

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 6 日現在

機関番号：35408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06383

研究課題名(和文) ミクログリアのTLR3-IFN $\beta$ シグナリングによるグリオシス制御機構の解明研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of the gliosis through TLR3/IFN- $\beta$  signaling mediated by microglia

研究代表者

中西 博 (Nakanishi, Hiroshi)

安田女子大学・薬学部・教授

研究者番号：20155774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウスでは低酸素/脳虚血負荷に伴いアストログリオシスが軽度で、高度な脳萎縮が生じた。一方、カテプシンH欠損マウスではニューロン死に伴い高度なアストログリオシスが形成された。カテプシンH欠損マウスではミクログリア・マクロファージにおけるToll様受容体3発現が減少していた。このためインターフェロン- $\beta$ (IFN- $\beta$ )の産生分泌が低下し、低酸素/脳虚血負荷に伴い高度なアストログリオシスが形成され、軽度な脳萎縮が生じなかったと考えられる。さらにミクログリアから産生分泌されたIFN- $\beta$ が、ミクログリアの生存維持ならびにアストロサイトの増殖抑制に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳損傷に伴って生じるアストログリオシスがどのように形成され、脳機能回復にどのように関与するのかを理解することは、損傷脳の機能再生・回復技術開発にとって不可欠である。しかし、不明な点が多いのが現状である。本研究においてミクログリアから産生分泌されるIFN- $\beta$ が、ミクログリアの生存維持やアストロサイトの増殖抑制に関与することを突き止めた。さらにIFN- $\beta$ 産生に必要なTLR3の成熟・安定化にはカテプシンHによるプロテオリシスが関与していることを明らかにした。本研究より、カテプシンHの酵素活性阻害あるいは発現抑制により高度なアストログリオシス誘導が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Wild-type mice showed a severe atrophy in association with neuronal death and moderate astrogliosis in the hippocampus following neonatal hypoxic-ischemia (HI). In contrast, CatH-deficient mice showed a marked neuronal death without severe atrophy. Moreover, a notable microglia/macrophages cell death and strong astrogliosis were observed in the hippocampus. The mean level of toll-like receptor 3 (TLR3) in the hippocampus from CatH-deficient mice was lower than in wild-type mice. In vitro experiments demonstrated that recombinant IFN- $\beta$  suppressed HI-induced microglial cell death and astrocyte proliferation. These observations suggest that CatH plays a critical role in the maturation and stabilization of TLR3, which is necessary for IFN- $\beta$  production. Therefore, impaired TLR3/IFN- $\beta$  signaling resulting from CatH deficiency may induce microglial cell death and astrogliosis/gliar scar formation in the hippocampus following HI injury, leading to suppression of hippocampal atrophy.

研究分野：神経化学

キーワード：グリオシス カテプシンH ミクログリア Toll様受容体3 インターフェロン- $\beta$

### 1. 研究開始当初の背景

脳損傷に伴って生じるアストログリオーシスがどのように形成され、脳機能の回復にどのように関与するのかを理解することは、損傷脳の機能再生・回復技術の開発にとって不可欠である。しかし、不明な点が多いのが現状である。申請者は、リソソーム性プロテア

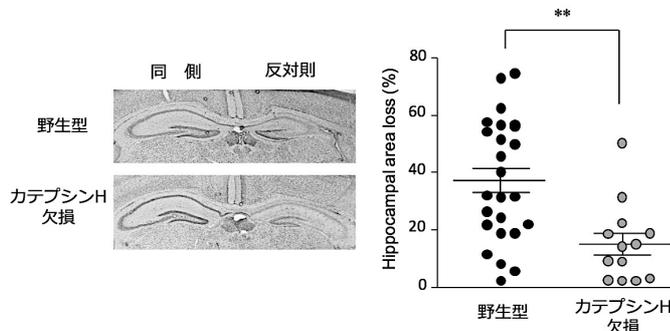


図1 低酸素-脳虚血に伴う海馬の萎縮

ーゼの一種であるカテプシンHを欠損させたマウスにおいて、低酸素/脳虚血により著明なニューロン死と高度なアストログリオーシスが生じ、脳萎縮は軽度であることを見出した。一方、野生型マウスでは、低酸素/脳虚血により著明な脳萎縮が生じた (図1)。

### 2. 研究目的

カテプシンHは正常脳では血管内皮細胞に局在しており、低酸素/脳虚血後は活性化ミクログリアに発現増大が認められた。さらに先行研究と予備解析より、カテプシンH欠損によるミクログリアからのインターフェロン-β(IFN-β)産生分泌低下が、高度なアストログリオーシスを引き起こす要因となるという着想に至った。そこで本研究は、「カテプシンHを切り口」とし、ミクログリアのToll様受容体3(TLR3)-IFN-βシグナリングを介したアストログリオーシス制御機構を明らかにすることを目的とする。さらに、損傷脳の機能再生・回復技術の開発に繋がる物質的基盤を確立することを目的に行った。

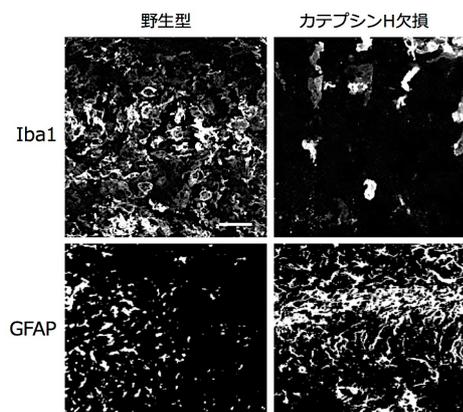


図2 カテプシンH欠損によるミクログリアの細胞死とアストロサイトの過剰活性化

### 3. 研究方法

(1) 野生型ならびにカテプシンH欠損マウスに低酸素/脳虚血を負荷し、海馬における抗Iba1抗体ならびに抗GFAP抗体を用いた免疫染色を行った。さらに、海馬可溶分画における抗TLR3抗体、抗p-IRF3抗体ならびに抗IRF3抗体を用いたウェスタン解析を行った。

(2) カテプシンH siRNA導入により実験的脳虚血により誘発されるミクログリア細胞死を計測した。また、ミクログリア細胞死に対するIFN-βの作用を解析した。

(3) スクラッチ法により培養アストロサイトの増殖・遊走に対するIFN-βの作用を解析した。

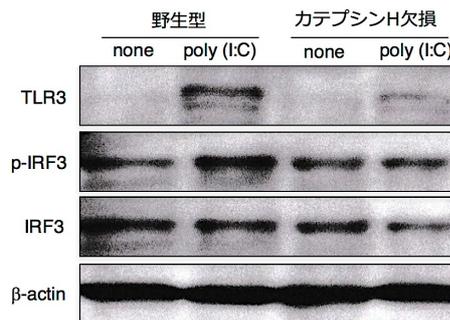


図3 カテプシンH欠損によるTLR3の蛋白質レベルでの低下

### 4. 研究成果

2021年度の研究において、マウス個体を用いた実験により以下の知見を得た。(1)カテプシンH欠損マウスではニューロン死に伴って海馬に集積した貪食性ミクログリアの細胞数は野生型マウスと比べて著しく少なかった。一方、カテプシンH欠損マウスの海馬では今度なアストログリオーシスが生じていた (図2)。(2)カテプシンH欠損ミクログリア/マクロファージではIRFのリン酸化の低下ならびにTLR3のタンパク質レベルでの減少が認められた (図3)。さらに、IFN-β産生分泌が有意に低下して

いた。(3)TLR3ならびにリン酸化STAT1の発現は低酸素/脳虚血を負荷した野生型マウスのミクログリアに認められたが、カテプシンH欠損マウスには認められなかった。

2022年度の研究では主に培養ミクログリアならびにアストロサイトを用いた実験を行い、以下の知見を得た。(1)カテプシンHのsiRNA導入により実験的脳虚血により誘発されるMG6ミクログリアの細胞死は有意に増大した(図4)。(2)リコンビナントIFN-βは実験的脳虚血により誘発されるMG6の細胞死を有意に抑制した。(3)初代培養アストロサイトを用いてアストロサイト増殖・遊走能に対するリコンビナンIFN-βの作用をスクラッチアッセイ法により解析した結果、IFN-βはアストロサイトの増殖・遊走を有意に抑制した。

2023年度は、低酸素/脳虚血負荷後の野生型ならびにカテプシンH欠損マウスの認知機能を比較することでアストログリオシスの脳機能回復に及ぼす影響についての解析を試みた。具体的には、低酸素/脳虚血負荷後、野生型ならびにカテプシンH欠損マウスの自発運動量ならびに新規物体認知テストによる解析を行なった。カテプシンH欠損マウスでは野生型マウスと比較して低酸素/脳虚血負荷に伴う自発運動量の減少ならびに認知機能低下は改善される傾向は認められたが有意な差には至らなかった。

以上の結果より、カテプシンH欠損マウスではニューロン死に伴い高度なアストログリオシスが形成されることを明らかにした。具体的には、野生型マウスでは低酸素/脳虚血負荷に伴いアストログリオシスが軽度で、高度な脳萎縮が生じた。詳細な解析を行った結果、カテプシンH欠損マウスではミクログリア・マクロファージにおけるTLR3の発現が減少していた。このためIRF活性化の低下によりIFN-βの産生分泌が低下し、低酸素/脳虚血負荷に伴い高度なアストログリオシスが形成され、軽度な脳萎縮しか生じなかったと考えられる。さらに、ミクログリアから産生分泌されたIFN-βが、IFN-α/β受容体を介して貪食性ミクログリアの生存維持ならびにアストロサイトの増殖抑制に関与することを突き止めた(図5)。

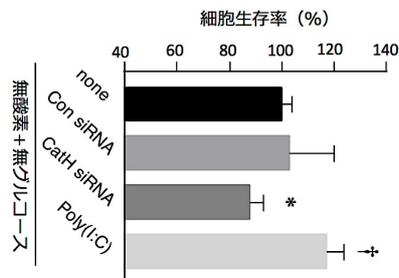


図4 実験的脳虚血によるミクログリア細胞死に対するカテプシンH発現阻害の影響

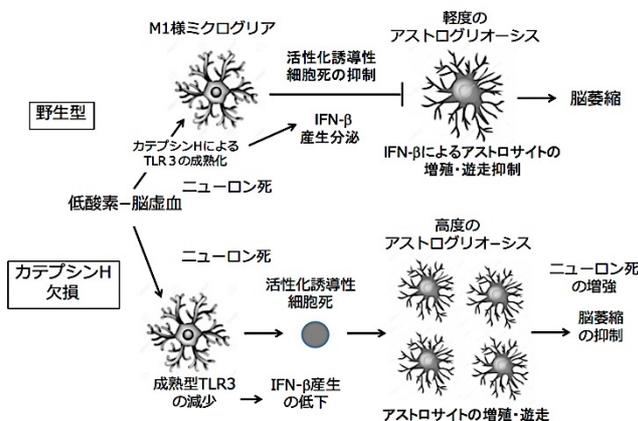


図5 カテプシンH欠損による脳萎縮抑制メカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Liu Yicong, Li Hui, Hu Jiangqi, Wu Zhou, Meng Jie, Hayashi Yoshinori, Nakanishi Hiroshi, Qing Hong, Ni Junjun	4. 巻 59
2. 論文標題 Differential Expression and Distinct Roles of Proteinase-Activated Receptor 2 in Microglia and Neurons in Neonatal Mouse Brain After Hypoxia-Ischemic Injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 717 ~ 730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-021-02594-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nonaka Saori, Kadowaki Tomoko, Nakanishi Hiroshi	4. 巻 154
2. 論文標題 Secreted gingipains from Porphyromonas gingivalis increase permeability in human cerebral microvascular endothelial cells through intracellular degradation of tight junction proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 105282 ~ 105282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2022.105282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Xie Zhen, Meng Jie, Kong Wei, Wu Zhou, Lan Fei, Narengaowa, Hayashi Yoshinori, Yang Qinghu, Bai Zhantao, Nakanishi Hiroshi, Qing Hong, Ni Junjun	4. 巻 21
2. 論文標題 Microglial cathepsin E plays a role in neuroinflammation and amyloid production in Alzheimer's disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aging Cell	6. 最初と最後の頁 e13565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ace1.13565	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hatori Yuta, Kanda Yukina, Nonaka Saori, Nakanishi Hiroshi, Kitazawa Takeo	4. 巻 17
2. 論文標題 ATP13A2 modifies mitochondrial localization of overexpressed TOM20 to autolysosomal pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0276823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0276823	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Erika, Minatozaki Shiyo, Katsuta Yui, Nonaka Saori, Nakanishi Hiroshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Human $\alpha$ -Defensin 3 Inhibits Porphyromonas Gingivalis Lipopolysaccharide-Induced Oxidative and Inflammatory Responses of Microglia by Suppression of Cathepsins B and L	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 15099 ~ 15099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232315099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Akihiro, Kitazawa Takeo, Hatori Yuta, Nakanishi Hiroshi, Watanabe Chie, Takashima Tomoya, Murakami Masahiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Targeting cellular gaps using Janus nanoparticles containing cationic polymers and surfactant lipids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 104-113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2022.01118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ni J, Zhang X, Reinheckel T, Turk V, Nakanishi H.	4. 巻 18
2. 論文標題 Cathepsin H deficiency decreases hypoxia-ischemia-induced hippocampal atrophy in neonatal mice through attenuated TLR3/INF- $\gamma$ signaling.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-021-02227-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka J, Takahashi H, Yano H, Nakanishi H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Generation of CSF-1 independent ramified microglia from leptomeninges in vitro.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cell10010024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Y, Kato H, Nonaka K, Nakanishi H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Stem cells from human exfoliated deciduous teeth attenuate neuropathic tactile allodynia in mice through distinct from sigrec-9/MCP-1-mediated tissue-repairing mechanism.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-99585-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakanishi H., Ni J., Nonaka S., Hayashi Y.	4. 巻 142
2. 論文標題 Microglial circadian clock regulation of microglial structural complexity, dendritic spine density and inflammatory response.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2020.104905	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Liu Y, Li H, Hu J, Wu Z, Meng J, Hayashi Y, Nakanishi H, Qing H, Ni J.	4. 巻 59
2. 論文標題 Differential expression and distinct roles of proteinase-activated receptor 2 in microglia and neurons in neonatal mouse brain after hypoxia-ischemic injury.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 717-730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-021-02594-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nonaka S, Kadowaki T, Nakanishi H.	4. 巻 154
2. 論文標題 Secreted gingipains from Porphyromonas gingivalis induce increased permeability of human cerebral microvascular endothelial cells through intracellular degradation of tight junction proteins.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 105282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2022.105282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Xie Z, Meng J, Kong W, Wu Z, Lan F, Narengaowa, Hayashi Y, Qinghu Yang Q, Bai Z, Nakanishi H, Qing H, Ni J.	4. 巻 21
2. 論文標題 Microglial cathepsin E plays a role in neuroinflammation and amyloid production in Alzheimer's disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aging Cell	6. 最初と最後の頁 e13565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ace1.13565	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大森朱莉、大本凜、野中さおり、中西博
2. 発表標題 歯周病菌LPSによりミクログリアにおいて産生・分泌されるサイトカイン類の網羅的解析
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 崎紫陽、井上瑛里加、野中さおり、中西博
2. 発表標題 ヒト beta-ディフェンシン-3 の歯周病菌LPSにより誘発されるミクログリアの酸化ストレスならびに炎症反応に対する抑制作用
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上瑛里加、湊崎紫陽、野中さおり、中西博
2. 発表標題 ヒト beta-ディフェンシン-3 の歯周病菌LPSにより誘発されるミクログリアの酸化ストレス・炎症反応に対する抑制メカニズム
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	野中 さおり  (Saori Nonaka)  (40767787)	安田女子大学・薬学部・講師    (35408)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------