

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659430

研究課題名(和文) 制御性ミクログリアの誘導法の確立および神経疾患への治療応用

研究課題名(英文) Induction of regulatory microglia and its therapeutic development

研究代表者

水野 哲也 (Mizuno, Tetsuya)

名古屋大学・環境医学研究所・准教授

研究者番号：70335008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：脳内の免疫機能を受け持つミクログリアは、神経障害作用と神経保護作用との2面性を有し、種々の神経変性疾患、炎症性脱髄疾患に関与している。本研究において、制御性ミクログリアというべき神経保護作用を示すミクログリアの分化誘導法を検討した。その結果、ミクログリアの増殖分化誘導作用を有するIL-34と、炎症性サイトカインであるTGF-betaを加え7日間培養を行うことにより、アミロイドベータ蛋白神経毒性に対して神経保護作用を示すミクログリアを誘導することができた。

研究成果の概要(英文)：Microglia have a biphasic neurotoxic or neuroprotective role in the pathogenesis of various neurodegenerative diseases. In this study, we examined the method for microglial differentiation into neuroprotective cells. We clarified that treatment of IL-34 and TGF for 7 days induces neuroprotective property in microglia, which exert neuroprotection against amyloid beta toxicity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 神経内科学

キーワード：ミクログリア IL-34 TGF 神経保護作用

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患、炎症性脱髄疾患において変性神経細胞の周囲に活性化ミクログリアの集簇が認められる。ミクログリアは TNF- α 、IL-1 β 、Interferon- γ 等の炎症性サイトカイン、活性酸素、グルタミン酸を産生し、慢性炎症を惹起するとともに神経細胞に対して障害的に働く。一方で、ミクログリアは神経細胞の状態をチェックし、神経栄養因子や IL-10 などの抗炎症性サイトカイン、抗酸化酵素を産生し神経保護作用を有する。さらに、ミクログリアは、その貪食能により変性神経細胞やアルツハイマー病の病因蛋白であるアミロイド β (A β) を除去し脳内環境を維持している。ミクログリアの貪食作用には、炎症を伴う場合と伴わない場合が存在し、炎症を伴わない貪食は、神経細胞保護作用に働いている。従って、神経障害性ミクログリアの機能を抑制し、神経保護的に作用する制御性ミクログリアを誘導できれば種々の神経変性疾患の治療に応用できる。我々は、これまでに自然免疫系を賦活する CpG (Toll like receptor 9 ligand)あるいは IL-34 投与によりミクログリアが、神経保護作用を発揮し、A β オリゴマー神経毒性に対して有効であることを示し (Doi et al. Am. J. Pathol. 2009, Mizuno et al. Am. J. Pathol. 2011)、さらに、培養ミクログリアが、GM-CSF、TNF- α の添加により樹状細胞様に分化すること、炎症反応に関与するヘパリン結合性成長因子ミドカインを標的とした RNA アプタマーが樹状細胞の機能を抑制する制御性樹状細胞の分化に有用であることを示した。

2. 研究の目的

脳内の免疫機能を受け持つミクログリアは、神経障害作用と神経保護作用との2面性を有し、種々の神経変性疾患、炎症性脱髄疾患において慢性炎症の主体となり神経障害性に作用する。ミクログリアの神経保護作用は、主に炎症を伴わない貪食作用、抗酸化酵素・

抗炎症性サイトカイン・神経栄養因子産生によるものと考えられる。本研究では、制御性ミクログリアというべき神経保護作用を発揮するミクログリアの分化誘導法を、種々のサイトカイン、ケモカイン等の液性因子を用いて確立する。

3. 研究の方法

(1) 制御性ミクログリアの分化誘導法の確立
マウス初代混合グリア細胞より分離したミクログリアを用いて、IL-34 を軸として、種々のサイトカイン (IL-10、TGF)、ケモカイン、神経栄養因子等の液性因子による制御性ミクログリアの分化誘導法を確立する。制御性ミクログリアは、リポ多糖 (LPS) による活性化を受けず、抗炎症性サイトカイン、抗酸化酵素を産生し、炎症を伴わない貪食能を獲得することを目標とする。

ミクログリアは、レプセル(細胞回収用温度応答性細胞培養皿)に播種し、我々が確立したミクログリアを樹状細胞に分化させる方法を参考に、IL-34 存在下で7日間培養し、さらに24時間 CpG を添加して培養する。この方法を基準にして、各種サイトカイン (IL-10、TGF- β)・ケモカイン (M-CSF、GM-CSF) を添加し、至適分化条件を検討する。培養後、培養温度を下げることにより細胞に障害を与えることなくミクログリアを回収し、フローサイトメーターにより炎症関連の表面マーカーや細胞内サイトカイン・活性酸素発現を検討する。さらにセルソーターを用い、目的とすべき制御性ミクログリアを分取し、炎症および抗炎症関連遺伝子・蛋白を解析する。

(2) 制御性ミクログリアの神経保護作用の検討

神経細胞・制御性ミクログリア共培養を用いて、LPS 刺激、A β オリゴマー神経毒性に対する神経保護作用を検討する。

4. 研究成果

(1) 制御性ミクログリアの分化誘導法の確立

ミクログリアの増殖分化誘導作用を有する IL-34 を主として、CpG および抗炎症性サイトカインである IL-10、TGF- β を加え 7 日間培養を行った。対照群として同様の増殖分化作用を持つ M-CSF および炎症を惹起する LPS、GM-CSF 群とを比較した。その結果、IL-34+TGF- β 群においては、炎症反応を惹起することなく、過度の増殖も抑制され、神経細胞との共培養系において A β オリゴマー神経毒性に対して神経保護作用を示した。IL-34+TGF- β +IL-10 群は増殖抑制が強く十分な神経保護作用は得られなかった。IL-34+CpG 群も神経保護作用が認められたが、IL-34+TGF- β 群ほどの作用は得られなかった。M-CSF+TGF- β 群は IL-34+TGF- β 群ほどの神経保護作用は認められなかった。LPS 群、GM-CSF 群は炎症反応が強く神経細胞に対し障害性に作用した。用量検討より、IL-34 は 75 ng/ml、TGF- β は、10 ng/ml が至適濃度であった。IL-34+TGF- β 群の分化について、表面抗原の解析を検討中である。

(2) ミクログリアの神経保護作用における IL-34、TGF- β の有用性の検討

我々は、これまでに IL-34 が、A β オリゴマー神経毒性に対してミクログリアを介した神経保護作用を有し、アルツハイマー病モデルマウスにおいて IL-34 の脳室内投与が認知機能、病理学的所見の改善を示すことを明らかにした。その機序は、主に抗酸化酵素 HO-1 および A β 分解酵素 Insulin degrading enzyme(IDE)の誘導によるものである。今回、神経細胞、ミクログリアの培養細胞において、ミクログリアに IL-34 を投与すると、TGF- β が誘導され(図1) また、TGF- β を加えると IL-34 によるミクログリアの増殖効果が抑制されることが示された(図2)。さらに、A β オリゴマー神経毒性に対して、IL-34、TGF- β がともに作用することにより神経保護に関与していることが明らかとなった(図3)(発表論文2)。

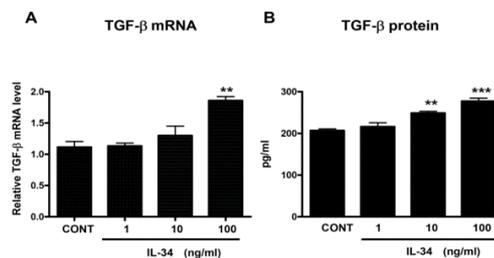


図1.

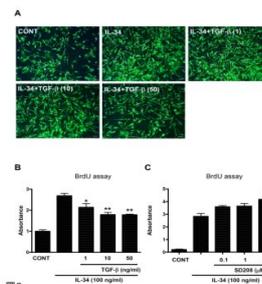


図2.

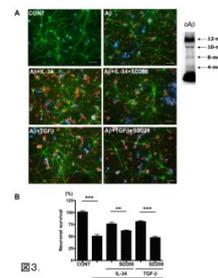


図3.

(3) IL-34、TGF- β の末梢投与の有効性の検討
当初、確立した分化誘導因子をナノカプセルに充填し、カプセル表面上にミクログリアの貪食受容体リガンド、脳移行シグナルを付与することで脳内送達を検討する予定であったが、ナノカプセルに脳血管内皮細胞を通過できる狂犬病由来脳移行ペプチド RVG 等の脳移行シグナルを付与することは困難であった。現在、IL-34、TGF- β に直接、RVG を結合させ、In vitro において、トランスウェルのポリカーボネート膜上面に脳血管内皮細胞を培養した薬物脳内移行性モデルを用いて、移行性を検討している。In vivo では、さらにこの分子を蛍光標識した後、正常マウスに経静脈および経動脈投与し、1日、5日、10日後に、組織標本の免疫染色により、脳移行性と制御性ミクログリアの誘導の有無を検討する予定である。

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 4 件)

(1)Parajuli B, Sonobe Y, HORIUCHI H, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. Oligomeric amyloid induces IL-1 processing via production of ROS: implication in Alzheimer's disease. Cell Death and Disease 4, 2013, e975 DOI: 10.1038/cddis.2013.503.

(2)Ma D, Doi Y, Jin S, Li E, Sonobe Y, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. TGF-induced by interleukin-34-stimulated microglia regulates microglial proliferation and attenuates oligomeric amyloid neurotoxicity. Neuroscience letters, 529(1), 2012, 86-91 DOI: 10.1016/j.neulet.2012.08.071.

(3)Li E, Noda M, Doi Y, Parajuli B, Kawanokuchi J, Sonobe Y, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. The neuroprotective effects of milk fat globule-EGF factor 8 against oligomeric amyloid toxicity. Journal of neuroinflammation, 9, 2012,148 DOI: 1186/1742-2094-9-148

(4)Parajuli B, Sonobe Y, Kawanokuchi J, Doi Y, Noda M, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. GM-CSF increase LPS-Induced production of proinflammatory mediators via upregulation of TLR4 and CD14 in murine microglia. Journal of neuroinflammation, 9, 2012,268 DOI: 10.1186/1742-2094-9-268.

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 水野哲也: アルツハイマー病の慢性炎症機序におけるミクログリアの役割 第32回日本認知症学会 2013.11. (松本)

(2) PARAJULI Bijay、水野哲也、竹内英之、錫村明生: 可溶性 A β オリゴマーによるミクログリアの神経傷害作用. 第 25 回日本神経免疫学会学術集会, 2013.11.(下関)(口演)

(3) MIZUNO Tetsuya, NODA Mariko, LI Endong, DOI Yukiko, PARAJULI Bijay, KAWANOKUCHI Jun, SONOBE Yoshifumi, TAKEUCHI Hideyuki, SUZUMURA Akio: The neuroprotective role of microglia treated with milk fat globule-EGF factor 8. 11th International Congress of Neuroimmunology, 2012.11. (Boston,

USA) (ポスター)

(4) 水野哲也、野田万理子、土井由紀子、錫村明生: Milk fat globule-EGF factor 8 の Abeta 神経毒性に対する作用の検討. 第 53 回神経学会学術集会, 2012. 5. (東京)(ポスター)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件) effects of

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

水野 哲也 (Mizuno Tetsuya)

研究者番号: 70335008