様　式　C－１９、F－１９、Z－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ４ 月 ２７ 日現在

機関番号：８３９０２
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：２４５００４５４

研究課題名（和文）未熟児低酸素性虚血性脳障害におけるミクログリアの生理機能の解明

研究課題名（英文）Microglial function in hypoxic-ischemic encephalopathy

研究代表者
河内　全（Kouchi, Zen）

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・病理学部・研究員

研究者番号：７０３２２４８５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,000,000円

研究成果の概要（和文）：モノアシルグリセロールリパーゼ（MAGL）は脳発達期の回路形成に関わることが知られていたが、脳内炎症時の機能は不明な点が多い。我々は虚血ストレスを与えた発達期の脳組織でMAGLの転写発現が抑制され、LPS刺激によってミクログリアにおける転写発現が抑制されると同時にプロテアソームによる分解から免れて安定化することを見出した。定常状態のMAGLはStat6によって発現が制御されるが、MAGLは酸素濃度によらずLPSで活性化される転写因子NFκBによるIL-6等のサイトカインの誘導には必須ではないことが示された。またMAGLはミクログリアのFcγレセプターを介した貪食能を亢進することを見出した。

研究成果の概要（英文）：It has been known that monoacylglycerol lipase (MAGL) is involved in wiring process of neural network in brain development, however, its pathological function in inflammatory condition remains unknown. We found that MAGL transcription was downregulated in neonatal brain subjected to hypoxic/ischemic stress and primary microglia treated with lipopolysaccharide (LPS). Microglial MAGL was transcriptionally regulated by Stat6 and its protein was rapidly degraded by proteasome in steady state. LPS treatment inhibited its degradation, resulting in its stabilization in microglia. Intrinsic MAGL was not prerequisite for LPS-dependent induction of several inflammatory cytokines such as IL6 in normoxic or hypoxic conditions, whereas it promoted phagocytosis mediated by Fcγ receptor in microglia.

研究分野：細胞生物学、生化学、病理学

キーワード：microglia　LPS　cytokine　monoacylglycerol lipase　ABHD12

１．研究開始当初の背景

モノアシルグリセロールリパーゼ(MAGL)は、2-アラキドノイルグリセロール（2-AG）等のモノアシル化脂質を加水分解する酵素である。MAGL は脳発達期の大脳皮質神経回路の形成に重要であることが知られていたが、低酸素炎症環境下の機能は不明であった。我々は虚血ストレスを与えた幼弱ラットで脳組織中の種々の脂質代謝酵素群の発現レベルを解析した結果、MAGL mRNA の発現が結紮側組織で減少していることを見出した。2011 年末に MAGL ノックアウトマウスでは個体レベルの解析より LPS 投与時のミクログリア活性化の阻害が見られ、プロスタグランジン類の産生が見られないことが報告されたが、ミクログリアがどのような役割を担っているかは不明であった。我々は単離培養したミクログリアに対して虚血ストレスを模倣する LPS 及び低酸素処理（1%O_2 或いは塩化コバルト）を施すことにより、MAGL が複雑な転写制御を受けることを見出した。脳における主要な 2-AG の産生酵素である DAGLαの転写発現は LPS 負荷及び低酸素処理によって変化がみられなかったことから、脳発達期の虚血時にミクログリア等の免疫系細胞でも MAGL が重要な役割を持つことを示唆している。本研究では MAGL や ABHD12 等のモノアシルグリセロールリパーゼファミリーが虚血ストレス応答時にミクログリアでどのような生理機能を有するかについて解明することを目的とした。

２．研究の目的

(1) 低酸素炎症環境（LPS 存在下）のミクログリアにおける MAGL の発現調節機構を明らかにする。また発現調節に関わる転写因子を明らかにし、その発現変化が活性にどのような影響を及ぼすかについて 2-AG を基質として用いた活性測定により解析する。
(2) 低酸素炎症環境下のミクログリアにおける MAGL ファミリーの機能について解析する。MAGL や ABHD12 の機能を阻害することによりミクログリアの機能がどのように変化するかを炎症性/抗炎症性サイトカインの産生や貪食能の変化に着目して明らかにする。
(3) ミクログリアにおける MAGL ファミリーの機能異常がミクログリアの機能を制御するという仮説に基づき、どのような分子経路で異常を生じるかについて明らかにする。

３．研究の方法

(1) ミクログリアにおいて LPS 且つ低酸素依存的な MAGL の発現機構を誘導する分子機構を転写因子に対する特異的阻害剤やプロモーターアッセイ等の手法により検証する。
(2) MAGL が炎症環境下の初代培養ミクログリアの機能にどのような影響を及ぼすかについてレンチウィルス発現系による siRNA の手法や特異的阻害剤を用いて解析する。また不死化ミクログリア細胞株 BV-2（内在性 MAGL の発現が見られない）を用いて FLAG タグを付加した MAGL や ABHD12 を一過性或いは安定発現した場合に細胞内局在や細胞の性質にどのような影響を及ぼすかについて生化学的手法や免疫細胞化学的手法を用いて解析する。

４．研究成果

(1)マウス初代培養ミクログリアで LPS 処理を行うと MAGL の転写発現は抑制されるが、低酸素処理時にも転写抑制が認められた（図１）。一方、BV2 細胞を用いた解析により、酸素濃度によらず LPS 処理時では MAGL 蛋白質はプロテアソームによる分解を免れて安定化し、2-AG 分解活性が上昇するが、初代培養ミクログリアでは通常酸素濃度で特に顕著な MAGL 蛋白質の安定化が見られた（図１）。MAGL の発現制御に主要な役割を持つ転写因子を解析する目的で種々の転写因子阻害剤を用いて検討した結果、Stat6 が定常状態の MAGL の転写誘導に重要な役割を演じることを見出した（図２）。Stat6 阻害剤である AS1517499 で処理した場合は IL-6 や TNFαの発現が亢進し、また NFκB/IκB 阻害剤 BAY11-7082 で処理した場合には MAGL の発現が回復しなかった。以上の結果より、炎症過程において Stat6 と NF-κB は互いに拮抗的に作用し、且つ両方の転写複合体に含まれる共通因子を介して MAGL とサイトカインの転写誘導が連携的に制御されている可能性が示唆された。

(2)マウス初代培養ミクログリアにおいてレンチウィルス発現系を用いて siRNA による発現を抑制し、或いは特異的阻害剤 JZL-184 を用いて MAGL 活性を阻害した結果、IL-1β、IL-6、等の炎症性サイトカインの転写誘導に変化は認められなかった（図３）。また BV-2 細胞

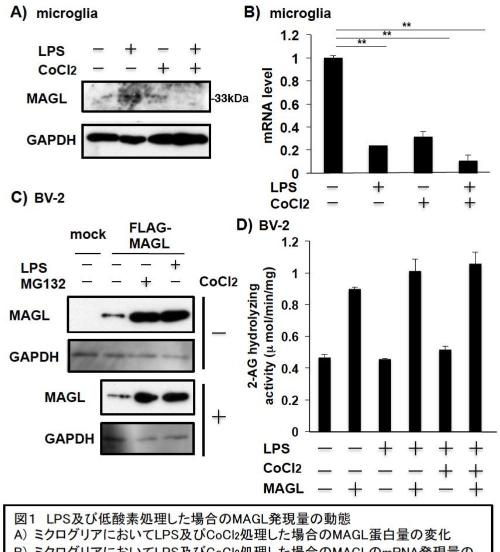

図1　LPS及び低酸素処理した場合のMAGL発現量の動態
A）ミクログリアにおいてLPS及び$CoCl_2$処理した場合のMAGL蛋白量の変化
B）ミクログリアにおいてLPS及び$CoCl_2$処理した場合のMAGLのmRNA発現量の変化（**:$p < 0.01$）
C）BV2細胞においてMAGL蛋白質はLPS処理によって安定化するが、コントロール細胞でもMG132処理によって同レベルまで回復する。
D）BV2細胞にMAGLを発現導入し、LPS及び$CoCl_2$処理した場合のの2-AG分解活性の変化を解析した。MAGLを導入した場合に活性は上昇する。

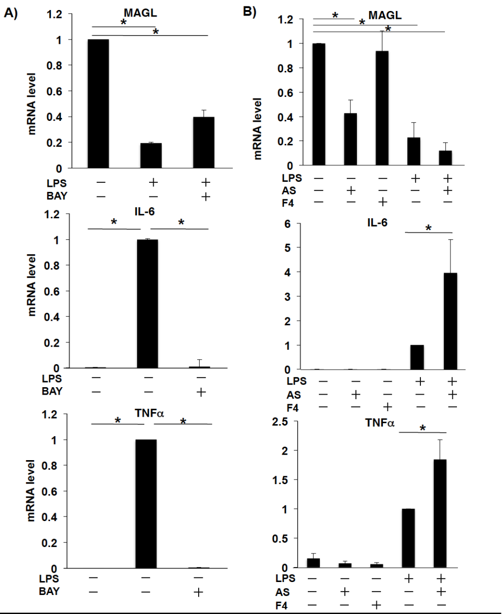

図2　各種転写因子阻害剤で処理した場合のMAGL、IL-6、TNFαの転写産物の量的変化
A）初代培養ミクログリアにおいてLPS及びNFκB阻害剤（BAY11-7082）で処理した場合の定量的RT-PCRによるMAGL、IL-6、TNFαの発現量の変化（*: p<0.05）
B）初代培養ミクログリアにおいてLPS及びStat6阻害剤（AS1517499）またはc-myc阻害剤（10058F-4）で処理した場合のMAGL、IL-6、TNFα 発現量の変化（*: p<0.05）

にFLAG-MAGLを発現導入した場合にも種々のサイトカインの転写誘導は影響を受けなかった。これらの結果よりミクログリア由来のMAGL は細胞自律的なサイトカインの産生誘導には必須ではないことが示された。

(3)初代培養ミクログリアでMAGLの発現を阻害した場合に細胞形態の萎縮が観察された。IgG ビーズを用いた貪食能の解析を行った結果、無処理群、LPS 処理群、及び低酸素処理に加えてLPSを添加した群のいずれにおいても MAGL をノックダウンした細胞では貪食能の低下が見られた（図４）。一方BV-2細胞にFLAG-MAGL を一過性に発現導入した場合には、LPS 及び低酸素負荷によらず、IgG ビーズの取り込みの亢進がみられた（図４）。以上の結果よりミクログリア細胞において MAGL はFcγレセプターを介した貪食を促進する活性を持つことが示された。

(4)ABHD12 はミクログリアに多く存在し、膜

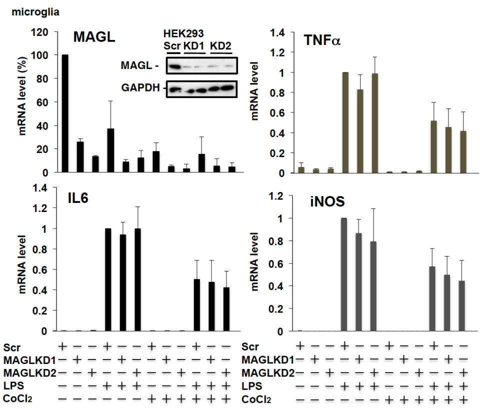

図3　ミクログリアでMAGLをsiRNAにより発現阻害した場合のIL-6、TNFα、iNOSのmRNA量の変化
（発現抑制効率を定量的RT-PCR及びHEK293細胞におけるMAGLのウェスタンブロットにより解析した。）

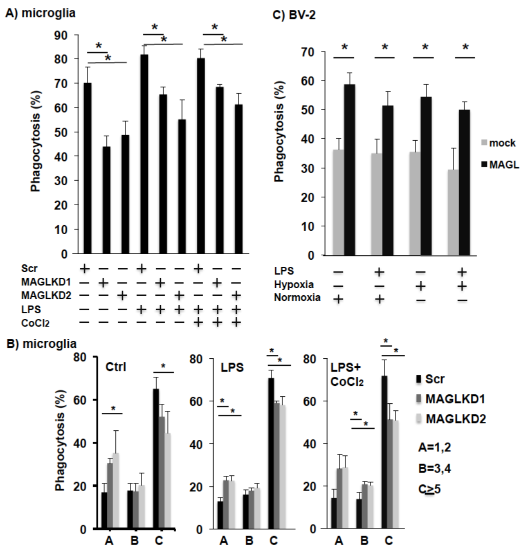

図4　ミクログリアでMAGLをsiRNAにより発現阻害した場合のFcγレセプター依存的な貪食能の変化
A）LPS及びLPSに加えて低酸素処理を行った場合に初代培養ミクログリアでMAGLを発現阻害した場合の貪食能の変化を解析した。発現阻害した場合には貪食能の抑制がみられる（*:p < 0.05）。
B）LPS及びLPSに加えて低酸素処理を行ったミクログリアでMAGLを発現阻害した場合の細胞あたりのIgGビーズの取り込み量を解析した。コントロールと比べて貪食能の低下がノックダウン細胞でみられる（*:p < 0.05）。
C）BV2細胞にMAGLを一過性に発現導入した場合にFcγレセプターを介した貪食能は上昇する（*: p < 0.05）。

貫通蛋白質と推定されているが、その機能は不明である。siRNA により初代培養ミクログリアでその発現を阻害すると細胞死の誘導がみられた。また BV-2 細胞にレンチウィルス発現系を利用して FLAG-ABHD12 を発現導入すると CSF1 依存的な細胞増殖を抑制したが、発現を抑制した場合も予想に反して血清依存的な増殖阻害が認められた。以上の結果はABHD12 の厳密な量的制御がミクログリアの生存や増殖をコントロールしていることを示唆する。また虚血ストレスを与えた場合にABHD12 がどのような分子機序を介してミクログリアの生理機能を制御しているか否かについても解析を行った。

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〕（計　1　件）

Chiba, Y., Komori, H., Takei, S., Hasegawa-Ishii, S., Kawamura, N. Adachi, K., Nanba, E., Hosokawa, M., Enokido, Y., Kouchi, Z., Yoshida, F., Shimada, A.(2014) Neuropathology **34**: 49-57

〔学会発表〕（計　3　件）

①河内　全、細川 昌則、榎戸　靖 (2012) 炎症反応における Monoacylglycerol lipase (MAGL)の生理的役割 第 85 回日本生化学会（福岡）

②Zen Kouchi, Masanori Hosokawa, Yasushi Enokido (2013) Physiological role of monoacylglycerol lipase in microglial response to inflammation. The 56th Annual

Meeting of Japan Society for Neurochemistry (Neuro2013), Kyoto

③河内　全、岸 宗一郎、細川 昌則、榎戸　靖 (2013) モノアシルグリセロールリパーゼが制御するミクログリアの機能解析　第 86 回日本生化学会（横浜）

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0　件）

○取得状況（計　0　件）

〔その他〕
ホームページ等
http://www.inst-hsc.jp/d-pathology/index.html

６．研究組織
(1)研究代表者 河内　全（KOUCHI,Zen）
愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所・病理学部・研究員
研究者番号：70322485

(2)研究分担者 細川　昌則（HOSOKAWA, Masanori）
愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所・病理学部・部長（兼任）
研究者番号： 00127135

研究分担者　島田　厚良（SHIMADA, Atsuyoshi）
愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所・病理学部・室長（兼任）
研究者番号： 50311444

研究分担者　榎戸　靖（ENOKIDO, Yasushi）
愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所・病理学部・室長
研究者番号： 90263326

研究分担者　千葉　陽一（CHIBA, Yoichi）
元愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所・病理学部・主任研究員（現所属：香川大学医学部）

(3)連携研究者