

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08172

研究課題名(和文) ミクログリアCaチャネルの神経変性疾患における役割

研究課題名(英文) Roles for microglial calcium channels in neurodegenerative diseases

研究代表者

三枝 弘尚 (SAEGUSA, Hironao)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：90261205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：電位依存性カルシウムチャネル(VDCCと略)は元来神経細胞等の興奮性細胞において発現、機能すると考えられてきた。我々は近年ミクログリアという非興奮性細胞においてN型VDCCが難治性疼痛である神経因性疼痛発症に関与していることを明らかにした。本研究においてはミクログリアのVDCCが神経変性疾患発症に関与するのかどうかを培養細胞や遺伝子改変マウスを用いて検討した。その結果N型VDCCの抑制のより神経変性軽減が、反対にL型VDCCの抑制は神経変性増悪をもたらされることが示唆された。今後ミクログリアのVDCCの抑制が活性化パターンの変化をもたらす分子機構を解明することが重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Voltage-dependent calcium channel (VDCC) has been thought to play important roles in excitatory cells such as neurons. However, we have recently clarified that N-type VDCC in microglia, a non-excitatory cell type, is also critically involved in development of neuropathic pain, an intractable pain caused by nerve injuries. In the present study, we have addressed a question whether the microglial VDCCs are also involved in pathophysiology of neurodegenerative diseases. By using cultured microglial cells and transgenic mice, where knock down of microglial VDCC is achieved, we have found the following results. Knocking down the microglial N-type VDCC lead to ameliorating neurological symptoms and on the other hand knocking down L-type VDCC results in exaggeration of the symptoms. Therefore, microglial VDCCs are actually involved in the pathophysiology of neurodegenerative diseases as well but the mechanism underlying is yet to be clarified.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：Caチャネル Cav1.2 Cav2.2 パーキンソン病 MPTP ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

電位依存性カルシウムチャネル (voltage-dependent calcium channel, VDCC と略) は神経細胞等の興奮性細胞において、細胞外から Ca^{2+} が流入する主要な経路の一つであり、様々な細胞機能の制御において重要な役割を担っている。VDCC は電気生理学的、薬理学的性質からいくつかのサブタイプに分類されている (L, N, P, Q, R, T 型)。Cav2.2 は電気生理学的薬理学的に同定された N 型 VDCC の主要な構成成分であり、主に神経細胞に発現し、神経伝達物質放出の制御において重要な機能を果たしている。研究代表者はこの Cav2.2 が属する Cav2 ファミリーの生理的機能を、遺伝子改変マウスを作製することにより解析してきた (Saegusa et al. 2000, Saegusa et al. 2001, Saegusa et al. 2007)。その一連の研究から Cav2.2 ノックアウトマウス (KO) は神経因性疼痛 (神経損傷に伴って生じる難治性の疼痛) が大きく軽減されることを明らかにした (Saegusa et al. 2001)。その後、Cav2.2KO と野生型マウス脊髄における網羅的遺伝子発現解析の結果から、ミクログリアに発現することが知られる遺伝子の発現変化が上述の神経因性疼痛軽減の背景にあることが明らかとなって来た。また Cav2.2KO に脊髄神経損傷を与えると、野生型では認められる脊髄での活性化ミクログリアの集積が、ほとんど見られないことが明らかとなった (Sakurai et al. 2009)。さらに予備的な検討の結果マウスミクログリア由来細胞株において Cav2.2 が発現していることも確認された。これらのことから、Cav2.2KO における神経因性疼痛の軽減は、従来考えられていたような Cav2.2 の神経細胞における機能喪失だけでなく、ミクログリアにおける Cav2.2 の機能喪失も寄与している可能性が考えられるに至った。そこでミクログリア特異的に Cav2.2 の発現抑制を誘導できるトランスジェニックマウスを作製し、脊髄神経結紮手術を施した後に神経因性疼痛の発症がどのようになるか検討したところ、熱性痛覚過敏には影響が見られなかったが、機械性アロディニアが軽減されていた (Saegusa & Tanabe 2014)。また脊髄神経結紮手術を施していない正常側では野生型と同程度の痛覚反応が見られた。これらのことは、ミクログリアの Cav2.2 チャネルはただ発現しているだけではなく実際に機能をもつこと、しかも神経損傷等のいわば異常事態が生じた際に有意に機能するようになることを示唆している。近年、神経因性疼痛だけでなく、精神疾患や神経変性疾患等の多くの神経疾患の発症にミクログリアが関与することが明らかになって来ている。従ってミクログリアの Cav2.2 が神経因性疼痛だけでなく神経変性疾患等でもその病態生理に関わっている可能性は高いと考えられる。

ミクログリアの活性化には大きく分けて 2 種類の状態 (M1 および M2) が存在すると言

われている。M1 型活性化状態ではミクログリアは神経変性に対して亢進的に作用し、M2 型活性化状態ではミクログリアは神経細胞に対して保護的に働くと考えられている。我々がミクログリア由来培養細胞 MG6 を用いて予備的に検討したところ、N 型や L 型 VDCC のブロッカー存在下で、M1 型、M2 型を誘導する物質を添加して刺激すると、N 型を阻害した場合、M2 型を示す細胞の割合が増大し、L 型を阻害した場合は反対に M2 型が減少し M1 型が増大するという予備的な結果を得た。このように VDCC を介して流入する Ca^{2+} およびその下流のシグナル伝達機構がミクログリアの活性化のパターンに影響を与えることが示唆される。

2. 研究の目的

上述のような背景のもとに、本研究では以下の 3 点について明らかにすることを目的とした。

(1) ミクログリア特異的に VDCC の発現を抑制できるトランスジェニックマウスに神経変性を誘導した際に神経変性の程度がどのようになるかを明らかにする。

(2) *in vitro* の培養細胞レベルで認められた VDCC 阻害により引き起こされたミクログリア活性化パターンの変化が、*in vivo* の神経変性モデルにおいても起こりうるのかを上記トランスジェニックマウスを用いて明らかにする。

(3) ミクログリアの活性化パターンが細胞外からの Ca^{2+} により影響をうけるメカニズムはどのようなものであるのかを培養ミクログリア細胞を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ミクログリア由来細胞株 MG6 の培養
MG6 細胞の培養方法は文献 (Takenouchi et al. 2005) に拠った。チェンバースライド上で培養する場合は poly-L-Lysine でコーティングしたのちに細胞を撒いて培養した。

(2) 遺伝子改変マウス

ミクログリア特異的 Cav2.2 発現抑制マウス (Cav2.2KD マウス) は既に文献 (Saegusa & Tanabe 2014) に記載されているものを用いた。

ミクログリア特異的 Cav1.2 発現抑制マウス (Cav1.2KD マウス) は Cav2.2 と同様のストラテジーで作製されたトランスジェニックマウスであり、ミクログリア特異的 RNAi により Cav1.2 の発現が抑制される。尚、Cav1.2 は L 型 VDCC の一種でミクログリアにおいて発現することが知られている。

、のいずれも遺伝子発現抑制はタモキシフェンの投与により誘導される (40mg/kg/day, 5日間)。

(3) 抗体染色

培養細胞は4%パラホルムアルデヒド (PFA) /PBS で10分間固定し、PBSにより洗浄した。

マウスは深麻酔下でPBSを灌流後4%PFA/PBSを灌流し、脳を摘出して一晩固定した。その後PBSで洗浄し、ピプラトームを用いて脳切片を作製した。

細胞、脳切片のいずれも1% blocking reagent (Roche), 0.1% Triton X-100 / PBS でブロッキングしたのち適宜希釈した一次抗体とインキュベートし、洗浄後蛍光標識二次抗体とインキュベートして、最終的に蛍光顕微鏡下で観察した。

(4) パーキンソン病モデル

パーキンソン病モデルは1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) を投与することにより作製した。(MPTPは中脳黒質のドーパミン神経を選択的に変性脱落させることができる。)14あるいは16mg/kgの用量で3時間ごとに4回腹腔内注射した。

(5) 行動学的試験

ロータロッドテストあるいはビームテスト、シリンダーテストを行った(Fleming et al. 2013)。ビームテストは幅3.5cm x 長さ25cmからスタートし1cmずつ幅が狭くなり最後は0.5cm x 25cmとなるような4枚のプラスチック製ビーム(全長25cm x 4=100cm)の上をマウスに歩かせることをまず学習させ、最終的には各ビームの上に金属メッシュ(1cm x 1cm)をのせその上をマウスに歩かせてステップのエラーをカウントするというテストである。この試験ではMPTPによるドーパミン神経変性の程度に応じてエラーが増えることが期待される。また、シリンダーテストはアクリル製透明シリンダー内にマウスを入れ3分間の自発的行動を観察するものである。ステップの数や立ち上がりの数がドーパミン神経変性の程度に応じて減少することが期待される。

4. 研究成果

(1) ミクログリア培養細胞株 MG6 の活性化に対する VDCC 阻害剤の影響

MG6細胞をLipopoly saccharide (LPS) + interferon gamma (IFN- γ)存在下で培養するとM1型活性化のマーカーであるiNosの発現が誘導される。また、interleukin 4 (IL-4)存在下で培養するとM2型活性化のマーカーであるArginase1 (Arg1)の発現が誘導される。これらは培養後の細胞に抗体染色を施すことにより容易に観察することができる。この系にN型VDCCの阻害剤である-conotoxin GVIA (GVIAと略)を添加して同様に培養したところ、iNosの発現はコントロールと比べ変化がなかったが、Arg1の発現は増加が認めら

れた。一方、L型VDCCの阻害剤であるニフェジピンやジルチアゼムはiNosの発現を増加させる傾向が認められたが、Arg1の発現には影響しないようであった。これらのことからL型VDCCの阻害はM1型活性化を促進し、N型VDCCの阻害は反対にM2型活性化を促進する可能性が示唆された。また、N型VDCCの機能としてミクログリア活性化に関連する遺伝子の発現調節に関与する可能性も示唆された。実際Hifファミリー転写因子の阻害剤を用いたところ、GVIAによるIL-4誘導性Arg1発現増大が見られなくなったことからN型VDCC阻害によるCa²⁺流入減少が転写因子に影響を与えArg1の発現増大につながると考えられる。この点の詳細なメカニズムについては今後の解析が必要である。

(2) ミクログリアにおける VDCC 発現抑制のパーキンソン病症状への影響

Cav1.2KDマウスあるいはCav2.2KDマウスにまずタモキシフェンを投与し、ミクログリアにおける各遺伝子の発現抑制を誘導した。その後MPTP投与前の行動学的試験を行い(シリンダーテスト、ビームテスト) MPTPを投与し、投与後6-7日目に再び行動学試験を行った。最終的にはMPTP投与7日後にマウス脳を固定してチロシンヒドロキシラーゼ (THと略、ドーパミン神経のマーカーとなる)に対する抗体で脳切片を染色し、黒質緻密部におけるドーパミン神経の数を調べた。

当初はMPTPによるドーパミン神経変性の程度を評価するための行動学的試験としてロータロッドテストを行ったが、この方法ではドーパミン神経変性による行動の変化を検出することは難しく、別の行動学的試験(ビームテストやシリンダーテスト)を採用することにした。Cav1.2KDマウスの場合、MPTP投与後のこれらの行動学的試験の成績はMPTP投与前に比べて悪化が見られ、その悪化の程度は野生型マウスよりも大きかった。さらに組織学的な解析では黒質緻密部のドーパミン神経細胞の数はCav1.2KDマウスの方が野生型マウスに比べて少ない傾向にあった。これらの結果はCav1.2KDマウスにおいてはMPTP投与によるドーパミン神経変性が野生型マウスよりも増悪することを意味する。

Cav2.2KDマウスでの解析は未だ進行中であるが、Cav1.2KDマウスの結果とは対照的な結果が得られている。すなわちCav2.2KDマウスにおいては野生型マウスと比べてMPTPによるドーパミン神経が軽減する傾向が見られる。

以上を総合すると、ミクログリアにおけるN型VDCC (Cav2.2)の機能阻害によりミクログリアは神経細胞保護的機能を持つM2型への移行が起こりやすくなり、その結果として

MPTP によるドーパミン神経変性が軽減すると考えられる。一方、ミクログリアにおける L 型 VDCC (Cav1.2) の阻害により神経細胞障害性の M1 型への移行が促進され、これによりドーパミン神経変性が増悪するものと考えられる。ミクログリアのような非興奮性細胞において電位依存性チャンネルが発現し、しかもチャンネルサブタイプに依存した拮抗的作用を担っていることは非常に興味深い。今後ミクログリアという非興奮精細胞においてこれらのチャンネルが活性化されるメカニズムを明らかにすることが重要であると考えられる。

<引用文献>

Saegusa H, Kurihara T, Zong S et al. (2000) Altered pain responses in mice lacking alpha 1E subunit of the voltage-dependent Ca²⁺ channel. Proc Natl Acad Sci USA. **97**:6132-7.

Saegusa H, Kurihara T, Zong S et al. (2001) Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca²⁺ channel. EMBO J. **20**:2349-56.

Saegusa H, Wakamori M, Matsuda Y et al. (2007) Properties of human Cav2.1 channel with a spinocerebellar ataxia type 6 mutation expressed in Purkinje cells. Mol Cell Neurosci. **34**:261-70.

Sakurai E, Kurihara T, Kouchi K et al. (2009) Upregulation of casein kinase 1epsilon in dorsal root ganglia and spinal cord after mouse spinal nerve injury contributes to neuropathic pain. Mol.Pain. **5**:74. doi:10.1186/1744-8069-5-74.

Saegusa H and Tanabe T. (2014) N-type voltage-dependent Ca²⁺ channel in non-excitabile microglial cells in mice is involved in the pathophysiology of neuropathic pain. Biochem Biophys Res Commun. **450**:142-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.103.

Fleming SM, Ekhaton OR, Ghisays V. (2013) Assessment of sensorimotor function in mouse models of Parkinson's disease. J Vis Exp. **17**;(76). doi: 10.3791/50303.

Takenouchi T, Ogihara K, Sato M et al. (2005) Inhibitory effects of U73122 and U73343 on Ca²⁺ influx and pore formation induced by the activation of P2X7 nucleotide receptors in mouse microglial cell line. Biochim Biophys Acta. **1726**:177-86.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Kondo, D., Saegusa, H., and Tanabe, T. Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/mammalian target of rapamycin/peroxisome proliferator-activated receptor pathway for induction and maintenance of neuropathic pain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **499**:253-259. (2018) doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.139 査読有り

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
<http://www.tmd.ac.jp/med/mphm/Yakuri.HTM>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三枝 弘尚 (SAEGUSA, Hironao)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教
研究者番号：90261205

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
ハンツラ スーンタラポーン (HUNTULA,
Soontaraporn)
王 馨爽 (WANG, Xinshuang)