



# 活性化ミクログリアの脳移植による 神経変性疾患に対する細胞治療

(研究課題番号 16390066)

平成 16 年度~平成 17 年度科学研究費補助金  
(基盤研究(B)) 研究成果報告書

平成 18 年 3 月

研究代表者 仲田 義啓

(広島大学大学院医歯薬学総合研究科・教授)



## 〈はしがき〉

脳内のマクロファージ様免疫細胞であるミクログリアは、脳虚血や脳傷害時に速やかに活性化される。また、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患においてもミクログリアの病巣部への蓄積と活性化が認められている。しかし、ミクログリアの活性化が神経変性の原因なのか結果なのかいまだに一致した結論は得られていない。それはこの細胞が神経保護と神経毒性の両性質を発揮するからである。つまり、ミクログリアは神経保護物質を放出し傷ついた神経の救済にあたる一方、傷害性物質をも放出し、脳のさらなる組織破壊を誘導する。従って、ミクログリアを神経保護細胞あるいは神経傷害性細胞へと変換させるメカニズムを明らかにすることができれば、神経傷害を最小限に止め、神経保護機能を最大限に発揮させることが可能となるかもしれない。

これまでに研究代表者は、神経障害時に細胞から大量に放出される ATP がミクログリアを活性化し、腫瘍壊死因子(TNF)を放出させることを報告してきた(Hide et al., *Journal of Neurochemistry*, 75: 965-972, 2000)。ミクログリアからの TNF 産生・放出の細胞内シグナルを検討した結果、イオンチャネル型 ATP 受容体である P2X<sub>7</sub> 受容体と MAP キナーゼの役割が明らかとなった。さらにミクログリアが神経に対して傷害的なのか保護的なのかをミクログリアと神経細胞の共培養を用いて検討した結果、ATP により P2X<sub>7</sub> 受容体を介して活性化を受けたミクログリアはグルタミン酸神経毒性から神経細胞を保護することを初めて明らかにした。一方、LPS 刺激したミクログリアにはこの保護効果は認められず、むしろ神経細胞死を増強する傾向さえ認められた。これらの結果は、ミクログリアは P2X<sub>7</sub> 受容体活性化を受けた場合に特異的に神経保護効果を発揮する可能性を示すものである。また、ミクログリアに発現する  $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体は、イオンチャネルとは異なる特性 (PLC 活性化と IP<sub>3</sub> 産生) を持ち、P2X<sub>7</sub> 受容体活性化ミクログリアからの TNF 遊離を増強し、LPS 活性化ミクログリアからの TNF 遊離を抑制することを明らかにした。さらに、ミクログリアの神経保護活性を *in vivo* で検討する目的で、ラット脳虚血モデルへのミクログリアの脳移植を試みた。その結果、著明な神経細胞死抑制効果が認められた。

本研究の成果より、P2X<sub>7</sub> 受容体活性化がミクログリアの神経保護機能の発揮に重要な役割を果たすことが示された。また、 $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体がミクログリアの炎症反応を抑制し神経保護作用を効率よく発揮させる可能性も明らかとなった。さらにミクログリア細胞治療の有効性も確認された。これらの知見が、神経変性疾患や脳血管障害における新たな治療法開発への礎となれば幸いである。

広島大学図書

0130516848



## 研究組織

研究代表者： 仲田義啓 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科・教授)

## 交付決定額(配分額)

(金額単位：円)

|          | 直接経費      | 間接経費 | 合計        |
|----------|-----------|------|-----------|
| 平成 16 年度 | 5,800,000 | 0    | 5,800,000 |
| 平成 17 年度 | 1,900,000 | 0    | 1,900,000 |
| 総計       | 7,700,000 | 0    | 7,700,000 |

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. 秀 和泉、仲田義啓：ミクログリアの活性制御と神経保護. 日本薬理学雑誌 124: 123-124 (2004)
2. Tomohisa Suzuki, Izumi Hide, Akiyo Matsubara, Chihiro Hama, Kana Harada, Kanako Miyano, Matthias Andrä, Hiroaki Matsubayashi, Norio Sakai, Shinichi Kohsaka, Kazuhide and Yoshihiro Nakata: Microglial  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP<sub>3</sub> pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *Journal of Neuroscience Research* 83: 1461-1470 (2006)

### (2) 口頭発表

1. 鈴木智久、松原明代、高坂新一、井上和秀、秀 和泉、仲田義啓：P2X<sub>7</sub>受容体活性化ミクログリアの神経保護作用. 第 47 回日本神経化学会 (大阪) 2004 年 9 月
2. 鈴木智久、松原明代、秀 和泉、仲田義啓：ATP 受容体および新規  $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体によるミクログリアの活性制御. 平成 16 年度生理学研究会 (岡崎) 2004 年 8 月
3. 秀 和泉、仲田義啓：ミクログリアの活性制御と神経保護作用. 第 32 回薬物活性シンポジウム (大阪) 2004 年 11 月

4. 濱 千紘、原田佳奈、宮野加奈子、松林弘明、酒井規雄、秀 和泉、仲田義啓： $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体はホスホリパーゼ C/IP<sub>3</sub>経路を介してミクログリアの機能を調節する。第 79 回日本薬理学会年会（横浜） 2006 年 3 月

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご助言をいただきました高坂新一先生（国立精神・神経センター所長）、井上和秀先生（九州大学大学院薬学研究院・教授）、谷口隆之先生（京都薬科大学病態生理学・教授）、北村佳久先生（京都薬科大学病態生理学・助教授）に謹んで御礼申し上げます。

## 序 論

### (1) はじめに

サイトカインは免疫・血液系をはじめとして発生、形態形成、生殖など末梢系の様々な生命機能の形成と維持に重要な役割を果たす。近年、これらサイトカインとその受容体が中枢神経系(CNS)にも多く発現していることが明らかになってきた<sup>1)</sup>。CNSのサイトカインは免疫応答分子としての機能に加え神経系細胞の分化の調節または栄養因子、神経回路形成や記憶の形成など末梢では認められない高次機能の形成に深く関与している。またサイトカインは誘導性で一過性の発現を呈し、標的細胞が限定されているという特徴を持つことから情報伝達分子としても機能し得る。実際、脳内の細胞間でサイトカイン受容体の発現パターンが異なることからサイトカインが情報伝達手段として用いられていると推測される。このように脳内では細胞間で複雑かつ極めて巧妙なサイトカインネットワークを形成し、脳という高度な情報処理機関を維持している<sup>2)</sup>。

### (2) 炎症性サイトカイン TNF と脳疾患

しかしながらこれらのサイトカインの過剰な産生は様々な脳疾患の原因となる証拠も集まりつつある。中でも炎症性サイトカインの腫瘍壊死因子(TNF)はアルツハイマー病<sup>3)</sup>、パーキンソン病<sup>4)</sup>、多発性脳硬化症<sup>5)</sup>など多くの神経変性疾患や AIDS 痴呆<sup>6)</sup>の脳に高濃度で検出されることからそれらの発症に深く関与すると考えられる。虚血や脳傷害は急性疾患であるにも関わらず、数時間または数日後にはその周辺に梗塞エリアの拡大を生じる。このとき傷害の周辺部には高濃度の TNF が検出されること、さらに虚血後に可溶性 TNF 抗体やアンチセンスオリゴヌクレオチドなど TNF の効力を中和する処置を行うと梗塞エリアの拡大が抑制されることから、虚血・傷害後のダメージの拡大に関与していることも間違いないようである<sup>7)</sup>。このように TNF は最も傷害初期に放出され多くの病態の成立に関与する傷害性サイトカインと考えられてきた。しかしながら近年 TNF が神経保護作用を持つことも明らかにされつつある。内因性の TNF が神経保護作用を有することを初めて報告したのは 1995 年 Bruce らのグループである<sup>8)</sup>。彼らは TNF 受容体をノックアウトしたマウスでは虚血や興奮性アミノ酸による傷害が野生型に比べて増大することを見いだした。この発見を皮切りに TNF が神経保護作用を持つことが多数報告されるようになった。TNF がどのような状況下で保護的になるのかは不明な点が多いが、発現時期<sup>9)</sup>、発現部位<sup>7)</sup>、発現濃度<sup>10)</sup>に依存することが示されている。また最近 TNF 受容体サブタイプの違いにより TNF の二面性が説明され得ることが、海馬と網膜神経細胞で報告された<sup>11,12)</sup>。脳内の TNF は主にミクログリアとアストロサイトによって産生される。中でもミクログリアはアストロサイトより微弱な刺激に应答して速やかに TNF を放出することから<sup>2)</sup> 脳疾患と TNF との関係を考える上で最も重要な細胞であるといっても過言ではない。

### (3) ミクログリア

中枢神経の発生の過程では多くの神経細胞が死滅することによって脳の特異的な構築が達成される。この時の神経細胞死はいわゆるプログラム細胞死で、最終的に食細胞により食食されて終息するが、中枢神経系ではミクログリアがその役割にあたる。このときのミクログリアは大きな細胞体

に短い突起をもつマクローファージ様の形態を呈し“ameboid ミクログリア”と呼ばれるが、生後はその数を減らしながら小さな細胞体に長い枝分かれした突起を持つ“ramified ミクログリア”へと形態を変化させる。しかし脳の異常をキャッチすると再び形態をアメーバ様へと変化させ増殖して、損傷組織へのアポトーシス誘導およびアポトーシスによって死滅した細胞の除去を開始する。従ってミクログリアは「脳の掃除屋」と考えられてきた。しかし近年、ミクログリアは主要組織適合性抗原 (MHC) class I と class II を発現して脳内の免疫反応を司ることや神経細胞をアポトーシスから保護すること、さらには学習や記憶といった高次機能の発現にも不可欠である可能性も示唆されており、多機能な細胞であることが明らかになりつつある<sup>13-15)</sup>。さらにミクログリアは Table1 および Table2 に示すように、極めて多くの種類のサイトカインやケモカインを放出し、かつ、その受容体を発現している<sup>16)</sup>。このことはミクログリアが脳内の免疫反応を調節すると共に、脳におけるサイトカインネットワークの中心的役割を果たす可能性を意味する(Fig.1)。従ってミクログリアは状況に応じて異なる神経栄養因子やサイトカインを使い分け神経細胞や周辺のグリア細胞の増殖や生死を運命づけることにより正常な脳のホメオスタシスを維持していると考えられる。しかしながらネットワークの中心に位置するがゆえに、その制御が破綻したときには周辺細胞に対し重篤な作用を及ぼす。過剰に活性化されたミクログリアから放出されるサイトカインが神経変性疾患を引き起こすことを示唆する多数の報告がそれを裏付ける<sup>17)</sup>。したがってミクログリアの活性化は厳密に制御されなければならない。

*in vivo* においてミクログリアを活性化する因子は今日までに様々な物質が候補として挙げられている。大きく分けて二つのカテゴリーに分類されるが一つは非物質的な刺激として電気的な刺激が考えられている。すなわち傷害を受けた神経細胞の周辺のイオン環境が変化しミクログリアが活性化する。もう一つのカテゴリーは生理活性物質による活性化であり、サイトカイン、 $\beta$ -amyloid タンパク、prion タンパク、HIV-関連タンパク、chromogranin A、Lipopolysaccharide (LPS) など多数報告されている<sup>18)</sup>。このように特定の病態下で発現する蛋白により活性化される報告が多いことから、ミクログリアが病態下で重要な役割を果たすことが推測される。上記のミクログリア活性化物質の中でグラム陰性菌の外膜構成成分であるリポポリサッカライド (LPS) はミクログリアを強力に活性化することから実験上の活性化ツールとして古くから用いられている。さらに近年、ミクログリアにおける ATP 受容体の発現が報告されて以来、細胞外 ATP による活性制御が注目されるようになった。

**Table 1. Cytokines and chemokines produced by microglia**

| Abbreviation                  | Full name  |
|-------------------------------|--|
| GRO $\alpha$                  | growth regulated oncogene $\alpha$                               |
| IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$   | interleukin-1 $\alpha$ /-1 $\beta$                               |
| IL-1ra                        | interleukin-1 receptor antagonist                                |
| IL-3                          | interleukin-3  |
| IL-6                          | interleukin-6  |
| IL-8                          | interleukin-8  |
| IL-10                         | interleukin-10   |
| IL-12                         | interleukin-12   |
| IL-15                         | interleukin-15   |
| IL-18                         | interleukin-18, also interferon- $\gamma$ inducing factor (IGIF) |
| IP-10                         | gamma interferon inducible protein-10                            |
| MCP-1                         | monocyte chemoattractant protein                                 |
| M-CSF                         | macrophage colony stimulating factor                             |
| MDC                           | macrophage derived chemokine                                     |
| MIP-1 $\alpha$ /MIP-1 $\beta$ | macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ /-1 $\beta$           |
| MIP-2                         | macrophage inflammatory protein-2                                |
| MIP-3 $\beta$                 | macrophage inflammatory protein-3 $\beta$                        |
| TGF- $\beta$                  | transforming growth factor $\beta$                               |
| TNF                           | tumor necrosis factor  |
| RANTES                        | regulated on activation, normal T cell expressed and secreted    |

**Table 2. Expression of Cytokine and chemokine receptors in microglia**

| Chemokine receptors | Cytokine receptors |                |
|---------------------|--------------------|----------------|
| CCR3                | IL-1R              | GM-CSFR        |
| CCR5                | IL-2R              | IFN $\gamma$ R |
| CXCR2               | IL-3R              | M-CSFR         |
| CXCR3               | IL-4R              | TGFR           |
| CXCR4               | IL-6R              | TNFR           |
| CX3CR1              | IL-10R             |                |
| IL-8R               | IL-12R             |                |
|                     | IL-13R             |                |
|                     | IL-15R             |                |
|                     | IL-18R             |                |

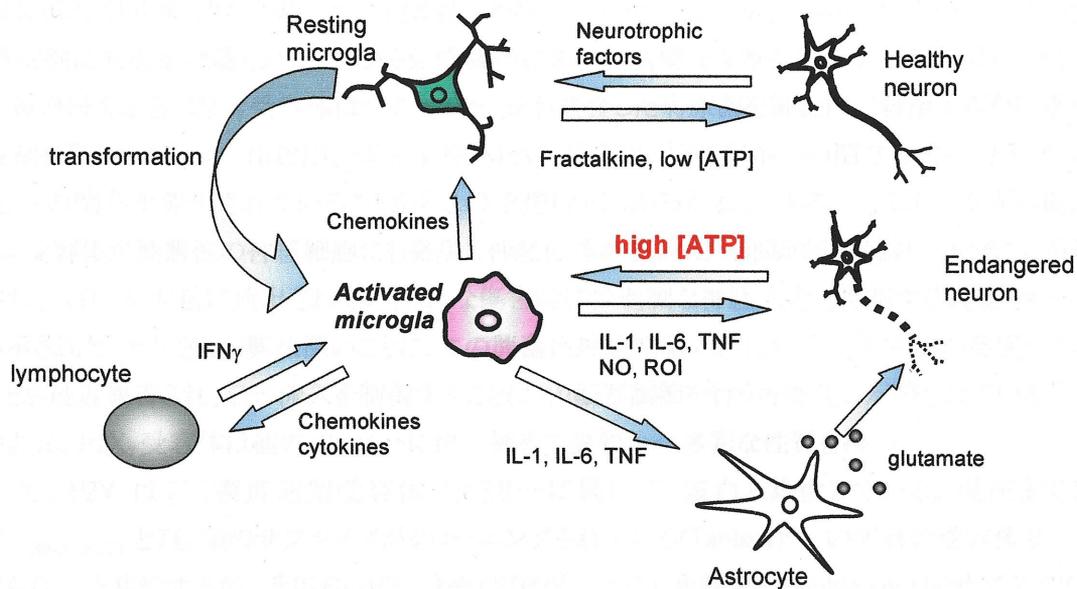


Fig.1 Simplified scheme illustrating some major routes of communication between microglia and other resident cells as well as invading cells as they involve cytokines/chemokines.

#### (4) 神経伝達物質としての ATP

細胞内のエネルギー代謝において中心的役割を果たしているプリンヌクレオチド ATP とその代謝物は細胞外から作用して多彩な生理機能を発揮する。ATP に対する受容体の存在は Burnstock により 1970 年代から提唱されていたが、1990 年のアデノシン受容体(P1 受容体)のクローニングを契機として ATP 受容体(P2 受容体)も次々とクローニングされ、その存在は遺伝子レベルで明らかとなった<sup>19-21)</sup>。ATP 受容体はイオンチャネル内蔵型 P2X と G 蛋白共役型 P2Y の二つに大別される。P2X 受容体はアミノ酸 400-500 個で構成されるポリペプチドで、膜二回貫通型の特徴的なトポロジーを示し、いくつかかがホモあるいはヘテロに会合し非選択的なカチオンチャネルを形成する。現在までに P2X<sub>1</sub> から P2X<sub>7</sub> までの 7 種類のサブタイプが知られている (Table.3)。P2X 受容体は末梢や中枢神経においてイオンチャネルとして機能し、早いシナプス伝達を担うだけでなく、男性生殖機能 (P2X<sub>1</sub>) や痛みの伝達 (P2X<sub>3</sub> または P2X<sub>2/3</sub>) を担うことから生体内で極めて重要な役割を果たすと考えられる。これら P2X 受容体のうち P2X<sub>7</sub> 受容体は他のメンバーには見られない、いくつかの特徴的な性質を持つ。以下にその例を挙げると、①非常に長い細胞内 C 末端領域をもつ<sup>22)</sup> ②他の P2X 受容体とヘテロ会合をしない<sup>19)</sup>、③持続的な活性化により 900Da までの分子を通過させるポアを形成する (ただし、最近 P2X<sub>2</sub> や P2X<sub>4</sub> でも同様に認められることが報告された<sup>23)</sup>)、④ATP<sup>4-</sup>を唯一のアゴニストとする。(生理条件下で ATP は Mg<sup>2+</sup> や Ca<sup>2+</sup> などの二価カチオンとキレートした状態で存在する。他の P2X メンバーは Mg<sup>2+</sup>-ATP<sup>4-</sup> や Ca<sup>2+</sup>-ATP<sup>4-</sup> もアゴニストとして作用するため μM オーダーの ATP により活性化されるが、P2X<sub>7</sub> 受容体は ATP<sup>4-</sup> を唯一のアゴニストとするためにその活性化に mM オーダーの ATP を必要とする)。P2X<sub>7</sub> 受容体がクローニングされた当初、

神経には発現せずミクログリア、マスト細胞、マクロファージ、リンパ球、アストロサイトといった免疫担当細胞に発現が確認されたことから免疫機能において重要な役割を果たすと推測されてきた。その後の研究から、P2X<sub>7</sub>受容体はマクロファージが貪食した病原菌を細胞内で殺菌する際に重要な役割を果たすこと、IL-1 $\beta$ 放出、NF $\kappa$ B や NFAT 活性化、抗原提示への関与やリンフォサイトの分化への関与が報告されていることからこの予想は正しかったようである<sup>24)</sup>。しかしながら最近 P2X<sub>7</sub> 受容体が興奮性の神経細胞にも発現し神経伝達物質放出を抑制的に制御していることが報告され、ATP が大量に放出されているような傷害時には過剰な神経入力を抑制する機能をもつことが示された<sup>25,26)</sup>。さらに興味深いことに、この興奮性神経細胞の核にも P2X<sub>7</sub>受容体が発現していることが最近報告され、Ca<sup>2+</sup>流入を制御することにより転写調節を行う可能性が示唆されている<sup>27)</sup>。このように P2X<sub>7</sub>受容体は他のメンバーに比べ極めて異彩かつ多彩な性質を持つ。

一方、P2Y は7回膜貫通型受容体ファミリーに属し G 蛋白と共役している。現在までに P2Y<sub>1,2,4,6,11,12,13</sub> と7種類のサブタイプがクローニングされている(Table.4)<sup>28)</sup>。いずれの受容体サブタイプも G<sub>q/11</sub>と共役するが、近年 G<sub>s</sub>(P2Y<sub>11</sub>)や G<sub>i</sub>(P2Y<sub>12,13</sub>)にも共役する(double couple)サブタイプも報告されている<sup>29)</sup>。P2X 受容体同様 P2Y 受容体も MAP キナーゼ活性化、血小板凝集(P2Y<sub>1</sub>,P2Y<sub>12</sub>)や細胞増殖(P2Y<sub>2</sub>)、樹状細胞の成熟(P2Y<sub>11</sub>)など生体内で重要な役割を果たしている。

Table 3. Rank order of potency of ATP analogues for cloned P2X receptors

| Subtypes         | Species      | Potency order of agonists   |
|------------------|--------------|---|
| P2X <sub>1</sub> | rat<br>human | 2-MeSATP>ATP> $\alpha,\beta$ -meATP<br>ATP= $\alpha,\beta$ -meATP                       |
| P2X <sub>2</sub> | rat          | 2-MeSATP>ATP  |
| P2X <sub>3</sub> | rat          | ATP> $\alpha,\beta$ -meATP  |
| P2X <sub>4</sub> | rat<br>human | ATP, not $\alpha,\beta$ -meATP<br>ATP>> 2-MeSATP, not $\alpha,\beta$ -meATP             |
| P2X <sub>5</sub> | rat          | ATP>> 2-MeSATP, not $\alpha,\beta$ -meATP   |
| P2X <sub>6</sub> | rat          | ATP>> 2-MeSATP, not $\alpha,\beta$ -meATP   |
| P2X <sub>7</sub> | rat<br>human | BzATP>ATP> 2-MeSATP, not $\alpha,\beta$ -meATP<br>BzATP> ATP, not $\alpha,\beta$ -meATP |

Table 4. Character of cloned P2Y receptor

| Subtypes          | Species      | Potency order of agonists                         | Coupled protein |
|-------------------|--------------|---|-----------------|
| P2Y <sub>1</sub>  | human<br>rat | 2-MeSADP > ADP<br>> 2-MeSADP > ATP                | Gq/11           |
| P2Y <sub>2</sub>  | human<br>rat | UTP=ATP>Ap4A>ATPgS<br>UTP=ATP                     | Gq/11 Gi3       |
| P2Y <sub>4</sub>  | human<br>rat | UTP>ATPgS>>ATP,ADP<br>UTP=ATP=ITP=Ap4A            | Gq/11 Gi3       |
| P2Y <sub>6</sub>  | human        | UDP=5-Br-UDP>>UTP2-MeSADP<br>UDP>UTP>ADP>2-MeSATP | Gq/11           |
| P2Y <sub>11</sub> | human        | ATPgS=BzATP>ATP>2-MeSATP                          | Gq/11 Gs        |
| P2Y <sub>12</sub> | human        | ADP, ATP  | Gi              |
| P2Y <sub>13</sub> | rat          | ADP= 2-MeSADP,<br>not 2-MeSATP, ATP               | Gq/11 Gi        |

ATPは acetylcholine や noradrenalin などと共に神経伝達物質として放出されるだけでなく、細胞質に 10 mM 以上のレベルで存在することから虚血や傷害を受けた細胞からは大量の ATP が漏出する<sup>30)</sup>。従ってその近傍にいる細胞は  $\mu\text{M}$  ~ mM オーダーの ATP にさらされる。前述のようにミクログリアは中枢神経系において主要な TNF 産生細胞であるが、その放出の引き金になる内因性物質の詳細は不明であった。研究代表者らはミクログリアからの TNF 遊離を制御する物質として ATP に注目し、細胞外 ATP はミクログリアから TNF 遊離を引き起こすことを初めて明らかにした<sup>31)</sup>。

#### (5) 細胞外 ATP はミクログリアから TNF 遊離を引き起こす

研究代表者らは、これまでに以下に示す知見を明らかにしてきた。3 mM ATP でミクログリアを刺激すると1時間後から TNF 遊離が認められ、6時間で最大に達しそれ以後減少が認められた (Fig.2A)。さらに濃度依存性の検討を行った結果、ATP 0.1 mM から緩やかな TNF 遊離が認められ、1 mM で最大の TNF 遊離が引き起こされ、それ以上の濃度では遊離量が減少した (Fig.2B)。次に TNF mRNA 発現に及ぼす細胞外 ATP の効果を Real time RT-PCR を用いて検討した結果、30 分後から TNF mRNA 発現が認められ1時間で最大に達し、その後緩やかに発現は減少した (Fig.2A)。これらの結果から細胞外 ATP は遺伝子転写を介して新たに TNF を産生し、細胞外へと放出させることが明らかになった。また P2X<sub>7</sub> 受容体選択的アゴニストである 2'-and 3'-O-(benzoyl-benzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP) でも同様の反応が認められ、この効果は P2X<sub>7</sub> 受容体遮断薬 Brilliant Blue G (BBG) により濃度依存的に抑制されたことから (Fig.3)、P2X<sub>7</sub> 受容体が重要な役割を果たすことも明らかにした<sup>32)</sup>。さらに ATP 誘発 TNF 遊離には MAP キナーゼの ERK (Extracellular signal-Regulated kinase) ならびに p38 が関与することも明らかにした。本研究ではさらに ATP 誘発 TNF 産生制御における MAP キナーゼ (ERK, JNK, p38) の役割とその活性化制御について検討し

た。また、神経細胞とミクログリアの共培養系を用いて ATP 受容体を介して活性化されたミクログリアが TNF 放出を介して大脳皮質神経細胞を保護することを明らかにした。さらに、この培養系で認められた効果が in vivo でも発揮されるのか、ラット脳虚血モデルを用いて検討した。

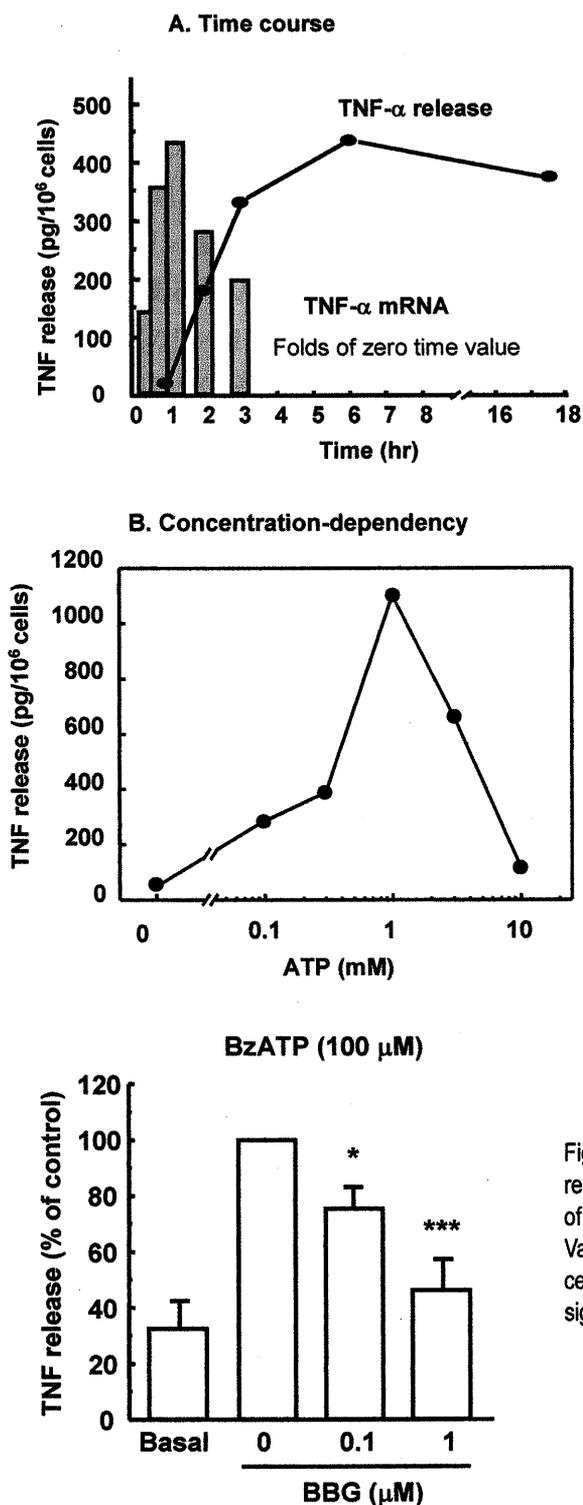


Fig.2 Effects of ATP on TNF release and TNF mRNA expression in rat cultured brain microglia. (A) Time course; (B) Concentration-dependency. The microglia were stimulated with 3 μM (A TNF release) or 1 mM (A TNF mRNA expression) or the indicated concentrations (B) of ATP and TNF release or mRNA expression were assayed after the indicated period of incubation (A) or three hours (B). Values are the means of two cultures from one experiment and a similar result was obtained in another set of independent experiments.

## I. ATP 誘発 TNF 遊離における Mitogen-activated protein kinase (MAPK) の役割

細胞は増殖因子やサイトカイン、あるいは物理化学的なストレスなど外部からの様々な刺激に応答して、増殖、分化、アポトーシスなど適応反応を示す。このような細胞外からの刺激を核へと伝達するシステムの一つとして MAP キナーゼが重要な役割を演じている。MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase, MAPK)は、insulin や種々の細胞増殖因子ならびに TPA などの発癌プロモーターにより共通に活性化されるセリン/スレオニンキナーゼとして 1980 年代後半に哺乳類培養細胞より見出された。その活性化には活性化ループ内の T-X-Y 配列のスレオニンとチロシン残基のリン酸化を必要とする。この両残基をリン酸化し、活性化する酵素が MAPK キナーゼ (MAPKK)である。MAPKK の活性化もその活性化ループ内のセリン/スレオニン残基のリン酸化を必要とし、このリン酸化を担う酵素を MAPKK キナーゼ (MAPKKK)と総称する。このように MAPK は MAPKKK-MAPKK-MAPK の 3 種類のキナーゼによりカスケードを構成し、細胞外からのシグナルはこれらのキナーゼによる一連のリン酸化反応を通じて増幅されつつ核へ伝えられる<sup>33)</sup> (Fig.4)。

MAPK ファミリーは最初に ERK(extracellular signal-regulated kinase) 1/2 が同定され、続いて JNK (c-Jun N-terminal kinase), p38 が同定された。JNK, p38 は放射線、紫外線、抗癌剤、高浸透圧、熱ショック、過酸化物質、エンドトキシン、血清除去など様々なストレスによって活性化されることからストレス応答 MAPK (stress-activated protein kinase: SAPK)と呼ばれている<sup>34)</sup>。近年、他のメンバーと比べて分子量が大きく(約 90 kDa)、特徴的な C 末端構造をもつ ERK5 が同定されその機能解析が進められている<sup>35)</sup>。これら MAP キナーゼカスケードは独立したシグナル伝達経路を構成し、細胞増殖、癌化、アポトーシス、免疫応答などの固有の機能を有している。ミクログリアにおいても MAPK 活性化を引き起こす物質が多数同定されており、サイトカインや誘導酵素合成をはじめとする多くの蛋白産生に重要な役割を果たす<sup>36)</sup>。当研究室では細胞外 ATP がミクログリアの ERK, p38 を活性化すること、そして MEK (ERK を活性化する MAPKK) 阻害薬 U0126 ならびに p38 阻害薬 SB203580 は ATP または BzATP 誘発 TNF 遊離を強く抑制することから、これら MAPK が TNF 遊離において重要な役割を果たすことも報告した<sup>31)</sup>。

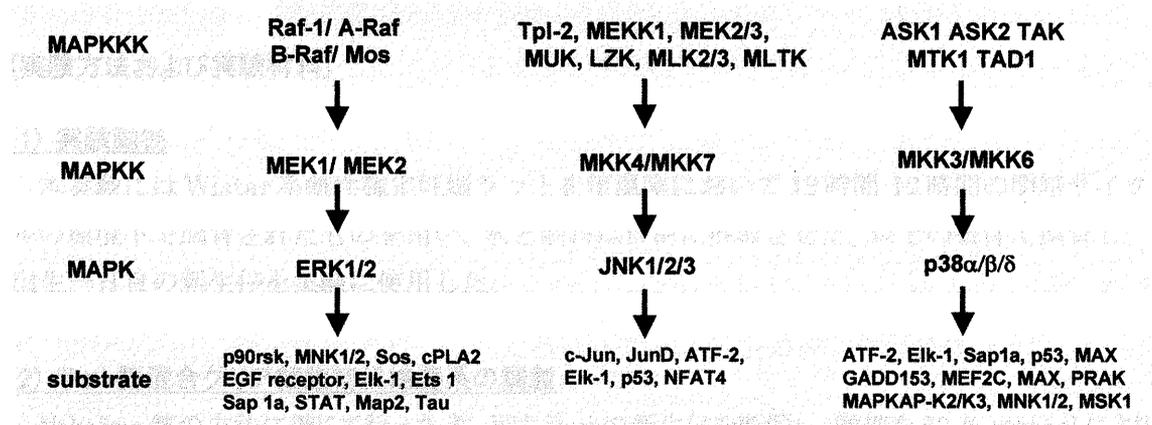


Fig.4 MAP kinase cascades.

Fig.5 に示すように TNF は転写された後、膜貫通型 26kDa の pro-TNF として産生され、その後 TNF- $\alpha$ 変換酵素(TNF- $\alpha$  converting enzyme: TACE)により切断されて細胞外へと放出される。このように TNF は転写調節、転写後調節、翻訳調節、放出制御と数段階にわたる調節を受け、その放出は厳密に制御されている。この調節には ERK, p38 MAPK が重要な役割を果たすことが数多く報告されているが、TNF 産生のどのステップを制御するかは、細胞・刺激の種類・動物種の違いにより異なる。一方、JNK も TNF 遊離において重要な役割を果たす報告があるものの、特異的阻害薬が発見されていなかったことから間接的に証明したものがほとんどであった。しかし ERK, p38 特異的阻害薬発見から約 7 年経った昨年、ようやく JNK 活性を直接阻害する化合物 SP600125 が報告された<sup>37)</sup>。そこで本章では U0126, SB203580 に加え SP600125 を用いて、これら MAPK が ATP 誘発 TNF 産生をどのように制御するかを検討した。

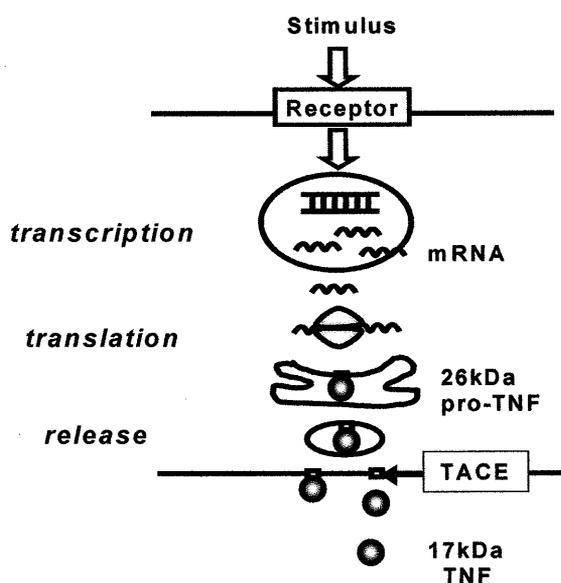


Fig.5 TNF is released by the action of cell surface protease, TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE). TNF is synthesized as a precursor of Mr 26,000 (26kDa), which is processed to a secreted 17kDa mature form by TACE.

## [実験方法および実験材料]

### (1) 実験動物

本実験には Wistar 系雌性確定妊娠ラットを恒温室において 12 時間-12 時間の明暗サイクルの環境下で飼育されたものを用い、水と飼料は自由に摂取させた。以上の条件で飼育し、出生一日目の新生仔を実験に使用した。

### (2) ラット脳混合グリア細胞初代培養系の調製

Nakajima 等の方法に準じて行った<sup>38)</sup>。即ちラットの新生仔を断頭し、頭部を 70 % ethanol により消毒したのち、無菌的に全脳を取り出し PBS に浸した。これを実体顕微鏡下で先細ピンセットを用

いて小脳を取り除き、さらに大脳髄膜を剥離したのち、剃刀を用いて十分ミンスした。これに 0.25 % trypsin を添加し、37 °C で 10 分間処置して細胞を分散させ、溶出した DNA を切断するために DNase I (最終濃度 0.5 mg/mL) を 30 秒間処理した。胎児ウシ血清(FCS)(最終濃度 33 %) を添加し、trypsin の反応を停止させた後、1000 rpm 6 分間遠心し、10 % FCS-DMEM に再懸濁し、70  $\mu$ m ナイロンメッシュに通して細胞分散液とした。この細胞分散液の一部を trypan blue 染色し光学顕微鏡下で生存している細胞数を計測した後、10  $\mu$ g/mL ポリ-L-リジン処理した 75 cm<sup>2</sup> 培養フラスコあたり、 $1.5\sim 2.0\times 10^7$  cells 播種し、10 % CO<sub>2</sub>-90 % air、37 °C 設定のインキュベーターで培養し、以後2日ごとに培地を交換した。

### **(3) ミクログリアの分離調製**

上記初代混合グリア細胞において 7 日後あたりから、フラスコに広がったアストログリアの層上に球状で弱付着性のまたは浮遊性のミクログリアが出現する。この状態からミクログリアの分離を行った。培養フラスコを振幅 20 cm、80 回/分の速さで 6 分間 8 の字に振盪し、上清を細胞浮遊液として回収した。この細胞をプレートやシャーレに播き 45 分間接着させた後、メディウムを吸引して非接着細胞を除去した。この過程により精製した細胞を FITC 標識したミクログリアマーカー、FITC-Isolectin B<sub>4</sub>を用いて免疫染色を行った結果、99 %がミクログリアであることを確認した。よってこの方法で細胞を回収して以下の実験に用いた。

### **(4) 培地**

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)に penicillin G (100 U/mL)、streptomycin (100  $\mu$ g/mL)、牛胎児血清(FCS, 10 %)を最終的に( )内に示す濃度になるように添加した。なお牛胎児血清は 56 °C で 30 分非働化してから使用した。

### **(5) TNF 遊離量の定量**

細胞浮遊液を 24 well プレートに  $1.5\times 10^5$  cells/0.4 mL/well で播き、45 分後にメディウムを除去し精製した。DMEM 培養液中(FCS free)各阻害薬で処置後、ATP または BzATP など刺激し、培養上清中に放出された TNF を ELISA kit を用いて定量した。定量はキットの説明書に従った。細胞内の TNF 量は ATP または BzATP で 2 時間後、細胞を 0.1 % triton-X 100 で可溶化して ELISA により定量した。サンプルは定量するまで -80 °C で保存した。

### **(6) total RNA 抽出**

60 mm シャーレにミクログリアを  $7.5\times 10^5$  cells/3 mL/シャーレで播き 45 分後にメディウムを除去し精製した。DMEM 培養液中(FCS free)各阻害薬で処置後、ATP または BzATP で 1 時間刺激した。刺激1時間後、DMEM をアスピレートし、細胞表面をリン酸緩衝液(PBS)で洗浄した後 Trizol<sup>TM</sup> LS 試薬(mono-phasic solution of phenol, guanidine isothiocyanate) 300  $\mu$ L を加え、セルスクレーパーで細胞を剥離後、超音波にて細胞を粉碎した。その後 chloroform 80  $\mu$ L を加え 10 分静置した

後、4 °C、13,000 rpm で 15 分遠心して、その上清を他のチューブに移すことにより DNA と蛋白を除去した。分離した上清に isopropanol 200 µL を加え-20 °C で少なくとも 1 時間冷却した後、4 °C、13,000 rpm で 20 分間遠心し上清を除去した。生じた RNA の沈殿に 400 µL の 75 % ethanol (in diethylpyrocarbonate (DEPEC)-treated water: RNase free H<sub>2</sub>O)を加え、4 °C、8,000 rpm で 20 分間遠心して RNA を洗浄した。最終的に得られた沈渣を TE buffer (Tris-EDTA buffer) 10 µL に溶解して total RNA サンプルとした。RNA 量は 260 nm における吸光度によって測定した。

#### **(7) Real Time RT-PCR 法による TNF mRNA の定量**

(6)で調製した RNA 1 µg を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として TNF mRNA と GAPDH (内部標準)mRNA に特異的な primer を用い、熱変性 15 sec/ 95 °C、アニーリング 10 sec/ 57 °C、伸長反応 1 min/72 °C を 40 サイクルを ABI PRISM 7700 を使用しリアルタイム PCR 増幅を行った。各サンプル mRNA 定量は各 PCR 産物を含むプラスミドを用い、コピー数とサイクル数(Ct 値)の関係で求めた。

#### **(8) 核および細胞質の分画**

NE-PER kit <sup>TM</sup> を用い、kit の説明書に従った。即ち、10 mm シャーレにミクログリアを 1.0×10<sup>6</sup> cells/8 mL/シャーレで播き(各点ダブレット)、DMEM 培養液中 SB203580 で 20 分間処置後 ATP または BzATP で一時間刺激した。(以下すべて氷上操作)その後、各シャーレ 650 µL PBS で細胞を回収し2,000 rpm、4 °C で 4 分間遠心した。上清を除去して沈渣に Cell Extra Reagent-1 (CER-1) を添加し、激しく 15 秒間ボルテックス後 10 分間静置し、Cell Extra Reagent-2 (CER-2)を添加し、再び激しく 5 秒間ボルテックスして1分間静置した。さらに 5 秒のボルテックス後 10,000 rpm、4 °C で 10 分間遠心し上清を細胞質画分とした。沈殿に NER を加え 10 分おきに激しく 15 秒間ボルテックスしこの操作を 40 分間続けた。最後に 10,000 rpm、4 °C で 20 分間遠心し、上清を核画分とした。これらをサンプルとして(6),(7)または(9)の実験を行った。

#### **(9) Western blotting 法による分画の確認**

(8)により分画した核と細胞質画分をタンパク定量した後 SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl: pH6.8, 2 % w/v SDS, 10 % glycerol, 50 mM DTT, 0.1 % w/v bromophenol blue)に溶解し 95 °C で 5 分間熱処理した。サンプル中のタンパク質を SDS-polyacrylamide-gel electrophoresis (

SDS-PAGE 7.5% gel) で分離した後、PVDF 膜に転写した。一次抗体には、核マーカーとして Oct-1(1:200)、細胞質マーカーとして HSP90(1:200)を用い、HRP 標識 anti-Rabbit IgG を反応させ、ECL で検出した。

#### **(10) 使用試薬および使用機器**

実験に使用した試薬は以下の通りである。Anti-HSP90 (H-114)、Anti-mouse IgG-B、Anti-Oct1 (c-21)、Anti-Oct1 (c-21)、Anti-rabbit IgG-B (Santa Cruz)、ATP、BzATP (Sigma)、DNase

(Roche)、Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma, D5796)、NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (PIERCE)、U0126、SB203580 (Promega)、SP600125 (BIOMOL)、Trizol™ LS Reagent (GIBCO)、Rat TNF ELISA kit (Cytoscreen) (Bioscience)。その他の一般試薬は得られる最高の純度のものを用いた。

### [実験結果]

#### (1) ATP 誘発 TNF 遊離における JNK の役割

SP600125 は他の MAPK メンバーに比較して 300 倍以上選択的に JNK 活性を抑制する化合物として報告された<sup>37)</sup>。この報告において SP600125 は Th1、Th2 細胞やモノサイトからの TNF 遊離を濃度依存的に抑制することから、ATP 誘発 TNF 遊離においても JNK が重要な役割を果たすことが予測される。そこでまず ATP 誘発 TNF 遊離に及ぼす SP600125 の影響を検討した。その結果 SP600125 は ATP 誘発 TNF 遊離を濃度依存的に抑制した(Fig.6a)。P2X<sub>7</sub> 受容体選択的アゴニスト BzATP 刺激においても同様の結果が得られた(Fig.6b)。この結果から JNK も ERK、p38 と同様に ATP 誘発 TNF 遊離において重要な役割を果たすことが示唆された。

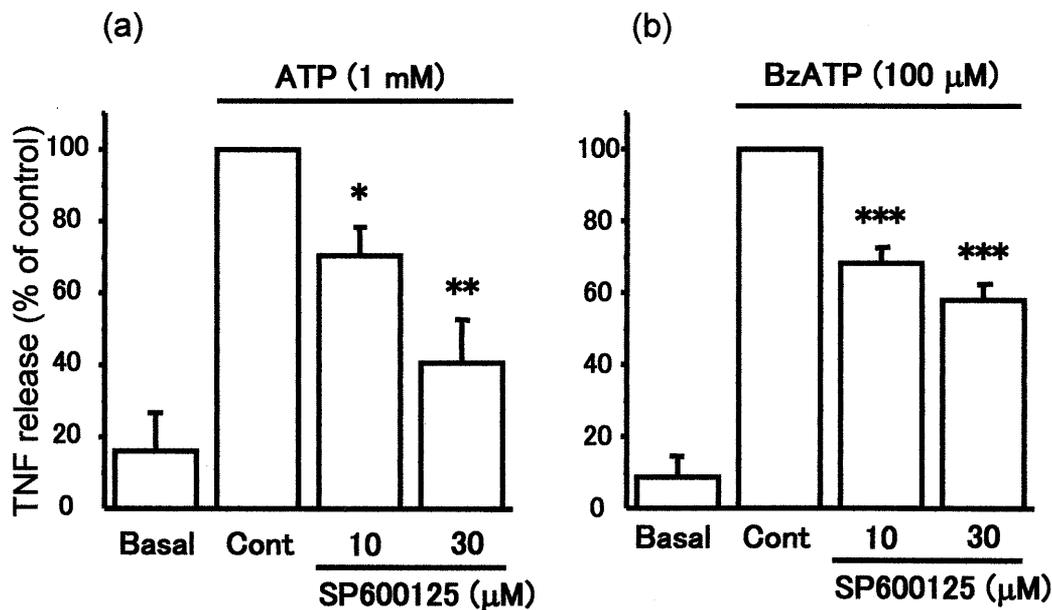


Fig.6 Effects of SP600125 on ATP/BzATP-induced TNF release in rat cultured microglia. The cells were preincubated with 10 or 30 μM SP600125 for 20 min and stimulated with 1 mM ATP (a) or 100 μM BzATP (b) for 3 hr. Values are expressed as mean ± SEM of percentage of release of compared with ATP or BzATP only. Values for 100% for release of TNF were 184.1 ± 28.8 and 938.3 ± 252.4 pg/10<sup>6</sup> cells in ATP- or BzATP-stimulated microglia, respectively. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, significantly different from the control.

## (2) 細胞内 TNF 産生に及ぼす MAPK 阻害薬の影響

Fig.5 に示したように、TNF は TNF 変換酵素 (TACE) により放出過程でも制御を受けるが、最近この TACE 活性が MAPK により制御されることが報告された<sup>39)</sup>。従って MAP キナーゼは TNF 産生のみならず TNF 放出過程においても役割を果たす。上述のように各 MAPK 阻害薬が ATP 誘発 TNF 遊離を抑制したことから、その作用点が産生の抑制か産生後の放出過程の抑制なのかを明らかにする目的で、ATP/BzATP 誘発細胞内 TNF 産生に及ぼす MAPK 阻害薬の効果を検討した。その結果 U0126, SB203580, SP600125 はいずれも、ATP または BzATP によって引き起こされる細胞内 TNF 産生を有意に抑制した(Fig.7 a,b)。従って、ERK, JNK, p38 はいずれも TNF 産生過程を制御することが示唆された。

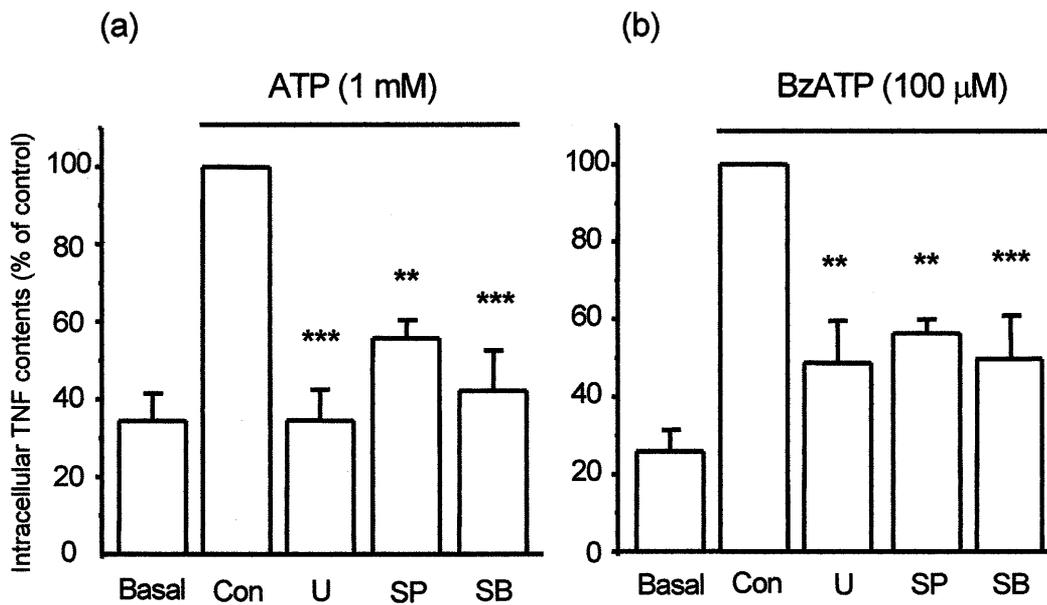


Fig.7 Effects of U0126 (U), SP600125 (SP) and SB203580 (SB) on ATP/BzATP-induced TNF production in rat cultured microglia. The cells were preincubated with 10  $\mu$ M U0126, 30  $\mu$ M SP600125 and 15  $\mu$ M SB203580 for 20 min and stimulated with 1 mM ATP(a) or 100  $\mu$ M BzATP(b) for 2 hr. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM of percentage of release of compared with ATP or BzATP only. Values for 100 % for release of TNF were 407.05  $\pm$  45.6 and 530.9  $\pm$  58.5 pg/10<sup>6</sup> cells in ATP- or BzATP-stimulated microglia, respectively. \*\*P<0.01, \*\*\*<0.001, significantly different from the control.

## (3) ATP 誘発 TNF mRNA 発現に及ぼす MAPK 阻害薬の影響

MAPK が ATP 誘発 TNF 産生過程を制御することが示唆されたことから、次に ATP/BzATP 誘発 TNF mRNA 発現に及ぼす MAPK 阻害薬の影響を検討した。その結果 U0126 と SP600125 は ATP または BzATP 誘発 TNF mRNA 発現を有意に抑制したのに対し、SB203580 では影響は認められなかった(Fig.8 a,b)。従って、ERK, JNK は TNF mRNA 発現を制御する一方で、p38 は転写後から翻訳までの過程を制御することが示唆された。

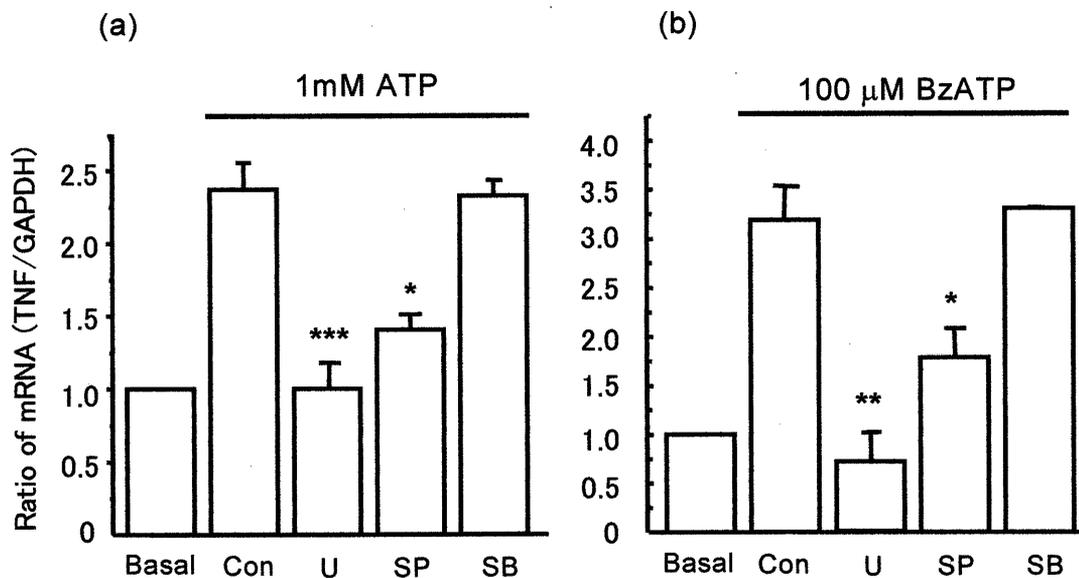


Fig.8 Effects of U0126 (U), SB203580 (SB) and SP600125 (SP) on ATP- or BzATP-induced TNF mRNA expression in rat cultured microglia. The cells were preincubated with 10  $\mu$ M U0126, 15  $\mu$ M SB203580 or 30  $\mu$ M SP600125 for 20 min and stimulated with 1 mM ATP (a) or 100  $\mu$ M BzATP (b) for 1 hr. Values shown as the ratio of TNF mRNA versus GAPDH mRNA. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of ratio of expression compared with ATP or BzATP only. \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01, \*P<0.05 significantly different from the control.

#### (4) SB203580 の TNF mRNA 核外輸送に及ぼす影響

RNAは核内で転写された後、蛋白産生のある細胞質へと輸送される。UsnRNAあるいはtRNAといった低分子量のRNAに関しては、特異的エクスポーチンが同定されそのメカニズムが明らかになりつつある<sup>40)</sup>。より構造の複雑な mRNA においても核外輸送に関する特異的な結合蛋白などが明らかにされつつあるものの、その機序は不明な点が多い。しかしながら最近この過程が細胞質からのシグナルにより制御されることが報告された<sup>41)</sup>。そこで、ミクログリアの ATP 誘発 TNF 産生における p38 の転写後調節が TNF mRNA の核外輸送におけるものであるかを検討した。ATP または BzATP で1時間刺激したミクログリアを細胞質と核フラクションに分画し、各フラクションに含まれる mRNA の定量を試みた。まず核と細胞質の分画を確認するために細胞質マーカーの HSP90 と核マーカーの Oct-1 を用いたウエスタンブロッティングを行った。Fig.9(a)に示すように、basal, control, SB203580 処置群において HSP90 と Oct-1 はそれぞれ細胞質画分、核画分からのみ検出されたことから各フラクションが分離できていることが確認できた。そこでこの方法により分画したミクログリアの核と細胞質の各フラクションに含まれる mRNA を定量した。その結果、無刺激細胞(コントロール)では、ATP または BzATP 刺激により核内に発現した mRNA は細胞外へと輸送されたが、SB203580 により p38 を阻害すると mRNA は核内に蓄積し、細胞質での増加はほとんど認められなかった(Fig.9b)。従って、p38 は発現した mRNA の核から細胞質への輸送過程を制御している可能性が示唆された。

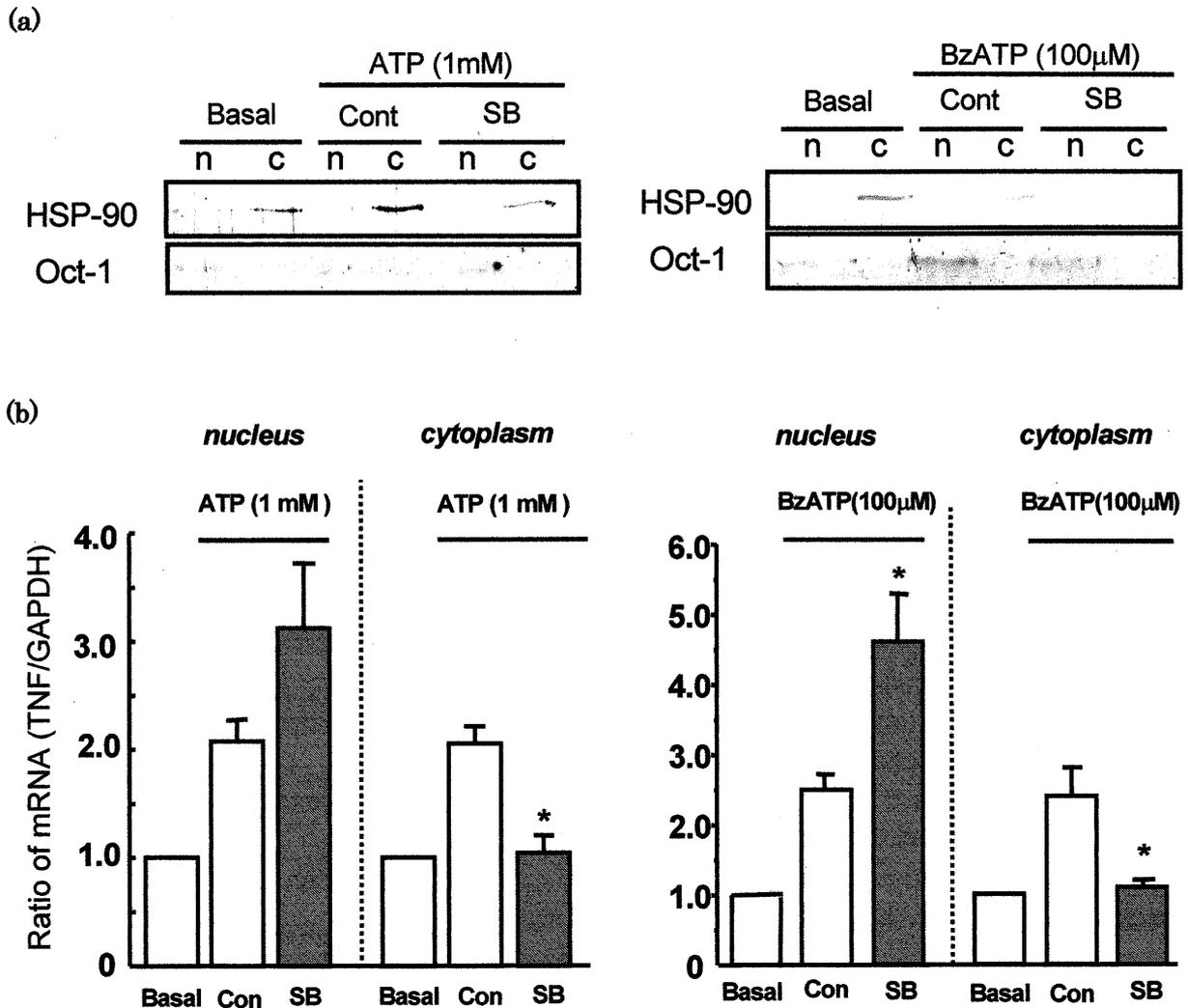


Fig.9 p38 regulates nucleocytoplasmic transport of TNF mRNA induced by ATP or BzATP. (a) Western blots of nuclear and cytoplasmic extracts were probed with antibodies to Oct1 (nuclear protein) and Hsp90 (cytoplasmic protein) to determine the efficiency of nucleocytoplasmic separation. (b) The effects of p38 inhibitor, SB203580 on distribution of the TNF mRNA in the nucleus and cytoplasm. The cells were preincubated with 15  $\mu$ M SB203580 for 20 min and stimulated with 1 mM ATP or 100  $\mu$ M BzATP for 1 hr. Then the cells were fractionated into nuclear and cytoplasmic fraction using NePer kit. Values shown as the ratio of TNF mRNA versus GAPDH mRNA. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of ratio of expression compared with ATP or BzATP alone. \*P<0.05, \*P<0.05 significantly different from the control.

### [考察]

本章の結果から ATP 誘発 TNF 遊離には、ERK, p38 に加え JNK も重要な役割を果たすことが明らかになった。しかしながら各メンバーの役割は異なり、ERK, JNK は遺伝子転写を制御する一方で p38 は mRNA の核から細胞質への輸送過程を制御することが明らかになった。

Table.5 に示すように TNF プロモーター領域には様々な転写因子が結合することが明らかにされ

ていることから<sup>42)</sup>、ERKもこれらの中のいずれかの転写因子を活性化して転写制御すると考えられる。NFAT阻害薬である calcineurin が ATP 誘発 TNF 遊離を抑制しなかったことから NFAT が関与しないことを確認しているものの(データ省略)、具体的にどの転写因子が関与するかは不明である。LPS 刺激したモノサイトにおいて、ERK が Elk-1 をリン酸化して Egr-1 の発現を誘導し、発現した Egr-1 が TNF のプロモーター領域に結合し TNF mRNA 発現を誘導することが報告されている<sup>43)</sup>。この Egr-1 発現のタイムコースが ATP 誘発 TNF mRNA 発現のタイムコースと一致することからこの転写因子が関与するかもしれない。

昨年初めて報告された特異的 JNK 阻害薬を用いて ATP 誘発 TNF 遊離における JNK の役割を検討した結果、ERK 同様 mRNA 発現を介して TNF 産生を制御していることが明らかになった。JNK も Fig.4 に示すように Activator protein-1(AP-1)の構成要素である c-Jun(Ser63 と 73)、ATF(Thr69 と 71)や Elk-1(Ser383 と 389)をリン酸化することからこれらを介して転写を促進すると考えられる。しかしながら SP600125 による TNF mRNA 発現の抑制は U0126 に比べると若干弱かった。JNK は IL-2、IL-3 や TNF の mRNA の安定性を制御することが報告されていることから、転写調節に加え安定性制御にも関与している可能性も否定できない<sup>37,44,45)</sup>。

一方、p38 は Cox-2、IL-6、IL-8、や TNF などの転写後調節に関与することが報告されているが、これらのほとんどは mRNA の安定性制御である。しかしながら本章の結果よりミクログリアにおける ATP/BzATP 誘発 TNF mRNA 発現は p38 阻害薬である SB203580 により全く抑制されなかったことから、p38 安定性制御に関与せずむしろ転写後から蛋白産生にいたる過程を制御すると考えられた。最近 Dumitru らは LPS 刺激した骨髄由来マクロファージにおいて、ERK が TNF mRNA の核外輸送を制御することを明らかにした<sup>41)</sup>。そこで p38 阻害薬 SB203580 を用いて ATP 刺激によって誘導される TNF mRNA の核と細胞質における分布量を検討した結果、p38 を阻害すると核内に mRNA が蓄積し細胞質にはほとんど運び出されなかった。従って p38 が mRNA の核外輸送を制御することが示唆された。以前 LPS 刺激した脾臓細胞において、p38 が MAPKAP キナーゼ 2 (MAPK activated protein kinase-2)を介し、TNF mRNA の核外輸送を制御する可能性を示唆していたが直接証明するには至らなかった<sup>46)</sup>。本章の結果から p38 が TNF mRNA の核外輸送を制御するという新規な TNF 産生制御機構が明らかとなった。

p38 の核外輸送を制御するメカニズムについては更なる検討が必要である。p38 は MNK (MAPK signal integrating kinase-1/2)リン酸化を介して翻訳開始因子 eIF-4E を活性化する<sup>47)</sup>。活性化した eIF-4E は翻訳開始を制御するだけでなく cyclin D1 mRNA の核外輸送を制御することが報告されていることから<sup>48)</sup>、ミクログリアの mRNA 輸送においても eIF-4E が関与しているかも知れない。

TNF が転写後調節をうけることは様々な細胞で報告されている。最近、この調節には TNF mRNA 上の 3'-untranslated region (UTR)に存在する AU rich element (ARE)が重要な役割を果たすことが明らかになりつつある<sup>49)</sup>。この領域は A,U に富んだ配列を持ち、TNF 以外にも IL-6、IL-8、GM-CSF などのサイトカイン、c-Fos やオンコジーン の mRNA 上にも存在することが報告されている。この領域を遺伝的に欠損させると血清中の TNF が上昇しリウマチや慢性消化器障害を引き起こすことから、この領域を介した TNF 発現制御は極めて重要な役割を果たすと考えられる。近年 ARE

に特異的に結合する蛋白(TTP, Hel-N1, HuR, AUF, TIAR, TIA-1 など)が同定されつつあり、これらを介して mRNA の安定性や翻訳開始調節に関与することが示唆されている。この中で TIA-1 や TIAR は核と細胞質をシャトルし特定の mRNA の核-細胞質輸送を制御することが確認されている (N. Kendersha and P. A. Anderson Unpublished data<sup>50)</sup>)。従って p38 はこのタンパクを介して mRNA の核外輸送を制御しているかもしれない。

**Table.5**  
**DNA binding elements for TNF promoter**

|             |        |
|-------------|--------|
| NFκB        | Egr-1  |
| AP-1        | Ets-1  |
| AP-2        | C/EBPβ |
| ATF-2/c-Jun | CRE    |
| NFAT        |        |

[小括]

ラット脳ミクログリアにおける ATP 誘発 TNF 産生には ERK, JNK, p38 が重要な役割を果たすことが明らかになった。しかしながらその役割は異なり、ERK, JNK は遺伝子転写を制御する一方で p38 は転写後調節を介して TNF 産生を制御することが明らかとなった。さらに p38 による転写後調節は TNF mRNA の核外輸送過程の制御である可能性が示された。

## II. P2X<sub>7</sub> 受容体による MAP kinase 活性化制御

これまでの結果からミクログリアにおける TNF 遊離には MAPK が重要な役割を果たすことが明らかになったが、研究代表者らはこれら MAPK はそれぞれ異なる受容体により制御されていることを明らかにしてきた<sup>32)</sup>。すなわち P2X<sub>7</sub> 受容体遮断薬 Brilliant Blue G (BBG) が ATP/BzATP 誘発 ERK 活性化には影響を及ぼすことなく p38 ならびに JNK 活性化を抑制することから、p38 と JNK は主に P2X<sub>7</sub> 受容体を介して活性化されるのに対し、ERK はそれ以外の受容体を介して活性化される (Fig.10)。さらに ATP 誘発 MAPK 活性化には細胞外 Ca<sup>2+</sup> に依存しない<sup>31)</sup>。これらの結果から、P2X<sub>7</sub> 受容体はイオンチャネル内蔵型でありながらも少なくとも Ca<sup>2+</sup> イオンチャネルの機能とは独立して MAPK を活性化すると考えられた。MAPK は外界刺激を核に伝達する重要なシグナル分子の一つであるが、受容体刺激は直接 MAPK カスケードを活性化するのではなくアダプター分子やシグナル伝達分子を介して活性化する。では P2X<sub>7</sub> 受容体はどのように MAPK を活性化するのだろうか。

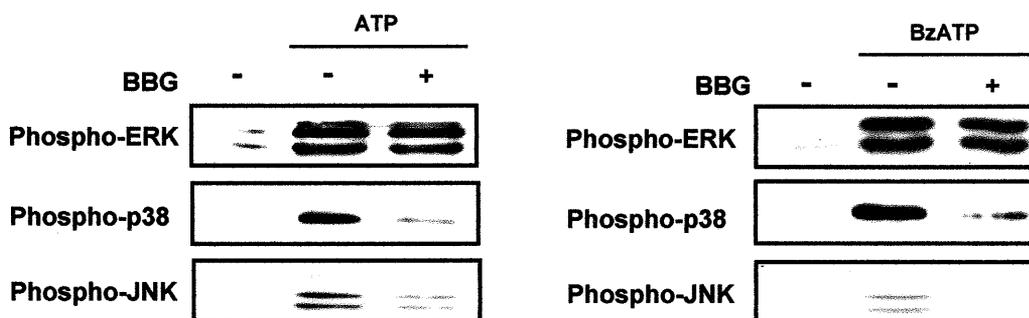


Fig.10 Effects of BBG on activation of MAP kinase, ERK, p38 and JNK in ATP- (left panel) or BzATP- (right panel) stimulated microglia cells. The cells were pretreated with 1  $\mu$ M BBG for 5 min and stimulated with ATP/BzATP for 10 min. The phosphorylated (active) and total ERK, p38 and JNK were detected by western blotting using antibodies which recognize phosphorylated and both phosphorylated /non-phosphorylated enzymes, respectively. The levels of each total MAP kinase were confirmed to be identical for each lane.

イオンチャネルやポンプなどの膜蛋白は細胞膜の脂質二重層に自由に浮遊してイオンを通すだけでなく、細胞内・外の蛋白と会合することによりその位置、運命、機能が厳密に制御されることが明らかになってきている。特にチロシンキナーゼによるリン酸化を介したチャネル機能の修飾は NMDA 受容体、AMPA 受容体、Ca<sup>2+</sup>感受性 K<sup>+</sup>チャネル、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネルなど多くのチャネルで報告され始めている<sup>53)</sup>。さらに AMPA 受容体や NMDA 受容体は恒常的にチロシンキナーゼ (Protein Tyrosine Kinase, PTK) と会合しており、刺激後イオンチャネルの機能とは独立してシグナル伝達を引き起こすことが報告されている<sup>54)</sup>。最近、P2X<sub>7</sub> 受容体の C 末端領域にはいくつかの機能的モチーフが存在することが明らかにされたが、その中には SH3 ドメイン結合モチーフが存在する<sup>55)</sup>。非受容体型チロシンキナーゼが SH3 ドメインを持つこと、さらにこれらは MAPK カスケードの上流分子として報告があることからこれらのタンパクが P2X<sub>7</sub> 受容体から MAPK カスケードへの情報伝達を担う可能性が考えられる。

さらに Table.6 に示すように P2X<sub>7</sub> 受容体は他のイオンチャネルと同様、恒常的に様々なタンパクと会合していることが報告された<sup>56)</sup>。その中にはチロシンキナーゼ活性を制御することが知られる HSP90 が含まれていたことから、この分子を介してシグナル伝達を惹起することが予測される。そこで本章では ATP 誘発 MAPK 活性化ならびに TNF 遊離における HSP90/PTK の役割について検討した。

**Table.6**  
**Proteins identified in the P2X<sub>7</sub> receptor complex**

---

Laminin  $\alpha$ 3 chain  
Integrin  $\beta$ 2  
Protein tyrosine phosphatase  $\beta$   
 $\beta$ -actin  
 $\alpha$ -actinin 4  
Heat shock cognate 71kDa protein  
Heat shock protein HSP-90 $\beta$   
PI 4-kinase 230  
MAGUK p55 subfamily member 3  
supervillin

---

#### [実験方法および実験材料]

この章で新たに用いた実験方法ならびに試薬は以下の通りである。

##### (1) Western blotting 法による MAP kinase 酵素測定

60 mm シャーレにミクログリア( $7.5 \times 10^5$  cells/ 3 mL/ シャーレ)を播き 45 分後にメディウム交換により洗浄して精製した。DMEM 培養液中(FCS free)各阻害薬で処置後、ATP または BzATP で 10 分間刺激した後 DMEM を除去し、リン酸緩衝液(PBS)で洗浄して 110  $\mu$ L の SDS sample buffer をディッシュに加え、セルスクレーパーで細胞を剥離後、超音波で細胞を粉碎し、95 °C で 5 分間熱処理した。サンプル中のタンパク質を SDS-polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE 12 % gel) で分離した後、PVDF 膜に転写した。一次抗体には、phospho MAP kinase (ERK, p38 MAPK, JNK/SAPK) もしくは total MAP kinase (ERK, p38 MAPK, JNK/SAPK) に特異的な抗体を用い(以上全て 1:1000)、HRP 標識 anti-Rabbit IgG を反応させ、ECL で検出した (Chart.6

参照)。

## (2) 使用試薬

genistein, gerdanamycin (Sigma), Phospho Plus antibody kits (ERK, p38, JNK) (New England Biolabs), tyrphostin A25 (Calbiochem)

## [実験結果]

### (1) MAPK 活性化に及ぼすチロシンキナーゼ阻害薬の影響

まず ATP または BzATP 誘発 MAPK 活性化に及ぼす非選択的チロシンキナーゼ阻害薬、tyrphostin A25 と genistein の影響を検討した。その結果 tyrphostin A25 は ERK 活性化には影響を与えず p38 と JNK の活性化を抑制した(Fig.11a)。genistein も ATP/BzATP 刺激による p38 ならびに JNK 活性化を濃度依存的に抑制した(Fig.12a)。またこれらの結果に一致して、tyrphostin A25 ならびに genistein は ATP または BzATP 誘発 TNF 遊離を抑制した(Fig.11b,12b)。従ってチロシンキナーゼは P2X<sub>7</sub> 受容体からの p38/JNK 活性化を担い、TNF 遊離において重要な役割を果たすことが示唆された。

### (2) ATP 誘発 MAPK 活性化に及ぼす PP2 の影響

非受容体型チロシンキナーゼには Src, Frk, Btk, Csk, Abl ファミリーなど様々な種類が存在するが genistein や tyrophostin A25 はそれらを非選択的に阻害するため、どのチロシンキナーゼファミリーが関与するかは不明である。近年、イオンチャネル型グルタミン酸受容体の AMPA 受容体が、細胞外 Ca<sup>2+</sup> に依存せず Src ファミリーチロシンキナーゼを介してシグナル伝達を引き起こすことが報告されている<sup>54)</sup>。そこで Src ファミリーチロシンキナーゼ選択的阻害薬 PP2 が ATP/BzATP 誘発 MAPK 活性化に及ぼす影響について検討した。その結果、PP2 は ATP ならびに BzATP 誘発 ERK 活性化には影響を及ぼさず p38, JNK 活性化を抑制した(Fig.13a)。またこの結果に一致して、PP2 は ATP/BzATP 誘発 TNF 遊離を有意に抑制した(Fig.13b)。一方 PP2 のネガティブアナログである PP3 では影響が認められなかった。従って P2X<sub>7</sub> 受容体から p38, JNK 活性化にいたる経路には Src ファミリーチロシンキナーゼが重要な役割を果たすことが示唆された。

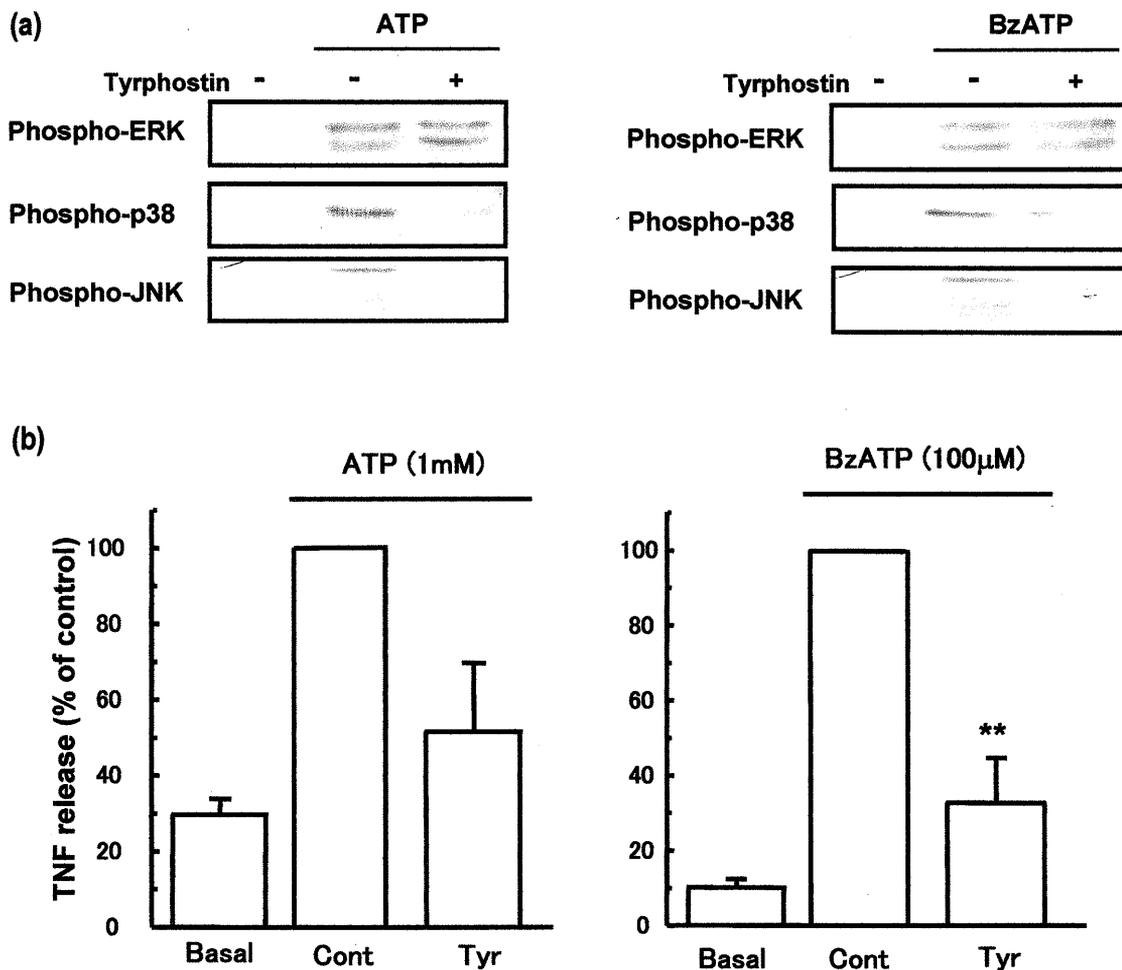


Fig.11 Effects of tyrphostin A25 on ATP- or BzATP-induced MAPK activation(a) and TNF release(b) in rat cultured microglia. (a) Effects of tyrphostin A25 on the activation of MAP kinase in ATP- (left panel) or BzATP- (right panel) stimulated microglia cells. The cells were pretreated with the 25  $\mu$ M Tyrphostin A25 for 15 min and stimulated with ATP/BzATP for 10 min. The phosphorylated (active) and total ERK, JNK/SAPK and p38 were detected by western blotting using antibodies which recognize phosphorylated and both phosphorylated /non-phosphorylated enzymes, respectively. The levels of each total MAP kinase were confirmed to be identical for each lane. (b) Effects of tyrphostin A25 on ATP- or BzATP-induced TNF release in rat cultured microglia. The cells were pretreated with 25  $\mu$ M Tyrphostin A25 (Tyr) for 15 min and stimulated with 1 mM ATP or 100  $\mu$ M BzATP for 3 hr. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM of percentage of release compared with ATP or BzATP only. Values for 100 % for release of TNF were  $336.7 \pm 49.6$  pg/ $10^6$  cells and  $1047.6 \pm 86.3$  pg/ $10^6$  cells in ATP- or BzATP- stimulated microglia, respectively. \*\*\*<0.001 and \*\*<0.01 significantly different from the control (t-test).

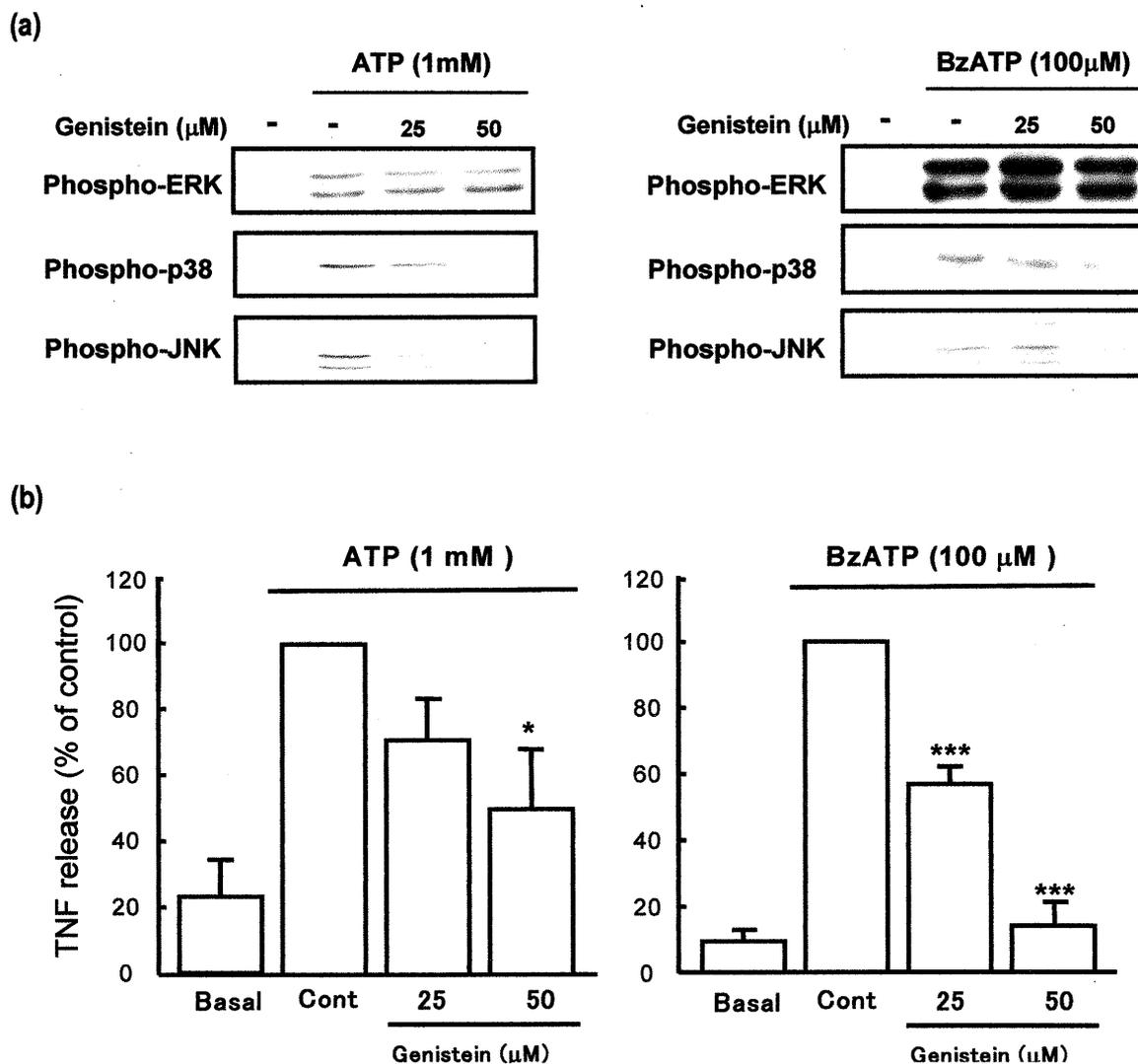
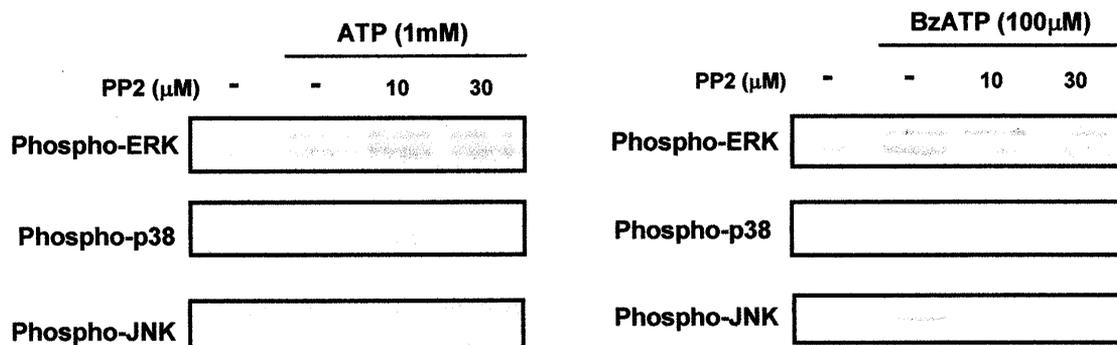


Fig.12 Effects of genistein on ATP- or BzATP-induced MAPK activation(a) and TNF release(b) in rat cultured microglia. (a) Effects of genistein on ATP-(left panel) or BzATP-(right panel) induced MAPK activation. The cells were pretreated with the indicated concentration of genistein for 15 min and stimulated with 1 mM ATP/100 μM BzATP for 10 min. (b) Effects of genistein on ATP- (left panel) or BzATP- (right panel) induced TNF release in rat cultured microglia. The cells were pretreated with indicated concentrations of genistein for 15 min and stimulated with 1 mM ATP or 100 μM BzATP for 3 hr. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM of percentage of release compared with ATP or BzATP only. Values for 100 % for release of TNF were  $136.0 \pm 37.0$  pg/ $10^6$  cells and  $328.6 \pm 63.5$  pg/ $10^6$  cells in ATP- or BzATP- stimulated microglia, respectively. \*\*\* $<0.001$  and \* $<0.05$  significantly different from the control.

(a)



(b)

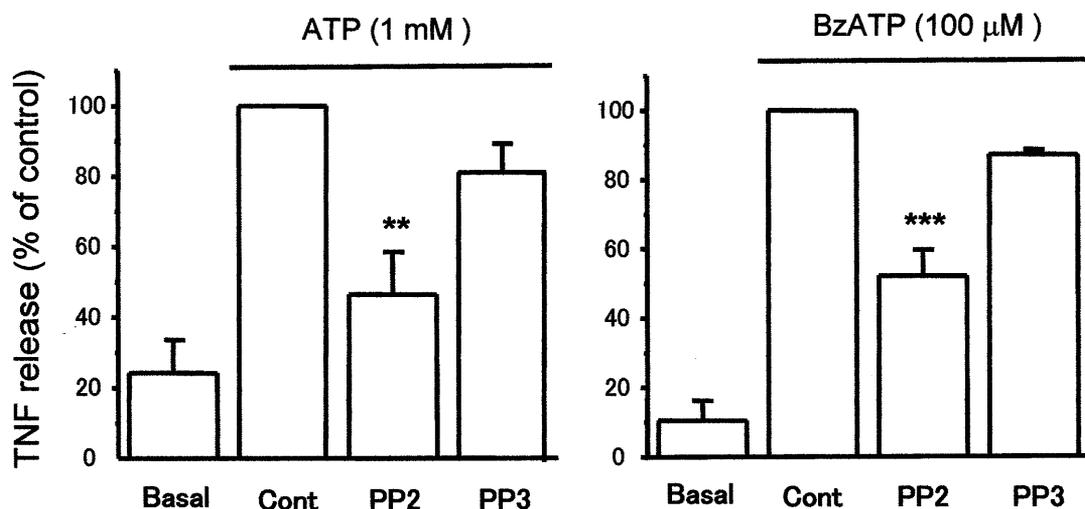


Fig.13 Effects of PP2 on ATP- or BzATP-induced MAP kinase activation (a) or TNF release in rat cultured microglia (b). (a) Effects of PP2 on ATP-(left panel) or BzATP-(right panel) induced MAPK activation. The cells were pretreated with the indicated concentration of PP2 for 20 min and stimulated with 1 mM ATP/100 µM BzATP for 10 min. (b) Effects of PP2 on ATP- (left panel) or BzATP- (right panel) induced TNF release in rat cultured microglia. The cells were pretreated with 30 µM PP2 or PP3 for 20 min and stimulated with 1 mM ATP or 100 µM BzATP for 3 hr. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM of percentage of release compared with ATP or BzATP alone. Values for 100 % for release of TNF were  $133.6 \pm 65.1$  pg/ $10^6$  cells and  $914.80 \pm 173.3$  pg/ $10^6$  cells in ATP- or BzATP- stimulated microglia, respectively. \*\*\* $<0.001$  and \*\* $<0.01$  significantly different from the control.

### (3) HSP90 による MAPK 活性化制御

HSP90 は分子シャペロンとして機能するだけでなく様々なシグナル伝達分子と会合しその活性制御を行うことが知られている<sup>57)</sup>。Src ファミリーチロシンキナーゼも Hsp90 と会合するタンパクの一つであり、そのキナーゼ活性の発揮に重要な役割を果たすことが知られている。最近この HSP90 が P2X<sub>7</sub> 受容体と恒常的に会合していることが報告された<sup>56)</sup>。従って P2X<sub>7</sub> 受容体から HSP90 を介して TNF 遊離のシグナルが惹起されていることが考えられる。そこで HSP90 阻害薬 geldanamycin を用いて ATP/BzATP 誘発 TNF 遊離における役割を検討した。その結果、geldanamycin は ATP ならびに BzATP 誘発 TNF 遊離を強力に抑制した。従って、ATP 誘発 TNF 産生にいたる経路には HSP90 が重要な役割を果たすことが示唆された。

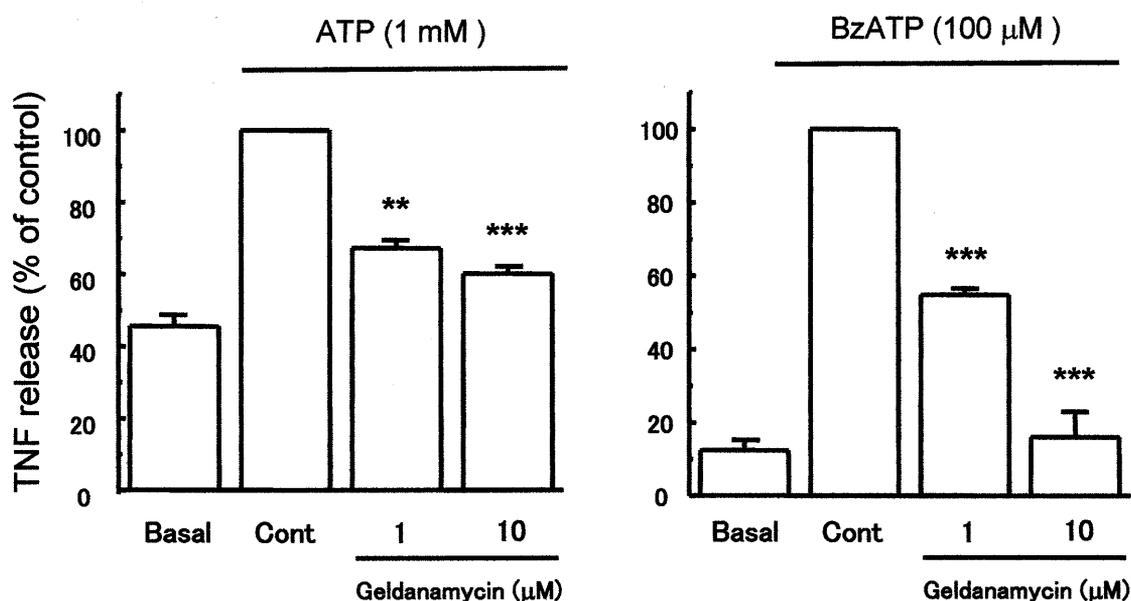


Fig.14 Effects of geldanamycin on ATP- or BzATP-induced TNF release in rat cultured microglia. The cells were pretreated with indicated concentration of geldanamycin for 15 min and stimulated with 1 mM ATP- (left panel) or 100 μM BzATP- (right panel) for 3 hr. Values are expressed as mean ± SEM of percentage of release compared with ATP or BzATP only. Values for 100 % for release of TNF were 289.4 ± 14.26 pg/10<sup>6</sup> cells and 910.6 ± 101.97 pg/10<sup>6</sup> cells in ATP- or BzATP- stimulated microglia, respectively. \*\*\*<0.001 and \*\*<0.01 significantly different from the control.

#### [考察]

本章の結果から、P2X<sub>7</sub> 受容体は非選択的のカチオンチャンネル型受容体でありながら、Ca<sup>2+</sup>の流入には依存せず Src ファミリーチロシンキナーゼを介して p38 と JNK 活性化を制御することが明らかになった。さらに P2X<sub>7</sub> 受容体から TNF 産生過程への情報伝達経路には HSP90 が重要な役割を果たすことが示唆された。

近年、イオンチャンネルが従来考えられてきたチャンネル機能とは独立してシグナル伝達を引き起こ

すことが多数報告されている<sup>53)</sup>。本章の結果は P2X<sub>7</sub> 受容体でも同様のメカニズムが機能していることを支持する。しかしながら Table.6 に示すように Kim らは P2X<sub>7</sub> 受容体に恒常的に会合するチロシンキナーゼは見いだせなかつただけでなく c-Src と会合しないことも確認している<sup>56)</sup>。従って、無刺激状態において P2X<sub>7</sub> 受容体は PTK と会合していないが、受容体の活性化により Src ファミリー PTK が引き寄せられると考えられる。

v-Src や c-Src は C 末端側半分にキナーゼ活性領域、N 末端側に Src の細胞膜への結合に必須の膜結合領域をもち、両領域の間には SH2/SH3 ドメインがある。SH3 領域はキナーゼ領域直上のリンカー部分内のプロリン繰り返し配列と結合して Src を折り畳み、キナーゼ活性を抑制している (Fig.15)<sup>58)</sup>。SH3 領域に他のタンパクが結合すると Src はコンフォメーションを変化させて活性化される。したがって受容体刺激により引き寄せられた Src ファミリーチロシンキナーゼが P2X<sub>7</sub> 受容体の C 末端領域に存在する SH3 結合モチーフと接触することにより活性化されて p38/JNK へと下流へのシグナル伝達を惹起しているかも知れない (Fig.15)。現在までに P2X<sub>7</sub> 受容体と Src ファミリー PTK の会合を調べた報告はないが、ミクログリアには c-Src のほかに Lyn や Lck といった Src ファミリー PTK が発現していることが報告されていることから<sup>60)</sup>、これらのチロシンキナーゼの関与が推測される。

また ATP 誘発 TNF 遊離には HSP90 が重要な役割を果たすことも明らかになった。HSP90 は Src ファミリーチロシンキナーゼと会合し、その機能発現に重要な役割を果たすことが知られている。最近 P2X<sub>7</sub> 受容体と HSP90 との会合が報告されたことから、HSP90 を介して Src ファミリーチロシンキナーゼにシグナルが伝達されることが想定される。P2X<sub>7</sub> 受容体と会合している HSP90 と PTK に会合している HSP90 が同一のものか、またそれらがどのように下流へとシグナル伝達を引き起こすかは不明であり今後更なる検討が必要である。

ここまで p38/JNK の上流シグナルについて論じてきたが、p38/JNK 活性化に関与するシグナルならびに受容体は ERK 活性化には関与していないようである。

#### [小括]

p38/JNK は P2X<sub>7</sub> 受容体から Src ファミリー PTK を介して、Ca<sup>2+</sup>非依存的に活性化されることが明らかになった。また P2X<sub>7</sub> 受容体から惹起されるシグナル伝達経路では HSP90 が重要な役割を果たすことも明らかになった。

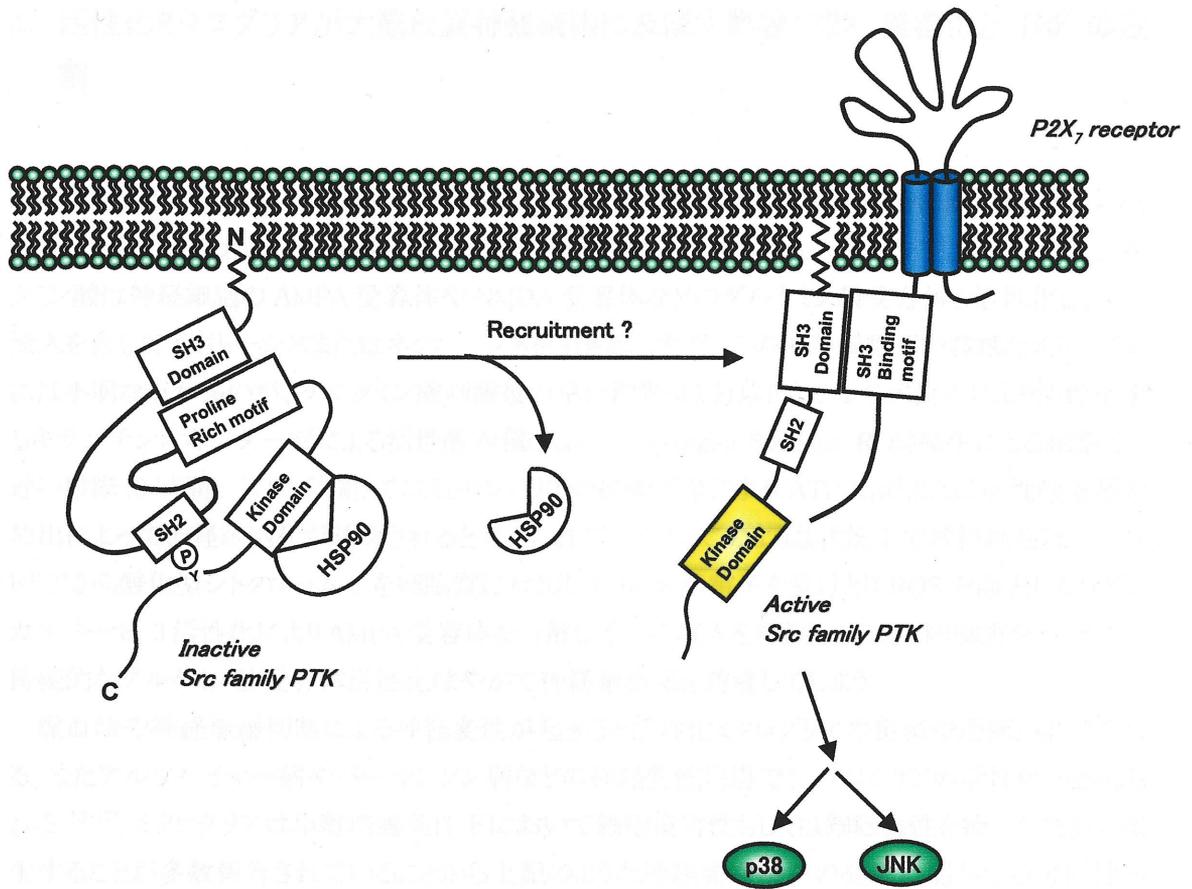


Fig.15 Hypothesis of Src family PTK activation.

### III. 活性化ミクログリアが大脳皮質神経細胞に及ぼす影響:P2X<sub>7</sub> 受容体と TNF の役割

虚血、傷害やアルツハイマー病、パーキンソン病など神経変性疾患発症時には過剰のグルタミン酸が放出されそれが神経細胞死を引き起こす原因の一つと考えられている<sup>61)</sup>。放出されたグルタミン酸は神経細胞の AMPA 受容体や NMDA 受容体などのグルタミン酸受容体を活性化し、Ca<sup>2+</sup>流入を介してアポトーシスまたはネクローシスを引き起こす<sup>62)</sup>。この神経細胞死の詳細なメカニズムには不明な点が多いが、グルタミン酸刺激後の早い段階(30 分以内)では Ca<sup>2+</sup>流入により活性化するキサンチンオキシダーゼによる活性酸素種(Reactive Oxygen Species: ROS)産生による細胞死、遅い段階(3 時間から 24 時間)ではミトコンドリアの機能不全による ATP 枯渇または活性酸素種の放出によって神経細胞死が誘導されると考えられている<sup>63)</sup>。このような状況下で神経細胞はミトコンドリアから酸化型シトクローム c を細胞質に放出して ROS の電子を受けとり ROS を除去したり<sup>64)</sup>、カスパーゼ-3 活性化により AMPA 受容体を分解して Ca<sup>2+</sup>流入を抑制したりして防御策をとるが<sup>65)</sup>、持続的なグルタミン酸受容体活性化はやがて神経細胞死を誘導してしまう。

虚血時や神経線維切断による神経変性が起きると活性化ミクログリアの集積や増殖が認められる。またアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患でもミクログリアの活性化が認められる<sup>13-17)</sup>。ミクログリアは単離培養条件下において細胞傷害性もしくは細胞毒性を持った物質を産生することが多数報告されていることから上記のような神経変性疾患の発症に関与する可能性が示されている。しかしながら序論でも述べたようにミクログリアは変性した神経を貪食することにより脳という高次機関の微小環境を整備するとともに、神経栄養因子やサイトカインを放出することにより神経を保護して機能維持を司っていることも確かである。実際、一過性前虚血を起こしたスナネズミの末梢血に interferon- $\gamma$  で活性化したミクログリアを注入すると、脳に移行し CA1 領域の神経細胞死を有意に抑制することが報告されている<sup>66)</sup>。このように活性化ミクログリアには傷害性と保護性という二面性があると考えられているが、実際この二面性がどのように制御されているかはほとんど明らかになっていない。

脳傷害時には傷ついた細胞から大量の ATP が漏出すると推測されることから、その ATP がミクログリアを活性化し TNF 遊離を惹起すると考えられる。序論でも述べたように TNF は神経細胞に対して傷害性にも保護性にも働くことが示唆されているが、その二面性の切り替えはどのように行われているかは不明な点が多い。そこで本章では P2X<sub>7</sub> 受容体を介して活性化されたミクログリアが TNF 放出を介して大脳皮質神経細胞に対しどのような影響を及ぼすか、神経細胞とミクログリアの共培養系を用いて検討を行った。

#### [実験方法および実験材料]

##### (1) 大脳皮質神経初代培養細胞の調製

ラットの新生仔を断頭し、頭部を 70 % ethanol で消毒したのち、無菌的に全脳を取り出して PBS に浸した。実体顕微鏡下、先細ピンセットを用いて大脳皮質を単離し、第一章と同様の方法で細胞を調製した。最後の行程で得られる細胞分散培養液は 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ポリ-L-リジン処理した 24 well plate に  $1.0 \times 10^6$  cells/well で播種した。10 %  $\text{CO}_2$ -90 % air, 37  $^\circ\text{C}$  設定で 24 時間培養した後、(2) に示す(下記参照)培地に交換し、さらに 48 時間後 Ara-C を含まない(2)の培地に交換して大脳皮質神経初代培養細胞とした。得られた細胞は神経特異的マーカーである anti MAP-2 抗体 (1:200)を用いた免疫染色により神経細胞であることを確認した(データ省略)。

### (2)培地(大脳皮質神経用)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)に Cytosine  $\beta$ -D-Arabino-Furanoside (10  $\mu\text{M}$ )、penicillin G (100 U/mL)、streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、牛胎児血清 (5 %)、馬血清(5 %)を最終的に( )内に示す濃度になるように添加した。なお牛胎児血清ならびに馬血清は 56  $^\circ\text{C}$  で 30 分非働化して使用した。

### (3) 神経細胞生存率の測定

大脳皮質神経細胞を培養した 24 well plate に  $1.0 \times 10^5$  のミクログリアを播いた Transwell<sup>®</sup>(ウエルの底が液性因子のみ通過させる 0.4  $\mu\text{m}$  のポアを持つメンブレンになっている。Fig.24 参照)を挿入し BzATP または LPS で 24 時間処置した。その後ミクログリアの入った Transwell<sup>®</sup>を取り外し、100  $\mu\text{M}$  グルタミン酸で 10 分間刺激した後 DMEM(FCS, HS, Ara-C を含まない)に戻して、24 時間後 MTT アッセイにより神経細胞の生存率を測定した。

### (4) MTT assay

アッセイ終了後のメディアムを取り除き、DMEM(FCS, HS, Ara-C を含まない)に溶かした 1 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)を 750  $\mu\text{L}$  加え 37  $^\circ\text{C}$  で 1.5 時間インキュベーションした。その後 600  $\mu\text{L}$  の溶解液 (20 % SDS と 50 % N,N-dimethylformamide から成る)を加え反応を停止して、さらに一晩 37 $^\circ\text{C}$  でインキュベーションした。その後 570 nm での吸光度を測定した。細胞を播いていないウェルから得られた値をブランク値としてそれぞれの値から差し引いた。その値を生細胞数に比例した値とし、コントロール群の値に対する割合を生存率とした。(Chart.7)

#### ◆ measurement of neuronal cell death (Chart.7)

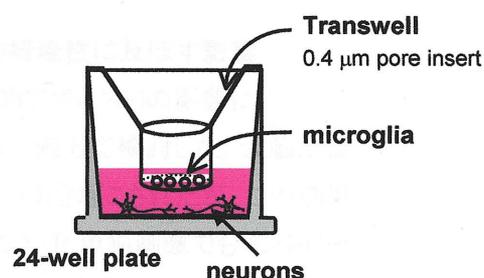
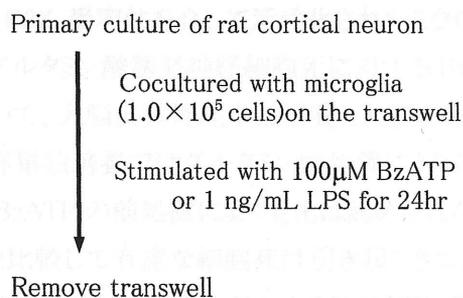
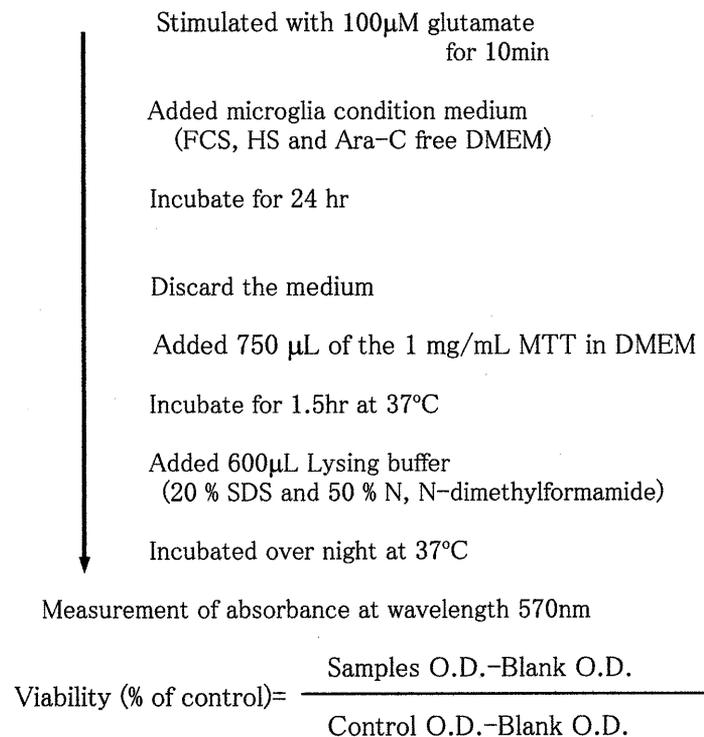


Fig.24 Schema of cortical neuron-microglia co-culture.



### Procedure of culture of cortical neuron and MTT assay

#### 使用試薬および使用機器

|                                    |            |
|------------------------------------|------------|
| cytosine β-D-Arabino-Furanoside    | : Sigma    |
| N, N-dimethylformamide             | : 和光純薬     |
| MTT                                | : Sigma    |
| 馬血清                                | : GIBCO    |
| anti-MAP 2 a&b monoclonal antibody | : CHEMICON |
| transwell                          | : COSTAR   |

#### [実験結果]

##### (1) P2X<sub>7</sub> 受容体を介して活性化されたミクログリアのグルタミン酸神経毒性に及ぼす影響

グルタミン酸誘発神経細胞死に対する BzATP (P2X<sub>7</sub> 受容体選択的アゴニスト) の影響について、大脳皮質神経単独培養と大脳皮質神経-ミクログリア共培養の両方で検討した。大脳皮質神経単独培養ではグルタミン酸処置により約 50 % の神経に細胞死が引き起こされたが、この効果は BzATP の前処置により変化は認められなかった (Fig. 16a)。また BzATP 単独刺激でもコントロールと比較して有意な細胞死は引き起こさなかった (Fig. 16a)。しかしながら神経細胞をミクログリアと共培養するとグルタミン酸による神経細胞死が BzATP 前処置により有意に抑制された (Fig. 16b)。さ

らにこの効果は P2X<sub>7</sub> 受容体選択的遮断薬 Brilliant blue G (BBG)により抑制された(Fig.16b)。従って P2X<sub>7</sub> 受容体刺激により活性化されたミクログリアは液性因子を介して神経保護的に働くことが明らかとなった。

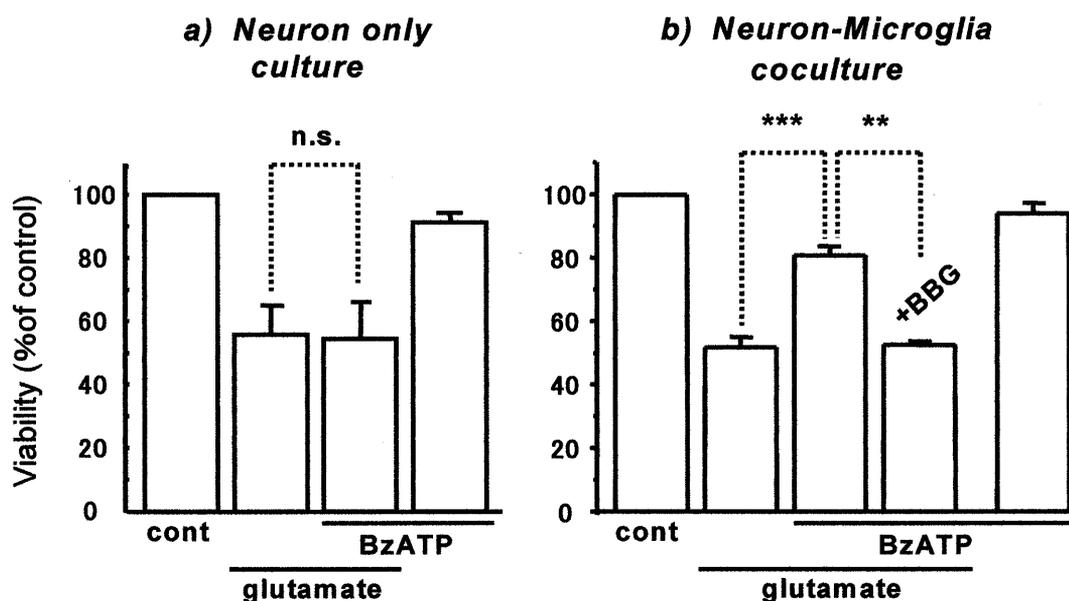


Fig.16 Effects of BzATP on glutamate-induced neuronal cell death in the absence (a) or presence (b) of microglia. Both cultures were treated with 100  $\mu$ M BzATP for 24 h followed by glutamate exposure (100  $\mu$ M 10 min). After 24 hr, viability of cortical neurons was determined using MTT assay. Treatment of BBG (1  $\mu$ M 5 min) prior to BzATP treatment significantly inhibited the neuroprotective effect of BzATP-activated microglia against glutamate-induced neurotoxicity. \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01 compared with broken line indicated columns.

## (2) BzATP 誘発 TNF の大脳皮質神経に及ぼす影響

Fig.5 に示したように、TNF は 26kDa の前駆体として産生された後に TNF 変換酵素(TNF- $\alpha$  converting enzyme, TACE)により切り出され細胞外へと放出されることが知られている。ミクログリアにおいても TACE を介した放出が行われていることを TACE 阻害薬 TAPI(TNF- $\alpha$  protease inhibitor) を用いて確認した結果、50  $\mu$ M TAPI は BzATP 誘発 TNF 遊離をほぼ完全に遮断した(Fig.17a)。そこで TAPI を用いて P2X<sub>7</sub> 受容体活性化によって認められたミクログリアの神経保護作用が TNF 遊離を介したものか否かを検討した。その結果 BzATP で活性化されたミクログリアによる神経保護作用は TAPI を併用することにより有意に抑制された(Fig.17b)。従って、BzATP により活性化されたミクログリアは少なくとも TNF を放出することにより神経保護作用を発揮することが示された。

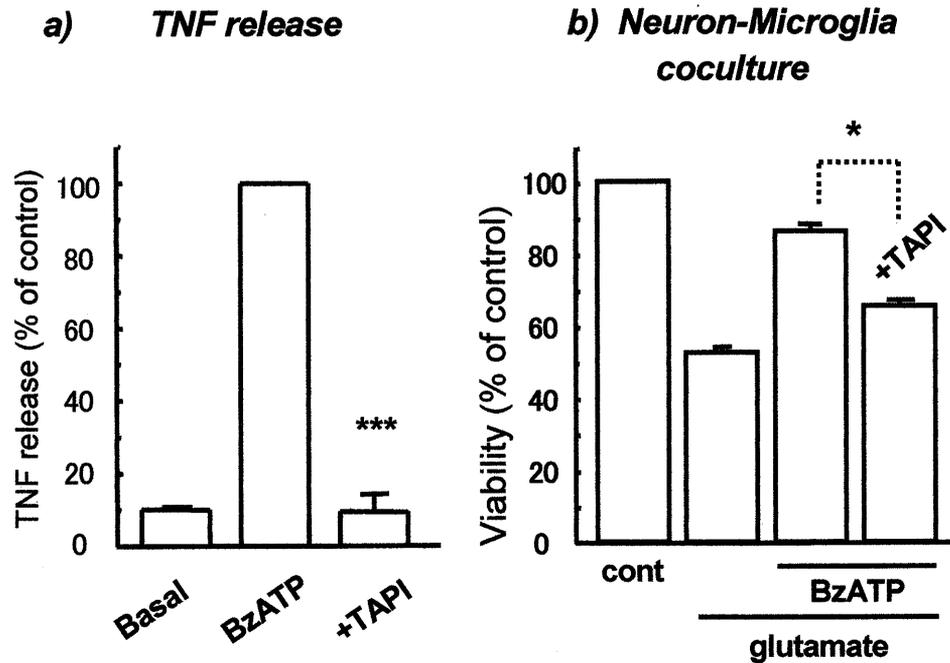


Fig.17 TAPI, which blocks BzATP-induced TNF release, inhibits the neuroprotective effect of BzATP-activated microglia against glutamate-induced neurotoxicity. (a) Effect of TAPI on BzATP-induced TNF release. The cells were pretreated with 50  $\mu$ M TAPI for 5 min and stimulated with 100  $\mu$ M BzATP for 3 hr. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM of percentage of release compared with BzATP only. Values for 100 % for release of TNF were  $755.3 \pm 64.39$  pg/ $10^6$  cells in BzATP stimulated microglia. \*\*\* $<0.001$ , significantly different from BzATP only stimulation. (b) Effects of TAPI on the neuroprotective effect of BzATP-activated microglia against glutamate-induced neurotoxicity. The cultures were treated with 50  $\mu$ M TAPI prior to BzATP treatment, and followed by glutamate exposure. After 24 hr, viability of cortical neuron was determined using MTT assay. \* $P<0.05$  compared with broken line indicated columns.

### (3) LPS によって活性化されたミクログリアのグルタミン酸神経毒性に及ぼす影響

Fig.27aに示すようにLPSはBzATPより強力にミクログリアからTNF遊離を引き起こす。そこでLPSで活性化されたミクログリアにも神経保護作用が認められるかを検討した。その結果、神経細胞-ミクログリア共培養を1 ng/mL LPSで処置してもグルタミン酸による神経細胞死は抑制されなかった(Fig.18b)。従ってTNFによる神経保護作用はP2X<sub>7</sub>受容体を介して活性化されたミクログリアに特異的なものであり、LPS誘発TNFには認められないことが明らかとなった。

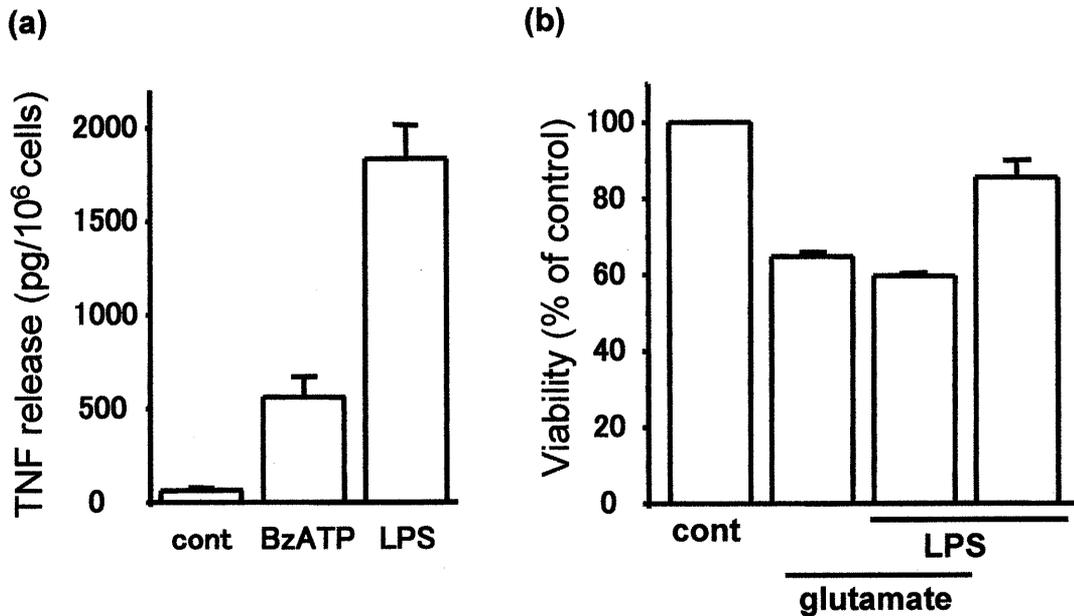


Fig.18 LPS-activated microglia don't have the neuroprotective effect against glutamate-induced neurotoxicity. (a) Comparison between BzATP- or LPS-induced TNF releases. The cells were stimulated with 100  $\mu$ M BzATP or 1 ng/mL LPS for 3 hr. (b) Effect of LPS on glutamate-induced neuronal cell death in the cortical neuron-microglia coculture. The coculture was treated with 1 ng/mL LPS for 24 h followed by glutamate exposure (100  $\mu$ M 10 min). After 24 hr, viability of cortical neuron was determined using MTT assay.

#### (4) TNFによる神経保護作用の濃度依存性

TNFが神経保護作用を有することが示唆されたにも関わらず、ミクログリアから強力にTNF遊離を引き起こすLPSにはその効果が認められなかった。BzATP誘発TNFとLPS誘発TNFの性質の違いの一つとして、遊離量が顕著に異なることがあげられる。そこでTNFによる神経保護作用の濃度依存性について検討した。その結果、グルタミン酸で引き起こされた細胞死(40.7%)に対するTNFの神経保護作用は2.5-5.0 ng/mLで最大反応となる二相性の性質を示した(Fig.19)。この結果からTNFは単独でグルタミン酸毒性に対する保護作用を有することが示唆されたが、その作用発揮には最適濃度が存在することが明らかになった。

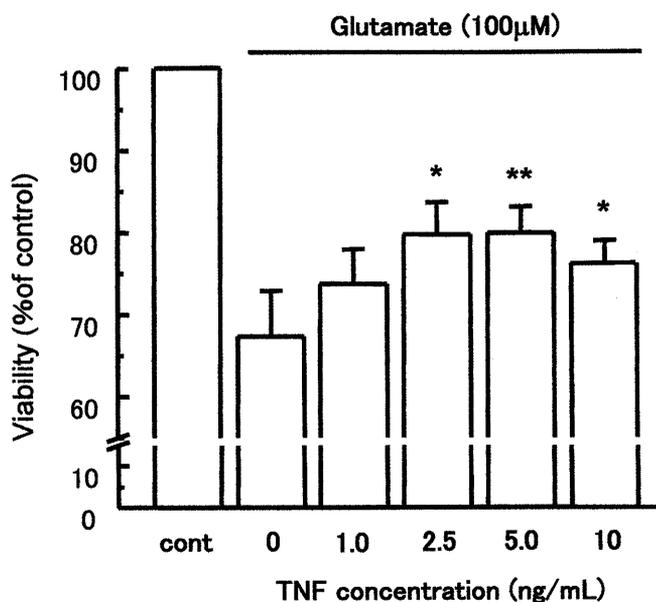


Fig.19 Effect of recombinant TNF on glutamate-induced neuronal cell death. The cortical neurons were treated with indicated concentration of recombinant TNF for 24 hr followed by glutamate exposure (100  $\mu$ M 10 min). After 18 hr, viability of cortical neuron was determined using MTT assay.

#### [考察]

本章の結果から、P2X<sub>7</sub> 受容体を介して活性化されたミクログリアはグルタミン酸による大脳皮質神経細胞死に対して保護的に働くことが示唆された。またこの効果はミクログリアからの TNF 遊離を遮断する TACE 阻害薬 TAPI により有意に抑制されたことから、TNF が重要な役割を果たすことが明らかになった。さらにリコンビナント TNF を用いた実験から TNF が二面性を持つ理由の一つに濃度が重要な鍵となる可能性が示唆された。

LPS で活性化されたミクログリアは大量の TNF を放出するにも関わらず神経保護作用が認められなかったことから、ミクログリアによる神経保護作用は ATP 受容体を介して活性化されたときに特異的な作用といえる。ミクログリアがどのような状況下で傷害性、保護性を示すかは未だ不明な点が多いが、本章の結果からミクログリアを保護性に導く因子として ATP が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

ミクログリアは ATP や ADP に遊走性を示すことが報告されている<sup>79)</sup>。従って、ミクログリアは傷害部位から漏出する ATP に鋭敏に反応し傷害の中心に向かって遊走を始めると想定される。傷害の中心部に近づくにつれ ATP の濃度が上昇し、十分に P2X<sub>7</sub> 受容体を活性化し得る領域に達すると TNF を放出し神経をグルタミン酸毒性から保護すると考えられる。序論でも述べたように、P2X<sub>7</sub> 受容体は mM オーダーという高濃度の ATP によって活性化される。このことは P2X<sub>7</sub> 受容体が正常な部位では TNF 遊離を引き起こさず、重篤な傷害部位(ATP が大量に漏出している部位)に到達して初めて TNF を放出し神経保護作用を発揮することができる。つまり P2X<sub>7</sub> 受容体は神経保護作用を制御するスイッチとして大変都合が良い。

リコンビナント TNF を用いた実験から TNF は単独で神経保護作用を示すこと、さらにその作用は適度な TNF 量においてのみ発揮されることが示唆された。BzATP によりミクログリアから放出される

TNF量は500~600 pg/mLとTNFが最大の神経保護作用を示した濃度よりやや低いが、ミクログリアに近接した神経細胞は局所的により高濃度のTNFに接触してより強い神経保護作用を発揮すると考えられる。一方LPSはミクログリアから強力にTNF遊離を引き起こし、局所的に神経保護作用を示す濃度を超えていたと推測される。またLPSはミクログリアから強力にNO遊離を惹起し神経細胞に傷害を与えることも多数報告されているが<sup>67)</sup>、このような傷害性物質がTNFの保護作用をマスクしているかもしれない。またLPSはATP誘発TNF産生とは異なる細胞内シグナルを介してTNFを産生する。例えばPKC阻害薬のbisindolylmaleimideやGö6976はLPS誘発TNF遊離を強く抑制するが、ATP誘発TNF産生は無影響かむしろ遊離を増強する(データ省略)。従ってこのような細胞内シグナルの違いに着目することにより、ATP誘発の保護性TNFには影響を与えることなく、LPS誘発の傷害性TNFのみを抑制する治療薬が期待できるかも知れない。

TNF受容体にはTNFR1(p55 TNF受容体)とTNFR2(p75 TNF受容体)の二つのサブタイプが存在する<sup>68)</sup>。どちらの受容体も一回膜貫通構造を持つが、これら二つの受容体の相同性は細胞外ドメインで24%、細胞内ドメインで10%未満と非常に低い。TNFによる様々な細胞応答はほとんどがTNFR1を介した反応であると考えられており、TNFR1からのシグナルは詳細に解明されてきている<sup>69)</sup>。一方TNFR2は膜貫通型TNFにより活性化されるという特殊な活性化機構が解明されるまでその機能は不明だったが、近年免疫細胞や内皮細胞の活性化に重要な役割を果たすことが明らかにされつつある。さらに最近、中枢神経系においてもTNFR2ノックアウトを用いた実験から、TNFがTNFR2からp38やAkt/PKBを介して神経保護作用を示すことが報告されている<sup>11,12)</sup>。今回認められたTNF単独による神経保護作用はTNFR2を介したメカニズムによるものかもしれない。またTNFはNFκB活性化やミトコンドリア経路を介してmanganese superoxide dismutase (MnSOD)を発現させ脳傷害を保護することが報告されている<sup>70,71)</sup>。本章緒言で述べたようにグルタミン酸による神経細胞死にはROSが深く関与していると考えられている。従ってTNFがMnSODの発現を介してミトコンドリア周辺の酸化ストレスを中和して神経細胞死抑制しているかもしれない。

一方TNF変換酵素阻害薬TAPIはミクログリアからのTNF遊離をほぼ完全に遮断するにも関わらず、P2X<sub>7</sub>受容体活性化ミクログリアによる神経保護作用を遮断しなかったことからTNF以外の因子が関与している可能性は否定できない。細胞外ATPはミクログリアからTNF遊離を引き起こすだけでなく、plasminogen<sup>75)</sup>、IL-6<sup>72,73)</sup>などの神経保護作用を持つ物質の放出も引き起こす。TNFは神経細胞にIL-6受容体を誘導することが報告されていることから<sup>74)</sup>、ATP刺激後3~6時間にかけて放出されたTNFが神経に作用してIL-6受容体を発現させ、IL-6受容体の準備が整ったところでミクログリアからIL-6が放出されて神経保護活性を示すというシナリオを描くことができる。

ATPに関して、本章の結果と他のグループによる報告をあわせると以下のような仮説を立てることができる(Fig.29)。ミクログリアは虚血や傷害が起きると、傷害の中心(ATPが大量に漏出している部位)にむかって遊走し、傷害が軽度の領域(ATPがμMオーダーの領域)ではplasminogenを放出する。そして傷害の中心部に達してmMオーダーのATPに接触すると、TNFやIL-6放出を介して神経を保護しているかもしれない。またmMオーダーのATPはシナプス前部のP2X<sub>7</sub>受容体を活性化して過剰なグルタミン酸放出を抑制することが報告されている<sup>24,25)</sup>。さらにATPの分解産物で

あるアデノシンもシナプス前部に存在するアデノシン受容体(A1 受容体)を活性化して神経伝達物質の放出を抑制する<sup>76)</sup>。従って細胞外へと漏出した ATP は脳の修復プログラムを稼動させる引き金となり細胞外でも極めて重要な”emergency call”の役割を果たしていると言える。神経細胞は大変ナイーブな細胞であり傷害時には数分の遅れが致命傷となり得る。特に海馬は虚血に弱く、数分、数秒の遅れにより生涯をかけて獲得した個人の能力が破壊され得る。このような傷害に陥って初めて”emergency call”となる物質を合成しては手遅れになりかねないが、その点全ての細胞がエネルギー源として持っている ATP が漏出するだけで周辺に緊急事態を発令できることは極めて効率がよいと考えられる。

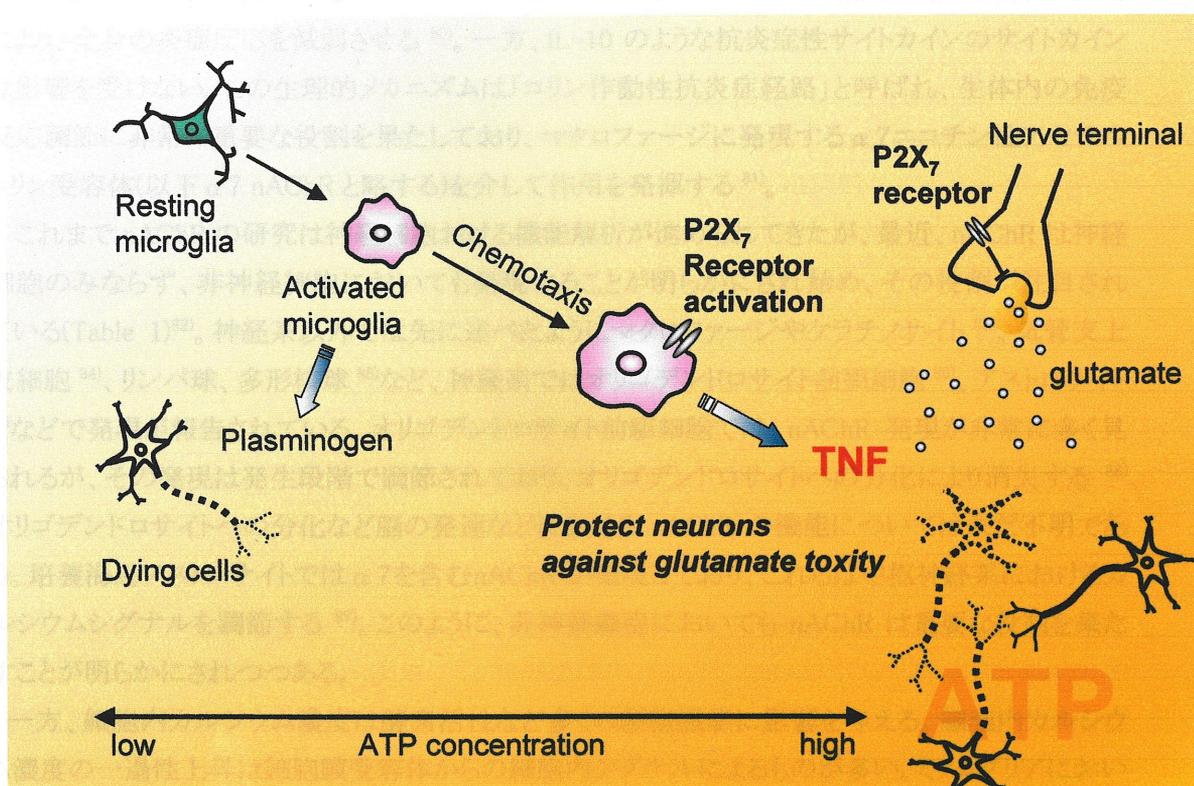


Fig.20 Hypothesis: microglia protect cortical neurons against glutamate toxicity in the physiological condition.

#### IV. ラット脳ミクログリアにおける $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体の発現と機能

生物は感染に対する防御機構を有しており、微生物の感染、外傷などにより素早く免疫応答が起こり感染防御を行う。本来ならば生体を外部刺激から防御するための免疫反応であるが、過度の炎症や TNF をはじめとするサイトカインの過剰な産生は、敗血症や慢性関節リウマチなどある種の疾患において、症状を悪化させる。生体内には炎症反応に対する内因性メカニズムが存在しており、免疫反応を調節することにより、過剰な炎症反応を抑制している。たとえば、炎症性刺激は中枢神経からの抗炎症性シグナルを活性化し、末梢組織における炎症反応は視床下部の神経伝達を変化させる。なかでも、迷走神経を介した系は、神経伝達物質として放出されたアセチルコリンが LPS などのエンドトキシンによるマクロファージからの TNF、IL-1、IL-18 遊離を有意に阻害することにより、全身の炎症反応を減弱させる<sup>80)</sup>。一方、IL-10 のような抗炎症性サイトカインのサイトカインは影響を受けない。この生理的メカニズムは「コリン作動性抗炎症経路」と呼ばれ、生体内の免疫反応調節に非常に重要な役割を果たしており、マクロファージに発現する $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体(以下 $\alpha 7$  nAChR と略する)を介して作用を発揮する<sup>81)</sup>。

これまで nAChR の研究は神経細胞における機能解析が進められてきたが、最近、nAChR は神経細胞のみならず、非神経細胞においても発現することが明らかにされ始め、その役割が注目されている(Table 1)<sup>82)</sup>。神経系以外では先に述べたようにマクロファージやケラチノサイト<sup>83)</sup>、気管支上皮細胞<sup>84)</sup>、リンパ球、多形核球<sup>85)</sup>など、神経系ではオリゴデンドロサイト前駆細胞<sup>86)</sup>、アストロサイト<sup>87)</sup>などで発現が報告されている。オリゴデンドロサイト前駆細胞では、nAChR 発現が非常に多く見られるが、その発現は発生段階で調節されており、オリゴデンドロサイトへの分化により消失する<sup>86)</sup>。オリゴデンドロサイトへの分化など脳の発達などにおける nAChR の機能については未だ不明である。培養海馬アストロサイトでは $\alpha 7$ を含むnAChR が発現しており、これらは中枢神経系におけるカルシウムシグナルを調節する<sup>87)</sup>。このように、非神経細胞においても nAChR は重要な役割を果たすことが明らかにされつつある。

一方、細胞内カルシウム濃度は酵素活性など多くの細胞機能に影響を与える。細胞内カルシウム濃度の一過性上昇は細胞膜受容体からの細胞内シグナルによるものが多い。ミクログリアにおいても、神経伝達物質や免疫反応メディエーターの受容体などの多くがカルシウムシグナルに結びついているため、カルシウム反応は休止状態および活性化型ミクログリアの機能の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。カルシウムシグナルの大きさや動態はリガンド結合型受容体や細胞内効果器のカスケードの特徴により決定され、IP<sub>3</sub> および ryanodine によるカルシウムストアからのカルシウム遊離、カルシウム遊離により活性化されるカルシウムチャネル、カルシウム緩衝システムなどが関与する(Fig. 21)。細胞が休止状態の場合、細胞内カルシウム濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)は約 50~150 nM であるが、外部から刺激が加わると[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は数百 nM~数 $\mu$ M にまで上昇する。Ca<sup>2+</sup>シグナルは主に 4 つのタイプに分類される<sup>92)</sup>(Fig.22)。(A)は細胞内 Ca<sup>2+</sup>ストアからの Ca<sup>2+</sup>遊離あるいは細胞膜の Ca<sup>2+</sup>チャネルの一過性の開口に伴う Ca<sup>2+</sup>流入によるもので、速い一過性の上昇が起こる。(B)は[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の一過性上昇後、持続的にプラトーが続く反応で、受容体型イオンチャネルや細胞内 Ca<sup>2+</sup>

ストアの枯渇により開口する  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル(SOC)が主に寄与する。(C)は  $\text{Ca}^{2+}$ のオシレーションを示しており、 $\text{Ca}^{2+}$ ストアと SOC が関与する。(D)は非常に遅いシグナルで、細胞膜伝導性の非常に遅い活性化や  $\text{Ca}^{2+}$ 排出の調節が変化することにより起こる。

$\text{Ca}^{2+}$ 流入には、リガンド結合による  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性イオンチャネル型の受容体(ROC)、細胞膜の脱分極により活性化される電圧依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル(VOCC)、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ ストアが枯渇するとそれを感じて細胞外から細胞内へ  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を引き起こす store-operated calcium channels (SOC)などが関与する。一方、 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離には、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ ストアに発現する  $\text{IP}_3$  受容体と ryanodine 受容体が関与する<sup>90)</sup>。 $\text{IP}_3$  受容体と ryanodine 受容体が同じ小胞に発現するか、あるいは異なる小胞に発現するかについては様々な報告があり、細胞のタイプによっても違いがあるようだ<sup>93)</sup>。 $\alpha 7$  受容体はカルシウム透過性の高いイオンチャネル型受容体であることから、活性化により細胞内カルシウム濃度に影響を与える可能性が考えられる。そこで、次にニコチンによる細胞内カルシウム濃度の変化とそのメカニズムについて検討した。

細胞内のエネルギー代謝において中心的役割を果たしている ATP は、虚血、炎症時に傷害を受けた細胞から放出され、細胞表面に発現する P2 受容体を介して細胞間のメディエーターとしても働く。ATP 受容体である P2 受容体は神経系に広く分布しており、P2X と P2Y の 2 つのサブタイプに分類される。P2X 受容体はイオンチャネル内蔵型、P2Y 受容体は G タンパク質共役型受容体であり、ミクログリアには P2X<sub>4</sub>、P2X<sub>7</sub>、P2Y<sub>12</sub> の発現が報告されている。前述したように、我々はこれまでに、ラット脳ミクログリアの P2X<sub>7</sub> 活性化により TNF が遊離されることを明らかにした。ATP による刺激 30 分後から、細胞内に TNF mRNA 発現が認められ、1 時間後に最大に達し、その後緩やかに減少したことから、細胞外 ATP は遺伝子転写を介して新たに TNF を産生し、細胞外へと放出させることが明らかになった。さらに P2X<sub>7</sub> を介して活性化されたミクログリアは、グルタミン酸による大脳皮質神経細胞死に対して保護的に働き、その作用には少なくとも TNF を介したものであることを明らかにした。ミクログリアは様々な物質により活性化され、LPS により活性化された場合も ATP 刺激と同じように TNF を遊離するにも関わらず、神経保護作用は示さなかった<sup>82)</sup>。ミクログリアを ATP で刺激した場合は 300~40 pg/mL という中程度の TNF を遊離するのに対し、LPS で刺激した場合は 1~2 ng/mL という多量の TNF を遊離することから、ミクログリアが神経保護作用を発揮するメカニズムの一つとして、TNF の遊離量が重要である。TNF は神経保護と神経傷害の相反する作用を持つため、ミクログリアからの TNF 遊離は厳密に制御されなければならない。ミクログリアの LPS 刺激による TNF 遊離は、抗炎症性サイトカインである IL-10 および IL-4 などにより抑制的に調節されることが報告されている<sup>83)</sup>。最近、マクロファージに発現する  $\alpha 7$  nAChR がアセチルコリンおよびニコチンにより活性化され、LPS 刺激による TNF 遊離を調節することにより、エンドトキシンによる生体内での過剰な炎症反応を抑制することが報告された<sup>81)</sup>。そこで、さらに ATP/BzATP および LPS 誘発 TNF 遊離におけるニコチンの影響とそのメカニズムについて検討した。

Table 7. nAChRs in non-excitable cells <sup>80)</sup>

| Cell Type                         | Subunit   | Ref. |
|-----------------------------------|---|------|
| Macrophage (Human)                | $\alpha 1, \alpha 7, \alpha 10$                   | 102  |
| Keratinocytes (Human)             | $\alpha 3, \alpha 7$                              | 106  |
| Bronchial Epithelium (Human, Rat) | $\alpha 3, \alpha 5, \beta 4, \beta 2, \alpha 7$  | 107  |
| Lymphocytes (Human)               | $\alpha 4, \beta 4, \alpha 3, \alpha 7, \beta 2$  | 108  |
| Polymorpho nuclear cells (Human)  | $\alpha 3, \alpha 4, \alpha 7, \beta 2, \beta 4$  | 108  |
| O2A Progenitors (Rat)             | $\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 7, \beta 2$ | 109  |
| Astrocytes (Rat)                  | $\alpha 7$  | 110  |

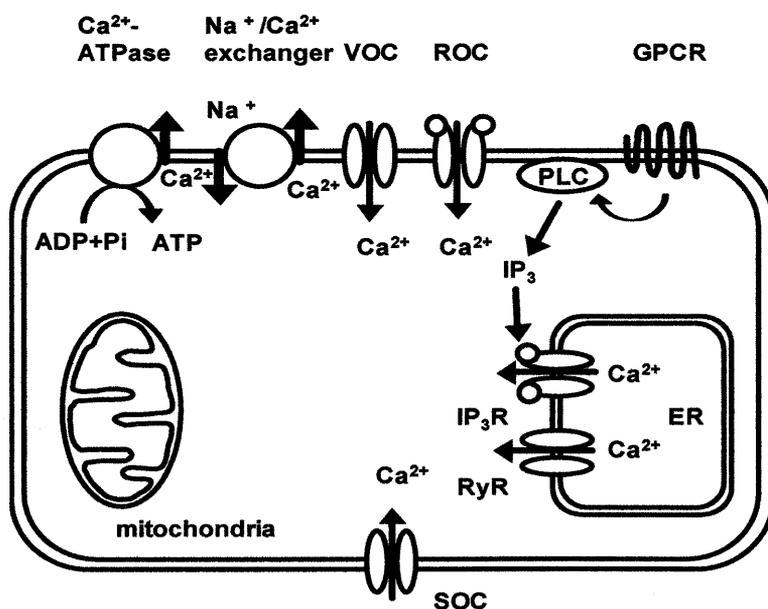


Fig.21 Mechanisms of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. Simplified scheme of cellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. ADP, adenosine diphosphate; ATP, adenosine triphosphate; ER, endoplasmic reticulum; GPCR, G-protein-coupled receptor;  $\text{IP}_3$ , inositol 1,4,5-trisphosphate;  $\text{IP}_3\text{R}$ , inositol 1,4,5-trisphosphate receptor; Pi, inorganic phosphate; PLC, phospholipase C; ROC, receptor-operated channel; RyR, ryanodine receptor; VOC, voltage-operated channel; SOC,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable store-operated channel

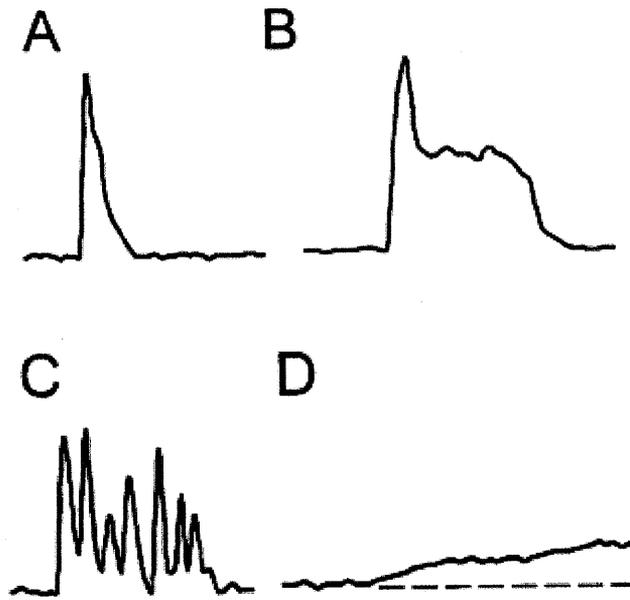


Fig.22 Forms of  $[Ca^{2+}]_i$  signals. A: Transients  $[Ca^{2+}]_i$  signals with a fast initial peak and a fast decay component. B: Transient  $[Ca^{2+}]_i$  signal comprised of an initial peak and a prolonged plateau phase. C: Oscillatory  $[Ca^{2+}]_i$  signal. D: Slow rising  $[Ca^{2+}]_i$  signals.

#### [実験方法および実験材料]

##### (1) Real Time RT-PCR 法による $\alpha 7$ nAChR mRNA の定量

(3)で調製した RNA  $1 \mu g$  を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として  $\alpha 7$  nAChR mRNA またはラット TNF mRNA と GAPDH(内部標準)mRNA に特異的な primer を用い、熱変性 15 sec/95°C、アニーリング 10 sec/57°C、伸長反応 1 min/72°C を 1 サイクルとして、40 サイクルを ABI PRISM 7700 を使用しリアルタイム PCR 増幅を行った。各サンプル mRNA 定量は各 PCR 産物を含むプラスミドを用い、コピー数とサイクル数(Ct 値)の関係を求めた。

##### (5) Western blotting 法による $\alpha 7$ nAChR 発現の検出

細胞浮遊液を 60mm シャーレ( $5 \times 10^5$  cells/3 mL/dish) で播き、45 分後にメディウムを除去し、精製した。氷冷した PBS で細胞を洗浄後、SDS sample buffer(62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 % w/v SDS, 10 % glycerol, 50 mM DTT, 0.1 % w/v bromophenol blue)を加え、セルスクレーパーで細胞を剥離後、回収し、超音波で細胞を粉碎した。95°C で 5 分間熱処理後、サンプル中の蛋白質を SDS-polyacrylamide-gel electrophoresis(SDS-PAGE)で分離し、PDVF 膜に転写した。一次抗体として、 $\alpha 7$  nAChR 特異的な抗体を用い、HRP 標識 anti-rabbit IgG を反応させ、ECL で検出した。

## (6) 免疫染色

細胞浮遊液を 35 mm ガラスボトムシャーレ( $3 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ L/dish) で播き、45 分後にメディアムを除去し、精製した。パラホルムアルデヒドを 4°C で 15 分間インキュベート細胞を固定した後、PBS で洗浄した。細胞に 1%アルブミンを含む PBS を室温で 30 分間インキュベートしてブロッキングを行った後、ウサギ ポリクロナール抗  $\alpha 7$ nAChR 抗体を室温で 1 時間インキュベートし、2 回洗浄した後、FITC 標識した抗ラビット抗体を室温で 1 時間インキュベートした。サンプルは共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。

## (7) Whole-cell patch-clamp recording

ミクログリアをチャンバーに播き、チャンバーは細胞外液で 2 mL/min で常時還流した。細胞外液には NaCl (165 mM), KCl (5 mM), glucose (10 mM), CaCl<sub>2</sub> (2 mM), HEPES (5 mM)が含まれており、NaOH で pH7.3 に調節した。実験は室温で行った。ミクログリアにおいて、薬物により誘導される電流は、Axopatch 200A patch clamp system (Axon Instruments, Foster City, CA)を用いて記録した。パッチピペット borosilicate capillary glass (World Precision Instrument-Japan, o.d. 1.5 mm)は、細胞内液 CsCl (80 mM), CsF (80 mM), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), HEPES (10 mM), Cs-EGTA (10 mM)(pH は CsOH で 7.3 に調節した) で満たされた場合、3~7 M $\Omega$ の抵抗を示す。電流記録は 2 kHz のローパスフィルターを用いてノイズをキャンセリングし、program pCLAMP (Axon Instruments)を使って直接記録した。薬物はミクログリアから 50  $\mu$ m の位置から U-shaped tube (“U-tube”)を介して直接投与した。

## (7) 使用試薬および使用機器

実験に使用した試薬および機器は以下の通りである。anti- $\alpha 7$ nAChR(Santa Cruz), anti-rabbit IgG FITC conjugate(Sigma),  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -Bgt), methyllycaconitine (MLA), (-)-nicotine hydrogen tartrate および (-)-xestospongine C (SIGMA), BAPTA-AM (Wako), ryanodine, thapsigargin (Alomone), U73122 (CALBIOCHEM), Axopatch 200A patch clamp system および pCLAMP (Axon Instruments) Borosilicate capillary glass (orld Precision Instrument)。

## **[実験結果]**

### **(1) ラット脳ミクログリアにおける $\alpha 7$ nAChR 受容体の発現**

近年、 $\alpha 7$  nAChR は神経細胞のみならず、非神経細胞においても発現することが報告されつつある<sup>82)</sup>。末梢ではマクロファージに発現しており<sup>81)</sup>、アストロサイトなどグリア細胞でも発現が確認されている<sup>87)</sup>。ラット脳ミクログリアにおいて、 $\alpha 7$  nAChR 特異的なプライマーを用いて RT-PCR 解析を行ったところ、 $\alpha 7$  nAChR mRNA を検出した(データは省略)。また、 $\alpha 7$  nAChR 特異的抗体を用いて Western blot で解析した結果、分子量約 55kDa の  $\alpha 7$  nAChR のバンドを確認した(Fig.23a)。ポジティブコントロールとして、 $\alpha 7$  nAChR 受容体を過剰発現させた HEK 293 細胞を用いた。神経に

主に発現する $\alpha 4 \beta 2$ の特異的抗体を用いて同様の検討を行ったが、 $\alpha 4 \beta 2$ のバンドは検出されなかった(データは省略)。さらに、 $\alpha 7$  nAChR 特異的抗体を用いて免疫染色を行ったところ、細胞膜と細胞内の一部に染色が認められた(Fig.23b)。以上の結果より、ラット脳ミクログリアにおける $\alpha 7$  nAChR の発現が確認された。

## (2) 細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度 $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼすニコチンの影響

受容体を介した細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の変化は、細胞外の情報を細胞内へ伝える重要なシグナルであり、ミクログリアにおいても、細胞内カルシウム濃度は厳密に制御されている<sup>92)</sup>。 $\alpha 7$  nAChR はカルシウム透過性の高いイオンチャンネルとして知られているため<sup>94,95)</sup>、ニコチンがミクログリアの $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす影響を fura-2 蛍光画像解析により検討した。ミクログリアにニコチン (1 mM)を処置すると、 $[Ca^{2+}]_i$ の一過性上昇が認められた(Fig.24a)。この反応は $\alpha 7$  nAChR 選択的阻害薬 MLA (methyllycaconitine)および、 $\alpha 7$  nAChR に特異的に結合する $\alpha$ -Bgt ( $\alpha$ -Bungarotoxin)により抑制された(Fig.24b,c)。したがって、ニコチンによる細胞内カルシウム濃度の一過性上昇は、 $\alpha 7$  nAChR を介した反応であることが示唆された。

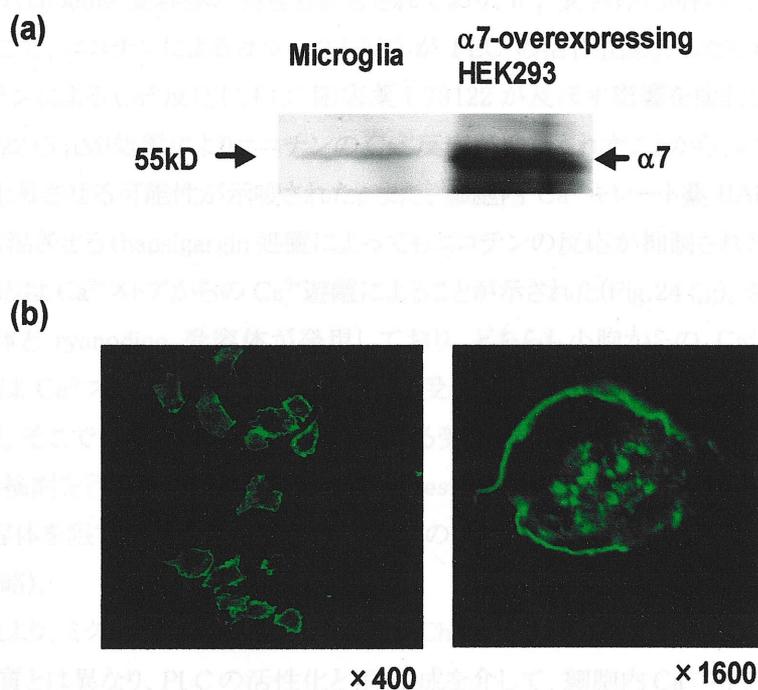


Fig.23 The expression of  $\alpha 7$  nAChRs in rat cultured microglia. (a) Western blots of  $\alpha 7$  nAChRs in microglia. Cell lysates from microglia cultured from 8 days to 17 days were detected by western blotting using antibody which recognizes  $\alpha 7$  nAChRs. HEK 293 cells overexpressing rat  $\alpha 7$  nAChRs were used as a positive control. (b) Immunostaining of  $\alpha 7$  nAChRs in microglia. Microglia were stained with anti- $\alpha 7$  nAChR -specific antibody labeled with FITC. Magnification: left,  $\times 400$ ; right,  $\times 1600$ .

### (3)ニコチンによる細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 変化における細胞外カルシウムの関与

$\alpha 7$  nAChR はイオンチャネルを形成し高い  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性を示すことから、細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇する可能性が考えられる。そこで  $\text{Ca}^{2+}$  free-DMEM を用いて、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ が存在しない条件下で同様の検討を行ったところ、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 非存在下においても $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の一過性上昇が認められ、反応の大きさも同程度であった(Fig.24d)。したがって、ニコチンによるカルシウム反応は、細胞外カルシウムに非依存的であることが示唆された。

### (4) ニコチンによる細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 変化の細胞内メカニズムの解明

これまでの報告から  $\alpha 7$  nAChR はイオンチャネル型受容体であると考えられているが、ミクログリアにおけるニコチンの  $\text{Ca}^{2+}$ 反応は細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入に非依存的であったことから、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離が関与する可能性が考えられる。G 蛋白共役型受容体や受容体型蛋白リン酸化酵素が活性化されると、PLC(Phospholipase C)の活性化により、 $\text{PIP}_2$  (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphates)から DG(diacylglycerol)と  $\text{IP}_3$  (inositol 1,4,5-triphosphate)が産生され、 $\text{IP}_3$  はセカンドメッセンジャーとして小胞表面上に発現する  $\text{IP}_3$  受容体に結合し、 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離を引き起こす。また、小胞には ryanodine 受容体の発現も報告されており、 $\text{IP}_3$  受容体と同様に、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の調節に関与する<sup>93)</sup>。そこで、ニコチンによるカルシウム反応が PLC の活性化を介したものを明らかにするために、ニコチンによる  $\text{Ca}^{2+}$ 反応に PLC 阻害薬 U73122 が及ぼす影響を検討した(Fig.24e)。ミクログリアの U73122 (5  $\mu\text{M}$ )処置によりニコチンの  $\text{Ca}^{2+}$ 反応が抑制されたことから、ニコチンは PLC を介して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させる可能性が示唆された。また、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ キレート薬 BAPTA および細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ ストアを枯渇させる thapsigargin 処置によってもニコチンの反応が抑制されたことから、ニコチンによる  $\text{Ca}^{2+}$ 反応は  $\text{Ca}^{2+}$ ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離によることが示された(Fig.24 f,g)。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ ストアには、 $\text{IP}_3$  受容体と ryanodine 受容体が発現しており、どちらも小胞からの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離を調節する。Thapsigargin は  $\text{Ca}^{2+}$ ストアを枯渇させるため、 $\text{IP}_3$  受容体と ryanodine 受容体の両方を阻害すると考えられる<sup>93)</sup>。そこで、ニコチンの反応に関与する受容体を同定するため、各受容体の阻害薬を用いて以下の検討を行った。 $\text{IP}_3$  受容体阻害薬 xestospngin-C はニコチンの反応を抑制したが、ryanodine 受容体を阻害する ryanodine はニコチンの反応には無影響であった(Fig.24 h, ryanodine のデータは省略)。

以上の結果より、ミクログリアに発現する  $\alpha 7$  nAChR は、神経の  $\alpha 7$  nAChR に認められるイオンチャネルの性質とは異なり、PLC の活性化と  $\text{IP}_3$  生成を介して、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ ストアから  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離を引き起こす可能性が示唆された。

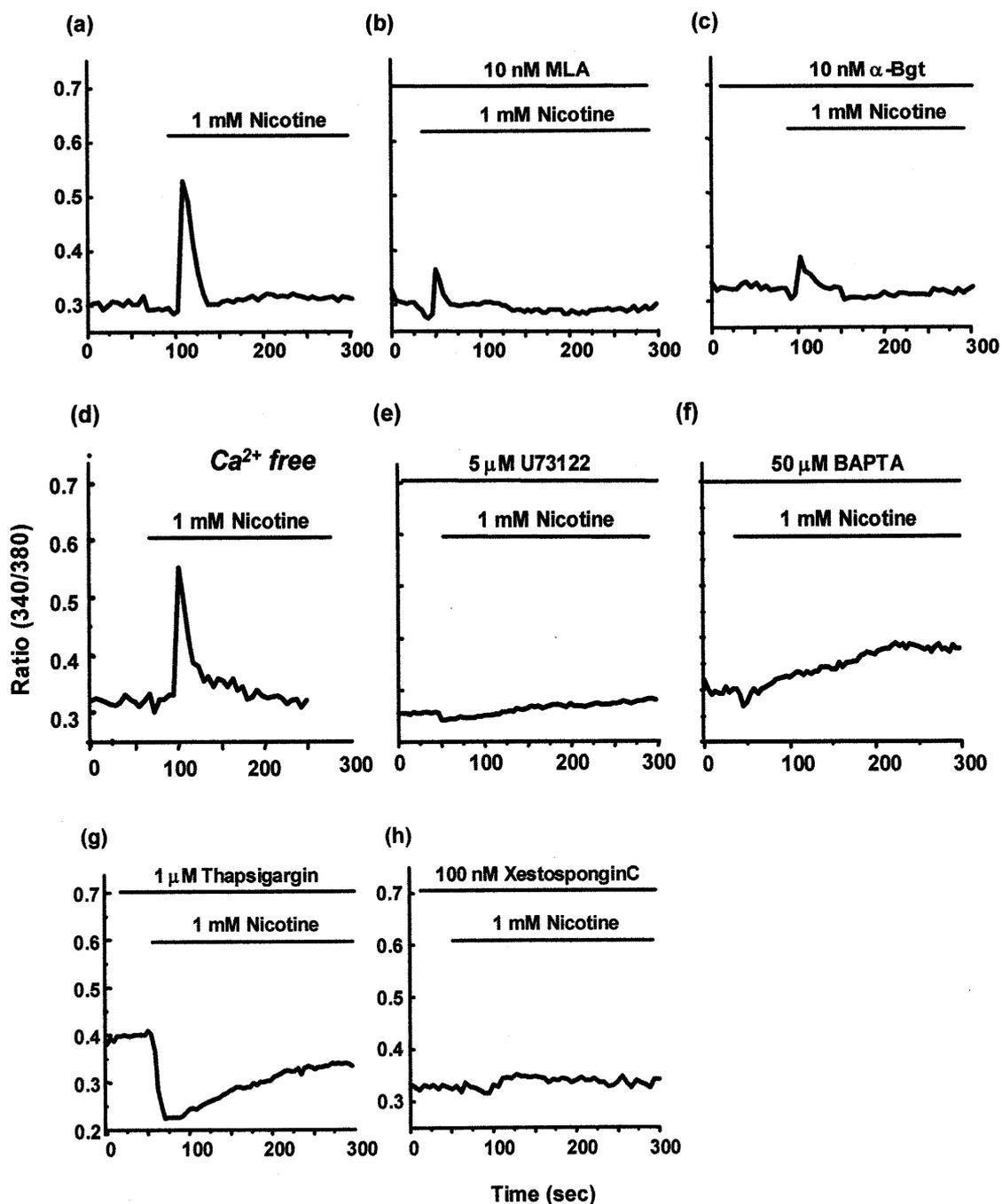


Fig.24  $\text{Ca}^{2+}$  responses in nicotine-stimulated microglia. The traces shown are representative of mean increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  of 30 cells in each culture. Fura-2-loaded cells were stimulated with 1 mM nicotine (a), or stimulated with 1 mM nicotine in the presence of 10 nM MLA (b) or 10 nM  $\alpha$ -bungarotoxin (c), selective inhibitors of  $\alpha 7$  receptor, in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (d), in the presence of 5  $\mu\text{M}$  U73122, an inhibitor of PLC (e), 50  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM, an intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  chelator (f), 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin, an inhibitor of microsomal  $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$  (g), 10 nM xestosponginc, an inhibitor of  $\text{IP}_3$  receptors (h). Similar results were obtained in at least three independent experiments.

#### (4) ミクログリアにおける $\alpha 7$ 受容体を介する電流

ミクログリアに発現する $\alpha 7$ nAChR がリガンド結合型イオンチャネルとして機能するのかを調べるために、whole cell パッチクランプ法を用いて、 $\alpha 7$  nAChR を介したニコチンによる $\text{Ca}^{2+}$ 電流について検討した。ミクログリアは $\alpha 7$  nAChR を発現しているにも関わらず、 $\alpha 7$  nAChR の $\text{Ca}^{2+}$ 電流は全く検出されなかった。しかし、全ての細胞において電位依存性電流が観察され、ATP 刺激によっても $\text{Ca}^{2+}$ 電流が観察された(Fig.25 a,b)。したがって、ミクログリアに発現する $\alpha 7$  nAChR はリガンド結合型イオンチャネルとしては機能していない可能性が示唆された。

#### (5) ミクログリアの ATP/BzATP/LPS 誘発 TNF 遊離におけるニコチンの影響

まず、ミクログリアにおける ATP/BzATP/LPS 誘発 TNF 遊離に対するニコチンの影響について検討した。ミクログリアにおける LPS 誘発 TNF 遊離は、ニコチン前処置により有意に抑制された(Fig.26a)。一方、ATP/Bz ATP による TNF 遊離は、ニコチンにより有意に増強された(Fig.26b, BzATP のデータは省略)。したがって、ニコチンはミクログリアの LPS 刺激による過剰な TNF 遊離を抑制する一方、ATP 刺激による中程度の TNF 遊離は増強することが明らかとなった。

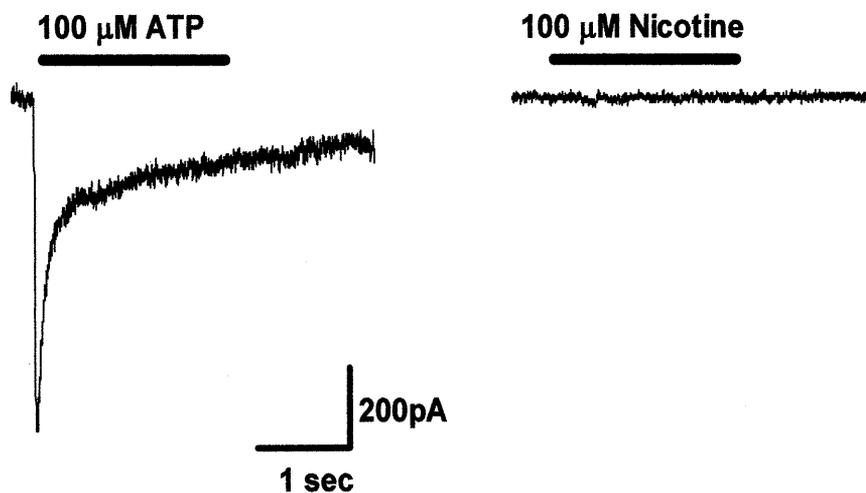


Fig.25 Nicotine induces no current of  $\alpha 7$  receptor in rat cultured microglia. (a) ATP 100  $\mu\text{M}$  induced current in all the microglia tested. (b) Nicotine 100  $\mu\text{M}$  did not induce any currents in the same microglia. Similar results were obtained in at least three independent experiments.

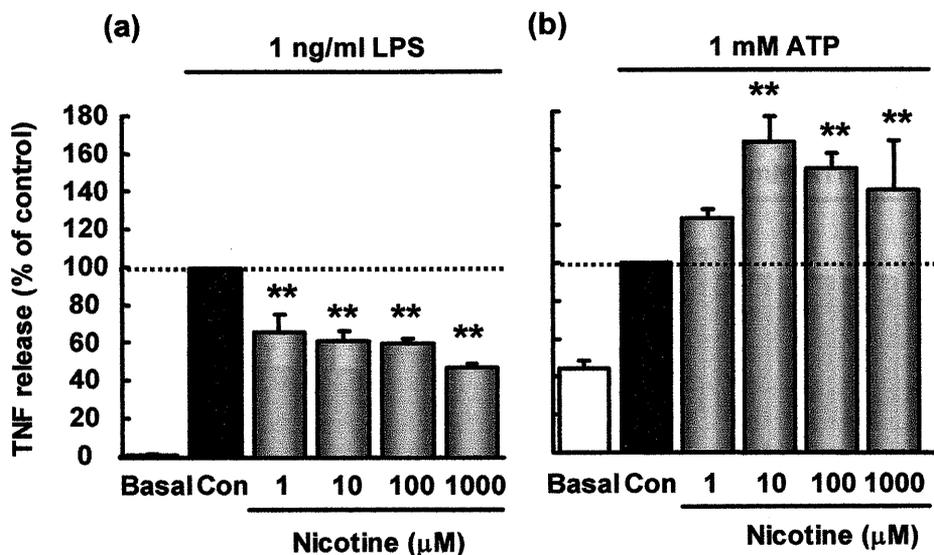


Fig.26 Nicotine suppresses and enhances TNF release induced by LPS (a) or ATP (b) from rat cultured microglia. The cells were pretreated with the indicated concentrations of nicotine for 10 min and stimulated 1 ng/mL LPS or 1 mM ATP for 3 hr. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM of percentage of release compared with LPS or ATP only. Values of 100 % for the release of TNF in LPS-stimulated and ATP-stimulated microglia were  $11.7 \pm 3.7$  ng/ $10^6$  cells and  $0.424 \pm 0.033$  ng/ $10^6$  cells, respectively. \*\* $P < 0.01$  significantly different from the control (ANOVA and Dunnett's test) (n=4).

#### (6) ミクログリアの ATP/BzATP/LPS 誘発 TNF mRNA 発現におけるニコチンの影響

ミクログリアから ATP/BzATP/LPS 刺激により遊離される TNF は、TNF mRNA 発現を介した新たな蛋白産生による。そこで、ニコチンの TNF 遊離調節のメカニズムを明らかにするために、ATP、BzATP および LPS 刺激による TNF mRNA 発現について検討した。ニコチンを前処置しても、全ての刺激において TNF mRNA 発現に変化は認められなかった(Fig.27 a, b, BzATP のデータは省略)。したがって、ニコチンは ATP、BzATP、LPS 刺激において転写後段階を調節することにより、TNF 遊離を抑制することが示唆された。

#### (7) ミクログリアの ATP/LPS 誘発 MAPK 活性化におけるニコチンの影響

ミクログリアにおける ATP/BzATP 誘発 TNF 遊離には MAPK が重要な役割を果たしており、ERK、JNK は TNF mRNA 発現を、p38 は mRNA の核外輸送を制御している<sup>99)</sup>。ミクログリアにおける LPS 誘発 TNF 遊離においてもこれら 3 種類の MAPK は重要な役割を果たしている<sup>101)</sup>。各 MAPK 阻害薬を用いて LPS 誘発 TNF mRNA 発現における MAPK の影響を検討したところ、ERK 阻害薬 U0126 は TNF mRNA 発現を抑制したが、p38 阻害薬 SB203580 および JNK 阻害薬 SP600125 は TNF mRNA 発現には無影響であった(Fig.28)。したがって、LPS 誘発 TNF 遊離において ERK は mRNA 転写段階を、p38 および JNK は転写後段階を調節することが明らかになった。ニコチンが ATP、BzATP および LPS 刺激による MAPK 活性化に及ぼす影響について検討した。その結果、ニコチンは ATP および BzATP による MAPK 活性化に対し無影響であった(Fig.29, BzATP の結果

は省略)。一方、LPS 刺激による MAPK 活性化においてニコチンは ERK 活性化に対し無影響であったが、p38、JNK の活性化は濃度依存的に抑制した(Fig.29)。

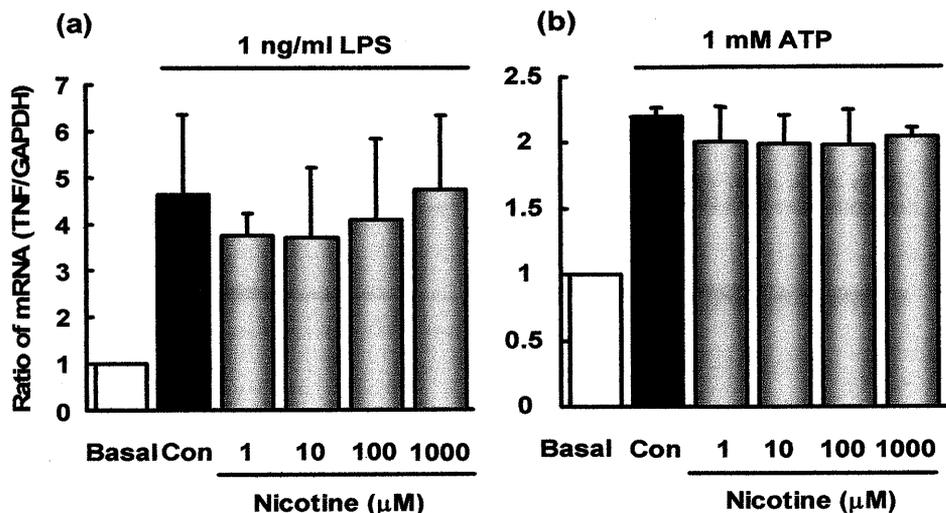


Fig.27 Effects of nicotine on LPS- (a) or ATP- (b) induced TNF mRNA expression in rat cultured microglia. The cells were preincubated with the indicated concentrations of nicotine for 10 min and stimulated 1 ng/mL LPS or 1 mM ATP for 1 hr. Values are shown as the ratio of expression compared with LPS or ATP only.

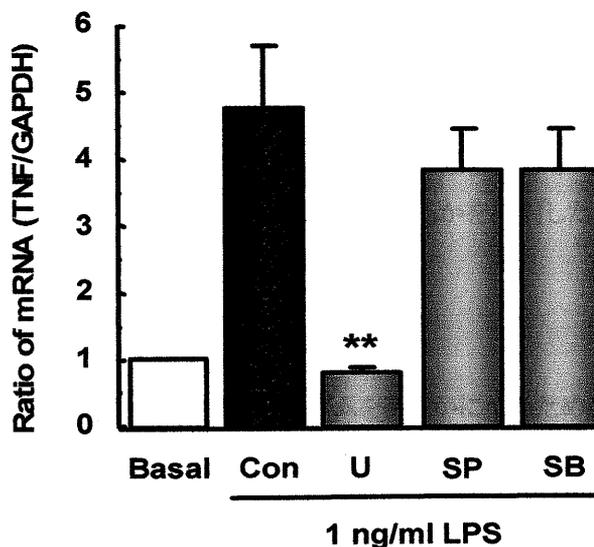


Fig.28 Effects of U0126 (U), SB203580 (SB) and SP600125 (SP) on LPS-induced TNF mRNA expression in rat cultured microglia. The cells were preincubated with 10 μM U0126, 15 μM SB203580 or 30 μM SP600125 for 20 min and stimulated 1 ng/mL LPS for 1 hr. Values are shown as the ratio of expression compared with LPS only. Data are expressed as mean ± SEM of ratio of expression compared with LPS only. \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the control (ANOVA and Dunnett's test) (n=3).

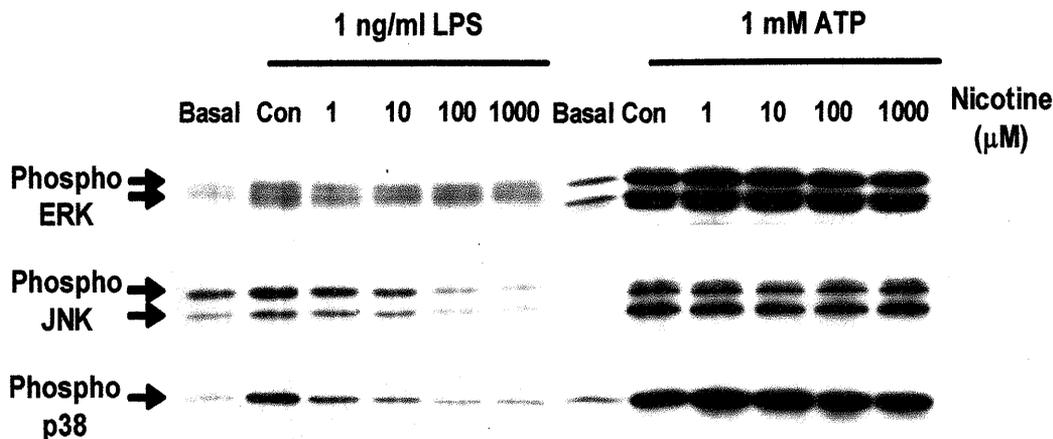


Fig.29 Effects of nicotine on activation of MAP kinase, ERK, p38 and JNK in LPS- (left panel) or ATP- (right panel) stimulated microglial cells. The cells were pretreated with the indicated concentration of nicotine for 10 min and stimulated with 1 ng/mL LPS for 30 min or 1mM ATP for 10 min. The phosphorylated (active) and total ERK, p38 and JNK were detected by western blotting using antibodies which recognize phosphorylated and both phosphorylated/non-phosphorylated enzymes, respectively (n=3).

以上の結果より、ニコチンは ATP 誘発 TNF 遊離に対しては、MAPK 非依存的な経路で転写後段階を調節することにより TNF 遊離を増強することが示唆された。一方、LPS 誘発 TNF 遊離に対してニコチンは MAPK の p38 および JNK 活性化を抑制することにより転写後段階を調節し、TNF 遊離を抑制することが示唆された。海馬神経細胞において、ニコチンは  $\alpha 7$  nAChR を介して ERK を活性化し<sup>102)</sup>、樹状細胞においても同様に p38 の活性化が報告されている<sup>103)</sup>。そこで、ミクログリアにおいてもニコチン単独処置により MAPK が活性化されるかを検討したが、MAPK 活性化は検出されなかった(データは省略)。

#### (8) ニコチンによる LPS 誘発 TNF 遊離抑制のメカニズム

ニコチンが LPS 誘発 TNF 遊離を抑制するメカニズムを明らかにするために、以下の検討を行った。 $\alpha 7$  nAChR の阻害薬である MLA は、ニコチンによる TNF 遊離調節作用を阻害したことから、ニコチンは  $\alpha 7$  nAChR を介して LPS 誘発 TNF 遊離を抑制することが示唆された(Fig.30a)。また、ニコチンによるカルシウム反応が、TNF 遊離の抑制作用に関与するかを明らかにするために、IP<sub>3</sub> 受容体阻害薬 xestospongine-C を処置したところ、ニコチンの作用は完全に阻害された(Fig.30b)。したがって、ニコチンは  $\alpha 7$  nAChR を介して LPS 誘発 TNF 遊離の抑制作用を発揮するが、そのメカニズムに細胞内カルシウム濃度の上昇が関与することが示唆された。

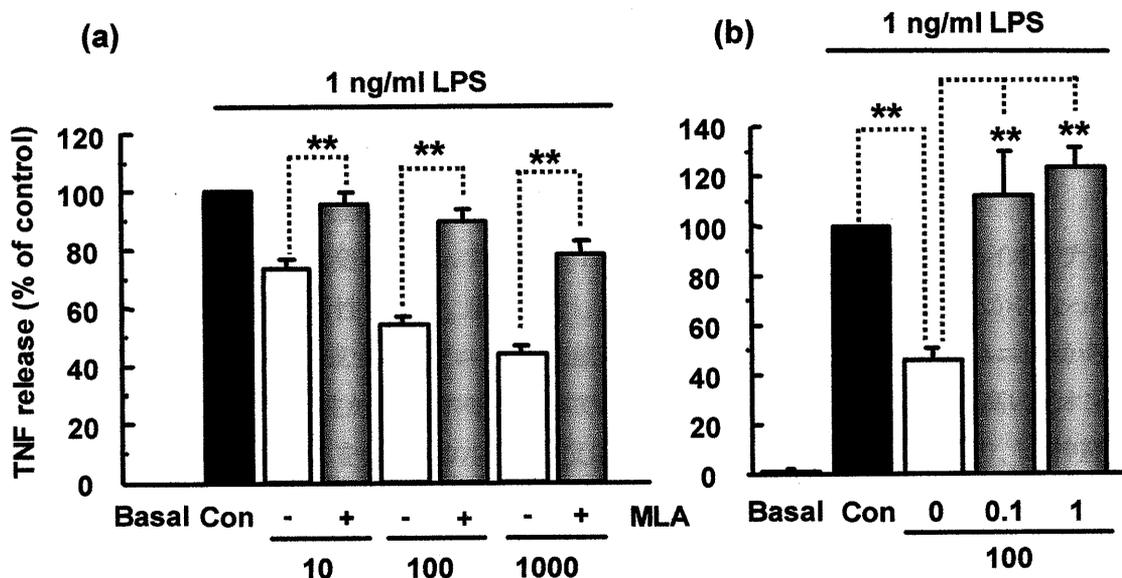


Fig.30 Effects of MLA or xestospongins C in the inhibitory effects of nicotine on LPS-induced TNF release. The cells were treated with 10 nM MLA (a) or 0.1  $\mu$ M or 1  $\mu$ M xestospongins C (b) for 10 min before addition of nicotine, and then stimulated with 1 ng/ml LPS for 3 hr. The released TNF were measured by ELISA. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM of percentage of release compared with LPS alone from three independent experiments. Values of 100 % for the release of TNF in LPS-stimulated microglia were  $20.5 \pm 1.9$  ng/ $10^6$  cells (a), and  $23.2 \pm 4.0$  ng/ $10^6$  cells (b), respectively. \*\*  $P < 0.01$ , significantly different from the control (ANOVA and Dunnett's test) (n=3).

### [考 察]

本研究の結果より、ラット脳ミクログリアにおける  $\alpha 7$  nAChR の発現が明らかになった。ミクログリアにはムスカリン性アセチルコリン受容体が発現しており、その活性化により細胞内カルシウム濃度が上昇するなどその機能についても報告されている<sup>88)</sup>。しかしnAChRの発現や機能には不明の点が多く、本研究で初めてラット脳ミクログリアにおいて機能を有する  $\alpha 7$  nAChR の発現を確認した。

アセチルコリンは中枢および末梢性コリン作動性神経で合成され、神経伝達におけるシナプス間のシグナル分子として働く。神経筋接合部において、神経終末から遊離されたアセチルコリンの拡散距離は受容体の活性化を指標とした測定によると、約 300 nm である<sup>89)</sup>。細胞外において、アセチルコリンはコリンエステラーゼにより分解を受けるため、実際の拡散距離はさらに狭いことが予想される。アセチルコリンは神経のみから遊離されるのであれば、神経終末から非神経細胞や非シナプス部位の距離が離れている場合、そこに発現する nAChR の活性化は困難であるように思えるが、最近アセチルコリン産生は神経に限らず非神経細胞においても行われていることが明らかにされつつある。非神経細胞に発現する nAChR は、その周辺にアセチルコリンの起源が存在することが多く、血管内皮細胞のようにパラクラインあるいはオートクラインにより nAChR を活性化する細胞も存在する。アストロサイトもコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)を発現しており、アセチルコリン

ンを産生することが報告されている<sup>90)</sup>。ミクログリア細胞内においてもアセチルコリンが検出されている。また、アストロサイトにおいてもムスカリン受容体とニコチン受容体の発現が報告されていることから<sup>91)</sup>、アセチルコリンは神経間のみならず、グリア細胞と神経間およびグリア細胞間のシグナル伝達を担う分子として広く脳内で作用を発揮する可能性が考えられる。今回、ミクログリアで発現が確認された $\alpha 7$  nAChRはその機能発現に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

また、ラット脳ミクログリアに発現する $\alpha 7$  nAChRは神経の $\alpha 7$  nAChRで認められるイオンチャネルの機能とは異なり、PLC活性化と $IP_3$ 産生を介して、 $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させることが明らかになった。 $\alpha 7$  nAChRの $Ca^{2+}$ 透過性は、構成するサブユニットに依存する。 $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットから成るヘテロ五量体は $Ca^{2+}$ 透過性が低く、ホモ五量体である $\alpha 7$  nAChRは $Ca^{2+}$ 透過性の高いイオンチャネルである<sup>96)</sup>。 $\alpha 7$  nAChRを介したカルシウム反応については詳しく研究されており、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y細胞では $\alpha 7$  nAChRのチャネルを介して直接 $Ca^{2+}$ が流入し、 $[Ca^{2+}]_i$ を有意に増加させるが、この反応による脱分極を介して電位依存性カルシウムチャネル(VOCC)も開口し、 $Ca^{2+}$ シグナルは更に増強される<sup>97)</sup>。また、VOCC活性化には非依存的にryanodine受容体を介して細胞内 $Ca^{2+}$ ストアからの $Ca^{2+}$ 遊離も引き起こされる<sup>87,97)</sup>。一方、海馬アストロサイトではニコチンの反応にVOCCはほとんど寄与しておらず、チャネルを介したカルシウム流入によるryanodine受容体からのcalcium-induced calcium releaseが主に寄与している<sup>87)</sup>。このように $\alpha 7$  nAChRは、発現する細胞および種により性質が異なるようである。しかし、これまで $\alpha 7$  nAChRにおけるイオンチャネル以外の機能の存在は報告されておらず、ミクログリアに発現する $\alpha 7$  nAChRが新規の機能を持つ可能性が示されたことは、非常に興味深い。ニコチン受容体はイオンチャネルを形成するとされているが、カエル下垂体メラニン細胞刺激ホルモン産生細胞において、ニコチンは細胞外カルシウム非依存的にPLCの活性化を介して細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こすことが報告されている<sup>98)</sup>。したがってニコチン受容体はイオンチャネルとしての機能ではなく、代謝型受容体に類似した細胞内シグナル経路に結びつく機能をもつ受容体も存在する可能性が考えられる。アストロサイトに発現する $\alpha 7$  nAChRは、アセチルコリンに反応し、速い脱分極性の電流が検出される<sup>87)</sup>。しかし、ミクログリアにおいてはアセチルコリンおよびニコチンによる電流が観測されなかったことから、ミクログリアの $\alpha 7$  nAChRはイオンチャネルとしては機能していないのかもしれない。

ニコチンによるカルシウム反応は、刺激を加えてから反応が起こるまでにわずかに時間差が生じる。この現象に加え、 $\alpha 7$  nAChRを同定した免疫染色において細胞内にも一部染色が認められたこと、またニコチンは細胞膜透過性を有することから、細胞内に発現する $\alpha 7$  nAChRがカルシウム反応に寄与している可能性も否定できない。そのため、細胞内の受容体の関与についてはさらに検討が必要である。

中枢神経において、 $\alpha 7$  nAChRを介したカルシウムシグナルは様々な影響を与える。例えば、未分化な海馬前駆細胞は $\alpha 7$  nAChRを低レベルに発現しており、これらが活性化されるとアポトーシスが誘導される。さらに、海馬においては $\alpha 7$  nAChRが活性化されると、プレシナプスでのカルシウムレベルが変化することにより、神経伝達物質の遊離が増加し、自発性興奮の頻度が増加する。ミクログリアにおいても、カルシウムは細胞の活性化や増殖など様々な機能を調節することから、

神経伝達物質として放出されたアセチルコリンが $\alpha 7$  nAChR に作用し、カルシウム反応を介して細胞機能を調節している可能性が考えられる。

本実験の結果より、ミクログリアに発現する $\alpha 7$  nAChR の活性化は ATP 刺激による TNF 遊離を増強する一方、LPS 刺激による TNF 遊離は抑制することが明らかになった。そのメカニズムとしてニコチンは ATP 誘発 TNF 遊離に対して MAPK 非依存的に TNF mRNA 転写後段階を調節することにより遊離量を増強することが示唆された。一方、LPS 誘発 TNF 遊離は、ニコチンによる $\alpha 7$  nAChR 活性化を介し、MAPK の p38、JNK の活性化を抑制することにより TNF mRNA 転写後段階を調節し、遊離量を抑制することが示唆された。またこのニコチンの作用には、ニコチンによる $IP_3$  を介したカルシウム反応が関与することが明らかになった。

脳内のサイトカインネットワークは、ミクログリアとアストロサイトが中心的な役割を果たす。ミクログリアはアストロサイトよりも微弱の刺激に反応し、TNF をはじめとするサイトカインを放出することから、炎症が原因と考えられる脳疾患などにおいてミクログリアの TNF 遊離を調節することが重要であると考えられる。 $\alpha 7$  nAChR はニコチンにより活性化され TNF の遊離を調節することから、脳疾患などの治療の新たな標的と為り得るかもしれない。ミクログリアの神経保護作用には遊離される TNF の量が関与しており、 $\alpha 7$  nAChR は神経保護作用を示す ATP 刺激による TNF 遊離は増強する一方、保護作用を示さず炎症を誘発する LPS 刺激による TNF 遊離は抑制することから、ミクログリアからの TNF 遊離調節を介してミクログリアの作用を神経保護の方向へとシフトさせる可能性が強く示唆される。

また、ミクログリアに発現する $\alpha 7$  nAChR による調節作用の標的になりうるものとして TNF 以外に、High mobility group box protein-1(HMGB1)が挙げられる。HMGB1 は高等動物の核内に普遍的に存在し、進化の過程で高度に保存された分子で<sup>104)</sup>、脳内では神経突起の進展に関与しており、末梢ではマクロファージから分泌される<sup>105)</sup>。マクロファージにおける $\alpha 7$  nAChR は、LPS および TNF 刺激によるマクロファージからの HMGB1 遊離を阻害する<sup>106)</sup>。ミクログリアからの HMGB1 遊離の報告はないが、HMGB1 はミクログリアの A $\beta$  42 貪食作用を濃度依存的に阻害することはすでに報告されているため<sup>107)</sup>、ミクログリアにおいてもマクロファージと同様に HMGB1 が遊離され、脳内の炎症に関与するが、その遊離が $\alpha 7$  nAChR により抑制される可能性が考えられる。アルツハイマー病患者脳では、神経細胞における $\alpha 7$  nAChR の発現の減少が報告されていることから、ミクログリアの $\alpha 7$  nAChR もこれらの疾患により発現抑制が引き起こされているかもしれない。 $\alpha 7$  nAChR の発現が減少すると HMGB1 が過剰に分泌されることによって、脳内での炎症誘導やミクログリアの A $\beta$  貪食作用の阻害が起こり、アルツハイマー病が更に悪化する可能性も考えられる。従って、ミクログリアの $\alpha 7$  nAChR はアルツハイマー病などの脳疾患の治療の標的となる可能性がある。

## [小 括]

本研究により、ミクログリアに $\alpha 7$  nAChR が発現することを確認した。ニコチンは $\alpha 7$  nAChR を介して細胞内カルシウム濃度を変化させるが、その作用はイオンチャネルによるものではなく、PLC の

活性化を介して産生される IP<sub>3</sub> により発揮されることも明らかになった。α7 nAChR は神経をはじめ、アストロサイトやマクロファージなどの細胞にも発現することが報告されているが、その機能はいずれもイオンチャンネルとしての報告であり、本実験により初めて α7 nAChR がイオンチャンネル以外の機能を持つ可能性が示された。

さらに、ニコチンは α7 nAChR を介して ATP 誘発 TNF 遊離を増強する一方、LPS 誘発 TNF 遊離は抑制することが明らかになった。同じ受容体を介した反応であるにも関わらずその調節メカニズムは刺激により異なっており、ニコチンは ATP 刺激では MAPK 非依存的に TNF mRNA の転写後段階を調節することにより TNF 遊離量を増強するのにに対し、LPS による刺激の場合は MAPK の p38 および JNK 活性化の抑制を介して転写後段階を調節し、遊離量を抑制することが明らかになった(Fig.33)。また、ニコチンによるカルシウム反応が LPS 誘発 TNF 遊離に重要であることも示した。

免疫反応は必要な場所で適した大きさ、時間で起こらなければ生体防御機構としての意味を成さず、過剰な反応はむしろ宿主に対して有害な作用をもたらす。サイトカインもその反応を担う一員であり、生体が恒常性を保つためにはその産生・分泌が厳密に制御されなければならない。ミクログリアに発現する α7 nAChR は、これまでに知られているイオンチャンネルとは異なるシグナルを介して、ミクログリアの過剰な活性化を抑制し、本来の神経保護作用を強める役割を果たすことが明らかとなった。従って、ミクログリアの α7 nAChR の更なる機能解析は、ミクログリアが病態形成に関わる神経変性疾患などの新たな治療薬開発につながる可能性が期待される。

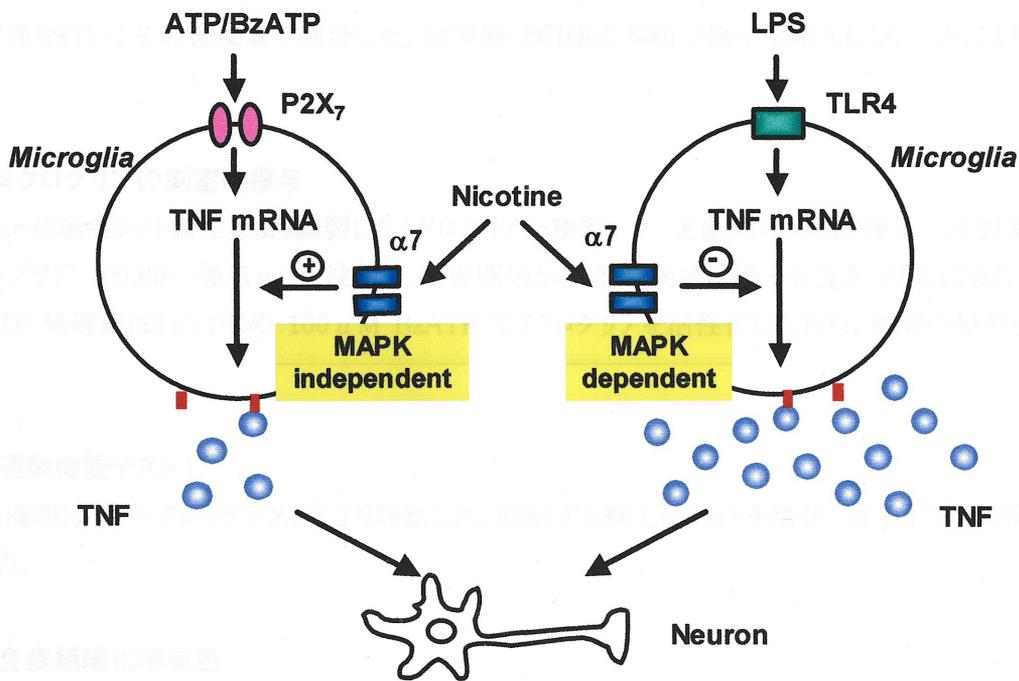


Fig. 33 Schema of effects of nicotine on ATP- or LPS-induced TNF release in microglia.

## IV. ラット脳虚血モデルにおけるミクログリア脳移植による神経保護効果の検討

これまでのミクログリアおよび神経細胞の初代培養を用いた *in vitro* の実験により、ミクログリアは P2X<sub>7</sub> 受容体の活性化を受けると神経細胞に対し保護的に働くことが明らかとなった。そこで、このミクログリアの神経保護効果が *in vivo* においても認められるのか、京都薬科大学病態生理学教室・谷口隆之教授および北村佳久助教授との共同研究により、ラットの脳虚血モデルを用いて検討を行った。

### [実験方法]

#### (1) ラット中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルの作成<sup>109)</sup>

成熟 Wistar 系雄性ラットをフローセンで麻酔し、ヒートパッド上に固定した。頸部正中切開を加え、迷走神経の保存に留意しつつ、左頸動脈分岐部まで露出させ、左頸動脈分岐部を中心に、総頸動脈(CCA)および外頸動脈(ECA)を周囲結合組織より剥離し、総頸動脈に糸をかけ、外頸動脈は糸で結紮し切断した。その後、内頸動脈起始部に切込みをいれ、栓子(ナイロン糸の一端に熱処理を加え、約0.5mmの球状に加工し、コーティングしたもの)を内頸動脈に向けて約19mm挿入し、栓子のナイロン糸近位をクレンメで固定した。(以上の操作により、栓子の先端は動脈分岐部を超えて前大脳動脈(AC)内に入り、栓子の体部で中大脳動脈入り口を閉塞する。)その後、皮膚を縫合した。

中大脳動脈を閉塞した栓子を一定時間(2時間)留置後、フローセン麻酔下に抜き取り、血流の再開通を行い、その後皮膚を縫合した。対照群は同様の手順で栓子を挿入しないことにより作製した。

#### (2) ミクログリアの脳室内投与

Wistar 系雄性ラット新生児より調製したミクログリアを精製した。虚血開始1時間後のラット脳室内にミクログリア 100,000 個/5 $\mu$ l を投与し、虚血開始から 2 時間後に栓子を抜き、再灌流を行った。BzATP 処置群はあらかじめ 100 $\mu$ M BzATP でミクログリアを活性化したのち、脳室内投与を行った。

#### (3) 運動機能テスト<sup>110)</sup>

運動機能は、ロータロッドテストにより評価した。回転する軸上にラットを乗せ、落下までの時間を測定した。

#### (4) 免疫組織化学染色

動物はネンブタール(100 mg/kg)を腹腔内投与した後、深麻酔下で開胸し、左心耳より経心的に灌流固定を速やかに行なった。まず、10 mM リン酸緩衝化生理食塩水(pH 7.4, PBS)を 120 ml、引き

続き4 %パラホルムアルデヒドを含む100 mM PBSを350 ml灌流した。灌流後、脳を速やかに摘出し、同様の組成の固定液にて2日間固定を行った。その後、15 %ショ糖を含む100 mM PBS中にて脱水し、クライオスタットを用いて20  $\mu$ mの凍結切片を作成した。切片は0.3 % Triton-Xを含む100 mM PBSで洗浄した。

免疫組織化学には、神経細胞に対する特異的抗体であるマウス抗 MAP-2 抗体(5000倍)、アストロサイトに対する特異的抗体であるマウス抗 GFAP 抗体(6000倍)、ミクログリアに対する特異的抗体であるマウス抗 CD11b 抗体(6000倍)および Iba1 抗体(5000倍)を用いた。切片を抗体と4日間4°C反応させ、ビオチン標識2次抗体を用いてアビジン-ビオチン標識酵素複合法(ABC法)により検出した。酵素活性は0.02 % 3,3'-diaminobenzidine, 0.3 % 硫酸ニッケルアンモニウムおよび0.0045 % 過酸化水素を含む50 mM トリス塩酸緩衝液(pH7.6)により可視化した。顕微鏡画像は画像解析(Winroof, Mitani, Japan)により定量した。

## [実験結果]

### 1. 虚血モデルラットのロータロッド行動評価

虚血を行う前の全ラットについてロータロッドテストを行った。回転軸上から落下するまでの時間は約176秒(n=7)であった。脳虚血3日後に再びテストをおこなった結果、持続時間は88秒に短縮され、運動機能障害が生じていることが観察された。それに対し、ミクログリアを脳室内投与した群では103秒(n=7)、さらにBzATP前処置した群では121秒(n=7)であり、ミクログリアの脳室内投与により運動機能障害が抑制される傾向が認められた(Fig.34)。

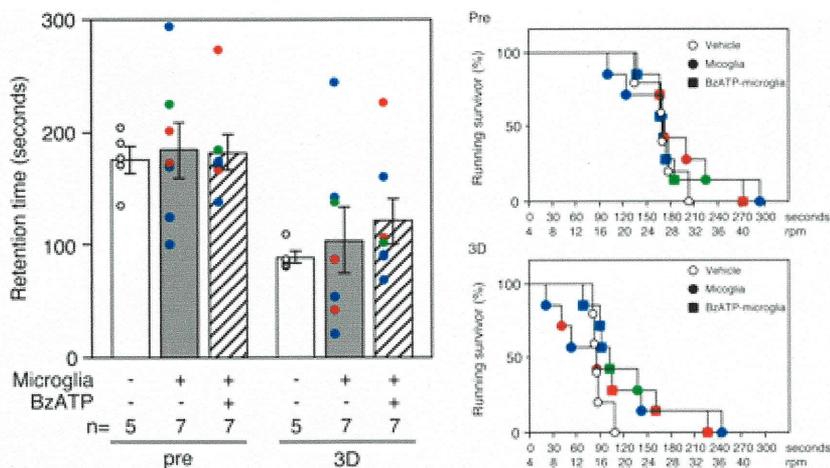


Fig. 34 Rota-rod performance of ischemic rats. Midway through a 2-h occlusion of the MCA, rats were injected i.c.v. with vehicle or 100,000 microglial cells. Sham-operated rats were used as the control group. Pre-operatively (Pre) and on days 3 (3D) after injection, these rats were tested with regard to their endurance on the rotating rod.

## 2. MAP-2 染色による神経細胞死の定量

MCAO による脳虚血により特に線条体および大脳皮質の一部に強い神経細胞死が認められた(Fig.35)。この付近には活性化ミクログリアの集積も観察された(データ省略)。MAP-2 染色領域はコントロールに比べ、約 41%へと減少し、神経細胞死が引き起こされていることが示された。ミクログリアの脳室内投与により、MAP-2 染色面積は約 77%に回復しており、神経細胞死の抑制が認められた。しかし、無刺激のミクログリアですでに十分神経保護効果が認められており、ミクログリアの BzATP 前処置により神経保護効果が有意に促進するデータは得られなかった。しかし、ミクログリアの培養日数によって BzATP 処置に著しい神経細胞死の抑制と運動機能の回復に著効を示す例も認められ、P2X<sub>7</sub> 受容体活性化の重要性についてはさらに検討が必要である。

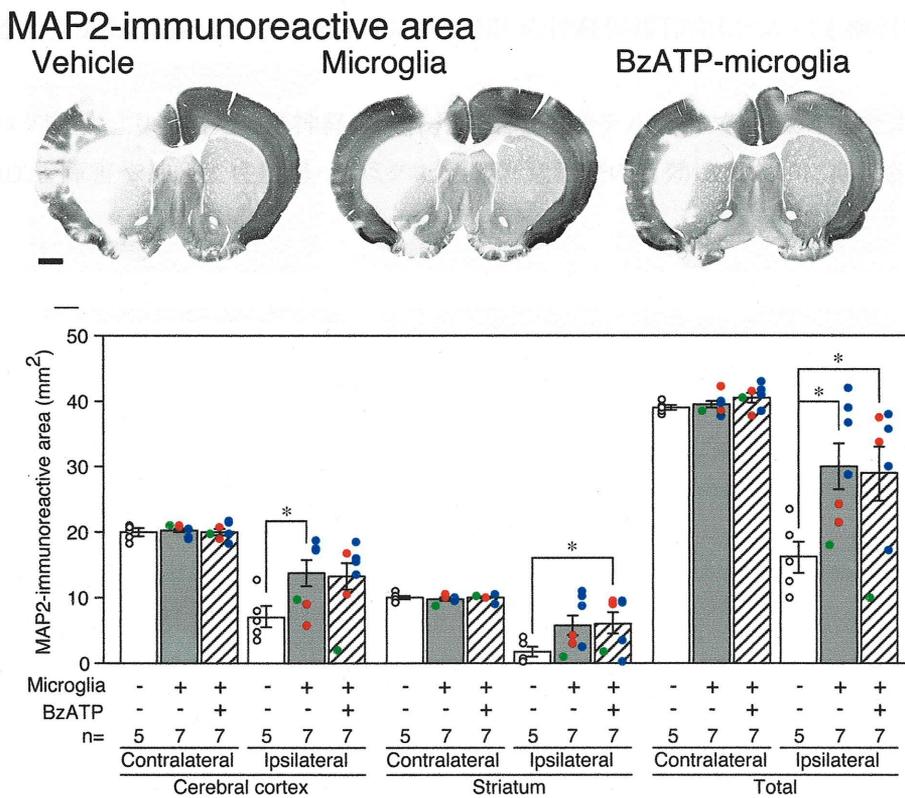


Fig. 35 Changes in the MAP2-immunoreactive are in ischemic rat brains. Frontal sections from rats after 3 days of MCA occlusion and refusion were immunostained by anti-MAP2 antibody. Upper: photographs of MAP2 immunoreactivity. Lower: MAP2 immunoreactive area (mm<sup>2</sup>) analyzed.

## [考 察]

本研究により、これまで培養系で認められていたミクログリアの神経保護活性が、*in vivo*においても発揮されることが確認できた。つまり、脳虚血モデルラットにおいて認められる運動機能障害(ロータロッドテスト)と神経細胞死(MAP-2染色)が、ミクログリアを脳室内投与することにより大きく改善された。培養系ではミクログリアの保護活性はP2X<sub>7</sub>受容体の活性化に依存していた。しかし、虚血モデルでは、BzATPの前処置により大きな保護作用を表す例があったものの、BzATP活性化を行わなくても十分神経保護活性を示す例が多く、本実験では少なくとも無処置群とBzATP処置群の間に有意差は認められなかった。この理由として、虚血部位には大量のATPの放出が予想され、この内因性ATPによるミクログリアのP2X<sub>7</sub>受容体の活性化によりBzATP前処置の効果がマスクされた可能性も考えられる。今後、P2X<sub>7</sub>受容体欠損ミクログリアなどを用いてP2X<sub>7</sub>受容体の役割を確認する必要がある。さらに*in vivo*におけるTNFの神経保護作用についても検討を行う予定である。

ミクログリアによりもたらされる神経保護作用を脳虚血モデルラットで明らかにした本研究の結果より、脳血管障害や神経変性疾患へのミクログリア細胞治療の有効性が大いに期待されると考えられた。

## 引用文献

- 1) Rothwell NJ, Hopkins SJ. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci.* **18**, 130-136 (1995)
- 2) Sawada M, Suzumura A, Marunouchi T. Cytokine network in the central nervous system and its roles in growth and differentiation of glial and neuronal cells. *Int J Dev Neurosci.* **13**, 253-64 (1995)
- 3) Perry RT, Collins JS, Wiener H, Acton R, Go RC. The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* **22**, 873-83 (2001)
- 4) Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP. Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *FASEB J.* **16**, 1474-1476 (2002).
- 5) Cannella B, Raine CS. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* **37**, 424-435 (1995)
- 6) Rostasy K, Monti L, Yiannoutsos C, Wu J, Bell J, Hedreen J, Navia BA. NFkappaB activation, TNF-alpha expression, and apoptosis in the AIDS-Dementia-Complex. *J Neurovirol.* **6**, 537-543(2000)
- 7) Stuart M. Allan and Nancy J. Rothwell. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 734-744 (2001)
- 8) Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtzman FW, Mattson MP. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med.* **2**, 788-794 (1996)
- 9) Scherbel U, Raghupathi R, Nakamura M, Saatman KE, Trojanowski JQ, Neugebauer E, Marino MW, McIntosh TK. Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 8721-6 (1999)
- 10) Carlson NG, Wieggl WA, Chen J, Bacchi A, Rogers SW, Gahring LC. Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J Immunol.* **163**, 3963-3968 (1999)
- 11) Yang L, Lindholm K, Konishi Y, Li R, Shen Y. Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways. *J Neurosci.* **22**, 3025-32 (2002)
- 12) Fontaine V, Mohand-Said S, Hanoteau N, Fuchs C, Pfizenmaier K, Eisel U. Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J Neurosci.* **22**, RC216 (2002)
- 13) Kazuyuki Nakajima and Shinichi Kohsaka. Microglia: Activation and their significance in the central nervous system. *J. Biochem.* **130**, 169-175 (2001)
- 14) Gehrmann J. Microglia: a sensor to threats in the nervous system? *Res Virol.* **147**, 79-88(1996)
- 15) 澤田 誠. ミクログリアの新規な性質と脳での役割 -ミクログリアは脳で何をしているか. *細胞工学* **18**, 550-558 (1999)
- 16) Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**, 140-55 (2002)
- 17) Gebicke-Haerter PJ. Microglia in neurodegeneration: molecular aspects. *Microsc Res Tech* **54**,47-58 (2001)

- 18) Nakamura Y. Regulating factors for microglial activation. *Biol Pharm Bull* **25**, 945-953(2002)
- 19) North RA, Surprenant A. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **40**, 563-580 (2000)
- 20) North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* **82**, 1013-67(2002)
- 21) Khakh BS. Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat Rev Neurosci.* **2**, 165-74 (2001)
- 22) A. Surprenant, F. Rassendern, E. Kawashima, R. A. North, G. Buell. The cytolytic P2z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science.* **272**, 735-737 (1997)
- 23) C. Virginio, A. MacKenzie, F. A. Rassenderen, R. A. North and A. Surprenant. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nature neuroscience.* **2**, 315-321 (1999)
- 24) D. Ferrari and F. D. Virgilio. Purinergic P2X<sub>7</sub>-mediated responses in immune cells. *Mod. Asp. Immunobiol.* **1**, 156-159 (2000)
- 25) Deuchars SA, Atkinson L, Brooke RE, Musa H, Milligan CJ, Batten TF, Buckley NJ, Parson SH, Deuchars J. Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci.* **21**, 7143-7152 (2001)
- 26) John N. Armstrong, Tyson B. Brust, Randall G. Lewis, and Brian A. MacVicar. Activation of presynaptic P2X7-like receptors depresses mossy fiber-CA3 synaptic transmission through p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci.* **22**, 5938-5945(2002)
- 27) Lucy Atkinson, Carol. J. Milligan, Noel J. Buckley, Jim Deuchars. An ATP-gated ion channel at the cell nucleus. *Nature.* **420**, 42 (2002)
- 28) Ivar von Kugelgen and Axel Wetter. Molecular pharmacology of P2Y-receptors *Naunyn-Schmiederg's Arch Pharmacol.* **362**, 310-323 (2000)
- 29) Didier Communi, Nathalie Suarez Gonzalez, Michel Detheux, Stephane Brezillon, Vincent Lannoy, Marc Parmentier, and Jean-Marie Boeynaems. Identification of a novel human ADP receptor couple to Gi. *Journal of Biological Chemistry.* **276**, 41479-41485(2001)
- 30) Dubyak GR, el-Moatassim C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* **265**, C577-606(1993)
- 31) Hide I, Tanaka M, Inoue A, Nakajima K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia. *J Neurochem* **75**, 965-72 (2001)
- 32) 鈴木 智久 修士論文 (2002)
- 33) Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol.* **19**, 2435-44(1999)
- 34) Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol.* **81**, 807-69 (2001)
- 35) Lee JD, Ulevitch RJ, Han J. Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* **15**, 715-24 (1995)
- 36) Koistinaho M, Koistinaho J. Role of p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases in microglia. *Glia* **40**, 175-83 (2002)
- 37) Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun

- N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 13681-13686 (2002)
- 38) Nakajima, K., Hamanoue, M., Shimojo, M., Takei, N. and Kohsaka, S. Characterization of microglia isolated from primary culture of embryonic rat brain by a simplified method. *Biomed. Res.* **10**, 411-423 (1989)
  - 39) Diaz-Rodriguez E, Montero JC, Esparis-Ogando A, Yuste L, Pandiella A. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol Biol Cell.* **13**, 2031-2044 (2002)
  - 40) 志村令郎, 渡辺公綱共編. RNA 研究の最前線. シュプリンガー・フェアラーク東京 (2000)
  - 41) Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C, Kontoyiannis D, Stamatakis K, Lin JH, Patriotis C, Jenkins NA, Copeland NG, Kollias G, Tschlis PN. TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* **103**, 1071-83(2000)
  - 42) Kaneko M, Saito Y, Saito H, Matsumoto T, Matsuda Y, Vaught JL, Dionne CA, Angeles TS, Glicksman MA, Neff NT, Rotella DP, Kauer JC, Mallamo JP, Hudkins RL, Murakata C. Neurotrophic 3,9-bis[(alkylthio)methyl]-and-bis(alkoxymethyl)-K-252a derivatives. *J Med Chem.* **6**, 1863-1869 (1997)
  - 43) Guha M, O'Connell MA, Pawlinski R, Hollis A, McGovern P, Yan SF, Stern D, Mackman N. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* **98**, 1429-1439 (2001)
  - 44) Ming XF, Kaiser M, Moroni C. c-jun N-terminal kinase is involved in AUUUA-mediated interleukin-3 mRNA turnover in mast cells. *EMBO J.* **17**, 6039-48 (1998)
  - 45) Chen CY, Del Gatto-Konczak F, Wu Z, Karin M. Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Science.* **19**, 1945-9 (1998)
  - 46) Kotlyarov A, Neining A, Schubert C, Eckert R, Birchmeier C, Volk HD, Gaestel M. MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nat Cell Biol* **1**, 94-97(1999)
  - 47) Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA. 1997 Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J* **15**, 1909-201997
  - 48) Rousseau D, Kaspar R, Rosenwald I, Gehrke L, Sonenberg N. Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **6**, 1065-1070 (1996)
  - 49) Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* **10**, 387-98 (1999)
  - 50) Piecyk M, Wax S, Beck AR, Kedersha N, Gupta M, Maritim B, Chen S, Gueydan C, Krays V, Streuli M, Anderson P. TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. *EMBO J* **1**, 4154-63 (2000)
  - 51) Lee YB, Schrader JW, Kim SU. p38 map kinase regulates TNF-alpha production in human astrocytes and microglia by multiple mechanisms. *Cytokine* **12**, 874-80 (2000)
  - 52) van den Blink B, Juffermans NP, ten Hove T, Schultz MJ, van Deventer SJ, van der Poll T, Peppelenbosch MP. p38 mitogen-activated protein kinase inhibition increases cytokine release by macrophages in vitro and during infection in vivo. *J Immunol* **166**, 582-587 (2001)
  - 53) Sheng M, Pak DT. Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins. *Annu Rev Physiol.* **62**, 755-78(2000)

- 54) Hayashi T, Umemori H, Mishina M, Yamamoto T. The AMPA receptor interacts with and signals through the protein tyrosine kinase Lyn. *Nature* **397**, 72-6 (1999)
- 55) Denlinger LC, Fisetto PL, Sommer JA, Watters JJ, Prabhu U, Dubyak GR, Proctor RA, Bertics PJ. Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* **167**, 1871-6 (2001)
- 56) Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J* **20**, 6347-58 (2001)
- 57) 永田和宏, 森正敬, 吉田賢右 共編. 分子シャペロンによる細胞機能制御. シュプリンガー・フェアラーク東京 140-147 (2001)
- 58) 秋山徹編. シグナル伝達が変わる. 羊土社 24-25 (2001)
- 59) Wilson HL, Wilson SA, Surprenant A, North RA. Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the P2X7 receptor C terminus. *J Biol Chem* **277**, 34017-23 (2002)
- 60) Tan J, Town T, Mullan M. CD45 inhibits CD40L-induced microglial activation via negative regulation of the Src/p44/42 MAPK pathway. *J Biol Chem* **275**, 37224-37231 (2000)
- 61) Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689-95 (1993)
- 62) Ankarcona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* **15**, 961-973 (1995)
- 63) Atlante A, Calissano P, Bobba A, Giannattasio S, Marra E, Passarella S. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett* **497**, 1-5(2001)
- 64) Atlante A, Calissano P, Bobba A, Azzariti A, Marra E, Passarella S. Cytochrome c is released from mitochondria in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion and can operate as a ROS scavenger and as a respiratory substrate in cerebellar neurons undergoing excitotoxic death. *J Biol Chem* **275**, 37159-37166 (2000)
- 65) Glazner GW, Chan SL, Lu C, Mattson MP. Caspase-mediated degradation of AMPA receptor subunits: a mechanism for preventing excitotoxic necrosis and ensuring apoptosis. *J Neurosci* **20**, 3641-9 (2000)
- 66) Imai F, Sawada M, Suzuki H, Zlokovic BV, Kojima J, Kuno S, Nagatsu T, Nitatori T, Uchiyama Y, Kanno T. Exogenous microglia enter the brain and migrate into ischaemic hippocampal lesions. *Neurosci Lett* **272**, 127-30 (1999)
- 67) Fiebich BL, Butcher RD, Gebicke-Haerter PJ. Protein kinase C-mediated regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cultured microglial cells. *J Neuroimmunol* **92**, 170-178 (1998)
- 68) Richard M. Locksley, Nigel Killeen, and Michael J. Lenardo. The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell* **104**, 487-501(2001)
- 69) Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* **296**, 1634-5 (2002)
- 70) Sullivan PG, Bruce-Keller AJ, Rabchevsky AG, Christakos S, Clair DK, Mattson MP, Scheff SW. Exacerbation of damage and altered NF-kappaB activation in mice lacking tumor necrosis factor receptors after traumatic brain injury. *J Neurosci* **19**, 6248-56(1999)
- 71) Rogers RJ, Monnier JM, Nick HS. Tumor necrosis factor-alpha selectively induces MnSOD expression via mitochondria-to-nucleus signaling, whereas interleukin-1beta utilizes an alternative pathway. *J Biol Chem* **276**, 20419-27 (2001)

- 72) Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Tsuda M, Ohsawa K, Kohsaka S, Inoue K. Mechanisms underlying extracellular ATP-evoked interleukin-6 release in mouse microglial cell line, MG-5. *J Neurochem* **78**, 1339-49 (2001)
- 73) Hama T, Miyamoto M, Tsukui H, Nishio C, Hatanaka H. Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. *Neurosci Lett* **104**, 340-4 (1989)
- 74) Marz P, Gadiant RA, Otten U. Expression of interleukin-6 receptor (IL-6R) and gp130 mRNA in PC12 cells and sympathetic neurons: modulation by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha). *Brain Res* **706**, 71-9 (1996)
- 75) Inoue K, Nakajima K, Morimoto T, Kikuchi Y, Koizumi S, Illes P, Kohsaka S. ATP stimulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent plasminogen release from cultured microglia. *Br J Pharmacol* **123**, 1304-10 (1998)
- 76) Cunha RA, Sebastiao AM, Ribeiro JA. Inhibition by ATP of hippocampal synaptic transmission requires localized extracellular catabolism by ecto-nucleotidases into adenosine and channeling to adenosine A1 receptors. *J Neurosci* **18**, 1987-95 (1998)
- 77) Kalsi K, Lawson C, Dominguez M, Taylor P, Yacoub MH, Smolenski RT. Regulation of ecto-5'-nucleotidase by TNF-alpha in human endothelial cells. *Mol Cell Biochem* **232**, 113-9(2002)
- 78) Carlson NG, Wieggl WA, Chen J, Bacchi A, Rogers SW, Gahring LC. Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J Immunol* **163**, 3963-8 (1999)
- 79) Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S. Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci* **15**, 1975-82 (2001)
- 80) Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* **405**, 458-62 (2000).
- 81) Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* **421**, 384-8 (2003).
- 82) Sharma G, Vijayaraghavan S. Nicotinic receptor signaling in nonexcitable cells. *J Neurobiol.* **53**, 524-34 (2002).
- 83) Zia S, Ndoye A, Lee TX, Webber RJ, Grando SA. Receptor-mediated inhibition of keratinocyte migration by nicotine involves modulations of calcium influx and intracellular concentration. *J Pharmacol Exp Ther.* **293**, 973-81 (2000).
- 84) Maus AD, Pereira EF, Karachunski PI, Horton RM, Navaneetham D, Macklin K, Cortes WS, Albuquerque EX, Conti-Fine BM. Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* **54**, 779-88 (1998).
- 85) Benhammou K, Lee M, Strook M, Sullivan B, Logel J, Raschen K, Gotti C, Leonard S. [(3)H]Nicotine binding in peripheral blood cells of smokers is correlated with the number of cigarettes smoked per day. *Neuropharmacology.* **39**, 2818-29 (2000).
- 86) Rogers SW, Gregori NZ, Carlson N, Gahring LC, Noble M. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression by O2A/oligodendrocyte progenitor cells. *Glia.* **33**, 306-13 (2001).
- 87) Sharma G, Vijayaraghavan S. Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 4148-53 (2001)

- 88) Zhang L, McLarnon JG, Goghari V, Lee YB, Kim SU, Krieger C. Cholinergic agonists increase intracellular  $Ca^{2+}$  in cultured human microglia. *Neurosci Lett.* **255**, 33-6 (1998).
- 89) Wessler I, Reinheimer T, Klapproth H, Schneider FJ, Racke K, Hammer R. Mammalian glial cells in culture synthesize acetylcholine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **356**, 694-7 (1997).
- 90) Land BR, Salpeter EE, Salpeter MM. Kinetic parameters for acetylcholine interaction in intact neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci USA.* **78**, 7200-4 (1981).
- 91) Hosli L, Hosli E, Della Briotta G, Quadri L, Heuss L. Action of acetylcholine, muscarine, nicotine and antagonists on the membrane potential of astrocytes in cultured rat brainstem and spinal cord. *Neurosci Lett.* **92**, 165-70 (1988).
- 92) Moller T. Calcium signaling in microglial cells. *Glia.* **40**, 184-94 (2002).
- 93) Galiano M, Gasparre G, Lippe C, Cassano G. Inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors mobilize calcium from a common functional pool in human U373 MG cells. *Cell Calcium.* **36**, 359-65 (2004).
- 94) Vijayaraghavan S, Pugh PC, Zhang ZW, Rathouz MM, Berg DK. Nicotinic receptors that bind alpha-bungarotoxin on neurons raise intracellular free  $Ca^{2+}$ . *Neuron.* **8**, 353-62 (1992).
- 95) Shoop RD, Chang KT, Ellisman MH, Berg DK. Synaptically driven calcium transients via nicotinic receptors on somatic spines. *J Neurosci.* **21**, 771-81 (2001).
- 96) Fucile S.  $Ca^{2+}$  permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium.* **35**, 1-8 (2004).
- 97) Dajas-Bailador FA, Mogg AJ, Wonnacott S. Intracellular  $Ca^{2+}$  signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated  $Ca^{2+}$  channels and  $Ca^{2+}$  stores. *J Neurochem.* **81**, 606-14 (2002).
- 98) Garnier M, Lamacz M, Tonon MC, Vaudry H. Functional characterization of a nonclassical nicotine receptor associated with inositolphospholipid breakdown and mobilization of intracellular calcium pools. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**, 11743-7 (1994).
- 99) Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X<sub>7</sub> receptor-activated microglia. *J Neurosci.* **24**, 1-7 (2004).
- 100) Ledebor A, Breve JJ, Poole S, Tilders FJ, Van Dam AM. Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia.* **30**, 134-42 (2000).
- 101) 鈴木智久 修士論文 (2002)
- 102) Dajas-Bailador FA, Soliakov L, Wonnacott S. Nicotine activates the extracellular signal-regulated kinase 1/2 via the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor and protein kinase A, in SH-SY5Y cells and hippocampal neurones. *J Neurochem.* **80**, 520-30 (2002).
- 103) Aicher A, Heeschen C, Mohaupt M, Cooke JP, Zeiher AM, Dimmeler S. Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: potential role for progression of atherosclerotic lesions. *Circulation.* **107**, 604-11 (2003).
- 104) Bustin M, Lehn DA, Landsman D. Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. *Biochim Biophys Acta.* **1049**, 231-43 (1990).
- 105) Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* **285**, 248-51 (1999).

- 106) Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, Al-Abed Y, Wang H, Metz C, Miller EJ, Tracey KJ, Ulloa L. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nature Med.* **10**, 1216-21 (2004).
- 107) Takata K, Kitamura Y, Tsuchiya D, Kawasaki T, Taniguchi T, Shimohama S. High mobility group box protein-1 inhibits microglial Abeta clearance and enhances Abeta neurotoxicity. *J Neurosci Res.* **78**, 880-91 (2004).
- 108) Suzuki T, Hide I, Matsubara A, Hama C, Harada K, Miyano K, Andra M, Matsubayashi H, Sakai N, Kohsaka S, Inoue K and Nakata Y. Microglial  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP<sub>3</sub> pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *J. Neurosci. Res.* **83**:1461-1470 (2006).
- 109) Kitamura Y, Takeda K, Inden M, Tsuchiya D, Yanagiwasa D, Nakata J and Taniguchi T. Intracerebroventricular injection of microglia protects against focal brain ischemia. *J. Pharmacol. Sci.* **94**, 203-206 (2004).
- 110) Kitamura Y, Yanagisawa D, Inden M, Takeda K, Tsuchiya D, Kawasaki T, Taniguchi T and Shimohama S. Recovery of focal brain ischemia-induced behavioral dysfunction by intracerebroventricular injection of microglia. *J. Pharmacol. Sci.* **97**: 289-293 (2005).