

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19500303

研究課題名（和文） ミクログリア由来フラクタルカインの  
機能解析と損傷ニューロンに対する治療効果の基礎的研究研究課題名（英文） Functional analysis of Microglia derived fractalkine and curative  
effect to injured neuron

研究代表者 前田 光代 (MAEDA MITSUYO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号 40122080

研究成果の概要：

傷害時ミクログリアに発現誘導される CX3CR1 の機能を検索するため、CX3CR1(-/-)マウスを用い、実験的神経因性疼痛モデルを作製し免疫組織学的に検索した。ミクログリアはワイルド (WT)と同様に脊髄後角第2層に浸潤した。WT群では有髄線維のミエリン接着貪食像が観察されたが、KO ではその割合は減少した。CX3CR1 はミクログリアの浸潤には関与せず、浸潤後の有髄軸索ミエリンの接着取り込みの調整への関与が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：分科---神経科学/細目---神経解剖学・神経病理学

キーワード：ミクログリア、フラクタルカイン、神経損傷

## 1. 研究開始当初の背景

脳梗塞、脳外傷、炎症など様々な脳損傷ではニューロンの変性傷害と同時に、変性ニューロン周辺に多数のミクログリアの集積が確認されている。また、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの神経変性疾患の場合でも、ミクログリアが活性化し、様々の遺伝子変異のある脆弱な運動ニューロンに傷害を及ぼすものと考えられている。実際、活性化されたミクログリア

は IL1-beta, TNFalpha などの炎症性サイトカイン、glutamate, nitric oxide, free radicalなどを産生する事から、ニューロンへの傷害作用や脳内の変性細胞の貪食細胞としての役割が重要視されてきた。しかしながら活性化ミクログリアは、これら障害性物質と同時に IL6, IL10 など神経保護効果を有するサイトカインを分泌するという2面性を有し、ニューロン保護効果の側面も併せ持つ。我々は、こ

れら活性化ミクログリアと傷害運動神経細胞とのインターアクションを形態学的に検索する目的で、運動神経再生モデルとして、マウス舌下神経切除モデルを使用してきた。軸索傷害後再生の盛んなラットと異なり、マウスでは数ヶ月を経てゆっくりと運動神経細胞が死滅していく現象が確認されており、このモデルは人の変性神経疾患のよいモデルとなりえる。軸索傷害を受けた運動神経細胞のうち、傷害一週間前後で、活性化ミクログリアの密な接着により、表面細胞膜を覆われた神経細胞は形態が回復し長期生存できる。一方、これらミクログリアに覆われない運動神経細胞は徐々に萎縮変性が進行し、やがて、死にいたり、この時点で多数のミクログリアに覆われ貪食される。これらの変化は、ミクログリアによる神経細胞カバーリングの保護効果を示唆する。しかしながら、神経因性疼痛ラットの脊髄後角第2層に浸潤増殖してくる活性化ミクログリアは細胞体よりむしろ、有髄あるいは無髄神経軸索周囲を取り囲む。かように活性化ミクログリアの傷害神経細胞への接着を含む反応動態は病変により、また時期により、大きく異なっている。そして、こうした現象には、おそらくある種のケモカインや、細胞接着因子などの関与が考えられる。なかでも、最近各種の炎症性疾患での関与が明らかとなってきたフラクタルカイン CX3CL1 は細胞接着とケモカインの2つの活性を併せ持ち、CNS では神経細胞に発現することが知られる細胞膜結合型ケモカインで、一方、その受容体である CX3CR1 はミクログリアで発現する。in vitro では CX3CL1 は神経細胞の生存を促進し、ミクログリアのアポトーシスを抑制する。

また CX3CR1 欠損マウスでは、ミクログリアの反応調節ができず、その結果として、neurotoxic に働く。一方、CX3CR1 欠損マウスにパーキンソン病や ALS を作製すると、より神経細胞の脱落消失が認められることが近年報告され、CX3CR1 の神経細胞保護効果が示唆されている。そこで今回は CX3CR1 ノックアウトマウスを用い、神経因性疼痛モデル脊髄レベルでのミクログリアの動態について電子顕微鏡的検索を中心に形態学的に検索した。

## 2. 研究の目的

舌下神経切除モデルのような運動神経損傷モデルではその神経核において、傷害軸索の神経細胞体表面に直接ミクログリアの接着が生じ神経細胞の維持消失に関与している。一方、脊髄神経末梢枝損傷モデルの脊髄のような損傷軸索の神経細胞体がみられない部位では活性化ミクログリアはいったいどのような動態を示すのかという疑問について検索する目的で、特にフラクタルカインレセプターである CX3CR1 のノックアウトマウス (CX3CR1<sup>-/-</sup>) を用いワイルドタイプのマウス (WT) での動態と比較検討することを目的とし、L5 脊髄後根神経節 (DRG) の末梢枝結紮切断による神経因性疼痛モデルを作製し免疫組織学的に検索した。

## 3. 研究の方法

(1) 神経因性疼痛モデルマウス (Allodynia モデルマウス) 作成

8 週令の C57black/6J 雄マウス (WT), CX3CR1<sup>-/-</sup>マウス (KO) を用い、抱水クロラル (35mg/kg) 腹腔内麻酔下に左側 L5 脊髄神経を腹腔神経節 (DRG) の末梢側で切断し、疼痛モデル (allodynia モデル) を作成

した。Allodynia の評価は von Frey filaments (0.02-2.0g)を後肢足底表面に適用した。

## (2) 傷害神経のラベリング

数匹の神経切断マウスは L5 神経の切断時にその断端に10%のbiotin-dextran(BD), あるいは biotin-Texas Red (BTR) 20 $\mu$ lを適用し順行性にラベルを行った。

## (3) 顕微鏡での免疫蛍光組織化学

神経切断後 7 あるいは 14 日目に BTR injection あるいは injection なしのマウスは 4%paraformaldehyde(PFA), 2.1%picric acid 混液にて灌流後、脊髄を摘出し、同液にて 5 時間後固定した。L5 レベルの脊髄を microslicer にて 50 $\mu$ m の厚さの連続切片を作成し、Iba1 抗体(X500)24 時間反応後、二次抗体として Alexa 488(X200)を室温 5 時間反応し免疫蛍光染色標本を作製し、手術側、非手術側の蛍光陽性ミクログリア数を計測した。

## (4) 電子顕微鏡レベルでの免疫組織化学

0.1% glutaraldehyd, 4%PFA 混液にて灌流固定後 L5 脊髄を浮遊切片(50 $\mu$ m)にて Iba1 抗体を用い ABC 法にて免疫染色し、オスミウムにて後固定し、エポン樹脂包埋し超薄切片を作製し、電子顕微鏡にて観察した。また一部は BTR injection 後さらに Iba1 抗体を用い免疫染色実施し、電子顕微鏡標本作製とし、電顕下に脊髄第 1、2、5、10 層、後索、側索の 6 箇所における iba1 陽性ミクログリア数を測定し、かつミクログリア突起の有髄神経ミエリン鞘への接着頻度について計測した。

## 4. 研究成果

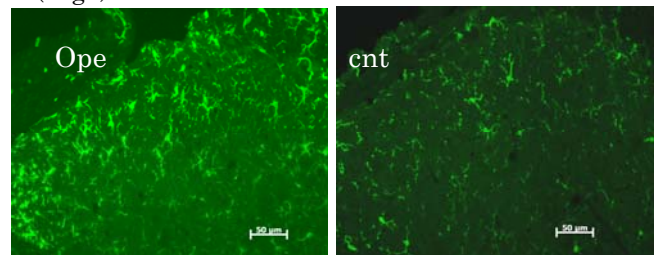
(1)WT 群の末梢神経損傷後脊髄への活性化ミクログリアの浸潤について

最初に WT 群脊髄でのミクログリアの浸潤

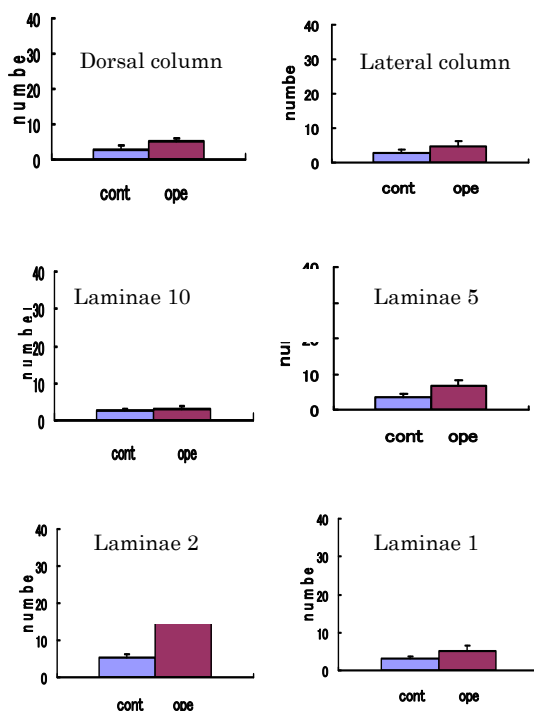
動態について形態、morphometry にて検索した。

L5 脊髄神経を腹腔神経節(DRG)の末梢側で切断した L5 脊髄では術後、7 日、14 日には後角第 2-3 層を中心とする高度瀰漫性の活性化ミクログリアの浸潤が認められた (Fig 1 A, B)。部位別にみるとミクログリア数は 600 $\mu$ m<sup>2</sup>面積あたり、術後 7 日では 1 層、2-3 層、5 層、10 層、後索、側索の非手術側ではそれぞれ、2 $\pm$ 0.8, 5 $\pm$ 0.7, 2 $\pm$ 0.8, 2 $\pm$ 0.7, 3 $\pm$ 0.9, 3 $\pm$ 0.8, 手術側では 4 $\pm$ 1.5, 19 $\pm$ 3.6, 8 $\pm$ 2.0, 4 $\pm$ 0.9, 3 $\pm$ 1.6, 4 $\pm$ 0.7 (Fig. 2) で、術後 14 日では同様に非手術側ではそれぞれ 3 $\pm$ 0.8, 5 $\pm$ 1.1, 4 $\pm$ 1.0, 3 $\pm$ 0.4, 3 $\pm$ 1.0, 3 $\pm$ 0.8 で、手術側では 5 $\pm$ 1.2, 16 $\pm$ 2.6, 7 $\pm$ 1.5, 3 $\pm$ 0.8, 3 $\pm$ 1.0, 3 $\pm$ 0.8 となり、術後 7、14 日共に第 2 層が最も多く全体的な数は 7 日目が最も多く、14 日でごく軽度減少傾向が認められた。

(Fig1)



(Fig.2)



(2)WT 群での活性化ミクログリアの有髄神経ミエリンへの影響

脊髄後角第2層に浸潤してくるWT群での活性化ミクログリアの動態について術後7日の時点で、iba1抗体を用い免疫電子顕微鏡標本を作製し検索した。WTの非手術側(cnt)ではIba1免疫陽性ミクログリアは広くニューロピルに浸潤が認められた(Fig. 3A)が、手術側(ope)ではミクログリアの細胞質あるいは突起の37%は有髄神経のミエリン鞘に接着し、取り囲む様相が観察された。接着状態が進行すると、接着部位でのミエリンは外側より変性消失が、さらにミエリンを完全に取り囲む食食様の様相を呈するものが増加した(Fig. 3B)。この時点では取り込まれた有髄神経のミエリン鞘は変性消失が目立ったが、内側の軸索は比較的形態が保持されていた。BTR投与にて順行性にラベルを行った標本では傷害された有髄、無髄が黒色にラベルされるため、非傷害軸索との鑑別が可能である。この方法にて観察すると術後の活性化ミクログリアは傷害軸索、非傷害軸索の何れの軸索にも接着しており、さらに細胞質内に髄線維の取り込みを行っていた。接着の割合を調べる目的で、1、2、5、層、後索、側索でiba1陽性ミクログリアの有髄ミエリンに接着しているものとしていないものをカウントしグラフ化した。2層でミエリンに接着しているミクログリア数が最も多かった(Fig.4)。

Fig.3 (矢印がiba1陽性ミクログリア)

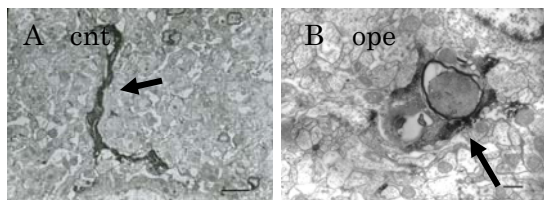
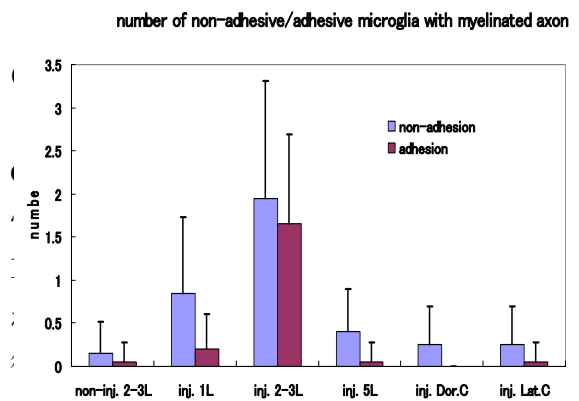
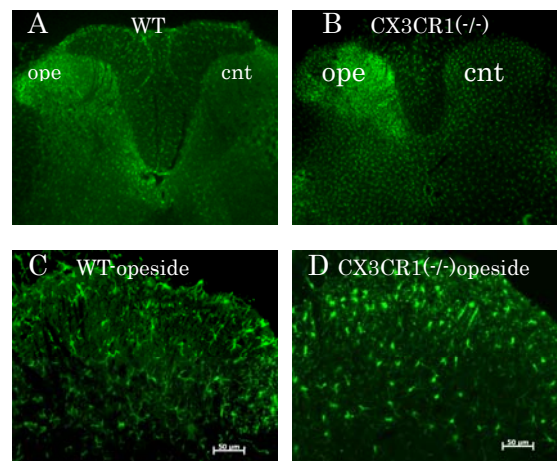


Fig.4

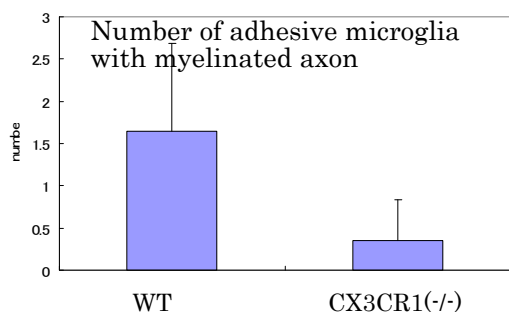


加齢の進行に伴って減少した。1日1回10mg/kgの突起はニューロピルに広く分散しているが、WT群と異なり、有髄ミエリンに接着あるいは取り囲むミクログリアの数は約20%に減少した(Fig.6)。

(Fig.5)



(Fig. 6)



これらの結果から、CX3CR1 は病巣部へのミクログリアの遊走浸潤に対する影響は少なく、むしろ浸潤後の有髄軸索ミエリンの接着取り込みを活性化し、痛み発症の調整に関与している可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- (1) Kawano, H., Komaba, S., Yamasaki, T., Maeda M., Kimura, Y., Maeda, A., Kaneda, Y.: New potential therapy for orthotopic bladder carcinomaby combining HVJ envelope with doxorubicin. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 61(6): 973-978, 2008
- (2) Takahara, Y, Suzuki A, Maeda M., Kawashima H, Nakatani T, Kiyama H Expression of pancreatitis-associated proteins in urothelium and urinary afferent neurons following cyclophosphamide-induced cystitis. *J Urolo* 179(4):1603-1609, 2008
- (3) Yasuda Y, Sasaki T, Takagawa M, Maeda M., Yasuda M, Atsumi T, Fujita Y, Fujita H: Erythropoietin contributes to implantation: Ectopic hemoglobin synthesis in decidual cells of mice. *Congenital Anomalies* 47: 22-33, 2007
- (4) Takahara Y, Maeda M., Nakatani T, Kiyama H: Transient suppression of the vesicular acetylcholine transporter in urinary bladder pathways following spinal cord injury. *Brain res* 1137: 20-28, 2007
- (5) Yagi H, Tokano H, Maeda M., Takabayashi T, Nagano T, Kiyama H, Fujieda S, Kitamura K,

Sato M: *Vlgr1* is required for proper stereocilia maturation of cochlear hair cells.

*Genes Cells* 12: 235-250, 2007

[学会発表] (計 1 件)

(1) Maeda M; Interaction between axotomized hypoglossal motor neuron and activated microglia in axotomy-induced neuronal death of the adult

mouse 第 112 回解剖学会総会全国学術集会 2007 年 3 月 21 日京都

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田光代 (MAEDA MITSUYO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番 : 40122080

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし