

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20500359

研究課題名（和文） ストレスによるミクログリア活性化メカニズムの解明

研究課題名（英文） Investigation of stress-induced microglial activation

研究代表者

洲鎌 秀永 (SUGAMA SHUEI)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：70302461

研究成果の概要（和文）：

本研究ではストレスによるミクログリア活性化メカニズムの解明を検討した。ミクログリアセルライン（MG6）およびプライマリーミクログリア培養細胞を用いて、RT-PCR 法、ウェスタンブロット法によって検討する。セルライン、ウライマリーのいずれでも、アドレナリン受容体 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ の発現があった。しかし、 $\beta 3$ 受容体の発現は無かった。次に、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ アドレナリン受容体アゴニスト（イソプロテレンール）添加によって、その応答を検討した。アゴニスト単独、LPS 添加と組み合わせて投与したところ、炎症性サイトカイン（インターロイキン6）の発現に影響は見られなかった。次に、培養ミクログリア細胞に、副腎ステロイド（デキサメサゾン）添加実験を行った。結果、LPS 投与による炎症性サイトカイン発現は、著しく抑制された。更に、ノルアドレナリン受容体欠損マウス（ダブルノックアウト）および野生型マウスを用いて、急性拘束ストレスを負荷したところ、野生型マウスでは著明なミクログリア活性化を示した。一方、ダブルノックアウトマウスでは、ストレスによるミクログリア活性化は有意に抑制された。以上の結果より、ストレス時に起こるミクログリア活性化は、交感神経系由来のノルアドレナリンが、脳内ミクログリア $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 受容体を介して、活性化を引き起こしていることが示唆された。又、副腎皮質ホルモンは、ストレス時のミクログリア活性化を抑制するものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we investigated microglial activation mechanism. With using microglia cell-line (MG6) as well as primary microglial cells, we employed RT-PCR, Western Blotting. Both in cell line and primary microglia, the expression of adrenergic receptor (AR) beta1 and beta2, but not beta3, was detected. Then, we administered an agonist for AR, isoproterenol. The result showed that isoproterenol did not affect the induction of interleukin-6. In addition, we studied an effect of adrenal steroid on microglial activation. It was shown that the expression of proinflammatory cytokines, such as interleukin-1, interleukin-6, was significantly inhibited by the adrenal steroid, dexamethazone. Furthermore, we studied the involvement of AR in microglial activation in vivo. In double knockout mouse that specifically lacks AR beta1 and beta2, microglial activation was not induced by exposure of restraint stress. The result was in contrast to that of wild type mouse which demonstrated significant stress-induced microglial activation in the brain. Thus, it was suggested that, in acute stress, microglial activation may be modulated through sympathetic nervous system, AR beta 1 and beta2. It was also suggested that adrenal glucocorticoids may play inhibitory roles in microglial activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：グリア、神経免疫学

1. 研究開始当初の背景

退行性神経変性疾患は、高齢化社会をむかえた現代における難治性疾患の一つである。その中、ミクログリアは、神経変性疾患の病原性において、極めて重要な役割を果たしていることが報告されている。パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病などの退行性神経疾患、エイズ脳症などの疾患において、活性化したミクログリアが病変部に異常集積している所見が報告されている。その後、Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs)などの抗炎症剤によって、退行性変化が軽減することも報告された。申請者らは、コントロール不可の活性化型ミクログリアは、損傷した細胞のみならず、正常な神経細胞までも暴発的に攻撃することを報告した。ミクログリアは、なんらかのメカニズムで活性化し過剰活性化状態になり、細胞障害因子などを放出し、神経細胞の障害を促進するものと考えられる。このように、ミクログリアは、神経変性疾患の病原性において、促進的に働く側面を有するものと考えられる。申請者は、これまでの研究で、ストレス負荷によって生じる脳内ミクログリア活性化について報告している。しかし、そのメカニズムについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ストレスによって起こるミクログリア活性化のメカニズムを検討することである。

3. 研究の方法

ラット、マウスの固体および培養細胞(ミクログリア)を用いて、免疫組織化学法、ウェスタンブロッティング法、リアルタイムPCRを用いて、関連蛋白およびmRNAの発現レベル、および発現細胞の同定を行った。

1) イン・ビボ系実験として、Wistar Rat (8-12週、250-280g)に、拘束ストレス(2時間)、冷却ストレス(4℃、2時間)を負荷する。ストレス負荷後、4%パラフォルムアルデヒド(PFA)で灌流固定を行う。凍結切片を作成し、免疫組織化学(IHC)を行う。用いる抗体としては、OX-42(汎MGマーカー)、OX-6(MHCIIマーカー、活性化型MGマーカー)、ED1(食食型MGマーカー)。ストレス時、活性化神経細胞ではIEG(Immediate early gene)のc-Fos、c-Jun発現が起こる。特に、脳下垂体に強く発現することは確認されている。神経シグナルとしての交感神経伝達物質(NE)の検討について、アドレナリン受容体($\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$)のミクログリアで

の共発現を二重染色、共焦点顕微鏡にて観察する。

2) イン・ビボ系の実験として、ミクログリア培養細胞(継代細胞および初代培養細胞)を用いる。コントロール群には生食を投与。テスト群には、 β 受容体アゴニストのイソプロテレノールを添加する。RNAと蛋白を抽出して、インターロイキン 1β 、インターロイキン6、TNF α などの炎症性サイトカインの測定を行い、ミクログリア活性化を検討する。

4. 研究成果

1) 冷却ストレスによるミクログリア活性化について

ウイスター・ラットを4℃、2時間の冷却ストレスに不可後、ミクログリアマーカー(OX-42)、インターロイキン 1β にて免疫組織化学にて染色する。冷却ストレス後30分で、脳内ミクログリアは形態的活性化を示した。その活性化は2時間(冷却)続き、冷却終了後に静止型へと戻っていった。一方、インターロイキン 1β は、海馬、視床下部での発現が確認された。コンフォーカル顕微鏡による二重染色の結果、インターロイキン 1β はアストロサイトの表面に共存を示した。以上の結果より、冷却ストレスは脳内神経免疫機構を活性化し、ミクログリア、およびインターロイキン 1β は、なんらかの役割を果たすことが示唆された(Sugama et al., 2010, *Journal of Neuroimmunology*)。

2) 拘束ストレスによるアストロサイト、ミクログリアへの影響について

ウイスターラットを2時間の拘束ストレスに負荷する。2時間のストレス後、ミクログリアは急速に形態的な活性化を示した。それに対し、アストロサイトは形態的な活性化を示さなかった。インターロイキン 1β 陽性細胞が、海馬、視床下部、扁桃体、中脳水道灰白質(Peraqueductal gray, PAG)で著明な増加を示した。コンフォーカル顕微鏡による二重染色の結果、インターロイキン 1β はアストログリアに共存していた。以上の結果より、ミクログリア、アストロサイトは、急性ストレスに際し、形態的、免疫応答性において全く異なる性質を有することを明らかにした(Sugama et al., 2011, *Neuroscience*)。

3) 副腎ステロイドのミクログリア活性化への影響の検討

ストレス時に生じるミクログリア活性化に対し、副腎ステロイドの作用を検討した。副腎摘出ラットおよびシャムオペラット(コン

トロール)を拘束ストレス負荷後、ミクログリア活性化を比較検討した。コントロールラットは、拘束ストレスによって急速にミクログリア活性化を示した。それに対し、副腎摘出ラットでは、ストレスによりより強いミクログリア活性化を示した。次に、免疫反応の検討の為、MHC II 陽性細胞、炎症性サイトカインの検討を加えた。現在、その結果を繰り返し検討中である。更に、培養ミクログリアを用いて、副腎ステロイド(デキサメサゾン)の作用を検討した。培養ミクログリアにLPS投与し炎症性サイトカイン(インターロイキン1 β 、インターロイキン6)の増加を惹起する。それに対し、LPS+デキサメサゾン投与群では、その炎症性サイトカインの発現が著明に減少された。以上の結果より、副腎ステロイドは、ミクログリアの形態的および炎症的な見地からの活性化において抑制的な作用を有するものと示唆された。

4) ストレス時に起こるミクログリア活性化メカニズムの解析について
脳内ミクログリアにおけるアドレナリン受容体の発現を検討した。脳内ミクログリアでは、 β 1、 β 2受容体発現が確認された。 β 3受容体は確認されなかった。次に、セルライン(MG6)および初代培養ミクログリアで、RT-PCRにて検討する。いずれの細胞でも、 β 1、 β 2のmRNA発現が確認された。 β 3mRNAは確認されず。次に、 β 受容体アゴニストであるイソプロテレノールを、培養ミクログリア細胞に添加し、その作用を検討した。単独でイソプロテレノールを添加した場合、ミクログリアから炎症性サイトカイン(インターロイキン1 β 、インターロイキン6)の産生は誘発されなかった。次に、LPS投与によって炎症を惹起後、イソプロテレノール添加の作用を検討した。その結果、LPS投与によって増加した炎症性サイトカインの発現量は、不変、あるいは若干の抑制が確認された。次に、 β 1、 β 2のダブルノックアウトマウスを用いて、ストレスによるミクログリア活性化メカニズムを検討した。野生型マウスにおいては、ストレスによって顕著なミクログリア活性化が誘発された。しかし、 β 受容体ダブルノックアウトマウスでは、ストレスによるミクログリア活性化が有意に抑制された。以上の結果より、交感神経由来のノルアドレナリンが、脳内ミクログリア β 1、 β 2受容体を介して、活性化に関与していることを示した。

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 12 件)

1. Sekiyama K, Fujita M, Sekigawa A, Takamatsu Y, Waragai M, Takenouchi T, Sugama S, Hashimoto M. Ibuprofen ameliorates protein aggregation and astrocytic gliosis, but not cognitive dysfunction, in a transgenic mouse expressing dementia with Lewy bodies-linked P123H b-synuclein. *Neurosci Lett* 515(1):97-101,2012
Doi:10.1016/j.neulet.2012.03.037
2. Sekiyama K, Nakai M, Fujita M, Takenouchi T, Waragai M, Wei J, Sekigawa A, Takamatsu Y, Sugama S, Kitani H, Hashimoto M. Theaflavins stimulate autophagic degradation of a-synuclein in neuronal cells. *Open Journal of Neuroscience* 2-1, 2012
<http://www.rossscience.org/ojns/articles/2075-9088-2-1.pdf>
3. Takenouchi T, Iwamaru Y, Sugama S, Tsukimoto M, Fujita M, Sekigawa A, Sekiyama K, Sato M, Kojima S, Conti B, Hashimoto M, Kitani H. The activation of P2X7 receptor induces cathepsin D-dependent production of a 20-kDa form of IL-1 β under acidic extracellular pH in LPS-primed microglial cells. *J. Neurochem* 117: 712-723, 2011
doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07240.x
4. Sugama S, Takenouchi T, Sekiyama K, Kitani H, Hashimoto M. Immunological responses of astroglia in the rat brain under acute stress: interleukin-1 beta co-localized in astroglia. *Neuroscience* 192: 429-437, 2011
Doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.06.051
5. Sugama S, Takenouchi T, Fujita M, Kitani H, Hashimoto M. Cold stress induced morphological microglial activation and increased IL-1 β expression in astroglial cells in rat brain. *J. Neuroimmunol* 233: 29-36, 2011
Doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.11.002
6. Fujita M, Sugama S, Sekiyama K, Sekigawa A, Tsukui T, Nakai M, Waragai M, Takenouchi T, Takamatsu Y, Wei J, Rothenstein E, Laspada AR, Masliah E, Inoue S, Hashimoto M. A β -synuclein mutation linked to dementia produces neurodegeneration when expressed in mouse brain. *Nat Commun* 1:110, 2010
Doi: 10.1038/ncomms1101
7. Takenouchi T, Iwamaru Y, Sugama S, Sato M, Hashimoto M, Kitani H. Lysospholipids and ATP mutually

- suppress maturation and release of IL-1beta in mouse microglial cells using a Rho-dependent pathway.
J. Immunol 180(12):7827-39, 2008.
<http://www.jimmunol.org/content/180/12/7827>
8. Sugama S, Takenouchi T, Kitani H, Fujita M, Hashimoto M.
Microglial activation is inhibited by corticosterone in dopaminergic neurodegeneration.
J. Neuroimmunol 208 (1-2), 104-114, 2009
Doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.01.016
9. Wei J, Fujita M, Nakai M, Waragai M, Sekigawa A, Sugama S, Takenouchi T, Masliah E, Hashimoto M.
Protective role of endogenous gangliosides for lysosomal pathology in a cellular model of synucleinopathies
Am. J. Pathol 174(5):1891-909, 2009
doi: 10.2353/ajpath.2009.080680
10. Takenouchi T, Fujita M, Sugama S, Kitani H, Hashimoto M.
The role of the P2X7 receptor signaling pathway for the release of autolysosomes in microglial cells.
Autophagy 5 (5), 723 – 724, 2009
Doi:10.4161/auto.5.5.8478
11. Sugama S.
Stress-induced microglial activation may facilitate the progression of neurodegenerative disorders.
Medical Hypotheses 73: 1031-1034, 2009.
Doi: 10.1016/j.mehy.2009.02.047
12. Sugama S, Takenouchi T, Conti B, Hashimoto M.
Differential microglial activation between acute stress and lipopolysaccharide administration.
J. Neuroimmunol 207(1-2):24-31. 2009.
Doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.11.007

[学会発表] (計 3 件)

1. Sugama S.
Differential microglial activation between acute stress and lipopolysaccharide treatment.
第 8 6 回日本生理学会 (第 3 6 回国際生理学会)、2009.7.28
2. Sugama S.
Astroglial response may differ from that of microglial cells in response to acute stress.
第 8 7 回日本生理学会、盛岡、2010.05.19

3. Sugama S.
Cold stress induced morphological microglial activation and increased IL-1β expression in astroglial cells in rat brain.
第 8 8 回日本生理学会、横浜、2011.3.28

6. 研究組織

(1) 研究代表者

洲鎌 秀永

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：70302461

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：