

AGEs: RAGE) を介して、例えば macrophage から cytokine を分泌させるなど、様々な生理活性を示すことがわかってきた。従来、AGEs の生成には非常に長い時間がかかるとされていたが、近年、glyoxal、methylglyoxal や 3-deoxyglucosone などの反応性の高い中間物質によって、メイラード反応が促進されることが知られてきた。メイラード反応自体は酸素がなくとも進行するが、これらの中間物質は、酸素存在下でメイラード反応の過程で生じるものである。今回の我々の検討でも、培養細胞に、CML が時間・濃度依存的に glyoxal によって誘導された。老化、糖尿病、腎不全などの場合でも、条件がそろえば、比較的短時間で AGEs は生成されると考えられる。また、今回の実験で、glyoxal の刺激によって、microglia が IL-6, TNF- $\alpha$  といった炎症性 cytokine を分泌することが認められた。アルツハイマー病脳において炎症性 cytokine の上昇が報告されており、老化に伴う神経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。AGE の産生と細胞障害との関係は不明の部分が多いが、AGE の産生は酸化ストレスを背景とした蛋白の修飾のひとつであり、この観点からは細胞内防御機序としての SOD やシャペロンなどとの関係が重要になってくると考えられる。今後、AGEs が神経細胞・グリア細胞に及ぼす分子機序について、さらに検討が必要と考えられた。

#### 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

Hisayoshi Niwa, Akinori Takeda, Masakazu Wakai, Toshio Miyata, Yoshinari Yasuda, Terunori Mitsuma, Kiyoshi Kurokawa and Gen Sobue: Accelerated formation of Ne-(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.

Akinori Takeda, Takeshi Yasuda, Toshio Miyata, Yoji Goto, Masakazu Wakai, Masaki Watanabe, Yoshinari Yasuda, Katsunori Horie, Toshiaki Inagaki, Manabu Doyu, Kenji Maeda and Gen Sobue: Advanced glycation end products co-localized with astrocytes and microglial cells in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathologica* 95, 555-558, 1998.

Yasushi Kobayashi, Mei Li, Akito Kume, Manabu Doyu, Kenzo Ohtsuka and Gen Sobue: Chaperones, HSP 70 and HSP 40 suppress aggregate formation and apoptosis in neuronal cells expressing truncated androgen receptor with expanded polyglutamine tract. *J. Biol. Chem.* 2000, in press.

## 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、ミクログリアを用いた非侵襲的脳のバイオターゲティング系を確立した。ヒト脳をバイオターゲティングする場合に実際上用いる細胞として骨髄細胞の利用が考えられるが、骨髄移植による脳への細胞移行は報告がない。そこで今回の研究の第3年目として、GFP 恒常的発現骨髄細胞を正常マウスに移植するシステムを確立し、骨髄細胞移植における脳親和性細胞の存在やその性質について検討した。その結果、GFP 陽性細胞が末梢臓器だけでなく脳実質にも、cluster を形成して存在する事を発見したが、脳に移入した細胞は末梢臓器に移入する細胞とは異なる性質を持つことが判った。

キーワード：ミクログリア、バイオターゲティング、骨髄移植

### 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(1)。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(2)、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(3)。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(4)。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(5)。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(6)。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応答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(7)。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(8)、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方法について検索することを目的とする。ヒト脳をバイオターゲティングする場合に実際上用いる細胞として骨髄細胞の利用が考えられるが、骨髄移植による脳への細胞移行は報告がない。そこで今回の研究の第3年目として、GFP 恒常的発現骨髄細胞を正常マウスに移植するシステムを確立し、骨髄細胞移植における脳親和性細胞の存在やその性質について検討した。

### B. 研究方法

1) 細胞の調製と注入：骨髄移植前 96 時間および 48 時間にレシピエントの雄性 B6 マウスに

5-FU を 150 および 75 mg/kg ip で投与した。骨髄細胞は GFP トランスジェニックマウス大腿骨から回収し、細胞を尾静脈中に注入した。注入後生理食塩水で環流し、各臓器を摘出、一部を 3 倍量の TNE buffer 中でホモゲナイズし Westernblotting による解析に用い、また一部を OCT 液中で凍結し病理観察に供した。

2) GFP 発現骨髄細胞に由来する細胞の臓器分布を調べるために、RT-PCR により GFP 遺伝子発現を確認した。また、Western blotting により GFP タンパクの各臓器での検出を行った。さらに、細胞分化ステージ特異的抗体

3) 凍結切片での注入細胞の同定：連続したおよそ 7 ミクロンの凍結切片を蛍光顕微鏡で観察し、その後 HE 染色または免疫染色を行った。

#### C. 研究結果

1 GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を正常同型マウスに移植し骨髄キメラを作製し、GFP 陽性細胞をレシピエントマウス体内において追跡できる系を確立した。

2 レシピエントの脳と末梢臓器において、GFP 陽性細胞が移行していることが確認でき、それらのほとんどはクラスターを形成していた。

3 脳と肝臓のクラスターについて蛍光免疫染色を行うと、脳では CD34 陰性 Mac-1 陽性 ER-MP 12 陽性を示すのに対し、肝臓では CD34 陰性 Mac-1 陽性 ER-MP12 陰性を示した。

4 脳におけるクラスターは、末梢臓器に比較して未分化であり通常の単球では発現しえない抗原を発現していることを示した。

5 ミクログリアの発生的起源は、血液を循環している単球に由来するのではなく未分化な骨髄前駆細胞が脳実質中に移行し血球系の細胞とは独立した分化をとげたものである可能性を示唆できた。

#### D. 考察

これまでの研究によって、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。したがって、老化促進ストレスから脳を保護する方法の一つとして、ミクログリアを用いた非侵襲的脳のバイオターゲティング系を用いて老化ストレスを抑制する薬物やサイトカインを脳に導入したり、遺伝子治療を行う可能性が示唆された。

しかし、実際にヒト脳をバイオターゲティングする場合に用いる細胞として骨髄細胞の利用が考えられるが、骨髄移植による脳への細胞移行は報告がない。そこで今回の研究の第 3 年目として、GFP 恒常的発現骨髄細胞を正常マウスに移植するシステムを確立し、骨髄細胞移植における脳親和性細胞の存在やその性質について検討し、GFP 陽性細胞が末梢臓器だけでなく脳実質にも、cluster を形成して存在する事を発見したが、脳に移入した細胞は末梢臓器に移入する細胞とは異なる性質を持つことが判った。骨髄に存在する脳に親和性を持った細胞はごく少数しか存在せず、今後この細胞の効率のよい分離法や、特異的な増殖条件等を検討する必要があると考えられる。

#### E. 結論

骨髄中には脳に親和性を持って脳に侵潤できる少数の細胞があることを発見した。これを有効に用いることによって脳のバイオターゲティン

グが可能になり、老化促進ストレスから脳を保護する手段として応用できる可能性が示唆できた。

#### F. 引用文献

- 1) M. Sawada et al: Cytokine network in the central nervous system and its roles in growth and differentiation of glial and neuronal cells, *Int. J. Dev. Neurosci.*, Vol 13, No3/4: 253-264, 1995.
  - 2) Tsirka et al: Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator, *Nature*, 377: 340-344, 1995.
  - 3) H. Lassmann et al: Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation, *Glia*, Vol 7, No 1, 19-24, 1993.
  - 4) F. Imai, M. Sawada et al: Permeability of blood-brain barrier to microglia and macrophage in vivo, *Neurosci. Lett.* Vol 237, No1, 49-52, 1997.
  - 5) T. Tanaka, M. Sawada et al: Presence of CD59-positive microglia in mouse brain. *Neurosci. Lett.* Vol 239, No1, 17-20, 1997.
  - 6) 澤田誠: ミクログリアの多様性と発生学的起源, *細胞*, 27,5:193-198, 1995.
  - 7) 澤田誠: 脳のサイトカインネットワーク, *蛋白質核酸酵素*, 42: 504-511, 1997.
  - 8) Ono, K, Takii, T, Onozaki, K, Ikawa, M, Okabe, M, Sawada, M: Migration of Exogenous Immature Hematopoietic Cells into Adult Mouse Brain Parenchyma under GFP-Expressing Bone Marrow Chimera. *Biochem Biophys Res Commun*, 262:610-614, 1999.
  - 9) Suzumura, A., Ito, A., Yoshikawa, M., Sawada, M.: Ibudilast suppresses TNF $\alpha$  production by glial cells functioning mainly as type III phosphodiesterase inhibitor in the CNS. *Brain Res.* 837, 203-212, 1999.
  - 10) Inoue, H., Sawada, M., Ryo, A., Tanahashi, H., Wakatsuki, T., Hada, A., Kondoh, N., Nakagaki, K., Takahashi, K., Suzumura, A., Yamamoto, M., Tabira, T.: Serial analysis of gene expression in microglial cell line. *Glia*, in press, 1999.
  - 11) Suzumura, A., Sawada, M.: Effects of vesnarinone on cytokine production and activation of murine microglia. *Life Sciences*, 64:1197-1203, 1999.
  - 12) Imai, F., Sawada, M., Suzuki, H., et al.: Exogenous microglia enter the brain and migrate into ischaemic hippocampal lesions. *Neurosci. Lett.* 272, 127-130, 1999.
  - 13) 澤田誠: アポトーシスとネクローシス. *生物試料分析*, 22: 93-100, 1999.
  - 14) 澤田誠: 神経系の分化とサイトカイン. *Clin. Neurosci.*, 16: 406-408, 1999
  - 15) 澤田誠: グリア細胞とその機能: 吉田孝人, 糸山泰人, 錫村明生(編), 免疫学から見た神経系と神経疾患 pp99-108 日本医学館, 1999.
- #### G. 研究発表
1. 論文発表
    1. 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.*, 72: 1466-1471, 1999.
    2. 学会発表  
[招待講演・シンポジウム]
      1. 澤田誠: 神経細胞の生存や機能に対するミクログリアの役割、第5回グリアクラブワークショップ 科学研究費特定B合同シンポジウム、札幌、August, 1999
      2. 澤田誠: ミクログリアの脳に対する高親和

性と脳特異的遺伝子導入：第71回日本生理学会、  
長崎、March,1999.

3.澤田誠：ミクログリア細胞移植による神経探精  
へのアプローチ、第42回神経化学会ワークショップ  
「神経再生の新しいアプローチ」広島、1999  
[一般講演]

(1) Imai,F.,Sawada,M.,Suzuki,H.,  
Kameyama,T.,Kanno,T.(1999)

Exogenous microglia enter into brain through  
endothelium and migrate into the ischemic  
lesion :28th Annual Meeting of American  
Neuroscience Society,Miami,November.

2.澤田誠：ミクログリアにより導入した外来  
遺伝子の脳内長期安定発現、第22回東海遺伝  
子医療研究会、名古屋、January,1999.

3 神澤孝夫、澤田誠、山本潔、小林勉、小田  
温、森宏、田中隆一：ミクログリアの免疫学的  
サブタイプの同定、第17回脳腫瘍学会、前橋、  
April,1999.

4 神澤孝夫、澤田誠、山本潔、小林勉、小田  
温、森宏、田中隆一：ミクログリアの免疫学的  
二面性；サブタイプの解析から、第12回脳と免  
疫研究会、広島、June,1999.

5 今井文博、澤田誠、鈴木弘美、久野茂彦、  
神野哲夫：ミクログリアを用いた brain  
targeted cell therapy の開発ミ虚血性脳疾  
患への応用、第12回脳と免疫研究会、広島、  
June,1999.