

## ミクログリアとストレス

分担研究者 澤田誠 藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教授

老化促進ストレスの脳に対する影響を調べる目的でストレスに対するミクログリアの応答を調べた。その第2年目として *in vitro* でミクログリアのサブタイプの性質の違いについて、*in vivo* では脳一過性虚血負荷時の非侵害的脳内導入ミクログリアの動態について調べた。その結果、ミクログリアはサブタイプによってストレス刺激による応答性が異なり、種々のサイトカイン産生のスペクトラムや細胞表面機能分子の発現などが異なることがわかった。また、我々の樹立した複数の株化ミクログリアのいくつかはミクログリアのサブタイプに一致した性質を持っていることがわかった。虚血ストレス負荷によって生じる遅延性神経細胞死において非侵害的脳内導入ミクログリアは神経変性部位に集まりやすく、さらに細胞死から神経を保護するような *trophic* な作用を持つことがわかった。

### A. 研究目的

ミクログリアはマクロファージ様の性質を持つ中枢神経系細胞で、炎症反応やウイルス感染において免疫担当細胞として働いたり変性した細胞を取り除く貪食細胞として働くほか、サイトカイン、プロテアーゼ、プロスタグランジン、NO、スーパーオキシドなどの生物活性因子を産生する脳内サイトカインネットワークの中心的な細胞である。また最近では学習や記憶といった高次の脳機能の発現にも不可欠であることが示され、脳に特異的な役割を持った特殊化した細胞であると考えられている。現在までのところミクログリアの起源は周産期に脳内に侵入した単球が特殊化して分化すると考えられている。しかし最近我々は脳に対する親和性や浸潤できるか否かについてマクロファージとミクログリアが決定的に異なることを示した。さらに両者を識別する方法で染色してその分布を調べたところ、ミクログリアが発生の早い段階から脳

内に存在することを示した。したがってミクログリアは骨髄で分化成熟する単球由来ではなく、脳に特異的な親和性を持った細胞群が発生の初期に脳内に侵入し、脳の形態形成や記憶学習といった高次機能まで調節するようになると考えられる。このようにミクログリアは外的および内的微小環境の変化にตอบสนองしての脳機能を形成したり維持したりする脳内ストレス応答系としての役割を果たしていると考えられる。最近アルツハイマー病などの脳の老化にミクログリアが深く関わっていることが示されているが、その詳細な分子機構についてはわかっていない。そこで本研究は脳の老化に関わる刺激が加えられたときのミクログリアの反応を *in vivo* と *in vitro* で検討し、脳の老化のメカニズムやそれを抑制する手段について検索することを目的とする。

その第2年目として *in vitro* でミクログリアのサブタイプの性質の違いについて、*in vivo* では脳一過性虚血負荷時の非侵害的脳内

導入ミクログリアの動態について調べた。

## B. 研究方法

1. ミクログリアは新生B6マウス脳より調製した混合グリア培養から既報の方法で分離精製した。LPSやIFN $\gamma$ による刺激およびリコンビナントサイトカインによる処理は、培地交換後にそれぞれを添加して規定の時間培養して行ない、培養上清のサイトカインをバイオアッセイで定量した。同様に処理したミクログリアについて酸性ホスファターゼ活性とNBT還元能についても定量した。また各処理を行ったミクログリアより酸性グアニジノーフェノール法によりRNAを抽出してRT-PCRによりサイトカインやサイトカイン受容体のmRNA発現を調べた。サイトカイン受容体タンパクの量的変動は各受容体タンパクに特異的な抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、FACSにより分析した。

2. 複数の株化ミクログリアを。LPSやIFN $\gamma$ による刺激およびリコンビナントサイトカインにより処理し、酸性グアニジノーフェノール法によりRNAを抽出してRT-PCRによりサイトカインやサイトカイン受容体のmRNA発現を調べた。また、細胞表面抗原に特異的な抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、FACSにより分析した。

3. 細胞の調製と注入：既報のとおり精製したFisher rat由来マクロファージとミクログリアをプラスチックシャーレに接着させた状態で貪食細胞染色液で調製した蛍光色素PKH26を10%血清を含む培地に1:1で混合して37°Cで15分間染色したのち回収し、 $2 \times 10^6$  cellsを5週齢同系ラット腋下動脈に注入した。注入後48時間、経時的実験ではさらに注入後1、2および3週間で麻酔下生理食塩水

で環流し、各臓器を摘出、OCT液中で凍結した。

4. 遺伝子の導入：大腸菌由来lacZ遺伝子発現ベクターpEFGeoをDOTAPリピッド(Boehringer-Mannheim)と混合し、終濃度1 $\mu$ g/mlで血清を含む培地で調製したものを精製したマクロファージとミクログリアおよび株化ミクログリアに添加して16時間処理し、通常の培地でさらに48時間培養し、上記のように蛍光染色して実験に用いた。

5. 凍結切片での注入細胞の同定：連続したおよそ5ミクロンの3枚の凍結切片をそれぞれ蛍光顕微鏡による観察、Xgalを用いた $\beta$ -galactosidaseの活性染色、化学発光法による $\beta$ -galactosidase活性の定量に用いた。活性測定は切片を0.5% TritonX100を含む細胞溶解液で溶解してGalactoLight(Boehringer-Mannheim)を用いて行った。

6. 一過性前脳虚血砂ネズミの腋下動脈より経口し木曾標識した正常ミクログリアを投与し経時的に剖検し、海馬CA1領域の錐体細胞の遅延性神経細胞死と導入したミクログリアの動態を観察した。

## C. 研究結果

1. 脳内での抑制性の作用が指摘されているIL-10がストレス応答に関わるミクログリアの炎症性サイトカイン産生、スーパーオキシドラジカル産生、増殖、MHC class II発現などの機能を抑制するほか、今回新たにIL-2、IL-6などの炎症性サイトカイン受容体の発現も抑制し、ミクログリアの機能のdown regulationをする事がわかった。

2. ミクログリアはサブタイプによってストレス刺激による応答性が異なり、種々のサイトカイン産生のスペクトラムや細胞表面機能分子の発現などが異なることがわかった。ま

た、我々の樹立した複数の株化ミクログリアのいくつかはミクログリアのサブタイプに一致した性質を持っていることがわかった。

3. 老化ストレス応答に関与が指摘されている caspase-1 による小脳顆粒細胞死が IGF-1 によって抑制されることが明らかになった。
4. 我々が樹立したミクログリア株細胞に外来性遺伝子を導入し、独自に開発した脳特異的バイオターゲティング法を用いることによって、目的遺伝子を脳に特異的に発現させることに成功した。
5. 一過性前脳虚血モデルにおいて脳特異的バイオターゲティング法でミクログリアを虚血性神経細胞死巣に導入して *in vivo* で直接ミクログリアの老化促進ストレス応答を検討するシステムを開発した。

#### D. 考察

ミクログリアは脳内での老化促進ストレス負荷時に重要な役割を果たしていると考えられているが、神経細胞に toxic に働くのか、反対に保護的に働くのかがよくわかっていない。しかし、今回の成績により、サブタイプの違いによって役割が異なる可能性がわかったことから、老化促進ストレスにおける役割を調べる場合、サブタイプを明確に区別する必要があることがわかった。

スナネズミ前脳虚血モデルでの海馬錐体細胞の遅延性細胞死はその発症のメカニズムが老化促進ストレスとも共通性が指摘されているが、今回脳特異的バイオターゲティングによりミクログリアを変性部位に高密度で導入できることがわかったので性質の異なる株化ミクログリアを導入してその性質を *in vivo* で比較検討できる。第3年度の研究でこの点を明らかにしていきたい。また、脳内に人為

的に移行させたミクログリアはその性質をかなり長期に渡って保持するので、老化促進ストレスに関与する遺伝子を発現するように遺伝子改変したミクログリアを導入して脳内での動態を調べる調べるのが今後の研究の課題であると考えられる。

また、ストレス負荷で活性化されるミクログリアは IL-10 のような抑制性のサイトカインの作用で阻害することができ、これらのサイトカインを脳特異的遺伝子導入などで発現させることによって、老化促進ストレスを予防する手段の開発にも応用できるかも知れない。

#### E. 結論

ミクログリアはサブタイプによってストレス刺激による応答性が異なり、種々のサイトカイン産生のスペクトラムや細胞表面機能分子の発現などが異なることがわかった。また、我々の樹立した複数の株化ミクログリアのいくつかはミクログリアのサブタイプに一致した性質を持っていることがわかった。虚血ストレス負荷によって生じる遅延性神経細胞死において非侵襲的脳内導入ミクログリアは神経変性部位に集まりやすく、さらに細胞死から神経を保護するような trophic な作用を持つことがわかった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sawada, M., Imai, F., Suzuki, H., Hayakawa, M., Kanno, T., Nagatsu, T.: Brain-specific gene expression by immortalized microglial cell-mediated gene transfer in the mammalian brain. FEBS Lett., 433:37-40, 1998.

2. Sawada, M., Suzumura, A., Hosoya, H., Marunouchi, T., Nagatsu, T.: IL-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia. *J. Neurochem.*, in press, 1998.
3. Suzumura, A., Sawada, M., Takayanagi, T.: Production of interleukin-12 and expression of its receptors by murine microglia. *Brain Research*, 787:139-142, 1998.
4. Suzumura, A. and Sawada, M. Effects of vesnalinone on cytokine production and activation of murine microglia. *Life Sci.* in press.
5. Suzumura, A., Sawada, M. and Makino, M. Propentofylline inhibits production of TNF  $\alpha$  and infection of LP-BM5 murine leukemia virus in glial cells. *J. Neurovirol.* in press.
6. Tanaka, M., Sawada, M., Miura, M., Marunouchi, T.: Insulin-like growth factor-1 analogue prevents apoptosis mediated through an interleukin-1b conof LP-BM5 murine leukemia virus in glial cells. *J. Neurovirol.* in press.

# 老化促進ストレスと神経細胞死

分担研究者 祖父江元 名古屋大学神経内科教授

ラット後根神経節の explant culture と、マウスアストロサイトとミクログリアの分散培養系において、培養液中に glyoxal を添加し、抗 CML 抗体による免疫組織染色と Western blot analysis により carboxymethyllysine (CML) の誘導を検討した。また aminoguanidine による CML 誘導の阻害効果を検討した。さらに培養液中の cytokine 濃度と、cytokine の mRNA を測定した。Glyoxal によって CML は時間・濃度依存的に誘導され、aminoguanidine によって阻害された。ミクログリアでは炎症性サイトカインの上昇が認められた。老化による神経細胞障害に、CML をはじめとする advanced glycation endproducts (AGEs) が、炎症性サイトカインを介して関与している可能性がある。

## A. 研究目的

近年、老化脳などにおいて、advanced glycation endproducts (AGEs) が沈着していることが報告され、その病態への関連が注目されている。我々は、神経細胞とグリア細胞の培養系において、AGEs の主要成分である carboxymethyllysine (CML) を実験的に誘導し、その病態を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 神経細胞における検討

ラット後根神経節を用い、コラーゲンゲル包埋法を用いた explant culture を行った。培養液中に CML を誘導する glyoxal を 0.001~10mM の各濃度で添加し、1~6 日間培養した。抗 CML 抗体を用いて免疫組織染色と Western blot analysis を行い、CML の誘導を検討した。また、glyoxal 0.1mM に対し、AGEs の生成を阻害する物質である aminoguanidine を 0.1~10mM の各濃度で添加し、CML の誘導が阻害されるか否かを

検討した。

### 2. グリア細胞における検討

マウス脳からアストロサイトとミクログリアを分離、精製した。この分散培養系において、培養液中に glyoxal を 0.001~10mM の各濃度で添加し、1 日間培養した。抗 CML 抗体を用いて免疫組織染色と Western blot analysis を行い、CML の誘導を検討した。また、glyoxal 0.1mM に対し、aminoguanidine を 0.1~10mM の各濃度で添加し、CML の誘導が阻害されるか否かを検討した。さらに、培養液中の cytokine (IL-1b, IL-2, IL-6, TNF-a) の濃度を ELISA を用いて検討するとともに、培養細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR によって cytokine の mRNA のレベルに変化があるか否かを検討した。

## C. 研究結果

### 1. 神経細胞における結果

免疫組織染色および Western blot analysis とともに、glyoxal によって CML が時間・濃

度依存的に誘導され、これは aminoguanidine によって濃度依存的に阻害された。

## 2. グリア細胞における結果

免疫組織染色および Western blot analysis で、glyoxal によって CML が濃度依存的に誘導され、これは aminoguanidine によって阻害された。IL-1b, IL-2, IL-6, TNF-a の濃度はアストロサイトでは特に変化はみられなかったが、ミクログリアでは glyoxal 0.1mM の添加によって IL-6, TNF-a の濃度の上昇が認められた。RT-PCR ではミクログリアにおいて glyoxal 0.1mM の添加によって TNF-a の mRNA の誘導が認められた。

## D. 考察

我々の剖検脳を用いた検討では、若年では CML の沈着は認められないが、老齢では神経細胞内に多量の、外に少量の CML の沈着がみられている。加齢に関連して発症するアルツハイマー病脳では、CML は神経細胞内外に多量に沈着し、神経細胞外のもはアストロサイトとミクログリアに存在する。加齢に伴う中枢神経組織の病態において、CML をはじめとする AGEs が重要な役割を果たしている可能性がある。AGEs は、蛋白と糖が非酵素的に反応（メイラード反応）して生じる不可逆的な物質で、褐色で、各種酵素に抵抗性で非常に分解されにくいなどの特性を持ち、受容体を介して様々な生理活性を示すことが知られている。従来、AGEs の生成には非常に長い時間がかかると思われていたが、近年、glyoxal などの反応性の高い物質によって、メイラード反応が促進されることが知られてきた。今回の

我々の検討でも、glyoxal によって CML が短時間に誘導された。また、この際、ミクログリアが IL-6, TNF-a といった炎症性サイトカインを分泌していることが認められた。老化に伴う細胞障害の機序のひとつとして、これらの炎症性サイトカインの関与が考えられる。今後、さらに検討が必要と考えた。

## E. 結論

神経細胞およびグリア細胞の培養系において、glyoxal によって CML が誘導され、この際、ミクログリアから炎症性サイトカインが分泌された。老化の際の神経細胞障害に、CML をはじめとする AGEs が関与している可能性がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Niwa, H., Takeda, A., Wakai, M., Miyata, T., Yasuda, Y., Mitsuma, T., Kurokawa, K. and Sobue, G.: Accelerated formation of Nε-(carboxymethyl)lysine, an advanced glycation end product, by glyoxal and 3-deoxyglucosone in cultured rat sensory neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 248, 93-97, 1998.
- 2) Takeda, A., Yasuda, T., Miyata, T., Goto, Y., Wakai, M., Watanabe, M., Yasuda, Y., Horie, K., Inagaki, T., Doyu, M., Maeda K. and Sobue, G.: Advanced glycation end products co-localized with astrocytes and microglial cells in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathologica* 95, 555-558, 1998.