

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460098

研究課題名(和文) カチオンチャネル制御によるミクログリア活性化調節機構の解明と病態応用

研究課題名(英文) Modulation of microglial activation by regulating cation channels and its application to disease association

研究代表者

白川 久志 (Shirakawa, Hisashi)

京都大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50402798

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)：中枢性疾患の病態においては近年、過剰な脳内炎症が病態進行に深く関与していることが示されつつある。従って、本研究では脳内の主要な免疫細胞であるミクログリアの活性化調節機構の解明を目的として、ミクログリアに発現するカチオンチャネル、特にTRP分子群に焦点を当てた。その結果、ミクログリアのTRPM2開口が炎症性活性化を媒介すること、多発性硬化症にTRPM2活性化が関与し、その薬理的抑制が有効であること、TRPV1開口がミクログリア走化性を亢進すること、脳虚血傷害の病態にTRPV1活性化が関与し、その薬理的抑制が有効であることが明らかになり、これらのTRP分子群の創薬標的としての有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：Microglia, the resident immune cells in the brain, maintain brain homeostasis at a resting state by surveying the environment and engulfing debris. However, in some pathological conditions, microglia can produce neurotoxic factors. Inflammation-induced Ca²⁺ signaling is thought to underlie this abnormal activation of microglia, but the mechanisms and the molecular identities are still obscure. Here, we focus on the pathophysiological roles of TRP channels in CNS diseases. In vitro and in vivo experiments demonstrate that 1) TRPM2 contributes to excessive production of nitric oxide in microglia, 2) TRPM2-KO improves the neurological outcomes of mouse multiple sclerosis model, 3) Activation of mitochondrial TRPV1 contributes to microglial migration, 4) TRPV1-KO attenuates neurological deficiency in mouse cerebral ischemia model, suggesting that the above-mentioned TRP channels are potential therapeutic targets to regulate microglial activation and neuroinflammation in CNS diseases.

研究分野：中枢神経薬理

キーワード：ミクログリア TRPV1 TRPM2 遊走 一酸化窒素 活性酸素種 脳虚血傷害 多発性硬化症

1. 研究開始当初の背景

難治性中枢疾患の根本的治療薬の創製には分子病理の詳細な解明に基づく新しい治療標的の探索・同定が必要である。申請者らも含め多くの研究により、難治性中枢神経疾患の根底には、神経-グリアネットワーク破綻を伴う脳内炎症が深く関与し、疾患の発症・進行・重症化に大きな影響を及ぼしていることが明らかになりつつあり(Cell, 2010)、そのような過剰な脳内炎症が展開する中心には、脳内における免疫細胞であるミクログリアが位置している。しかしながら、この細胞が炎症起因性もしくは抗炎症性の方向へ活性化される分子メカニズム、特に有望な創薬標的の設定に関する知見は非常に不足しているのが実情である。

近年、Orai/STIM 複合体 CRAC チャンネルが T 細胞の機能発現に深く関与する Ca^{2+} 流入路として同定されるなど、非興奮性細胞の細胞機能制御におけるカチオンチャンネルの役割が注目を浴びつつあるが、脳内の主要な免疫細胞であるミクログリアにおけるカチオンチャンネルの役割には不明な点が多く残されていた。

申請者らはこれまで脳細胞に発現する Ca^{2+} 透過型カチオンチャンネルのうち、transient receptor potential (TRP) チャンネルに着目して研究を行ってきた。TRP チャンネルはヒトにおいては 28 の、マウスにおいては 27 の遺伝子が同定され、TRPC、TRPM、TRPV、TRPA、TRPP、そして TRPML の 6 つのファミリーに分類されている(Wu et al., 2010)。研究代表者らは 2012 年に、ミクログリアに発現する TRPV4 を刺激すると脱分極が惹起され、 K^{+} チャンネル活性化による過分極に基づく Ca^{2+} 利用能が抑制されることで、LPS 誘発活性化が抑制されることを見出した(Konno et al., Glia, 2012)。その一方で、逆にミクログリアに発現する TRPM2 は Ca^{2+} シグナリングを介して LPS 誘発活性化を亢進させることを見出した(Haraguchi et al., J Neurosci, 2012)。

2. 研究の目的

前記した背景を踏まえると、ミクログリア、の生理学および病態生理学的活性化に重要なカチオンチャンネルを同定することは、脳内炎症が関与する中枢性神経疾患の治療介入に貢献することが期待される。一方で、研究代表者らは、ミクログリア TRP チャンネルの刺激作用が活性化状態に対して相反することを報告しており、TRP チャンネル活性化の下流シグナルがミクログリア活性化をどのように制御しているかを精査することも重要であると考えた。

そこで本研究においてミクログリア活性化機構に TRP チャンネル開口の下流シグナルがどのような影響を果たすかについて明らかにすることが、難治性中枢神経疾患の創薬

に関する基礎的知見の提供に資すると考えこれを目的とし、in vitro 系と遺伝子改変マウスの in vivo 病態モデルを駆使して解析を行うこととした。以下項目ごとに目的および結果について概説する。

3. 研究の方法

(1) 培養ミクログリアを用いた in vitro 実験

ラット初代培養ミクログリアは生後 1-2 日齢の Wistar 系ラット新生仔から大脳皮質を摘出し、常法により調製した。免疫染色は蛍光標識抗体を用いて行い、ウエスタンブロット、RT-PCR、定量的 RT-PCR、ELISA はキット等を用いて常法により行った。

(2) 細胞株培養とトランスフェクション

HEK 293T 株化細胞は GlutaMAX I 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 10% の熱非動化ウシ胎児血清 (Sigma) を加えた培地を用いて、 $37^{\circ}C \cdot 5\% CO_2$ 条件下で培養した。HEK 293T 株化細胞は SuperFect Transfection Reagent または Lipofectamine 2000 を用いて、目的のプラスミドをトランスフェクトし、2 日後細胞を PLL でコートしたガラス上に再播種し、実験に用いた。

(3) 電気生理学的検討

電気生理学的測定は室温で行った。電極は外径 1.5 mm のガラスキャピラリー(ナリシゲ、日本)を P-87 マイクロピペットプレー(Sutter, Novato, CA)で引く事で作成した。アクセス抵抗は電極に電極内液を入れた状態で細胞外液に浸した際に 2-5 M Ω となるように調整した。ホールセルパッチクランプには、細胞外液には NaCl を主体とした溶液を用い、電極内液にはセシウムを主体とした溶液を用いた。測定には EPC-10 patch-clamp amplifier と PATCHMASTER software を用いた。

(4) 細胞内 Ca^{2+} 濃度測定

ガラス上に播種した細胞を 5 μM の細胞内 Ca^{2+} 指示薬である fura-2AM (同仁科学研究所) を Krebs-Ringer solution に溶かした溶液に 30-40 分、 $37^{\circ}C$ で浸した。蛍光画像は 5 秒毎に励起光 340 または 380 nm、蛍光 510 nm で、AQUACOSMOS/ORCA-AG imaging system(浜松ホトニクス)を用いて撮影した。実験は室温で行った。励起/蛍光 = 340 nm/510 nm の蛍光強度 (F_{340}) を励起/蛍光 = 380 nm/510 nm (F_{380}) で割る事で比を算出し (F_{340}/F_{380}) これを細胞内カルシウム濃度の指標とした。測定開始時に F_{340}/F_{380} が 1.5 を越えるものは除外した。細胞の生存を確認するためにイオノマイシンを用いた。

(5) 一過性中大脳動脈閉塞 (tMCAO) モデル

1%ハロタン麻酔下で C57BL/6J 系雄性マ

ウス (8-13 weeks, 20-30 g) の頸部を切開し、左総頸動脈よりシリコンコーティングしたナイロン栓子を挿入することにより中大脳動脈起始部を閉塞した。また、45-60 分の閉塞後ナイロン栓子を引き抜くことにより血流を再開通させた。手術中、直腸温は heating pad により 37 °C に維持した。頭皮を切開し、左側頭筋を剥離した後、bregma より左外側に 6 mm、尾側に 2 mm の位置に laser-Doppler flowmetry のプローブを固定し単位時間当たりの局所脳血流量を測定した。局所脳血流量は tMCAO 直前の血流を 100% とし、虚血中の血流量が 25% 以下に減少し、かつ再灌流 5 分後に血流が 60% 以上に回復したものを実験に用いた。

神経症状の評価は再灌流後所定の時間に虚血性脳傷害の程度を以下の 6 段階で行動学的に評価した。0: 正常、1: 右前肢および体躯の屈曲、2: 回転運動、3: 虚血側への傾倒、4: 正向反射の消失、5: 無動

梗塞巣体積の評価は再灌流後所定の時間に全脳を摘出し、前脳部分において 1 mm 厚の冠状切片を 8 枚作製した。ミトコンドリアにおける還元反応により赤色を呈する 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) を用いて 37 °C 暗所で 20 分間インキュベートした後、10% 中性等張ホルマリン溶液で固定した。TTC 非染色部位である白色面積を測定し、切片の厚みとの積を梗塞巣体積とした。

Rota-rod 試験による運動協調性の評価は tMCAO 後 1-2 日目に行った。マウスを rota-rod シリンダー上におき、マウスが rota-rod に留まっている時間を計測した。

Rope-grip 試験による運動能力の評価は tMCAO 後 1-2 日目に行った。マウスが前肢のみでロープに掴まった状態から試験を始め、マウスの運動機能を行動観察から以下に示す 6 段階で評価した。マウス一匹につき 5 回試行し平均値を算出した。0: 落下、1: 前肢の片足または両足を使ってぶら下がる、2: 1 に同じ、かつロープに登ろうと試みる、3: 前肢及び後肢の片足または両足を使ってぶら下がる、4: 四肢でぶら下がり、尾を巻き付ける、5: 脱出。

(6) 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)モデル多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)の動物モデルとしては EAE モデルを選択した。実験には C57BL/6 系雌性の野生型および TRPM2-KO マウス(7-9 週齢)を用いた。MOG35-55 ペプチド(100 µg)および免疫賦活剤を含むエマルジョンをマウスの背側部に皮下投与することにより、MS 病態を模した EAE を惹起した。臨床スコアは病態の悪化に応じて 0~6 の 7 段階で評価し、摘出した L3-L5 の脊髄を用いて常法により定量的 RT-PCR、ELISA、組織学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) ミクログリアの炎症性活性化における TRPM2 の役割～脳虚血傷害の病態に則した活性化刺激による検討～

脳における免疫応答を担うミクログリアは、周辺環境の維持に寄与する一方で、病態下において活性化し、それに伴う一酸化窒素(NO)やサイトカイン類の産生・放出などを介して、疾患の増悪を促すことが報告されている。近年、このようなミクログリアの機能には種々のイオンチャネルが深く関連することが明らかにされてきた。TRP チャネルファミリーの 1 つである transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) チャネルは、過酸化水素をはじめとする活性酸素種による酸化的ストレスなどにより活性化される非選択的カチオンチャネルで、様々な組織に分布することが知られており、単球系の免疫細胞に発現する TRPM2 が末梢における病態の増悪因子として働くことなども報告されている。また、中枢神経系において神経細胞のみならずミクログリアでの発現が報告されている。そこで本検討では、病態時における活性化ミクログリアの細胞傷害的な炎症反応において TRPM2 が果たす役割について着目し検討を行った。

野生型マウス由来ミクログリアにおいて、TRPM2 の mRNA の発現が観察された。細胞内 Ca²⁺濃度測定法を用いた結果において、野生型ミクログリアで観察された LPS+IFN γ による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が、TRPM2-KO ミクログリアではほとんど観察されなかった。また、LPS+IFN γ の 48 時間処置によって野生型ミクログリアで観察された iNOS の mRNA 発現増大が TRPM2-KO ミクログリアにおいて有意に抑制されていた。Ca²⁺キレーターである BAPTA やリン酸化キナーゼ Pyk2 阻害薬である AG17、及び MAPK の一種である p38 および JNK 阻害薬である SB302580、SP600125 の適用により、野生型ミクログリアにおいて NO 産生増大の抑制が観察されたが、TRPM2-KO ミクログリアにおいては、これら阻害剤による有為な NO 産生増大の抑制は観察されなかった。さらに、western blot 法を用いて、LPS+IFN γ によるこれら MAPK のリン酸化状態の変化について、野生型および TRPM2-KO ミクログリアを比較したところ、同様の結果が得られた。以上の結果より、TRPM2 はミクログリアの炎症関連刺激による活性化に関与し、Pyk2/p38 および JNK 活性化を介した NO 産生増大に寄与していることが示された。このような経路は中枢性神経疾患の病態増悪に関与していることが示唆される。

(2) 多発性硬化症における TRPM2 の病態生理学的役割

多発性硬化症は、脳や脊髄などに病変が認められる中枢性脱髄疾患の一つであり、神経症状の再発と寛解をくり返すことが多く、詳細な原因は明らかにされていないが、慢性炎

症を伴うことからミエリン鞘への自己免疫反応が原因と考えられている。現在リンパ球の中枢への浸潤を抑制する薬剤が治療に用いられているが、重篤な感染症など副作用発現が問題とされていることから、新たな病態解明に基づく治療薬の創製が求められている。

近年、多発性硬化症の患者の脳においてミクログリア/マクロファージの異常活性化や過剰な活性酸素種の蓄積が報告されており、実際多発性硬化症の動物モデルにおいて、ミクログリア/マクロファージを除去したり、異常な活性化を抑制することで病態が改善することが報告されている。そこで、多発性硬化症の病態において、前述したミクログリア/マクロファージに発現する TRPM2 の活性化が重要であることが考えられたことから、多発性硬化症の動物モデルにおける TRPM2 の病態生理学的役割を検討した。

野生型マウスでは免疫惹起 10 日目頃より尾の緊張低下に該当するスコア 1 のマウスが現れはじめ、免疫惹起 21 日目に向けてその臨床スコアは上昇しピークをむかえるが、TRPM2-KO マウスでは、野生型と同時期に発症するが、その臨床スコアの上昇は顕著に抑制されること、すなわち改善することが明らかになった。LFB 染色およびヘマトキシリン&エオジン染色で組織学的に脊髄後角部分を解析したところ、野生型マウスの切片では LFB 染色画像で広範囲に脱髄が認められ、ヘマトキシリン&エオジン染色の画像では炎症性細胞の浸潤が認められるが、TRPM2 欠損マウス切片ではどちらも顕著に抑制されていた。

続いて、TRPM2 阻害による EAE スコアへの影響を検討した。ミコナゾールはエルゴステロール合成を阻害する抗真菌薬であり、TRPM2 阻害作用を有するが、10 mg/kg のミコナゾールを発症後である 16 日目より毎日腹腔内に投与した結果、野生型マウスにおいては vehicle 群で病態が悪化し続けたのに対し、ミコナゾール投与群では病態悪化が抑制された。しかし、TRPM2-KO マウスにおいてはミコナゾール投与による病態悪化の更なる抑制はみられなかった。従って、ミコナゾールは TRPM2 阻害作用を介して EAE の病態を改善するといえる。

TRPM2KO マウスにおける病態悪化の改善の原因を追求するため、まず脊髄における T 細胞数への TRPM2 欠損の影響を検討した。脊髄の回収はスコアのピーク付近である 21 日目に行った。EAE 発症により脊髄への T 細胞の浸潤が確認されたが、野生型マウスと TRPM2-KO マウスの間でその数に差はなかった。続いて同じく脊髄を回収し、炎症性サイトカインの組織含有量を定量したところ、IL1 β 量が TRPM2 の欠損によって減少していた。IL1 β は主にミクログリア/マクロファージ/ミクログリアにおいて産生されることから、TRPM2-KO によるグリア細胞の変化

を検討したところ、ミクログリア/マクロファージのマーカーである Iba1 の免疫活性強度の EAE 負荷による増大は、TRPM2-KO により顕著に減弱していた。

以上の結果より、TRPM2 の欠損あるいは阻害によって EAE の病態悪化が抑制され、その機序にはミクログリア/マクロファージ活性化抑制が一部関与していることが示唆される。

(3)ミクログリア遊走機構における TRPV1 の生理学的役割

中枢神経系における免疫担当細胞であるミクログリアは、正常時は神経活動や周辺環境の監視を行う一方で、脳卒中等の病態時は活性化して傷害領域へ遊走・集積することが知られている。ミクログリアの集積は、組織損傷時に漏出する ATP やグルタミン酸など神経伝達物質、炎症時に産生される CCL2 などのサイトカインによって引き起こされることが知られているが、不明な点も多く残されている。

Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)は、カプサイシンや熱、酸などによって開口する Ca²⁺透過性カチオンチャネルであり、末梢神経において疼痛との関連が報告されている。近年 TRPV1 はエンドカンナビノイドやアラキドン酸代謝産物などを内因性のリガンドとして、脳内においても機能的に発現していることが報告されているが、ミクログリアにおける TRPV1 の機能には不明な点が多く残されている。そこで本検討ではミクログリアの走化性に着目し TRPV1 の生理的役割について検討を行った。

ポイデンチャンバーを用いてミクログリアの走化性について評価したところ、野生型マウス由来のミクログリアではカプサイシンの濃度依存的に走化性の上昇が観察されたが、TRPV1 欠損マウス由来のミクログリアではこのような現象は観察されなかった。さらにこの遊走は TRPV1 遮断薬、ミトコンドリア機能阻害、活性酸素種除去剤、p38 阻害薬、JNK 阻害薬により抑制された。免疫組織化学的手法によりミクログリアにおいて TRPV1 の免疫陽性が確認されたものの、カプサイシンをミクログリアに適応しても膜電流や細胞内 Ca²⁺濃度に変化が観察されなかった。より詳細な免疫組織化学的手法により細胞内局在を検討した結果、TRPV1 は一部のミトコンドリアや ER、リソソームに存在していた。ミトコンドリアは ER やリソソームとは違い、細胞内 Ca²⁺を取り込むオルガネラとして知られているため、ミトコンドリアに着目して検討したところ、カプサイシンによりミトコンドリア内 Ca²⁺濃度の上昇やミトコンドリアの脱分極が引き起こされることが明らかとなった。以上の結果より、ミクログリアにおける TRPV1 の活性化はミトコンドリアの脱分極を引き起こし、活性酸素種を産生させ、MAPK を介して走化性を向

上させることが示唆される。

(4)脳虚血傷害における TRPV1 の病態生理学的役割

世界的な高齢化社会の到来により、中枢神経変性疾患の症例数の増加が著しい。脳血管疾患は世界の死因において心疾患の次に症例数が大きく、また発症後死に至らずとも麻痺や後遺障害が残ることが多く、医療経済学的にも大きな問題となっている。近年、脳血管が梗塞されることで発症する脳虚血傷害においてミクログリア/マクロファージが病態の増悪に深く関与していることが示唆されている。前項において、ミクログリアに発現する TRPV1 刺激が細胞機能に影響を及ぼすことが明らかとなったことから、本項目では脳虚血傷害のモデルであるマウス中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルを用いて、TRPV1 遺伝子欠損 (TRPV1-KO) および TRPV1 遮断薬 capsazepine の投与による影響を再灌流 24、48 時間において経時的に評価した。その結果、capsazepine 投与群では vehicle 投与群と比較し神経症状および運動機能は有意に改善し、梗塞巣体積は有意に減少した。TRPV1-KO マウスでは野生型マウスと比較し、再灌流 24、48 時間において、神経症状および運動機能、梗塞巣体積が有意に改善または減少した。しかしながら、免疫組織化学的検討ではミクログリア/マクロファージマーカー Iba1、アストロサイトマーカー GFAP、好中球マーカー Gr1 陽性細胞数に有意差は認められなかったこと。以上の結果より、脳虚血再灌流傷害において、神経症状および運動機能の増悪、梗塞巣体積の増大に TRPV1 が関与していることが明らかとなった。TRPV1 を介した病態増悪のメカニズムにおいて、ミクログリアおよびマクロファージ、アストロサイト、好中球の活性化は重要ではなく、他の細胞群/メカニズムが関与し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 3 件)

Miyake T, Shirakawa H, Kusano A, Sakimoto S, Konno M, Nakagawa T, Mori Y, Kaneko S. “TRPM2 contributes to LPS/IFN γ -induced production of nitric oxide via the p38/JNK pathway in microglia.” *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有り) 444:212-217, 2014. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.022.

Miyake T, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. “Activation of mitochondrial transient receptor potential vanilloid 1 channel contributes to microglial migration.” *Glia.* (査読有り) 63:1870-1882,

2015. DOI: 10.1002/glia.22854.

Miyanojara J, Shirakawa H, Kusano A, Sakimoto S, Konno M, Nakagawa T, Mori Y, Kaneko S. “A pathophysiological role of TRPV1 in ischemic injury after transient focal cerebral ischemia in mice.” *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有り) 467:478-483, 2015. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.027.

〔学会発表〕(計 8 件)

金子周司ら「TRPM2 は免疫グリア細胞の活性化を介して炎症性および神経障害性疼痛を増悪する」シンポジウム『イオンチャンネルと痛み：最新の研究動向』第 136 回日本薬学会年会、2016 年 3 月 26-29 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

筒井真人ら「多発性硬化症における TRPM2 チャンネルの病態生理学的役割」第 128 回日本薬理学会近畿部会、2015 年 11 月 20 日、千里ライフサイエンスセンター (大阪府)

Miyanojara J et al., 「Protective effects of minocycline against cognitive impairment in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion」9th International Congress on Vascular Dementia, 2015 年 10 月 16-18 日、Ljubljana, (Slovenia)

白川久志ら「Activation of mitochondrial TRPV1 contributes to microglial migration」平成 27 年度生理研研究会 (TRP 研究会 2015 TRPs and SOCs ~ Unconventional Ca²⁺ Physiology ~、2015 年 6 月 4-5 日、岡崎生理学研究所 (愛知県))

白川久志ら「アストロサイトにおける S1P 誘発応答への TRPC6 チャンネルの関与」日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25-28 日、神戸学院大学 (兵庫県)

金子周司ら「単球系列細胞に発現する TRPM2 の病態生理学的役割」第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 21-23 日、神戸国際会議場 (兵庫県)

三宅崇仁ら「ミクログリアにおける TRPV1 を介した走化性制御」平成 26 年度生理研研究会 (TRP チャンネル研究を通じて見えてきた新たな生理学への光、2014 年 6 月 5-6 日、岡崎生理学研究所 (愛知県))

白川久志ら「脳虚血傷害の病態進展における免疫系細胞 TRP チャンネルの役割」第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19-21 日、仙台国際センター (宮城県)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/channel/ja/research/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

白川 久志 (SHIRAKAWA HISASHI)
京都大学・大学院・薬学研究科・准教授
研究者番号： 50402798

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

金子 周司 (KANEKO SHUJI)
京都大学・大学院・薬学研究科・教授
研究者番号： 60177516

中川 貴之 (NAKAGAWA TAKAYUKI)
京都大学・大学院・医学研究科・准教授
研究者番号： 30303845