

氏名（本籍）	岡島 智美		
学位の種類	博 士（理学）		
学位記番号	博 甲 第 9835 号		
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Atypical Cadherin FAT3 Is a Novel Mediator for Morphological Changes of Microglia (非定型カドヘリン FAT3 を介したミクログリアの形態制御機構の解明)		
主査	筑波大学助教	博士（工学）	鶴田 文憲
副査	筑波大学教授	学術博士	橋本 哲男
副査	筑波大学教授	博士（理学）	中田 和人
副査	筑波大学教授	博士（医学）	千葉 智樹

論 文 の 要 旨

本論文において著者は、ミクログリア細胞株BV2を用いて、非定型カドヘリンファミリーFAT3によるミクログリア形質制御のメカニズムを解析し、FAT3がミクログリア突起の運動性を減少させる新規因子であることを見出している。また*Fat3*ノックアウトマウスの解析から、FAT3が出生後におけるミクログリアの形質変化タイミングを調節し、適切なシナプス形成を制御する因子であると結論づけている。

ミクログリアは、脳内免疫機能を担当する常在型マクロファージであり、病原菌や死細胞を除去することで脳内環境を維持している。また近年、ミクログリアは発達過程におけるシナプス形成にも関与することが示唆されている。先行研究から、発達過程のミクログリアはアメボイド型の形態からラミファイド型の形態に変化し、自身の性質も活性型から監視型へと変換させることが報告されている。その一方で、発達過程ミクログリアの形質変化を制御するメカニズムの全容は明らかとなっていない。本論文において筆者は、ミクログリア形質を制御する新規因子の同定ならびにメカニズム解析を目的としている。

まず筆者は、ミクログリア形態変化を*in vitro*で評価する系を構築し、新規制御因子のスクリーニング解析について論じている。一般的に、マウス脳からミクログリアを単離すると操作過程で活性化してしまい、安定的なミクログリア初代培養を行うことは困難を極める。そこで筆者は、生体内ミクログリアと遺伝子発現が類似したミクログリア細胞核BV2を用いて、標的因子を探索した。まず筆者は、BV2を汎用培地と高栄養培地で培養すると、高栄養培地で培養したときは突起の形状が安定化し、細胞が細長くなることを見出した。次に、これらBV2の遺伝子発現パターンをDNAアレイで比較解析し、高栄養培地で発現上昇する遺伝子として非定型カドヘリンファミリー*Fat3*の同定に成功した。先行研究においてFAT3はENA/VASPタンパク質を介して、アクチン骨格系の制御に関わることが報告されている。筆者は、siRNAを用いて細胞内のFAT3発現を減少させたところ、FAT3がBV2の突起の維持に必要な因子であることを見出した。以上の結果から筆者は、FAT3がミクログリアの形態や突起形成を調節する新しい候補因子になると結論づけている。次に筆者は、FAT3の遺伝子発現を促す因子をスクリーニングし、高栄養培地に含まれる因子から、ヒポキサンチンを同定した。ヒポキサンチンはプリン誘導体の一種で、脳ではサ

ルベージ経路を介したヌクレオチド代謝の基質となっている。筆者は、BV2にヒポキサンチンを添加すると、BV2突起の運動性が減少し、ダイナミックな突起の伸長退縮が減衰することを発見した。一連の結果から筆者は、FAT3はアクチン骨格系を介して、BV2突起の伸長退縮を抑制することで、形態の安定化に寄与する新規候補因子になると結論づけている。

次に筆者は、個体におけるFAT3の機能解析を行うため、CRISPR/Cas9法を用いて*Fat3*ノックアウトマウスを作成した。このマウスを用いて新生仔ミクログリアの形態を観察したところ、野生型と比較して、過剰にラミフィケーションしたミクログリアが数多く観察された。このことから筆者は、FAT3の欠損によってミクログリア突起の伸長退縮の抑制効果が解除され、結果的にハイパーラミファイド型のミクログリアが産生されると論じている。次に筆者は、FAT3の脳内での局在を観察するため、ラビットにFAT3細胞内領域の組換えタンパク質を免疫し、FAT3ポリクローナル抗体を作成した。この抗体を用いて、新生仔マウスの脳切片を染色したところ、FAT3がミクログリアのみならず、神経細胞のシナプスにも発現していることを見出した。また筆者は、*Fat3*ノックアウトマウスでは、これらシナプスの数が減少することを見出した。先行研究から、新生仔ミクログリアはラミファイド型へと変換したのち、近傍のシナプスを精査して、不必要なシナプスを除去することが報告されている。*Fat3*ノックアウトによってミクログリアのラミファイド型への転換が促進し、シナプスの数が減少することから、筆者は、ミクログリアFAT3が、シナプス上のFAT3あるいはFAT3リガンドを認識し、過剰なシナプス刈り込みを抑制するDon't eat meシグナルとして作用しているのではないかと論じている。

総じて、本論文において筆者は、ミクログリア形質を制御する新規因子として非定型カドヘリンファミリーFAT3を同定し、FAT3が突起形成の安定化に寄与することを論じている。またFAT3がミクログリアの形質変化タイミングを調節し、過剰なシナプス刈り込みを抑制する新規制御因子になりうると結論づけている。

審 査 の 要 旨

先行研究から、ミクログリアの形質変化は、適切な神経回路網の形成と密接に関連することが報告されている。その一方で、一連のプロセスにおける詳細な分子メカニズムは解明されていなかった。本研究において筆者は、分子生物学的手法を用いて、形質制御の候補因子としてFAT3を同定した。さらに*Fat3*欠損マウスの解析から、FAT3が出生後の成熟過程を制御し、適切なシナプス形成を制御する可能性を発見した。特に筆者が本論文で提唱している、FAT3が新しいDon't eat meシグナルの候補因子として機能する、という仮説は、ミクログリア研究領域のみならず、神経科学領域全般の発展に道をひらく可能性がある。以上、本論文は、分子生物学、神経科学領域において、独創性、新規性も高く、学術的価値の高い論文であると評価された。

令和3年1月25日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。