

Microglia Transcriptional Profiling in Major Depressive Disorder Shows Inhibition of Cortical Gray Matter Microglia

(Biological Psychiatry Volume94, Issue8)

遺伝子発現プロファイリングとMDD患者の灰白質におけるミクログリア活性の抑制

医学類 2 年 K.H.

遺伝子発現プロファイリング

スクリーニング

新規の分子・遺伝子を探索

プロファイリング

ある条件下での分子の相互作用・振る舞いから
何が起きているのかを推定

する目的で網羅的な解析を行う

大うつ病性障害：MDD (Major Depressive Disorder)

- ・抑うつ気分
- ・不眠
- ・疲労感
- ・自殺念慮

抗うつ薬・精神療法が有効

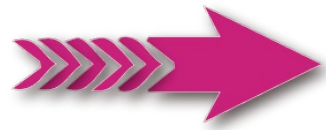
神経病理的なマーカーは見つかっていない

大うつ病性障害：MDD (Major Depressive Disorder)

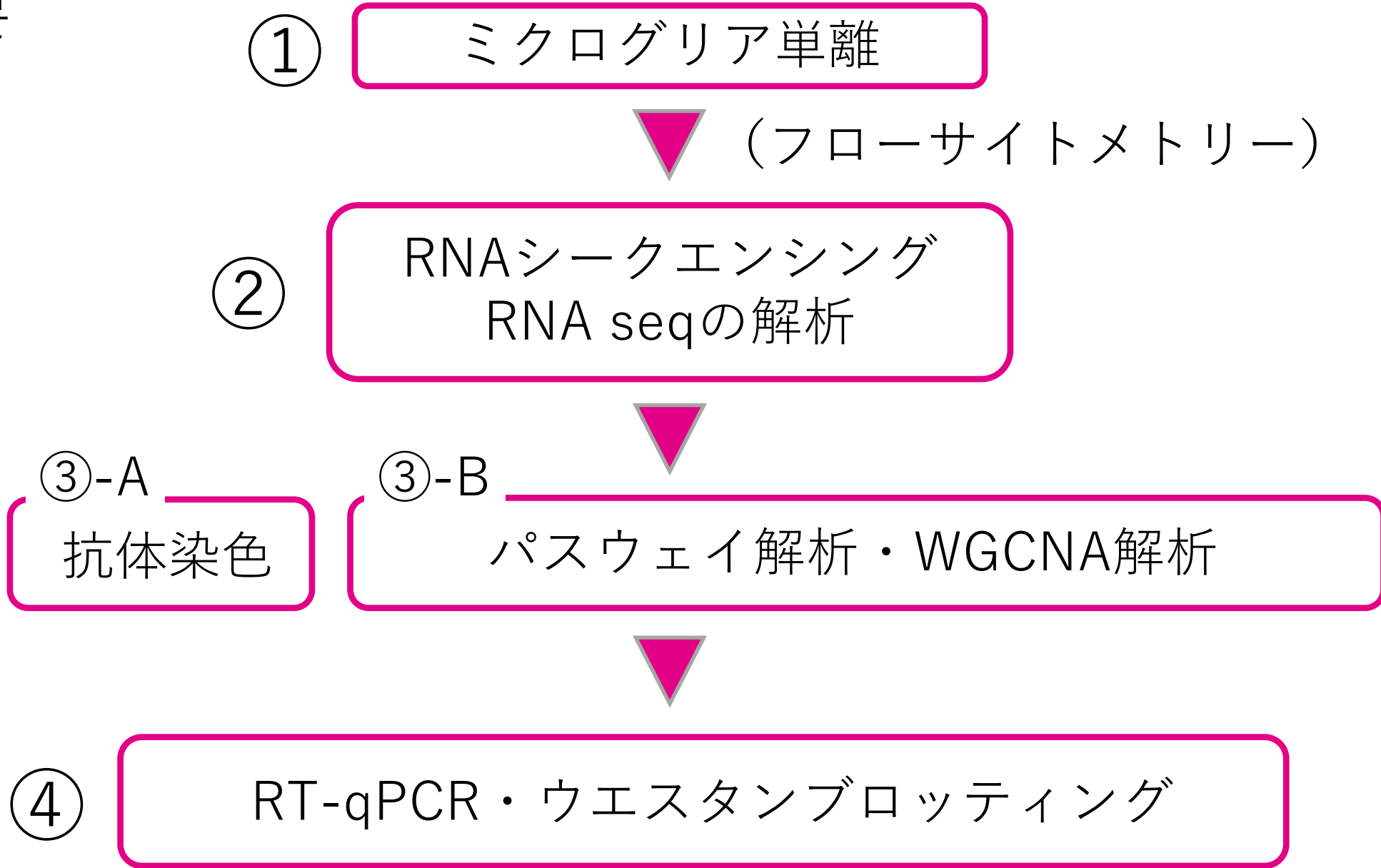
神経病理的なマーカーは見つかっていない

TMEM119・CX5CR1 増加？

CD163・CD14・CD68 減少？



ミクログリアの全RNAを調べる
(MDDによりどう変化するか？)



灰白質のミクログリアでの発見

- MDD患者では81遺伝子（**CD163**）がダウンレギュレート
- それらの遺伝子は、**免疫活性や貪食**に関与するものだった
- MDDでの免疫抑制にCD200・CD47が関与している

初めて死後の大脳皮質でミクログリアのトランスクリプトームを解析した

① ミクログリア単離

Table 1. Characteristics of Donors With MDD and Control Donors Used for RNA Sequencing of Isolated Microglia

Donors	Sex, F/M, <i>n</i>	Age at Death, Years	PMD, Hours	pH CSF
Control, <i>n</i> = 10	5/5	75.0 ± 3.6	7.2 ± 0.5	6.8 ± 0.1
MDD, <i>n</i> = 13	7/6	63.7 ± 4.0	8.0 ± 0.7	6.7 ± 0.1

Data are presented as mean ± SEM.

CSF, cerebrospinal fluid; F, female; M, male; MDD, major depressive disorder; PMD, postmortem delay.

脳梁（白質：WM）と後頭葉皮質（灰白質：GM）から採取

① ミクログリア単離

A

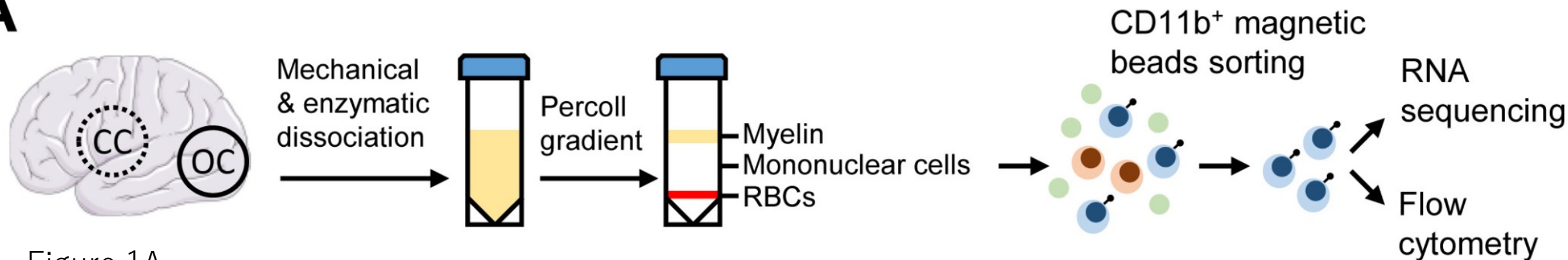


Figure 1A

抗CD11b磁気ビーズを用いてミクログリアを選び出す

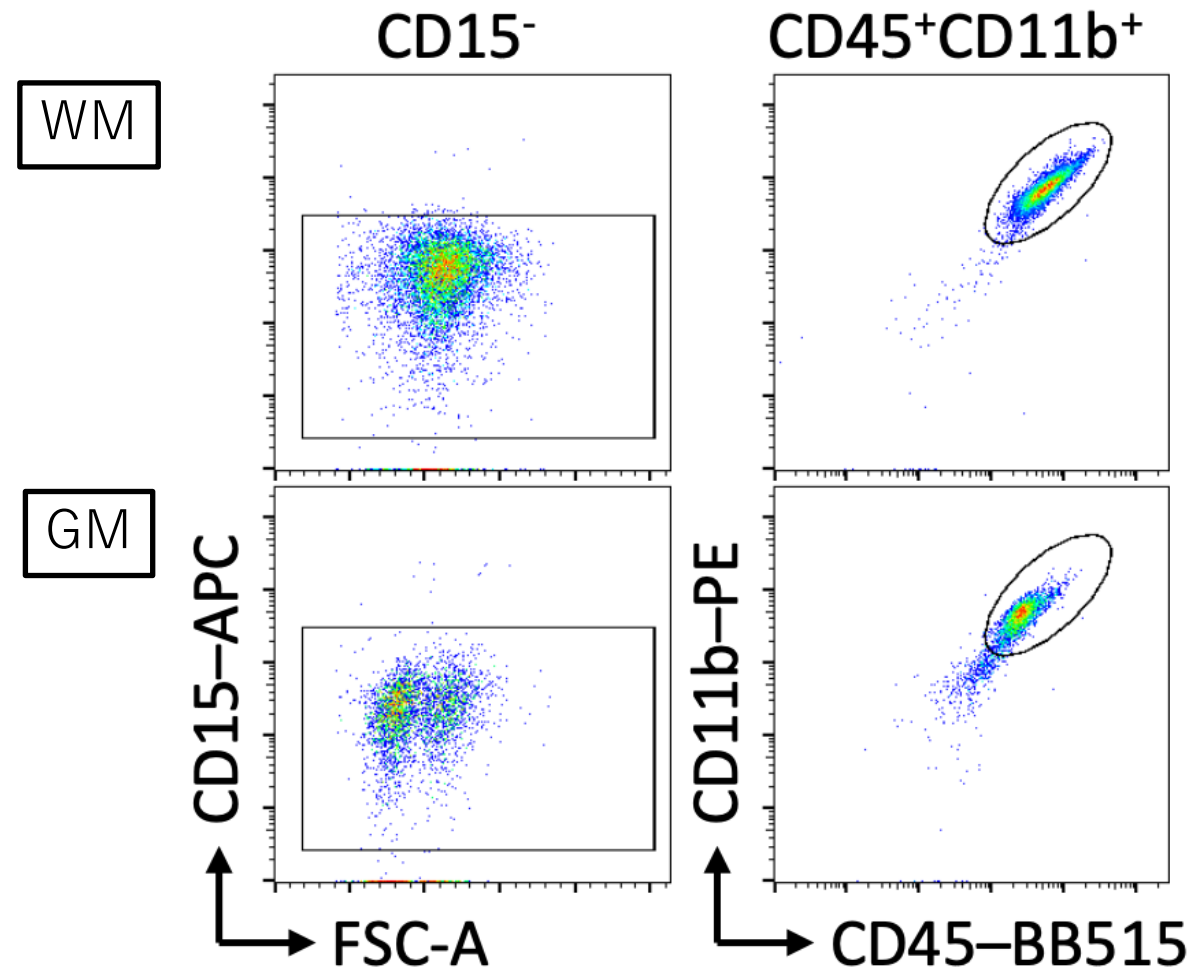
(磁気活性化セルソーティング)



RNAを抽出・シーケンシング

フローサイトメトリー：単離したミクログリアの純度は？

Supplementary Figure 1



フローサイトメトリー

レーザー光と蛍光物質を用いて、
細胞をひとつずつ解析する

- CD15陰性
- CD45・CD11bともに陽性

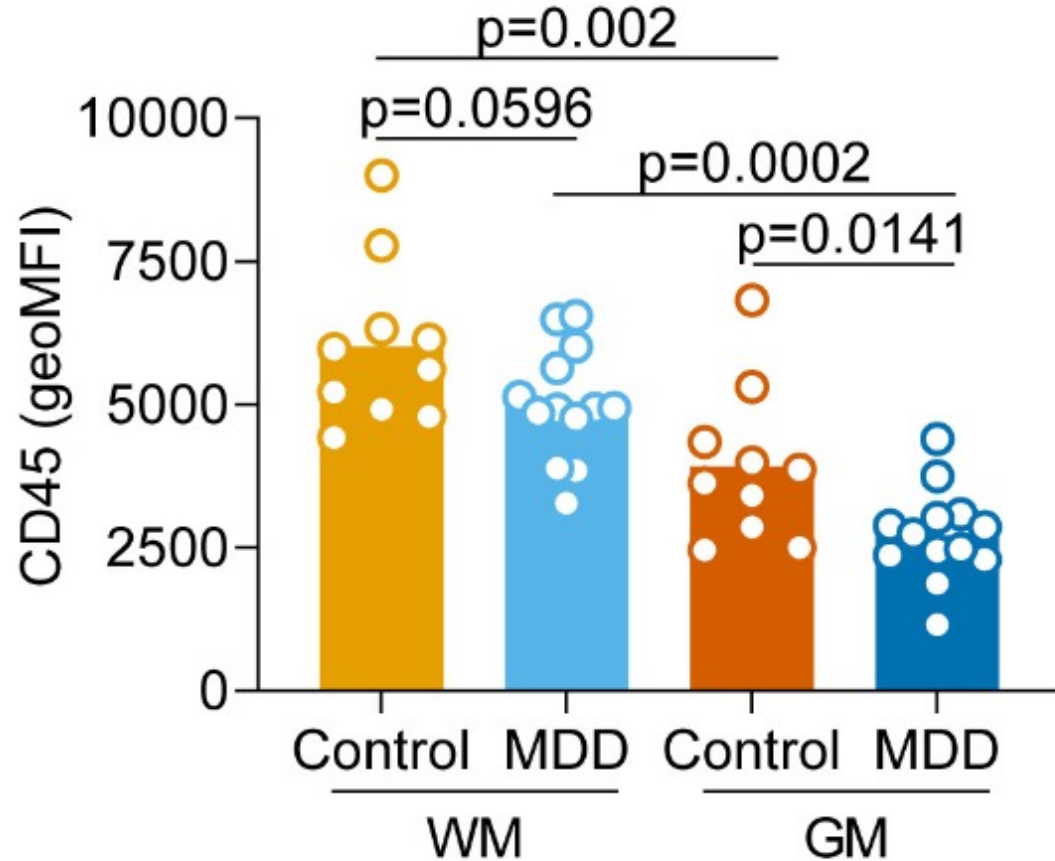


純度は適切

フローサイトメトリー：CD45発現の差

B

Figure 1-B

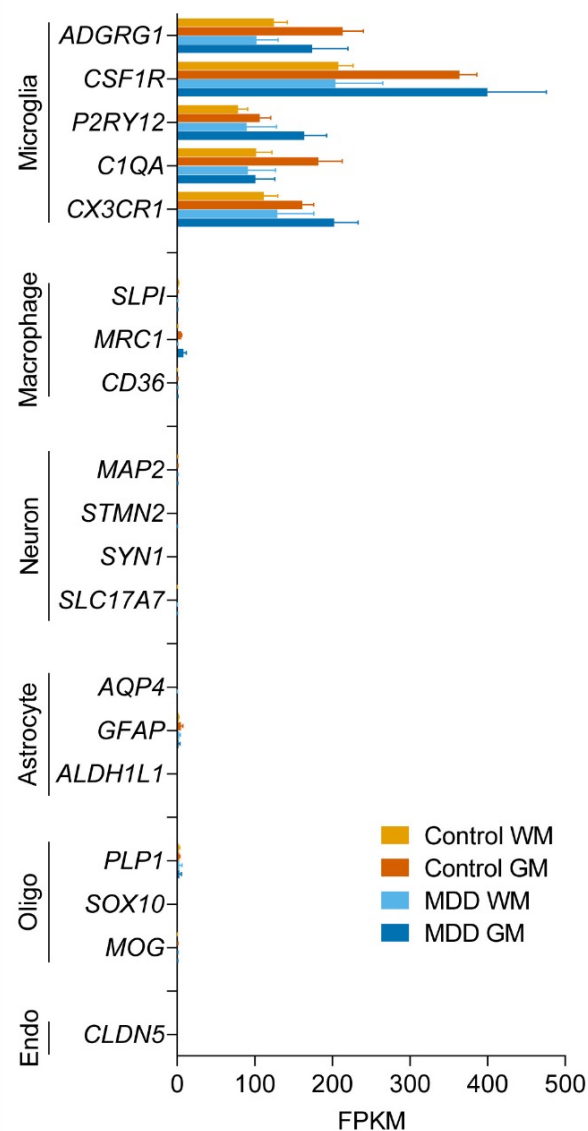


● GM < WM

● MDD < Control

(先行研究と一致)

② RNA-seqの解析：ミクログリアの純度



ミクログリアのマーカー

マクロファージ

ニューロン

アストロサイト

オリゴデンドロサイト

内皮細胞

Figure 1-C

② RNA-seqの解析：データの違いを生む因子は？

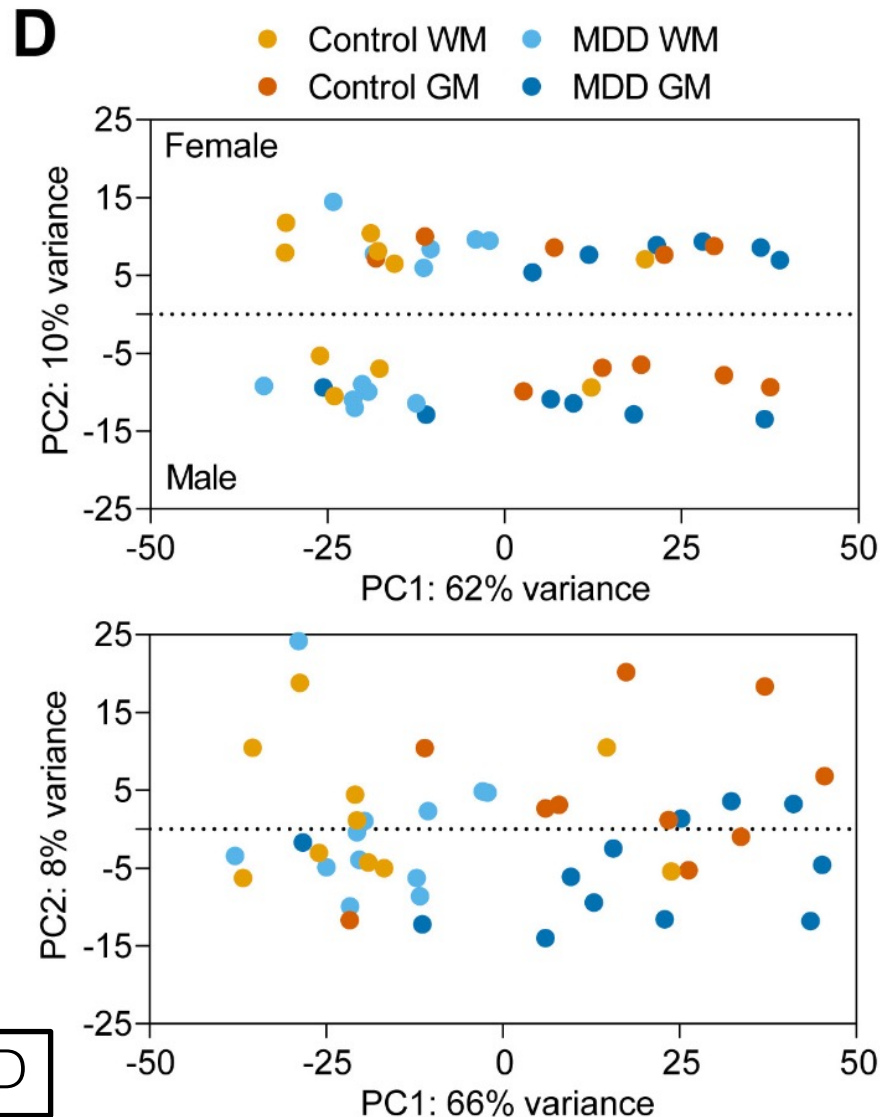


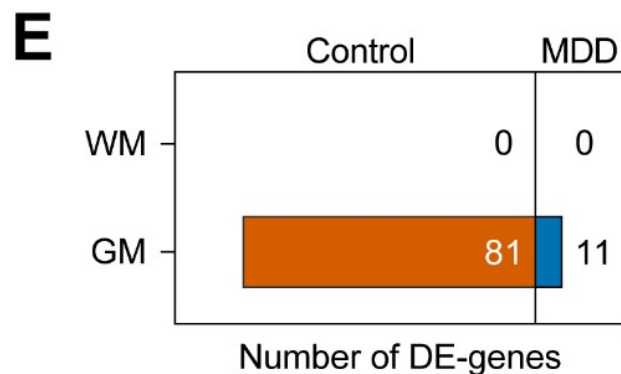
Figure 1-D

主成分分析

データの分散に最も寄与する変数と
2番目に寄与する変数を
それぞれ軸とする

WM由来かGM由来か
(次に性別)

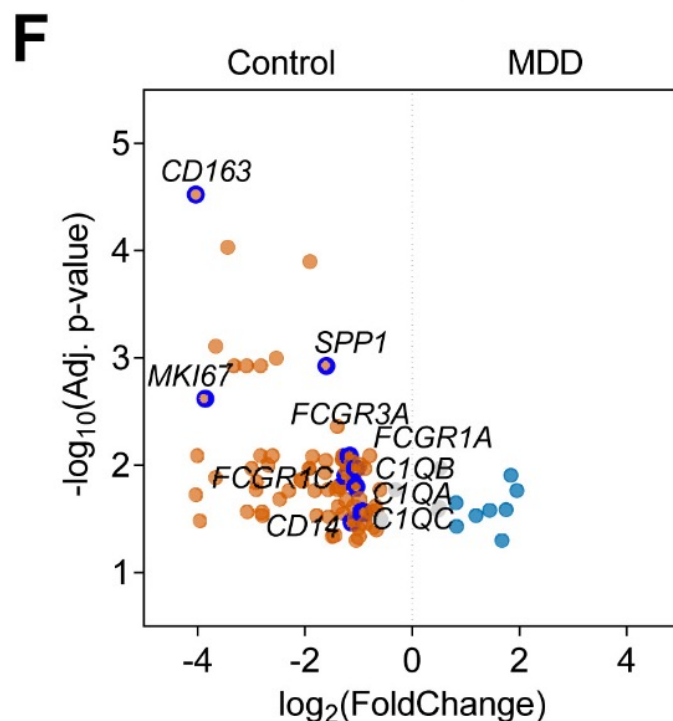
② RNA-seqの解析：遺伝子発現の差



MDDのGMミクログリアで

発現量↑：**11**

発現量↓：**81**



CD163に着目

：免疫活性化マーカー

(CD14も免疫活性化マーカー)

Figure 1-E,F

③-A 抗体染色：CD163の発現量について

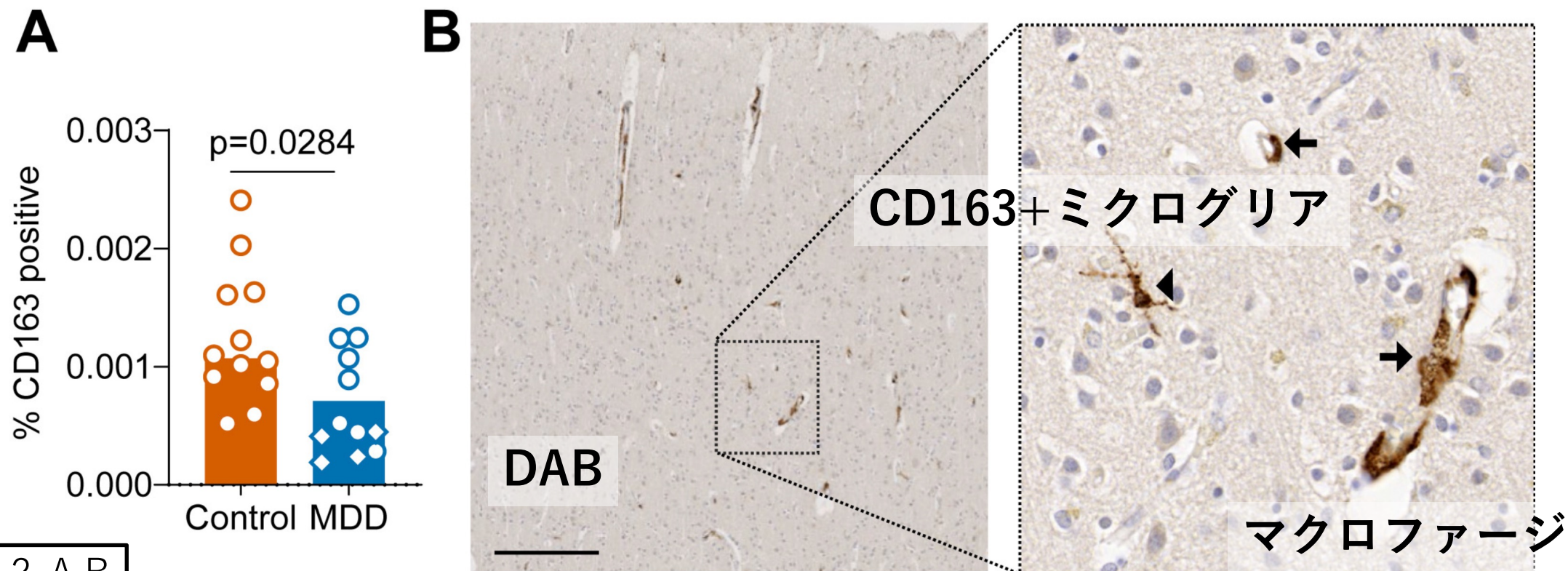


Figure 2-A,B

菱形は死亡時に明らかな抑うつ状態にあったドナー



MDDとCD163（免疫活性）抑制の関係を示唆？

③-B RNA-seqの解析：MDDにより変化する経路は？

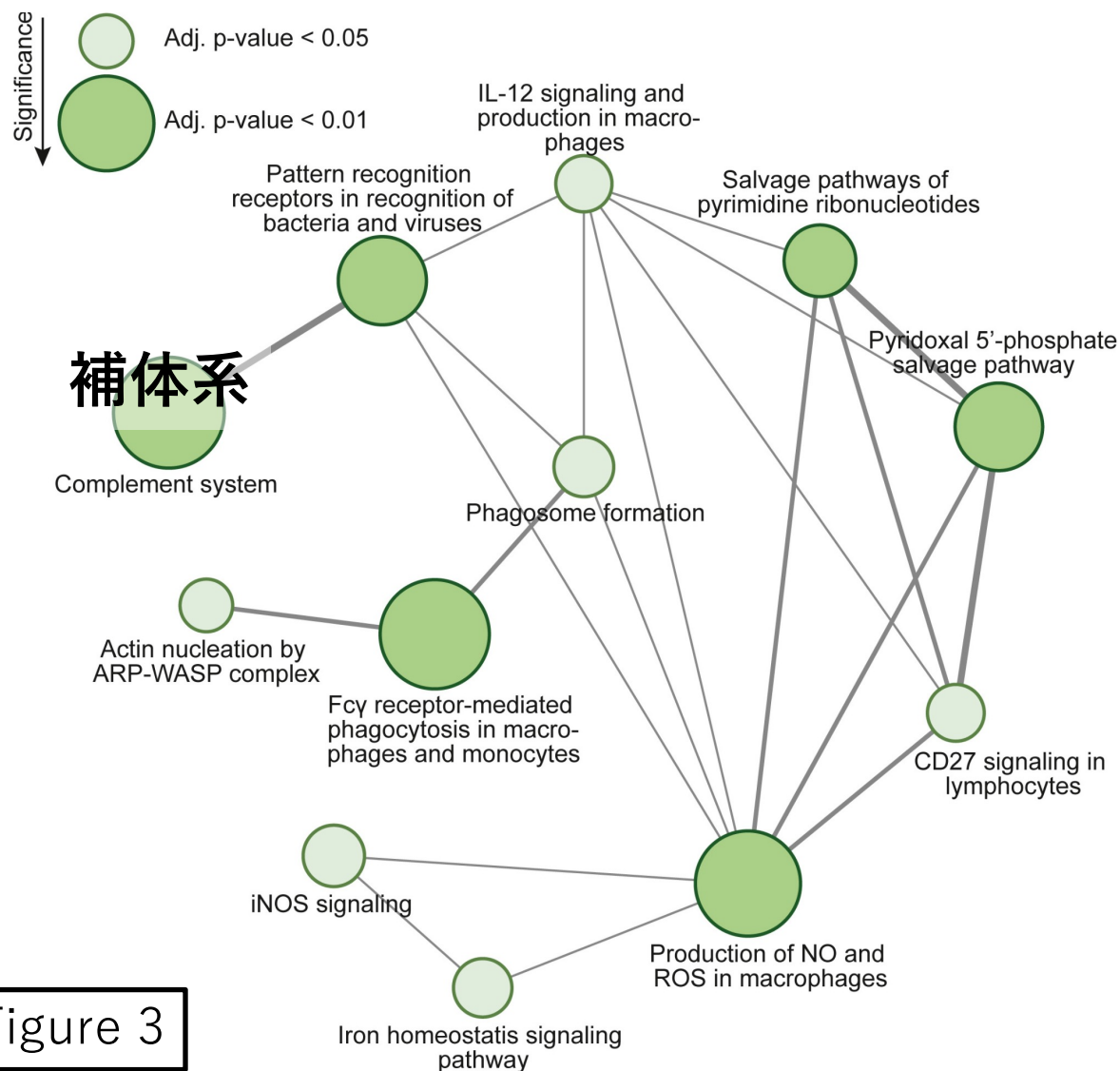


Figure 3

パスウェイ解析

パスウェイ：分子間相互作用や経路発現が変動した遺伝子が属していたパスウェイを抽出する

●免疫活性化

●食食活性

に変化（抑制）



③-B RNA-seqの解析：WGCNA解析

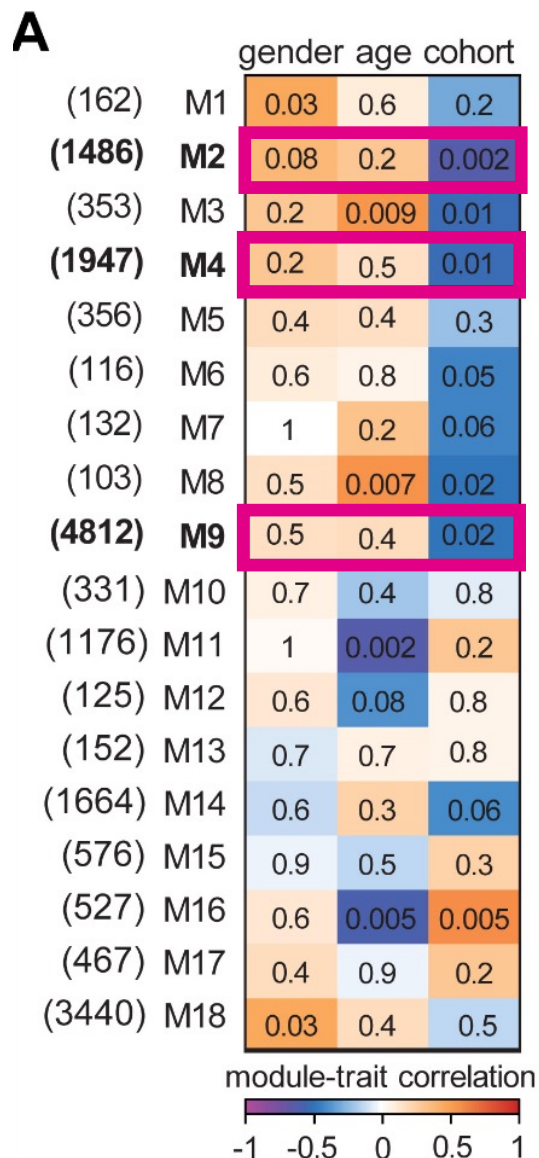


Figure 4-A

WGCNA

Rのパッケージ
共発現遺伝子のクラスターと、それに関
連する因子を同定できる

※枠内の数字はp値

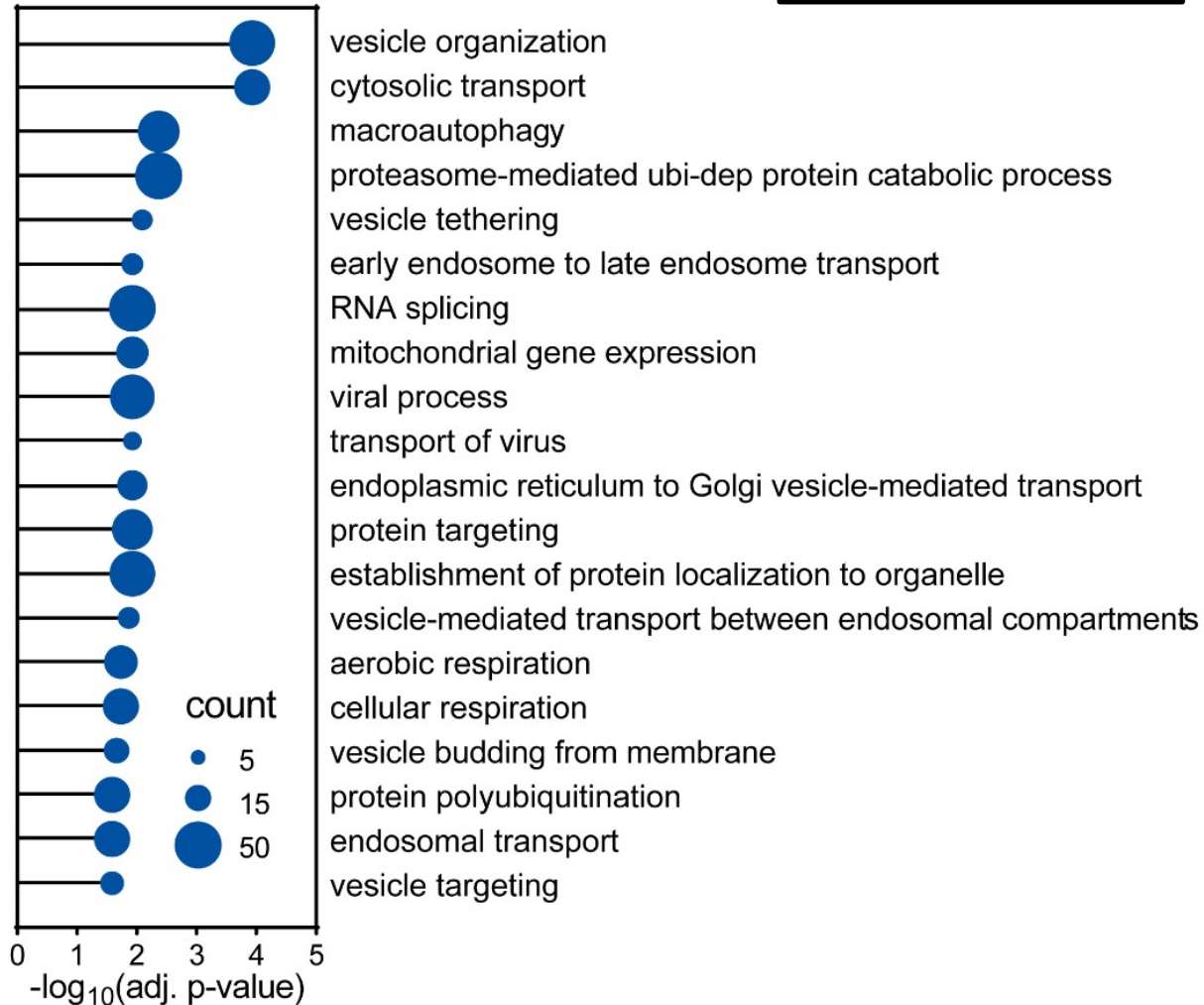
モジュール (M) 2が
最もMDDに関連する

③-B RNA-seqの解析：WGCNA解析 M2の内容は？

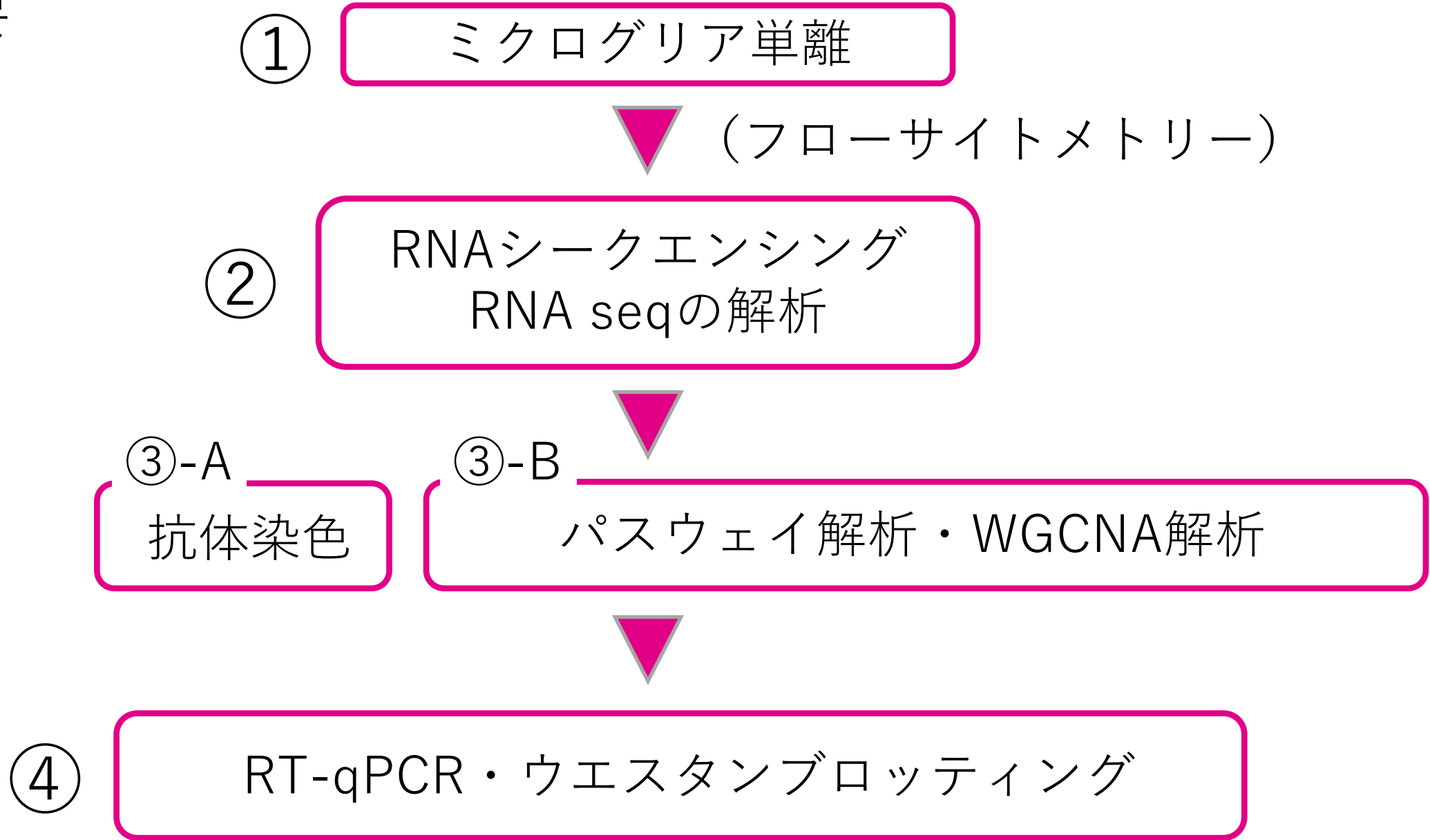
B

M2

Figure 4-B,C,D

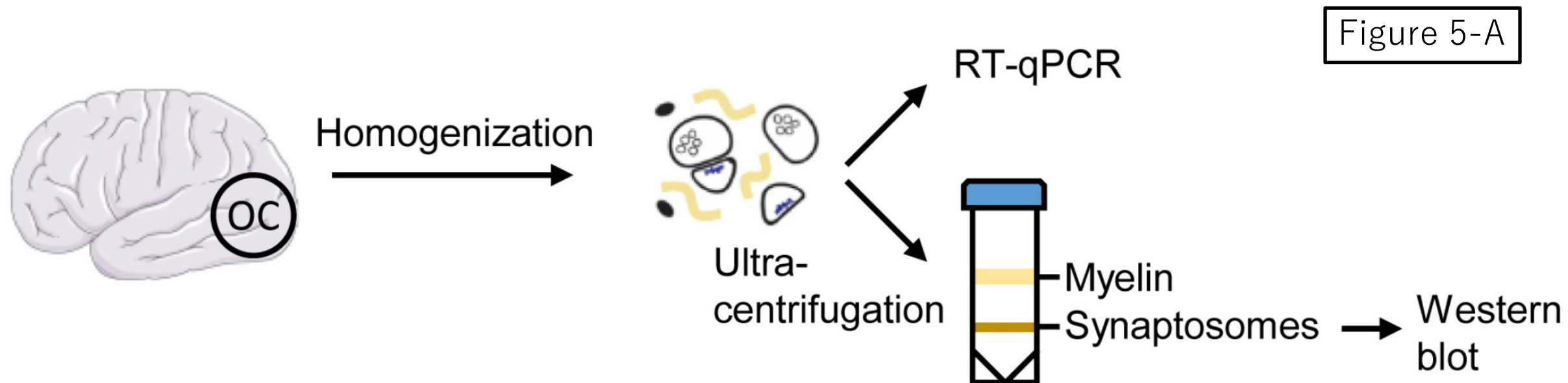


- 小胞組織化
 - 細胞質輸送
 - マクロオートファジー
- ：ミクログリア関連



④ RT-qPCR・WB

A

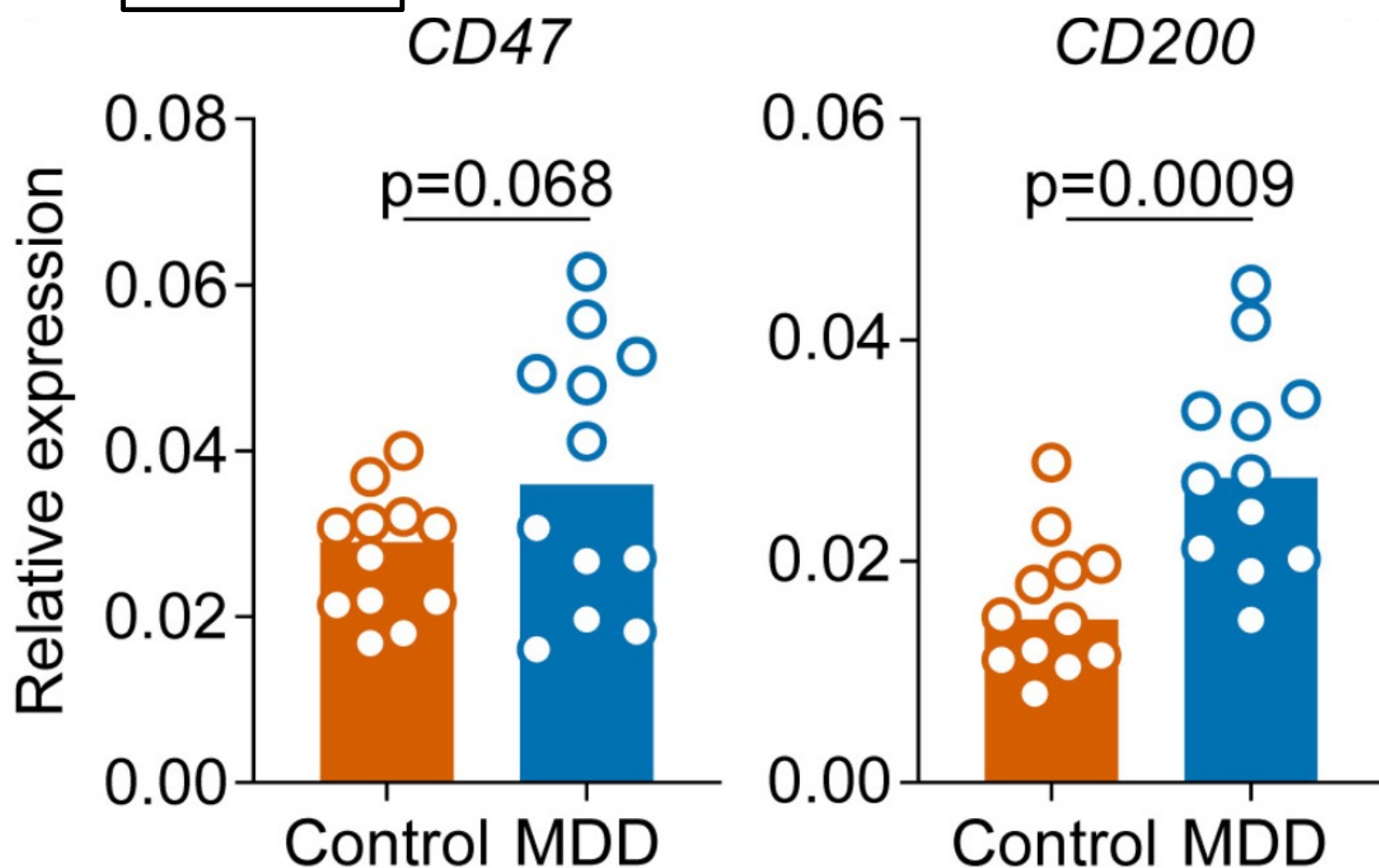


GM（灰白質）で発現量に変化あり ➡➡➡➡➡ **神経細胞による干渉が重要？**

- OC(GM)全組織でRT-qPCR
- シナプトソームを分離してWB

④ RT-qPCR・WB：免疫抑制のメカニズムは？

Figure 5-B



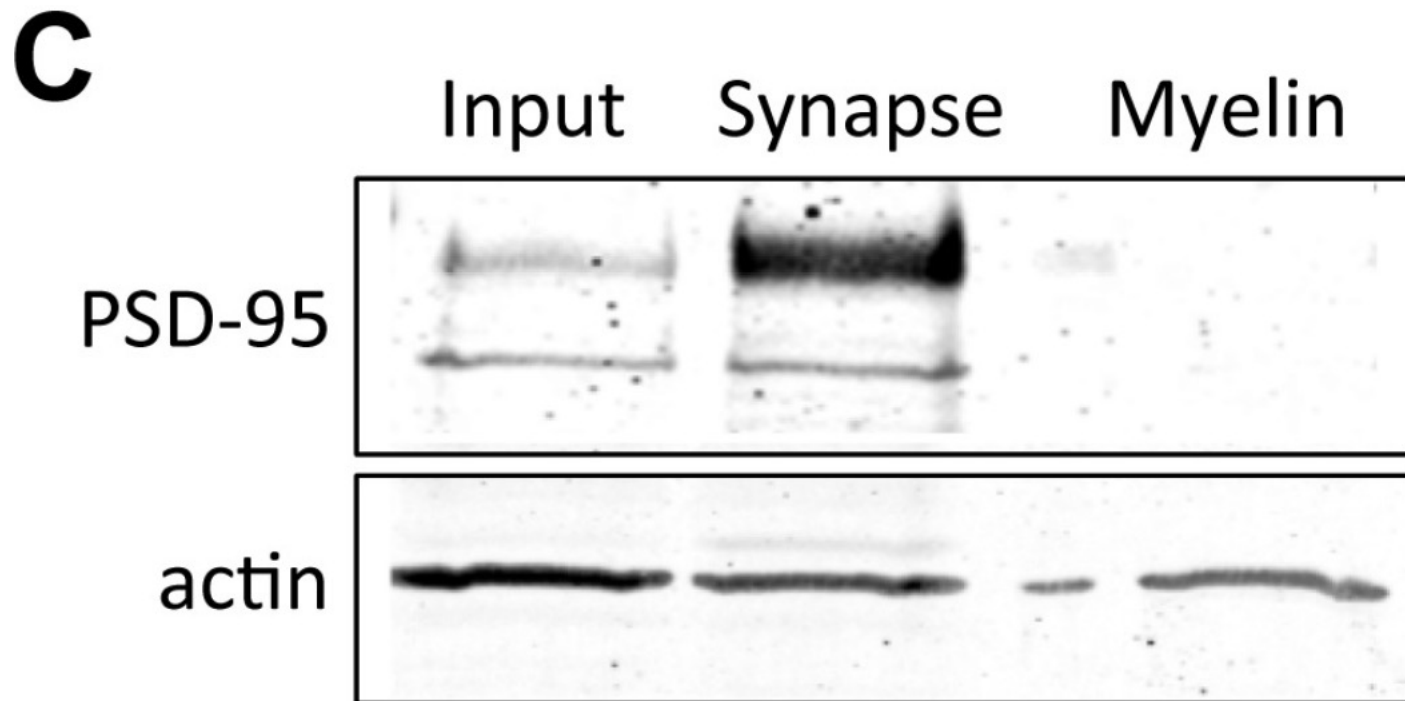
CD200・CD47

“Don't eat me” シグナル
ニューロン→ミクログリアの
シグナル伝達に関与
シナプス刈り込みを防ぐ

CD200・CD47増加が
因子となっている？

④ RT-qPCR・WB

Figure 5-C



PSD-95
興奮性シナプスのマーカー

シナプス画分が
正確に分離されている

④ RT-qPCR・WB：シナプスにおけるCD200・CD47

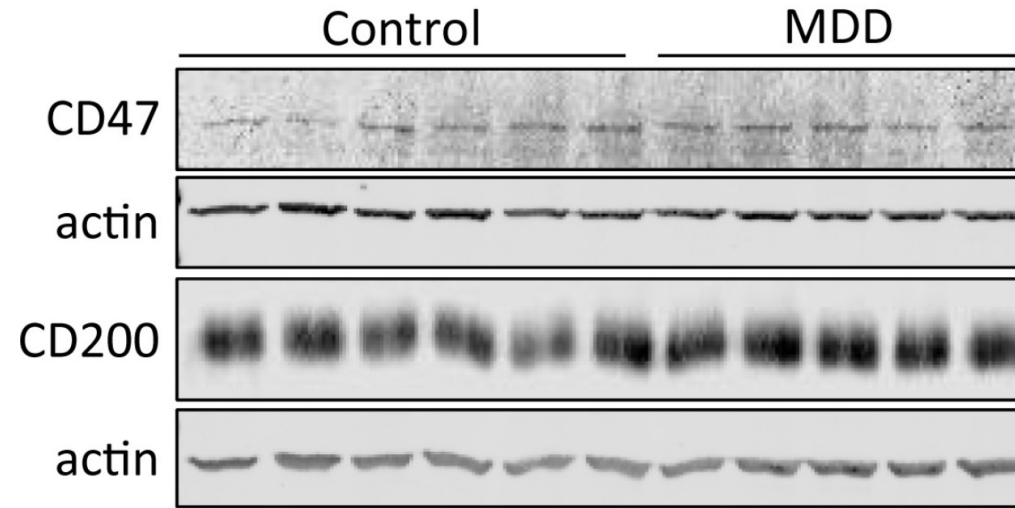
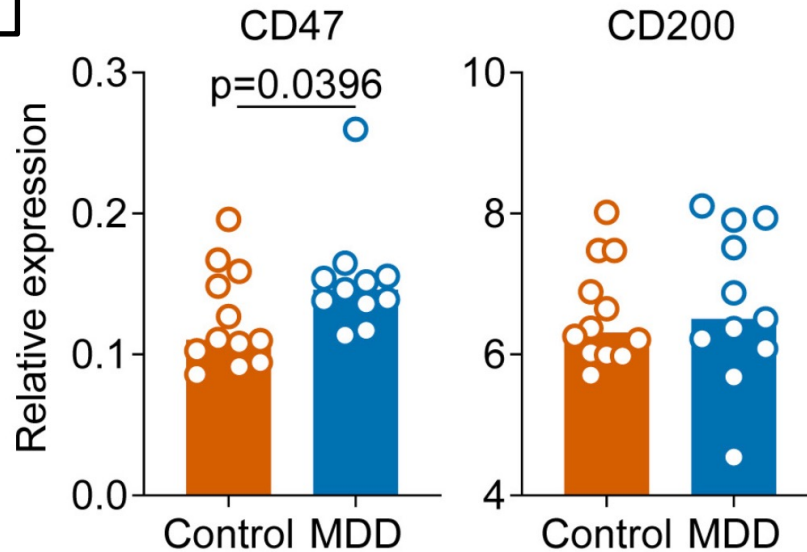


Figure 5-D,E



シナプスにおいては、
CD47のみ増加を認めた

後頭葉皮質（灰白質）のミクログリアでの発見

- MDD患者では81遺伝子（**CD163**）がダウンレギュレート
- それらの遺伝子は、**免疫活性や貪食**に関与するものだった
- MDDでの免疫抑制にCD200・CD47が関与している



MDDの後頭葉皮質では、（おそらく）神経細胞の制御により
免疫抑制されたミクログリアが確認される

- MDDの脳ドナーはほぼ全員抗うつ薬を服用
 - ：薬剤による影響の可能性を否定できない
（白質では変化がなかったなので、その可能性は低い）
- 臨床的な情報は、ドナーによっては得られなかった