

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 6月7日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500363

研究課題名（和文）ミクログリアの突起伸長から遊走への運動能調節機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of microglial process extension and migration

研究代表者

大澤 圭子（OHSAWA KEIKO）

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・代謝研究部・室長

研究者番号：40392435

研究成果の概要（和文）：ミクログリアの突起伸長と遊走の調節分子機構を解明するために、我々は細胞外アデノシン三リン酸（ATP）の代謝産物であるアデノシンがアデノシン A3 受容体を介して ATP 受容体 P2Y₁₂ と協調して働き突起伸長と遊走を促進することを明らかにした。また、ラット成体脳ミクログリアにおける A3 受容体 mRNA の発現を示した。これらの結果から、アデノシグナルが神経障害反応性のミクログリアの機能変化を調節する重要な脳内シグナル分子であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Microglia are the primary immune surveillance cells in the brain. Microglial process extension and migration toward injured sites in the brain is triggered by the stimulation of the purinergic receptor P2Y₁₂ by extracellular ATP. In this study, we found that adenosine A3 receptor (A3R) co-operated with P2Y₁₂ to promote microglial process extension and migration. A3R mRNA was clearly observed in microglia sorted from normal adult brains. From these results we concluded that adenosine signaling might play an important role in mediating the change in microglial motility from the resting state to the activated state after brain injury or disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	770,000	231,000	1,001,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,170,000	951,000	4,121,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：ミクログリア、突起伸長、細胞移動、細胞外ヌクレオチド、アデノシン

1. 研究開始当初の背景：ミクログリアは、神経組織の修復・再生、あるいは炎症の憎悪・回復に重要な役割を果たす細胞である。正常脳では、小型の細胞体で長く多数に分岐した突起を持つラミファイド型で存在し、突起を活発に動かして脳内センサー細胞として働く

ことが示唆されている（Nimmerjahn A. *et al.* 2005 *Science* 308, 1314-1318）。脳障害時には、ミクログリアはいち早く反応して形態を変化させ活性化型となり、障害部位へ移動し増殖して生理活性物質の産生・分泌、貪食など多様な機能を発揮するようになる。近年、

神経損傷後すぐに、ラミファイド型ミクログリアが損傷部位に向かって突起を伸長する様子が観察され、その反応は、損傷部位から流出した細胞外 ATP により ATP 受容体 P2Y12 を介して引き起こされることが報告された (Davalos D. *et al.* 2005 *Nat. Neurosci.* 8, 752-758; Haynes S. *et al.* 2006, *Nat. Neurosci.* 9, 1512-1519)。従って、神経障害に応答性のミクログリア運動能制御機構の解析は、ミクログリアの生理機能と脳障害時における役割を理解するために重要である。しかしながら、ミクログリアの突起伸長から細胞移動の調節分子機構についてはいまだ十分に解明されていない。我々は、これまでに、ATP による遊走が P2Y12 の下流で機能するホスホリパーゼ C (PLC) とホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) -Akt シグナル系により調節されることを報告した (Ohsawa K. *et al.* 2007 *GLIA* 55, 604-616; Irino Y. *et al.* 2008 *J. Neurosci. Res.* 86, 1511-1519)。また、近年、突起伸長調節機構の解析を行なうために、培養ミクログリアを用いたミクログリア突起伸長解析系を確立し、突起伸長調節に P2Y12 刺激による PI3K, PLC とインテグリンシグナル系の活性化が必要であることを明らかにしてきた (Ohsawa K. *et al.* 2010 *Glia* 58, 790-801)。

ミクログリア突起伸長解析系を用いた予備的検討より、突起伸長は ATP 刺激後数分以内に起こるが細胞遊走の開始には数時間かかること、ADP アナログの P2Y12 選択的刺激による突起伸長では伸長方向の濃度勾配依存性が低くなること、そして、アデノシン受容体 (AR) に対する阻害剤で ADP による突起伸長が抑制されることが認められた。アデノシンは細胞外ヌクレオチドを加水分解する細胞表面酵素 (E-NTPDase など) により ATP/ADP から生成され、細胞表面上に存在する AR を介して作用する。AR には 4 つのサブタイプ (A1、A2A、A2B、A3) が存在し、ミクログリアには A1、A2A 及び A3 の発現が報告されている (Hasko G. *et al.* 2005 *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 511-516)。また、アデノシンによる好中球の移動調節が報告されている (Chen Y. *et al.* 2006 *Science* 314, 1792-1795)。以上のことから、我々は、アデノシンシグナル系の突起

伸長および細胞遊走への関与について検討した。

2. 研究の目的：本研究はアデノシンによるミクログリアの突起伸長と遊走を調節する分子機構の解明を目的とし、

- (1) アデノシンの突起伸長への作用
- (2) アデノシンの細胞遊走への作用
- (3) ミクログリアに発現するアデノシン受容体サブタイプの解析
- (4) アデノシン刺激で活性化される突起伸長調節分子シグナル系の解析

の項目を中心に研究を行なった。

3. 研究の方法

(1) アデノシンの突起伸長への作用：初代培養ミクログリアは生後一日目ラットの大脳より調製した混合グリア細胞を 10 日から 14 日培養し、培地上清に浮遊した細胞をミクログリアとして調製した。我々が以前確立した突起伸長解析系 (図 1) を用いて、まず、P2Y12 高親和性アゴニストである 2-メチルチオ ADP (2MeSADP) のミクログリアに対する作用を ADP と比較し、2MeSADP の突起伸長活性が有意に低いことを確認した。そして、2MeSADP 刺激ミクログリアに対するアデノシン及び各 AR サブタイプ選択的アゴニストの添加効果を調べた。また、ADP 刺激による突起伸長について、アデノシン加水分解酵素アデノシンデアミナーゼ (ADA) 処理によりアデノシンを除去した場合と、各 AR サブタイプ選択的アンタゴニストの影響を検討した。

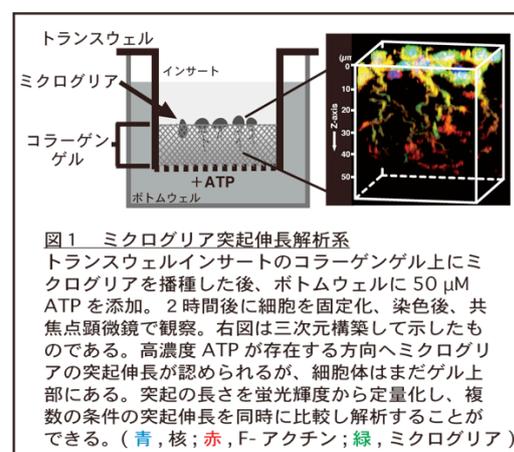


図1 ミクログリア突起伸長解析系
トランスウェルインサートのコラーゲンゲル上にミクログリアを播種した後、ボトムウェルに 50 μ M ATP を添加。2 時間後に細胞を固定化、染色後、共焦点顕微鏡で観察。右図は三次元構築して示したものである。高濃度 ATP が存在する方向へミクログリアの突起伸長が認められるが、細胞体はまだゲル上部にある。突起の長さを蛍光輝度から定量化し、複数の条件の突起伸長を同時に比較し解析することができる。(青、核; 赤、F-アクチン; 緑、ミクログリア)

(2) アデノシンの細胞遊走への作用：まず、EZ-TAXIScan システムを用いてミクログリア

の遊走解析系を確立した。1mM ATP 刺激によりミクログリアは ATP 濃度勾配に依存した遊走を示し、それは P2Y12 選択的アンタゴニスト AR-C69901MX により完全に抑制されたことから ATP による遊走は P2Y12 に依存することが確認された (図 2)。アデノシンの細胞遊走への関与を検討するために、ADP 刺激による遊走に対する AR 選択的アンタゴニストの影響と 2MeSADP 刺激による遊走に対するアゴニストの影響を解析し、遊走に関わる AR サブタイプを調べた。

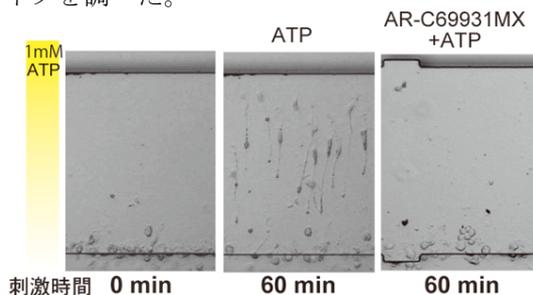


図 2 EZ-TAXIScan システムにおけるミクログリアの遊走

(3) ミクログリアに発現するアデノシン受容体サブタイプの解析：ラット成体脳組織から酵素処理とパーコール密度勾配遠心分離法で調製した細胞を CD11b と CD45 に対する蛍光抗体で標識し、FACS (BD FACS Aria) により CD11b+CD45^{low} 細胞をミクログリアとして分取した。得られた細胞から mRNA を調製し、AR サブタイプ特異的なプライマーを用いた RT-PCR 法により AR サブタイプの発現を解析した。

(4) アデノシン刺激で活性化される突起伸長調節分子シグナル系の解析：PI3K シグナル系と分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼファミリー (MAPKs) に属する ERK1/2、p38 キナーゼ (p38) と Jun N-terminal kinase (JNK) の ADP 刺激による活性化を検討した。培養ディッシュに接着した初代培養ミクログリアを ADP で刺激後、細胞を可溶化し、細胞ライセート中のタンパク質を SDS-PAGE・膜転写後、各キナーゼのリン酸化型フォームを特異的に認識する抗体を用いたウェスタンブロット法で自己リン酸化を検出し、キナーゼの活性化を解析した。次に、ADP による突起伸長に対する各 MAPKs 選択的な阻害剤の影響を突起伸長解析系を用いて調べた。そして、阻害効

果が認められたキナーゼ分子が、AR サブタイプ選択的アゴニストの刺激で活性化されるかを検討した。

4. 研究成果

(1) アデノシンの突起伸長への作用：ボトムウェルに ADP (50 μ M) を添加すると、ミクログリアは高濃度 ADP の報告に向かって突起を伸長するが、2MeSADP では 500 nM でも突起伸長が認められなかった (図 3A)。2MeSADP 刺激された細胞の突起には、短いものと長くランダムな方向に伸びているものが観察され (図 3B、白矢じり)、2MeSADP は濃度勾配依存性の突起伸長活性が低いことが判明した。そこで、アデノシンを 2MeSADP と同時にボトムウェルに添加したところ、濃度勾配に依存した突起伸長が回復し、アデノシン 10 μ M と 100 μ M で有意に効果が認められた (図 3A)。

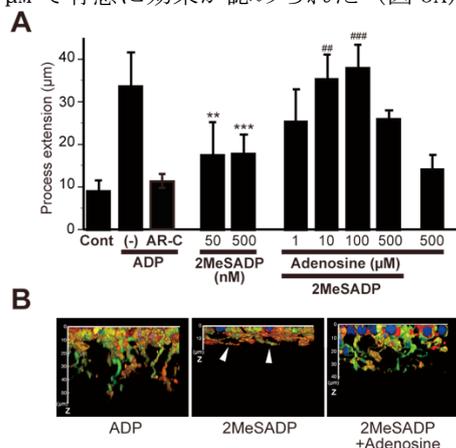


図 3 アデノシンによる 2MeSADP 刺激ミクログリアの突起伸長の回復

(*** p<0.01, ** p<0.02 vs ADP; ### p<0.01, ### p<0.02 vs 50 nM 2MeSADP; n=3-4, Student's t-test; 平均値±標準偏差)

AR サブタイプの選択的アゴニストの影響を調べたところ、A3 アゴニスト 2-C1-IB-MECA (1 nM と 10 nM) に効果があり、他のサブタイプアゴニスト (1 μ M) の影響は認められなかった (図 4A)。ADP (50 μ M) 刺激による突起伸長は、ADA (10 μ M) による細胞の前処理で有意に阻害された。また、ARs アンタゴニスト CGS15943 (20 μ M) 及び A3 アンタゴニスト MRS1523 (1 μ M) により抑制された (図 4B)。他の AR サブタイプアンタゴニストの影響は認められなかった。以上の結果から、アデノシンが ADP による突起伸長に関与し、A3 を介して作用することが示された。

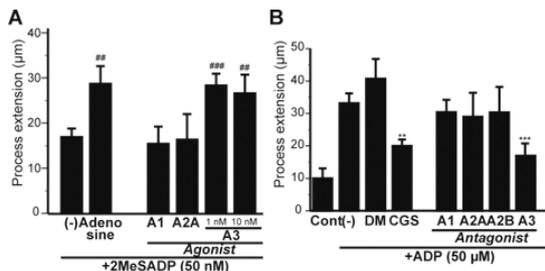


図4 ARサブタイプ選択的アンタゴニストとアゴニストのミクログリア突起伸長に対する影響

(### p<0.001, ## p<0.002 vs 50 nM 2MeSADP; *** p<0.01, ** p<0.02 vs ADP; n=3~4, Student's t-test; 平均値±標準偏差)

(2) アデノシンの細胞遊走への作用：EZ-TAXIScan システムを用いて解析したところ、A1 アンタゴニスト DPCPX (5 µM) と A3 アンタゴニスト MRS1523 (10 µM) により、ADP (1 mM) 刺激による移動速度は減少し、1 時間後のミクログリアの細胞移動距離は有意に抑制された (図 5A)。A2A アンタゴニスト SCH58261 (1 µM) の影響は認められなかった。2MeSADP (10 µM) 刺激でミクログリアの濃度勾配依存性の細胞移動が生じるが、A1 アゴニスト CCPA (50 nM) と A3 アゴニスト (10 nM) を 2MeSADP と同時に添加すると移動速度が増大し、刺激 1 時間後の移動距離が増加した (図 5B)。以上の結果から、細胞移動は A1 と A3 サブタイプが関与していることが示された。

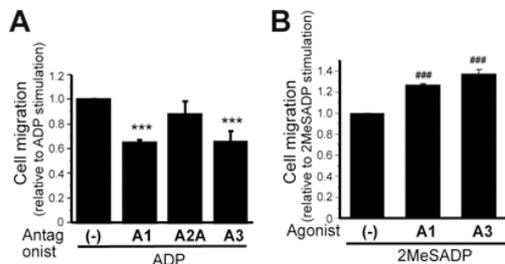


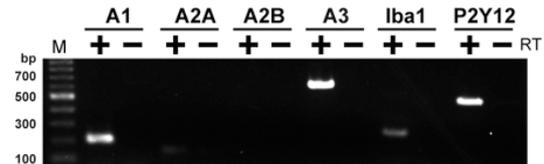
図5 ARサブタイプ選択的アンタゴニストとアゴニストのミクログリア遊走に対する影響

(*** p<0.005 vs 1 mM ADP; ### p<0.001 vs 10 µM 2MeSADP; n=3~4, Student's t-test; 平均値±標準偏差)

(3) ミクログリアに発現するアデノシン受容体サブタイプの解析：ラット初代培養ミクログリアから mRNA を調製し RT-PCR 法で AR サブタイプの発現を調べたところ、A1 と A3 のバンドが明らかに認められたが、A2A のバンドシグナルは非常に弱く、A2B のバンドは認められなかった。A2A の発現は LPS 刺激により活性化されたミクログリアで上昇すること告されている (Orr et al. 2009 *Nat. Neurosci.* 12, 872-878)。本実験で使用したラットミク

ログリアでも LPS 刺激による発現上昇が確認された。ラット成体脳より分取したミクログリアにおける AR の発現を調べたところ、初代培養ミクログリアと同様のパターンが得られ、A1 と A3 の発現が認められたが、A2A の発現は低かった (図 6)。以上の結果から、正常脳ラミファイド型ミクログリアでは主に A1 と A3 が発現しており、A2A の発現は弱いことが示唆された。

図6 ラット成体脳ミクログリアにおける



ARサブタイプの発現

(4) アデノシン刺激で活性化される突起伸長調節分子シグナル系の解析：P2Y12 の下流で機能する PI3K シグナル系が突起伸長に関わることから (Ohsawa et al. 2010 *GLIA* 58, 790-801)、アデノシンあるいは A3 アゴニスト 2-C1-IB-MECA の刺激により PI3K-Akt シグナル系が活性化されるかを Akt のリン酸化を指標として検討した。どちらのリガンドによっても Akt の活性化は認められなかったことから、アデノシン刺激による PI3K の寄与は低いものと考えられた。そこで、次に、MAPK シグナル系の突起伸長への関与について検討した。ADP (50 µM) 刺激 5 分後には ERK1/2、p38、JNK の活性化が認められた。そこで、各キナーゼに対する阻害剤の ADP 刺激による突起伸長に対する影響を調べたところ、ERK1/2 阻害剤 PD98059 (PD, 10 µM) と U0126 (U, 10 µM) と、p38 阻害剤 SB203580 (SB, 25 µM) の影響は認められなかったが、JNK 阻害剤 SP600125 (SP, 10 µM) が有意に抑制した (図 7)。そこで、A3 アゴニスト 2-C1-IB-MECA 刺激による JNK の活性化調べたところ

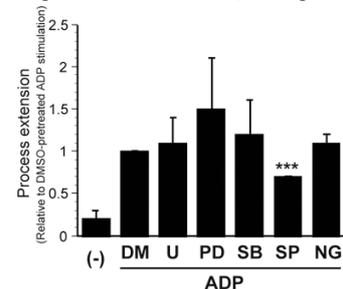


図7 MAPKs 阻害剤の ADP によるミクログリア突起伸長に対する影響

(*** p<0.01 vs ADP+DMSO(DM); n=3~4, Student's t-test; 平均値±標準偏差; NG, JNK inhibitor negative control 10 µM)

ろ、1 nM から 100 nM で濃度依存的にリン酸化型 JNK の増加が認められ、10 nM の刺激による増加は刺激 2 分後から認められ 15 分後まで維持されていた(図 8)。以上の結果から、JNK シグナル系の活性化が ADP による突起伸長に關与することが示され、A3 刺激で活性化される JNK シグナルも突起伸長に寄与することが示唆された。

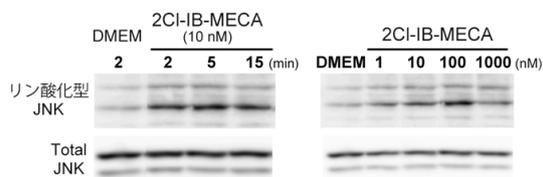


図 8 ミクログリアにおける A3 アゴニスト刺激による JNK の活性化

以上の結果より、アデノシンが A3 を介してミクログリアの突起伸長と遊走に關与することが示された。近年、神経疾患の炎症や病態の拡大・進行にミクログリアが積極的に関係することが示されている。最近、アデノシンが活性化ミクログリアで発現する A2A を刺激してミクログリアの突起の退縮や細胞移動の反発を誘導することが報告され、A2A が活性化ミクログリアの突起退縮や傷害部位への停滞に關与していることが示唆された (Orr et al. 2009 *Nat. Neurosci.* 12, 872-878)。本研究では、アデノシンは、神経傷害直後のミクログリアに対しては A3 を介してミクログリアの突起伸長を牽引し、また、A1 および A3 を介してミクログリアの移動を促進し、P2Y12 と協調した作用を及ぼすことが示唆された。アデノシンシグナルはミクログリアの動態に影響し、ラミファイド型ミクログリアから活性化ミクログリアの変換の制御に重要な因子となると考えられる(図 9)。

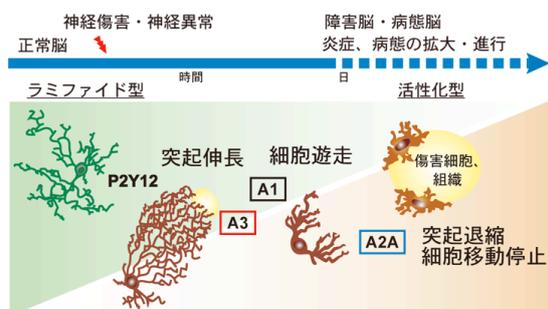


図 9 アデノシンによるミクログリアの動態制御

今後、脳神経系の病態進行機序を理解するために、神経障害や病態時におけるミクログリアの AR サブタイプの発現について解析し、それらの役割を明らかにすることが必要である。

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 5 件)

- ① Ohsawa K, Sanagi T, Nakamura Y, Suzuki E, Inoue K, Kohsaka S. 2012. Adenosine A3 receptor is involved in ADP-induced microglial process extension and migration. *J. Neurochem*, 121(2):217-227. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07693.x. PubMed PMID: 22335470. 査読有.
- ② Sanagi T, Nakamura Y, Suzuki E, Uchino S, Aoki M, Warita H, Itoyama Y, Kohsaka S, Ohsawa K. 2012. Involvement of Activated Microglia in Increased Vulnerability of Motoneurons After Facial Nerve Avulsion in Presymptomatic ALS Model Rats. *GLIA*, 60(5):782-793. doi:10.1002/glia.22308. PubMed PMID: 22344792. 査読有.
- ③ Ohsawa K, Kohsaka S. 2011. Dynamic motility of microglia: Purinergic modulation of microglial movement in the normal and pathological brain. *GLIA* 59(12):1793-1799. doi:10.1002/glia.21238. PubMed PMID: 21901756. 査読有.
- ④ Sanagi T, Yuasa S, Nakamura Y, Suzuki E, Aoki M, Warita H, Itoyama Y, Uchino S, Kohsaka S, Ohsawa K. 2010. Appearance of phagocytic microglia adjacent to motoneurons in spinal cord tissue from a presymptomatic transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res* 88(12):2736-2746. PubMed PMID: 20648658. 査読有.
- ⑤ Ohsawa K, Irino Y, Sanagi T, Nakamura Y, Suzuki E, Inoue K, Kohsaka S. 2010. P2Y12 receptor-mediated integrin-β1 activation regulates microglial process extension induced by ATP. *Glia* 58(7):790-801. PubMed PMID: 20091784. 査読有.

[学会発表] (計 8 件)

- ①大澤圭子: Involvement of adenosine A3 receptor in microglial process extension 第 54 回日本神経化学学会大会

2011年9月27日 石川県、瑠璃光

- ②大澤圭子：アデノシンシグナルによるミクログリアの突起伸長調節 第34回日本神経科学大会 2011年9月17日 神奈川県、パシフィコ横浜.
- ③大澤圭子：アデノシンシグナルによるミクログリアの遊走と突起伸長調節 第33回日本分子生物学会年会 2010年12月8日 兵庫県 神戸ポートアイランド
- ④Ohsawa K: Involvement of β 1 integrin activation by P2Y12 receptor in microglial process extension 第29回内藤コンファレンスGLIA WORLD 2010年10月6日神奈川県 湘南交際村センター
- ⑤大澤圭子：神経変性疾患におけるミクログリアの動態変化 第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学学会大会・第20回日本神経回路学会大会 2010年9月2日 兵庫県 神戸ポートアイランド
- ⑥Ohsawa K: Involvement of β 1 integrin activation by P2Y12 receptor in microglial process extension ISN/APSN 2009 2009年8月25日 韓国 釜山展示コンベンションセンター
- ⑦Ohsawa K: Integrin β 1 activation by P2Y12 receptor is involved in microglial process extension Fukuoka Purine 2009 2009年7月24日 ザ 福岡 ザ ルイガンスホテル
- ⑧大澤圭子：ミクログリアの形態変化と遊走-細胞外ATPによる遊走と突起伸長の調節分子機構- 第52回日本神経化学学会大会 2009年6月24日 群馬 伊香保温泉 ホテル天望

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 圭子 (OHSAWA KEIKO)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 代謝研究部・室長
研究者番号：40392435

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐柳 友規 (SANAGI TOMOMI)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 代謝研究部・研究員
研究者番号：00527012