

脳ミクログリアの新しい機能の発見と
in vivo での機能解析

課題番号 11670089

平成 11～12 年度(1999～2000)科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))
研究成果報告書

平成 13 年 3 月

研究代表者 仲田義啓

(広島大学医学部教授)

脳ミクログリアの新しい機能の発見と in vivo での機能解析

平成 11～12 年度 (1999～2000) 科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))

研究成果報告書

平成 13 年 3 月

研究代表者 仲田義啓 (広島大学医学部教授)

[研究実績の概要]

脳ミクログリアは虚血や炎症時に活性化され、傷害を受けた細胞を貪食するとともに種々のサイトカインを分泌する。それらのサイトカインのうち、腫瘍壊死因子(TNF- α)は脳実質への炎症細胞の浸潤を引き起こし、またオリゴデンドロサイトにアポトーシスを誘導することから、神経変性疾患の病因に深く関わると考えられているが、最近、神経保護作用を併せ持つことも注目されている。一方、ATP はエネルギー源として細胞質に豊富に存在し、脳虚血や炎症により細胞が傷害を受けた際に大量に漏出する。細胞外に放出された ATP は近傍のミクログリアを活性化し、その機能を制御すると推測されるが、その詳細は明らかではない。本研究ではミクログリアからの TNF- α 産生・遊離における細胞外 ATP の役割について検討し、ATP がミクログリアから著明な TNF- α 遊離を引き起こすことを見出した。ミクログリアには ATP 受容体のうち少なくとも G 蛋白共役型 P2Y₂ とイオンチャネル型 P2X₇ が発現している。TNF- α 遊離は 1mM 以上の高濃度の ATP により引き起こされ、P2X₇ 刺激薬 BzATP にも強い活性が認められた。また、これらの反応は P2X₇ 遮断薬プリリアントブルーG (BBG) によって抑制されたことから、P2X₇ 受容体の関与が示唆された。さらに、関与する細胞内シグナルにおいて、Ca²⁺ および ERK および p38 が重要な役割を果たすことが明らかとなった。ATP および BzATP 刺激により TNF- α の mRNA 発現が誘導されるが、ERK 阻害薬(U-0126) は mRNA 発現を強く抑制する一方、p38 阻害薬(SB203580)は影響を及ぼさなかった。従って、ERK は遺伝子転写、p38 は転写後の調節に関与すると考えられた。また、BBG は ERK ではなく p38 の活性化のみ抑制したことから、P2X₇ 受容体は p38 活性化を特異的に制御することが示唆された。

研究組織

研究代表者: 仲田 義啓 広島大学医学部教授

研究経費

平成 11 年度 1,800 千円

平成 12 年度 1,200 千円

計 3,000 千円

[原著論文]

1. Izumi Hide, Masaya Tanaka, Atsuko Inoue, Kazuyuki Nakajima, Shinichi Kohsaka, Kazuhide Inoue, and Yoshihiro Nakata
Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor- α release from rat microglia.
Journal of Neurochemistry, 2000, 75: 965-972.
2. Izumi Hide, Tomohisa Suzuki, Atsuko Inoue, and Yoshihiro Nakata
Regulation of TNF- α release from microglia by ATP.
Neurochemical Research, in press.
3. 田中将也、鈴木智久、井上敦子、秀 和泉、井上和秀、高坂新一、仲田義啓
細胞外 ATP によるラットミクログリアの TNF- α 産生遊離
神経化学 1999, 38(3):274

[学会・シンポジウム]

1. 第 42 回日本神経化学会 平成 11 年 9 月 15-17 日(広島)
田中将也、鈴木智久、井上敦子、秀 和泉、井上和秀、高坂新一、仲田義啓
細胞外 ATP によるラット脳ミクログリアの TNF- α 産生遊離
2. 第 98 回日本薬理学会近畿部会 平成 12 年 10 月 27 日(岐阜)
鈴木智久、河合裕子、井上敦子、高坂新一、井上和秀、秀 和泉、仲田義啓
ATP による脳ミクログリアからの TNF- α 遊離の制御
3. 第 74 回日本薬理学会年会 平成 13 年 3 月 21-23 日(横浜)
秀 和泉、井上敦子、仲田義啓
ミクログリアでの ATP 誘発 TNF- α 放出メカニズム

[国際学会]

The 1st International Workshop on Nucleotides and their Receptors in the Immune System
September 8-10, 2000 Ferrara, Italy

Izumi Hide, Masaya Tanaka, Tomohisa Suzuki, Atsuko Inoue, Kazuyuki Nakajima, Shinichi Kohsaka,
Kazuhide Inoue, and Yoshihiro Nakata

Extracellular ATP stimulates TNF- α release from rat cultured microglia.

[研究会]

生理学研究所「ATP 受容体による生体機能制御とその分子的メカニズム」

平成 11 年 8 月 26 日 生理学研究所、岡崎

田中将也、鈴木智久、井上敦子、秀 和泉、仲田義啓

ラット脳ミクログリアからの TNF- α 遊離を制御する ATP 受容体とその細胞内シグナル機構

脳ミクログリアからの TNF- α 産生遊離機構に関する薬理学的研究 —ATP 受容体による制御—

(1)はじめに

脳は、おもに神経細胞とグリア細胞から構築される。神経細胞は、脳の全細胞の約10%を占め、シナプスを形成し情報連絡をとり、末梢に命令を出す司令塔として機能している。多くの研究者がその壮大な機能をもつ神経に心奪われたため長年の間、脳において大多数を占めるグリア細胞に関心が寄せられることはなかった。グリア細胞の重要性が認識されるようになったのは1970年代以降のことである。グリア細胞はその性質や形態の違いからアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアの3種類の細胞に分類されている。アストロサイトは血管内皮細胞と共に血液脳関門(blood-brain barrier: BBB)の形成、神経伝達物質グルタミン酸や一酸化窒素(NO)の代謝¹⁾を行うなど神経細胞の機能調節ならびに生存維持に関与する。またオリゴデンドロサイトは軸索においてミエリンを形成し、神経の迅速なシグナル伝達を可能にする²⁾。そしてミクログリアについてはcentral nervous system(CNS)においてMHCクラスII発現、サイトカイン分泌を行い、脳の免疫反応に関与することなどが報告されるにつれ^{3,4)}、BBBにより末梢/循環系の免疫システムから隔離された脳における、ミクログリアを中心とする脳独自の免疫系が注目されるようになってきた。

(2)ミクログリア(microglia)

ミクログリアはCNSを構成するグリア細胞の1つで、20世紀初頭にdel Rio Hortegaの炭酸銀染色により同定され、オリゴデンドロサイトやアストロサイトなどのマクログリアに対応して命名された⁵⁾。細胞の起源としては今日なお議論のあるところであるが、一般的にはBBBの不完全な胎生期に脳内に移行した単球・マクローファージ系の細胞がミクログリアの起源として多くの研究者に受け入れられている。生後1~2週目をピークに脳内に出現、発生段階で生じた老廃物を貪食処理し、以後はその数を減らす。そして、わずかな変化でも直ちに捉えることができる長い分岐した突起をもつ(ramified)休止型ミクログリアとなる。しかし外傷、感染および炎症の際には突起が短く細胞体が大いアメーバ状(ameboid)活性型ミクログリアに変化し増殖して、T細胞への抗原提示や、殺菌、抗腫瘍作用、組織の修復に関与する。このようにミクログリアは免疫応答のみならず恒常性の維持にいたるまで、きわめて多様な機能をもつことが知られている^{4,6-8)}。このように刺激によって形態変化、細胞内物質の誘導、または機能亢進されることをミクログリアの‘活性化’と呼んでいる。

ミクログリアが多様な機能を発現する上で重要な役割を果たしているのが、分泌作用である。in vitroの実験からミクログリアは活性酸素種(O₂⁻、H₂O₂、HO \cdot など)、酸化窒素種(NO⁺、NO⁻、ONOO⁻)などの低分子傷害性因子から、腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor- α : TNF- α)、インターロイキン(IL)-1、IL-3、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、インターフェロン(IFN)、プロスタグランジン類などの炎症や免疫に関与する因子、コロニー刺激因子(CSF)、プラスミノゲン、basic fibroblast growth factor(bFGF)、nerve growth factor(NGF)などの神経成長栄養因子にいたる多種多様な産物を放出することが報告されている⁹⁻¹³⁾。ミクログリアによるこれら分子の産生は生体にとって必要不可欠ではあるが、無秩序な産生は正常細胞の障害を引き起こし様々な神経変性疾患を引き起こすと考えられている。従ってミクログリアからのこれら分子の産生遊離の制御は生体にとって非常に重要な意味を持っており、ミクログリアと脳疾患との関連においてよく観察されている。

(3)脳疾患とミクログリアの活性化

高齢化社会の到来に伴い多発が危惧されるアルツハイマー病、パーキンソン病、脳血管性痴呆症などの脳変性疾患はいずれもその基礎に神経細胞死がある。近年、神経の生死にアストロ

サイトやミクログリアなどのグリア細胞が密接に関わることが示されてきた。アルツハイマー病は記憶、学習と関係する前脳基底核のコリン作動性神経の特異的変性、脱落による疾患で、組織学的に老人斑が存在することが知られている。この老人斑にはβアミロイドと呼ばれる神経毒性物質の沈着が認められ、これによりミクログリアは活性化され、集積する。ここでミクログリアは様々な障害因子(NO、O₂、サイトカイン)を分泌し、組織変性を加速させるとの報告がある^{14,15)}。さらに nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) がアルツハイマー病における活性型ミクログリアを減少させ、その痴呆傷害を激減させることも示されている^{16,17)}。また黒質ドーパミン作動性神経が脱落するパーキンソン病においては、ミクログリアの活性化が観察され、さらに免疫抑制剤 FK-506 などによりドーパミン神経細胞死が抑制されたことから、ミクログリアの活性化は神経変性を進行させる可能性が示唆されている^{18,19)}。さらには自己免疫疾患や脳虚血においても関与が指摘されており、これらについては Table 1 に示す。

以上のように活性化ミクログリアは神経の傷害を感知して、集積し細胞傷害性因子の産生を行うため、神経変性、破壊を進め、病因との関係で興味を持たれる。しかし現在までに報告されているミクログリアと神経傷害との関係は主にその形態学的知見によるものが多く、分子生物学的な観点からミクログリアと神経傷害との関係について解析した報告は少ない。そのためミクログリアの影響は二次的なものであり直接の病因細胞と考える意見は少なく、むしろミクログリアは疾患において神経保護に働く可能性が示唆されつつある。神経が損傷を受けるとミクログリアは偽足様構造体を挿入しシナプス除去 (synaptic stripping) を行い、損傷神経の情報伝達を遮断し、周囲への影響を最小に留める。また活性化ミクログリアは先に述べた傷害因子のみならず、それを相殺するような因子や神経栄養因子の産生も同時に行い、サイトカインネットワークとして複合的に働き神経保護作用を示す。例えば、CNS における炎症反応では脳内皮細胞やアストロサイトにより GM-CSF が遊離され、ミクログリアの増殖が誘導される。同時に NO やスーパーオキシドラジカルなどの傷害性因子がミクログリアから遊離されるが、このミクログリアの増殖をおこす GM-CSF は神経保護作用をしめす。さらにミクログリアは GM-CSF により神経栄養活性をもつ IL-6 を特異的に産生するため、NO、O₂ による神経毒性は相殺される。このようにミクログリアは直接神経に毒性を示すことはなく、現在では神経の修復を行う一方で再生不可能な神経の除去を行い傷害を最小に留めるために働くと考えられている。このように疾患におけるミクログリアの活性化による影響は一律なものではなく、サイトカインネットワークに代表される複合的な条件により決定されるため、これらを理解することが重要である。

(4) TNF-α

TNF-αは腫瘍部分に出血性壊死を誘導する因子として、1975年 Oldらにより報告されたが、最近では炎症を介した生体防御機構に深く関わるサイトカインとして理解されるようになった。Table 2 に示すように体内では多種類の細胞が TNF-αを産生しうることが明らかにされつつあり、そのなかでもミクログリアからの TNF-α遊離は、様々な脳疾患に大きく関与していると考えられる。報告によると、in vivo 脳虚血モデルマウスでは速やかにミクログリア、アストロサイトにより TNF-αが遊離される。同時に BBB の破壊、神経細胞死の誘導、さらには梗塞エリアの拡大が生じるが、この悪化が抗 TNF-α抗体により抑制された²²⁻²³⁾。このため TNF-αは神経毒性を示す分子として位置付けられているが、最近 in vitro で TNF-αがグルコース涸渇、グルタミン酸興奮毒性、βアミロイド、酸化ストレスによる神経細胞死に対して神経保護作用を示し、in vivo においても TNF-αを前処置した虚血モデルマウスにおいて梗塞エリアの減少が認められた²⁴⁻²⁶⁾。また TNF 受容体ノックアウトマウスでは虚血、興奮性アミノ酸による傷害が Wild type に比べ増強されていたことから、TNF-αの神経保護作用が注目されるようになってきた²⁷⁾。TNF-αは最も傷害初期に遊離され、IL-8、G-CSF、ICAM を誘導することから、一度放出されると好中球、末梢リンパ球を脳局所へ浸潤させる²⁸⁾。またグリア細胞に作用して NO を大量に放出させ、さらにアストロサイトのグルタミン酸

代謝を抑制するなど²⁹⁾、神経以外の細胞に働いて炎症反応を拡大させる。一方、TNF- α は神経細胞に働き NGF、FGF 同様に Ca²⁺結合蛋白質 Calbindin D28K 発現により細胞内 Ca²⁺上昇の中和を行い、また Superoxide dismutase 発現により活性酸素を除去するなどの神経保護作用も

Table 1 脳疾患と活性化ミクログリア²⁰⁾

	ミクログリアの反応性	作用
変性疾患		
アルツハイマー病	MHC class II 発現	β アミロイドの産生? 傷害因子の産生 死細胞の除去
パーキンソン病	MHC class II 発現	傷害因子の産生?
免疫疾患		
多発性硬化症 (EAE)	MHC class II 発現	抗原提示作用 傷害因子の産生 死細胞の除去
感染疾患		
AIDS	多核巨大細胞の出現	HIV-1の増殖促進 傷害因子の産生
CJD、scrapie	形態変化、増殖	傷害因子の産生
その他		
脳梗塞(虚血)	MHC class II 発現 イソレクチンB ₄ 結合増大	傷害因子の産生 死細胞の除去
脳損傷	ac-LDLレセプターの発現	死細胞の除去
アクトミー(顔面神経)	CR3レセプターの発現 MHC class I, II 発現	synapting stripping 修復、再生?

Table 2 TNF- α expression in a wide variety of cells¹⁾

マクロファージ
マクロファージ系細胞(クッパー、ミクログリア)
好中球、好塩基球、好酸球
マスト細胞
リンパ球(T,B)
ナチュラルキラー(NK)細胞
リンホカイン活性化キラー(LAK)細胞
骨髄細胞
繊維芽細胞
ケラチノサイト
一部の癌細胞

有する^{24,30)}。このような多彩な生理活性を示すため TNF- α は神経傷害因子、神経保護因子としての両面をあわせもつ。この TNF- α の多様性は標的細胞膜に発現している TNF-R1 (p55)と TNF-R2 (p75)と呼ばれる2種類の TNF 受容体により引き起こされている。TNF-R1 は現在アポト

ーシス、JNK、NF- κ Bカスケード活性化が知られ、TNF-R2もNF- κ Bを活性化するがこれら詳細な機構は現在も明らかにされていない。このようにTNF- α はその標的細胞、標的受容体により多様な影響を示すと考えられるが、少なくとも神経細胞には直接毒性を示さず、保護作用を有するため神経細胞をターゲットとした局所のTNF- α 遊離は神経変性を防ぐために効果的である。従って様々な神経変性疾患の際に神経細胞の周辺に集積することが知られているミクログリアからのTNF- α 遊離はアルツハイマーなどの神経変性疾患において治療学的観点からも有用と考えられる。

(5) ATP

生体にとって最も重要な分子といって過言ではない Adenosine 5'-triphosphate (ATP) は生体のエネルギー源としてあまりにもポピュラーなため、ATP が神経伝達を行うことは驚きであった。そのため 1971 年 Burnstock によりプリン作動性神経の概念が提唱されたが³¹⁾、4 半世紀にわたり受け入れられなかった。しかし ATP は脳シナプトソームから放出され、後シナプス細胞に著明な反応を引き起こし、シナプス間隙において ecto-ATPase により急速に代謝されるなど、神経伝達物質としての最低限の条件は古くから満たしていた。1992 年 ATP が脳における情報伝達を担うことが始めて報告され^{32,33)}、さらに翌年 ATP 受容体の cDNA がクローニングされるにいたり、ATP は神経伝達物質として広く認知されるようになった³⁴⁾。その後、多くの ATP 受容体が発見され、1994 年 Zimmermann は特異的アゴニスト、アンタゴニストの開発が遅れていたことから、ATP 構造類似体による親和性の違いを利用し、薬理的に分類した (Table 3)。ATP 受容体の分類については依然、論議のあるところだが、現在では UTP がアゴニストとなる P2U 受容体は P2Y 受容体のサブタイプに、また 900 Da までの分子を通過させる pore として機能することが知られている P2Z 受容体は P2X 受容体のサブタイプに分類されている³⁶⁾。P2X 受容体は現在 7 種類のサブタイプが知られており、膜 2 回貫通型の形態をとり、ATP が結合すると非選択的のカチオンチャンネルとして機能する。P2Y 受容体にも 7 種類のサブタイプの存在が報告され、膜 7 回貫通型で 3 量体 G 蛋白質 G_q、G_o、G_i と共役していることが報告されている³⁷⁾ (Table 4- 5)。

ATP はアセチルコリンやノルアドレナリンなどの他の神経伝達物質とともにシナプス小胞に貯蔵され、外液 Ca²⁺ 依存的にシナプス間隙に放出される。また ATP はシナプス小胞以外にも細胞質に数 mM のレベルで存在し、トランスポーターによって細胞外へ遊離されるほか、虚血などにより傷害を受けた細胞から大量に漏出すると考えられている。実際 *in vivo* で炎症部位、損傷組織において血小板や傷害細胞から大量の細胞内ヌクレオチドが遊離されることが報告されている^{39,40)}。最近ミクログリアにも ATP 受容体が発現していること⁴¹⁻⁴³⁾、さらに活性化したミクログリアが ATP を放出することが報告された⁴³⁾。そのため細胞外 ATP がパラクライン/オートクラインに神経グリア情報伝達物質、さらには虚血などの障害メディエーターとして機能する可能性が考えられ、障害時にミクログリアの活性化を制御する可能性が考えられる。

そこで本研究では様々な脳疾患に関与するミクログリアの活性化機構の解明を行うために、その細胞膜に発現している ATP 受容体に注目した。特にミクログリアからの TNF- α 遊離は病態への直接的な関与が大きく、治療への応用の可能性も高いため、ATP による TNF- α 遊離への影響について検討した。

Table 3 Pharmacological classification of P2 purinoceptors³⁵⁾

	P2X	P2Y	P2U	P2T	P2Z
Type	ATP-gated ion channel	G-protein coupled	G-protein coupled	G-protein coupled	Nonselective pore
Signal	Na ⁺ /K ⁺ /Ca ²⁺	IP ₃ → Ca ²⁺ /DAG	IP ₃ → Ca ²⁺ /DAG	IP ₃ →Ca ²⁺ /DAG cAMP	Molecules up to 1kDa
Agonist	α,β-MeATP> β,γ-MeATP> ATP=ADP> 2-MeSATP	2-MeSATP>> ATP=ADP> α,β-MeATP	UTP,ATP> ADP>> 2-MeSATP	2-MeSADP> ADP	ATP ⁴⁻
In CNS or peripheral innervation	+	+	+	Platelets	Macrophages mast cells

Note that P2T is an ADP receptor with ATP acting as an antagonist, and that P2U is not a purinoceptor in the strict sense as it is also activated by a pyrimidine nucleotide. Abbreviations: α,β-MeATP, α,β-methyleneATP; β,γ-MeATP, β,γ-methyleneATP; 2-MeSADP, 2-methylthioADP; 2-MeSATP, 2-methylthioATP.

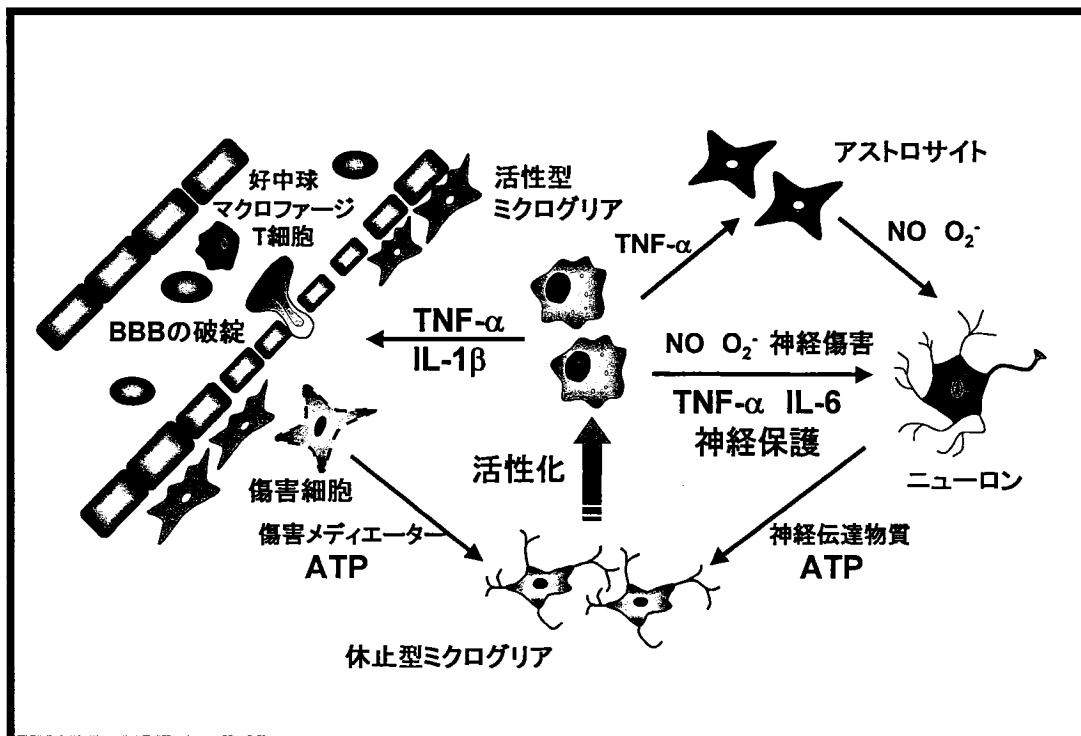
Table 4 Nomenclature of ionotropic ATP receptors: P2X³⁸⁾

subtypes	species	potency order of agonists	channel
P2X ₁	rat human	2-MeSATP>ATP(~1 μM)>αβ-MeATP ATP(~1 μM)=αβ-MeATP	I _{Na/K/Ca}
P2X ₂	rat	2-MeSATP>ATP(~1 μM), not αβ-MeATP	I _{Na/K/Ca}
P2X ₃	rat	ATP(~1 μM)>αβ-MeATP	I _{Na/K/Ca}
P2X ₄	rat human	ATP(~10 μM), not αβ-MeATP ATP(~10 μM)>2-MeSATP, not αβ-MeATP	I _{Na/K/Ca}
P2X ₅	rat	ATP(~10 μM)>2-MeSATP, not αβ-MeATP	I _{Na/K/Ca}
P2X ₆	rat	ATP(~10 μM)>2-MeSATP, not αβ-MeATP	I _{Na/K/Ca}
P2X ₇	rat human	BzATP>ATP(~100 μM)>2-MeSATP, not αβ-MeATP BzATP>ATP, not αβ-MeATP	I _{Na/K/Ca} forming pores

Abbreviations: BzATP, 2'- and 3'-O-(benzoyl-benzoyl)ATP

Table 5 Nomenclature of G protein coupled ATP receptors: P2Y³⁸⁾

subtypes	potency order of agonists
P2Y ₁	2-MeSATP>ADP>ADP α S, not UTP
P2Y ₂	ATP=UTP, not ADP, UDP or 2-MeSATP
P2Y ₃	UDP>UTP=ADP>2-MeSATP>ATP
P2Y ₄	UTP, not ATP, ADP, UDP or 2-MeSATP
P2Y ₆	UDP>UTP>2-MeSATP=ADP, not ATP
P2Y ₈	ADP β S>ATP=UTP>2-MeSATP
P2Y ₁₁	ATP>2-MeSATP>ADP, not UTP or UDP



虚血傷害のモデル：ミクログリアは何らかのメディエーターにより活性化され、様々な生理活性物質を放出する。そのうち TNF- α は好中球などを脳へ浸潤させ炎症反応を引き起こす。一方神経細胞には保護作用を示す。このとき ATP は傷害細胞から大量に漏出する。また神経伝達物質として神経終末からも放出される。

第1編 ラット脳ミクログリアにおける TNF- α 産生遊離の ATP による制御

第1章 Lipopolysaccharide (LPS) によるミクログリアからの TNF- α 産生遊離

[緒言]

マクロファージは強力な生理作用を有するため、その活性化は厳密に制御されていることが知られている。定住状態 (resident) のマクロファージは補体成分などの刺激により応答 (responsive) マクロファージとなり、さらに IFN- γ により初期活性化 (primed) マクロファージとなる (Fig.1)。そして LPS 刺激などが加わり活性化 (activated) マクロファージと変化するとともに、その機能、効率も状態によって異なってくる⁴⁴⁾。同様にミクログリアの定住状態から活性化状態への移行は代謝変化、傷害因子サイトカインの放出増大をはじめとする種々の分泌活性の変化、細胞表面抗原の変化などが観察されている (Table 6)。このミクログリアの活性化を誘導する物質として、LPS やムラムルジペプチドなどの菌体由来分子、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1などのサイトカインがよく知られている⁴⁴⁾。なかでも LPS はもっとも強力にミクログリアを活性化し、その活性化機構を明らかにするための実験モデルとしてよく使用される。

LPS はグラム陰性菌の外膜構成成分であり、エンドトキシン本体として知られている (Fig.2)。LPS を生体に投与すると、発熱、血圧降下、血液凝固活性の亢進、多臓器傷害などの劇的な反応が誘導されショックが引き起こされ、ついには死に至る。LPS はマクロファージにおいて MAP キナーゼ、チロシンキナーゼの活性化をおこし、さらに AP-1 や NF- κ B などの転写因子を活性化して⁴⁵⁾、サイトカイン、低分子ラジカル、プロスタグランジンを含む多くの炎症性分子を産生遊離させる。LPS により産生されたサイトカイン特に TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 は血管内皮細胞、好中球、繊維芽細胞などからのさらなるサイトカイン、プロスタグランジン産生を促進し、これら因子が複雑に絡み合ってショックを誘導すると考えられている。脳内において、ミクログリアは LPS に対する感受性をもっとも高い細胞であり、アストロサイトに比べ 100 倍の感度を持ち⁴⁾、微量の菌体成分の脳内への侵入においても速やかに活性化されるため、感染の際の一次標的細胞として中心的役割を果たすと考えられている。本研究はミクログリアの活性化機構の解明を目的とするが、その基礎検討として、LPS によるミクログリア活性化機構を知るために、本章ではミクログリアの培養条件、LPS によるミクログリアからの TNF- α 遊離について検討を行った。

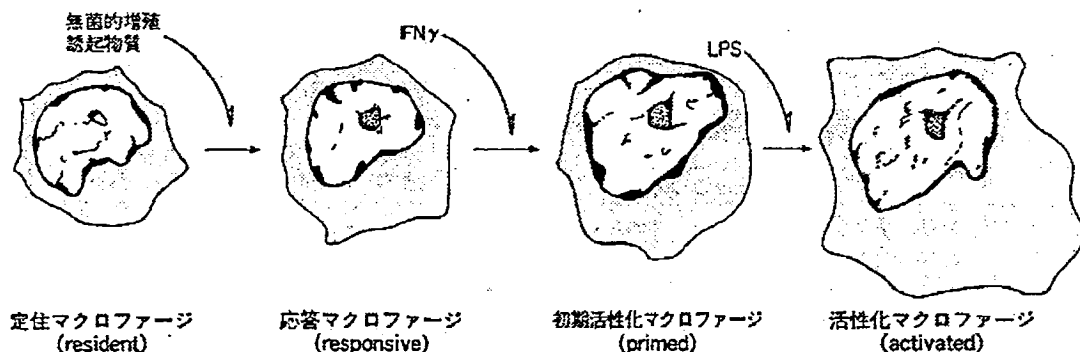


Fig.1 マクロファージ活性化の段階⁴⁴⁾

Table.6 Markers of Microglia⁸⁾

Marker	Ameboid Microglia	Ramified Microglia
Antibody		
OX-42 (CR-3 complement receptor)	++	+
Mac-1 (CR-3 complement receptor)	++	+
OX-18 (MHC class I antigen)	+	-
OX-6 (MHC class II antigen)	+	-
ED-1 (macrophage, cytosol protein)	++	-
F4/80	++	+
CD-4	+	+
vimentin	++	-
Lectin		
isolectin B ₄ (α-D-galactose)	++	++
agglutinin-120 (β-D-galactose)	++	++
Receptor		
Fc receptor	++	+
acetylated LDL receptor	++	-
Silver impregnation	++	++
Enzyme		
nonspecific esterase	++	-
thiamine pyrophosphatase	++	++

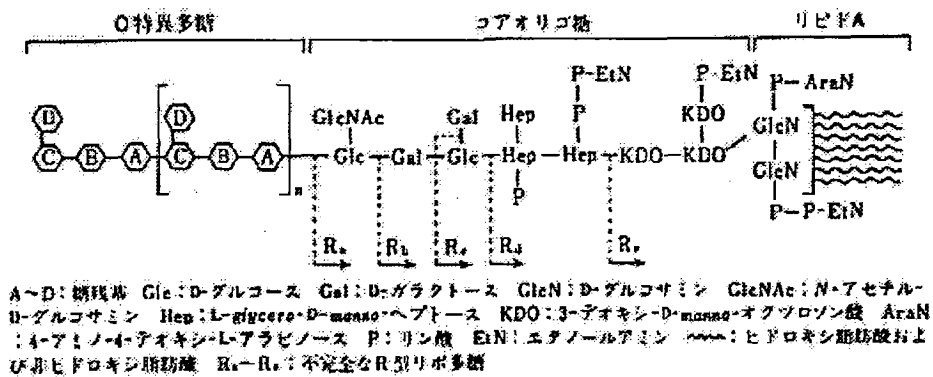


Fig.2 グラム陰性菌の LPS の一般構造
(出典: 生化学事典 第2版 東京化学同人 1990年)

[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、出産された新生仔を実験に使用した。

(2) ラット脳初代培養系の調整

Nakajima⁴⁶⁾らの方法に準じて行なった。即ち、ラット(Wistar 系)の新生仔を断頭し、頭部を 70 % ethanol により消毒し、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、さらに大脳の髄膜を剥離した後、剃刀を用いて十分ミンスした。これを 0.25 % trypsin、37°C で 30 分処置して細胞を分散させ、溶出した DNA を切断するために 0.05 % DNaseI を加え 30 秒間処理した。さらに胎児ウシ血清 (FCS) を加え、trypsin の反応を止め、1000 rpm、6 分間遠心した後、10 % FCS- DMEM に再懸濁し、70 μ m ナイロンメッシュに通し細胞分散液とした。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を調べ、10 μ g/ml ポリ-L-リジン処置した 75 cm² 培養フラスコ 1 本あたり、 2×10^7 cells を播種し、10 % CO₂-90 % 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整

上記初代混合グリア培養を 8 日間ぐらいすると、フラスコ底面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した。この状態からミクログリアの分離を行なう。培養フラスコを振幅 20 cm、80 回/分の速さで 5 分間 8 の字に振盪した。この上澄みを細胞浮遊液として回収し、光学顕微鏡下で細胞数を計測し、24 well プレート、100 mm 培養シャーレなどに播き、45 分接着させて洗浄し精製ミクログリアとして実験に用いた。

(4) ミクログリアの同定

培養により得られた混合グリア細胞もしくは精製ミクログリアに、マーカーである FITC ラベルした Isolectin B₄ を用いて、免疫組織染色によりミクログリアの同定を行なった。

(5) 培地

Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM) は粉末 (GIBCO BRL) より調整し (CaCl₂: 1.8 mM, MgSO₄: 0.81 mM)、100 U/ml penicillin G、100 μ g/ml streptomycin になるように添加した。なお牛胎児血清 (FCS) は 56°C で 30 分非働化してから使用した。なお FCS には Limulus amoebocyte lysate (LAL) test⁴⁷⁾ の結果、エンドトキシン 32.5 pg/ml を含有していた。

(6) TNF- α 遊離の定量

細胞浮遊液を 24 well プレート (1.5×10^5 cells/0.4 ml/well) に分注し、45 分後に洗浄し精製した。ATP などにより刺激し、培養上清中に放出された TNF- α 免疫活性を ELISA kit を用いて定量した。定量はキットの使用説明書に従い、マイクロプレートリーダーにより 414 nm における吸光度を測定した。細胞内の TNF- α 量は細胞を 0.1 % TritonX-100 で可溶化した。サンプルは定量するまで -80°C で保存した。

(7) Total RNA 抽出

Total RNA の抽出は Chomczynski と Sacchi の方法 (Acid Guanidium Thiocyanate

-Phenol-Chloroform Extraction)に準拠して行なった⁴⁸⁾。すなわち、細胞をリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄した後、Solution D (4 M guanidine thiocyanate, 25 mM Na citrate, 0.5 % N-lauoylsarcosine, 0.1 M 2-mercaptoethanol: pH7.0)500 μ l を加え、ラバーポリスマンで細胞を破砕した。その後 2 M Na-acetate (pH4.0) 50 μ l, phenol (water saturated) 500 μ l, chloroform:isoamyl alcohol (49:1) 100 μ l を加えて抽出することによって DNA と蛋白を除き、等量の isopropanol による沈殿を 2 回繰り返す、さらに 70 % ethanol によって洗浄して最終的に得られた沈澱を depc H₂O (diethyl pyrocarbonate 処理水: RNase free H₂O) で溶解して 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。

(8) Probe の作成

717bp のラット TNF- α cDNA を pGEM-3Z ベクターの Pst I /BamH I polylinker site に組み込んだプラスミド (Prof. E. N. Benveniste, University of Alabama at Birmingham より供与) を Xho I でリニアライズした⁴⁹⁾ (Fig.3)。これから T7 RNA polymerase により RNA probe を作成した。反応液 (linearized plasmid DNA 1 μ g, transcription buffer, 10 mM DTT, RNase inhibitor 20 units, 0.5 mM ATP, CTP, GTP, 0.012 mM UTP, [α -³²P] UTP 1.85 MBq, RNA polymerase 20 units) を 37°C で 1 時間インキュベートし、RNase-free DNase (5 units) を加え、37°C で 15 分インキュベートし、phenol: chloroform: isoamyl alcohol (5:24:1) 抽出、ethanol 沈殿を行い radioactive RNA probe を得た。

(9) リボヌクレアーゼ (RNase) プロテクションアッセイ⁵⁰⁾

細胞から抽出した total RNA 5 μ g に ³²P でラベルした TNF- α probe (200,000 cpm) と内部標準として β -actin RNA probe (10,000 cpm) を加え、45°C で 12 時間ハイブリダイズさせた。これを 10 μ g/ml の RNase A により 30°C、60 分間処置した。この操作により、ハイブリダイズしていない一本鎖状の RNA が切断され、ハイブリダイズした領域のみが protect される。その後、0.5 % SDS、0.125 mg/ml proteinase K で 37°C、15 分間処置することにより RNase A を失活させた。これを phenol:chloroform:isoamyl alcohol (5:24:1) 抽出、ethanol 沈殿により精製後、4 % polyacrylamide/7 M urea ゲルで電気泳動を行った。泳動後ゲルを乾燥させ、イメージングプレートに 1 時間露光し、バイオイメージングアナライザー BAS2000 (Fuji Film) により定量解析を行った。

[実験結果]

(1) ラット脳混合グリア細胞の初代培養

ラット新生仔大脳を 8 日間培養すると、光学顕微鏡下での観察において、Fig.4A に示す混合グリア細胞が得られた。ミクログリアは、成熟ラットにおいて脳細胞の数%を占めると報告されているが、新生児脳では 10~20 % を占めるほどまでに増殖しており、新生児大脳からの初代培養系がミクログリアのソースとして優れていることが示された。アストロサイト層上に球状で弱付着性または浮遊性の細胞が観察されるので²⁰⁾、この状態からミクログリアの分離を行い、精製ミクログリアを得た (Fig.4B)。

この細胞をミクログリアと同定するため、CNS においてはミクログリア特異的に結合する FITC 標識 Isolectin B₄ を用いた免疫染色を行った (Fig.5)。その結果、混合グリア培養系では最上層の浮遊細胞が染色され、精製過程により得られた細胞では、99 % がミクログリアとして同定されたので、以下の実験に用いた。なお混合グリア培養はミクログリアの回収率の低下する 16 日目まで継続した。

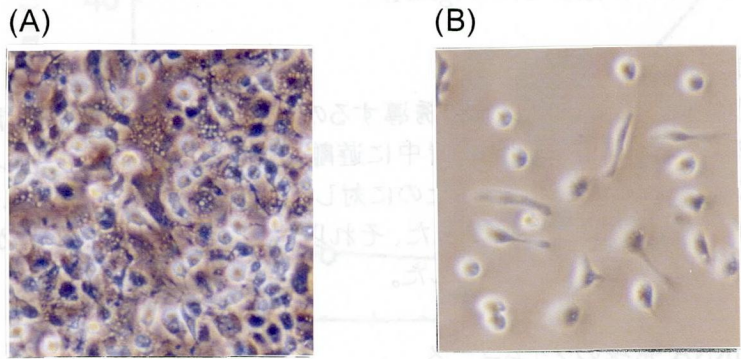


Fig.4 Micrograph of mixed glial culture (A), and isolated microglia (B).

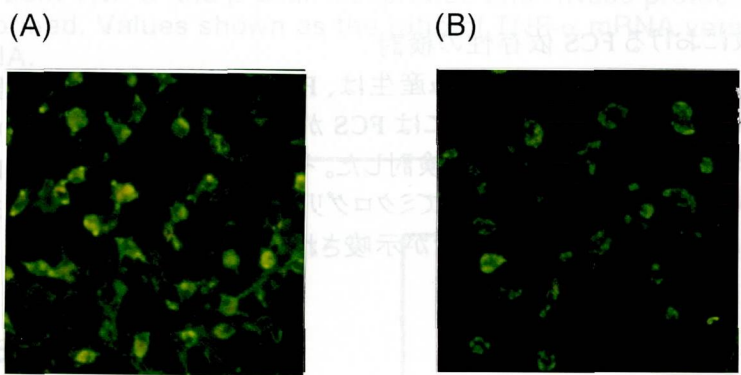


Fig.5 Immunofluorescence staining with Isolectin B₄
Mixed glial culture (A) and isolated microglia (B).

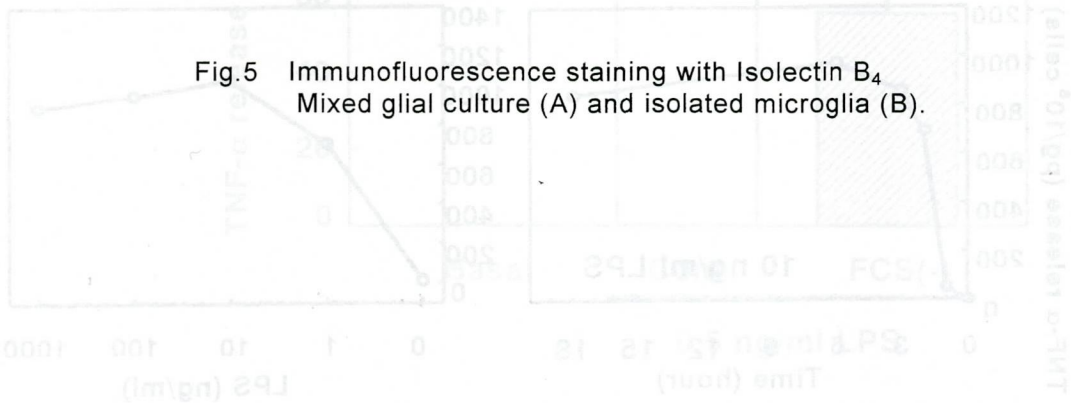


Fig.6 Effect of LPS on TNF-α release in rat cultured brain microglia. (A) Time course, (B) Concentration dependency. The microglia were stimulated with the indicated concentrations of LPS for 18 hr. (A) 10 ng/ml of LPS for the indicated periods. (A), TNF-α released to the media were quantified by ELISA. Values are the means of two cultures from one experiment and a similar result was obtained in another set of independent experiments.

(2) LPS によるミクログリアからの TNF- α 産生遊離

a. LPS による TNF- α 遊離のタイムコース

精製ミクログリアを用いて LPS による TNF- α 遊離のタイムコースを検討した。培養上清中への TNF- α 遊離は 10 ng/ml LPS 刺激後、2 時間後から顕著に検出され、6 時間後まで増加が認められたが、その後ゆるやかに減少した (Fig.6A)。

b. LPS 濃度依存性の検討

次に、ミクログリアからの TNF- α 産生を誘導するのに必要な LPS の濃度を調べた。ミクログリアに各濃度の LPS を加え、18 時間後の上清中に遊離された TNF- α 量を測定した。無刺激ではほとんど細胞外への遊離は認められなかったのに対し、LPS は TNF- α を顕著に遊離させ、10 ng/ml で最大の遊離が認められた (Fig.6B)。また、それ以上の高濃度ではゆるやかな減少が認められ、その濃度反応曲線はベルシェイプを示した。

c. TNF- α mRNA 発現のタイムコース

LPS による TNF- α 遊離が、TNF- α 産生の誘導に基づくか否か、TNF- α mRNA 発現についてプロテクションアッセイにより検討し、LPS 刺激における TNF- α mRNA の β -actin mRNA に対する割合をグラフに示した。TNF- α mRNA は無刺激の状態においてもわずかであるがその発現が認められたが、LPS 刺激 1 時間後においては著しく増加した (Fig.7)。このことから、LPS がミクログリアにおいて TNF- α mRNA 発現を引き起こし、新たな TNF- α を合成し遊離することが示された。

d. LPS 刺激における FCS 依存性の検討

マクロファージの LPS 刺激による TNF- α 産生は、FCS の添加によって、増強される報告がある⁵¹⁾。また、マストセルなどでは TNF- α の産生には FCS が必須であることから、この LPS による TNF- α 産生遊離に FCS が必要であるか否かを検討した。その結果、LPS による TNF- α 遊離は FCS 無添加により部分的に減少した (Fig.8)。よってミクログリアからの TNF- α 遊離において LPS は FCS 中に含まれる血清成分により増強されることが示唆された。

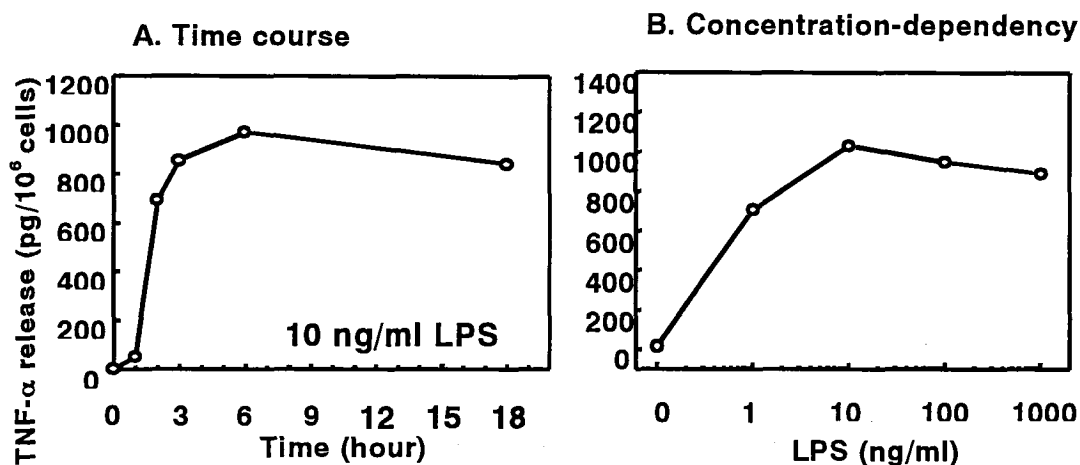


Fig.6 Effect of LPS on TNF- α release in rat cultured brain microglia. (A) Time course; (B) Concentration-dependency. The microglia were stimulated with the indicated concentrations of LPS for 18 hr (B), with 10 ng/ml of LPS for the indicated period (A). TNF- α released to the media were quantified by ELISA. Values are the means of two cultures from one experiment and a similar result was obtained in another set of independent experiments.

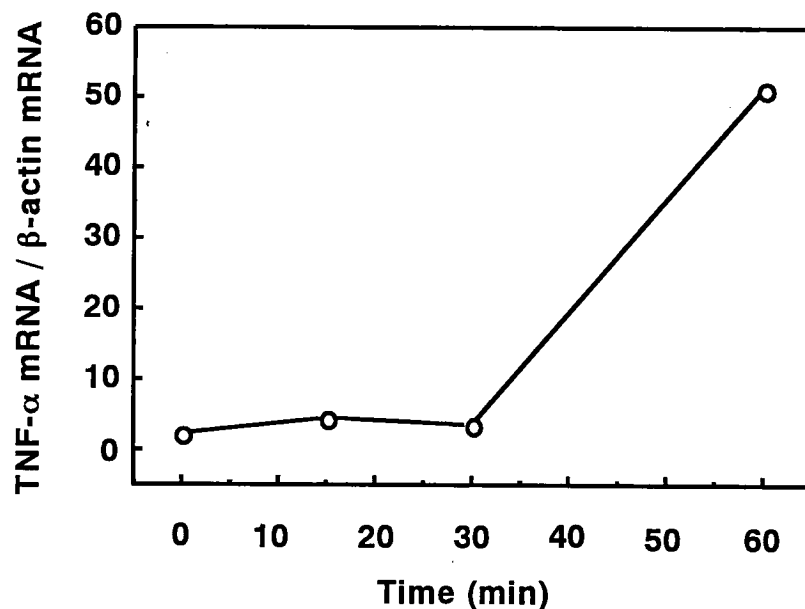


Fig.7 Effect of LPS on TNF- α mRNA expression in rat microglia. The microglia were stimulated with 10 ng/ml of LPS for the indicated period and total RNA was isolated as described in the 'Method' and hybridized with both TNF- α and β -actin riboprobes and RNase protection assay was performed. Values shown as the ratio of TNF- α mRNA versus β -actin mRNA.

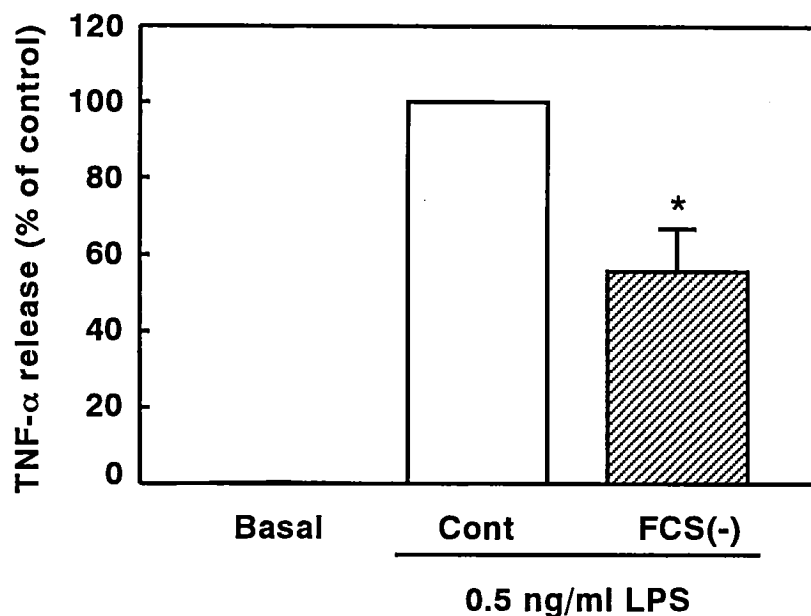


Fig.8 LPS-induced TNF- α release in the presence or absence of FCS. The microglia cells were stimulated by 0.5 ng/ml LPS in normal or FCS-free DMEM for 3 hours. Values are expressed as mean \pm SEM of percentage of release compared with control from three independent experiments. Values for 100 % for release of TNF- α were 1.78 ± 0.35 ng/ 10^6 cells in LPS-stimulated microglia in Normal DMEM. * $p < 0.05$, significantly different from the control (t-test).

[考察]

Isolectin B₄による免疫染色ならびに形態観察した結果、ミクログリアはアストロサイト層上に浮遊する弱付着性の球状細胞であり、精製によって、単一細胞に分離できることが示された。また形態はアメーバー状もしくは棒状を示していることから、今回得られた培養ミクログリアは培養もしくは精製過程において、活性化されていることが示唆された。また無刺激でこの精製細胞の培養を続けると、形態が枝分かれした休止状態に変化することが観察されていた。また混合グリア培養におけるミクログリアの形態が球状を示した細胞も観察された。これらのことから混合グリア系において休止型のミクログリアが精製過程により活性化されることが考えられた。もしくは混合グリア培養においてニューロンやアストロサイトからのシグナルにより活性化されていたミクログリアが、単離することでその刺激が無くなり、休止型に戻る可能性が考えられた。本研究では特に厳密に区別せず、アメーバー状もしくは棒状のミクログリアを実験には用いた。

LPSによるTNF- α 遊離機構について検討した結果、無刺激においてもミクログリアはアメーバ状を示しており、形態的に活性化されている様子であるが、TNF- α は遊離しない。このことから、ミクログリアもマクロファージ同様にその活性化は厳密に制御されていることが考えられ、少なくとも精製過程での刺激ではTNF- α の産生遊離に至るほどの活性化段階には移行しないことが示された。しかしLPSは顕著なTNF- α 遊離を引き起こし、0.3 ng/mlの微量のLPSでも十分なTNF- α を遊離することを確認した(データ略)。このようにミクログリアはLPSに対する感受性が強く、アストロサイトで報告されているよりも低濃度で反応し⁴⁾、脳の異常にいち早く反応すると考えられた。またLPSによるTNF- α 遊離のタイムコースが3~6時間で最大となることが示された。さらにプロテクションアッセイの結果から、LPSはミクログリアを刺激し、1時間後にはTNF- α mRNAの発現をおこし(Fig.7)、蛋白合成を介し3時間以降には細胞外へ遊離することが示された。6時間以降遊離量が減少することは、TNF- α mRNAの誘導低下、TNF- α 蛋白質の分解などが関与することが考えられた。

LPSは血清成分LPS結合蛋白質(LBP)とともに細胞膜蛋白質CD14に結合し複合体を形成し、Toll-like receptors (TLRs)を活性化する。TLRsはショウジョウバエにおいて感染防御に働くToll受容体と類似性を示し、マクロファージにおいてprotein tyrosine kinase、MAPキナーゼ、NF- κ B活性化などのシグナルを起動することが知られている¹¹⁰⁾。しかしLPSは血清つまりLBPが存在しなくとも、おそらくCD14を仲介しない経路により細胞内にシグナルを伝えることもよく知られている⁵²⁾。LPSはミクログリアにおいて、TNF- α mRNA発現からTNF- α 産生遊離を引き起こしたが、この効果はFCS無添加により部分的に減少した。このことからLPSが血清成分であるLBPと結合しCD14を介してシグナルを伝えるとともに、LPS単独でもCD14以外の経路でミクログリアを活性化するシグナルを起すことが示された。また本研究においてLPSはミクログリアにCa²⁺シグナルを起動することは無く(データ略)、これらの結果はLPSによるTNF- α 遊離に特徴的であり、他の刺激と区別するのに有用であることが示された。

第2章 細胞外 ATP によるミクログリアからの TNF- α 産生遊離

[緒言]

ミクログリアにおける ATP の影響については 1994 年 Norenberg らにより電気生理学的手法を用いて報告されて以来⁴¹⁾、ミクログリアには G 蛋白質共役型 P2Y 受容体による細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 遊離とイオンチャネル内蔵型 P2X 受容体による Ca^{2+} 、 Na^+ などの非選択的カチオン流入が生じることが明らかになってきた。1996 年 Ferrari らは始めてミクログリアに発現する P2Z 受容体の存在を報告した⁵³⁾。さらに翌年 Surprenant らによりラット脳から 595 アミノ酸よりなる ATP 受容体 P2Z がクローニングされた。この 595 アミノ酸の P2Z は始めの 395 アミノ酸が P2X サブタイプと 35~40 % の相同性を示し、カチオンチャネルとして同様の性質を示すことから P2X₇ として同定され、現在ではミクログリアにもその発現が確認されている³⁶⁾。P2X₇ は膜 2 回貫通型であるが細胞内 C 末端が他の P2X 受容体と比べ非常に長い構造をとる。P2X₇ は多機能分子として非選択的カチオンチャネルとして機能するのみならず、この特徴的な構造により 900 Da の分子を通過させる pore を形成する。このため P2X₇ は活性化により①速やかな細胞膜の脱分極、②細胞膜透過性の亢進を行い、細胞内にシグナルを伝達する。また、すべてのプロトンが解離した ATP^4 を唯一のアゴニストとするが (Fig.9)、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 含有培養液中においては ATP^4 がキレートされてしまう。そのため活性化には高濃度 (mM オーダー) の ATP が必要である⁵⁴⁻⁵⁶⁾。他の P2X、P2Y 受容体は Mg^{2+} - ATP^4 などの複合体もアゴニストとして認識することから、P2X₇ は ATP 受容体のなかでも極めて異質な性質を示す。その特有の反応として細胞質の膨張、細胞膜の崩壊、さらにアポトーシス、ネクロトーシスといった細胞死を起こすことが知られている⁵⁶⁾。一方で P2X₇/P2Z が肥満細胞、マクロファージ、リンパ球、アストロサイト、ミクログリアなど主に免疫担当細胞に発現していることは^{53,58-61)}、免疫機能に関わる可能性を示している。例えば ATP による P2X₇ を介したマクロファージの細胞死は抗原提示を行った後の感染細胞除去のため積極的なアポトーシス誘導機構として働く^{107,108)}。また高濃度の ATP が存在しなければ P2X₇ が活性化されないことは、傷害など ATP が大量に遊離される病的状態や神経細胞などの ATP 遊離細胞に密接した環境においてのみ活性化されることなどが想像され、免疫反応のみならず、病態への関与も考えられる。

一方、ミクログリアに発現する P2Y 受容体については知見が不足しているが、ミクログリアでは UTP が ATP と同様に反応を引き起こすことからマクロファージ同様に P2Y₂ が発現している可能性が考えられている (Table 5)。P2Y₂ は G 蛋白質と共役し細胞内ストアからの Ca^{2+} 遊離を起こし、さらには容量性 Ca^{2+} 流入を起こすことが報告され、比較的低濃度 (μM オーダー) の ATP でも十分に活性化されることが知られている。さらにチロシンキナーゼ、プロテインキナーゼ C を介した MAP キナーゼを活性化することが報告され、ATP による蛋白合成、細胞増殖の制御の可能性を示している⁶²⁾。

また ATP は細胞外において細胞膜に発現している ecto-ATPase などによりアデノシンに速やかに代謝される。アデノシンは ATP とは独立したアデノシン受容体 (A_1 , $\text{A}_{2\text{A}}$, $\text{A}_{2\text{B}}$, A_3) によりそのシグナルを伝える。アデノシン受容体はいずれも G 蛋白質共役膜 7 回貫通型で G_i 、 G_s もしくは G_o を介して cAMP、 Ca^{2+} によりシグナルを伝える (Fig.10)。ミクログリアは他の細胞に比べ非常に強く ATP 分解酵素を発現しており⁸⁾、積極的に ATP シグナルに関わることが想定される。またその代謝物であるアデノシンの受容体も発現しており、生体において ATP のミクログリアへの効果は、その代謝物であるアデノシンも含めた一連のシグナル伝達により決定される。

ATP はこれらの受容体を介してミクログリアを活性化し、病態形成に大きく関与すると推測される。本章では ATP によるミクログリアからの TNF- α 遊離について測定し、ミクログリア活性化における P2Y₂、P2X₇ ならびにアデノシン受容体の役割について検討する。

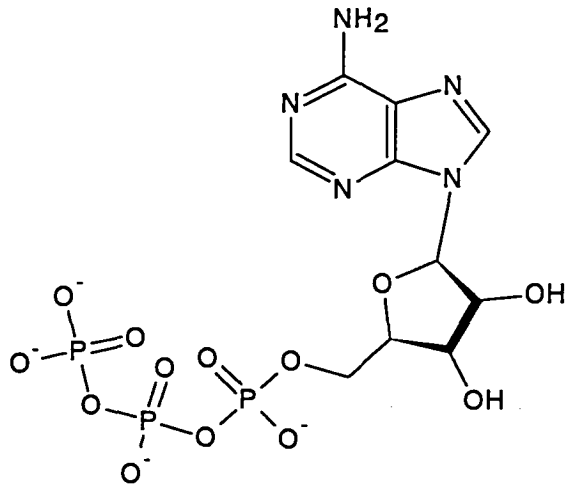


Fig.9 Chemical structure of ATP⁴⁻.

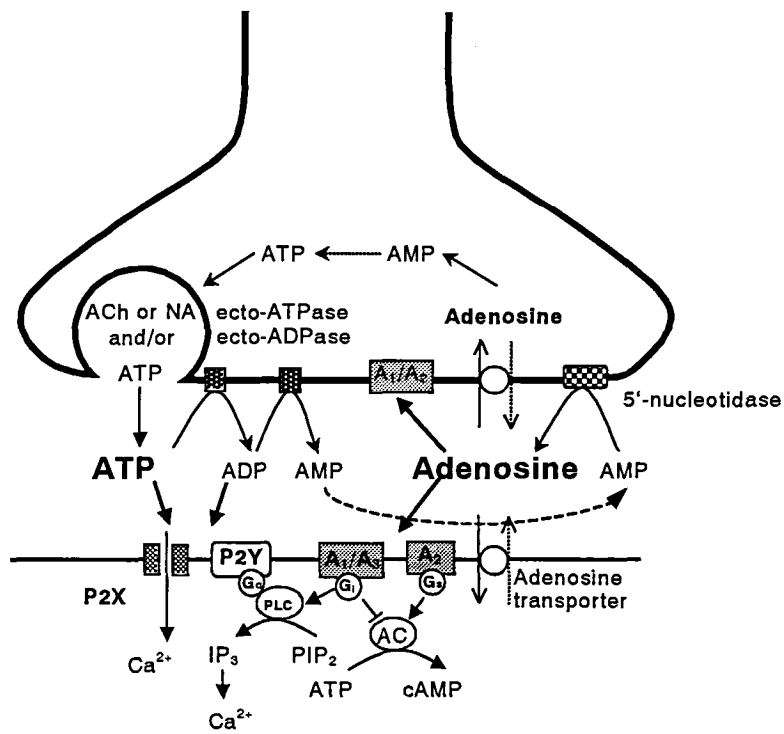
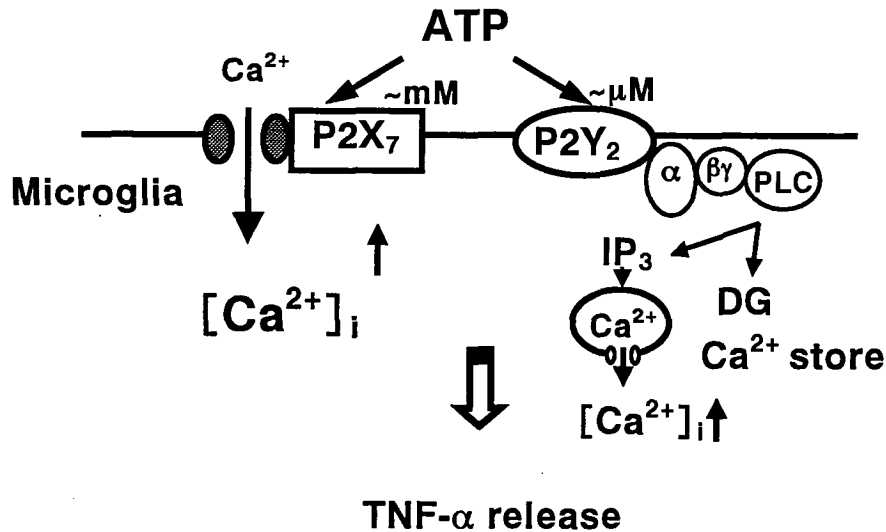


Fig.10-A Life cycle and potential functions of ATP^{35,38)}



	P2X ₇	P2Y ₂
Type	イオンチャネル型 (pore 形成)	G 蛋白質共役型
Ca ²⁺ シグナル	細胞外 Ca ²⁺ 流入	細胞内ストアから の Ca ²⁺ 遊離
アゴニスト	mM オーダーの ATP (μ M オーダーの ATP ⁴⁻)	μ M オーダーの ATP
Mg ²⁺ の効果	抑制 (ATP ⁴⁻ をキレート)	無影響

Fig.10-B ATP receptors in microglia.

[実験方法および実験材料]

この章で新たに使用した実験方法は以下の通りである。

(1) 細胞死の観察

細胞浮遊液を 24 well プレート (1.5×10^5 cells/0.4 ml/well) に分注し、45 分後に洗浄し精製した。ATP により刺激し、90 分後に 25 % トリパンプルーを加え、光学顕微鏡下において細胞をカウントし、全細胞に対するトリパンプルー染色されない細胞の割合を生存率とした。

上記以外は第1章に示す方法と同様に行った。

[実験結果]

(1) ATP によるラット脳ミクログリアからの TNF- α 遊離

まずミクログリアからの TNF- α 遊離に及ぼす ATP の影響を検討した。10 % FCS-DMEM (1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄) 培養液中で ATP によりミクログリアを刺激し、培養液中に遊離された TNF- α を ELISA により定量した。3 mM ATP でミクログリアを刺激すると TNF- α が 1 時間後から細胞外に遊離され、6 時間で最大に達し、それ以降減少が認められた (Fig.11A)。このタイムコースは LPS (10 ng/ml) によるものと類似していた (Fig.6)。以後の実験ではほぼ最大に達する 3 時間を刺激時間として用いた。

一方、ATPによるTNF- α 遊離の濃度反応曲線は2相性を示し、比較的低濃度(0.1 mM)でゆるやかな遊離と、1 mMで大量の遊離が確認され、さらなる高濃度では遊離量の減少が認められた(Fig.11B)。

(2) TNF- α mRNA 発現に対する ATP の効果

ATPによるTNF- α 遊離が産生過程の促進なのか、遊離過程の促進なのかを明らかにするため、TNF- α mRNA 発現に対するATPの効果を検討した。ATPによるTNF- α mRNA 発現について検討したプロテクションアッセイの結果を示した(Fig.12)。TNF- α mRNAは445 bpに、内部標準として用いた β -actin mRNAは310 bpにバンドが認められた。ATPは刺激1時間後に著しいTNF- α mRNA 発現を引き起こし、LPSによるTNF- α mRNA 誘導のタイムコースと同様にその後減少した(データ略)。このことからATPはTNF- α mRNA 発現を介して新たなTNF- α を産生し、TNF- α 遊離を起こすことが示された。

(3) LPS の混入とポリミキシン B の影響

前章において示したようにマイクログリアは微量のLPSにも強く反応し、大量のTNF- α を遊離する。さらにLPSは血清中、さらには実験器具、水、試薬に至るまであらゆるところに混入する可能性があることから、LPSの混入のためATPがTNF- α 遊離を起こした可能性が考えられる。そこで試薬を溶解したときのLPS含有濃度をLAL test⁴⁷⁾により定量した。その結果、10% FCS-DMEM溶液中には86 pg/ml、1 mM ATP-DMEM溶液中には、97 pg/mlのLPSが検出された。DMEM中ではTNF- α はほとんど遊離されないことから、1 mM ATP-DMEM溶液中に含まれるLPS濃度ではTNF- α が遊離されることはなく、ATPによるTNF- α 遊離はLPSの混入によるものではないことが示された。また他の試薬についてもLAL testを行い、LPSの混入がないことを確認した(データ略)。

さらにLPSの混入の可能性を否定するため、LPSの作用を除去することが知られているポリミキシンBを用いて検討した。LPS刺激によるTNF- α 遊離はポリミキシンBにより完全に抑制された(データ略)。しかしながらマイクログリアをポリミキシンB存在下でATP刺激してもTNF- α 遊離量には変化は認められなかった(Fig.13)。このことからATPの効果はLPSの混入によるものではないことが確認された。

(4) ATP 誘発性 TNF- α 遊離における FCS の必要性

前章で述べたようにLPSによるTNF- α 遊離はFCS無添加により減少した。このことはLPSのシグナル伝達に特徴的であり、ATPによるTNF- α 遊離がLPS同様にFCSに影響されるのか否か検討した。FCS無添加DMEMを用いてATP刺激を行ったが、TNF- α 遊離はLPS刺激とは異なり、FCS無添加により影響されない(Fig.14)。このことからATPはLPSとは異なるシグナル経路によりTNF- α 遊離を引き起こすことが示唆された。

(5) ATP アナログによる TNF- α 遊離

いまだATP受容体に対する選択的アゴニスト、アンタゴニストが開発されていないため、ATP受容体の同定はおもにそのアナログの親和性に基づいて行なわれている。そこでマイクログリアにおいてTNF- α 遊離を制御するATP受容体サブタイプを明らかにする目的で、ATPアナログの効果について検討した。Adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) (ATP γ S)は非水解性のATPアナログであり、100 μ Mにおいて強くTNF- α 遊離を引き起こした(Fig.15)。このことはATPの加水分解は必要ではなく、ADP、AMP、AdenosineなどのATP代謝物は関与しないことを示している。さらにATPよりも強い活性を示したことから持続的な受容体の活性化が必要とされることが示された。またA₁/A₂アデノシン受容体アゴニスト5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA)は10 μ Mにおいても有意な遊離を起こさなかったことから、アデノシンが直接関与していないことも示唆された。

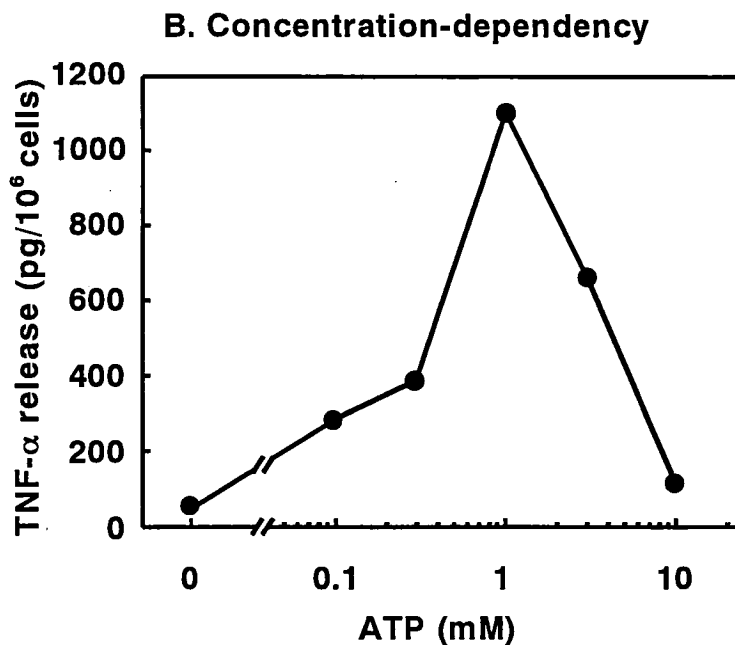
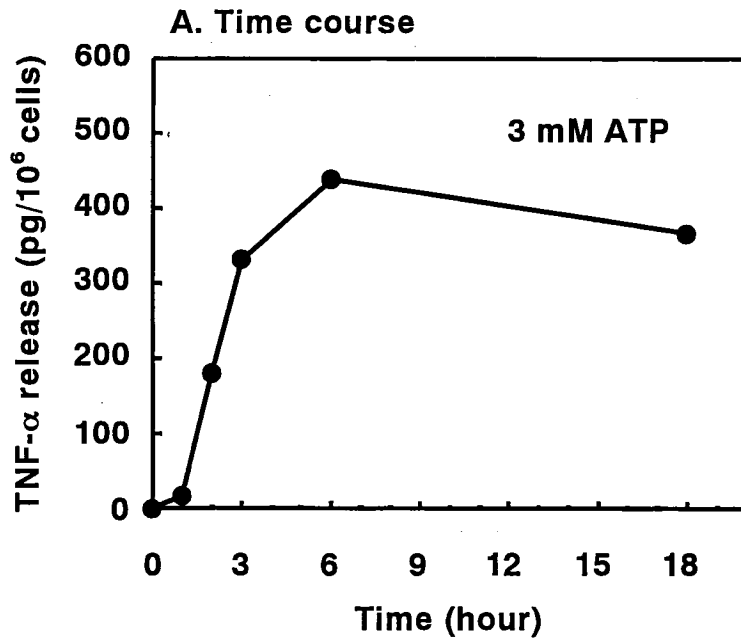


Fig.11 Effect of ATP on TNF- α release in rat cultured brain microglia. (A) Time course; (B) Concentration-dependency. The microglia were stimulated with 3 mM (A) or the indicated concentrations (B) of ATP and TNF- α released to the media was assayed after the indicated period of incubation (A) or three hours (B). Values are the means of two cultures from one experiment and a similar result was obtained in another set of independent experiments.

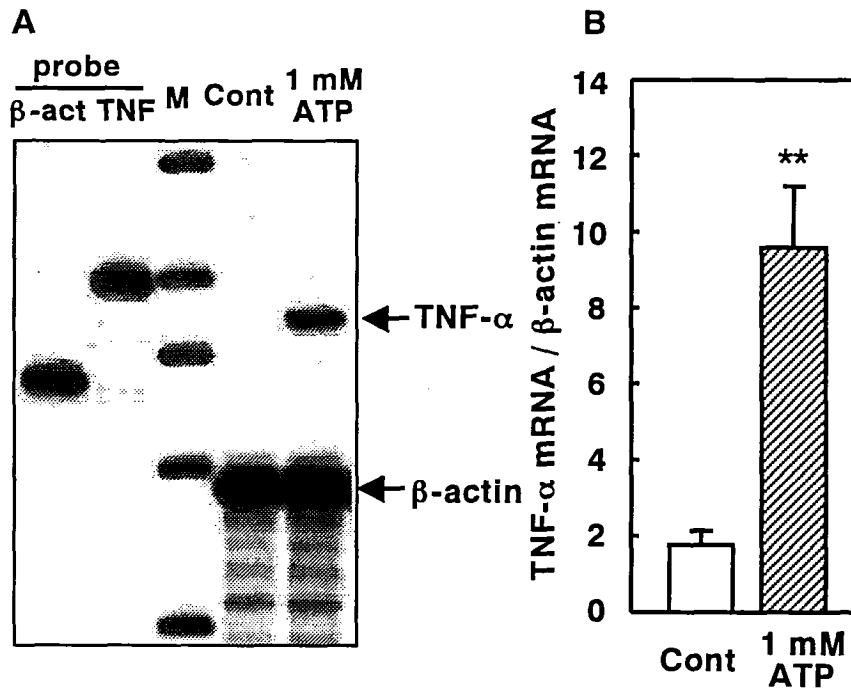


Fig.12 Effect of ATP on TNF- α mRNA expression in rat microglia. (A) The result of ribonuclease protection assay. Each lane represents the protected bands for TNF- α (445 bases) and β -actin (310 bases) mRNA or the labeled probes of TNF- α (485 bases) and β -actin (390 bases) and size marker, *pBSSKHpa II* (M; 710, 489, 404, 325, 242 bases). (B) Values shown as the ratio of TNF- α versus β -actin. Data are mean \pm SEM (bars) values (n=9). ** p<0.01.

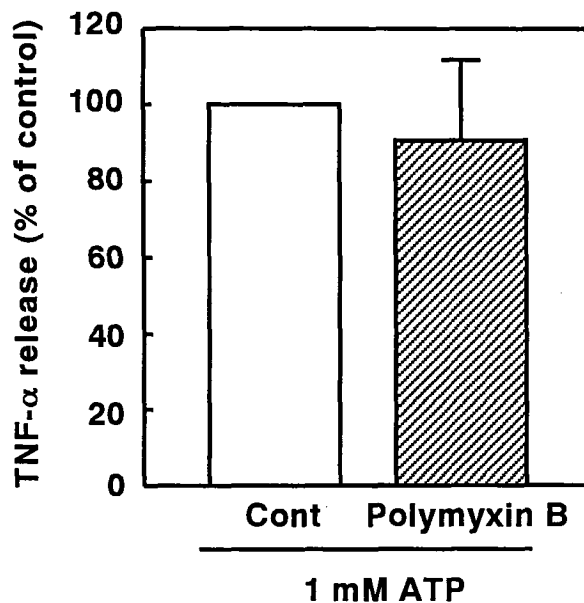


Fig.13 Effect of polymyxin B in ATP-induced TNF- α release. The microglia were stimulated by 1 mM ATP in the presence or absence of 10 μ g/ml polymyxin B. Values are expressed as mean \pm SEM of percentage of release compared with control from three independent experiments.

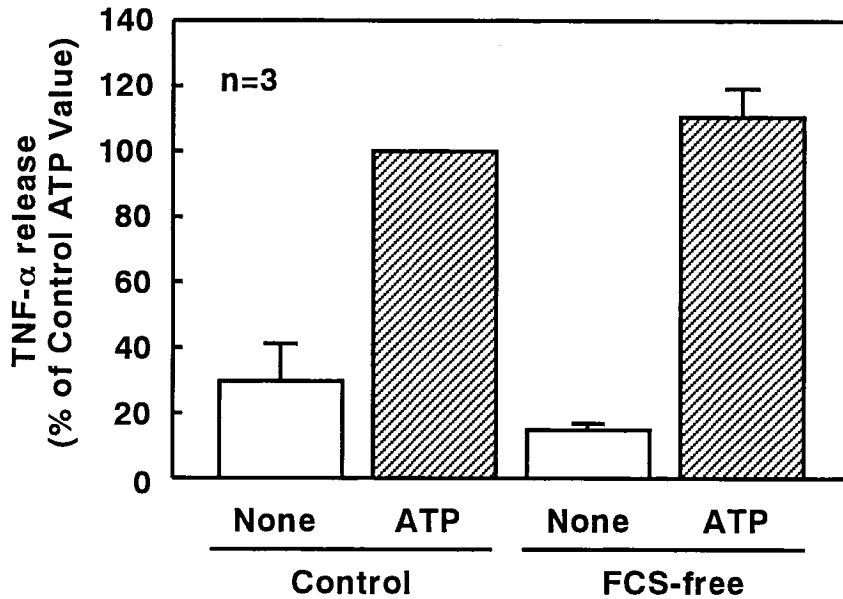


Fig.14 ATP-induced TNF- α release in the presence or absence of FCS. The microglia were stimulated by 1 mM ATP in control (10 % FCS) or FCS-free DMEM for 3 hours. Values are expressed as mean \pm SEM of percentage of release compared with ATP stimulated in normal DMEM. Values for 100 % for release of TNF- α were 709.9 ± 180.0 pg/ 10^6 cells in ATP-stimulated microglia in normal DMEM (control).

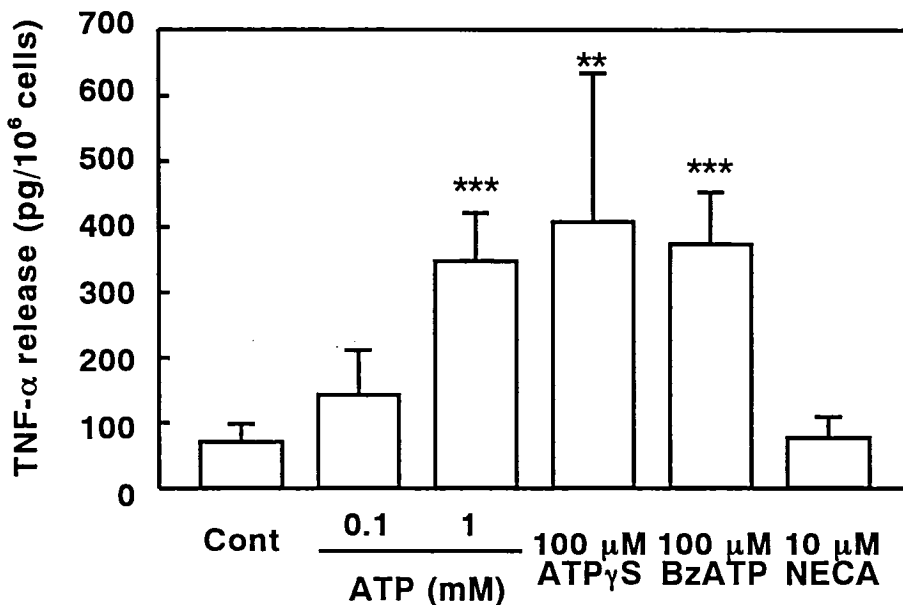


Fig.15 Effects of ATP and ATP-analogs on TNF- α release in rat cultured brain microglia. The microglia were stimulated with indicated concentrations of ATP or ATP-analogue for three hours. Values are expressed as mean \pm SEM of TNF- α release. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significantly different from the control (t-test).

ミクログリアは P2Y₂ と P2X₇ の発現が確認されている。そのうち P2Y₂ は μM オーダーの ATP により活性化されるが、P2X₇ は ATP⁴⁻ を唯一のアゴニストとするため、Mg²⁺ などを含む培養液中では高濃度 (mM) の ATP が必要である⁵⁴⁻⁵⁶⁾。本実験では 1.8 mM CaCl₂、0.8 mM MgSO₄ 含有 DMEM 中において TNF- α 遊離が 1 mM ATP で最大の反応を示したことから、この ATP の効果は P2X₇ を介する可能性が考えられた。そこで P2X₇ 選択的アゴニストである 2'-and 3'-O-(4-benzoyl-benzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP)^{36,67)} の効果を検討した。その結果、BzATP は 100 μM において顕著な TNF- α 遊離を起こし、ATP による TNF- α 遊離が P2X₇ を介して引き起こされている可能性が示唆された (Fig.15)。

(6) P2X₇ アントゴニストの影響

P2X₇ アゴニストである BzATP が強く TNF- α 遊離を引き起こしたことから、ATP の効果に関わる受容体サブタイプとして P2X₇ の可能性が示唆された。そこで ATP による TNF- α 遊離に対する P2X₇ アントゴニストの影響を検討した。Adenosine 5'-triphosphate periodate oxidized (oATP) は P2X₇ アントゴニストとして最もよく用いられているが⁶³⁾、本実験においては単独処置において TNF- α 遊離を引き起こし、ATP 刺激に対しても抑制効果を確認することが出来なかった (Fig.16)。そこで他の P2X₇ アントゴニストとしてイソキノリン誘導体 KN-04⁶⁴⁾、ならびに Ca²⁺/Na⁺チャネル阻害剤として知られ、最近 P2X₇ 阻害効果が報告された calmidazolium⁵⁴⁾ を検討したところ、10 μM において有意な抑制を示した。しかしながら、それ以下の低濃度では抑制効果は認められず (データ略)、その濃度依存性は確認できなかった。またアミロライド誘導体 N,N-hexamethylene amiloride (HMA)、非選択的 P2X/P2Y アントゴニストである

pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-,2',4'-disulphonic acid (PPADS) にも部分的に P2X₇ を抑制すると報告されているが⁶⁵⁾、HMA は 50 μM という高濃度で抑制効果を示したが、その濃度依存性は確認できず、PPADS については 100 μM においても有意な抑制効果が認められなかった (データ略)。以上の結果は P2X₇ 選択的アゴニスト BzATP による TNF- α 遊離に対しても同様の結果であった (データ略)。これらのことは TNF- α 遊離において P2X₇ の関与を否定するものであるが、現在の P2X₇ アントゴニストの特異性には疑問が残り、さらなる検討が必要である。

最近、Brilliant Blue G (BBG) がラット P2X₇ 受容体の特異的アントゴニストであることが報告された¹¹⁾。そこで、ATP または BzATP 刺激による TNF- α 遊離に及ぼす BBG の影響を調べた。その結果、BBG は濃度依存的に ATP または BzATP 刺激による TNF- α 遊離を抑制することが示された (Fig. 16-2)。従って、ATP または BzATP 誘発性 TNF- α 遊離は少なくとも P2X₇ 受容体に関与する可能性が示された。

(7) Mg²⁺ の影響

ATP は水溶液中では荷電した ATP⁴⁻ というアニオン形態をとっている (Fig.9)。しかし、培養液中には Ca²⁺をはじめ、Mg²⁺、H⁺、などの多種のカチオンが存在し、特に 2 価カチオン Mg²⁺ は ATP⁴⁻ と結合し、Mg-ATP²⁻、Mg-ATP-Mg などの複合体を形成する。一般に P2X、P2Y 受容体には Mg-ATP²⁻ もアゴニストとして機能し、2 価カチオンには影響されないが、P2X₇ は ATP⁴⁻ を唯一のアゴニストとするため、Mg²⁺ が P2X₇ を介するシグナルを特異的に抑制することが多く報告されている⁵⁴⁻⁵⁶⁾。そこで ATP 誘発性 TNF- α 遊離に対する Mg²⁺ の影響を検討した。実験は 1 mM ATP ならびに 100 μM BzATP をあらかじめ Mg²⁺ と共存させてから刺激した。その結果 Mg²⁺ は ATP ならびに BzATP が引き起こす TNF- α 遊離を濃度依存的に抑制した (Fig.17)。このことは TNF- α 遊離が P2X₇ を介する効果であることを示唆するが、ほぼ全ての ATP⁴⁻ をキレートできる 10 mM Mg²⁺ における抑制率が ATP 刺激においては 56.1 \pm 4.9 %、BzATP 刺激では 42.0 \pm 15.8 % であり、Mg²⁺ により完全には抑制されないことが示された。このことから P2X₇ と P2X₇ 以外の複数の受容体により TNF- α 遊離が行われている可能性が考えられた。

(8) ATP による細胞死の観察

ATP は P2X₇ を活性化し、細胞死を起こすことが知られている。そのメカニズムは刺激の強さ、時間的な長さなどにより異なるが、過剰 Ca²⁺ 流入によるネクローシスと、カスパーゼ系酵素の活性化によるアポトーシスが混在している⁵⁷⁾。このことから ATP による細胞死の観察が P2X₇ 活性化の目安となり、さらには ATP による TNF-α遊離の生理的意義の理解にも寄与すると考え、ATP による細胞死の誘導について検討を行った。その結果 ATP は 1 mM 以上において有意に細胞死を誘導し、3 mM 以上では急激な細胞死の増加傾向が観察された (Fig.18)。またこの細胞死は P2X₇ アンタゴニスト oATP により抑制されることから P2X₇ の活性化によることが示唆された (データ略)。しかしながら 10 mM 刺激、3 時間後においても生存する細胞が確認され、ADP では 10 mM でもほとんど細胞毒性を示さなかった (データ略)。さらにミクログリアは他の細胞に比べ非常に高い ATP 代謝能をもつことなどから⁸⁾、ミクログリアは ATP を分解し細胞毒性を消失させることが考えられた。また初代培養ミクログリアが均一な細胞ではなく、P2X₇ の発現量が細胞間で異なり、ATP の感受性が変化していることなども考えられた。

(9) ミクログリアにおける P2X₇ 発現の確認

末梢血液中の単球は P2Y 受容体が機能しているが、P2X₇ に対する反応が欠如している。しかし IFN-γ によりマクローファージに分化させると P2X₇ の発現が誘導され、P2X₇ を介する反応を引き起こす⁶⁶⁾。またミクログリアにおいても ramified ミクログリアは ameboid ミクログリアに比べ ATP に対する反応強度が低いという報告がある⁵³⁾。本研究で用いているミクログリアは形態から見ると ameboid を示しているが、細胞死の観察から P2X₇ を発現していないと考えられる細胞も確認

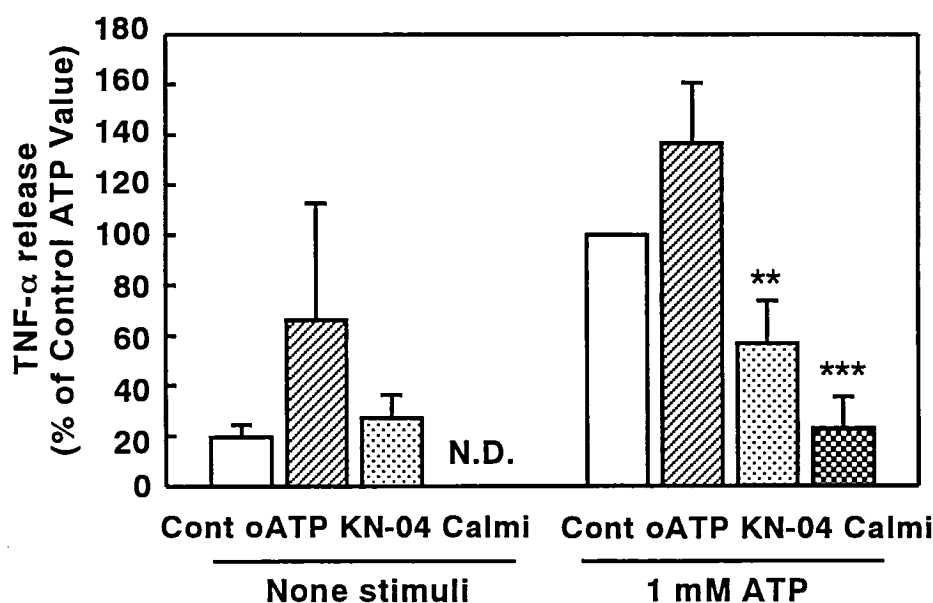


Fig.16-1 Effects of P2X₇ antagonists on ATP-induced TNF-α release in rat microglia. The cells were pretreated with 30 μM oxidized ATP (oATP) for 1 hours, 10 μM KN-04 or 10 μM calmidazolium (Calmi) for 10 min and oxidized ATP was wash to remove excess oxidized ATP and stimulated with 1 mM ATP. Values are expressed as mean ± SEM of percentage of release compared with Control in 1 mM ATP. ** p<0.01, *** p<0.001, significantly different from the control (t-test).

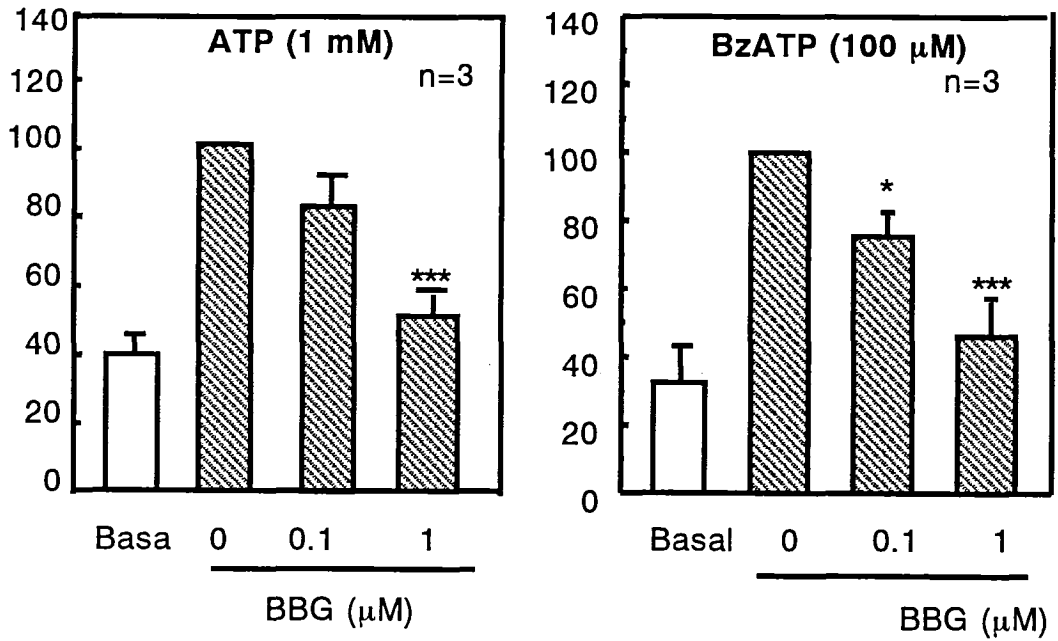


Fig.16-2 Effects of P2X₇ antagonist, Brilliant Blue G (BBG), on ATP- or BzATP-induced TNF- α release in rat microglia. The cells were pretreated with BBG for 5 min and stimulated with 1 mM ATP or 100 μ M BzATP. Values are expressed as mean \pm SEM of released TNF- α (pg/ml). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significantly different from the control (t-test).

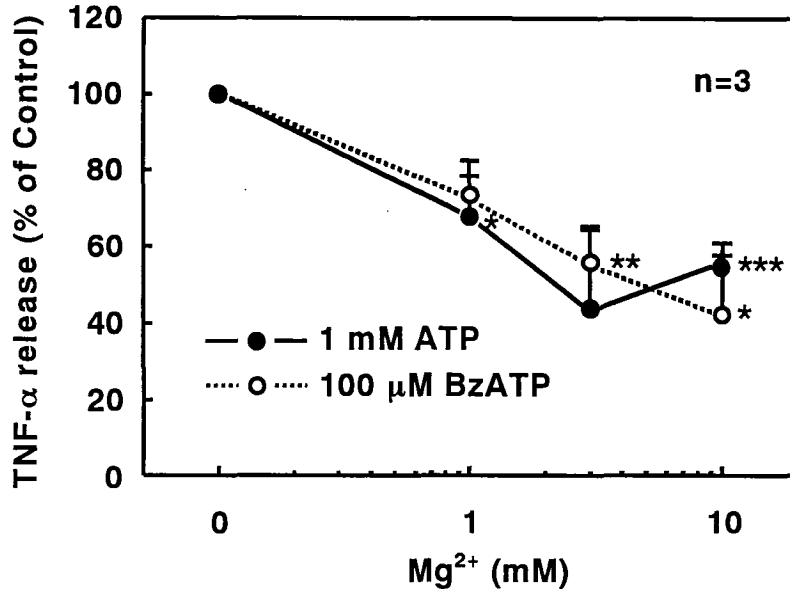


Fig.17 Effect of Mg²⁺ on ATP- or BzATP-induced TNF- α release in rat microglia. The cells were stimulated with 1 mM ATP or 100 μ M BzATP in the presence of Mg²⁺. Values are expressed as mean \pm SEM of percentage of release compared with individual controls. Control (100 %) Values for release of TNF- α were 413.9 \pm 211.7 and 325.6 \pm 191.8 pg/10⁶ cells in ATP- or BzATP-stimulated microglia, respectively. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significantly different from the control (t-test).

された。そこで本研究におけるミクログリアの $P2X_7$ の発現を肥満細胞をポジティブコントロール、RBL-2H3 細胞をネガティブコントロールとして特異的抗体を用いて検討した^{36,57)}。ミクログリアには 78 KDa あたりにバンドが確認され、肥満細胞にも発現し、また RBL-2H3 細胞には発現していないことから $P2X_7$ であることが示され、また競合ペプチドによりそのバンドが消失していることからその発現が確認された (Fig.19)。同細胞数を泳動した結果、本研究で用いているミクログリアは肥満細胞に比べ $P2X_7$ 発現が弱く、細胞種もしくはその環境により発現量に変化し、ATP によるシグナル伝達を調節している可能性が考えられた。

(9) ミクログリアにおける $P2X_7$ 発現の確認

末梢血液中の単球は $P2Y$ 受容体が機能しているが、 $P2X_7$ に対する反応が欠如している。しかし $IFN-\gamma$ によりマクロファージに分化させると $P2X_7$ の発現が誘導され、 $P2X_7$ を介する反応を引き起こす⁶⁶⁾。またミクログリアにおいても ramified ミクログリアは ameoboid ミクログリアに比べ ATP に対する反応強度が低いという報告がある⁵³⁾。本研究で用いている

ミクログリアは形態から見ると ameoboid を示しているが、細胞死の観察から $P2X_7$ を発現していないと考えられる細胞も確認された。そこで本研究におけるミクログリアの $P2X_7$ の発現を肥満細胞をポジティブコントロール、RBL-2H3 細胞をネガティブコントロールとして特異的抗体を用いて検討した^{36,57)}。ミクログリアには 78 KDa あたりにバンドが確認され、肥満細胞にも発現し、また RBL-2H3 細胞には発現していないことから $P2X_7$ であることが示され、また競合ペプチドによりそのバンドが消失していることからその発現が確認された (Fig.19)。同細胞数を泳動した結果、本研究で用いているミクログリアは肥満細胞に比べ $P2X_7$ 発現が弱く、細胞種もしくはその環境により発現量に変化し、ATP によるシグナル伝達を調節している可能性が考えられた。

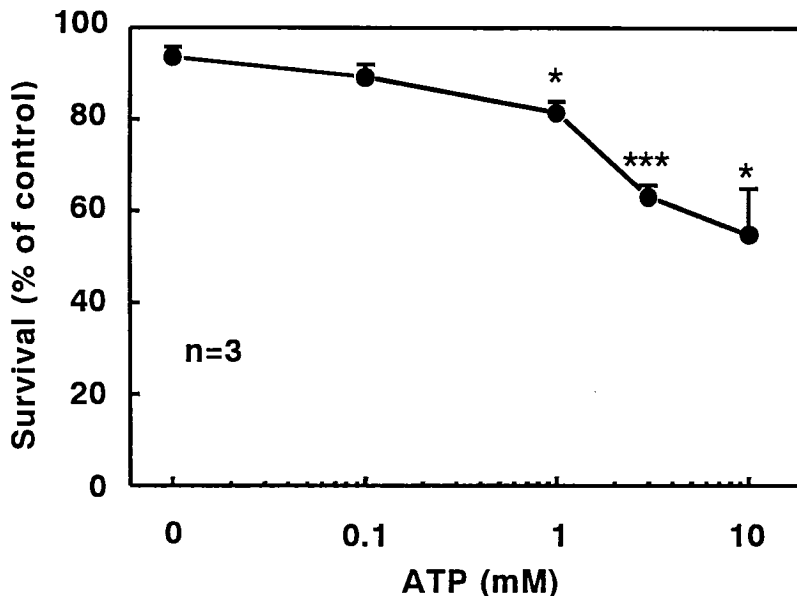


Fig.18 ATP-induced cytotoxicity in rat microglia. The cells were stimulated with the indicated concentrations of ATP for 90 min and stained by trypan blue. Non-stained cells were counted as survival. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significantly different from the control (t-test).

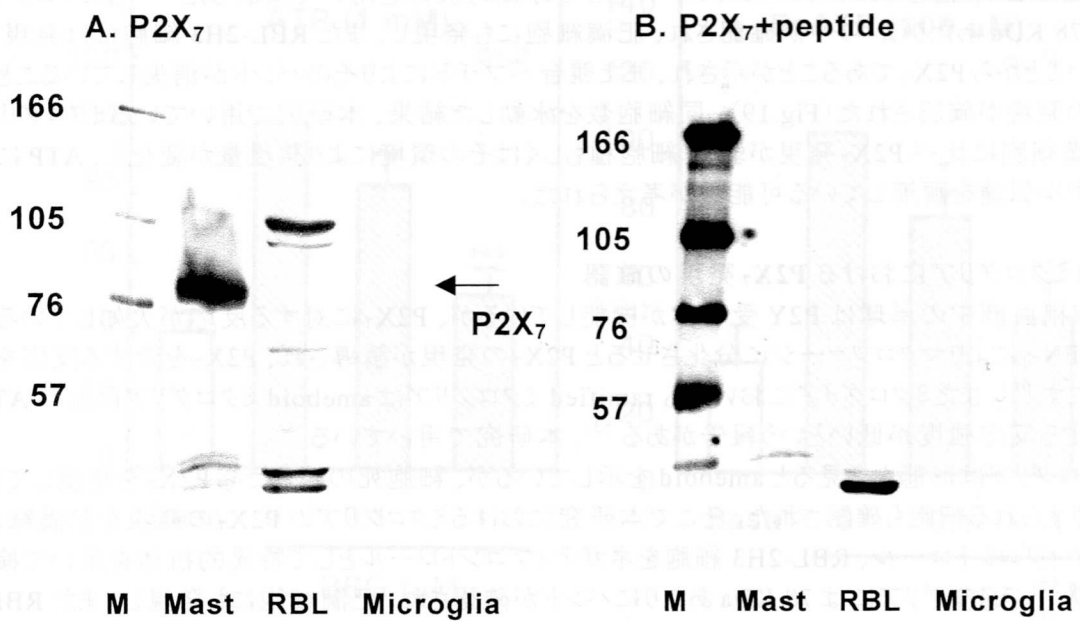


Fig.19 P2X₇ receptor expression by microglia. P2X₇ were detected by Western blotting using specific antibody (A) and control antigen peptide (B). Lane 1, marker; lane 2, mast cells; lane 3, RBL-2H3 cells; lane 4, microglia.

[考察]

ミクログリアは脳内の主要な興奮性伝達物質であるグルタミン酸には反応せず、その活性化メカニズムが注目されている。ミクログリアは少なくとも P2Y₂、P2X₇ の 2 種類の ATP 受容体を発現していることから、細胞外 ATP がミクログリアを活性化することが推測される。本章では細胞外に遊離された TNF- α を測定することにより、細胞外 ATP がミクログリアを活性化し、顕著に TNF- α 遊離を引き起こすことを示した。この ATP の効果は TNF- α mRNA 発現を介した新たな TNF- α 蛋白質の産生遊離によるものであったが、この TNF- α 遊離は 1) LAL test により ATP 試薬に LPS が混入していない 2) LPS キレート剤; ポリミキシン B では TNF- α 遊離が抑制されない 3) FCS に依存しない ということから ATP 自身の効果であることが確認された。ATP は細胞膜に発現している ecto-ATPase、ADPase さらに 5'-nucleotidase などにより速やかに ADP、AMP、アデノシンに代謝され、それぞれの受容体にシグナルを伝える³⁵⁾。しかし ATP γ S が強い効果を示すこと、アデノシン受容体アゴニスト NECA が TNF- α を産生しないことなどから ATP 中間代謝物による影響ではないことが確認された。

ATP は複数の受容体サブタイプを活性化することが可能であり、本実験において ATP 誘発性 TNF- α 遊離を引き起こす受容体の同定を試みた。ATP による TNF- α 遊離の濃度反応曲線は 2 相性を示し、1 mM で最大効果を引き起こし、それ以上の高濃度では減少が認められた。この結果から 1 mM ATP が引き起こす大量の TNF- α 遊離に注目した。この効果には高濃度の ATP が必要であり、ミクログリアに発現する ATP 受容体 P2X₇ が重要な役割を果たしている可能性が考えられた。さらに特異的に P2X₇ を活性化する BzATP が ATP よりも強く TNF- α 遊離を起こしたことも P2X₇ を介することを示している⁶⁷⁾。しかしながら P2X₇ アンタゴニストとして知られる oATP において

ATP 誘発性 TNF- α 遊離に対する抑制効果は確認できなかった。oATP は P2X₇ 蛋白質と共有結合し不可逆的に阻害効果を示すが、同時に ecto-ATPase 阻害活性をしめすことから、ATP の分解を抑制し、逆に ATP シグナルを増強する可能性が考えられる⁶³⁾。しかしながら細胞外 ATP が存在しない oATP 単独においても TNF- α 遊離を起こすことから、詳細な機構は現在も不明である。KN-04 は Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II 選択的阻害剤 KN-06 の不活体として開発された。しかし P2X₇ に対して nM オーダーで選択的にアンタゴニストとして作用し、さらにこの効果は human に特異的であり、rat には 1 μ M においても抑制効果を示さないという報告がされている⁶⁸⁾。これは他の P2X 受容体ファミリーでは human と rat のホモロジーが 90 %程度あるのに対し、human P2X₇ と rat P2X₇ では 80 %と低いため、動物種により薬物感受性が異なると考えられる⁶⁹⁾。本実験では、ラット脳ミクログリアにおいて KN-04 は 10 μ M では抑制効果を示したが、それ以下の濃度においては抑制効果は観察されず、KN-04 の rat P2X₇ に対する特異性には疑問が残った。同様に calmidazolium、HMA もそれぞれ 10 μ M、50 μ M では抑制効果が確認できたが P2X₇ への特異性には疑問が残り、P2X₇ アンタゴニストによりそのシグナルを決定することは困難であった。ごく最近、Brilliant Blue G (BBG) が μ M オーダー以下の濃度で P2X₇ 受容体を選択的に阻害することが報告された¹¹¹⁾。この BBG を用いて、ATP および BzATP による TNF- α 遊離には P2X₇ 受容体が重要な役割を果たすことが示された。

Virginio らは Mg²⁺ が ATP⁴⁻ 濃度を低下させることで P2X₇ が起こす電位変化の ATP 濃度反応曲線を高濃度側にシフトさせることを報告した⁵⁴⁾。Mg²⁺ による ATP⁴⁻ の除去は他の ATP 受容体には無影響であり、P2X₇ シグナルを選択的に抑制する。本研究においても Mg²⁺ は濃度依存的に 1 mM ATP ならびに 100 μ M BzATP が引き起こす TNF- α 遊離を抑制したため、TNF- α 遊離が P2X₇ を介することが示された。

また ATP 誘発性 TNF- α 遊離の濃度反応曲線は 2 相性を示したことは複数の受容体に関わる可能性を示唆する。さらに Mg²⁺ の影響においても 1 mM ATP ならびに 100 μ M BzATP 中に存在するすべての ATP⁴⁻ もしくは BzATP⁴⁻ をキレートできる 10 mM Mg²⁺ における抑制率が ATP 刺激においては 56.1 \pm 4.9 %、BzATP 刺激では 42.0 \pm 15.8 %であり、Mg²⁺ により完全には抑制されないことが示された。この結果からも P2X₇ とそれ以外の複数の受容体を介して TNF- α 遊離が行われている可能性が示唆された。

また、1 mM より高濃度の ATP において TNF- α 遊離が減少することについては、P2X₇ 活性化により細胞死が誘導されるため、TNF- α 蛋白の合成、遊離が減少することが示唆された。しかしながら 10 mM ATP においてミクログリアは約 60 %以上生存しているにも関わらず、TNF- α はほとんど遊離されない。このことから細胞死の誘導だけではなく、受容体の脱感作などの機構が関与する可能性が考えられた。

本章では、ATP が P2X₇ を含む複数の受容体を介して TNF- α 遊離を引き起こすことを示したが、ATP 受容体活性化は細胞外からの Ca²⁺ 流入、細胞内小胞体からの Ca²⁺ 遊離を起こすことから、この効果はおもに Ca²⁺ によりシグナル伝達されていると考えられる。そのため細胞内 Ca²⁺ の測定は ATP 誘発性 TNF- α 遊離の機構解明に重要であり、次章で検討した。

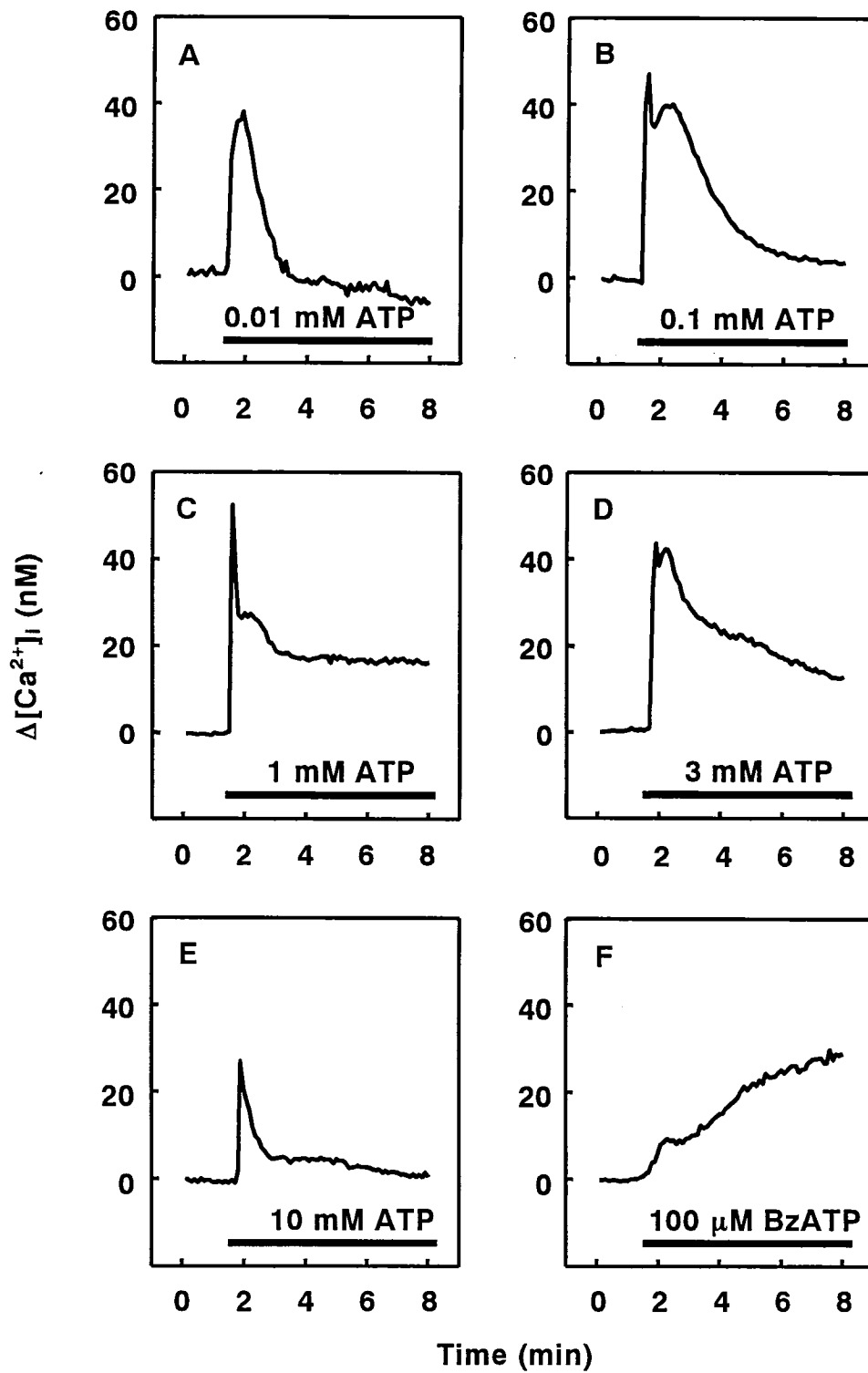


Fig.21 Ca^{2+} response in ATP-stimulated rat microglia. Fura-2-loaded cells were perfused with DMEM medium containing 10 % FCS and stimulated with the indicated concentrations of ATP (A-E) or BzATP (F). The traces shown are representative of the mean increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ above basal level of 28-39 cells from one culture. Similar results were obtained at least in three independent experiments.

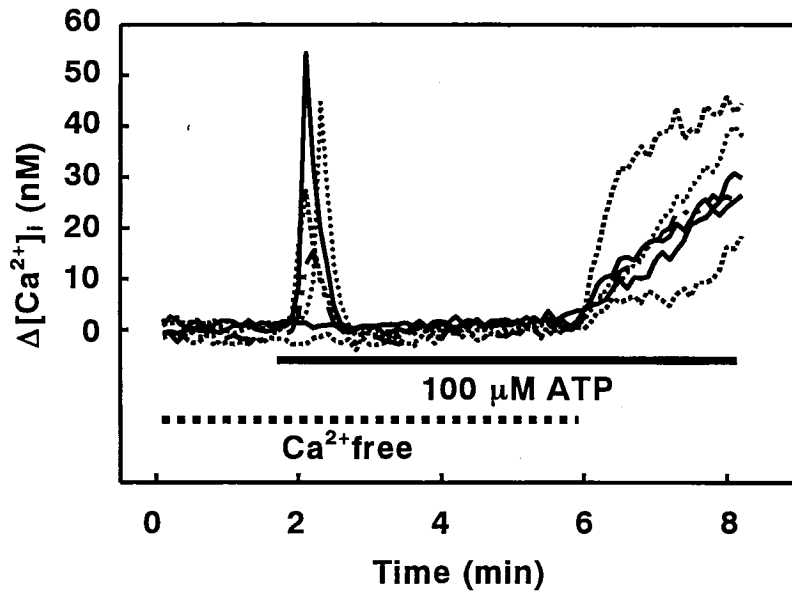


Fig.22 Ca^{2+} response in ATP-stimulated rat microglia in the presence or absence of extracellular Ca^{2+} . Fura-2-loaded cells were perfused with DMEM medium containing 10 % FCS and 2 mM EGTA (dotted line) or standard DMEM stimulated with the 100 μM ATP (solid line). The seven cells shown are representative of 29 cells stimulated by ATP.

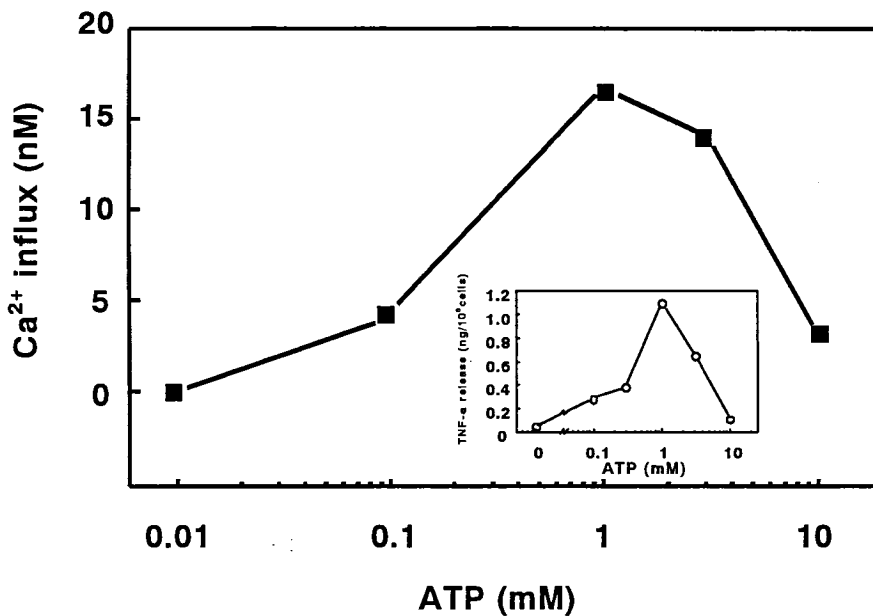


Fig.23 The concentration-response curve of ATP-induced Ca^{2+} influx. The Ca^{2+} influx was evaluated as a increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ above the basal level 8 minutes after ATP stimulation. The inset shows concentration-response curve of ATP-induced TNF- α release.

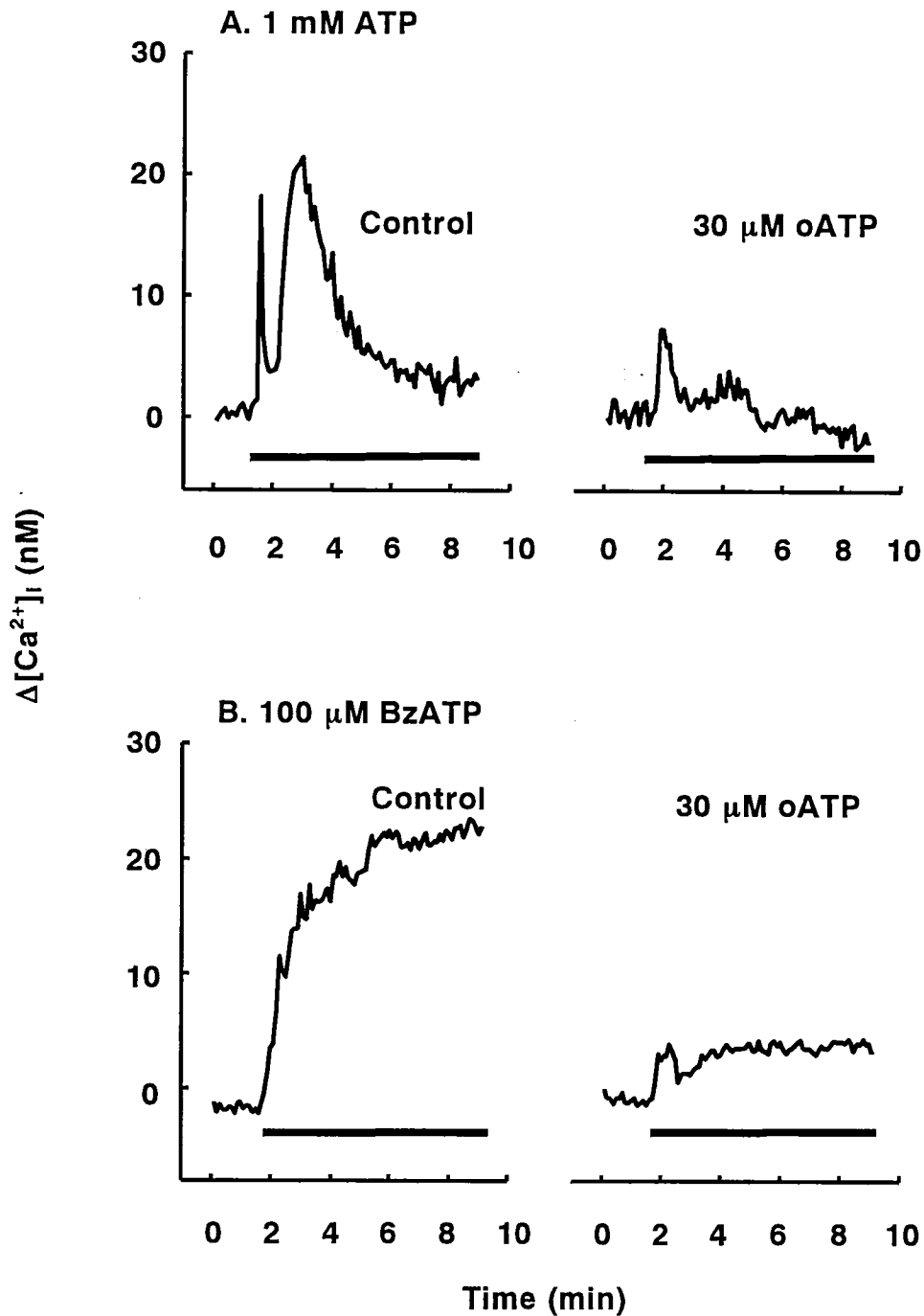


Fig.24 Effects of P2X₇ antagonist oxidized ATP on ATP-induced Ca²⁺ response in rat microglia. The cells were pretreated with 30 μ M oxidized ATP (oATP) for 1 hour and washed to remove excess oxidized ATP and stimulated with 1 mM ATP (A) or 100 μ M BzATP (B). The traces shown are representative of the mean increase in [Ca²⁺]_i above basal level of 25-36 cells from one culture. Similar results were obtained at least in three independent experiments.

示さなかった。さらに BzATP による Ca^{2+} 流入に対しても同様の効果を示した (Fig.24)。ATP は P2Y_2 を活性化し小胞体からの Ca^{2+} 遊離に引き続き、容量性 Ca^{2+} 流入を起こすが、oATP はこれには無影響である⁶³⁾。また他の P2X_7 アンタゴニスト KN-04、calmidazolium、PPADS についても同様の結果が示されたことから (データ略)、ATP による持続的 Ca^{2+} 流入が P2X_7 を介することが示された。

(3) ATP による pore 形成

a. アゴニストによる検討

ATP による持続的 Ca^{2+} 流入は P2X_7 を介して引き起こされる。しかしそれはどのようなメカニズムを介するのだろうか。 P2X_7 はイオンチャネルとして働く以外にその活性化により 900 Da までの分子を通過させる大きな pore を形成することが知られている^{69,78)}。エチジウムブロマイドは 394 Da の分子で通常細胞膜を通過できないが、 P2X_7 が活性化され pore が形成されると細胞内に流入し、DNA と結合し蛍光を発する (Fig.25)。写真で示すように、ATP 刺激によりミクログリアにおいてエチジウムの取りこみによる蛍光が確認された (Fig.26)。この各細胞における蛍光強度を flowcytometer により測定し、その平均を Fig.27A に示した。3 mM ATP で刺激すると、刺激約 1 分後から蛍光が確認され、つまり pore が形成され始め、時間経過と共に直線的に上昇し 10 分後にはほぼ最大に達しプラトーになった。そこで ATP 刺激 10 分後の蛍光強度の ATP 濃度依存性を調べた結果、1 mM から pore が形成され、3 mM で最大効果を示し 10 mM では減少していた。Pore の最大形成を起こす ATP 濃度 (3 mM) は、 Ca^{2+} 流入や TNF- α 遊離の最大反応を示す濃度 1 mM とはずれていることから、pore の最大形成が Ca^{2+} 流入、TNF- α 遊離に必要ではないことが示唆された (Fig.27B)。

b. アンタゴニストによる検討

ATP による pore 形成は P2X_7 を介したものなのか P2X_7 アンタゴニストの影響を検討した。その結果 P2X_7 アンタゴニスト oATP は 30 μM において 39.4 %、300 μM においては 100 % 3 mM ATP による効果を抑制したことから、pore 形成は P2X_7 を介していることが示された (Fig.28)。また PPADS、HMA も抑制効果を示した。しかしながら calmidazolium は P2X_7 の pore は抑制しない報告がされているが本研究では抑制効果を示した。さらに KN-04 も pore 形成を抑制し、逆の結果となり、各アンタゴニストの P2X_7 への抑制機構、特異性の違いを示した (Table 7)。

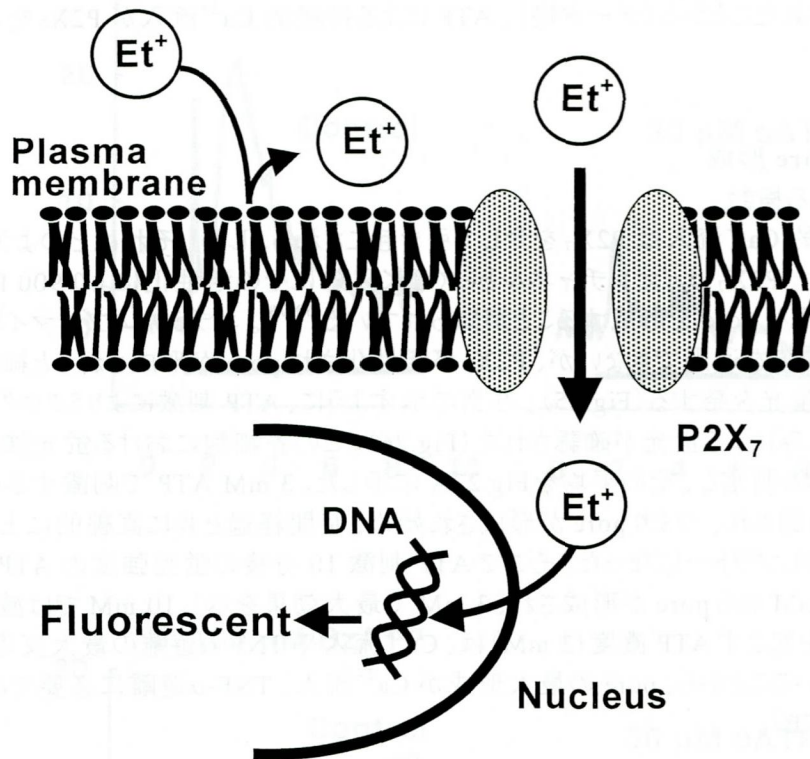


Fig.25 Mechanism of ethidium influx by extracellular ATP.

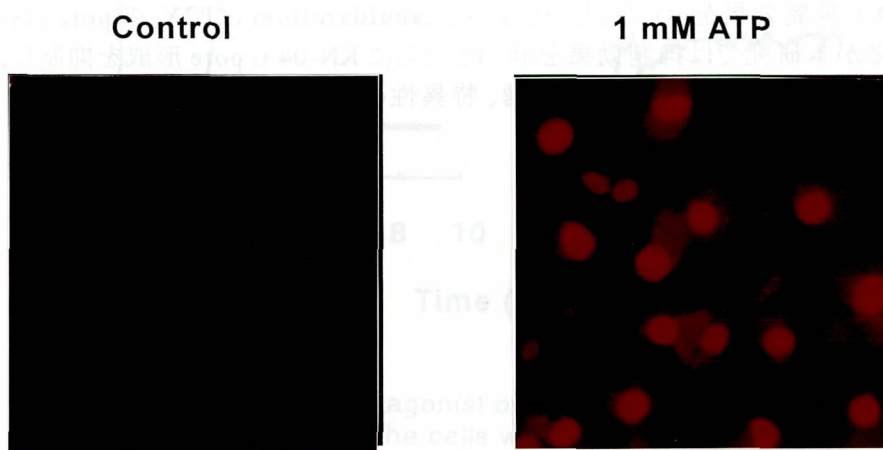


Fig.26 Ethidium influx via P2X₇ receptor. The cells were incubated with 20 μ M ethidium bromide for 30 min in the presence or absence of 1 mM ATP for 30 min.

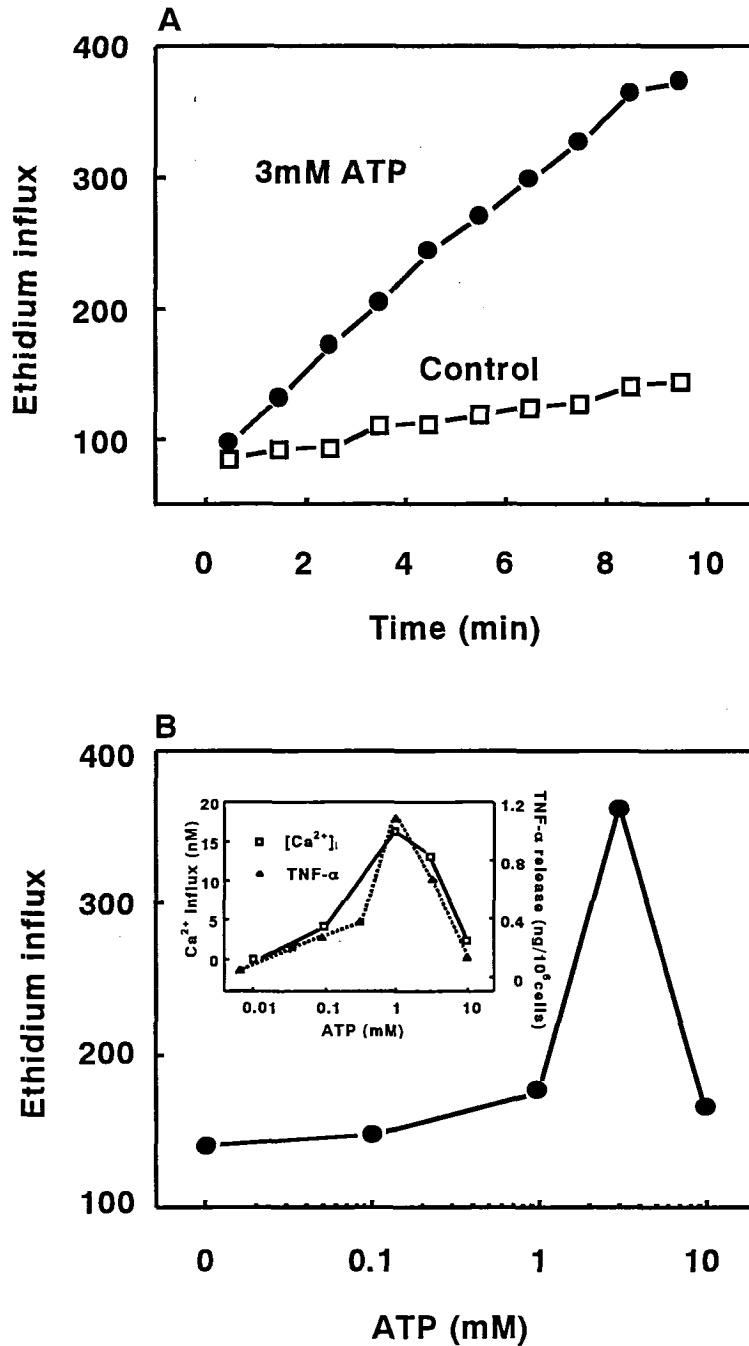


Fig.27 Effect of ATP on ethidium influx in microglia. (A) The cells were stimulated by 3 mM ATP (●) and control (□) in the presence of 20 μM ethidium bromide and measured the fluorescence by flow cytometry. (B) The concentration-response curve for ethidium influx induced by ATP. The fluorescence was measured for 10 min stimulation. Values were the means of individual cells from one experiment. Similar results were obtained at least in three sets of independent experiments. The inset shows concentration-response curve of ATP-induced TNF-α release (▲) and ATP-induced Ca²⁺ influx (□).

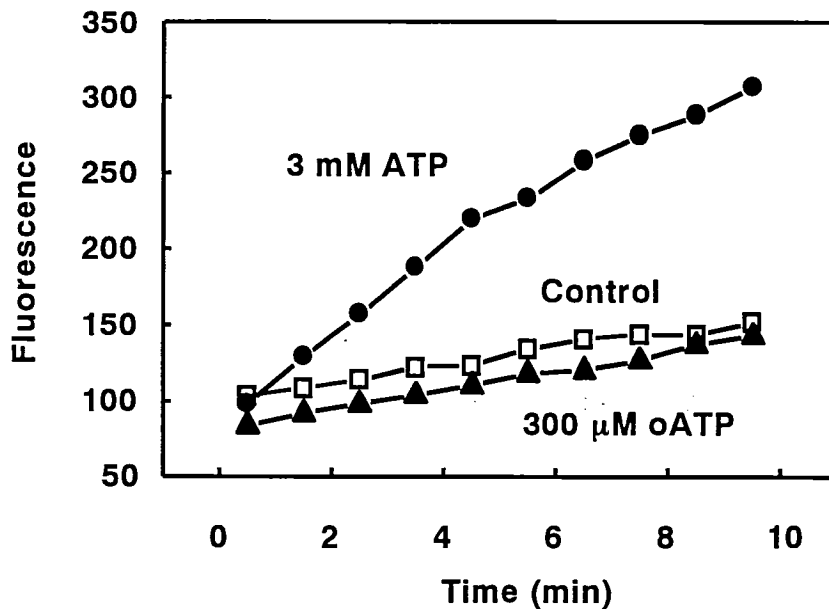


Fig.28 Effect of P2X₇ antagonist: oxidized ATP (oATP) on ATP-induced ethidium influx. The cells were pretreated with 300 μM oxidized ATP (▲) for 2 hr and stimulated with 3 mM ATP and measured the fluorescence by flow cytometry. Values were the means of individual cells from one experiment. Similar results were obtained at least in three sets of independent experiments.

Table 7 Inhibition of ATP-induced ethidium uptake by P2X₇

Additions	ATP-induced uptake (% of control)
Control	100.0
30 μM oxidized ATP	60.6 (1)
300 μM oxidized ATP	0.0 (2)
10 μM KN-04	91.7 (3)
10 μM Calmidazolium	4.5 (2)
100 μM PPADS	20.2 (2)
50 μM HMA	0.0 (1)

Effects of P2X₇ antagonists on ATP-induced ethidium uptake in rat microglia. The cells were pretreated with 30 μM oxidized ATP (oATP) for 1 hour, 300 μM oxidized ATP for 2 hours, 10 μM KN-04 for 10 min, 10 μM calmidazolium for 10 min, 100 μM PPADS for 10 min, and 50 μM HMA for 10 min, stimulated with 3 mM ATP and measured the fluorescence by flow cytometry. The fluorescence was measured at 10 min stimulation. Figures in parentheses numbers of independent experiments.

(4) 細胞外 Ca^{2+} の必要性

以上のように ATP 誘発性 TNF- α 遊離は細胞外 Ca^{2+} 流入が重要な役割を果たしている可能性が示されたことから、TNF- α 遊離の細胞外 Ca^{2+} に対する依存性を検討した。 Ca^{2+} free-DMEM を用いて ATP 刺激をすると、TNF- α 遊離が有意に抑制された。このことから ATP 誘発性 TNF- α 遊離は細胞外からの Ca^{2+} 流入に依存していることが示された (Fig.29)。しかしながら Mg^{2+} の阻害効果同様に完全には抑制されなかった。

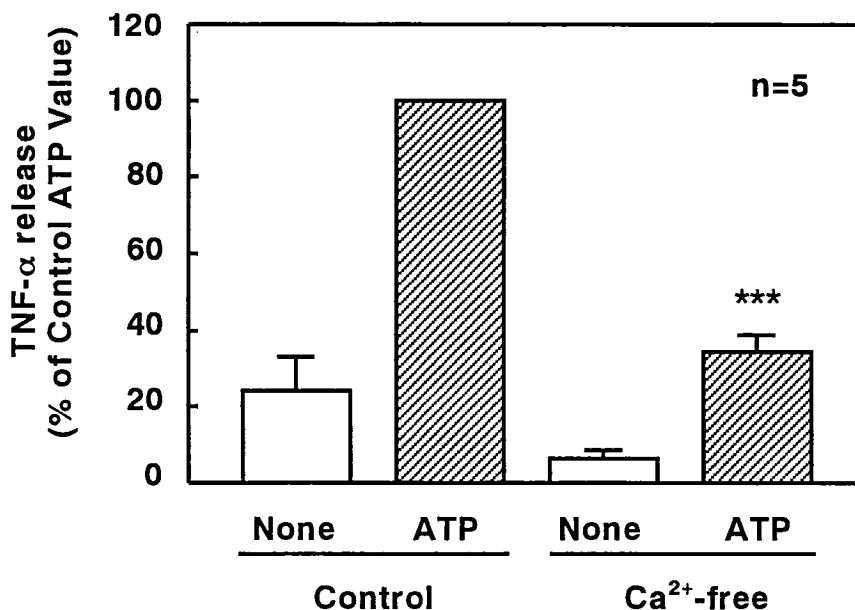


Fig.29 ATP-induced TNF- α release in the presence or absence of extracellular Ca^{2+} . The microglia cells were stimulated by 1 mM ATP in normal or Ca^{2+} -free DMEM (containing 0.5 mM EGTA) with 10 % FCS for 3 hours. Values are expressed as mean \pm SEM of percentage of release compared with Control ATP. Values for 100 % for release of TNF- α were 550.7 ± 172.0 pg/ 10^6 cells in ATP-stimulated microglia in normal DMEM. *** $p < 0.001$, significantly different from the normal ATP (t-test).

[考察]

ATP による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を fura-2 蛍光法により検討した結果、ATP の Ca^{2+} シグナルは一過性 Ca^{2+} 上昇と、持続的な Ca^{2+} 上昇に大別された。一過性 Ca^{2+} 上昇が細胞外 Ca^{2+} 非存在下においても観察されたことから、ATP により P2Y_2 が活性化し 3 量体 G 蛋白質を介して細胞内小胞体から Ca^{2+} 遊離を引き起こすことが考えられた。一方で持続的 Ca^{2+} 上昇は細胞外 Ca^{2+} 非存在下では観察されず、また BzATP でも引き起こされ、oATP 処置で抑制された。この結果から ATP が P2X_7 を活性化しイオンチャネルさらには pore 形成により細胞外から持続的 Ca^{2+} 流入を引き起こすことが示された。 P2Y_2 が引き起こす一過性 Ca^{2+} 上昇が低濃度 (10 μM) の ATP でも引き起こされたことから、 P2Y_2 は μM オーダーの ATP で活性化されることが確認された。一方、持続的 Ca^{2+} 流入が高濃度の ATP においてのみ観察されたことから、本実験においては P2X_7 が mM オーダーの ATP により活性化されることが示された。

ATP 刺激において、P2X₇を介する持続的 Ca²⁺流入と TNF-α遊離の濃度反応曲線がともに 1 mM で最大反応を示し、10 mM では減少し、類似の曲線を示した。また ATP による TNF-α遊離は細胞外 Ca²⁺に依存することが明らかになった。この結果から、P2X₇を介した持続的 Ca²⁺流入が TNF-α産生遊離において重要な役割を果たしていることが示唆された。

また ATP 誘発性 TNF-α遊離は細胞外 Ca²⁺を除去しても完全には抑制されなかった。しかし細胞外 Ca²⁺非存在下において細胞内 Ca²⁺キレート剤;BAPTA を処置すると、ATP 誘発性 TNF-α遊離が完全に抑制された(データ略)。これらのことから Mg²⁺の結果同様に、TNF-α遊離には P2X₇以外の受容体を一部介する可能性が示された。さらに P2X₇以外の経路による TNF-α遊離には細胞内 Ca²⁺遊離が重要であり、P2Y₂が関与する可能性が考えられた。

また P2X₇の pore 形成は 3 mM で最大反応が示されたが、これは P2X₇を介する Ca²⁺流入の濃度依存性とは異なっていた。1 mM ATP で形成される pore の量で十分な Ca²⁺が透過することが考えられるが、Ca²⁺が pore ではなくチャンネルから流入する可能性も考えられた。また細胞内 Ca²⁺変化、細胞膜透過性の検討から 10 mM ATP では Ca²⁺流入、pore 形成など P2X₇特異的な反応が起こらなかった。この結果から 10 mM ATP で TNF-α遊離が引き起こされないのは、前章で示した ATP による細胞死の誘導以外にも受容体の脱感作が関与することが示唆された。

P2X₇アンタゴニストについて TNF-α遊離を抑制した KN-04 は ATP による Ca²⁺流入は抑制したが pore 形成に対して抑制しなかった。これは報告されている KN-04 の P2X₇への抑制効果と異なっている⁶⁴⁾。さらに Ca²⁺流入に関しても KN-04 は高濃度でなければ抑制しないことから P2X₇への特異性が無いものと判断された。さらに calmidazolium についても P2X₇においてチャンネルのみ抑制し pore 形成については抑制しない報告がされているが⁵⁴⁾、本研究では pore 形成も抑制したため、calmidazolium についても細胞への非特異的影響が関与する可能性が考えられた。αATP、PPADS は Ca²⁺流入、pore 形成をともに抑制したが、TNF-α遊離への抑制効果は認められず、TNF-α遊離を P2X₇を介する効果として同定はできなかった。このように従来の P2X₇アンタゴニストには選択性に問題があり、ごく最近報告された P2X₇アンタゴニスト Brilliant Blue G (BBG) は P2X₇受容体研究の有用なツールとなるであろう。現在、BBG を用いて検討中である。

第2編 ATP誘発性 TNF- α 遊離における MAP キナーゼの関与

第1章 ATP誘発性 TNF- α 遊離における MAP キナーゼの関与

[緒言]

Mitogen-activated protein kinase (MAP キナーゼ) は 1980 年代後半にインスリンや細胞増殖因子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見いだされ⁷⁴⁾、細胞増殖におけるシグナル伝達に重要な役割を果たすことが明らかにされている。現在、哺乳類において extracellular signal-related kinase (ERK)、p38、jun N-terminal kinase (JNK)/stress-activated protein kinases (SAPK) の 3 種の MAP キナーゼが知られており、一連のリン酸化カスケードにより活性化され、その機能も細胞増殖のみならずストレス応答、炎症、アポトーシスなど多様性を示すことが分かっている。

ミクログリアに関しては、免疫組織染色をもちいた実験により虚血時に p38 がミクログリアにおいて強力に活性化されること、またミクログリアと類似の性質を持つモノサイト/マクロファージ系において cytokine suppressive anti-inflammatory drug (CSAID) は p38 を標的蛋白質として阻害することで IL-1、TNF- α の産生が減少することなどが報告されている^{79,80)}。これらの報告から、ミクログリアは病態時において何らかのメディエーターにより MAP キナーゼが活性化され、これがサイトカイン産生遊離を調節している可能性が考えられる。

一方 ATP はアストロサイトにおいて ERK を活性化し、この活性化は UTP でも同様に生じることから P2Y 受容体を介していることが示され (Table 5)、さらに ATP により細胞増殖が誘導されることが報告されている^{62,81)}。また P2X 受容体についても PC12 細胞において ATP が細胞外 Ca²⁺ 流入を起こすことによりチロシンキナーゼ PyK2 依存的に ERK を活性化させる⁸²⁾。これらのことからミクログリアにおいても ATP は P2X₇、P2Y₂ を介して、MAP キナーゼを活性化することが考えられ、この活性化によりサイトカイン産生を含めた細胞機能を調節している可能性が考えられる。そこで本章では ATP 誘発性 TNF- α 遊離における MAP キナーゼの関与を検討した。

[実験方法および実験材料]

この章で新たに使用した実験方法は以下の通りである。

(1) Western blotting 法による MAP キナーゼ酵素活性測定

100 mm シャーレ (2.0×10^6 cells/8 ml/dish) に培養したミクログリア細胞を DMEM 中で ATP で 5 分間刺激した。DMEM をアスピレートし氷冷下 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) 中でスクレープした後、ソニケートした。95-100°C で 5 分間熱処理し、氷冷した。サンプル中の蛋白質を SDS-polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE) で分離した後ニトロセルロース膜に転写した。一次抗体としてリン酸化 MAP kinase (ERK, p38, JNK/SAPK) もしくは全 MAP kinase (ERK, p38, JNK/SAPK) に特異的な抗体 (New England Biolabs) を用い、LumiGLO で検出した⁸³⁾。

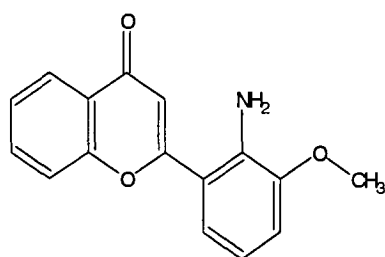


Fig.30 Structure of PD98059

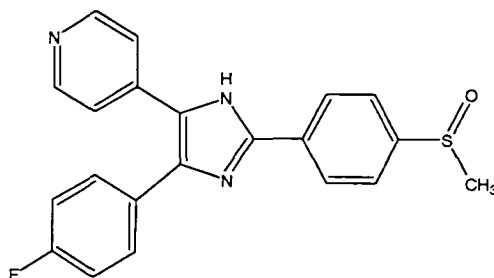


Fig.31 Structure of SB203580

[実験結果]

(1) ATP 誘発性 TNF- α 遊離に対する MAP キナーゼ阻害薬の影響

LPS 刺激によるミクログリアからの TNF- α 遊離において、ERK や p38 といった MAP キナーゼファミリーが調節制御している^{83,104}。そこで ATP 誘発性 TNF- α 遊離において MAP キナーゼが関与するか否かを確認するため、MAP キナーゼカスケードにおいて ERK の上流に位置する MEK を阻害する PD98059 ならびに p38 を阻害する SB203580 を用いて検討した^{102,103}。25 μ M PD98059 ならびに 15 μ M SB203580 処置により ATP 誘発性 TNF- α 遊離はそれぞれ 66.5 %、29.6 %に低下した。SB203580 が PD98059 よりも強く抑制したが、両者を併用すると、さらに強く抑制した (Fig.32)。これは BzATP 刺激においても同様な結果となった。また、PD98059 よりも強力な MEK 阻害薬である U0126 により ATP または BzATP による TNF- α 遊離は強く抑制された (データ省略)。これらの結果から、ATP 刺激により MAP キナーゼカスケードである p38 および ERK が活性化され、TNF- α 遊離に重要な役割を果たしている可能性が示された。

(2) ATP による MAP キナーゼ活性化

MAP キナーゼファミリー ERK、p38 ならびに JNK 活性化における ATP の効果について、リン酸化 MAP キナーゼ (活性型) 特異的抗体を用いて検討した。まず ATP 濃度依存性を検討した結果、ATP は 1 mM 以上において強く ERK、p38 ならびに JNK の活性化を引き起こした。次にそのタイムコースの検討をした。1 mM ATP で刺激すると 1 分後から急速に MAP キナーゼの活性化が引き起こされた (Fig.33)。さらに 30 分後まで活性化は上昇し、その後徐々に減少するが 60 分後においてもその活性化が確認された (データ略)。

(3) MAP キナーゼ活性化における Ca²⁺の必要性

これまでに ATP は TNF- α 遊離を引き起こし、ATP による細胞外からの Ca²⁺流入が重要であることを示してきた。さらに MAP キナーゼには Ca²⁺により活性化される経路が存在することから¹⁰⁹、ATP による MAP キナーゼ活性化における Ca²⁺の必要性について検討した。Ca²⁺キレート剤として 50 μ M BAPTA を 30 分前処置することで細胞内に取りこませ、細胞内 Ca²⁺上昇を抑制する。さらに細胞外 Ca²⁺存在下もしくは非存在下において ATP で刺激し、ERK、p38、JNK の活性化を観察した。なお細胞外 Ca²⁺非存在下においては Ca²⁺free-DMEM-10 % FCS-0.5 mM EGTA を加えた状態で用いたが、これは fura-2 蛍光法により ATP 刺激し、細胞内小胞体からの Ca²⁺遊離は起こるが、細胞外からの Ca²⁺流入が起きないことを確認した (データ略)。TNF- α 遊離は細胞外 Ca²⁺に依存していたにもかかわらず、MAP キナーゼは BAPTA 処置もしくは Ca²⁺非存在下においても

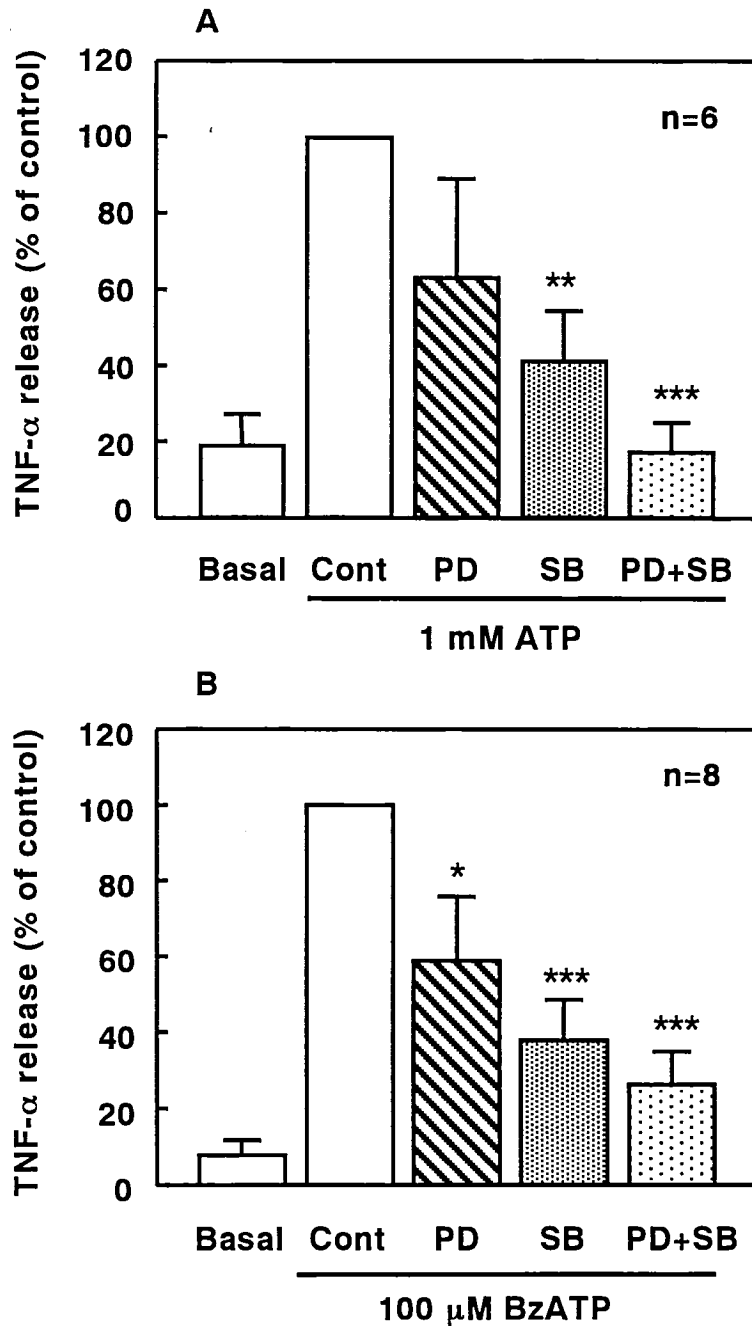


Fig.32 Effects of PD98059 and SB203580 on ATP (A) or BzATP (B)-induced TNF- α release in rat microglia. The cells were pretreated with 15 μ M PD98059 and/or 25 μ M SB203580 for 10 min and stimulated with 1 mM ATP or 100 μ M BzATP. Values are expressed as mean \pm SEM of percentage of release compared with individual controls. Values for 100 % for release of TNF- α were 279.7 \pm 167.6 and 162.4 \pm 25.1 pg/10⁶ cells in ATP- or BzATP-stimulated microglia, respectively. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, significantly different from the control (t-test).

ATPにより活性化され、Ca²⁺に依存しないことを示唆した。しかしながら Ca²⁺free の条件において BAPTA 処置をすると完全に MAP キナーゼの活性化が抑制されたことから Ca²⁺の重要性が示された (Fig.34)。以上の結果から細胞内 Ca²⁺遊離と細胞外 Ca²⁺流入の両方の経路が関与していることが示された。

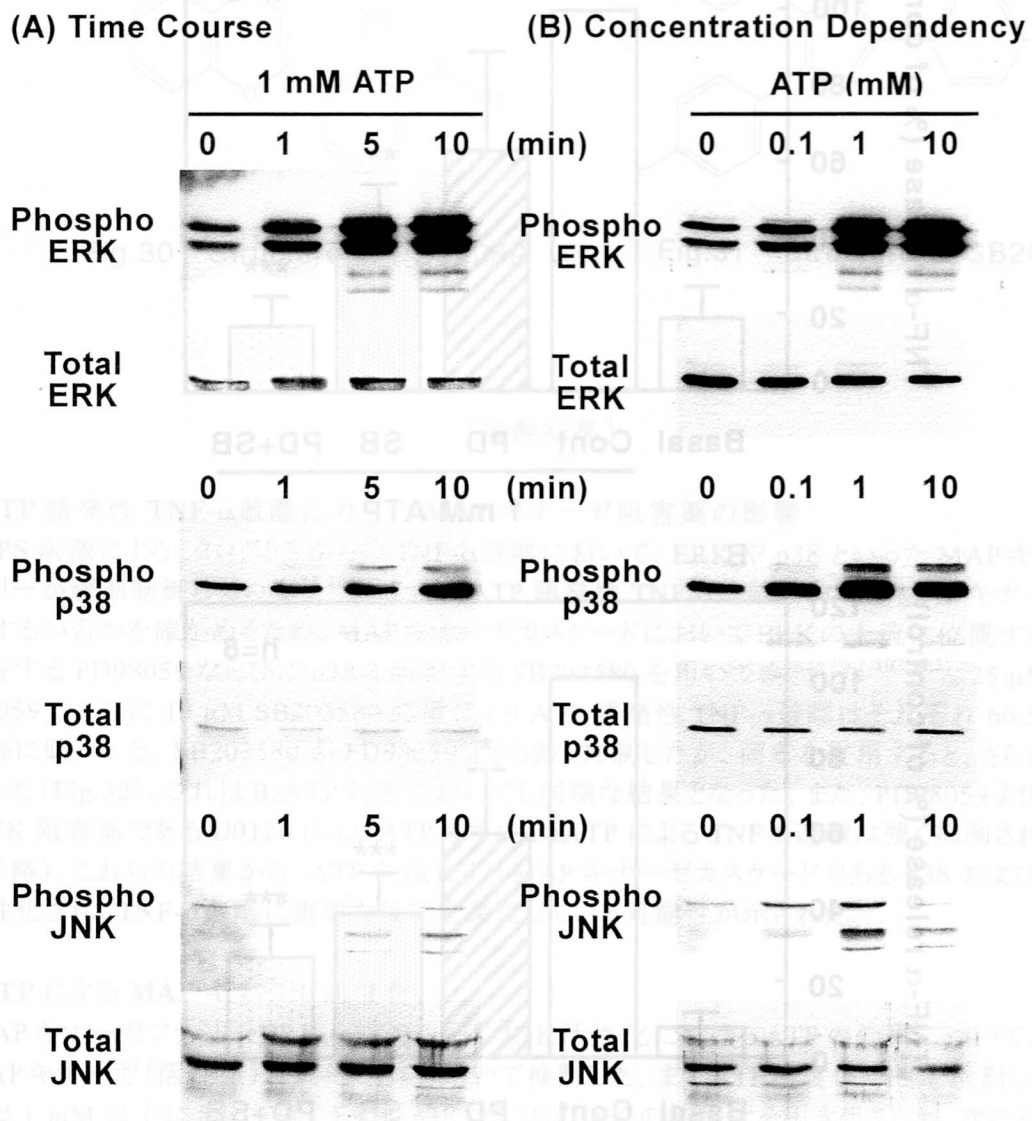


Fig.33 Activation of MAP kinase ERK, p38 and JNK in ATP-stimulated microglia. (A) Time course; (B) Concentration-dependency. The cells were stimulated with 1 mM ATP for 1, 5, 10 min and the activated ERK, p38 and JNK were detected by Western blotting using specific antibodies against phosphorylated ERK, p38 and JNK, as described in *Methods*. The levels of each total MAP kinase were confirmed to be identical for each lane by using antibodies, which recognize both activated and non-activated enzymes.

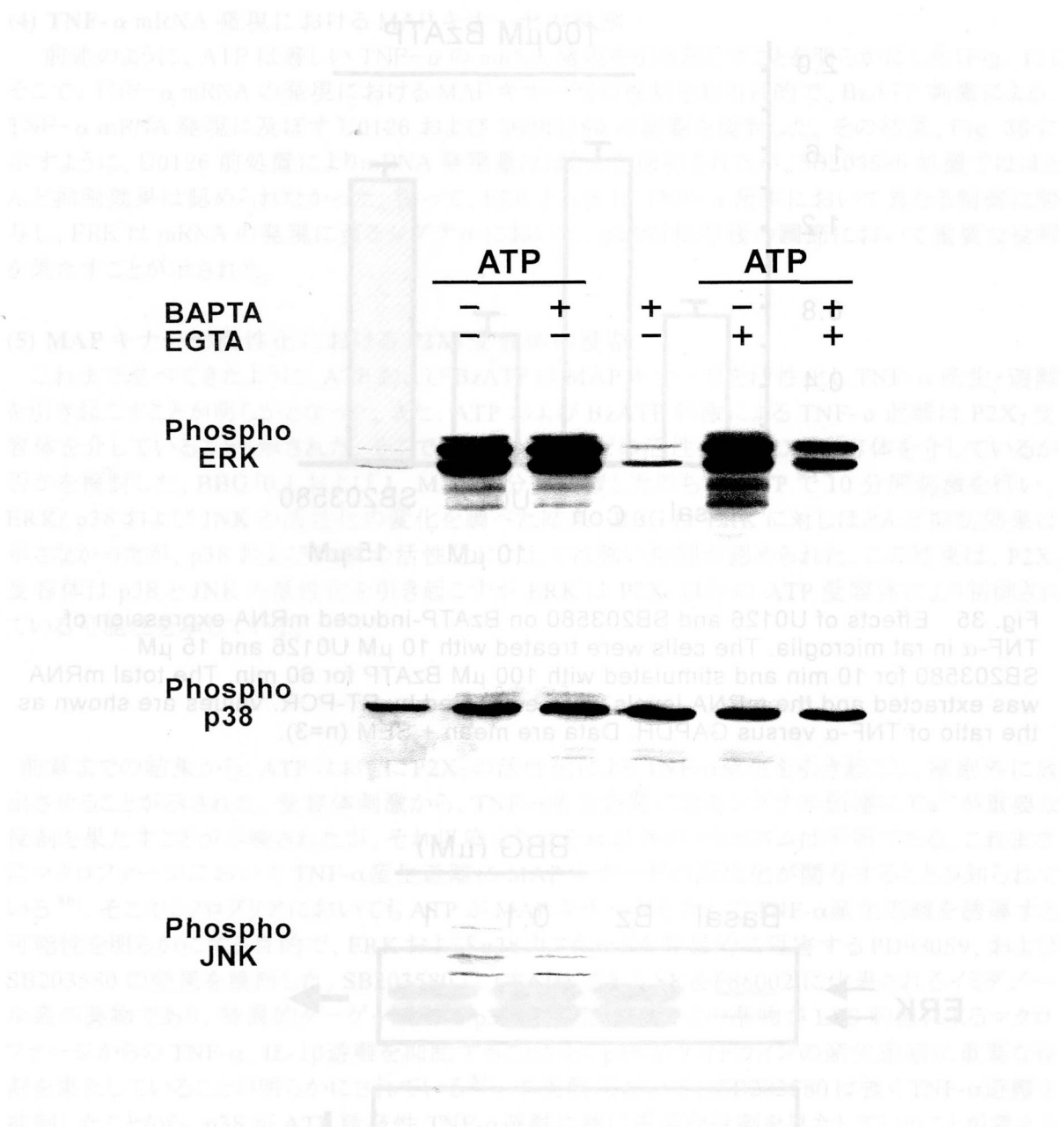


Fig.34 Effects of BAPTA and extracellular Ca^{2+} on ATP-induced activation of MAP kinase ERK, p38 and JNK. The microglia were pretreated with 50 μ M BAPTA-AM for 30 min and washed to remove excess BAPTA and stimulated by 1 mM ATP for 5 min in normal or Ca^{2+} -free DMEM. The activated ERK, p38 and JNK were detected by Western blotting using specific antibodies against phosphorylated enzymes, as described in *Methods*. The levels of each total MAP kinase were confirmed to be identical for each lane by using antibodies, which recognize both activated and non-activated enzymes.

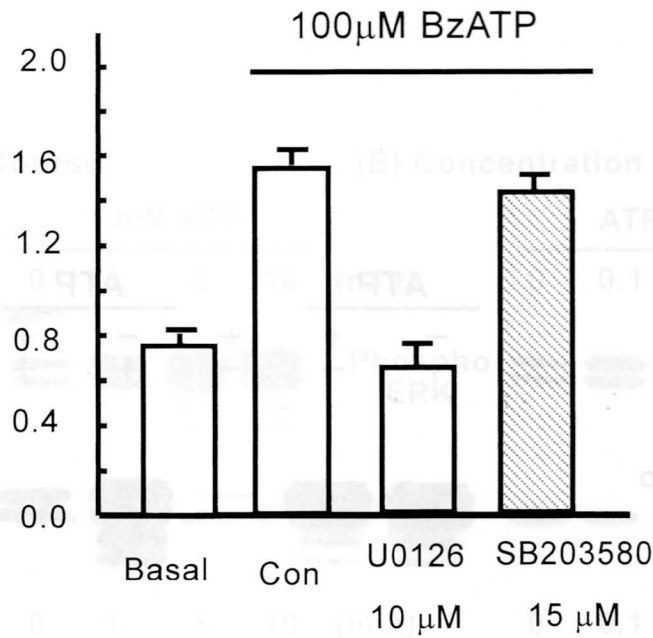


Fig. 35 Effects of U0126 and SB203580 on BzATP-induced mRNA expression of TNF- α in rat microglia. The cells were treated with 10 μ M U0126 and 15 μ M SB203580 for 10 min and stimulated with 100 μ M BzATP for 60 min. The total mRNA was extracted and the mRNA levels were estimated by RT-PCR. Values are shown as the ratio of TNF- α versus GAPDH. Data are mean + SEM (n=3).

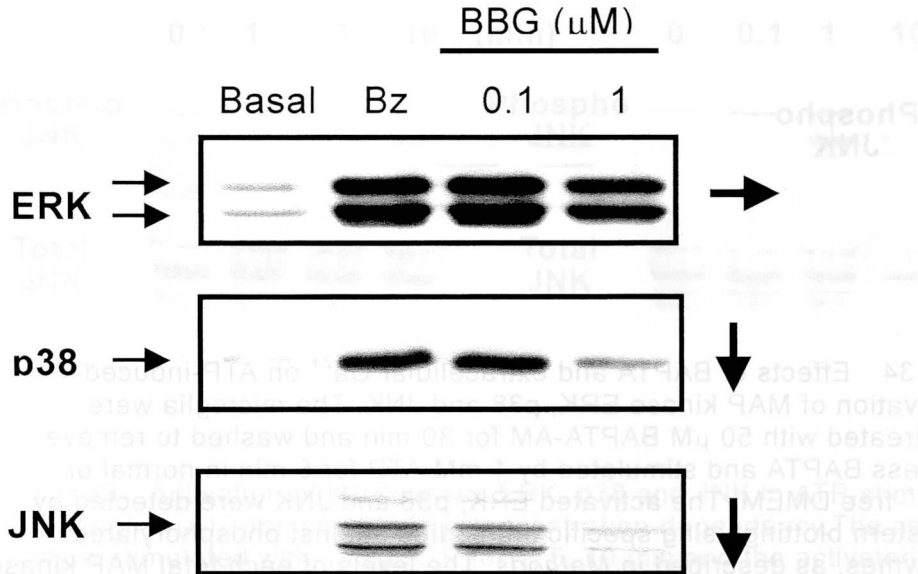


Fig. 36 Effects of Brilliant Blue G (BBG) on BzATP-induced MAP kinase activation in rat microglia. The cells were treated with 1 μ M BBG for 5 min stimulated with 100 μ M BzATP for 10 min. The activated ERK, p38 and JNK were detected by western blotting using specific antibodies against phosphorylated enzymes, as described in Methods. The levels of each total MAP kinase were confirmed to be identical for each lane by using antibodies, which recognize both activated and non-activated enzymes.

(4) TNF- α mRNA 発現における MAP キナーゼの役割

前述のように、ATP は著しい TNF- α の mRNA 発現を引き起こすことを明らかにした (Fig. 12)。そこで、TNF- α mRNA の発現における MAP キナーゼの役割を知る目的で、BzATP 刺激による TNF- α mRNA 発現に及ぼす U0126 および SB203580 の影響を検討した。その結果、Fig. 35 に示すように、U0126 前処置により mRNA 発現量はほとんど抑制されたが、SB203580 処置ではほとんど抑制効果は認められなかった。従って、ERK と p38 は TNF- α 産生において異なる制御に関与し、ERK は mRNA の発現に至るシグナルにおいて、p38 は転写後の調節において重要な役割を果たすことが示された。

(5) MAP キナーゼ活性化における P2X₇ 受容体の役割

これまで述べてきたように、ATP および BzATP は MAP キナーゼを活性化し TNF- α 産生・遊離を引き起こすことが明らかとなった。また、ATP および BzATP 刺激による TNF- α 遊離は P2X₇ 受容体を介していることも示された。そこで、MAP キナーゼの活性化が P2X₇ 受容体を介しているか否かを検討した。BBG (0.1 および 1 M) を 5 分間処置したのち BzATP で 10 分間刺激を行い、ERK、p38 および JNK の活性化の変化を調べた結果、BBG は ERK に対しほとんど抑制効果は示さなかったが、p38 および JNK の活性化に対しては強い抑制が認められた。この結果は、P2X₇ 受容体は p38 と JNK の活性化を引き起こすが ERK は P2X₇ 以外の ATP 受容体により制御されている可能性を示している。

[考察]

前章までの結果から、ATP はおもに P2X₇ の活性化により TNF- α 産生を引き起こし、細胞外に放出させることが示された。受容体刺激から、TNF- α 産生遊離に至るシグナル伝達に Ca²⁺ が重要な役割を果たすことが示唆されたが、それ以降またはそれ以外のメカニズムは不明である。これまでにマクロファージにおいて TNF- α 産生遊離に MAP キナーゼの活性化が関与することが知られている⁸⁶⁾。そこでミクログリアにおいても ATP が MAP キナーゼを介して TNF- α 産生遊離を誘導する可能性を明らかにする目的で、ERK および p38 カスケードを特異的に阻害する PD98059、および SB203580 の効果を検討した。SB203580 は CSAID である SK&F86002 に代表されるイミダゾール系の薬物であり、特異的ターゲットとして p38 が同定された。この薬物が LPS 刺激によるマクロファージからの TNF- α 、IL-1 β 遊離を抑制することから、p38 がサイトカインの産生遊離に重要な役割を果たしていることが明らかにされている⁸⁷⁾。本実験においても SB203580 は強く TNF- α 遊離を抑制したことから、p38 が ATP 誘発性 TNF- α 遊離に特に重要な役割を果たしていることが考えられた。また PD98059 に関しては SB203580 に比べると弱いながらも抑制効果が認められ、さらに両薬物の併用により顕著な抑制が認められたことから ERK の関与も示された。

実際に ATP がミクログリアにおいて MAP キナーゼを活性化することを確認するため、リン酸化 MAP キナーゼ特異的抗体を用いたイムノブロットにより検討した。その結果 ATP は顕著に ERK、p38、JNK を活性化することが明らかとなった。LPS も MAP キナーゼを活性化したが、活性化までに少なくとも 10 分間は必要であった (データ略)。それに対し ATP による MAP キナーゼの活性化は極めて速やかであり、ATP は LPS とは異なる経路で MAP キナーゼを活性化することが示された。この効果は ERK、p38、JNK いずれにおいても 1 mM の ATP で強く認められ、さらに BzATP (100 μ M) も同様に MAP キナーゼを活性化した (データ略)。これらの結果から ATP は P2X₇ を介して MAP キナーゼを活性化することが示唆された。しかし、UTP (100 μ M) によっても MAP キナーゼの活性化が観察され (データ略)、P2Y₂ を介した経路も存在することが示された。

前章において、ATP 刺激による TNF- α 遊離には Ca²⁺ が重要であることが示されたので MAP キナーゼ活性化においても Ca²⁺ が関与するか否かを検討した。EGTA 処置により細胞外 Ca²⁺ を取り

除いても ATP による MAP キナーゼの活性化は影響されなかったことから、P2X₇ を介した細胞外 Ca²⁺ 流入には依存しないと考えられた。また細胞内 Ca²⁺ 上昇を抑制する目的で 50 μM BAPTA を処置すると、MAP キナーゼ活性化に部分的な抑制が認められた。さらに BAPTA と EGTA を併用することにより MAP キナーゼの活性は完全に抑制された。このことは ATP による MAP キナーゼ活性化に細胞内 Ca²⁺ 上昇が必須であることを示している。前述したが、UTP および BzATP がそれぞれ MAP キナーゼを活性化することから、P2Y₂ および P2X₇ がそれぞれ独立して MAP キナーゼ活性化に関与すると考えられる。P2Y₂ は小胞体からの Ca²⁺ 遊離に依存して MAP キナーゼを活性化し、一方 P2X₇ は細胞外からの Ca²⁺ 流入により MAP キナーゼを活性化する。従って EGTA により細胞外 Ca²⁺ 除去した場合、P2X₇ の経路は抑制されても P2Y₂ の経路により MAP キナーゼの活性化は引き起こされる。一方 BAPTA により細胞内 Ca²⁺ をキレートした場合は、P2Y₂ の経路は遮断されても P2X₇ を介した大量の Ca²⁺ 流入により MAP キナーゼは活性化されると考えられる。そのため、ATP による MAP キナーゼ活性化を完全に抑制するためには、BAPTA と EGTA を併用することにより P2Y₂ 及び P2X₇ の両経路からの細胞内 Ca²⁺ 上昇を抑制する必要がある可能性が考えられた。

Bhat らはミクログリアにおいて PD98059 ならびに SB203580 が LPS 刺激による TNF-α 遊離を抑制するが、TNF-α mRNA 発現は抑制しないことから、ERK および p38 が TNF-α の転写後調節を行っていることを報告した⁸³⁾。しかしながら、TNF/NGF レセプターファミリーに属する抗原 CD40 活性化によるミクログリアの TNF-α 産生においては PD98059 が mRNA 発現を抑制したことから、ERK が TNF-α mRNA 転写制御に関与していることが示されている⁸⁸⁾。本研究では、MEK 阻害薬 U0126 が TNF-α mRNA 発現を強力に抑制する一方、SB203580 は TNF-α mRNA 発現には影響しなかったことから、ERK は ATP 刺激による TNF-α mRNA 発現を、p38 は mRNA 発現以降の過程を制御する可能性が示された。

ATP は ERK、p38 同様に JNK/SAPK も活性化したが、TNF-α 遊離は PD98059 と SB203580 を併用することでほぼ完全に抑制された。従って ATP 誘発性 TNF-α 遊離は主に ERK と p38 が制御し、JNK/SAPK はあまり関与していないことが考えられた。

P2X₇ は NF-AT、NF-κB を活性化することが報告され^{84,85)}、これら転写因子が TNF-α 産生に関与することが推測される。しかし、ATP 誘発性 TNF-α 遊離は FK-506 ならびにシクロスポリン C では抑制されず(データ略)、NF-AT の関与は否定された。また ATP はカスパーゼ系酵素の活性化や活性酸素種の産生を経て、NF-κB を活性化するため、発現までに 3 時間もの時間を要する。しかし ATP 誘発性 TNF-α mRNA 発現は刺激 1 時間後には顕著に上昇した。この結果から ATP による TNF-α 転写に NF-κB も関与しないと考えられた。

さらに、BzATP による ERK、p38 および JNK 活性化に及ぼす BBG の効果を検討した結果、P2X₇ 受容体は ERK ではなく少なくとも p38 を活性化し TNF-α 産生を制御することにより TNF-α 遊離を引き起こすことが示された。ERK は P2X₇ 以外の ATP 受容体により制御されているらしい。その受容体についてはまだ不明であるが、おそらく G 蛋白共役型 P2Y のサブタイプであることが推測される。この受容体の同定のためにはさらなる検討が必要である。

総括

本研究において、細胞外 ATP がラット脳ミクログリアを活性化し、TNF- α 産生・遊離を引き起こすことを見出した。さらに、そのメカニズムについて薬理的検討を行い、いくつかの知見を得た。ここでその内容を以下にまとめる。

初代培養ミクログリアにおいて ATP 刺激により顕著な TNF- α 遊離が認められ、この効果は Ca^{2+} 依存性、 Mg^{2+} 感受性、アゴニスト選択性などの性質の類似性から P2X_7 受容体を介することが示唆された。これまで P2X_7 受容体のアンタゴニストとして用いられてきた薬物は特異性が低く、TNF- α 遊離に対する抑制効果は認められなかったが、最近 P2X_7 特異的アンタゴニストとして報告された Brilliant Blue G (BBG) を用いることにより、 P2X_7 受容体の関与が示された。 P2X_7 が免疫細胞に選択的に発現していることと考え合わせると^{53,58-61)}、この受容体がミクログリアの脳免疫反応に深く関与することが推測される¹⁰¹⁾。そこで ATP による TNF- α 遊離を制御する細胞内シグナルを明らかにすることで、ATP 受容体がいかにしてミクログリアの免疫機能を制御するか検討を行なった。

まず細胞内 Ca^{2+} 濃度に対して ATP は P2Y_2 を介した細胞内 Ca^{2+} 遊離と P2X_7 による細胞外 Ca^{2+} 流入を起こした。TNF- α 遊離は細胞外 Ca^{2+} 流入に依存しているが、一部細胞内 Ca^{2+} 遊離による TNF- α 産生も認められたことから、 P2X_7 のみならず、 P2Y_2 も部分的に TNF- α 産生遊離に関与することが示された。

また、MAP キナーゼの特異的阻害薬の効果から、ATP 誘発性 TNF- α 遊離における MAP キナーゼ ERK、p38 の関与が示唆された。ATP は ERK、p38 を速やかに活性化するが、ERK は TNF- α の mRNA 発現を調節する一方、p38 は遺伝子転写以降の過程を制御する可能性が示された。また、BBG は p38 の活性化のみを抑制したことから、 P2X_7 受容体は p38 の活性化を制御し、ERK はその他の P2 受容体おそらくは P2Y サブタイプを介して制御される。

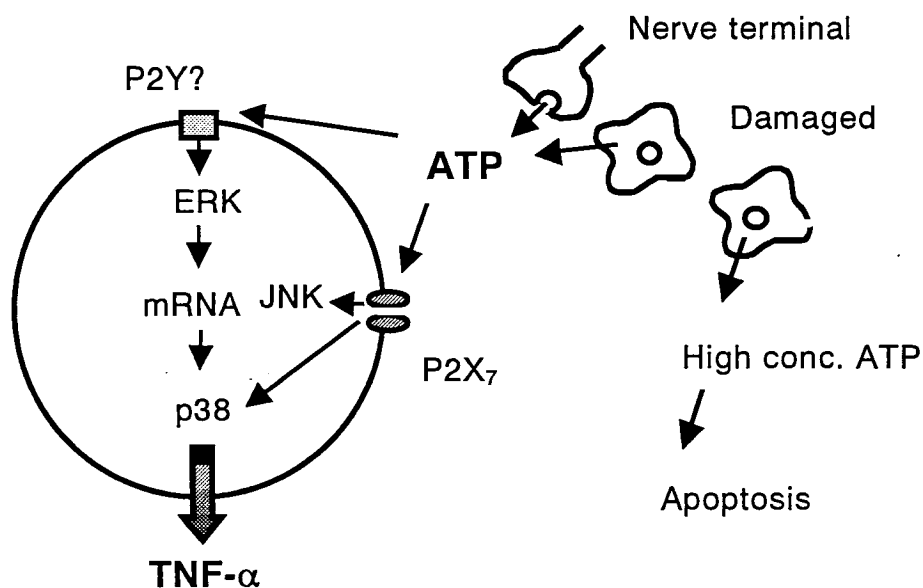


Figure. 37 Schema of regulation of TNF- α release from microglia by extracellular ATP.

脳虚血傷害、アルツハイマー病、パーキンソン病さらには自己免疫疾患に対してミクログリアの関与が示唆されているが、脳障害でのミクログリアの役割、ならびに細胞外 ATP の病態への関与については依然不明である。ミクログリアは正常時には休止化しているが、脳障害の際には速やかに活性化され、TNF- α などのサイトカインを分泌し、再生修復もしくは再生不能細胞の積極的な死を引き起こす。しかしその無秩序な活性化は脳傷害の拡大を起こすことから、その活性化を制御することで、神経変性の拡大を防止し、さらに神経に対する保護効果を発揮できる。本研究では、*in vitro*において、ミクログリアの活性化を制御するATP受容体の存在を明らかにした。またミクログリアの活性化を引き起こす LPS はミクログリアから ATP を遊離させる⁴³⁾。この遊離された ATP がオートクライン/パラクラインにシグナル伝達した結果、NF- κ B 活性化さらに NO 産生を引き起こすことが明らかにされていることから、細胞外 ATP がミクログリアの活性化因子であることが示されている^{105,106)}。現在までに ATP は P2X₇ 活性化を介して‘LPS’により初期活性化された’ミクログリアから IL-1 β 、さらに繊維芽細胞から IL-6 の遊離を引き起こすことが報告されている^{96,97)}。このうち、IL-1 β 遊離は LPS 刺激により細胞内に蓄積された proIL-1 β が、P2X₇を介して活性化された IL-1 β converting enzyme (ICE) によりプロセッシングされることにより惹起する。これとは異なり、TNF- α は ATP 単独の刺激で産生遊離されるため、BBB の破綻などのない生理状態においても効果を発揮できる。

またアデノシンはマクロファージにおいて A₃ 受容体を活性化して、LPS による TNF- α mRNA 発現を特異的に抑制する⁹⁸⁾。またミクログリアにおいても A₁、A_{2A}、A₃ アデノシン受容体の発現が確認されている⁹⁹⁾。このため ATP 誘発性 TNF- α 遊離に対しても ATP の代謝物であるアデノシンが過剰な産生に対して抑制的に働いている可能性が考えられる。また本研究でも示したように、TNF- α 遊離を誘導する P2X₇ の過剰な活性化はミクログリアの細胞死を誘導することにより過剰なサイトカイン遊離を抑制している。このように ATP 誘発性 TNF- α 遊離は厳密に制御されるため無秩序な産生による細胞毒性が低く、標的細胞に発現する TNF 受容体を介してより選択性の高い神経保護効果が期待される。さらに細胞外 ATP がミクログリアにおいて P2X₇ を介してこれらのサイトカイン以外にもプラスミノージェンを遊離させ、神経保護に関与する報告もあることから⁷⁵⁾、ATP の神経保護への関与に強く関心が寄せられる。

一方、P2X₇ の発現は環境に応じて変化することが報告されている。例えば単球を用いた実験で TNF- α 処置により P2X₇ の発現が増強し、P2Y₂ 発現が減少した¹⁰⁰⁾。この結果は正常時には P2Y₂ が有意に機能するが、病態などの非常時には P2X₇ の発現量が TNF- α により上昇され、TNF- α をはじめ IL-1 β 、IL-6 などを遊離させ、免疫反応を増強する可能性を示している。

以上述べてきたように、ATP 受容体 (P2X₇) 作動薬の開発は、正常時にはその受容体発現が低いため副作用が低く、脳において P2X₇ は主にミクログリアに発現していることから選択性の高い効果が予想される。さらに ATP による TNF- α 産生はアデノシンによる抑制、細胞死の誘導、シグナル制御などにより過剰産生を防ぐ機構が存在し、安全性が期待される。現在 TNF- α の神経保護作用、神経毒性、さらに ATP についてもそのシグナル伝達さらには代謝物も含めた作用が明確に理解されていないが、本研究により今後これらの研究が進展し、脳におけるサイトカイン遊離を制御する ATP 受容体をターゲットとした新しい治療薬の開発が期待される。

引用文献

- 1) Stanimirovic, D.B., Ball, R. & Small, D. L. (1999) Developmental regulation of glutamate transporters and glutamine synthetase activity in astrocyte cultures differentiated in vitro. *Int. J. Dev. Neurosci.* **17**, 173-184.
- 2) McLaurin, J.A. & Yong, V.W. (1995) Oligodendrocytes and myelin. *Neurol. Clin.* **13**, 23-49.
- 3) Hickey, W.F. & Kimura, H. (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow derived and pre-set antigen in vivo. *Science* **239**, 290-292.
- 4) Sawada, M., Suzumura, A. & Marunouchi, T. (1995) Cytokine network in the central nervous system and its roles in growth and differentiation of glial and neuronal cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* **13**, 253-264.
- 5) Del Rio-Hortega, P. (1919) E1 tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglia en estado normal. II. Intervencion de la microglia en los procesos patologicos. III. Naturaleza probable de la microglia. *Boll. Societed Esp. biol.* **9**, 69-120.
- 6) Kreutzberg, G.W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* **19**, 312-318.
- 7) Zielasek, J. & Hartung, H.P. (1996) Molecular mechanisms of microglial activation. *Adv. Neuroimmunol.* **6**, 191-222.
- 8) Nakajima, K. & Kohsaka, S. (1993) Functional roles of microglia in the brain. *Neurosci. Res.* **17**, 187-203.
- 9) Perry, V. & Gordon, S. (1991) Macrophages and the nervous system. *Int. Rev. Cytol.* **125**, 203-244.
- 10) Nakajima, K., Nagata, K. & Kohsaka, S. (1994) Pasminogen mediates an interaction between microglia and dopaminergic neurons. *Eur. Neurol.* **343**, 10-16.
- 11) Mallat, M., Houlgatte, R., Brachet, P. & Prochiantz, A. (1989) Lipopolysaccharide-stimulated rat brain macrophages release NGF in vitro. *Dev. Biol.* **113**, 309-311.
- 12) Koike, T. (1998) Brain aging and microglia: possible functions of a microglial gene that responds to neuronal cell death. *Molecular Medicine* **35**, 644-652.
- 13) Shimojo, M., Nakajima, K., Takei, N., Hamanoue, M. & Kohsaka, S. (1991) Production of basic fibroblast growth factor in cultured brain microglia. *Neurosci. Lett.* **123**, 229-231.
- 14) Ii, M., Sunamoto, M., Ohnishi, K. & Ichimori, Y. (1996) β -amyloid protein-dependent nitric oxide production from microglial cells and neurotoxicity. *Brain Res.* **720**, 93-100.
- 15) Steven, W.B. & Ashley D.H. (1997) Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulated by apolipoprotein E. *Nature* **388**, 878-881.
- 16) McGeer, P.L. & McGeer, E.G. (1996) Anti-inflammatory drugs in the fight against Alzheimer's disease. *Ann. NY Acad. Sci.* **777**, 213-220.
- 17) Mackenzie, I.R. & Munoz, D.G. (1998) Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer-type pathology in aging. *Neurology* **50**, 986-990.
- 18) McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E. & McGeer, E.G. (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brain. *Neurology* **38**, 1285-1291.
- 19) Kitamura, Y., Itano, Y., Kubo, T. & Namura, Y. (1994) Suppressive effect of FK-506, a novel immunosuppressant, against MPTP-induced dopamine depletion in the striatum of young C57B1/6 mice. *Neuroimmunol.* **50**, 221-224.
- 20) 中島 一行, 高坂 新一 (1991) ミクログリア 蛋白質核酸酵素 **36**, 1576-1577.
- 21) 山崎 正利 (1995) TNF- α 臨床免疫 **27**, 259-268.
- 22) Barone, F.C., Arvin, B., White, R.F., Miller, A., Webb, M.D., Willette, R.N., Lysko, P.G. & Feuerstein, G.Z. (1997) Tumor necrosis factor- α ; A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* **28**, 1233-1244.
- 23) Lavine, S.D., Hofman, F.M. & Zlokovic, B.V. (1998) Circulating antibody against tumor necrosis factor -alpha protects rat brain from reperfusion injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **18**, 52-58.
- 24) Cheng, B., Christakos, S. & Mattson, M.P. (1994) Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* **12**, 139-153.

- 25) Barger, S.W., Horothee, D., Furukawa, K., Goodman, Y., Krieglstein, J. & Mattson, M.P. (1995) Tumor necrosis factors α and β protect neurons against amyloid β -peptide toxicity; Evidence for involvement of a κ B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca^{2+} accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9328-9332.
- 26) Nawashiro, H., Tasaki, K., Ruetzler, C.A. & Hallenbeck, J.M. (1997) TNF- α pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **17**, 483-490.
- 27) Gary, D.S., Bruce-Keller, A.J., Kindy, M.S. & Mattson, M.P. (1998) Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **18**, 1283-1287.
- 28) Merrill, J.E. & Benveniste, E.N. (1996) Cytokines in inflammatory brain lesions; helpful and harmful. *Trends Neurosci.* **19**, 331-338.
- 29) Chao, C.C. & Hu, S. (1994) Tumor necrosis factor-alpha potentiates glutamate neurotoxicity in human fetal brain cell cultures. *Dev. Neurosci.* **16**, 172-179.
- 30) Bruce, A.J., Boling, W., Kindy, M.S., Peschon, J., Kraemer, P.J., Carpenter, M.K., Holtsberg, F.W. & Mattson, M.P. (1996) Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nature Med.* **2**, 788-794.
- 31) Burnstock, G. (1971) Neural nomenclature. *Nature* **229**, 282-283.
- 32) Edwards, F.A., Gibb, A.J. & Colquhoun D. (1992) ATP receptor-mediated synaptic current in the central nervous system. *Nature* **359**, 145-147.
- 33) Inoue, K., Nakazawa, K., Fujimori, K., Watano, W. & Takanaka, A. (1992) Extracellular adenosine 5'-triphosphate-evoked glutamate release in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* **134**, 215-218.
- 34) Webb, T.E., Simon, J., Krishek, B.J., Bateson, A.N., Smart, T.G., King, B.F., Burnstock G. & Barnard, E.A. (1993) Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett.* **324**, 219-225.
- 35) Zimmermann, H. (1994) Signaling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci.* **17**, 420-426.
- 36) Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R.A. & Buell, G. (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified ATP as a P2X receptor (P2X₇). *Science* **272**, 735-738.
- 37) Okajima, F., Tokumitsu, Y., Kondo, Y. & Ui M. (1987) P2-purinergetic receptors are coupled to two signal transduction systems leading to inhibition of cAMP generation and to production of inositol triphosphate in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **262**, 13483-13490.
- 38) 井上 和秀 (1998) ATP 受容体 *生体の科学* **49**, 326-328.
- 39) Gordon, J.L. (1986) Extracellular ATP; effects, sources and fate. *Biochem. J.* **233**, 309-319.
- 40) Dubyak, G.R. & El-Moatassim, C. (1993) Signal transductions via P2-purinergetic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am. J. Physiol.* **265**, C577-606.
- 41) Norenberg, W., Langosch, J.M., Gebucke-Haerter, P.J. & Illes, P. (1994) Characterization and possible function of adenosine 5'-triphosphate receptors in activated rat microglia. *Br. J. Pharmacol.* **111**, 942-950.
- 42) Norenberg, W., Cordes, A., Blohbaum, G., Frohlich, R. & Illes, P. (1997) Coexistence of purino- and pyrimidinoceptors on activated rat microglial cells. *Br. J. Pharm.* **121**, 1087-1098.
- 43) Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Hanau, S. & Di Virgilio, F. (1997) Purinergetic modulation of interleukin-1 β from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J. Exp. Med.* **185**, 579-582.
- 44) 花岡 正男, 玉置 憲一 (1993) *免疫細胞 分光堂*.
- 45) Sanghera, J.S., Weinstein, S.L., Aluwalia, M., Girn, J. & Pelech, S.L. (1996) Activation of multiple proline-directed kinases by bacterial lipopolysaccharide in murine macrophages. *J. Immunol.* **156**, 4457-4465.
- 46) Nakajima, K., Hamanoue, M., Shimojo, M., Takei, N. & Kohsaka, S. (1989) Characterization of microglia isolated from a primary culture of embryonic rat brain by a simplified method. *Biomed. Res.* **10**(S3), 411-423.
- 47) Kirikae, T., Tamura, H., Hashizume, M., Kirikae, F., Uemura, Y., Tanaka, S., Yokochi, T. & Nakano, M. (1997) Endotoxin contamination in fetal bovine serum and its influence on tumor necrosis factor production by macrophage-like cells J774.1 cultured in the presence of the serum. *Int. J. Immunopharmac.* **19**, 255-262.

- 48) Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1992) Role of protein kinase C activity in tumor necrosis factor- α gene expression: Involvement at the transcriptional level. *J. Immunol.* **149**, 3894-3902.
- 49) Chung, I.Y., Kwon, Y. & Benveniste, E.N. (1992) Role of protein kinase C activity in tumor necrosis factor- α gene expression; Involvement at the transcriptional level. *J. Immunol.* **149**, 3894-3902.
- 50) Inoue, A., Seto, M., Sugita, S., Hide, I., Hirose, T., Koga, N., Kikuchi, T. & Nakata, Y. (1997) Aripiparazole, a novel antipsychotic drug, inhibits quinpirole-evoked GTPase activity but not up-regulate dopamine D2 receptor following repeated treatment in rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.* **321**, 105-111.
- 51) Jack, R.S., Fan, X., Bernheiden, M., Rune, G., Ehlers, M., Weber, A., Kirsch, G., Mentel, R., Furll, B., Freudenberg, M., Schmitz, G., Stelter, F. & Schutt, C. (1997) Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine Gram-negative bacterial infection. *Nature* **389**, 742-745.
- 52) Sweet, M.J. & Hume, D.A. (1996) Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 8-26.
- 53) Ferrari, D., Villalba, M., Chiozzi, P., Falzoni, S., Ricciardi-Castagnoli, P. & Di Virgilio, F. (1996) Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. *J. Immunol.* **156**, 1531-1539.
- 54) Virginio, C., Church, D., North, A.D. & Surprenant, A. (1997) Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X₇ receptor. *Neuropharmacol.* **36**, 1285-1294.
- 55) Steinberg, T.H. & Silverstein, S.C. (1987) Extracellular ATP⁴⁻ promotes cation fluxes in the J774 mouse macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* **262**, 3118-3122.
- 56) Song, S.L. & Chueh, S.H. (1996) Antagonistic effect of Na⁺ and Mg²⁺ on P2Z purinoceptor-associated pores in dibutyryl cyclic AMP-differentiated NG108-15 cells. *J. Neurochem.* **67**, 1694-1701.
- 57) Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Susino, M.D., Collo, G., Buell, G. & Di Virgilio, F. (1997) ATP-mediated cytotoxicity in microglial cells. *Neuropharmacol.* **36**, 1295-1301.
- 58) Cockcroft, S. & Gomperts, B.D. (1979) ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells. *Nature* **279**, 541-542.
- 59) Steinberg, T.H., Newman, A.S., Swanson, J.A. & Silverstein, S.C. (1987) ATP⁴⁻ permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophage to fluorescent dyes. *J. Biol. Chem.* **262**, 8884-8888.
- 60) Markwardt, F., Lohn, M., Bohm, T. & Klapperstuck, M. (1997) Purinoceptor-operated cationic channels in human B lymphocytes. *J. Physiol.* **498**, 143-151.
- 61) Ballerini, P., Rathbone, M.P., Di Iorio, P., Renzetti, A., Giuliani, P., D'Alimonte, I., Trubiani, O., Caciagli, F. & Ciccarelli, R. (1996) Rat astroglial P2Z(P2X₇) receptors regulate intracellular calcium and purine release. *Neuro. Report* **7**, 2533-2537.
- 62) Neary, J.T., Kang, Y., Bu, Y., Yu, E., Akong, K. & Peters, C.M. (1999) Mitogenic signaling by ATP/P2Y purinergic receptors in astrocytes: Involvement of a calcium-independent protein kinase C, extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway. *J. Neurosci.* **19**, 4211-4220.
- 63) Murgia, M., Hanau, S., Pizzo, P., Rippa, M. & Di Virgilio, F. (1993) Oxidized ATP: An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 8199-8203.
- 64) Gargett, E.C. & Wiley, S.J. (1997) The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. *Br. J. Pharmacol.* **120**, 1483-1490.
- 65) Chessell, P.I., Michel, D.A. & Humphrey, A.P.P. (1998) Effects of antagonists at the human recombinant P2X₇ receptor. *Br. J. Pharmacol.* **124**, 1314-1320.
- 66) Falzoni, S., Munerati, M., Ferrari, D., Spasani, S. & Moretti, S. (1995) The purinergic P_{2Z} receptor of human macrophage cells: characterization and possible physiological role. *J. Clin. Invest.* **95**, 1207-1216.
- 67) Gargett, C.E., Cornish, J.E. & Wiley, J.S. (1997) ATP, a partial agonist for the P2Z receptor of human lymphocytes. *Br. J. Pharm.* **122**, 911-917.
- 68) Humphreys, B.D., Virginio, C., Surprenant, A., Rice, J. & Dubyak, G.R. (1998) Isoquinolines as antagonists of the P2X₇ nucleotide receptor; High selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Mol. Pharmacol.* **54**, 22-32.

- 69) Rassendren, F., Buell, G.N., Virginio, C., Collo, G., North, R.A. & Surprenant, A. (1997) The permeabilizing ATP receptor, P2X₇. *J. Biol. Chem.* **272**, 5482-5486.
- 70) Ebashi, S. (1976) Excitation-contraction coupling. *Annu. Rev. Physiol.* **38**, 293-313.
- 71) Kakiuchi, S. & Yamazaki, R. (1970) Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **41**, 1104-1110.
- 72) Putney, J.W.Jr. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**, 1-12.
- 73) Randriamampita, C. & Tsien, R.Y. (1993) Emptying of intracellular Ca²⁺ stores release a novel small messenger that stimulation Ca²⁺ influx. *Nature* **364**, 809-814.
- 74) Hide, I., Toriu, N., Nuiabe, T., Inoue, A., Hide, M., Yamamoto, S. & Nakata, Y. (1997) Suppression of TNF- α secretion by azelastine in a rat mast (RBL-2H3) cell line. *J. Immunol.* **159**, 2932-2940.
- 75) Inoue, K., Nakijima, K., Morimoto, T., Kikuchi, Y., Koizumi, S., Illes, P. & Kohsaka, S. (1998) ATP stimulation of Ca²⁺-dependent plasminogen release from cultured microglia. *Br. J. Pharm.* **123**, 1304-1310.
- 76) Gargett, C.E. & Wiley, J.S. (1997) The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. *Br. J. Pharm.* **120**, 1483-1490.
- 77) Gargett, C.E., Cornish, J.E. & Wiley, J.S. (1997) ATP, a partial agonist for the P2Z receptor of human lymphocytes. *Br. J. Pharm.* **122**, 911-917.
- 78) Chiozzi, P., Murgia, M., Falzoni, S., Ferrari, D., Di Virgilio, F. (1996) Role of the P2Z receptor in Spontaneous cell death in J774 macrophage culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**, 176-181.
- 79) Walton, K.M., DiRocco, R., Bartlett, B.A., Koury, E., Marcy, V.R., Jarvis, B., Schaefer, E.M. & Bhat, R.V. (1998) Activation of p38^{MAPK} in microglia after ischemia. *J. Neurochem.* **70**, 1764-1767.
- 80) Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., Stickler, J.E., Mclaughlin, M.M., Siemens, I.R., Fisher, S.M., Livi, G.P., Adams, J.L. & Y oung, P.R. (1994) A protein kinase involving in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**, 739-746.
- 81) Munsch, N., Gavaret, J.M. & Pierre M. (1998) Ca²⁺ dependent purinergic regulation of p42 and p44 MAP kinases in astroglial cultured cells. *Biomed. Pharmacother.* **52**, 180-186.
- 82) Swanson, K.D., Reigh, C. & Landreth, G.E. (1998) ATP-stimulated activation of the mitogen-activated protein kinases through ionotropic P2X₂ purinoreceptors in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 19965-19971.
- 83) Bhat, N R., Zhang, P., Lee, J.C. & Hogan, E.L. (1998) Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J. Neurosci.* **18**, 1633-1641.
- 84) Ferrari, D., Wesselborg, S., Bauer, M.K.A. & Schulze-Osthoff, K. (1997) Extracellular ATP activates transcription factor NF- κ B through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF- κ B p65 (RelA). *J. Cell Biol.* **139**, 1635-1643.
- 85) Ferrari, D., Stroh, C. & Schulze-Osthoff, K. (1999) P2X₇/P2Z purinoreceptor-mediated activation of transcription factor NFAT in microglial cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 13205-13210.
- 86) Hambleton, J., McMahon, M. & DeFranco, A.L. (1995) Activation of Raf-1 mitogen-activated protein kinase in murine macrophages partially mimics lipopolysaccharide-induced signaling events. *J. Exp. Med.* **182**, 147-154.
- 87) Lee, J.C. & Yung, R.R. (1996) Role of CSBP/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 152-157.
- 88) Tan, J., Town, T., Saxe, M., Paris, D., Wu, Y. & Mullan, M. (1999) Ligation of microglial CD40 results in p44/42 mitogen-activated protein kinase-dependent TNF- α production that is opposed by TGF- β 1 and IL10. *J. Immunol.* **163**, 6614-6621.
- 89) 野澤義則 (1995) 細胞工学 **14**, 1255.
- 90) Humphreys, B.D. & Dubyak, G.R. (1996) Induction of P2Z/P2X₇ nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and IFN- γ in the human THP-1 monocytic cell line. *J. Immunol.* **157**, 5627-5637.
- 91) Alzola, E., Perez-Etxabarria, A., Kabre, E., Fogarty, D.J., Metioui, M., Chaib, N., Macarulla, J.M., Matute, C., Dehaye, J.P. & Marino, A. (1998) Activation by P2X₇ agonists of two

- phospholipases A₂(PLA₂) in ductal cells of rat submandibular gland. *J. Biol. Chem.* **273**, 30208-30217.
- 92) Chen, W.C. & Chen, C.C. (1998) ATP-induced arachidonic acid release in cultured astrocytes is mediated by Gi protein coupled P2Y1 and P2Y2 receptors. *Glia*. **22**, 360-370.
 - 93) Gargett, C.E., Cornish, E.J. & Wiley, J.S. (1996) *Biochem. J.* **313**, 529-535.
 - 94) Visentin, S., Renzi, M., Frank, C., Greco, A. & Levi, G. (1999) Two different ionotropic receptors are activated by ATP in rat microglia. *J. Physiol.* **519**, 723-736.
 - 95) Gao, Z., Chen, T., Weber, M.J. & Linden, J. (1999) A2B adenosine and P2Y2 receptors stimulate mitogen-activated protein kinase in human embryonic kidney-293 cells. Cross-talk between cyclic AMP and protein kinase C pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 5972-5980.
 - 96) Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Hanau, S. & Di Virgilio, F. (1997) Purinergic modulation of interleukin-1 β release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J. Exp. Med.* **3**, 579-582.
 - 97) Solini, A., Chiozzi, P., Morelli, A., Fellin, R. & Di Virgilio, F. (1999) Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X₇ receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release. *J. Cell Sci.* **112**, 297-305.
 - 98) Sajjadi, F.G., Takabayashi, K., Foster, A.C., Domingo, R.C. & Firestein, G.S. (1996) Inhibition of TNF- α Expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors. *J. Immunol.* **156**, 3435-3442.
 - 99) Fiebich, B.L., Biber, K., Lieb, K., Calkner, D., Berger, M., Bauer, J. & Gebicke-Haerter, P.J. (1996) Cyclooxygenase-2 expression in rat microglia is induced by adenosine A_{2a}-receptors. *Glia* **18**, 152-160.
 - 100) Humphreys, B.D. & Dubyak, G.R. (1998) Modulation of P2X₇ nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **64**, 265-273.
 - 101) Sanz, J.M., Chiozzi, P. & Di Virgilio, F. (1998) Tenidap enhances P2Z/P2X₇ receptor signaling in macrophages. *Eur. J. Pharm.* **355**, 235-244.
 - 102) Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T. & Saltiel, A.R. (1995) PD098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **270**, 27489-27494.
 - 103) Dudley, D.T., Pang, L., Decker, S.J., Bridges, A.J. & Saltiel, A.R. (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7686-7689.
 - 104) Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., Strickler, J.E., McLaughlin, M.M., Siemens, I.R., Fisher, S.M., Livi, G.P., White, J.R., Adams, J.L. & Young, P.R. (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**, 739-746.
 - 105) Hu, Y., Fiset, P.L., Denlinger, L.C., Guadarrama, A.G., Sommer, J.A., Proctor, R.A. & Bertics, P.J. (1998) Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophage. *J. Biol. Chem.* **273**, 27170-27175.
 - 106) Sikora, A., Liu, J., Brosnan, C., Buell, G., Chessel, I. & Bloom, B.R. (1999) Purinergic signaling regulation radical-mediated bacterial killing mechanisms in macrophages through a P2X₇-independent mechanism. *J. Immunol.* **163**, 558-561.
 - 107) Lammas, D.A., Stober, C., Harvey, C.J., Kendrick, N., Panchalingam, S. & Kumararatne, D.S. (1997) ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z/P2X₇ receptors. *Immunity* **7**, 433-444.
 - 108) Molloy, A., Loachunmroonvorapong, P. & Klaplan G. (1994) Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerun. *J. Exp. Med.* **180**, 1499-1509.
 - 109) Finkbeiner, S. & Greenberg, M.E. (1996) Ca²⁺-dependent routes to ras: mechanisms for neuronal survival, differentiation, and plasticity? *Neuron* **16**, 233-236.
 - 110) Poltorak, A., He, H., Smirnova, I., Liu, M.Y., Huffel, C.V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Gaianos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. & Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice; mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088.
 - 111) Jiang, L.H., Mackenzie, A.B., North, R.A. and Surprenant, A. (2000) Brilliant Blue G selectively blocks ATP-gated P2X₇ receptors. *Mol. Pharmacol.* **58**, 82-8.