

## 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 13 日現在

機関番号： 15401  
 研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2009 ~ 2011  
 課題番号： 21590281  
 研究課題名 (和文) ミクログリアの  $\alpha 7$  ニコチン受容体の新しいシグナル伝達様式と脳内炎症治療への展開  
 研究課題名 (英文) Novel signaling pathways and anti-inflammatory roles of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine 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・助教  
 研究者番号： 20253073

## 研究成果の概要 (和文)：

脳ミクログリアにおいて  $\alpha 7$  ニコチン受容体はイオンチャネルとは独立した代謝型シグナルを介して細胞内ストアからカルシウム放出を引き起こす。この反応はチロシンリン酸化に依存し、炎症時に生じる酸性条件下や酸化ストレス下に増強され、リポポリサッカライド (LPS) による炎症誘導を抑制する。一方、LPS 刺激はミクログリアに細胞死を引き起こすが、細胞死を免れた一部の細胞は長期間生存維持し食食などの保護的機能を発揮する。 $\alpha 7$  ニコチン受容体は抗炎症作用に加え保護的ミクログリアには促進効果を示すことから、炎症疾患治療の標的としての可能性がさらに期待される。

## 研究成果の概要 (英文)：

In brain microglia, alpha 7 nicotinic receptor activation induced calcium release from intracellular calcium stores through tyrosine-kinase-dependent metabotropic pathways. This calcium response was enhanced under acidic condition or oxidative stress and thereby suppressed lipopolysaccharide (LPS)-induced production of inflammatory cytokines. LPS stimulation also promotes long survival and protective function such as phagocytosis in microglia. Since alpha 7 nicotinic receptors play a role in facilitating protective function in microglia, this receptor subtype may be a potential target for brain inflammatory diseases.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：薬理学・神経科学

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、炎症、ミクログリア、ニコチン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

近年、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患や脳梗塞などの脳血管障害が増加し、その予防や治療が重要な課題であるが具体的な方策は得られていない。こ

れらの病態の基盤には共通してミクログリアを介した炎症反応がある。ミクログリアは脳に定住するマクロファージ様細胞であり、感染や神経傷害時に活性化され、異物や死細胞を貪食するとともに栄養因子を放出し、脳

神経の恒常性維持に重要な役割を果たす。しかし、いったん過剰な活性化を受けると神経傷害因子を大量に放出し、炎症や神経細胞死を誘導する。

$\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体 ( $\alpha 7$  ニコチン受容体) はこれまでおもに神経細胞に発現しリガンド作動性イオンチャネルとして速やかな神経伝達を担うと考えられてきた。しかし、研究代表者らはこの受容体はミクログリアにも発現し、さらにイオンチャネルとしてではなく、ホスホリパーゼ C (PLC) 活性化とイノシトール三リン酸 (IP3) 産生などの代謝型シグナルを介して細胞内カルシウムストアからカルシウム遊離を引き起こすことを明らかにしてきた。一方、炎症誘発物質であるリポポリサッカライド (LPS) による Toll-like receptor 4 (TLR4) の活性化はミクログリアから TNF などの炎症性サイトカインの遊離を著明に引き起こし、炎症反応を強力に誘導する。 $\alpha 7$  ニコチン受容体の活性化は LPS 誘発 TNF 遊離を有意に抑制することから、ミクログリアの過度の炎症反応を抑制する重要な役割を果たすことも示してきた。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や細胞機能の調節の機序には不明の点が多く残されている。

## 2. 研究の目的

ミクログリアにおいて  $\alpha 7$  ニコチン受容体が代謝型シグナルを伝達する仕組みを、特に、チロシンリン酸化に焦点を当て検討した。また、炎症時には細胞外の酸性化が生じ、また活性酸素による酸化ストレスが引き起こされる。このような状況下で、 $\alpha 7$  ニコチン受容体の機能がどのように制御されるか検討した。さらにミクログリアの LPS による TLR4 活性化は強い炎症反応を引き起こすが、この反応を詳細に検討する過程で、LPS 刺激はミクログリアに細胞死を引き起こすが、同時に一定の割合の細胞に生存維持を引き起こすことを見出した。これらの細胞の機能を明らかにするとともに、 $\alpha 7$  ニコチン受容体の果たす役割について検討した。

## 3. 研究の方法

実験にはラット新生児より調製した脳ミクログリア初代培養細胞を用いた。また、チオグリコール酸培地により誘導したマウス腹腔マクロファージも使用した。細胞内カルシウム濃度の測定はカルシウム蛍光指示薬である Fura-2-AM を細胞内に取り込ませ、得られた蛍光画像を解析することにより行った。炎症性サイトカイン (TNF) は ELISA キットを用いて定量した。ミクログリアの生存は生細胞数のカウントにより定量し、貪食作用は培養装置を取り付けた位相差顕微鏡によ

るタイムラプス観察により解析した。

## 4. 研究成果

ミクログリアに発現する  $\alpha 7$  ニコチン受容体は PLC 活性化と IP3 産生により細胞内カルシウムストアからカルシウム放出を引き起こすが、この作用はチロシン脱リン酸化阻害薬である過酸化バナジン酸の処置により増大し、チロシンキナーゼ阻害薬ゲニステインおよび src-family チロシンキナーゼ阻害薬 PP-2 により抑制された。このことから、 $\alpha 7$  ニコチン受容体から PLC 活性化にチロシンリン酸化が関与する可能性が示された。ミクログリアには src-family チロシンキナーゼのなかで Lyn が最も豊富に発現しており、細胞機能制御にも大きな働きをしている。そこで、Lyn 欠損マウスからミクログリアによく似た性質をもつ腹腔マクロファージを採取し検討した。その結果、Lyn 欠損マクロファージでもニコチン誘発カルシウム反応は引き起こされることが確認された。従って、 $\alpha 7$  ニコチン受容体のシグナルには Lyn 以外のチロシンキナーゼが関わる可能性が考えられた。これまで、 $\alpha 7$  ニコチン受容体の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、イオンチャネルと代謝型シグナルの働きがチロシンリン酸化により逆の方向に調節されることは興味深い。

また、炎症時には細胞外が酸性に傾くことが知られている。この酸性条件下 (低 pH) では、ミクログリアにおけるニコチン刺激によるカルシウム反応は増大することがわかった。同様に過酸化水素処置による酸化ストレス状態でもニコチンによるカルシウム上昇反応は増大した。このことから、炎症時には細胞外の酸性化により  $\alpha 7$  ニコチン受容体を介したシグナル伝達の機能促進が誘導され、より強い抗炎症作用が発揮される可能性が示された。

LPS 刺激によるミクログリアの炎症反応の研究を進める過程で、LPS 刺激は濃度依存的にミクログリアに細胞死を引き起こすが、その中で一定の割合で細胞死を免れその後長期間生存し続ける細胞群が一定の割合存在することを見出した。細胞培養装置付き位相差顕微鏡によりミクログリアのタイムラプス観察を行った結果、LPS 刺激で細胞死を免れたミクログリアは著しく運動性を高め近傍の死細胞へ遊走し活発に貪食する様子が示された。また、これらの長期間生存するミクログリアは保護的機能に関わる遺伝子群を高発現していたことから、生存し貪食するミクログリアは保護的細胞である可能性が高いと考えられた。 $\alpha 7$  ニコチン受容体は細胞生存を維持し、また貪食作用も促進する。このことから  $\alpha 7$  ニコチン受容体は同じ TLR4 活

性でも炎症へ至るシグナルを抑制しつつ、保護的機能を高める重要な役割を果たす可能性が示された。

本研究により得られた知見は、新規シグナルを介してミクログリアの炎症作用を抑制する一方で保護作用を促進する $\alpha 7$ ニコチン受容体の新しい働きを明らかにし、 $\alpha 7$ ニコチン受容体をターゲットとした脳内炎症治療への可能性をさらに広げるものと期待される。

#### 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 8 件)

1. Harada, K., Hide, I., Seki, T., Tanaka, S., Nakata, Y., Sakai, N. Extracellular ATP differentially modulates Toll-like receptor 4-mediated cell survival and death of microglia. *Journal of Neurochemistry* (査読有) 116: 1138-1147 (2011)  
doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07170.x.

2. Yanase, Y., Hide, I., Mihara, S., Shirai, Y., Saitho, N., Sakai, N., *et al.* A critical role of conventional protein kinase C in morphological changes of rodent mast cells. *Immunology and Cell Biology* (査読有) 89: 149-159 (2011)  
doi:10.1038/icb.2010.67

3. Seki, T., Ki Y., Tanaka, S., Dohi, E., Onji, T., Yamamoto, K., Seki T, Yoshino KI, Tanaka S, Dohi E, Onji T, Yamamoto K, Hide, I., Sakai, N. *et al.* Establishment of a novel fluorescence-based method to evaluate chaperone-mediated autophagy in a single neuron. *PLoS ONE* (査読有) 7: E31232 (11頁) (2011)  
doi: 10.1371/journal.pone.0031232

4. Dohi, E., Tanaka, S., Seki, T, Miyagi, T., Hide, I., Sakai, N., *et al.* Hypoxic stress activates chaperone-mediated autophagy and modulates neuronal cell survival. *Neurochemistry International* (査読有) 60: 431-442 (2011)  
doi: 10.1016/j.neuint.2012.01.020

5. Seki, T., Takahashi, H., Yamamoto, K., Ogawa, K., Onji, T., Adachi, N., Tanaka, S., Hide, I., Sakai, N. *et al.* Congo red, an amyloid-inhibitory compound, alleviates various types of cellular dysfunction triggered by mutant protein kinase C $\gamma$  that causes spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14) by inhibiting oligomerization and

aggregation.

*Journal of Pharmacological Sciences* (査読有) 114: 206-216 (2010)  
doi: 10.1254/jphs.10170FP

6. Yamamoto, K., Seki, T., Hide, I., Sakai, N., *et al.* Mutant protein kinase C gamma that causes spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14) is selectively degraded by autophagy. *Genes Cells* (査読有) 15: 425-438 (2010)  
doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01395.x

7. Seki, T., Abe-Seki, N., Kikkawa, T., Takahashi, H., Yamamoto, K., Adachi, N., Tanaka, S., Hide, I., Sakai, N., *et al.* Effect of trehalose on the properties of mutant  $\gamma$ PKC, which causes spinocerebellar ataxia type 14, in neuronal cell lines and cultures Purkinje cells. *Journal of Biological Chemistry* (査読有) 285: 33252-33264 (2010)  
doi: 10.1074/jbc.M110.146704

8. Yae, E., Yahara, S., El-Aasr, M., Ikeda, T., Yoshimitsu, H., Matsuoka, C., Ono, M., Hide, I., *et al.* Studies on the constituents of whole plants of *Youngia japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* (査読有) 572: 719-723 (2009)  
doi: org/10.1248/cpb.57.719

[学会発表] (計 31 件)

1. 秀 和泉、原田佳奈、関 貴弘、田中 茂、柳瀬雄輝、酒井規雄、Toll-like receptor 4 活性化ミクログリアの異なる細胞反応とプリン受容体の関与。第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14-16 日、京都市

2. 田中 茂、宮城達博、土肥栄祐、秀 和泉、酒井規雄、他、低酸素環境下における Gs 共役型受容体 GPR3 の神経細胞保護作用。第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14-16 日、京都市

3. 宮城達博、田中 茂、秀 和泉、酒井規雄、他、げっ歯類脳における恒常性 Gs 活性化受容体 GPR3 の発現と神経細胞内局在。第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14-16 日、京都市

4. 山本 光、田中 茂、関 貴弘、秀 和泉、酒井規雄、cAMP アナログの長期処置による RN46A 細胞におけるセロトニントランスポーター機能上昇の分子機構の解析。第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14-16 日、京都市

5. 土肥栄祐、田中 茂、関 貴弘、宮城達博、高橋哲也、秀 和泉、松本昌泰、酒井規雄、シャペロン介在性オートファジーは低酸素ストレスによる神経細胞死に対し保護的に働く。第 85 回日本

薬理学会年会、2012年3月14-16日、京都市

6. 宮原岳史、関 貴弘、秀 和泉、酒井規雄、他、  
プロテインキナーゼCのトランスロケーションと  
酵素活性に対するプロポフォルの効果。第120  
回日本薬理学会近畿部会、2011年11月11日、京  
都市

7. 酒井規雄、藤原雅幸、山本 光、田中 茂、関  
貴弘、秀 和泉、他 セロトニントランスポー  
ター機能に対するケミカルシャペロン  
4-phenylbutyrate (4-PBA)の効果。第119回日本  
薬理学会近畿部会、2011年7月8日、名古屋市

8. 酒井 規雄 他 遺伝性脊髄小脳失調症14型  
(SCA14)の発症原因となる変異 $\gamma$ PKCの分解に  
オートファジーが関与する。第52回日本神経学  
会、2011年5月19日、名古屋市

9. 土肥栄佑、田中 茂、秀 和泉、酒井規雄、他、  
低酸素環境下におけるシャペロン介在性オートフ  
ァジーの役割。第34回日本神経科学大会、2011  
年9月14日~17日、横浜市

10. 田中 茂、秀 和泉、酒井規雄、他、GPR3  
は小脳発生過程の神経細胞死を修飾する。第34  
回日本神経科学大会、2011年9月14日~17日、  
横浜市

11. 酒井規雄 他 ケミカルシャペロンがセロト  
ニントランスポーター機能に及ぼす影響 活性ア  
ミンに関するワークショップ 2011年8月11日  
徳島市

12. 山本 光 他 cAMP アナログ処置によるセ  
ロトニントランスポーター(SERT)の機能変化  
活性アミンに関するワークショップ 2011年8月  
11日 徳島市

13. Dohi, E., Hide, I., Sakai, N., *et al.*  
Contribution of chaperone-mediated autophagy  
to the survival of cells under hypoxic condition  
SFN meeting 2011 2011年11月12日~16日  
Washington DC (USA)

14. Tanaka, S., Hide, I., Sakai, N. *et al.*  
Involvement of GPR3 against apoptotic  
neuronal cell death during cerebellar  
development. SFN meeting 2011, 2011年11月12  
日~16日, Washington DC (USA)

15. 山本 光、他、ケミカルシャペロンのセロト  
ニントランスポーター機能に対する影響 第54回  
日本神経化学会大会 2011年9月27日 加賀市

16. 藤原俊輔、秀 和泉、酒井規雄、他、 Toll-li  
ke receptor活性化ミクログリアからのTNF遊離

におけるP2X7受容体の関与。第84回日本薬理学  
会年会、2011年3月22日~24日、横浜市

17. 関 貴弘、秀 和泉、酒井規雄、他、新規活  
性評価法を用いたシャペロン介在性オートファジ  
ー活性に対する脊髄小脳失調症14型 (SCA14) の  
原因となる変異 $\gamma$ PKCの影響 第84回日本薬理学  
会年会 2011年3月22日~24日 横浜市

18. 隠地智也、他、脊髄小脳失調症14型 (SCA14)  
の原因となる変異 $\gamma$ PKCの細胞毒性に対するシャ  
ペロン介在性オートファジーの影響 第84回日  
本薬理学会年会 2011年3月22日~24日 横浜市

19. 藤原雅幸、他、ケミカルシャペロン 4-Phenyl  
Butylate (4-PBA)のセロトニントランスポーター  
機能に対する効果。第84回日本薬理学会年会、  
2011年3月22日~24日、横浜市

20. 山本 光、他、RN46A細胞において cAMP  
アナログの長期暴露はセロトニントランスポー  
ターの取り込み活性を上昇させる。第84回日本  
薬理学会年会、2011年3月22日~24日、横浜市

21. 関 貴弘、他、脊髄小脳失調症14型 (SCA14)  
の原因となる変異 $\gamma$ PKCは heat shock cognate  
protein 70 (Hsc70) と結合し、そのリソソーム  
へのトランスロケーションを抑制する。  
BMB2010, 2010.12.7, 神戸市

22. Seki, T., *et al.* Mutant  $\gamma$ PKC causing  
spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14)  
preferably interacts with heat shock cognate  
protein 70 (Hsc70) and affects its translocation  
to lysosome Neuroscience 2010 (the 40th annual  
meeting of the Society for Neuroscience)  
2010.11.14 San Diego, USA

23. Tanaka, S., *et al.* Neural expression of  
G Protein-coupled receptors GPR3 modulates  
survival of cerebellar granular neurons und  
er hypoxic conditions Neuroscience 2010 (the  
40th annual meeting of the Society for Neurosci  
ence) 2010.11.14 San Diego, USA

24. Hide, I., Sakai, N., *et al.* Purinergic  
modulation of Toll-like receptor 4-regulated  
death or survival of microglia. THE 29<sup>th</sup> NAITO  
CONFERENCE ON GLIA WORLD  
-Dynamic Function of Glial Cells in the Brain-  
October 5-8, 2010, Kanagawa, Japan

25. 原田佳奈、秀 和泉、他 Toll-like receptor 4  
活性化ミクログリアの細胞死と生存の細胞外ATP  
による調節 Neuro2010 (第53回日本神経学  
会大会) 2010年9月2日~4日 神戸市

26. 関 貴弘、他 脊髄小脳失調症 14 型(SCA14)の原因となる変異  $\gamma$ PKC は heat shock cognate protein 70 (Hsc70) と結合し、そのリソソームへのトランスロケーションに影響を及ぼす Neuro2010 (第 53 回日本神経化学学会大会) 2010 年 9 月 2 日~4 日、神戸市

27. 田中 茂、他 神経細胞に発現する G 蛋白共役型受容体 GPR3 の低酸素下における神経細胞生存への関与 Neuro2010 (第 53 回日本神経化学学会大会) 2010 年 9 月 2 日~4 日 神戸市

28. 酒井規雄、秀 和泉 他 神経細胞株におけるニコチン誘発 PKC トランスロケーションの観察 第 118 回 日本薬理学会近畿部会 2010 年 11 月 19 日、大阪市

29. 原田佳奈、秀 和泉 他 Toll-like receptor 4 および細胞外ATPによるミクログリアの細胞死/生存調節 第38回 薬物活性シンポジウム 2010年11月11日~12日、札幌市

30. 原田 佳奈、秀 和泉、他 細胞外ATPによるリポポリサッカライド活性化ミクログリアの生存調節 第83回 日本薬理学会年会 2010年3月16日、大阪市

31. 関 貴弘、他、脊髄小脳変性症 14 型(SCA14)を引き起こす変異  $\gamma$ PKC がシャペロン介在性オートファジーに及ぼす影響 日本神経科学学会 2009 年 9 月 16-18 日 名古屋市

## 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・助教

研究者番号：20253073

### (2) 研究分担者

酒井 規雄 (SAKAI NORIO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70263407

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：