

平成21年 6月 10日現在

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2006～2008

課題番号：18500307

研究課題名（和文） 細胞外ATPによるミクログリア遊走能の調節機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of microglial chemotaxis induced by ATP

研究代表者

大澤 圭子 (OHSAWA KEIKO)

国立精神・神経センター 神経研究所 代謝研究部 室長

研究者番号：40392435

研究成果の概要：本研究は、神経-グリア細胞相互作用因子の一つである細胞外アデノシン三リン酸（ATP）によるミクログリアの遊走と突起伸長を調節する分子機構の解明を目的とし、ATP受容体P2Y12により活性化されるホスホリパーゼCシグナル系が細胞移動に関与することを明らかにした。また、ミクログリア突起伸長の簡便な解析系を確立し、P2Y12を介した細胞接着因子インテグリン β 1の活性化が突起伸長調節に必要であることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：神経科学 細胞生物学

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、細胞運動、シグナル伝達、細胞外ヌクレオチド、インテグリン

1. 研究開始当初の背景

ミクログリアは脳内マクロファージとも呼ばれ、神経組織の修復・再生、あるいは炎症の憎悪・回復に重要な役割を果たす細胞である。正常脳では、ミクログリアは小型の細胞体で長く多数に分岐した突起を持つラミファイド型で存在するが、障害時にいち早く反応して形態を変化させ活性化型となり、障害部位へ移動し増殖して生理活性物質の産生・分泌、食食や抗原提示

など多様な機能を発揮するようになる。近年、ラミファイド型ミクログリアの突起が正常脳で活発に運動していることが *in vivo* で観察され (Nimmerjahn A. *et al. Science* 308, 1314-1318, 2005)、脳細胞が損傷した場合、近傍のミクログリアの突起が損傷部位に向かって伸長し、細胞外ATPがその突起伸長を引き起こす因子であることが報告された (Davalos D. *et al. Nat. Neurosci.* 8,

752-758, 2005)。ミクログリアの形態変化は様々な機能の活性化に先立ち生じ、移動したミクログリアは周囲の環境に応じて異なる機能を示すようになることから、ミクログリアの形態変化と遊走能の調節機構を明らかにすることは、ミクログリアの生理機能を理解するために重要である。しかしながら、ミクログリアの突起伸長や細胞移動の調節分子機構についてほとんど解明されていない。我々研究室では、ATP受容体 P2Y12 が脳内ではミクログリアに特異的に発現しており (Sasaki Y. *et al. Glia* 44, 242-250, 2003)、ATP による培養ミクログリアの形態変化と遊走が P2Y12 を介して誘導され (Honda S. *et al. J. Neurosci.* 21, 1975-1982, 2001)、P2Y12 下流で機能するホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) シグナル系の活性化が必要であることを報告してきた (Ohsawa K. *et al. Glia* 55, 604-616, 2007)。そこで、本研究では、まず、PI3K と共に P2Y12 の下流で活性化されることが知られているホスホリパーゼ C (PLC) に注目し、PLC-カルシウムシグナル系のミクログリアの遊走における役割を検討した。そして、突起伸長調節機構の解析を行なうために、培養ミクログリアを用いたミクログリア突起伸長解析系を確立し、突起伸長調節に関わる P2Y12 シグナル系の解析を行なった。

2. 研究の目的

本研究はATPによるミクログリアの遊走と突起伸長を調節する分子機構の解明を目的とし、

(1) 細胞遊走の調節における PLC シグナル系の役割の解析

(2) ミクログリア突起伸長 *in vitro* 解

析系の確立

(3) P2Y12 刺激で活性化される突起伸長調節分子シグナル系の解析

の項目を中心に研究を行なった。

3. 研究の方法

1) 細胞遊走の調節における PLC シグナル系の役割の解析：まず、ミクログリアに発現する PLC アイソフォームを RT-PCR 及びウェスタンブロット法を用いて調べ、P2Y12 に対する高親和性アゴニスト ADP の刺激により活性化される PLC アイソフォームを同定した。次に、PLC 阻害剤と細胞内 Ca^{2+} キレート剤の ADP によるミクログリア遊走に対する効果を調べ、PLC シグナル系の関与を検討した。また、PI3K の下流で活性化される Akt に対する両阻害剤の効果も調べ、細胞内カルシウムシグナル系と PI3K シグナル系の関係について検討した。

(2) ミクログリア突起伸長解析系の確立：トランスウェルチャンバーのインサート膜上に作製した三次元コラーゲンゲル上に、ラット脳初代培養ミクログリアを播種した後、ボトムウェルに ATP を添加した (図 1)。2 時間後に細胞を固定し、ゲル内の ATP 濃度勾配に反応したミクログリアの形態と細胞体の位置を ミクログリア特異的のマーカータンパク質 Iba1 に対する抗体と F-アクチン選択的結合試薬ファロイジン、核染色色素 DAPI を用いて蛍光免疫染色し、共焦点顕微鏡を用いて観察した。突起伸長の長さは、DAPI の最も強い画像の位置から Iba1 あるいはファロイジンのシグナルが認められる位置までの

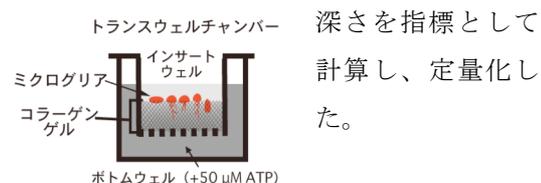


図 1 ミクログリア突起伸長解析系

(3) P2Y12 刺激で活性化される突起伸長調節分子シグナル系の解析：上記に示した突起伸長解析系を用いて、まず、PI3K と PLC 各酵素特異的阻害剤の影響を調べ、PI3K と PLC の関与を検討した。次に、ATP によりミクログリアのコラーゲンゲルへの接着性が上昇することから、ATP でミクログリアと細胞外マトリックスとの相互作用がどのように変化するのかを調べ、ミクログリアの突起伸長におけるインテグリンシグナル系の関与を解析した。インテグリン阻害剤 RGD ペプチド及び機能抑制抗体の影響を解析し、突起伸長調節に関わるインテグリンサブタイプを同定した。また、P2Y12 を介してインテグリンが活性化されるのか明らかにするために、P2Y12 非発現株の 1321N1 細胞と P2Y12 を安定発現させた P2Y12-1321N1 細胞を用いて、ATP 刺激による活性化型インテグリンの量的変化を免疫沈降反応法を用いて比較・解析した。さらに、ラット脳組織切片中のミクログリアにおけるインテグリンの発現を 蛍光免疫組織染色法で調べた。

4. 研究成果

(1) 細胞遊走の調節における PLC シグナル系の役割：ミクログリアには PLC- β 1 と β 4 の発現は認められず、 β 2、 β 3、 γ 1 と γ 2 の発現が認められた。P2Y12 に対する高親和性アゴニスト ADP の刺激により、 β 2 の膜ラッフル部位への集積が観察されたが、 γ 1 と γ 2 のリン酸化の亢進は認められず、PLC- β が P2Y12 の下流で機能し遊走調節に関与することが示唆された。PLC 阻害剤はミクログリアの遊走を阻害するとともに細胞内カルシウムの上昇を抑制した。細胞内 Ca^{2+} キレート剤もまた遊走を阻害したことから、PLC- Ca^{2+} シグナル系の

活性化が遊走調節に必要であることが明らかになった。また、PLC 阻害剤と細胞内 Ca^{2+} キレート剤が、PI3K に依存した Akt の活性化を抑制したことから、Akt の活性化は PLC- Ca^{2+} と PI3K の両シグナル系により制御されることが示された。さらに、Akt 阻害剤はミクログリアの遊走を抑制したことから、Akt がミクログリアの遊走調節に関与することが示唆された。以上の結果は、P2Y12 の下流で機能する PI3K と PLC の関係を示し、ミクログリア細胞遊走における細胞内 Ca^{2+} シグナルの役割のひとつを明らかにしたもので、細胞遊走調節機構を理解する上で重要な知見となる。

(2) ミクログリア突起伸長解析系の確立：トランスウェルインサート内のコラーゲンゲル上に播種した培養ミクログリアは、ATP (50 μM) をボトムウェルに添加すると、刺激 2 時間後には、細胞体をゲル上部に残したまま突起をゲル内に伸長させていた (図 2)。この伸長は 50 μM 以上の ATP で有意に認められ、同濃度の ATP インサート内とボトムウェル内に同時に添加した場合には観察されなかった。また、ATP あるいは ADP により引き起こされるが、UTP と UDP では起こらず、P2Y12 選択的アンタゴニスト AR-C69931MX で抑制された (図 3)。

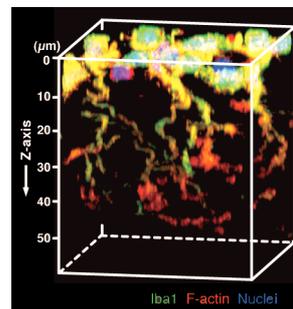
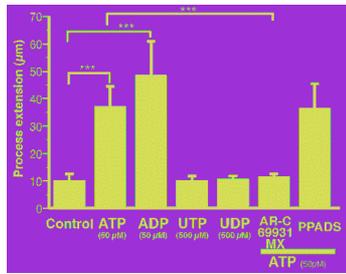


図 2 ミクログリアのゲル内への突起伸長

これらの結果から、突起伸長は ATP の濃度勾配に依存したケモタキシスな反応であり、P2Y12 を介して引き起こされる事が確認された。



(***p<0.001, n=3~4, Student' s t-test; 平均値±標準偏差)

図3 ミクログリア突起伸長に対する各種ヌクレオチドとP2Y12アンタゴニストの影響

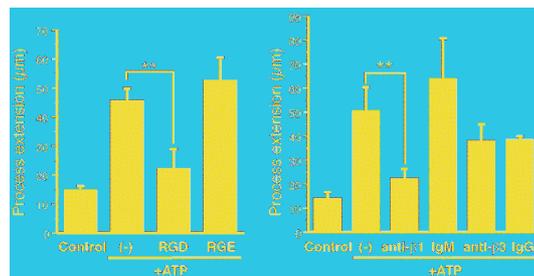
今回確立したミクログリア突起伸長解析系は内外で初めてのものである。この系では、刺激時間に依存した突起伸長と細胞体の移動が観察されることから、ミクログリアの突起伸長から細胞体移動への変換を調節する分子シグナルを解析できる。この系でのミクログリアの反応と組織中ミクログリアの動態を解析することにより、ミクログリアの運動能調節機構がより詳細に知ることができる。

(3) P2Y12 刺激で活性化される突起伸長調節分子シグナル系の解析

① PI3K と PLC の関与 : PI3K 阻害剤および PLC 阻害剤が ATP による突起伸長を抑制したことから、突起伸長は P2Y12 の下流で活性化される PI3K と PLC 両シグナル系により調節されることが明らかになった。

②細胞接着因子インテグリンの関与 : ATP によりミクログリアのコラーゲンゲルに対する接着性が高まることから、P2Y12 を介した細胞接着因子の活性化が示唆された。ATP による細胞接着活性の亢進は、P2Y12 選択的アンタゴニスト AR-C69931MX により抑制され、インテグリン阻害剤 RGD ペプチドあるいは β 1 インテグリン特異的機能抑制抗体によっても阻害された。これらの結果から、細胞接着活性の亢進は P2Y12 を介して引き起こされ、 β 1 インテグリンが関与することが示された。そこで、活性化型 β 1 インテグリン認識抗体を用いた免疫沈降反応法で、 β 1 インテグリンの活性化を調べた。P2Y12 を安

定発現させた P2Y12-1321N1 細胞で ATP 刺激による活性化が認められ、P2Y12 を介した細胞内シグナルにより β 1 インテグリンが活性化されることが判明した。また、ミクログリア突起伸長は RGD ペプチドあるいは β 1 インテグリン特異的機能抑制抗体により有意に抑制された (図 4)。



(**p<0.01, n=3~4, Student' s t-test; 平均値±標準偏差)

図4 RGD ペプチドと β 1 インテグリン機能抑制抗体のミクログリア突起伸長に対する影響

さらに、 β 1 インテグリン抗体を用いた免疫組織染色法で、ラット大脳皮質のミクログリアにシグナルが認められ、 β 1 インテグリンがラミファイド型ミクログリアに発現していることが示された。以上の結果から、ATP による突起伸長には β 1 インテグリンが関与し、P2Y12 を介した β 1 インテグリンの活性化による細胞接着性の亢進が突起伸長に必要であることが強く示唆された (図 5)。

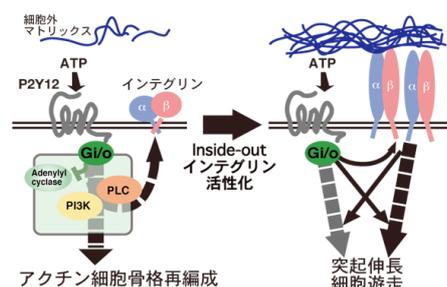


図5 ATP による P2Y12 を介したインテグリン β 1 の活性化と突起伸長

本研究で明らかにされた P2Y12 による β 1 インテグリンの活性化は、ミクログリアの運動能調節だけではなく、ラミファイドミクログリアの活性化を引き起こす分子シグナルとして働くと考えられ、正常脳内ミクログリ

アの機能と活性化を理解する上で非常に重要な知見となる。

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 大澤圭子 細胞外 ATP によるミクログリア運動能調節機構の研究、神経化学、48, 3-11 (2009) 査読無
- ② Irino Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S, Ohsawa K. Akt activation is involved in P2Y12 receptor-mediated chemotaxis of microglia. *J. Neurosci. Res.* 86, 1511-1519 (2008) 査読有.
- ③ Ohsawa K and Kohsaka S. Microglial response to injury. *Encyclopedia of Neuroscience*, Academic press, Oxford, (2008) 査読無.
- ④ Ohsawa K, Irino Y, Nakamura Y, Akazawa C Inoue K and Kohsaka S. Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *GLIA* 55, 604-616 (2007) 査読有.

[学会発表] (計 8件)

- ① 大澤圭子、中村泰子、入野康宏、鈴木恵里、佐柳友規、井上和秀、高坂新一：A TP受容体P2Y12を介したインテグリンβ1活性化によるミクログリア突起伸長調節、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月12日、神戸ポートアイランド
- ② 大澤圭子、中村泰子、入野康宏、鈴木恵里、佐柳友規、井上和秀、高坂新一：A TP受容体P2Y12を介したインテグリンβ1活性化によるミクログリア突起伸長調節 第51回日本神経化学会大会、2008年9月12日、富山国際会議場
- ③ Ohsawa K, Kohsaka S. Molecular mechanisms of ATP-induced microglial chemotaxis. USA-Japan joint meeting for glia research, Philadelphia, USA, 3. 19, 2008.
- ④ 大澤圭子、中村泰子、鈴木恵里、井上和秀、高坂新一 Molecular mechanisms of ATP-induced microglial chemotaxis. 第50回日本神経化学会大会、第30回日本神経科学大会、第17回日本神経回路学会大会合同大会、2007年9月12日、

パシフィコ横浜

- ⑤ 大澤圭子、中村泰子、鈴木恵里、井上和秀、高坂新一：細胞外 ATP 受容体 P2Y12 を介したミクログリア突起伸長調節機構の解析 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2007年12月12日、パシフィコ横浜
- ⑥ 入野康宏、大澤圭子、中村泰子、井上和秀、高坂新一：Akt activation is crucial for P2Y12 receptor-mediated chemotaxis of microglia. 第28回日本生物学的精神医学会・第36回日本神経精神薬理学会・第49回日本神経化学会大会 合同年会、名古屋、9. 14, 2006
- ⑦ Irino Y, Ohsawa K, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S. Akt activation is crucial for P2Y12 receptor-mediated chemotaxis of microglia. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 6. 21. 2006
- ⑧ Ohsawa K, Irino Y, Nakamura Y, Akazawa C Inoue K, Kohsaka S. Intracellular signaling underlying ATP-induced chemotaxis of microglia. The 17th International symposium on Adenosine and Adenine Nucleotides, Italy, 5. 25. 2006.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 圭子 (OHSAWA KEIKO)
国立精神・神経センター 神経研究所 代謝研究部・室長
研究者番号：40392435

(2) 研究分担者

入野 康宏 (IRINO YASUHIRO)
国立精神・神経センター 神経研究所 代謝研究部・研究員
研究者番号：10415565

(3) 連携研究者

なし