

令和元年5月24日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07055

研究課題名（和文）免疫シグナル伝達鎖DAP12を介した神経損傷後のミクログリア活性化機構の解析

研究課題名（英文）Effects of a DAP12-mediated signal on microglial activation after injury

研究代表者

小西 博之（Konishi, Hiroyuki）

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90448746

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：DAP12はミクログリアの細胞膜上に発現する膜タンパクであり、特定のリガンド認識受容体のシグナル伝達鎖として機能すると考えられている。知覚神経損傷によるアロディニアモデルを用いてDAP12の機能を解析した結果、DAP12がリガンド認識鎖TREM2と複合体を形成した場合にはミクログリアの炎症性作用を促進するのに対し、リガンド認識鎖Siglec-Hと複合体を形成した場合には炎症性作用を抑制することを見出した。さらに、DAP12のリガンド認識鎖Siglec-Hは、脳内マクロファージや浸潤性単球には発現しない非常に特異性の高いミクログリアマーカーであることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シグナル伝達鎖DAP12は、異なるリガンド認識鎖（TREM2またはSiglec-H）と複合体を形成することにより、ミクログリアの活性化を正/負両方に制御することを見出した。DAP12を介するシグナルの適切な制御により、神経損傷後のミクログリアの性質を神経保護的に転換できる可能性が期待される。また、本研究により示したSiglec-Hの発現特異性は、今後のミクログリア研究において有益な情報になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：DAP12 is considered to work as a signal transduction chain of some ligand-binding receptors in microglia. Our study, using allodynia model of mice, revealed that DAP12 can regulate microglial activity both positively and negatively after injury. When DAP12 makes complex with TREM2, TREM2/DAP12 promotes microglial pro-inflammatory responses after injury, whereas Siglec-H/DAP12 complex suppresses. Furthermore, we demonstrated Siglec-H as a microglia-specific marker that discriminates microglia from brain macrophages and CNS-infiltrating monocytes.

研究分野：神経損傷

キーワード：グリア ミクログリア 神経炎症 疼痛 アロディニア ミクログリアマーカー TREM2 DAP12

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミクログリアは神経損傷に応答し活性化する。その活性化誘導には、神経損傷を感知する細胞膜上受容体が重要な役割を果たすと予想されるが、ATP 受容体や CSF-1 受容体以外に活性化への関与が証明されている受容体は少ない。

単核細胞に発現する DAP12 は、triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) などのリガンド認識受容体と共役し、シグナルを細胞内に伝達するアダプターとして機能すると考えられている。DAP12 と TREM2 は若年性認知症 Nasu-Hakola 病の原因遺伝子であることから、DAP12 を介するシグナルは脳内でミクログリアの活性制御に関与することが予想されるが、具体的な機能は不明であった。そこで、ミクログリア活性化における DAP12 の機能を、運動神経損傷モデルマウスを用い解析した結果、DAP12 はミクログリアの炎症性反応を促進・遷延することでミクログリアの神経毒性を高めることを我々は見出した (Kobayashi, Konishi et al, *Glia*, 2015)。

2. 研究の目的

ミクログリアの活性化は、損傷モデルにより神経保護的あるいは傷害的に作用すると考えられている。本研究では、他の神経損傷モデルとしてアロディニア (異痛症) モデルを用い、DAP12 を介するシグナルがミクログリア活性化に与える影響を解析した。さらに、リガンド認識鎖である DAP12 共役受容体やそのリガンドの同定により、ミクログリア活性化における DAP12 の機能の分子レベルでの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) アロディニアモデルを用いた解析

マウス L4 脊髄神経の切断によりアロディニアモデルを作成した。リアルタイム PCR、*in situ* hybridization や免疫組織化学などの手法により、脊髄後角における DAP12 関連分子や炎症性分子の発現を調べた。また、von Frey テストにより疼痛評価を行った。さらに、脊髄髄腔内に留置したカテーテル経路で TREM2 に対するアゴニスティック抗体を髄腔内投与することにより、TREM2 刺激がミクログリア活性化と疼痛に与える影響を調べた。

(2) Siglec-H のリガンド探索

Siglec-H 細胞外ドメインと Fc を融合させたリコンビナントタンパク (Siglec-H-Fc) を作成し、脳や初代培養神経細胞の抽出物から Siglec-H-Fc と共沈するタンパク質を探索した。また、Siglec-H-Fc とリガンドの可能性を持つ糖鎖との結合を、Biacore システムを用い表面プラズモン共鳴実験により評価した。

(3) Siglec-H の発現特異性の評価

Dundee 大学 Dr. Crocker から供与された抗 Siglec-H 抗体を用い、脳や脊髄の免疫組織化学を行った。染色像を、汎用ミクログリアマーカー Iba1 や CD11b のものと比較することにより、Siglec-H のミクログリア発現特異性を評価した。

4. 研究成果

(1) アロディニアモデルにおける TREM2/DAP12 複合体の機能解析

アロディニアモデルでは、脊髄後角において活性化したミクログリアが引き起こす炎症性反応が疼痛の主要な原因となることが知られている。まず、L4 神経切断後の脊髄後角において DAP12 がミクログリア特異的に発現していることを免疫組織化学で確認した。von Frey テストにより、野生型マウスに比べ DAP12 ノックアウトマウスでは疼痛が有意に軽減されることを明らかにした。その原因として、DAP12 ノックアウトマウスでは、脊髄後角においてミクログリア数が減少すると共に炎症性サイトカインの発現が顕著に低下していることを見出した。

さらに、ミクログリア活性化における機能的な DAP12 共役受容体の特定を行った。免疫系で明らかにされている DAP12 共役受容体のうち、TREM2 が脊髄後角においてミクログリア特異的に発現することを見出した。非損傷マウスの髄腔内へ TREM2 アゴニスティック抗体を投与した結果、脊髄後角において炎症性サイトカインの発現が上昇すると共に、足底に疼痛が現れた。DAP12 ノックアウトマウスではその現象は見られなかったことから、TREM2/DAP12 複合体を介するシグナルがミクログリアの炎症性反応を促進し疼痛を増悪させることが示唆された (Kobayashi, Konishi et al, *J Neurosci*, 2016)。

(2) アロディニアモデルにおける Siglec-H/DAP12 複合体の機能解析

既知の DAP12 共役受容体のうち、TREM2 以外に Siglec-H もミクログリアに発現していることを見出した。そこで、アロディニアモデルを用い、ミクログリア活性化における Siglec-H の機能を解析した。野生型マウスに比べ Siglec-H ノックダウンマウス (*Siglechl^{dtr/dtr}* マウス: Takagi et al, *Immunity*, 2011) では、神経損傷後の脊髄後角における炎症性サイトカインの発現上昇が促進されることに加え、疼痛が増悪することを見出した。よって、Siglec-H/DAP12 複合体を介するシグナルは、TREM2/DAP12 複合体とは対照的に、ミクログリアの炎症性反応を抑制することが示唆された (Konishi et al, *Glia*, 2017)。

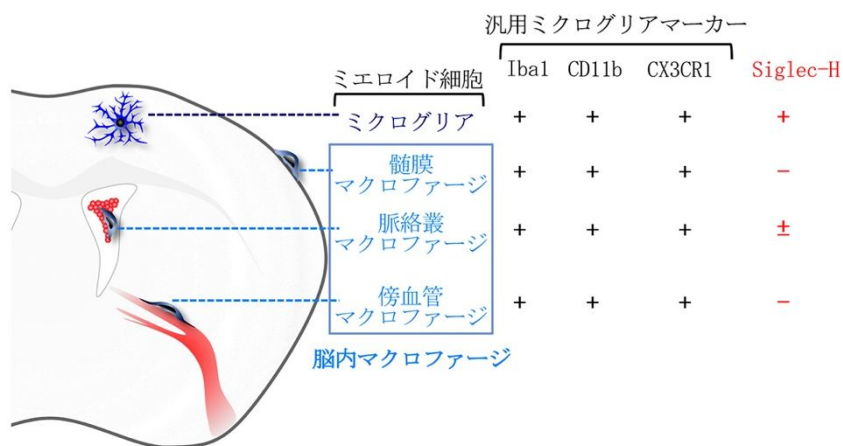
(3) Siglec-H リガンドの同定

TREM2 に関してはリガンドが同定されているが、Siglec-H については同定されていなかった。そこで、Siglec-H-Fc リコンビナントタンパクと共沈するタンパク質を探索したが、リガンド候補分子は得られなかった。Siglec ファミリー分子はシアル酸を含む糖鎖を主なリガンドとすることが知られている。そこで、他施設との共同研究により、リガンドの可能性を持つ糖鎖と Siglec-H の結合を表面プラズモン共鳴実験により調べた結果、シアル酸含有糖鎖 A2G'2F が Siglec-H と結合することを見出した (Handa-Narumi, Yoshimura, Konishi et al, *Cell Struct Funct*, 2018)。

(4) Siglec-H のミクログリアマーカーとしての有用性

脳内の単核細胞としてミクログリアが有名であるが、それ以外にも髄膜、血管周囲や脈絡叢といった脳の特定位位には脳内マクロファージが存在する。しかし、汎用されているミクログリアマーカー Iba1 や CD11b は、ミクログリアに加え脳内マクロファージにも発現していることが知られている。それに対し、Siglec-H はミクログリアに発現するが、脳内マクロファージにはほぼ発現しないことを示した。Siglec-H は、損傷や炎症時に脳内に浸潤してくる浸潤性単球や、末梢神経系に存在する末梢神経マクロファージにも発現しないことから、神経系において非常に特異性の高いミクログリアマーカーであることが明らかとなった(下図) (Konishi et al, *Glia*, 2017)。

Siglec-H のミクログリア発現特異性



	汎用ミクログリアマーカー			Siglec-H
	Iba1	CD11b	CX3CR1	
ミエロイド細胞 ミクログリア	+	+	+	+
髄膜 マクロファージ	+	+	+	-
脈絡叢 マクロファージ	+	+	+	±
傍血管 マクロファージ 脳内マクロファージ	+	+	+	-

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

(1) Sayo A, **Konishi H**, Kobayashi M, Kano K, Kobayashi H, Hibi H, Aoki J, Kiyama H. GPR34 in spinal microglia exacerbates neuropathic pain in mice.

J Neuroinflammation, 16(1):82, 2019.

DOI: 10.1186/s12974-019-1458-8

査読有

(2) **Konishi H**, Kiyama H, Ueno M.

Dual functions of microglia in the formation and refinement of neural circuits during development.

Int J Dev Neurosci, in press.

DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2018.09.009

査読有

(3) **Konishi H**, Kiyama H.

Microglial TREM2/DAP12 signaling: a double-edged sword in neural diseases.

Front Cell Neurosci, 12:206, 2018.

DOI: 10.3389/fncel.2018.00206

査読有

(4) Handa-Narumi M, Yoshimura T, **Konishi H**, Fukata Y, Manabe Y, Tanaka K, Kiyama H, Fukase K, Ikenaka K.

Branched sialylated N-glycans are accumulated in brain synaptosomes and interact with Siglec-H.

Cell Struct Funct, 43(2):141-152, 2018.

DOI: 10.1247/csf.18009

[査読有](#)

(5) Ito K, Ohkawara B, Yagi H, Nakashima H, Tsushima M, Ota K, [Konishi H](#), Masuda A, Imagama S, Kiyama H, Ishiguro N, Ohno K.

Lack of Fgf18 causes abnormal clustering of motor nerve terminals at the neuromuscular junction with reduced acetylcholine receptor clusters.

Sci Rep, 8(1):434, 2018

DOI: 10.1038/s41598-017-18753-5

[査読有](#)

(6) [Konishi H](#), Kobayashi M, Kunisawa T, Imai K, Sayo A, Malissen B, Crocker PR, Sato K, Kiyama H.

Siglec-H is a microglia-specific marker that discriminates microglia from CNS-associated macrophages and CNS-infiltrating monocytes.

Glia, 65(12):1927-1943, 2017.

DOI: 10.1002/glia.23204

[査読有](#)

(7) Wei L, Tokizane K, [Konishi H](#), Yu HR, Kiyama H.

Agonists for G protein-coupled receptor 84 (GPR84) alter cellular morphology and motility but do not induce pro-inflammatory responses in microglia.

J Neuroinflammation, 14(1), 198-209, 2017.

DOI: 10.1186/s12974-017-0970-y

[査読有](#)

(8) [Konishi H](#), Ohgami N, Matsushita A, Kondo Y, Aoyama Y, Kobayashi M, Nagai T, Ugawa S, Yamada K, Kato M, Kiyama H.

Exposure to diphtheria toxin during the juvenile period impairs both inner and outer hair cells in C57BL/6 mice.

Neuroscience, 351, 15-23, 2017.

DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.03.028

[査読有](#)

(9) Tokizane K, [Konishi H](#), Makide K, Kawana H, Nakamuta S, Kaibuchi K, Ohwada T, Aoki J, Kiyama H.

Phospholipid localization implies microglial morphology and function via Cdc42 in vitro.

Glia, 65(5), 740-755, 2017.

DOI: 10.1002/glia.23123

[査読有](#)

(10) Kobayashi M, [Konishi H](#), Sayo A, Takai T, Kiyama H.

TREM2/DAP12 signal elicits pro-inflammatory response in microglia and exacerbates neuropathic pain.

J Neurosci, 36(43), 11138-11150, 2016.

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1238-16.2016

[査読有](#)

(11) Nakashima H, Ohkawara B, Ishigaki S, Fukudome T, Ito K, Tsushima M, [Konishi H](#), Okuno T, Yoshimura T, Ito M, Masuda A, Sobue G, Kiyama H, Ishiguro N, Ohno K.

R-spondin 2 promotes acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction via Lgr5.

Sci Rep, 6, 28512, 2016.

DOI: 10.1038/srep28512

[査読有](#)

[学会発表](計 18 件)

(1) **小西博之**、佐藤克明、木山博資。

ミクログリアの貪食能低下はアストロサイトにより補完される。

第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会。2019 年 3 月 29 日。

(2) **Hiroyuki Konishi**。

Astrocytic phagocytic activity compensates for microglial dysfunction.

第 11 回 Nagoya グローバルリトリート。2019 年 2 月 15 日。

(3) **小西博之**、佐藤克明、木山博資。

Phagocytic clearance of microglial debris by astrocytes in microglial depletion model mice.

第 22 回グリア研究会。2018 年 12 月 1 日。

(4) **小西博之**、佐藤克明、木山博資。

ミクログリア除去時に現れるアストロサイトの貪食能。

第 78 回日本解剖学会中部支部学術集会。2018 年 10 月 14 日。

(5) 佐世暁、**小西博之**、小林正明、日比英晴、青木淳賢、木山博資。

脊髄後角のミクログリアに発現する GPR34 は神経障害性疼痛を悪化させる。

第 8 回生理学研究所・名古屋大学医学系研究科 合同シンポジウム。2018 年 9 月 29 日。

(6) **小西博之**、木山博資。

ミクログリア除去時に現れるアストロサイトの貪食能。

第 8 回生理学研究所・名古屋大学医学系研究科 合同シンポジウム。2018 年 9 月 29 日。

(7) 吉村武、半田麻衣、**小西博之**、深田優子、真鍋良幸、田中克典、Guangming Bao、木山博資、深瀬浩一、池中一裕。

脳シナプトソームに集積している枝分かれしたシアル酸化 N 結合型糖鎖はシグレック H と相互作用する。

第 40 回日本生物学的精神医学会・第 61 回日本神経化学学会大会 合同年会。2018 年 9 月 7 日。

(8) **小西博之**、岡本峻幸、佐藤克明、木山博資。

ミクログリア除去モデルマウスにおけるミクログリア残骸のアストロサイトによる貪食。

第 40 回日本生物学的精神医学会・第 61 回日本神経化学学会大会 合同年会。2018 年 9 月 6 日。

(9) 佐世暁、**小西博之**、小林正明、日比英晴、青木淳賢、木山博資。

GPR34 はミクログリアにおける炎症性反応を惹起し神経障害性疼痛を増悪させる。

第 40 回日本疼痛学会。2018 年 6 月 15 日。

(10) **小西博之**、小林正明、佐藤克明、木山博資。

Siglec-H のミクログリアマーカーとしての有用性と機能。

第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会。2018 年 3 月 28 日。

(11) **小西博之**、佐藤克明、木山博資。

Microglial debris are phagocytosed by astrocytes under absence of functional microglia.

第 22 回グリア研究会。2017 年 12 月 2 日。

(12) **小西博之**、小林正明、佐藤克明、木山博資。

ミクログリアマーカー Siglec-H の発現特性と機能。

第 77 回日本解剖学会中部支部学術集会。2017 年 10 月 7 日。

(13) **小西博之**、木山博資。

ミクログリアマーカー Siglec-H の発現特性と機能。

第 7 回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム。2017 年 9 月 9 日。

(14) **小西博之**、小林正明、佐藤克明、木山博資。

Siglec-H is a specific marker for microglia in mice.

第 60 回日本神経化学学会大会。2017 年 9 月 8 日。

(15) Tokizane K, **Konishi H**, Makide K, Kawana H, Nakamuta S, Kaibuchi K, Ohwada T, Aoki J, Kiyama H.

Alteration of phospholipid localization induces microglial ramification.

Cold Spring Harbor Asia Conferences, Novel insights into Glia function & Dysfunction,
December 6th, 2016.

(16) **小西博之**、小林正明、木山博資。
TREM2/DAP12 signal in microglia exacerbates neuropathic pain。
第 21 回グリア研究会。2016 年 12 月 3 日。

(17) **小西博之**、小林正明、木山博資。
TREM2/DAP12 を介する神経損傷後のミクログリア活性化。
第 6 回生理学研究所・名古屋大学医学系研究科合同シンポジウム。2016 年 9 月 24 日。

(18) **小西博之**、小林正明、高井俊行、木山博資。
TREM2/DAP12 を介するミクログリア活性化は神経障害性疼痛を増悪させる。
第 59 回日本神経化学学会大会。2016 年 9 月 8 日。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ：<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/anatomy2/konishi.htm>

6 . 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。