



ATPを介したニューロン・ミクログリア相互作用の分子基盤 組織内ミクログリアの可視化とミクログリア遊走能調節機構の解析

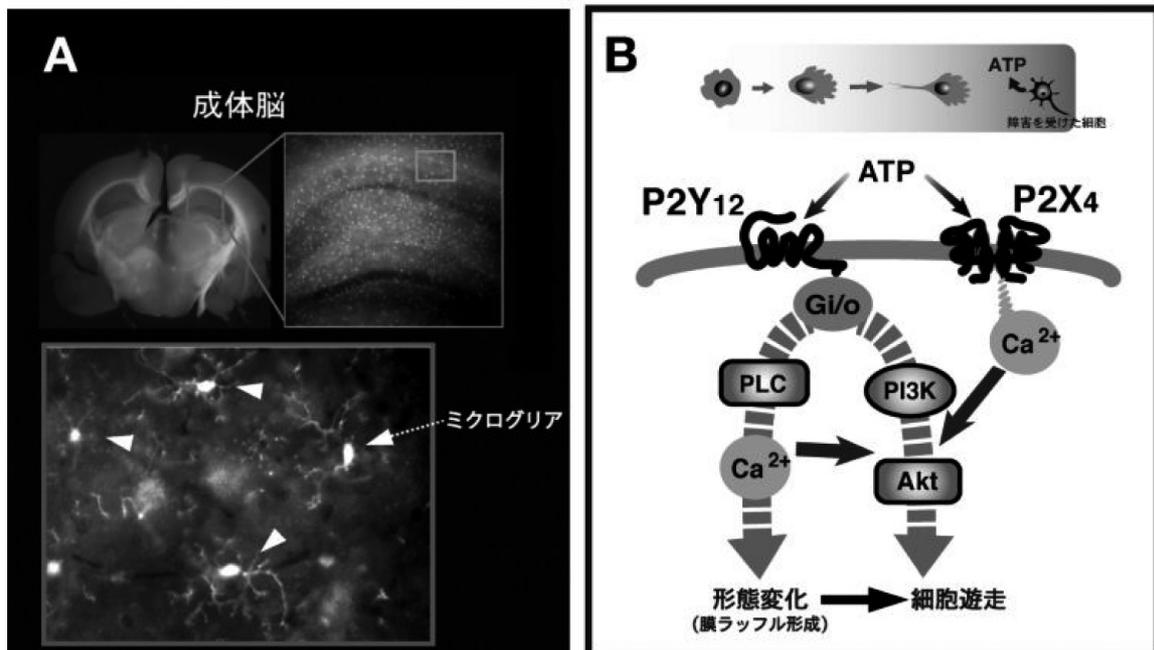
高坂新一、内野茂夫、大澤圭子

国立精神・神経センター 神経研究所 代謝研究部

組織中ミクログリアの可視化のために、Iba1のプロモーターの下流でEGFPを発現するIba1-EGFPトランスジェニックマウスを作成した。EGFP陽性細胞は胎生10.5日に出現し、胎生11.5日で脳および脊髄、肝臓などに認められた。生後脳におけるEGFP陽性細胞は、生後6日目の脳梁に集積したアメボイド型の細胞として認められ、生後14日目の脳実質内ではほとんどがラミファイド型となり、成体脳では脳全体に散在するラミファイド型細胞として認められた。抗Iba1抗体を用いた免疫組織化学的染色法により、これらの細胞がIba1陽性細胞と完全に一致することが確認され、EGFP陽性細胞はミクログリアであることが示された。(Hirasawa et al., J. Neurosci. Res. 81, 357-362, 2005)。本マウスはEGFP蛍光によりミクログリアを生きたまま組織内で可視化できるので、ニューロン-ミクログリアの相互作用研究のための有用なツールとなり、すでに多くの研究者により利用され共同研究が行われている。

ミクログリア遊走能の調節機構の解析では、ミクログリア

とニューロンの相互作用因子である細胞外ATPによる作用機序を分子レベルで解析した。ミクログリアは神経障害時に速やかに反応して形態を変化させ傷害部位へ移動・集積することが知られており、これらの形態変化と遊走はミクログリアの様々な活性化機能を決定する初期反応として重要である。我々は、いままでに、細胞外ATPが三量体Gタンパク質共役型ATP受容体P2Y12を介してミクログリア遊走能を亢進する事を明らかにしてきた。本プロジェクトでは、ミクログリア細胞移動におけるイオンチャンネル型ATP受容体P2X4の役割について検討し、P2Y12に加えてP2X4も遊走調節に関与する事を明らかにした(Ohsawa et al, Glia 55, 604-616, 2007)。また、我々は、細胞遊走を調節する細胞内情報伝達系の解析を行い、P2Y12の下流で機能するホスファチジルイノシトール3キナーゼ(PI3K)シグナル系とホスホリパーゼC(PLC)シグナル系の両シグナル系の活性化が遊走調節に必要であることを明らかにした。PI3K活性がP2X4に依存した細胞内カルシウムシグナルの調節を受けることから、



A. Iba1-EGFPトランスジェニックマウスによる組織内ミクログリアの可視化
成体脳実質内でラミファイドミクログリアがEGFP陽性細胞として観察される。

B. 細胞外ATPによるミクログリアの遊走能調節分子機構

ATPによるミクログリアの遊走はP2Y12に加えP2X4によっても調節される。遊走調節にはP2Y12の下流で機能するPLCとPI3K-Aktシグナル系が関与するが、PLCシグナル系の活性化は膜ラッフル形成と遊走に必要であり、PI3Kシグナル系はミクログリアの形態変化後の細胞移動の調節に関わる。PI3K-Aktシグナル系の活性化は、細胞内Ca²⁺シグナルにより制御される。P2X4は細胞外Ca²⁺流入によるCa²⁺シグナルを介してPI3K-Aktシグナル系に影響を与える。

P2X4はPI3Kシグナル系に影響を及ぼすことで遊走調節に関与することを示唆した。また、PLCに依存した細胞内カルシウムシグナル系によってもPI3Kシグナル系が調節されることを明らかにし、PI3Kの下流で活性化されるAktも遊走調節分子の一つである事を示唆した (Irino et al, J. Neurosci. Res. 86, 1511-1519, 2008)。P2Y12は正常時ミクログリアにおいて発現しているのに対し (Sasaki et al, Glia, 44, 242-250, 2003)、P2X4は神経因性疼痛や脳虚血などの傷害あるいは病態時の活性化ミクログリアで発現亢進されることから、P2X4は脳障害・病態時におけるミクログリアの細胞遊走調節に働くことが示唆された。

一方、正常成体脳のラミファイドミクログリアについては、局所的な組織障害時にATPによるP2Y12を介した作用で障害部位へ突起を伸長させることが知られている。しかしながら、突起伸長から細胞移動への変換を司る分子調節機構は不明である。また、いままで、ミクログリアの突起伸長はin vitroの培養系で再現できず、その調節分子機構の解析が困難であった。本プロジェクトにより、三次元コラーゲンゲルとトランスウェルを用いたin vitroのミクログリア突起伸長解析系を確立し、ATPによる突起伸長について解析をおこなった。その結果、ミクログリアの突起伸長には、PI3KおよびPLCシグナル系に加え、インテグリンシグナル系の活性化が必要であることを明らかにした。

【文献】

- Nakajima, K*, **Kohsaka, S.**, Tohyama, Y. and Kurihara, T.: Activation of microglia with lipopolysaccharide leads to the prolonged decrease of conventional protein kinase C activity. Mol. Brain Res. 110 (2003) 92-99
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., **Kohsaka, S.**, Michael W. Salter and Inoue, K*: P2X₄ receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. Nature 14;424 (2003) 778-783
- Uchino, S.**, Wada, H., Honda, S., **Hirasawa, T.**, Yanai, S., Nakamura, Y., Ondo, Y and **Kohsaka, S***: Slo2 sodium-activated K⁺ channels bind to the PDZ domain of PSD-95. BBRC 310(2003)1140-1147
- Sasaki, Y.**, Hoshi, M., Akazawa, C., Nakamura, Y., Tsuzuki, H., Inoue, K. and **Kohsaka, S***: Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y₁₂ in microglia in rat brain. Glia 44(2003) 242-250
- Hirasawa, T.**, Wada, H., **Uchino, S.** and **Kohsaka, S***: Inhibition of NMDA receptors induces delayed neuronal maturation and sustained proliferation of progenitor cells during neocortical development. J. Neurosci. Res. 74(2003) 676-687
- Suzuki, T., Hide, I., Ido, K., **Kohsaka, S.**, Inoue, K., Nakata, Y*: Production and release of neuroprotective TNF by P2X7 receptor-activated microglia. J. Neurosci. 24: (2004) 1-7
- Ohsawa, K.**, **Imai, Y.**, **Sasaki, Y.**, and **Kohsaka, S***: Macrophage/Microglia-specific protein Iba1 binds to fimbria and enhances its action-bundling activity. J. Neurochem. 88 (2004) 844-856. (impact factor 4.604)
- Nakajima, K*, Tohyama, Y., **Kohsaka, S.** and Kurihara, T.: Protein kinase C alpha requirement in the activation of p38 mitogen-activated protein kinase, which is linked to the induction of tumor necrosis factor alpha in lipopolysaccharide-stimulated microglia. Neurochem Int. 44 (2004) :205-214
- Akazawa, C., Nakamura, Y., Sango, K., Horie, H. and **Kohsaka, S***: Distribution of the galectin-1 mRNA in the rat nervous system; its transient upregulation in rat facial motor neurons after facial nerve axotomy. Neurosci. 125 (2004) 171-178
- Akazawa, C., Tsuzuki, H., Nakamura, Y., **Sasaki, Y.**, Ohsaki, K., Nakamura, S., Arakawa, Y. and **Kohsaka, S***: The upregulated expression of sonic hedgehog in motor neurons after rat facial nerve axotomy. J. Neurosci. 24 (2004) 7923-7930
- Nakajima, K*, Tohyama, Y., Kurihara, T. and **Kohsaka, S.**: Axotomy-dependent urokinase induction in the rat facial nucleus: possible stimulation of microglia by neurons. Neurochem Int. 46 (2005) 107-116.
- Kamitori, K.**, Tanaka, M. **Okuno-Hirasawa, T.**, and **Kohsaka, S***: Receptor related to tyrosine kinase RYK regulates cell migration during cortical development. BBRC 330 (2005) 446-453
- Hirasawa, T.**, **Ohsawa, K.**, **Imai, Y.**, Ondo, Y., Akazawa, C., **Uchino, S.** and **Kohsaka, S***: Visualization of microglia in living tissues by using Iba1-EGFP transgenic mice. J. Neurosci. Res. 81 (2005) 357-362
- Nakajima, K*, Tohyama, Y., Kurihara, T. and **Kohsaka, S.**: Enhancement of urokinase-type plasminogen activator (uPA) secretion, but not that of substrate plasminogen (PGn), by rat microglia stimulated with neuronal conditioned medium. Neurosci. Lett. 378 (2005) 13-17
- Yogosawa, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I., Miyoshi, H., **Kohsaka, S***, and Akazawa, C. Ubiquitylation and degradation of serum-inducible kinase by hVPS18, a RING-H2 type ubiquitin ligase. J. Biol. Chem. 280 (2005) 41619-41627 (impact factor 5.854)
- Hattori, K., **Uchino, S.**, Isosaka, T., Maekawa, M., Iyo, M., Sato, T., **Kohsaka, S.**, Yagi, T. and Yuasa, S*: Fyn is required for haloperidol-induced catalepsy in mice. J. Biol. Chem. 281 (2006) 7129-7135 (impact factor 5.854)
- 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/IP3 Pathway and Modulate the Cell Activation Toward a Neuroprotective Role. J. Neurosci. Res. 83 (2006) 1461-1470
- Uchino, S.**, Wada, H., Honda, S., Nakamura, Y., Ondo, Y., Uchiyama, T., Tsutsumi, M., **Hirasawa, T.**, and **Kohsaka, S***: Direct interaction of PDZ domain-containing synaptic molecule Shank3 with GluR1 AMPA receptor. J. Neurochem. 97 (2006) 1203-1214 (impact factor 4.604)
- Nakajima, K*, Graeber, MB., Sonoda, M., Tohyama, Y., **Kohsaka, S.** and Kurihara, T.: In vitro proliferation of axotomized rat facial nucleus-derived activated microglia in an autocrine fashion. J. Neurosci. Res. 24 (2006) 348-359
- Yogosawa, S., Kawasaki, M., Wakatsuki, S., Kominami, E., Shiba, Y., Nakayama, K., **Kohsaka, S***, and Akazawa, C.: Monoubiquitylation of GGA3 by hVPS18 regulates its ubiquitin-binding ability. BBRC. 350 (2006) 82-90
- Yamada, M., **Ohsawa, K.**, **Imai, Y.**, **Kohsaka, S.** and **Kamitori, S***: X-ray Structures of the Microglia/Macrophage-specific Protein Iba1 from Human and Mouse Demonstrate Novel Molecular Conformation Change Induced by Calcium-binding. J. Mol. Biol. 364 (2006) 449-457
- Ohsawa, K.**, **Irino, Y.**, Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K. and **Kohsaka, S***: Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglia chemotaxis. Glia 55 (2007) 604-616 (impact factor 4.276)
- Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., **Ohsawa, K.**, Tsuda, M., Joshi, B.V., Jacobson, K.A., **Kohsaka, S.**, and Inoue, K*: UDP acting at P2Y(6) receptors is a mediator of microglial phagocytosis. Nature 446 (2007) 1091-1095 (impact factor 29.273)
- Nakajima, K*, Tohyama, Y., Maeda, S., **Kohsaka, S.** and Kurihara, T.: Neuronal regulation by which microglia enhance the production of neurotrophic factors for GABAergic, catecholaminergic, and cholinergic neurons. Neurochem Int. 50 (2007) 807-820
- Irino, Y.**, Nakamura, Y., Inoue, K and **Kohsaka, S***, and **Ohsawa, K.**: Akt activation is involved in P2Y12 receptor-mediated chemotaxis of microglia. J. Neurosci. Res. 86 (2008) 1511-1519.)