* においてミクログリアが活性化すると、特徴的な細胞の形態変化が起こることが知られている。すなわち、平常時のラミ

ファイブ型で見られる細長い突起が、短く太くなる (41)。その際、ミクログリアにおいて RhoA/ROCK 経路が活性化することが報告されているが、この経路は単に形態変化だけでなく、活性化 (細胞傷害性への変化) そのものにも必要な経路であることが示唆されている。事実、いくつかの神経変性疾患モデル (パーキンソン病や ALS モデルなど) に対して ROCK 阻害薬を投与すると、ミクログリアの活性化が抑制され、神経傷害が減弱される (42,43)。今後、EAE のように中枢神経系で GM-CSF が多量に産生される環境で (16-18)、*Mafb*^{-/-}ミクログリアが、RhoA/ROCK 経路を介した過剰な活性化を示すか否か、検証する必要がある。

5.5. ミクログリアにおいて *MafB* がどのように GM-CSF シグナリングを抑制しているのか

造血幹細胞由来のマクロファージにおいては、*MafB* は GM-CSF シグナリングに影響を与えないが、ミクログリアにおいては、*MafB* は GM-CSF シグナリングに拮抗する。しかし本研究では、その詳細な分子機序は明らかにならなかった。考えられる機序としては、*MafB* が、GM-CSF シグナリングの抑制因子の転写制御を行っている可能性がある。本研究によって、GM-CSF 存在下では、*Mafb*^{-/-}ミクログリアにおける *Ccl2* mRNA が有意に減少していることを明らか

にした。CCL2 は単球・マクロファージ系列細胞を遊走させるケモカインとして広く知られている。Sierra-Filardi らの研究によって、CCL2 が GM-CSF シグナリングを抑制していることが示唆された (34)。加えて、*Ccl2* 遺伝子のプロモーター領域に MARE が存在し、マクロファージをレチノイン酸と TNF- α で刺激すると、実際に MafB がその部位に結合することも報告されている (44)。

これらの先行研究を踏まえると、MafB が *Ccl2* の発現を誘導することで、GM-CSF シグナリングを抑制しているという可能性は考えられる。その他に、Kim らは、MafB が核内で IRF3 と直接結合することで、I 型インターフェロンシグナリングを抑制すると報告した (45)。MafB が GM-CSF の下流にある STAT5 (46) や IRF5 (47) などと核内で直接結合し、機能を抑制しているという可能性も考慮すべきかもしれない。

6. 結語

本研究によって、著者は、転写因子 MafB がミクログリアにおける GM-CSF シグナリングに拮抗することを明らかにした。しかし、MafB がどのように GM-CSF シグナリングを抑制するのか、その詳細なメカニズムは不明のままであり、MafB の標的分子を特定することが今後の課題である。ミクログリアにおける MafB と GM-CSF シグナリングのクロストークを明らかにすることは、病態時におけるミクログリアの活性化機構の解明にもつながると思われる。

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導賜りました筑波大学医学医療系解剖学発生学研究室教授 高橋智先生、同准教授 大石久史先生に感謝を申し上げます。

また、実験補助をしていただきました同研究室 小島正美氏、土浦協同病院臨床検査部 藤井暁子氏に感謝を申し上げます。

8. 参考文献

1. Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:57–69.
2. Saijo K, Glass CK (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 11:775–787.
3. Salter MW, Beggs S (2014) Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell* 158:15–24.
4. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314–1318.
5. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333:1456–1458.
6. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74:691–705.

7. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330:841–845.
8. Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, Wieghofer P, Heinrich A, Riemke P, Hölscher C, Müller DN, Luckow B, Brouwer T, Debuski K, Fritz G, Opdenakker G, Diefenbach A, Biber K, Heikenwalder M, Geissmann F, Rosenbauer F, Prinz M (2013) Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci* 16:273–280.
9. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F (2012) A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336:86–90.
10. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM (2007) Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 10:1538–1543.
11. Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch UK, Mack M,

- Heikenwalder M, Brück W, Priller J, Prinz M (2007) Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 10:1544–1553.
12. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, Koeglsperger T, Dake B, Wu PM, Doykan CE, Fanek Z, Liu L, Chen Z, Rothstein JD, Ransohoff RM, Gygi SP, Antel JP, Weiner HL (2014) Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci* 17:131–143.
13. Hamilton JA (2008) Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8:533–544.
14. Erbllich B, Zhu L, Etgen AM, Dobrenis K, Pollard JW (2011) Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PLoS ONE* 6:e26317.
15. Elmore MR, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, Kitazawa M, Matusow B, Nguyen H, West BL, Green KN (2014) Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* 82:380–397.

16. Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Pedras-Vasconcelos J, Verthelyi D, Dittel BN (2007) GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 178:39–48.
17. Codarri L, Gyölvéshi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B (2011) ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 12:560–567.
18. El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang GX, Dittel BN, Rostami A (2011) The encephalitogenicity of TH17 cells is dependent on IL-1 \cdot and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 12:568–575.
19. Esen N, Kielian T (2007) Effects of low dose GM-CSF on microglial inflammatory profiles to diverse pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *J Neuroinflammation* 4:10.
20. Santambrogio L, Belyanskaya SL, Fischer FR, Cipriani B, Brosnan CF, Ricciardi-Castagnoli P, Stern LJ, Strominger JL, Riese R (2001) Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*

98:6295–6300.

21. Eychène A, Rocques N, Pouponnot C (2008) A new MAFia in cancer. *Nat Rev Cancer* 8:683–693.
22. Artner I, Le Lay J, Hang Y, Elghazi L, Schisler JC, Henderson E, Sosa-Pineda B, Stein R (2006) MafB: an activator of the glucagon gene expressed in developing islet alpha- and beta-cells. *Diabetes* 55:297–304.
23. Moriguchi T, Hamada M, Morito N, Terunuma T, Hasegawa K, Zhang C, Yokomizo T, Esaki R, Kuroda E, Yoh K, Kudo T, Nagata M, Greaves DR, Engel JD, Yamamoto M, Takahashi S (2006) MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages. *Mol Cell Biol* 26:5715–5727.
24. Cobos I, Long JE, Thwin MT, Rubenstein JL (2006) Cellular patterns of transcription factor expression in developing cortical interneurons. *Cereb Cortex* 16:i82–88.
25. Millonig JH, Millen KJ, Hatten ME (2000) The mouse Dreher gene *Lmx1a* controls formation of the roof plate in the vertebrate CNS. *Nature* 403:764–769.
26. Kelly LM, Englmeier U, Lafon I, Sieweke MH, Graf T (2000) MafB is an

- inducer of monocytic differentiation. *EMBO J* 19:1987–1997.
27. Bakri Y, Sarrazin S, Mayer UP, Tillmanns S, Nerlov C, Boned A, Sieweke MH (2005) Balance of MafB and PU.1 specifies alternative macrophage or dendritic cell fate. *Blood* 105:2707–2716.
 28. Aziz A, Soucie E, Sarrazin S, Sieweke MH (2009) MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages. *Science* 326:867–871.
 29. Sarrazin S, Mossadegh-Keller N, Fukao T, Aziz A, Mourcin F, Vanhille L, Kelly Modis L, Kastner P, Chan S, Duprez E, Otto C, Sieweke MH (2009) MafB restricts M-CSF-dependent myeloid commitment divisions of hematopoietic stem cells. *Cell* 138:300–313.
 30. Wu HJ, Liu YJ, Li HQ, Chen C, Dou Y, Lou HF, Ho MS, Li XM, Gao Z, Duan S (2014) Analysis of microglial migration by a micropipette assay. *Nat Protoc* 9:491–500.
 31. Guez-Barber D, Fanous S, Harvey BK, Zhang Y, Lehrmann E, Becker KG, Picciotto MR, Hope BT. (2012) FACS purification of immunolabeled cell types from adult rat brain. *J Neurosci Methods* 203:10–18.
 32. Milner R, Campbell IL (2002) Cytokines regulate microglial adhesion to

- laminin and astrocyte extracellular matrix via protein kinase C-dependent activation of the $\alpha 6 \beta 1$ integrin. *J Neurosci* 22:1562–1572.
33. Blanchi B, Kelly LM, Viemari JC, Lafon I, Burnet H, Bévengut M, Tillmanns S, Daniel L, Graf T, Hilaire G, Sieweke MH (2003) MafB deficiency causes defective respiratory rhythmogenesis and fatal central apnea at birth. *Nat Neurosci* 6:1091–1100.
34. Sierra-Filardi E, Nieto C, Domínguez-Soto A, Barroso R, Sánchez-Mateos P, Puig-Kroger A, López-Bravo M, Joven J, Ardavín C, Rodríguez-Fernández JL, Sánchez-Torres C, Mellado M, Corbí AL (2014) CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *J Immunol* 192:3858–3867.
35. Aziz A, Vanhille L, Mohideen P, Kelly LM, Otto C, Bakri Y, Mossadegh N, Sarrazin S, Sieweke MH (2006) Development of macrophages with altered actin organization in the absence of MafB. *Mol Cell Biol* 26:6808–6818.
36. Ridley AJ (2011) Life at the leading edge. *Cell* 145:1012–1022.

37. Senokuchi T, Matsumura T, Sakai M, Yano M, Taguchi T, Matsuo T, Sonoda K, Kukidome D, Imoto K, Nishikawa T, Kim-Mitsuyama S, Takuwa Y, Araki E (2005) Statins suppress oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation by inactivation of the small G protein-p38 MAPK pathway. *J Biol Chem* 280:6627–6633.
38. Sahai E, Garcia-Medina R, Pouyssegur J, Vial E (2007) Smurf1 regulates tumor cell plasticity and motility through degradation of RhoA leading to localized inhibition of contractility. *J Cell Biol* 176:35–42.
39. Gadea G, de Toledo M, Anguille C, Roux P (2007) Loss of p53 promotes RhoA–ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. *J Cell Biol* 178:23–30.
40. Goldmann T, Wieghofer P, Müller PF, Wolf Y, Varol D, Yona S, Brendecke SM, Kierdorf K, Staszewski O, Datta M, Luedde T, Heikenwalder M, Jung S, Prinz M (2014) A new type of microglia gene targeting shows TAK1 to be pivotal in CNS autoimmune inflammation. *Nat Neurosci* 16:1618–1626.
41. Derecki NC, Cronk JC, Kipnis J (2013) The role of microglia in brain maintenance: implications for Rett syndrome. *Trends Immunol*

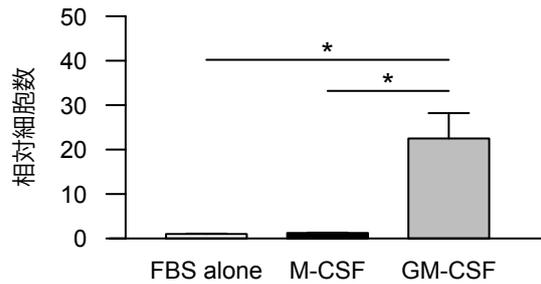
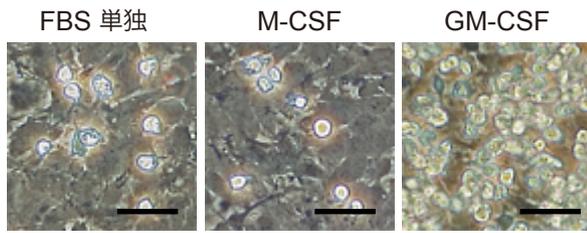
34:144–150.

42. Barcia C, Ros CM, Annese V, Carrillo-de Sauvage MA, Ros-Bernal F, Gómez A, Yuste JE, Campuzano CM, de Pablos V, Fernandez-Villalba E, Herrero MT (2012) ROCK/Cdc42-mediated microglial motility and gliapse formation lead to phagocytosis of degenerating dopaminergic neurons in vivo. *Sci Rep* 2:809.
43. Tönges L, Günther R, Suhr M, Jansen J, Balck A, Saal KA, Barski E, Nientied T, Götz AA, Koch JC, Mueller BK, Weishaupt JH, Sereda MW, Hanisch UK, Bähr M, Lingor (2014) Rho kinase inhibition modulates microglia activation and improves survival in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 62:217–232.
44. Zhang Y, Chen Q, Ross AC (2012) Retinoic acid and tumor necrosis factor- α induced monocytic cell gene expression is regulated in part by induction of transcription factor MafB. *Exp Cell Res* 318:2407-2416.
45. Kim H, Seed B (2010) The transcription factor MafB antagonizes antiviral responses by blocking recruitment of coactivators to the transcription factor IRF3. *Nat Immunol* 11:743–750.
46. Hansen G, Hercus TR, McClure BJ, Stomski FC, Dottore M, Powell J,

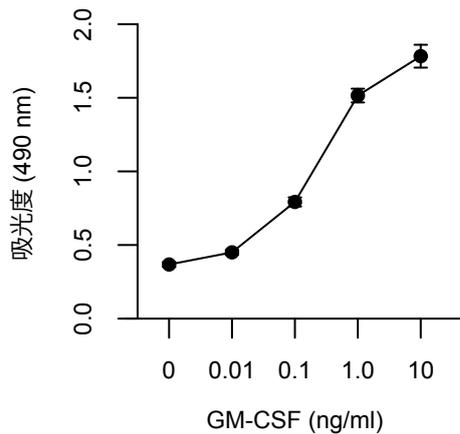
Ramshaw H, Woodcock JM, Xu Y, Guthridge M, McKinstry WJ, Lopez AF, Parker MW (2008) The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *Cell* 134(3):496–507.

47. Krausgruber, T., K. Blazek, T. Smallie, S. Alzabin, H. Lockstone, N. Sahgal, T. Hussell, M. Feldmann, I. A. Udalova (2011) IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* 12: 231–238.

A



B



C

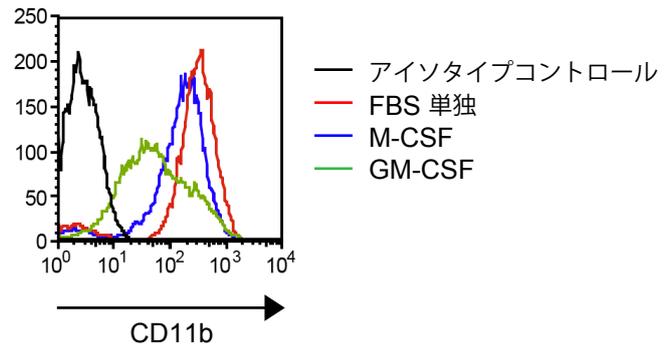


図 1. GM-CSF は、*in vitro*において、M-CSF よりもミクログリアの増殖を強く促進させるとともに、大きな形質の変化を引き起こす。

(A) M-CSF (10 ng/ml) または GM-CSF (10 ng/ml) 存在下の混合グリア培養。日齢 1–3 日の新生仔マウスから脳を採取し、そこから得た細胞懸濁液を培養した。左：培養 8 日目の位相差顕微鏡画像。緩く接着した円形のミクログリアが観察される。スケールバー = 50 μ m。右：培養 8 日目のミクログリアの細胞数。浮遊細胞 (= ミクログリア) を回収し、血球計算板にて計数した。FBS 単独を 1 として、相対値を示す。各群 n = 4。* p < 0.05。

(B) GM-CSF は濃度依存的に初代培養ミクログリアの増殖を促進させる。GM-CSF を種々の濃度 (0, 0.01, 0.1, 1.0, 10 ng/ml) 添加して混合グリア培養を行い、培養 10 日目にミクログリアを回収し、MTS アッセイにて細胞数を計測した。数値は 490 nm の吸光度を表している。各群 n = 4。

(C) 初代培養ミクログリアにおける CD11b の発現。M-CSF (10 ng/ml) または GM-CSF (10 ng/ml) 存在下で 10 日間培養した後にミクログリアを回収し、フローサイトメトリーにて解析した。

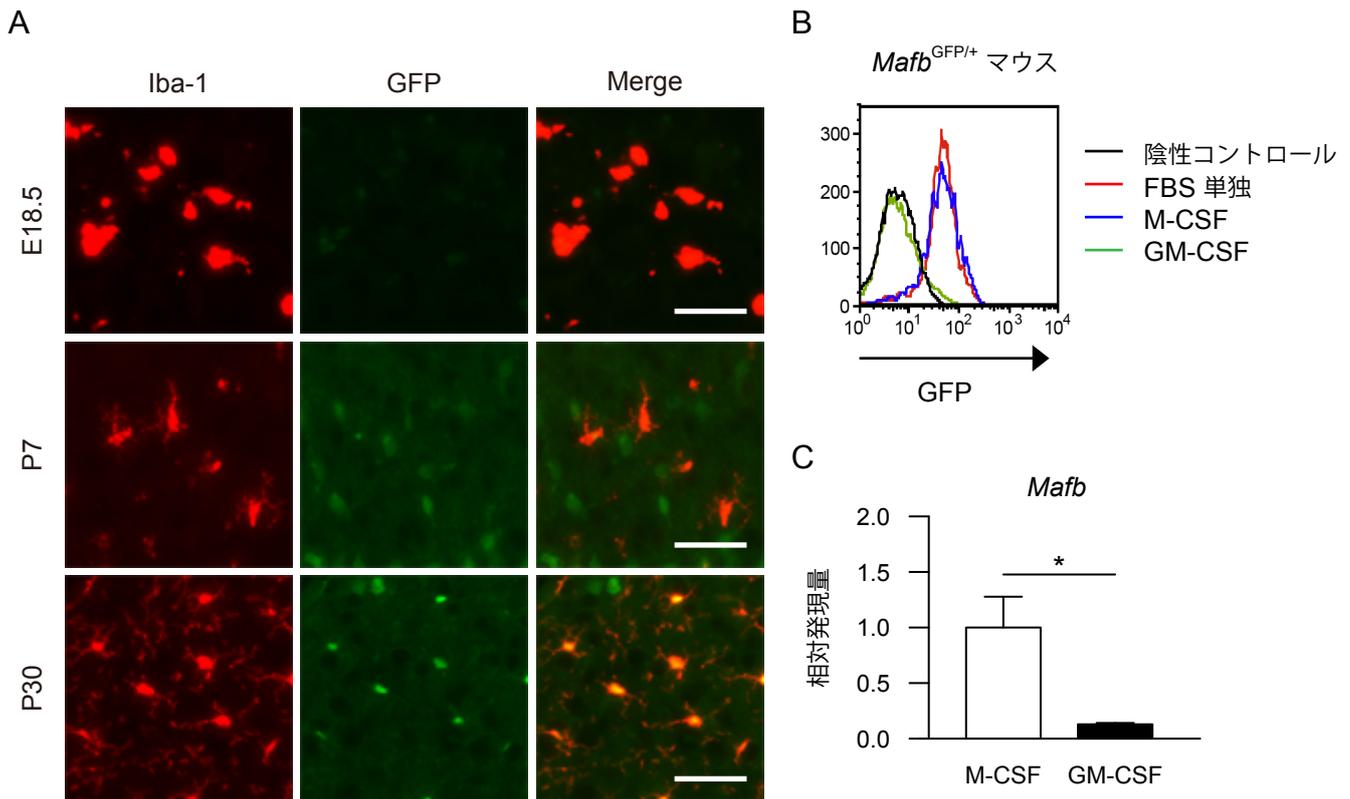


図 2. MafB の発現は、*in vivo* ではミクログリアが成熟するにつれて上昇し、*in vitro* では GM-CSF によって減少する。

(A) 大脳皮質の免疫組織化学。 *Mafb*^{GFP/+} マウスより脳切片を作製し、E18.5、P7、P30 における GFP (= MafB) の発現を観察した。抗 Iba1 抗体 (1:2,000) でミクログリアを検出した。スケールバー = 50 μ m。

(B) *Mafb*^{GFP/+} ミクログリアにおける GFP の発現。日齢 1–3 日の *Mafb*^{GFP/+} マウスの脳を採取して、混合グリア培養を行った。M-CSF (10 ng/ml) または GM-CSF (10 ng/ml) 存在下で 10 日間培養した後にミクログリアを回収し、フローサイトメトリーにて解析した。野生型ミクログリアを陰性コントロールとした。

(C) 初代培養ミクログリアにおける *Mafb* mRNA の発現。日齢 1–3 日の野生型マウスの脳を採取して、混合グリア培養を行った。M-CSF (10 ng/ml) または GM-CSF (10 ng/ml) 存在下で 10 日間培養した後に RNA を抽出し、定量 RT-PCR にて測定した。各群 n = 4。**p* < 0.05。

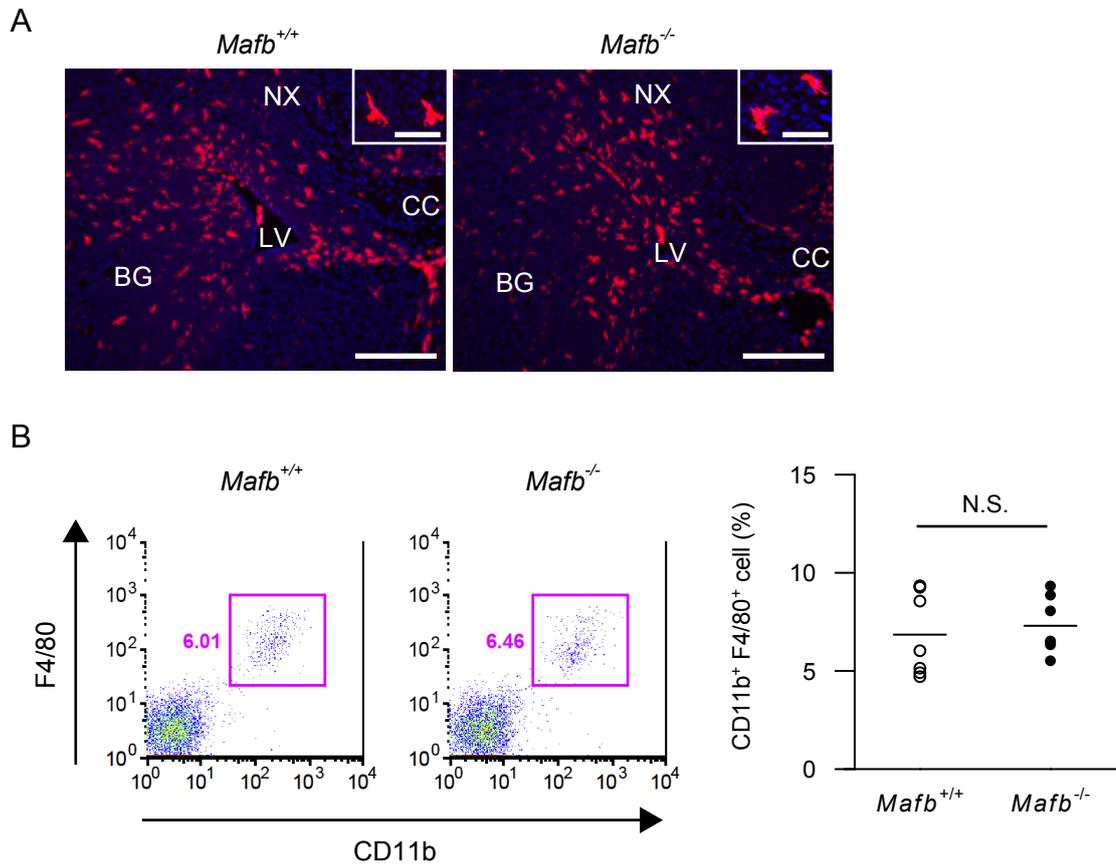


図 3. *Mafb* 遺伝子欠損マイクログリアでは、*in vitro* における GM-CSF の効果が増強される。

(A) 胎生 18.5 日マウス脳の免疫組織化学。 *Mafb*^{+/+} または *Mafb*^{-/-} 胎仔マウスより脳切片を作製し、抗 Iba1 抗体 (1:2,000、赤) でマイクログリアを検出した。核染色に Hoechst 33342 (青) を用いた。スケールバー = 100 μm。CC = 脳梁、BG = 基底核、LV = 側脳室、NX = 大脳新皮質。挿入図：高倍率像。スケールバー = 50 μm。

(B) 胎生 18.5 日マウス脳におけるマイクログリアの割合。 *Mafb*^{+/+} または *Mafb*^{-/-} 胎仔マウス脳から得た細胞懸濁液を用い、フローサイトメトリーにてマイクログリア (CD11b⁺ F4/80⁺) の割合を計測した。各群 n = 7。

N.S. = not statistically significant。

(次項に続く)

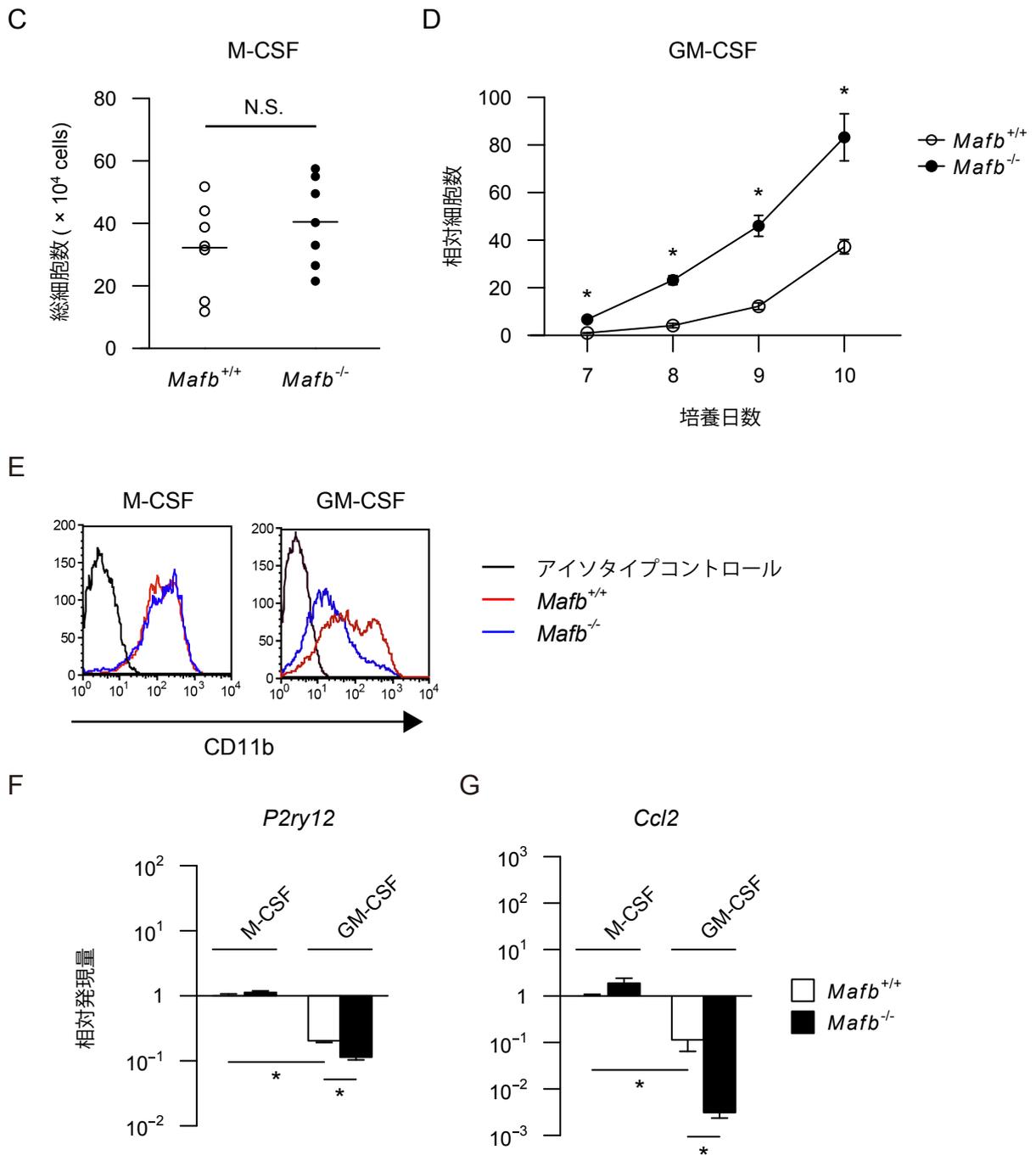


図 3. (前項からの続き)

(C) M-CSF 存在下における *Mafb* 遺伝子欠損マイクログリアの増殖能。M-CSF (10 ng/ml) 存在下で 10 日間培養し、血球計算板にてマイクログリアの細胞数を計測した。各群 n = 6。N.S. = not statistically significant。

(D) GM-CSF 存在下における *Mafb* 遺伝子欠損マイクログリアの増殖能。GM-CSF (10 ng/ml) 存在下で培養し、7-10 日目に血球計算板にてマイクログリアの細胞数を計測した。培養 7 日目における *Mafb*^{+/+} の細胞数を 1 とし、相対値を示す。各群 n = 7。* *p* < 0.05。

(E) *Mafb* 遺伝子欠損マイクログリアにおける CD11b の発現。M-CSF (10 ng/ml) または GM-CSF (10 ng/ml) 存在下で 10 日間培養した後にマイクログリアを回収し、フローサイトメトリーにて解析した。

(F,G) *Mafb* 遺伝子欠損マイクログリアにおける *P2ry12* (E) と *Ccl2* mRNA (F) の発現。M-CSF (10 ng/ml) または GM-CSF (10 ng/ml) 存在下で 10 日間培養した後に RNA を抽出し、定量 RT-PCR にて測定した。各群 n = 4-6。* *p* < 0.05。

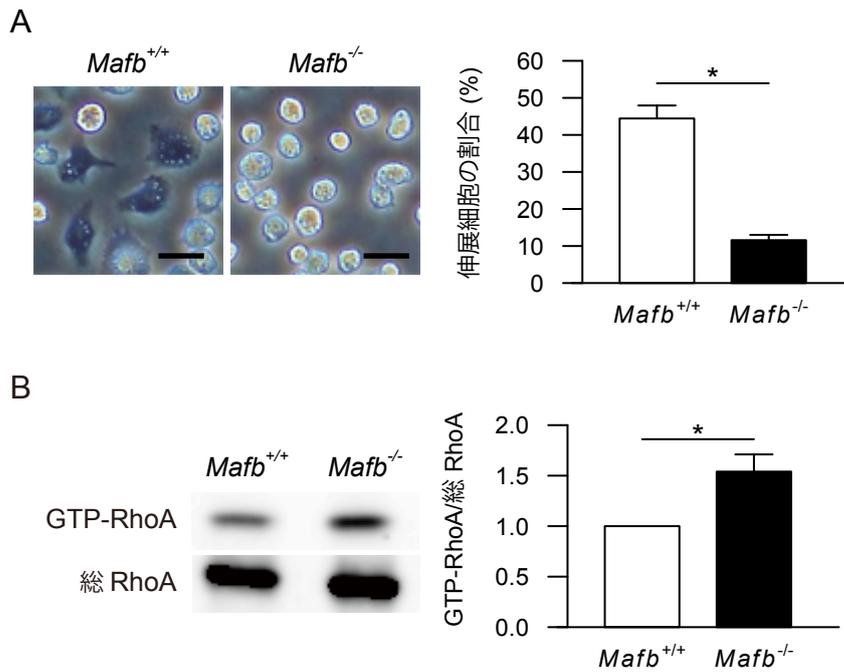


図 4. *Mafb* 遺伝子欠損ミクログリアは、GM-CSF 存在下で、RhoA の過剰な活性化を一部介して、円形の細胞形態を示す。

(A) 左：GM-CSF 存在下の初代培養ミクログリアの位相差顕微鏡像。GM-CSF (10 ng/ml) 存在下で混合グリア培養を 8 日間行った後にミクログリアを回収し、播種後 30 分後に撮影した。スケールバー = 25 μ m。右：伸展細胞の割合。各群 n = 5。* $p < 0.05$ 。

(B) GTP 結合型 RhoA に対するプルダウンアッセイ。(A) と同じ条件でミクログリアを回収し、播種後 30 分後にタンパク質を抽出した。GST 融合 rhotekin-RBD を用いてプルダウンし、抗 RhoA 抗体 (1:1,000) を用いてイムノブロッティングを行った。3 回実験を行い、デンストメトリーでバンドの濃さを定量化した。数値は GTP-RhoA/ 総 RhoA の比で表した。* $p < 0.05$ 。

(次項に続く)

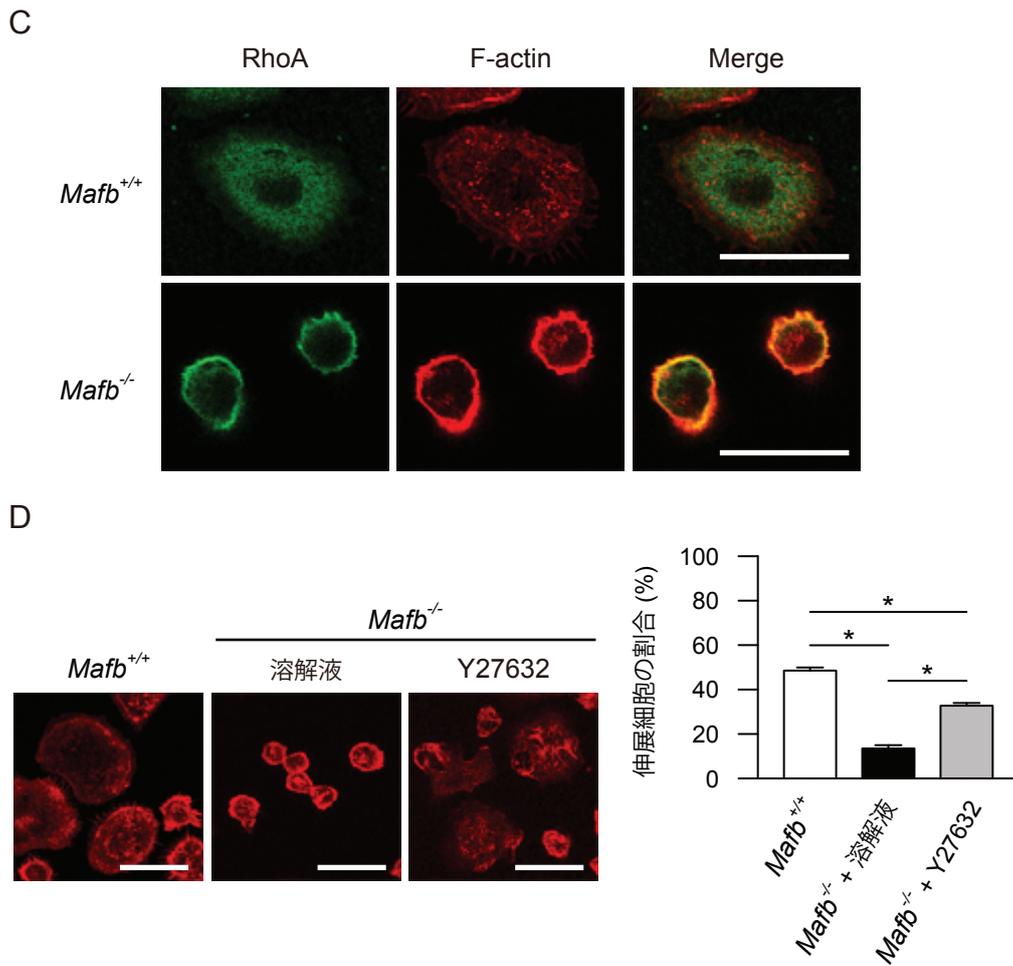


図 4. (前項からの続き)

(C) GM-CSF 存在下の初代培養マイクログリアの免疫蛍光染色。(A)と同じ条件でマイクログリアを回収し、播種後 30 分後に固定した。RhoA (緑) と F-actin (赤) を共焦点顕微鏡にて観察した。スケールバー = 25 μ m。

(D) ROCK 阻害薬 Y27632 によって *Mafb*^{-/-}マイクログリアが伸展する。左：(A)と同じ条件で回収したマイクログリアに溶解液 (= 蒸留水) または Y27632 (10 μ M) を添加し、播種後 30 分後に固定した。F-actin (赤) を共焦点顕微鏡にて観察した。スケールバー = 25 μ m。右：伸展細胞の割合。各群 n = 3。**p* < 0.05。