

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28日現在

機関番号：32690

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500357

研究課題名（和文）ミクログリアの機能切換えスイッチに関する基礎的研究

研究課題名（英文）Study of the switching mechanism by which microglia change their function

研究代表者

中嶋 一行 (NAKAJIMA KAZUYUKI)

創価大学・生命情報工学科・教授

研究者番号：50175494

研究成果の概要（和文）：ミクログリアの持つ、増殖能、傷害因子の産生能、貪食能、抗原提示能は、従来、活性化の刺激を受けた後、細胞内シグナル系によって切換えられると推測されてきたが、ラットの顔面神経傷害系を使用した動物レベルおよび細胞レベルの実験から、それらの各機能/能力は、細胞内のシグナル伝達系で切り替えられるのではなく、細胞外から到来するそれぞれ特異的な刺激因子によって切り替えられることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The ability of microglia to proliferate, produce harmful factors, express phagocytic properties and present antigens has been considered to be switched on/off by intracellular signal transduction mechanism. However, the experiments using rat facial nerve transection model and in vitro model revealed that the abilities of microglia were suggested to be switched on/off by specific factors present in extracellular space, but not by intracellular signal transduction mechanism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,200,000	360,000	1,560,000
22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
23年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：神経科学、脳・神経、グリア細胞、免疫

1. 研究開始当初の背景

過去、ミクログリアは、脳損傷時や脳疾患時の役割について関心がもたれ、神経の傷害性／炎症性または神経の生存維持性／保護性の視点から多くの研究が進められてきた。しかしその一方で、細胞特性に関する基礎的な研究が取り残されてしまい、不明な点も多

く残されている。そのひとつに、機能発現およびその調節に関する問題がある。ミクログリアは、正常時は一定の密度で存在し、低活性状態にあるが、病態時／傷害時では、増殖性になり、貪食能を示したり、抗原提示能や傷害因子の産生能を発現するようになる。しかし、これらの能力は、別々に誘導されるの

か、または、同時あるいは連鎖的に発現されるのか、長い間不明の状態であった。

2. 研究の目的

成熟ラットの顔面神経を切断すると、神経核ではミクログリアの増殖が起こる。この増殖性ミクログリアは、食食活性や抗原提示機能を全く発現しない。しかし、その後、非食食性ながら抗原提示に必要な MHC class II を発現するようになる。また、顔面神経細胞が細胞死を起こした場合には食食性細胞に変化する。これらの食食性ミクログリアは IL-1 β や TNF α など傷害性サイトカインを発現しないが、LPS などの感染刺激を与えると産生を開始する。このように、ラットの顔面神経の傷害系を観察すると、ミクログリアの様々な能力は、これまで思われていたように一律に発現するようには見えない。そこで、本研究では、ミクログリアの諸機能（増殖能、抗原提示作用、食食能、傷害因子産生能）を誘導するシグナルメカニズムを解析し、各機能は、独立に誘導されるのか、同時／連鎖的に誘導されるのかを明らかにすることを目的とした

3. 研究の方法

ラットの顔面神経系を使用し、運動神経を切断傷害した場合、あるいは切断部分にシクロヘキシミドを投与し運動ニューロンに細胞死を誘導した場合について、ミクログリアの反応性を調べた。すなわち、ミクログリアの活性化、増殖性、食食性、MHC class II の発現性および傷害性因子の産生性について、関連する分子を経時的にウエスタンブロット法および免疫組織化学的方法により解析した。活性化の指標としては Iba1 を、増殖関連分子としては増殖因子である M-CSF とその受容体である cFms を、S 期のマーカーとしては PCNA およびサイクリンを、傷害性サイトカインとしては TNF α および IL-1 β を、食食の指標としては CD68 を選択した。

上記インビボの実験で得られた結果を確認するために、また、各機能/能力の誘導メカニズムを調べるために、ラット新生仔脳の初代培養系から調製した培養ミクログリアを使用し、様々な刺激の応答性を解析した。すなわち、培養ミクログリアに M-CSF を添加し、cFms、PCNA およびサイクリンなどの誘導を検討したり、LPS を添加し、傷害性因子の誘導を調べたり、種々のサイトカインの添加により食食性や MHC class II の発現性を検討した。

4. 研究成果

ラットの傷害顔面神経核中で見られるミクログリアの増殖は、最初に、増殖因子である M-CSF がミクログリアで増産され、オート

クリーンに cFms 受容体が活性化された後、そのシグナルが MAPKs 系に伝えられ、サイクリン/PCNA および cFms の誘導を引き起こすことで進行することが明らかになった。この結果は、従来の推測とは異なるものであり、国際的にも反響のある知見となった (Yamamoto et al., 2010; 2012)。

ミクログリアは、たとえ活性化されたとしても炎症性サイトカインの産生は行わないが、感染の刺激 (LPS 刺激など) が入った場合は、TNF α の誘導を行うようになる。その誘導に関わるシグナル分子として PKC α および MAPKs が同定されたが、MAPKs の活性化には、スーパーオキシドアニオンが関わるということが明らかになった。一方、スーパーオキシドアニオンと同時に産生される一酸化窒素 (NO) には、その作用はなかった。また、実際、ミクログリアにスーパーオキシドアニオン産生試薬を添加すると、TNF α が誘導されることも確認された。この結果も従来推測されていたメカニズムと異なっており、ミクログリアの傷害性に関して新規な知見を与えた点で評価される (Yoshino et al., 2010)。

ミクログリアの食食細胞への変化は、神経細胞死に際して起こることが、動物実験から示された。ラットの顔面神経切断部位にシクロヘキシミドを投与すると、運動ニューロンは細胞死を起こし、それを認識したミクログリアが食食細胞に変化したと考えられた。ミクログリアを食食細胞に変える運動ニューロンの刺激は未同定であるが、ミクログリアが食食性を発現するためには PKC α の働きが重要であることが示された。これらも従来知られていなかった結果であり、新規性も高いので、論文にまとめ、投稿する予定である。

顔面神経傷害系でミクログリアが MHC class II を発現するのは、増殖後の時期であり、必ずしも食食性とは一致するものではなかった。インビトロの実験から、TNF α などの炎症性サイトカインの刺激によって、MHC class II が誘導されることが示された。従って、インビボにおいても、MHC class II の誘導は、なんらかの生理活性因子が刺激となって引き起こされるものと推測された。この誘導に関わるシグナル分子の探索は、今後も継続して行う予定である。

以上のように、ミクログリアの各機能/能力は、細胞内で切り替えられるのではなく、細胞外から入る異なる刺激によって別々に誘導されるものと考えられた。たとえば、M-CSF の刺激が入れば増殖性になり、細胞死の刺激が入ると食食性になり、感染刺激が加われば、炎症性サイトカインの産生を行うように変化する。また、もし、複数の刺激が同時に入った場合は、複数の応答性が観察されることになる。

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7件)

① Yamamoto S, Kohsaka S, Nakajima K. Role of cell cycle-associated proteins in microglial proliferation in the axotomized rat facial nucleus. *Glia*. 査読有, 60 (2012) 570-581. DOI: 10.1002/glia.22291

② Yoshino Y, Yamamoto S, Kohsaka S, Oshiro S, Nakajima K. Superoxide anion contribute to the induction of tumor necrosis factor alpha (TNF α) through activation of the MKK3/6-p38 MAPK cascade in rat microglia. *Brain Res*. 査読有, 1422 (2011) 1-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2011.09.009>,

③ Yamamoto S, Nakajima K, Kohsaka S. Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) as an inducer of microglial proliferation in axotomized rat facial nucleus. *J Neurochem*. 査読有, 115 (2010) 1057-1067. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2010.06996.x

④ Sotome S, Nakajima K, Yoshimura Y, Shimizu A. Effects of Temperature and Pressure on Astrocyte Preservation. *J. Phys.; Conf. Ser.* 査読有, 215 (2010), 012166 (p1-5)

⑤ Nakajima K, Yamamoto S, Tohyama Y, Kohsaka S. Close association of p38 and JNK with plasminogen-dependent upregulation of PAI-1 in rat astrocytes in vitro. *Neurosci Lett*. 査読有, 471 (2010) 66-69. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20074614

⑥ Maeda S, Nakajima K, Tohyama Y, Kohsaka S. Characteristic response of astrocytes

to plasminogen/plasmin to upregulate transforming growth factor beta 3 (TGF β 3) production/secretion through proteinase-activated receptor-1 (PAR-1) and the downstream phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt/PKB signaling cascade. *Brain Res*. 査読有, 1305 (2009):1-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.025>,

⑦ Sotome S, Nakajima K, Yoshimura Y, Shimizu A. Temperature and pressure effect on astrocyte preservation. *Cryobiology and Cryotechnology*. 査読有, 55 (2009) 1-7.

[学会発表] (計28件)

① Nakajima K, Noda M, Tohyama Y, Kohsaka S. Microglia as a glutamate scavenger in the axotomized rat facial nucleus. 41st Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, 15 Nov, 2011.

② Yamamoto S, Kohsaka S, Nakajima K. Analysis of microglial proliferation in the transected rat facial nucleus. 41st Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, 15 Nov, 2011.

③ 中嶋一行、野田真里子、高坂新一. 傷害顔面神経核におけるミクログリアのグルタミン酸除去能. 第54回日本神経化学学会大会、石川、9. 27、2011.

④ 山本伸一、高坂新一、中嶋一行. 軸索切断側顔面神経核におけるミクログリアの増殖メカニズム. 第54回日本神経化学学会大会、石川、9. 27、2011.

⑤ 増田寿明、中嶋一行. アストロサイトは、ミクログリアが誘導するTNF α 量を促進する. 第54回日本神経化学学会大会、石川、9. 27、2011.

⑥ 竹澤洋亮、中嶋一行、高坂新一. 中枢神経系における乳酸供給細胞としてのミクログリア. 第54回日本神経化学学会大会、石川、9. 27、2011.

⑦ 本田芳成、山本伸一、高坂新一、中嶋一行. 神経傷害とミクログリアの応答性：神経栄養因子作用の解析. 第54回日本神経化学学会大会、石川、9. 27、2011.

⑧ 竹澤 洋亮、高坂 新一、中嶋 一行. 中枢神経系における糖代謝へのミクログリアの関与. 第34回日本神経科学学会大会、横浜、9. 16、2011.

⑨ 増田 寿明、高坂 新一、中嶋 一行. ミクログリアにおけるTNF α 産生はアストロサイトとの細胞間相互作用によって促進される. 第34回日本神経科学学会大会、横浜、9. 17、2011.

⑩ 齋藤 丈博、須藤 賢司、宮森 弘明、中嶋 一行. ミクログリアにおける炎症性サイトカイン及び抗炎症性サイトカインの誘導について. 第34回日本神経科学学会大会、横浜、9. 17、2011.

⑪ 本田 芳成、一宮 俊文、高坂 新一、中嶋 一行. 神経傷害とミクログリアの応答性：神経栄養因子作用の解析. 第34回日本神経科学学会大会、横浜、9. 17、2011.

⑫ 山本 伸一、高坂 新一、中嶋 一行. ラットの顔面神経核におけるセルサイクル関連タンパク質によるミクログリアの増殖調節. 第34回日本神経科学学会大会、横浜、9. 17、2011.

⑬ Nakajima K, Yoshino Y, Tohyama Y, Kohsaka S. Involvement of superoxide anion in the induction of TNF α in microglia.

40th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, 15 Nov, 2010

⑭ Ishibashi N, Sotome S, Nakajima K, Yoshimura Y, Shimizu A. The study of new cell transportation method. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii, Dec, 2010.

⑮ 一宮俊文、高坂新一、中嶋一行. ラットの顔面神経切断時におけるコリン作動性ニューロンの影響. 第53回日本神経化学学会、第33回日本神経科学学会、第20回日本神経回路学会合同大会、神戸、9. 3、2010.

⑯ 竹澤洋亮、高坂新一、中嶋一行. 脳内の糖代謝に関するグリア細胞の関与. 第53回日本神経化学学会、第33回日本神経科学学会、第20回日本神経回路学会合同大会、神戸、9. 3、2010.

⑰ 中嶋一行、吉野幸久、遠山陽子、高坂新一. ミクログリアのTNF α 産生に関わるスーパーオキシドアニオン. 第53回日本神経化学学会、第33回日本神経科学学会、第20回日本神経回路学会合同大会、神戸、9. 3、2010.

⑱ 國分丈治、中嶋一行、溝川拓一、澤紀子、金松知幸. リポポリサッカライドによるミクログリアの活性化に伴う代謝的变化. 第53回日本神経化学学会、第33回日本神経科学学会、第20回日本神経回路学会合同大会、神戸、9. 3、2010.

⑲ 増田寿明、中嶋一行. ミクログリアによるTNF α 産生はアストロサイトとの細胞間相互作用で促進される. 第53回日本神経化学学会、第33回日本神経科学学会、第20回日本神経回路学会合同大会、神戸、9. 3、2010.

⑳ 山本伸一、中嶋一行、高坂新一. ミクログリアにおけるcFmsとPCNAの誘導に対する

M-CSFの役割. 第53回日本神経化学会、第33回日本神経科学会、第20回日本神経回路学会合同大会、神戸、9.3、2010.

㉑ 宮森弘明、中嶋一行、高坂新一. 神経系における抑制性サイトカインの産生について. 第53回日本神経化学会、第33回日本神経科学会、第20回日本神経回路学会合同大会、神戸、9.3、2010.

㉒ 本田芳成、山本伸一、高坂新一、中嶋一行. 神経傷害とミクログリアの応答性：神経栄養因子作用の解析. 第53回日本神経化学会、第33回日本神経科学会、第20回日本神経回路学会合同大会、神戸、9.3、2010.

㉓ 須賀直博、吉越千夏、上田耕久、任静、森岡勝樹、小林新、中嶋一行、大城聡. ミクログリア/神経細胞混合培養による遺伝子発現の動態変化. 第53回日本神経化学会、第33回日本神経科学会、第20回日本神経回路学会合同大会、神戸、9.3、2010.

㉔ Nakajima K, Maeda S, Tohyama Y, Kohsaka S. Characteristic response of astrocytes to plasminogen to upregulate transforming growth factor beta 3 (TGFβ3) production/secretion through the action of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt/PKB signaling cascade. 9th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, France, Paris, 9.9, 2009

㉕ 加茂剛和、高坂新一、中嶋一行. ミクログリアを傷害性に誘導するPKCの解析. 第32回日本神経科学大会、名古屋、9.16、2009.

㉖ 中嶋一行、遠山陽子、高坂新一. プラスミノーゲン活性化アストロサイトによるPAI-1誘導へのマップキナーゼの関与. 第32回日本神経科学大会、名古屋、9.16、2009.

㉗ 山本伸一、小野晴子、上村雅人、高坂新一、中嶋一行. ミクログリアの増殖：マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) によるcFmsの誘導. 第32回日本神経科学大会、名古屋、9.17、2009.

㉘ 須賀直博、吉越千夏、大橋麻耶、森岡勝樹、小林新、中嶋一行、大城聡. ミクログリアは鉄輸送系を調節することにより酸化ストレスが誘導する神経細胞死を抑制する. 第32回日本神経科学大会、名古屋、9.17、2009.

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 一行 (NAKAJIMA KAZUYUKI)
創価大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：50175494

(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

山本 伸一 (YAMAMOTO SHINICHI)
創価大学・大学院工学研究科・大学院生
研究者番号：

前田 秀一 (MAEDA SHYUICHI)
創価大学・大学院工学研究科・大学院生
研究者番号：

吉野 幸久 (YOSHINO YUKIHISA)
創価大学・大学院工学研究科・大学院生
研究者番号：