

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590249  
 研究課題名（和文） ミクログリアに発現する新規 $\alpha 7$ ニコチン受容体の機能解析と神経変性  
 防御に果たす役割  
 研究課題名（英文） Function and roles of  $\alpha 7$  nicotinic receptors in microglia

研究代表者  
 秀 和泉（HIDE IZUMI）  
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助手  
 研究者番号：20253073

## 研究成果の概要：

$\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体（ $\alpha 7$  ニコチン受容体）は神経細胞では典型的なイオンチャンネルとして働くが、ミクログリアにおいてはイオンチャンネル活性を示さず、ホスホリパーゼ C(PLC)活性化とイノシトール 3 リン酸 (IP<sub>3</sub>) 感受性細胞内ストアからのカルシウム遊離など代謝型受容体に似たシグナルを引き起こした。ミクログリアの $\alpha 7$  ニコチン受容体の cDNA 配列を決定した結果、すでに報告されている神経型 $\alpha 7$  ニコチン受容体と同一であることが示された。一方、ミクログリアの $\alpha 7$  ニコチン受容体を介したカルシウム反応はチロシンリン酸化により促進的に調節されることが明らかとなった。さらに、この $\alpha 7$  ニコチン受容体の PLC/IP<sub>3</sub> シグナルはミクログリアの過剰な活性化による神経傷害作用の抑制および神経保護作用の発現促進において重要な役割を果たす可能性が示された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：中枢・末梢神経

## 1. 研究開始当初の背景

ミクログリアは脳のマクロファージと呼ばれ、通常は長い突起を伸ばし脳内環境を監視するが、ひとたび感染、傷害などの異変を感知すると速やかに活性化されて局所に移動し、アメボイド型に形態をかえ異物や死細胞を貪食する。さらに、神経保護因子を産生し

神経組織の修復を行う一方、過剰な活性化を受けると神経傷害因子を放出し、神経細胞死を引き起こすと考えられている。一方、 $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体（ $\alpha 7$  ニコチン受容体）はこれまで神経細胞に特異的に発現し、カルシウムに透過性の高いイオンチャンネルとして速やかな神経伝達を担うと考

えられていた。しかし、近年、さまざまな非神経細胞に発現することが報告され、その多彩な生理的役割が注目されている。研究代表者は、ラット脳ミクログリアにも $\alpha 7$ ニコチン受容体が発現すること、さらにニコチン刺激を受け細胞内カルシウム濃度を上昇させることを見出した(Suzuki *et al.* 2006)。しかし、ニコチン誘発カルシウム反応は、細胞外カルシウム非存在下でも消失しなかったことから、イオンチャネルを介したカルシウム流入によるものではない可能性が示された。また、ニコチン誘発カルシウム反応はホスホリパーゼ C (PLC) 阻害薬 U73122 処置、あるいはイノシトール 3 リン酸 ( $IP_3$ ) 受容体遮断薬である xestospongine C によって抑制された。さらに、ホールセルパッチを施したミクログリアにおいてもニコチン誘発電流は検出されなかった。これらの結果から、ミクログリアに発現する $\alpha 7$ ニコチン受容体はイオンチャネルとして機能せず、PLC 活性化など一連の代謝型シグナルに似た反応を引き起こす可能性が示された。

一方、ミクログリアは過剰な活性化を受けると神経傷害的に働く一方、穏やかな活性化ではむしろ神経保護的な役割を果たすことが示唆されている。研究代表者もこれまでに、ATP による  $P2X_7$  受容体刺激では少量の腫瘍壊死因子 (TNF) を放出し、この TNF にはグルタミン酸刺激から神経細胞を保護する役割があることを報告してきた (Suzuki *et al.* 2004)。一方、リポポリサッカライド (LPS) による Toll-like receptor4 (TLR4) の刺激では大量の TNF が放出され、この TNF は神経傷害的に働く。そして、ニコチン刺激によりミクログリアからの傷害的な LPS 誘発 TNF 遊離は減少し、神経保護的な ATP 誘発 TNF 遊離は増大することが明らかとなった (Suzuki *et al.*, 2006)。従って、ミクログリアに発現する $\alpha 7$ ニコチン受容体は、ミクログリアの傷害的性質を抑制し保護的機能を高めることから、ミクログリアの神経保護作用を効率よく発揮させるための重要な役割を果たす可能性が示された。しかし、ミクログリアにおける $\alpha 7$ ニコチン受容体のシグナル伝達機構と細胞活性制御の機序についてはほとんど明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

神経細胞ではイオンチャネルとして働く $\alpha 7$ ニコチン受容体が、ミクログリアではなぜイオンチャネルとして機能せず、代謝型シグナルに似た情報伝達を引き起こすのだろうか？本研究では、まず、ミクログリアに発

現する $\alpha 7$ ニコチン受容体が神経型受容体とは異なる構造 (バリエント) をもつ可能性を検討する目的で、RT-PCR 法により全長の cDNA 配列を決定し、神経細胞に発現する $\alpha 7$ ニコチン受容体との比較を行った。次に、ニコチンによる $\alpha 7$ ニコチン受容体刺激が、どのような機序で PLC 活性化を引き起こすのかを知る目的で、Gi 蛋白質あるいはチロシンリン酸化の関与を検討した。さらに、この PLC 活性化とそれに引き続く  $IP_3$ /カルシウム経路が TNF 遊離の制御に関与する可能性を明らかにする目的で、ニコチンによる LPS 誘発 TNF 遊離抑制および ATP 誘発 TNF 遊離促進に対する  $IP_3$  受容体遮断薬 xestospongine C の効果を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) ミクログリアに発現する $\alpha 7$ ニコチン受容体の cDNA 配列の解析

ミクログリアおよび対照として神経型 $\alpha 7$ ニコチン受容体を安定発現させた HEK293 細胞、海馬組織を用いた。 $\alpha 7$ ニコチン受容体のバリエント検索のために、エクソン 1-10 のうちエクソン 1-3 間、3-8 間、8-10 間のプライマーを作製した。細胞から全 RNA を抽出し上記のプライマーを用いて RT-PCR を行い、PCR 産物の cDNA 配列を決定した。ミクログリアから得られた配列を、神経型 $\alpha 7$ ニコチン受容体の配列と比較した。

### (2) 細胞内カルシウム濃度の測定

ミクログリアに  $2.5 \mu M$  Fura-2-AM (0.02 % Pluronic F-127) を 20 分間ロードし、(-)ニコチンで刺激した。得られた蛍光画像を画像解析装置 Argus-50 で解析することにより細胞内カルシウム濃度を測定した。Gi 蛋白質阻害薬である百日咳毒素 (PTX) およびチロシンキナーゼ阻害薬 (ゲニステイン、PP2)、チロシンホスファターゼ阻害薬 (過酸化バナジン酸) の効果を検討した。

### (3) TNF の定量

ミクログリアを (-)ニコチンで 10 分間処置したのち LPS あるいは ATP で刺激し、3 時間後にメディアムに放出された TNF 量を ELISA により定量した。

## 4. 研究成果

### (1) ミクログリアに発現する $\alpha 7$ ニコチン受容体の cDNA 配列

ミクログリアに発現する $\alpha 7$ ニコチン受容体の cDNA 配列の全長を決定した結果、すでに報告されている神経細胞に発現する $\alpha 7$ ニコチン受容体と同一の構造を持つことが明らかとなった。ただし、ミクログリアには、神経細胞には存在しないエクソン 2 を欠失

したバリエーションが認められた。しかし、このバリエーションではフレームシフトが起きるため、 $\alpha 7$ ニコチン受容体のN末の19アミノ酸からなる短いペプチドで停止することがわかった。このペプチドにはアセチルコリン結合部位は含まれず、その機能は不明である。以上の結果から、ミクログリアの $\alpha 7$ ニコチン受容体は神経細胞に発現する $\alpha 7$ ニコチン受容体と同一の蛋白質であると推測され、ミクログリアにおけるシグナル特性の違いは、受容体の構造の違いによるものではなく、異なる細胞特異的シグナル伝達機構の存在による可能性が考えられた。

### (2) ミクログリアにおけるニコチン誘発カルシウム反応の解析

ミクログリアにおいて、ニコチンによるカルシウム反応はGi蛋白質阻害薬PTXによっても抑制されなかった。したがって少なくとも、Gi蛋白質を介したPLC活性化は関与しないと考えられた。一方、チロシンキナーゼ阻害薬ゲニステインおよびSrc-familyチロシンキナーゼ特異的阻害薬PP2処置によりニコチン誘発カルシウム反応は有意に抑制された。この結果から、ミクログリアに発現する $\alpha 7$ ニコチン受容体はチロシンキナーゼ、特にSrc-familyチロシンキナーゼの活性化を介して、カルシウム反応を引き起こす可能性が示された。これまでに、 $\alpha 7$ ニコチン受容体イオンチャネル活性はチロシンリン酸化により抑制的に制御されることが報告されており、ミクログリアの $\alpha 7$ ニコチン受容体はこれとは逆の促進的調節を受ける可能性が示された。また、チロシンキナーゼはPLC- $\gamma$ のチロシンリン酸化を介して活性化を引き起こすことも報告されており、ミクログリアのPLC活性化の機序にチロシンリン酸化が関わる可能性が考えられる。さらに、チロシンホスファターゼ阻害薬である過酸化バナジン酸の処置により、ニコチンによるカルシウム反応は著しく大きくかつ持続的なものになった。この結果もまた、ニコチンによるカルシウム反応誘導におけるチロシンリン酸化の重要性を強く示唆するものである。

### (3) $\alpha 7$ ニコチン受容体を介したミクログリアのTNF遊離調節におけるPLC/IP<sub>3</sub>シグナルの関与

これまでに、ミクログリアにおいてニコチンはLPS刺激により放出されるTNF遊離(傷害性)を抑制し、ATP誘発LPS遊離(保護的)を促進することを報告してきた。このニコチンによるTNF放出の調節において、 $\alpha 7$ ニコチン受容体シグナルにおけるPLC/IP<sub>3</sub>経路が関与する可能性を検討する目的で、IP<sub>3</sub>受容体遮断薬xestospongine Cの効果を検討した。その結果、ニコチンによるTNF遊離の両方向

への調節、すなわちLPS誘発TNF遊離の抑制とATP誘発TNF遊離の促進は、いずれもxestospongine C処置により抑制された。従って、本研究により明らかになった $\alpha 7$ ニコチン受容体の代謝型シグナルがTNF遊離を制御し、この作用を介してミクログリアの神経保護作用発揮に重要な役割を果たす可能性が示された。

以上の知見は、これまでのイオンチャネル型受容体として知られる $\alpha 7$ ニコチン受容体のシグナル伝達の新しい仕組みを解明するものであり、さらにこのシグナルが神経炎症の抑制において重要な役割を担うことが示された。 $\alpha 7$ ニコチン受容体の情報伝達様式のさらなる理解は、ミクログリアの関わる神経炎症疾患の新しい治療薬開発への一助になるものと期待される。

### 参考文献

1. Suzuki T, Hide I, Matsubara A, Hama C, Harada, Miyano K, André M, Matsubayashi H, Sakai N, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y: Microglial  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors drives a phospholipase C/IP<sub>3</sub> pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *J. Neurosci. Res.* 83:1461-1470 (2006)
  2. Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y: Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor from P2X<sub>7</sub> receptor-activated microglia. *J. Neurosci.*, 24: 1-7 (2004)
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 2 件)

1. Yanagisawa D, Kitamura Y, Takata K, Hide I, Nakata Y, Taniguchi T: Possible involvement of P2X<sub>7</sub> receptor activation in microglial neuroprotection against focal cerebral ischemia in rats. *Biol. Pharm. Bull.* (査読有) 31: 1121-1130 (2008)
2. Fukuzawa M, Yamaguchi R, Hide I, Chen Z, Hirai Y, Sugimoto A, Yasuhara T, Nakata Y: Possible involvement of long chain fatty acids in the spores of *Ganoderma lucidum* (Reishi Houshi) to its anti-tumor activity. *Biol Pharm Bull.* (査読有) 31:1933-1937 (2008).

[学会発表] (計 4 件)

1. 秀和泉、原田佳奈、酒井規雄、仲田義啓: ミクログリアの $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体の機能解析—脳内炎症疾患の創薬に向けて—、生体機能と創薬シンポジウム2008、2008年9月5-6日、東京都

2. Izumi Hide, Kana Harada, Norio Sakai, Yoshihiro Nakata :  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor signaling and modulation of cytokine production in microglia. USA-JAPAN joint meeting for Glial research, March 17-20, 2008, Philadelphia, PA, USA.
3. 原田佳奈、秀 和泉、酒井規雄、仲田義啓 : ミクログリアからの一酸化窒素放出に及ぼす ATP の影響、生体機能と創薬シンポジウム、2007 年 9 月 13-14 日、金沢市
4. 前田詠理子、原田 佳奈、大澤圭子、高坂新一、秀 和泉、仲田義啓 : ミクログリアおよびマクロファージによるサイトカイン産生における Iba1 の役割、Neuro 2007 (日本神経化学会)、2007 年 9 月 10-12 日、横浜市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秀 和泉 (HIDE IZUMI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助手  
研究者番号 : 20253073

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者