

機関番号：13501

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18077011

研究課題名（和文）

ATPセンサーP2受容体-メカノセンサー相互作用による情報制御に関する研究

研究課題名（英文）

Information processing by the interaction of the ATP-sensors and mechano-sensors

研究代表者

小泉 修一 (KOIZUMI SCHUICHI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：10280752

研究成果の概要（和文）：

ミクログリアは傷害神経細胞から漏出するATPをATPセンサー（P2Y12）で感知し、傷害部位へ遊走する。このとき、傷害部位から eat-me signal “UDP” が放出されると、ミクログリアはこれを貪食センサー（P2Y6）で感知し、傷害細胞や断片を貪食により脳内から除去する。ミクログリアは、遊走性から貪食性へミクログリアのATPセンサーの変化を伴ったモーダルシフトすることにより、脳内環境の維持を行っていた。

研究成果の概要（英文）：

Microglia sense ATP leaked from damaged neurons by the ATP-sensor P2Y12, and migrate toward the injured site. If they meet UDP, eat-me signal, there, microglia start to phagocytose the damaged cells or debris to remove them from the brain. The UDP sensor is P2Y6. Microglia change their mode from migration to phagocytosis (modal-shift), which was associated with down- and up-regulation of P2Y12 and P2Y6, respectively. By such a modal-shift, microglia maintain the homeostasis of the CNS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	11,700,000	0	11,700,000
2007年度	12,400,000	0	12,400,000
2008年度	13,400,000	0	13,400,000
2009年度	12,300,000	0	12,300,000
2010年度	12,400,000	0	12,400,000
総計	62,200,000	0	62,200,000

研究分野：新領域

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理

キーワード：ミクログリア、貪食、アストロサイト、神経細胞傷害、ATP、UDP、ATPセンサー、モーダルシフト

1. 研究開始当初の背景

生体は外部環境の変化を瞬時に感知して最適な応答、環境適応を行っている。そのために、種々のセンサーを有するが、これらセンサーは、センサー間相互作用によりそのセ

ンサー機能が変化する所謂「モーダルシフト」を呈する。脳内で環境変化を最初に察知する細胞群は、ミクログリアと呼ばれる免疫担当細胞である。ミクログリアは、脳内で発生した炎症、神経傷害等のあらゆる変化を感

知し、種々の的確な応答を呈する。しかし、ミクログリアがセンサー機能を変化させ、これら多種・多様の応答を的確に感知し、脳内環境を維持するメカニズムは不明のままである。

2. 研究の目的

ミクログリア機能制御で最も重要な役割を果たすセンサーが、ATP センサーであるが、ミクログリアは複数の ATP センサーを有する。この ATP センサー間相互作用による、「ATP センサーのモーダルシフト」の様式を明らかにすることにより、ミクログリアが種々の環境を感知し、異なる応答性を呈して脳内環境の整備を行うメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

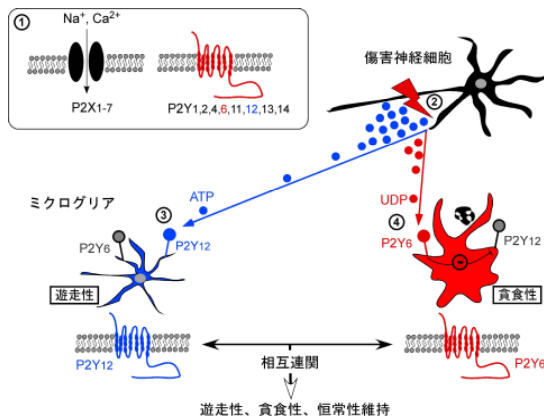
ラットミクログリア及びアストロサイトの初代培養は、既報に従った (Koizumi et al., Nature 2007)。ミクログリアの遊走はダンケモタキスチャンバーを、貪食能は、蛍光ビーズを取り込ませ、これを FACS 及び顕微鏡下での目視で定量した。ATP 及び UDP (UTP) の放出量は、*in vivo* マイクロダイアリシスにより回収した灌流液を、HPLC で定量した。カイニン酸 (KA) による、脳障害モデルは、40mg/kg をラット腹腔内に投与することにより作成した。P2Y₆ 受容体の制御は、薬理的 (MRS6739) 及び siRNA による RNA 干渉法により行った。カルシウムイメージング及び免疫組織学的解析には、共焦点レーザー顕微鏡 (FMV1000、オリンパス) を用いた。

4. 研究成果

脳内グリア細胞が果たす様々な新しい役割が注目されるようになってきている。その中でも、脳内免疫担当細胞と考えられているミクログリアは、種々の脳の病態時に活性化され、

増殖し、様々な応答を呈することから、種々の脳疾患と密接な関係にあると考えられており、その機能調節には、ATP など細胞外ヌクレオチドとそのセンサー (ATP センサー又は P2 受容体、図中①) が中心的な役割を果たす。例えば、神経細胞が損傷すると、その周辺部位に活性化したミクログリアの集積が認められるが、これは、神経細胞が傷害されると細胞内に存在する高濃度 (5 mM) ATP が漏出し (図中②)、これが化学誘引物質として働き、ミクログリアの P2Y₁₂ 受容体を介して化学走性を誘発すること (Honda et al., J. Neurosci., 2001) に起因している (図中③)。損傷細胞周辺に集合したミクログリアは、神経細胞がもはや修復不可能であると判断すると、傷害された神経細胞やその残片を貪食によって脳内から除去し、脳内環境を整える。しかし、これまでミクログリアが神経細胞のダメージの程度をどの様に見分け、またどの様なシグナルで貪食を開始するのかがよくわかっていなかった。今回我々は、ラットの海馬神経細胞を kainic acid (KA) で傷害すると、ATP だけでなく UDP (uridine 5'-diphosphate) が放出されることを *in vitro* 及び *in vivo* の実験系で明らかにした。また傷害された海馬 CA3 領域では、UDP の特異的センサー『P2Y₆ 受容体』の発現がミクログリア特異的に亢進していた。ミクログリアを UDP で刺激すると、P2Y₆ 受容体依存的にミクログリアの貪食が即時的に開始され、これは傷害された神経細胞から漏れ出た UDP によっても模倣されることが *in vitro* 及び *in vivo* で確認できた (図中④)。ATP も UDP も神経細胞の傷害を周辺細胞に知らせる重要な分子として働き、共にミクログリアのダイナミックな動きを制御している。しかし ATP は P2Y₁₂ 受容体を介して化学走性を制御するが貪食能には全く影響せず、逆に UDP は P2Y₆

受容体を介して食食能を亢進させるが化学走性には関与していなかった。このように、ミクログリアは、細胞外ヌクレオチド ATP 及び UDP をそれぞれ厳密に見分け、それぞれの分子に応じた独立した応答を行うことにより、病態時の脳機能を極めて巧妙に制御していることが明らかとなった。



図の解説 P2Y12-P2Y6 モーダル変化によるミクログリアの遊走性から食食性への変化。細胞内のエネルギー通貨である ATP は、細胞外に放出又は漏出されて、細胞間情報伝達物質として機能する。ATP 等の細胞外ヌクレオチドを認識する「ATP センサー」は P2 受容体と呼ばれ、イオン透過型 P2X 受容体及び GPCR 型 P2Y 受容体それぞれ 7 及び 8 種類、計 15 種類からなる (図中①)。遊走性 ATP センサー P2Y12 は、傷害神経細胞から放出される ATP (図中②) を認識して、ミクログリアを傷害部位へと遊走させる (図中③)。この過程で、ミクログリアは食食センサー P2Y6 を高感度センサーにモーダルシフトさせ (空間モーダルシフト)、傷害部位から放出される UDP (図中④) を認識して食食性ミクログリアへと変身する (図中④)。また、同時に遊走性 ATP センサー P2Y12 を低感度センサーに変身させ、遊走性を消失させる。このように、脳内免疫担当細胞であるミクログリアは、ATP センサー間相互連関により脳傷害時の細胞外環境

変化を巧みに認識し、脳の恒常性維持に大きく寄与していることが示された。

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] (査読有 計 16 件)

1. Koizumi, S. (2010) Synchronized Ca^{2+} oscillations in astrocytes. **FEBS J.** 277, 286-292.
2. Mochizuki, T., Tokabe, T., Araki, I., Fujishita, K., Shibasaki, K., Uchida, K., Naruse, K., Koizumi, S., Takeda, M. and Tominaga, M. (2009) The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca^{2+} influx and ATP release in primary urothelial cell cultures. **J. Biol. Chem.**, 284, 21257-21264.
3. Fujishita, K., Ozawa, T., Shibata, K., Tanabe, S., Sato, Y., Hisamoto, M., Okuda, T. and Koizumi, S. (2009) Grape seed extract (GSE) acting on astrocytes, reveals its neuronal protection against oxidative stress via interleukin-6-mediated mechanisms. **Cell Mol Neurobiol.**, 29, 1121-1129.
4. Shinozaki, Y., Sumitomo, K., Tsuda, M., Koizumi, S., Inoue, K. and Torimitsu, K. (2009) Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X_4 receptors. **PLoS Biology**, 7, e103.
5. Shinozaki, Y., Sato, Y., Koizumi, S., Ohno, Y., Nagao, T. and Inoue, K. (2007) Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-mediated

cell death by inhibition of c-Jun-N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. **Neurosci.**, 147, 153-163.

6. Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B.V., Jacobson, K.A., Kohsaka, S. and Inoue, K. (2007) UDP acting at P2Y₆ receptors is a novel mediator of microglial phagocytosis. **Nature**, 446, 1091-1095.
7. Shinozaki, T., Koizumi, S., Ohno, T., Nagao, T. and Inoue, K. (2006) Activation of P2Y₁ receptors in astrocytes interferes the H₂O₂-evoked death promoting signaling cascades. **Glia**, 54(6):606-618.

[学会発表] (計 77 件)

1. Koizumi, S., Fujishita, K., Nakao, A. Mechanisms underlying upregulation of microglial P2Y₆ receptors. Society for Neuroscience Meeting, 2010. 10. 14-17, San Diego, USA.
2. Koizumi, S., Fujishita, K., Shibata, K., Ozawa, T., Tanabe, S., Sato, Y. Contribution of astrocytes to the “French paradox” in the CNS. 2009. 9. 8-9. 12, Paris, France.
3. Fujishita, K., Nakao, A., Inoue, K. and Koizumi, S. Mechanisms underlying upregulation of P2Y₆ receptors in microglia in kainate-induced injury model. 2009. 9. 8-9. 12, Paris, France.
4. Koizumi, S., Fujishita, K., Shibata, K., Ozawa, T. Contribution of astrocytes to the “French paradox” in the CNS. Society for Neuroscience,

2009. 10. 17-10. 21, Chicago, USA.

5. Koizumi, S. Cell-to-cell communication mediated by extracellular nucleotides in the CNS. A lecture in commemoration of receiving prize “Japan Academy Medal” Fukuoka Purine 2009, 2009. 7. 23-25, Fukuoka.
6. Koizumi, S., Fujishita, K. Glial function and ischemic brain injury. (シンポジウム). 第 8 2 回日本薬理学会、2009 年 3 月 16-18 日、横浜
7. Fujishita, K., Sueishi, K., Takata, F., Kataoka, Y., and Koizumi, S. Astrocyte-to-pericyte communication mediated by ATP. Society for Neuroscience, Nov. 15-19, 2008, Washington DC, USA.

[図書] (計 2 件)

1. 小泉修一、ニューサイエンス社、ATP を介したグリア・ニューロン相互作用、細胞、2008 年、12(142)-16(146)
2. 小泉修一、井上和秀、北隆館、ニューロン・ミクログリア相互作用、BioClinica, 2008 年、97-102

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称：グリア細胞の活性化抑制組成物
発明者 1：小泉修一 (山梨大学)
発明者 2：柴田圭輔 (山梨大学)
発明者 3：藤下加代子 (山梨大学)
発明者 4：菅原 健 (山梨大学)
発明者 5：松川 隆 (山梨大学)
権利者：同上
種類：
番号：特願 2009-267902
出願年月日：2009 年 11 月 25 日
国内外の別：国内
2. 名称：神経細胞の維持や修復に有用な薬剤
発明者 1：小泉修一 (山梨大学)
発明者 2：柴田圭輔 (山梨大学)

発明者 3 : 小澤哲朗 (山梨大学)

発明者 4 : 柴田圭輔 (山梨大学)

発明者 5 : 松川 隆 (山梨大学)

権利者 : 同上

種類 :

番号 : 特願 2009-183294

出願年月日 : 2009 年 8 月 6 日

国内外の別 : 国内

[その他]

【新聞報道】

1. 脳の掃除屋 (毎日新聞、H17 年 4 月 5 日)
2. 脳の掃除係 (読売新聞、H17 年 4 月 5 日)
3. 脳の掃除屋の活性物質確認 (山梨日々新聞、H17 年 4 月 5 日)
4. 脳の掃除屋を活性化 (共同通信、H17 年 4 月 5 日)
5. 脳内の掃除屋「ミクログリア」(信濃毎日新聞科学欄、H17 年 4 月 30 日)

【TV】

1. NHK ニュース全国版 (H17 年 4 月 5 日)
2. NHK ニュース関東版 (H17 年 4 月 6 日)

【雑誌】

1. 脳をきれいに (週刊新潮、H17 年 4 月 19 日)
2. 脳内の掃除屋 (ネイチャーダイジェスト、H17 年 6 月)

【Web 等】

1. 47News 2007. 04. 05. 脳の「掃除屋」を活
(<http://www.47news.jp/CN/200704/CN2007040501000448.html>)
2. MNS 毎日インタラクティブ 2007. 04. 05
脳の掃除屋 : 不要物質食べる細胞を解明
3. Miljan(みるじゃん) 2007. 04. 05
「脳の掃除屋」の活性物質確認

6. 研究組織
(1) 研究代表者

小泉 修一 (KOIZUMI SCHUICHI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授
研究者番号 : 10280752

(2) 研究分担者

藤下 加代子 (FUJISHITA KAYOKO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号 : 10443102

柴田 圭輔 (SHIBATA KEISUKE)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号 : 50580411

大久保 聡子 (OKUBO SATOKO)

国立医薬品食品衛生研究所・研究員
研究者番号 : 20274954
(H19→H20 : 連携研究者)

(3) 連携研究者

なし