

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790080

研究課題名（和文）P2Y12受容体を介した突起伸展によるミクログリア活性化シグナル複合体形成の解明

研究課題名（英文）Formation of signaling complex in P2Y12 receptor-mediated microglial chemotaxis.

研究代表者

齊藤 秀俊 (Saitoh Hidetoshi)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：90444794

研究成果の概要（和文）：

数種のATP受容体について、蛍光タンパク質との融合受容体タンパク質を発現するベクターを作成し、Iba1遺伝子上流配列をプロモータとして用いたレンチウイルスベクターによってこれら機能タンパク質を初代培養系・脳組織培養系のミクログリアに発現させる系を確立した。これによって生体組織内でミクログリア特異的に遺伝子導入するための基本的なツールを開発したことになる。また、P2Y12受容体の活性化とミクログリアの活性化様式との関連性について、初代培養ミクログリアのP2Y12受容体の活性化によってCCL2、CCL3の産生・放出が誘導されることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

This study established a method which achieved effective transgene expression in primary microglia from neonatal rat forebrain using lentiviral vectors possessing iba1 promoter and transgenes. In addition, this study revealed that two chemokine, CCL2 and CCL3, are upregulated by activation of P2Y12 receptor in primary microglia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経薬理学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：神経生物学、ATP受容体、ミクログリア

## 1. 研究開始当初の背景

ミクログリアは中枢神経系の免疫担当細胞と呼ばれており、病原体感染や神経細胞死など異常が生じた場合は、細胞の形を大きく変え、活性化型となる。活性化したミクログリアは増殖能や異常部位への遊走能、変性細胞や病原体に対する貪食能といった形態学的な

活動を速やかに誘導する。また、炎症性サイトカインの産生により炎症反応に寄与する一方で、栄養因子や抗炎症性サイトカインの産生によって損傷組織の再生を促すという二面性も持ち合わせている。神経変性疾患とミクログリア過剰活性化の関連性は古くから指摘され、行き過ぎたミクログリアの活性化は様々な中枢性疾患に繋がると考えられている。

研究代表者は、末梢神経損傷による神経因性疼痛発現に際し、脊髄内ミクログリアの増殖・活性化が起こり、この脊髄のミクログリアに発現する P2Y<sub>12</sub> 受容体の阻害によって神経因性疼痛の発症が抑制されることを報告した。近年、多光子励起顕微鏡を用いたリアルタイム観察により、ミクログリアが脳内の物理的傷害部位に向かって細胞突起を伸ばす現象が報告されている(図1)。この現象は ATP の局所投与によって模倣され、P2Y<sub>12</sub> の遺伝子欠損マウスではみられないことから、脳内ミクログリアは自身の有する P2Y<sub>12</sub> 受容体を介して、傷害を受けた細胞から漏出した ATP を感知し、脳の傷害部位を感知すると報告されている。つまり、中枢組織の傷害時には、細胞外に放出されるヌクレオチドおよびこれを受感する P2 受容体を介して、ミクログリア活性化の様式が空間的・時間的に制御されると予想される。

研究代表者は神経因性疼痛におけるミクログリアの P2Y<sub>12</sub> 受容体の役割は、末梢神経の損傷を感知し、その後のミクログリアの活性化へのシグナルのゲート機構として働くことと推測し、このメカニズムにはミクログリアの伸展突起を利用した、シグナルタンパク質の局在変化が関わっていると考えた。現在までに、走化性を持つ細胞の極性形成時には様々なシグナルタンパクが方向性を持って細胞膜上に局在することが知られているが、傷害を認知したミクログリアの突起先端においてミクログリア活性化関連因子が局在することを示した例や、局所へのシグナルタンパク質の集積を経時的な可視化によって理解するという研究はなされていない。

## 2. 研究の目的

ミクログリアがどのように細胞外環境を察知し、どのように活性化して、細胞応答の発現に至るのか、その機構を解明することは様々な神経変性疾患の解明・治療法を考える上でも重要な課題である。本研究はミクログリアの活性化機構の解明を細胞内のナノスケールの反応場を主眼に置いて解析することを主な目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 現在知られている唯一の初代培養ミクログリアへ高効率遺伝子導入系はレンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入系である。そこでまず、ミクログリア特異的発現を示すレンチウイルスベクターの開発

を行う。Iba1 と呼ばれる遺伝子は中枢組織内でミクログリア特異的に発現するタンパク質として知られており、これら遺伝子プロモーターはミクログリア内でのみ有効に働き、プロモーター下流の配列の転写を促進する。そこで、ミクログリア特異的発現を示す可視化プローブとして、これら Iba1 プロモーター下流に、蛍光標識タンパク配列を組み込んだレンチウイルスベクターを作製する。その後、このレンチウイルスベクターを初代培養ミクログリア及びマウスミクログリア系培養細胞 BV-2 に感染させ、目的蛍光プローブの発現効率をチェックし、ミクログリアでのみ発現することを確認する。

(2) ADP の濃度勾配を作製可能な特殊な培養チャンバーを利用し、ミクログリアが高濃度 ADP に向かって細胞突起を進展させる模様を共焦点レーザー顕微鏡にて経時的に観察する。そのご ATP 受容体の伸長突起内における局在変化を解析する。同様に神経因性疼痛等の病態とミクログリアの形態変化についても検討する。

(3) P2Y<sub>12</sub> 受容体の活性化とミクログリアの活性化様式との関連性について、炎症関連物質である CCL2、CCL3、TNF $\alpha$  の産生・放出をリアルタイム RT-PCR 法や ELISA を用いて定量する。

組換え DNA 実験については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」及び「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」等の法令、並びに「九州大学遺伝子組換え実験指針」、「九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則」及び「九州大学遺伝子組換え実験安全管理細則」を遵守し、事前に機関実験計画書への承認を受けた。

動物実験については、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」、「九州大学動物実験規則」及び「九州大学動物実験規則実施細則」を遵守し実験計画書の承認を受けてから実施した。

#### 4. 研究成果

(1) 初代培養ミクログリアを用い、細胞突起進展時のミクログリア発現分子の局在変化の可視化のために、Iba1遺伝子上流配列をプロモーターとして用いたレンチウイルスベクターの構築を行った。ラット新生児より得た大脳組織細胞の混合培養系にIba1プロモーター下流にGFPを発現するレンチウイルスベクターを用いたところ、多種の細胞の混合培養系の中で抗Iba1抗体によって染めだされるIba1陽性細胞選択的に緑のGFPの蛍光シグナルが観察された(図1)。

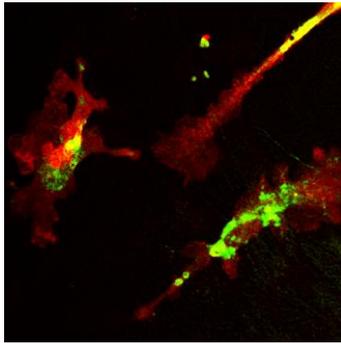


図1 大脳組織細胞混合培養系において抗Iba1抗体染色(赤)とIba1プロモーターによって発現誘導されたGFPの蛍光(緑)

また、蛍光タンパク質以外にも、部位特異的に遺伝子発現制御する遺伝子改変動物で頻繁に用いられているcre-loxpシステムに注目し、Iba1遺伝子上流配列をプロモーターとしてcre組み換え酵素を発現するベクターを構築した。このベクターをEGFPレポーターマウスの脳から得られた培養組織切片に微量注入したところ、培養6日後からEGFP陽性細胞が観察されることを見出した(図2)。この時、その他のグリア細胞であるアストロサイトのマーカータンパクとして知られるGFAPの陽性細胞以外でEGFPの蛍光シグナルが観察されたことから、今回開発したベクターを使うことにより生体に極めて近い組織培養という条件においてもミクログリア特異的な遺伝子発現制御技術を確認することが出来た。

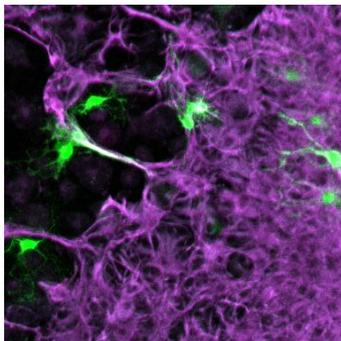


図2 大脳組織切片培養系において抗GFAP抗体染色(紫)とIba1プロモーターによって発現誘導されたGFPの蛍光(緑)

さらに、数種のATP受容体(P2X4, P2Y6, P2Y12)についても蛍光タンパク質との融合受容体タンパク質を発現するベクターを作成し、レンチウイルスベクターによってこれら機能タンパク質を初代培養ミクログリアに高発現させる系を確立した。ミクログリアにおいてP2X4受容体は主に細胞内のオルガネラ膜に存在する観察像が得られた(図3)のに対し、P2Y12受容体は形質膜に豊富に局在することが明らかになった。

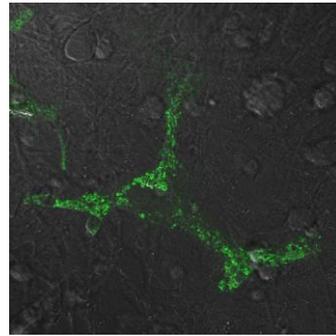


図3 大脳組織細胞混合培養系において、Iba1プロモーターによって発現誘導されたP2X4受容体とGFPの融合タンパク質由来の蛍光(緑)

(2) ADPの濃度勾配を作製するために微細なスリット状構造をもったシリコン製の培養器具を用い初代培養ミクログリアをADP濃度勾配下流においたところ、ミクログリアは細胞の突起をADPの高濃度側へ伸ばし細胞の極性化を引き起こした(図4)。スリットの外側の細胞では細胞体の大部分がADPに対する走化性応答を引き起こし細胞の極性を判別することが難しい(図5)。また、この時一般的な培養細胞の免疫染色法を組み合わせたとところ遜色なく細胞内分子の染色を行うことが出来た。

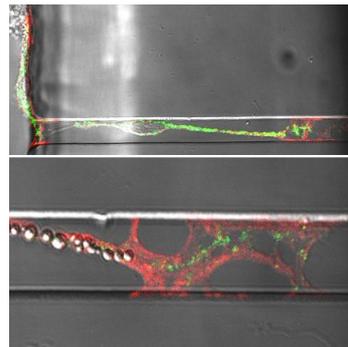


図4 ADP濃度勾配によって突起の伸展形態をしめたミクログリアを抗ox42(赤)、抗P2X4抗体(緑)で染色した。

ADPに向かって遊走するミクログリア細胞ではP2X4受容体は細胞内のオルガネラ膜のみならず、細胞突起のその先端部位にも存在することが確認された。

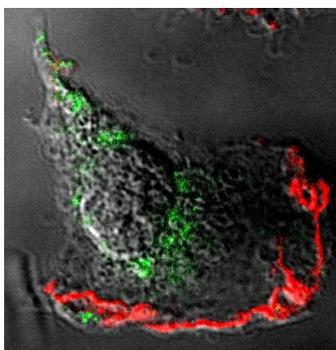


図5 微細スリット外部でADP濃度勾配によって細胞遊走形態をしめしたミクログリアを抗 $\alpha$ 42(赤)、抗P2X4抗体(緑)で染色した。

(3) P2Y<sub>12</sub>受容体の活性化とミクログリアの活性化様式との関連性について、炎症関連物質であるCCL2、CCL3の産生・放出を解析したところ、初代培養ミクログリアにおいてCCL2、CCL3の産生・放出がP2Y<sub>12</sub>受容体の活性化によって誘導されることを見出した(図6、7)。

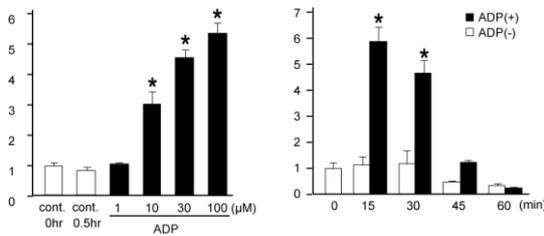


図6 初代培養ミクログリアにADPを処置した後のCCL3 mRNAの発現変化をリアルタイムPCR法によって測定した(縦軸:変化倍率)。

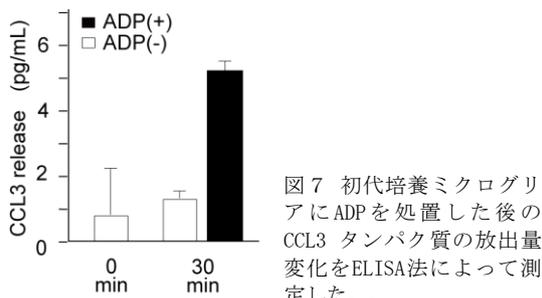


図7 初代培養ミクログリアにADPを処置した後のCCL3タンパク質の放出量変化をELISA法によって測定した。

これまでにミクログリアからの炎症性物質の産生・放出には高濃度の細胞外ATPによるP2X<sub>7</sub>受容体の活性化が必要であるという認識が一般的であったが、ATPの分解産物であるADPをアゴニストとし、より低濃度で活性化されるP2Y<sub>12</sub>受容体によってもミクログリアの炎症性応答が見られることを明らかにした。この発見は激しいATP漏出・放出を伴わないような組織傷害時にも、P2Y<sub>12</sub>受容体を介したミクログリアの炎症性応答が引き起こされる可能性を示しており、P2Y<sub>12</sub>受容体を標的とした創薬の可能性を明確に示すものである。

## 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 14 件)

- ① Kataoka A, Koga Y, Uesugi A, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K, "Involvement of vasodilator-stimulated phosphoprotein in UDP-induced microglial actin aggregation via PKC- and Rho-dependent pathways", *Purinergic Signaling*, 2011(in press)
- ② Kuboyama K, Harada H, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Ushijima K, Inoue K., "Astrocytic P2Y(1) receptor is involved in the regulation of cytokine/chemokine transcription and cerebral damage in a rat model of cerebral ischemia.", *J Cereb Blood Flow Metab.*, 2011(in press)
- ③ Biber K\*, Tsuda M\*, Tozaki-Saitoh H\*, Tsukamoto K, Toyomitsu E, Masuda T, Boddeke H, Inoue K., "Neuronal CCL21 up-regulates microglia P2X4 expression and initiates neuropathic pain development." *EMBO J*, 30(9):1864-73, 2011 \*equal contribution
- ④ Tsuda M, Kohro Y, Yano T, Tsujikawa T, Kitano J, Tozaki-Saitoh H, Koyanagi S, Ohdo S, Ji R-R, Salter MW, Inoue K, "JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation and neuropathic pain maintenance in rats." *Brain*, 134:1127-39, 2011
- ⑤ Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K, "Purinergic regulation of microglia", 日本薬理学雑誌, 136(2):93-7, 2010
- ⑥ Maeda M, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Kiyama H, "Nerve injury-activated microglia engulf myelinated axons in a P2Y<sub>12</sub> signaling-dependent manner in the dorsal horn.", *Glia.*, 58(15):1838-46, 2010
- ⑦ Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, "Pain and purinergic signaling.", *Brain Res Rev.*, 63(1-2):222-32, 2010
- ⑧ Shiratori M\*, Tozaki-Saitoh H\*, Yoshitake M, Tsuda M, Inoue K, "P2X<sub>7</sub> receptor activation induces CXCL2 production in microglia through NFAT and PKC/MAPK pathways." *J Neurochem.*, 114(3):810-9, 2010 \*equal contribution
- ⑨ Tsuda M, Kuboyama K, Inoue T, Nagata K, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, "Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X<sub>4</sub> receptors in acute and chronic pain assays.", *Mol. Pain*, 11;5(1):28, 2009
- ⑩ Masuda J, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, "Intrathecal delivery of PDGF produces tactile allodynia through its receptors in spinal microglia" *Molecular Pain*, 5:23, 2009
- ⑪ Nagata K, Imai K, Yamashita T, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K, "Antidepressants inhibit P2X<sub>4</sub> receptor function: a possible involvement in

neuropathic pain relief.” *Mol. Pain*, 23;5:20, 2009

- ⑫ Tsuda M, Masuda T, Kitano J, Shimoyama H, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, “IFN- $\gamma$  receptor signaling mediates spinal microglia activation driving neuropathic pain.” *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106(19):8032-7, 2009
- ⑬ Tsuda M, Toyomitsu E, Kometani M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, “Mechanisms underlying fibronectin-induced upregulation of P2XR expression in microglia: distinct roles of PI3K-Akt and MEK-ERK signaling pathways.” *J Cell Mol Med.*, 13(9B):3251-9, 2009
- ⑭ Fujita T, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, “P2Y(1) receptor signaling enhances neuroprotection by astrocytes against oxidative stress via IL-6 release in hippocampal cultures.” *Glia*, 57(3):244-57, 2009

[学会発表] (計 3 件)

- ① Tozaki-Saitoh Hidetoshi, "P2Y12 receptor in spinal microglia are required for neuropathic pain", International symposium on Purinergic signalling in New strategy of drug discovery, Joint with JSPS Core-to-Core Program, A satellite symposium for IUPS 2009, 7/23-7/25, 2009, Fukuoka
- ② 齊藤秀俊、上田和明、津田誠、井上和秀、 “神経障害性疼痛発症時の脊髄 CCL3 の関与”、第 8 3 回日本薬理学会年会 (2010、3. 16-18 大阪)
- ③ 齊藤秀俊、津田誠、井上和秀、 “ミクログリアの食食時における一過性のカルシウム上昇” 第 8 3 回日本薬理学会年会 (2010、3. 16-18 大阪)

[図書] (計 2 件)

- ① Inoue K, Koizumi S, Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, “Chapter 12 P2Y(6)-Evoked Microglial Phagocytosis.”, *Int Rev Neurobiol.*, 85:159-63, 2009
- ② 井上和秀、津田誠、齊藤秀俊, “脊髄ミクログリアの P2 プリン受容体と神経障害性疼痛”、生体の科学「伝達物質と受容体」特集号 60, 506-508, 2009

[その他]

ホームページ等

<http://yakkou.phar.kyushu-u.ac.jp/>

5. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 秀俊 (Saitoh Hidetoshi)

研究者番号 : 90444794