

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500465

研究課題名(和文) ノルアドレナリンによるミクログリア活性化と退行性神経変性病態のメカニズム

研究課題名(英文) Investigation of microglial activation through noradrenaline in the process of neurodegenerative disease

研究代表者

洲鎌 秀永 (Sugama, Shuei)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：70302461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：著者らはストレスによるミクログリア活性化をピボモデルを用いて最初に報告した。そのメカニズムは不明のままである。本研究の目的はミクログリア活性化のメカニズムを解明することである。ストレスによるミクログリア活性化が生じた部位での、蛋白の増減を調べたところ、ノルアドレナリン合成酵素であるDopamine beta Hydroxylase (DBH)が、顕著に増加していた。レーザー顕微鏡で多重染色でも、DBH陽性ファイバーがミクログリア周辺を取り巻く所見が確認された。さらに、ノルアドレナリン受容体である、1、2 Adrenergic Receptor (AR)が、その細胞に陽性に染色された。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated the first evidence that acute stress could induce morphological microglial activation in the brain. The goal of this study was to investigate the mechanism how the microglial activation is triggered by exposures to acute stress. We found that Dopamine beta Hydroxylase (DBH), an enzyme required for the synthesis of noradrenaline in the brain, is significantly elevated in the hippocampus, thalamus, and hypothalamus in response to acute stress. In addition, we found that DBH immunoreactive fibers surround microglial cells. Those microglial cells were found to be positive to beta 1 and beta 2 Adrenergic Receptor (AR). We suggest that microglia may be modulated through noradrenaline during the time of acute stress.

研究分野：神経科学

キーワード：ミクログリア ストレス ノルアドレナリン 青斑核 アドレナリン受容体 脳内免疫

1. 研究開始当初の背景

脳内グリア細胞には、ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイトがある。特に、ミクログリアは神経変性における脳内免疫で中心的役割を果たしていることが最近の研究で明らかになっている。ミクログリアは、一般的に、静止型、活性化型、貪食型の三つに分類され、いずれかの状態を保ち、脳内免疫の平衡状態に寄与している。周囲からのシグナルに応じ、静止型から活性化型へ移行し、更には貪食型に変化して、損傷した神経細胞を除去する機能を有する。また、神経保護因子を分泌し、神経修復の作用も行う。その一方で、異常な活性化状態になると、損傷細胞のみならず、正常な神経細胞までも攻撃し、神経脱落を増幅させてしまう点が問題となる。このような特性から、ミクログリアは両刃の剣とも呼ばれている。そのミクログリアの暴走のメカニズムを解明し、それを阻止することが健全な健康状態を維持することになる。

著者らは、病理的条件のみならず、日常的に起こるストレスに着目し、精神的ストレスとミクログリア活性化の研究を開始している。これまで明らかにしたのは以下の点である。

- (1) 急性拘束ストレスにて、ラット脳内ミクログリアが急速に活性化する。
- (2) 急性拘束ストレス負荷にて、正常ラットでは炎症性変化を伴わないが、副腎摘出ラットでは炎症性変化が増大し、ミクログリアも過剰活性を示した。
- (3) 脳内ミクログリアでは、1、2 アドレナリン受容体が発現した。3はごくわずかであった。
- (4) 1、2のアゴニスト(イソプロテレノール)を、培養ミクログリアに添加すると、LPS存在下で炎症性変化が増大した。
- (5) 培養ミクログリア細胞系に、副腎ステロイド(デキサメサゾン)添加で、LPSによって惹起された炎症性変化が有意に抑制された。

以上の所見を元に、ストレス時に起こるミクログリア活性化は、青斑核由来ノルアドレナリンが、脳内の各部位に分泌され、ミクログリア1、2を介して、活性化を誘導するという仮説を提唱した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ミクログリア活性化のメカニズムを生理的ストレスの立場から詳細に検討することにある。特に、ストレス下において活性化する視床下部 脳下垂体 副腎(HPA)軸および交感神経のバランスの見地から、ミクログリアがどのような修飾を受けるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

青斑核由来のノルアドレナリンとミクログリア活性化の相関関係を検討する。ウイスターラット(8 12週齢、250 - 280グラム)を用いる。拘束ストレス負荷を行う。拘束ストレスは、ワイアーネットを用いたラットの全身を巻く。その際、呼吸状態を確認し、呼吸を制限することはしないように注意する。ストレス負荷後、4%パラフォルムアルデヒド(PFA)でかん流固定を行う。凍結切片を作成し、免疫組織化学染色、In-Situ Hybridizationを行う。用いる交代としては、OX-42(汎ミクログリアマーカー)、OX-6(MHCII)、ED1(貪食用ミクログリアマーカー)。神経の活性化マーカーとしては、c-Fosを用いる。

4. 研究成果

- (1) 2時間の拘束ストレス後、海馬、視床、視床下部でIba1陽性ミクログリアを比較した。いずれの部位でも、Iba1陽性ミクログリアの形態的肥大が有意に起こっていた。
- (2) 同部位でのミクログリア数の比較を行った。同様、Iba1陽性ミクログリア数は有意に増加していた。
- (3) DBH陽性のファイバーは、海馬、視床、視床下部に検出された。同ファイバーは、ストレスによって有意に増強していた。
- (4) 青斑核におけるDBH陽性細胞は、ストレスによって有意に増強していた。
- (5) 1AR、2ARとミクログリアは、ほとんど共存していた。3ARは発現が僅かであった。免疫染色、PCR、ウェスタンブロット法で確認した。
- (6) DBHファイバーは、Iba1陽性ミクログリアを取り囲んでいた。
- (7) ノルアドレナリン受容体欠損マウスを用いて、野生型マウスと比較をした。海馬、視床、視床下部、いずれの部位でも、野生型では顕著なミクログリア活性化があった。しかし、1、2ARダブルノックアウトマウスにおいては、殆ど、ミクログリア活性化は起こらなかった。

以上の所見より、ストレス時のミクログリア活性化は、脳内全体に張り巡らされているノルアドレナリン受容体、1、2、を介し、活性化を受けていると考えられる。

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 7件)

- (1) Sekiyama K, Fujita M, Sekigawa A, Takamatsu Y, Waragai M, Takenouchi T, Sugama S, Hashimoto M. Ibuprofen ameliorates protein aggregation

- and astrocytic gliosis, but not cognitive dysfunction, in a transgenic mouse expressing demontia with Lewy bodies-linked P123H beta-synuclein. *Neurosci Lett.* 515(1):97-101
- (2) Sekiyama K, Sugama S, Fujita M, Sekigawa A, Takamatsu Y, Waragai M, Takenouchi T, Hashimoto M. Neuroinflammation in Parkinson's Disease and related disorders: A lesson from genetically manipulated mouse models of alfa-synucleinopathies. *Parkinson Dis.* 2012:271732
- (3) Takenouchi T, Iwamaru Y, Imamura M, Fukuhara S, Sugama S, Sato M, Mochizuki N, Hashimoto M, Yokoyama T, Mohri S, Kitani H. Cytochalasin D enhances the accumulation of a protease-resistant form of prion protein in ScN2a cells: involvement of PI3 kinase/Akt signaling pathway. *Cell Biol Int.* 2012;36(12):1223-31
- (4) Cutting edge: IL-13Ra1 expression in dopaminergic neurons contributes to their oxidative stress-mediated loss following chronic peripheral treatment with lipopolysaccharide. Morrison BE, Marcondes MC, Nomura DK, Sanchez-Alavez M, Sanchez-Gonzalez A, Saar I, Kim KS, Bartfai T, Maher P, Sugama S, Conti B. *J Immunol.* 2012;189(12):5498-502.
- (5) Corticosteroids limit microglial activation occurring during acute stress. Sugama S, Takenouchi T, Fujita M, Kitani H, Conti B, Hashimoto M. *Neuroscience.* 2013;13-20.
- (6) Diversity of mitochondrial pathology in a mouse model of axonal degeneration in synucleinopathies. Sekigawa A, Takamatsu Y, Sekiyama K, Takenouchi T, Sugama S, Waragai M, Fujita M, Hashimoto M. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;817807.
- (7) Disease-Modifying Effect of Adiponectin in Model of alfa-synucleinopathies. Sekiyama K, Waragai M, Akatsu H, Sugama S, Takenouchi T, Takamatsu Y, Fujita M, Sekigawa A, Rochenstein E, Inoue S, La Spada AR, Masliah

E, Hashimoto M. *Ann Clin Transl Neurol.* 2014;1(7):479-489.

〔学会発表〕(計 3件)

- (1) Corticosteroids provide suppressive signals for microglial activation during acute stress. Sugama S.
日本生理学会(横浜大会)2013年3月
- (2) Topographical study of activated microglia and c-Fos immunoreactive neurons following acute restraint stress. Sugama S, Kakinuma Y.
日本生理学会(鹿児島大会)2014年3月
- (3) Stress-induced microglial activation may be triggered by noradrenergic neurons. Sugama S, Kakinuma Y
日本生理学会(神戸大会)2015年3月

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
特に無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

洲鎌 秀永 (SUGAMA, Shuei)
日本医科大学・生体統御学・講師

研究者番号：70302461

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

橋本 款 (HASHIMOTO, Makoto)

研究者番号： 50189502

竹之内 敬人 (TAKENOUCHI, Takato)

研究者番号： 2029518