

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	網脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発

所 属 国立精神・神経センター神経研究所 代謝研究部
研究者 高坂 新一

分担研究者

ノバルティスファーマ K.K. 研究本部 小泉 信一

要 旨

レセプター型チロシンキナーゼ様分子 RYK に関しては、ラット中枢神経系における発現細胞の系譜をグリア細胞を中心に解析した。また COS-7 細胞における発現系を用いて、RYK と Eph レセプターとの結合およびそれによる RYK のリン酸化を確認した。

一方、ミクログリアーニューロン相互作用の研究に関しては、マウスミクログリア由来細胞株 MG5 と神経初代培養細胞の共培養系を確立し、血清アルブミン存在下でのミクログリアの神経細胞障害性の発現が見出された。さらに神経障害の分子機構を理解するために、神経障害性発現培養条件下と神経保護性培養条件下での MG5 細胞の遺伝子発現における差異を DNA アレイ法によって検討した。

1. 研究目的

神経細胞の生存維持には周囲のグリア細胞が重要な役割を担っていることが近年明らかにされつつある。本研究では、ニューロングリア相互作用を調節する物質的基盤を明らかにすることを目的としている。具体的には二つの課題を設定した。一つはレセプター型チロシンキナーゼ様分子 RYK の機能解析、今一つはミクログリアーニューロン相互作用の検討である。

RYK に関しては、昨年度までに *in situ* hybridization、および免疫染色法により RYK の発生過程のラット脳における発現パターンを解析した。その結果、RYK は主に神経幹細胞、ニューロン、また少数であるがその周辺のグリア様細胞で発現していることが示された。さらに胎児ラットの前脳より樹立された株化神経幹細胞 MNS-70 において RYK は神経幹細胞およびニューロンで発現していることが明らかになった。しかしながら、*vivo* での発現パターンを考慮すると RYK はニューロングリア間相互作用に寄与している可能性が高いと考えられる。そこで今年度は、RYK を発現するグリア細胞の系譜を明らかにすることがこの分子の役割を解明をする上で重要であると考え、初代培養を用い解析を行った。

さらに最近、他グループよりマウス RYK と Eph レセプターファミリーが結合することを示す報告がなされた。Eph レセプターは神経系で軸索伸長や細胞移動などにおいて、多様な機能を持つことが明らかになっている分子群である。RYK のリガンドがこれまで同定されておらず、リン酸化も確認されていないことを考慮すると、RYK が Eph レセプターと結合することにより、リガンドによる刺激を受けることができるという可能性も考えられた。そこで、これらの分子の結合およびそれによる RYK のリン酸化を確認する研究も行った。

ミクログリアーニューロン相互作用の検討に関しては、ミクログリア細胞株 (MG5) と初代神経細胞との共培養系においてミクログリア細胞が神経細胞に及ぼす影響について、特に神経細胞の生存という点に着目して検討することを目的とした。さらに、培養条件によって MG5 細胞が神経細胞に対して保護的に働くか、あるいは障害性を示すかを検証し、両培養条件下における MG5 細胞の遺伝子発現の差異を検討した。

2. 研究方法

(1) ラット初代培養細胞の調製

胎生 21 日目のラットより大脳を単離し、髄膜および海馬を除いて大脳皮質を回収した。これをピペッティングにて細かくした後、10 ml 0.25 % トリプシンを加えて 37 °C、5 分間処理し、さらに 5 ml ウシ胎児血清を加えた後、300 μ g/ml DNase I で処理した。細胞を遠心分離で回収し、D-MEM 培地で懸濁後、100 μ m 孔細胞濾過フィルターに通し、100 μ g/ml ポリ-L-リジンでコートしたシャーレにおいて、10 % ウシ胎児血清を含む D-MEM 培地で 37°C、10 % CO₂ 存在下で培養を行った。

(2) 免疫染色法

細胞を Sonicseal Slides (Nulge Nunc) で培養後、4 %パラホルムアルデヒド / PBS で固定し、99.5 % エタ

ノールで処理後、3 % BSA / 0.1 % Triton X-100 / PBS で希釈した1次抗体と4℃で16時間インキュベートし、PBSで5分間、3回洗浄した。その後、3 % BSA / 0.1 % Triton X-100 / PBS で希釈した2次抗体と室温で2時間インキュベートし、PBSで5分間、4回洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。抗体は以下のものを使用した。1次抗体：抗RYKウサギ抗血清(1:100 (10 μ g/ml))、抗GFAPマウスモノクローナル抗体(Sigma, 1:400)、抗ガラクトセレブロシド(GalC)マウスモノクローナル抗体(Roche, 1:50)、A2B5マウスハイブリドーマ培養上清(ATCC, 1:5)。2次抗体：抗ウサギIgG-FITC(Jackson Lab, 1:200)、抗マウスIgG-Cy3(Amersham Pharmacia, 1:200)または抗マウスIgM-Cy3(Jackson Lab, 1:200)。

(3) COS-7細胞の培養およびトランスフェクション

COS-7細胞は10 % ウシ胎児血清を含むD-MEM培地で37℃、5 % CO₂存在下で100 mmシャーレにおいて培養した。トランスフェクションにはLipofectamine Plus Reagent(GIBCO)を用いた。ポリスチレンチューブ内で730 μ l D-MEM培地、20 μ l Plus Reagentおよび3 μ g DNAを混合し、15分間静置した。別のポリスチレンチューブ内で720 μ l D-MEM培地と30 μ l Lipofectamineを混合し、上記のD-MEM/Plus Reagent/DNA混合液に添加してさらに15分間静置した。この間に細胞をD-MEM培地で2回洗浄して5 ml D-MEM培地を加え、上記の混合液を添加した。3時間後に培地を10 % ウシ胎児血清を含むD-MEM培地に交換し、さらに24~48時間培養した。

(4) 免疫沈降法

細胞をPBSで2回洗浄後、氷冷したPBS 1 mlを加えセルスクレイパーで回収した。1,000 \times g, 4℃で5分間遠心し、上清を除いて沈殿に500 μ l lysis buffer(0.5 % Triton X-100, 10 % glycerol, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 2 mM Na₂VO₄, 1XProtease inhibitor cocktail(Roche))を加えて氷上で30分静置した。12,000Xg, 4℃で30分間遠心し、上清にProtein A SepharoseおよびProtein G Sepharose(共にAmersham Pharmacia)それぞれ10 μ lを添加し、4℃で1時間ローテーターで回転させた。1,500Xg, 4℃で1分間遠心し、上清に2 μ gの抗FLAGウサギポリクローナル抗体(ZYMED)または0.5 μ g抗HAラットモノクローナル抗体(Roche)を加え、4℃で1時間ローテーターで回転させた。さらにProtein A SepharoseおよびProtein G Sepharoseそれぞれ10 mlを添加し、4℃で1時間ローテーターで回転させた。1,500Xg, 4℃で1分間遠心して結合したタンパク質を沈殿させ、1 ml lysis bufferで5回洗浄した後、20 μ l 2XSDSサンプルバッファー(125 mM Tris-HCl pH6.8, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0.01 % bromophenol blue, 10 % 2-メルカプトエタノール)を加え、100℃で5分間加熱し、SDS-PAGEを行った。

(5) SDS-PAGEおよびウエスタンブロット

サンプルをマルチゲル4/20(第一化学)にアプライし、泳動バッファーは25 mM Tris-HCl, 200 mM グリシン, 0.1 % SDSを使用して、30 mAで電気泳動を行った。泳動終了後、Transfer Membrane(MILLIPORE)にブロッティングした。バッファーは100 mM Tris, 200 mM グリシン, 20 %メタノールを使用した。メンブランをブロックエース(大日本製薬)中でブロックし、TBS-T(150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH8.0, 0.05 % Tween20)で洗浄後、0.1 % BSA/TBS-Tで希釈した1次抗体中で室温で1時間インキュベートした。さらにTBS-Tで洗浄後、0.1 % BSA/TBS-Tで希釈した2次抗体中で室温で1時間インキュベートした。TBS-Tで洗浄後、ECL Western blotting detection reagents(Amersham Pharmacia)を用いてシグナルを検出した。抗体は以下のものを使用した。1次抗体：抗リン酸化チロシンマウスモノクローナル抗体(upstate biotechnology, 1:1,000)、抗FLAGマウスモノクローナル抗体(STRATAGENE, 1:1,000)、抗FLAGウサギポリクローナル抗体(ZYMED, 1:1000)、抗HAラットモノクローナル抗体(Roche, 1:1,000)。2次抗体：抗ウサギIgG-HRP、抗マウスIgG-HRP、抗ラットIgG-HRP(すべてAmersham Pharmacia, 1:2,000)。

(6) MG5細胞の培養

国立精神・神経センター神経研究所より、同研究所においてp53KOマウスのミクログリア細胞より樹立した培養細胞株MG5とアストロサイト由来のA-1細胞の分与を受けた。

A-1細胞の培養には10% FBS(Gibco BRL)を含むDMEM培地を用いた。細胞は週に2回、PBSで1回洗浄した後トリプシン処理により回収し、split ratio 1/20 \sim 1/30で75cm²フラスコを使用して継代した。MG5細胞の培養に必要なA-1細胞の培養上清は次のようにして調製した。75cm²フラスコにコンフルエントにまで増殖したA-1細胞の継代時に、1/10を175 cm²フラスコに撒き込む。サブコンフルエントの状態にまで増殖したら、フラスコあたり60mlの培地を加え一晩培養する。翌日、培地を回収し、血清培

地用のフィルター (Nalgen) でろ過し、A-1 細胞の培養上清とした。MG5 細胞の培養には、DMEM / 10% FBS と A-1 細胞の培養上清を 3:7 の比率で混合して MG5 細胞用培地として用いた。MG5 細胞の培養には径 10cm ペトリディッシュ (#1011, Falcon) を用いた。細胞は週に 1 回 PBS で二回洗浄した後、パストールピペットでピペッティングにより剥がし、遠心 (500×g, 5min) にて回収し split ration 1/3 で継代した。

(7) マウス神経細胞調製

神経細胞の調製および培養方法は基本的に D. W. Choi らの方法に従った。

妊娠マウス (ICR, 日本チャールスリバー) より受精後 15 日の胎仔マウスを取り出し、氷冷した PBS 中で胎児より脳を取り出した。氷冷した L15 培地中で顕微鏡下、大脳皮質を分離し、組織を約 1 ミリ角に刻んだ後に同培地で 2 回洗浄した。組織片の洗浄は水中で組織片を含んだ 50 mL conical tube を 2 分間静置した後に培地を交換するか、500 rpm, 30 sec 遠心した後に培地を交換することによった。

洗浄後、組織片を Hanks's salt solution 中で 37°C にて 20 min トリプシン処理を行い、その後 Plating medium で 2 回洗浄した。組織片に 4 mL の Plating medium を加えて、15 mL の conical tube に移した後に、先端をバーナーであぶって鈍化した Pasteur pipet を使って 10 回の trituration を行った。液量を 10 mL に増やした後、40 mm のメッシュで細胞を濾過した後に適当量の培地に懸濁した。細胞懸濁液調製後、生細胞の割合と細胞密度を数え、70-80% 程度以上の生細胞率が得られていることを確認し、実験に用いた。調整後の細胞を 5% 牛胎児血清および 5% 馬血清を含む MEM 培地に懸濁し 3.5×10^5 cells/cm² の細胞密度で Poly-D-Lysine でコートした 48 穴培養ディッシュにまきこんだ。翌日、培地を 10% 馬血清を含む MEM 培地に全量交換し、さらに 3 日間培養後、再び培地交換を行った。培養開始後、5 日目の神経細胞を実験に用いた。

(8) 神経細胞とミクログリア細胞の共培養

神経細胞の培養開始後 5 日目に培地を全量交換し、その後、ミクログリア細胞を MEM 培地に懸濁し、 1×10^4 cells/well 加えた。一晚培養した後に、細胞を血清を含まない MEM 培地に交換し、さらに 48 時間培養し、神経細胞の生存に与える影響を調べた。血清アルブミンは、ミクログリアを加えると同時に培地中に添加した。

(9) 生細胞数の測定

生細胞数の測定には Cell Countin Kit-8 (同仁化学) (WST アッセイ) および培養上清中に放出される LDH 活性の測定により行った。

(10) mRNA 発現の DNA アレイ法による比較

ミクログリア細胞 1×10^6 cells を径 10cm の培養ディッシュにまき 48 時間培養した後、培地を血清不含有 DMEM 培地に交換した。培地に 0.5% の血清アルブミンを添加し、さらに 24 時間培養した。血清アルブミン存在下、非存在下にて培養したミクログリア細胞について、mRNA の発現パターンを DNA アレイ法により解析した。DNA アレイには CLONTECH 社の Atlas Mouse 1.2 Array I および Atlas Mouse 1.2 Array II を用い、2,352 遺伝子の発現量を調べ比較検討を行った。

3. 研究成果

(1) ラット初代培養細胞における RYK 発現細胞系譜の解析

これまでの結果から、初代培養細胞において RYK は MAP2 陽性のニューロンで発現していること、またミクログリアのマーカーである ED1 陽性細胞では発現していないことが明らかになっている。今回はミクログリア、すなわち type-1 および type-2 アストロサイトとオリゴデンドロサイト、また type-2 アストロサイトとオリゴデンドロサイトの前駆細胞である O-2A 前駆細胞における RYK の発現をマーカータンパク質との二重免疫染色法により検討した。その結果、アストロサイトのマーカーである GFAP 陽性細胞のほとんどが RYK を発現していなかったが、少数は RYK を発現しており、それらは形態的には type-2 アストロサイトに特徴的な多角形で複数の突起を持つ細胞であった (図 1a)。そこで type-2 アストロサイトおよび O-2A 前駆細胞のマーカーである A2B5 抗体と抗 RYK 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、A2B5 陽性細胞のうち多くが RYK を発現していることが明らかになった (図 1b)。またオリゴデンドロサイトのマーカーである GalC との二重免疫染色から、RYK は全てではないが多くのオリゴデンドロサイトで発現していることが示された (図 1c)。以上の結果から、RYK は type-1 アストロサイトでは発現していないが、type-2 アストロサイト、O-2A 前駆細胞およびオリゴデンドロサイトの多くで発現していると考えられる。

(2) RYK と Eph レセプターの結合

RYK のリガンドは何か、またどの細胞種がそれを発現しているのかという問題は、RYK の機能解明のために重要なテーマである。そこで RYK の細胞外ドメインと種々の細胞や組織との結合能を解析することにより、RYK のリガンドスクリーニング法の検討を試みた。しかし、RYK の細胞外ドメインの特異的結合能は観察されなかった。このことから、RYK の細胞外ドメイン単独ではリガンド結合能は持たない、または非常に低く、リガンドとの結合には細胞膜上で RYK と他のレセプターが結合する必要があるという可能性が考えられた。また最近、マウス RYK と Eph レセプターファミリーが結合し、それにより RYK がリン酸化されることを示す報告がなされた。そこでまず COS-7 細胞において RYK-FLAG および EphA4 または B3-HA を共発現させ、免疫沈降、ウエスタンブロットを行うことにより、これらの分子の結合を検討した。その結果、抗 FLAG 抗体による免疫沈降物に EphA4 または B3-HA のバンドが確認されたことから、RYK と EphA4 および B3 が結合していると考えられた (図 2a)。また抗 HA 抗体による免疫沈降物に RYK-FLAG のバンドが確認されたことから、RYK と EphA4 および B3 の結合が示された (図 2b)。

(3) Eph レセプターとの結合による RYK のリン酸化

RYK はチロシンリン酸化活性を持たないと考えられており、最近までそれ自身がリン酸化されるという報告もなされていなかった。そこで RYK が Eph レセプターと結合することによりリン酸化されるかどうかを確認するため、同様に COS-7 細胞において RYK-FLAG および EphA4 または B3-HA を共発現させ、免疫沈降、ウエスタンブロットを行うことにより、これらの分子のチロシンリン酸化を検討した。抗 FLAG 抗体による免疫沈降物に対して、抗リン酸化チロシン抗体でウエスタンブロットを行ったところ、RYK および EphA4 または B3 の分子量に相当するリン酸化チロシンのバンドが検出された (図 3)。COS-7 細胞において RYK のみを発現させてもチロシンリン酸化はみられないことから、RYK は Eph レセプターによりリン酸化されたと考えられる。

(4) 血清非存在下で誘導される神経細胞死に対するミクログリア細胞の影響

マウス大脳皮質神経細胞を血清非存在下で培養すると、神経細胞死が誘導される。このときミクログリア細胞が神経細胞死におよぼす影響について検討した。

培養 5~6 日目の神経細胞にミクログリア細胞を加え一晩培養後、培地を血清を含まない MEM 培地に交換し、さらに 48 時間培養した。その後、生細胞数の測定を WST アッセイにより行った。神経細胞のみのときに比べ、ミクログリア細胞を共存させたときは生細胞数が増加していた (図 4)。すなわち、ミクログリア細胞は血清非存在下において誘導される神経細胞死に対して抑制効果を示すことが分かった。

(5) ミクログリア細胞培養上清の神経細胞生存促進効果

ミクログリア細胞が神経細胞の生存を促進することから、ミクログリア細胞が神経保護因子を産生している可能性が考えられる。そこで、ミクログリア細胞の培養上清が神経生存促進作用を示すか検討した。サブコンフルエントのミクログリア細胞の培地を血清を含まない MEM 培地に交換し、48 時間培養した。その後、培養上清を回収しフィルター (0.22 μm) でろ過したものをミクログリア培養上清として用いた。

神経細胞をミクログリア細胞の培養上清中で培養すると、ミクログリア細胞と共培養したときと同様に、生細胞数の増加が確認された (図 5)。このことから、ミクログリア細胞の神経細胞保護作用は培養上清中に分泌される液性因子を介していることが分かった。

(6) 活性化ミクログリア細胞の神経細胞損傷効果

ミクログリア細胞はリポポリサッカライド (Lipopolysaccharide;LPS) やゼイモサン、また、血清アルブミンによって活性化され、細胞障害性をもつ活性酸素種などを産生することが知られている。特に、血清アルブミンは脳血管障害時に流出し、直接ミクログリアを活性化して神経炎症を引き起こしている可能性が考えられる。そこで、血清アルブミン存在下において、ミクログリア細胞が神経細胞に及ぼす影響について検討した。

ミクログリア細胞と神経細胞を共培養し、このとき血清アルブミンを添加した。LPS および IFN γ を添加した。神経細胞のみのときには、血清アルブミンを添加しても細胞死の指標である LDH 活性に変化はみられなかった。しかしながら、ミクログリアと共培養させたときには、血清アルブミンを添加した場合、LDH 活性の増加がみられた。すなわち、血清アルブミンによってミクログリア依存的に細胞死が引き起こされ

た(図6)。このとき、蛍光標識したミクログリアの形態を観察すると、無血清培地中では丸く萎縮しているが、血清アルブミン存在下では扁平になり突起を伸ばしている細胞が数多くみられた。そして、MAP2染色により48時間後にはほぼすべての神経細胞が死滅していることも確認された。

したがって、ミクログリア細胞は無血清培地では神経細胞の生存を促進するが、血清アルブミン存在下では非常に強い神経細胞障害作用を示すことがわかった。

(7) MG5細胞の神経細胞障害性条件下と神経細胞保護性条件下での mRNA 発現の比較

同一のクローンミクログリア株細胞 MG5 が培養条件によって全く異なる性質を神経細胞との共培養系で示したことから、特に細胞障害性の分子機構を理解するためにそれぞれの培養条件下での MG5 における遺伝子の発現を比較した。

解析の結果、神経保護作用を示す培養条件下で高発現を示す遺伝子群、神経障害性の培養条件下で高発現を示す遺伝子群がそれぞれ同定された(表1)。

神経細胞との共培養下では神経保護作用を示す培養条件でミクログリア株細胞を単独に培養するとミクログリア株細胞自身は細胞死を起こすことが判っている。したがって、この条件下で誘導される遺伝子群にはミクログリア細胞株自身の細胞死に関与する一連の遺伝子が含まれることが予測され、実際に activator of apoptosis harakiri (HRK) や fas-associated factor 1 (FAF1) の上昇が観察された。一方、神経保護作用を示す分子として、液性因子の存在が示唆されていることから、サイトカイン等液性因子の発現上昇が予想された。同定された遺伝子群の中ではそれに該当するものとして、文献上神経保護作用が報告されているインターロイキン11の発現上昇が観察された。

神経障害性培養条件下で上昇している遺伝子群には、マクロファージなどの活性化に伴い上昇することが知られている遺伝子 immunoresponsive gene 1 やケモカイン類 macrophage inflammatory protein 1 α および β (MIP-1 α , MIP-1 β)、monocyte chemoattractant protein 3 (MCP-3) などが含まれていた。このことから、神経障害性培養条件下ではミクログリアは活性化されていることが示唆される。しかし現時点では、上昇が観察された分子のうち、どの分子が直接神経障害に関与しているかの確認にはいたっていない。

4. 考察およびまとめ

これまでの解析から、RYK の発現は神経幹細胞およびニューロンで特に強いこと、また *in vivo* ではニューロン周辺のグリア細胞も RYK を発現しているものがあることが示されていた。今年度はこれらの RYK を発現しているグリア細胞の系譜を明らかにした。その結果、RYK は type-1 アストロサイトでは発現していないが、type-2 アストロサイト、O-2A 前駆細胞およびオリゴデンドロサイトの多くで発現していることがわかった。ニューロンとオリゴデンドロサイト両方で発現しているということから、RYK がホモフィリックに結合することにより、軸索伸長や再生に関与しているという可能性もある。またオリゴデンドロサイトの前駆細胞は *in vivo* において非常に高い移動能を持つことや、RYK の細胞外ドメインに含まれる leucine rich motifs が細胞間接着に関与するということから、RYK が細胞移動に関与している可能性も考えられる。type-2 アストロサイトに関しては、その生理的意義が明らかにされておらず、RYK のこれらの細胞における役割についても考察は困難である。

Eph レセプターは神経系で軸索伸長や神経堤細胞の移動、分節構造の形成などにおいて、多様な機能を持つことが明らかになっている分子群である。他グループからの報告および本研究により、RYK が Eph レセプターと結合し、それによりリン酸化されることが示された。これらのことは、RYK が神経系において Eph レセプターと共に重要な役割を担っていることを示唆している。これまでの結果は非神経系細胞を用いたものであり、今後は組織切片や神経系細胞などを用いた解析により、RYK が 10 種類以上の存在が確認されている Eph レセプターファミリーのうちどのタイプと結合しているのかを明らかにする予定である。また RYK-Eph レセプターのリガンドおよび細胞内シグナル伝達分子の同定を行っていく。

Eph レセプターはニューロンで発現し、軸索伸長に関与していることが知られており、また発生初期の神経系でも発現がみられることから、神経幹細胞でも発現している可能性が高い。しかし、オリゴデンドロサイト、type-2 アストロサイトおよび O-2A 前駆細胞における発現に関しては報告されておらず、これらの細胞においてはその他のレセプターが RYK と結合している、または RYK 単独で機能している可能性も考えられる。あるいはこれらの細胞において Eph レセプターが発現して RYK と結合し、これまで知られていない機能をもつ可能性もあり、興味深い。

ミクログリア株細胞MG5と初代培養神経細胞の共培養系を利用して、MG5細胞の培養条件による神経細胞への影響を検討した。無血清培養条件下ではMG5細胞との共存によって神経細胞の生存は促進された。

このとき、神経細胞のみならずアストロサイトの生存あるいは増殖も促進していた。したがって、神経細胞の生存促進効果は神経細胞に対して直接的なものである可能性とアストロサイトを介したものである可能性の両方が考えられる。ミクログリア細胞の培養上清にも神経細胞生存促進作用がみられた。このことから、ミクログリア細胞は液性神経保護因子を産生し、細胞外に分泌していると考えられる。そして、この神経保護作用をもつ液性因子の産生には、特に神経細胞あるいはアストログリアとの接触は必要とされていないと考えられた。

一方、傷害時の炎症性神経傷害の*in vitro*モデルとして血清アルブミンによるミクログリアを介した神経傷害の評価系を共培養系を応用し確立した。この系では、ミクログリア依存の神経細胞死の誘導が観察され、血清アルブミンによって活性化されたミクログリアは、共培養系において非常に強い神経損傷作用を示すことが確認された。血清アルブミンが脳血管障害時にミクログリアを直接活性化する可能性が示されたことから、これは神経炎症モデルとして保護薬の評価に有効な*in vitro*の系であると考えられた。

さらに、ミクログリアによる神経障害に関する分子機構について検討を進めるため条件の最適化を進め、神経障害性および神経保護性の性質を示す条件下での遺伝子発現の差異を DNA アレイ法によって検討した結果、数十種の遺伝子発現に差異を発見した。この成果は今後、神経障害に対し保護作用を持つ薬剤の発見及び開発の過程において有用な情報ではある。しかし、同定された遺伝子群にはその機能が既知のものもまた未知のものも含まれており、それぞれの遺伝子についての *in vivo* での動態の検証と遺伝子機能解析がさらに必要である。本研究課題のフレームでは残念ながらこれ以上の解析を完遂することはできなかったが、今後の興味深い課題を提供できたと考える。

6. 研究発表

- Fernando L.-Redondo, Nakajima, K., Honda, S. and Kohsaka, S.: Glutamate transporter GLT-1 is highly expressed in activated microglia following facial nerve axotomy. *Mol. Brain Res.* 76 (2000) 429-435
- Harada, T., Harada, C., Nakayama, N., Okuyama, S., Yosha, K., Kohsaka, S., Matsuda, H. and Wada, K.: Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. *Neuron* 26 (2000) 533-541
- Hide, I., Tanaka, M., Inoue, A., Inoue, K., Ohsawa, K., Kohsaka, S. and Nakata, Y.: Extracellular ATP triggers TNF- α release from rat microglia. *J. Neurochem.* 75 (2000) 965-972
- Ohsawa, K., Imai, Y., Kanazawa, H., Sasaki, Y. and Kohsaka, S.: Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J. Cell. Sci.* 113 (2000) 3073-3084
- Machide, M., Kamitori, K. and Kohsaka, S.: Hepatocyte growth factor-induced differential activation of phospholipase C γ 1 and phosphatidylinositol 3-kinase is regulated by tyrosine phosphatase, SHP-1 in astrocytes. *J. Biol.Chem.* 275 (2000) 31392-31398
- Nakajima, K., Honda, S., Tohyama, Y., Kurihara, T. and Kohsaka, S.: Ceramide-enhanced urokinase-type plasminogen activator (uPA) release is mediated by protein kinase C in cultured microglia. *Glia* 32 (2000) 226-233
- Nakajima, K., Honda, S., Nakamura, Y., Lopez-Redondo, F., Yamato, M., Kikuchi, A., Okano, T. and Kohsaka, S.: Intact microglia are cultured and non-invasively harvested without pathological activation using a novel cultured cell recovery method. *Biomaterials* (2001) in press
- Ohsawa, I., Takamura, C and Kohsaka, S.: Fibulin-1 binds the amino-terminal head of β -amyloid precursor protein and modulates its physiological function. *J. Neurochem.* (2001) in press
- Honda, S., Sasaki, Y., Ohsawa, K., Imai, Y., Nakamura, Y., Inoue, K. and Kohsaka, S.: Extracellular ATP or ADP induces chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J. Neurosci.* (2001) in press

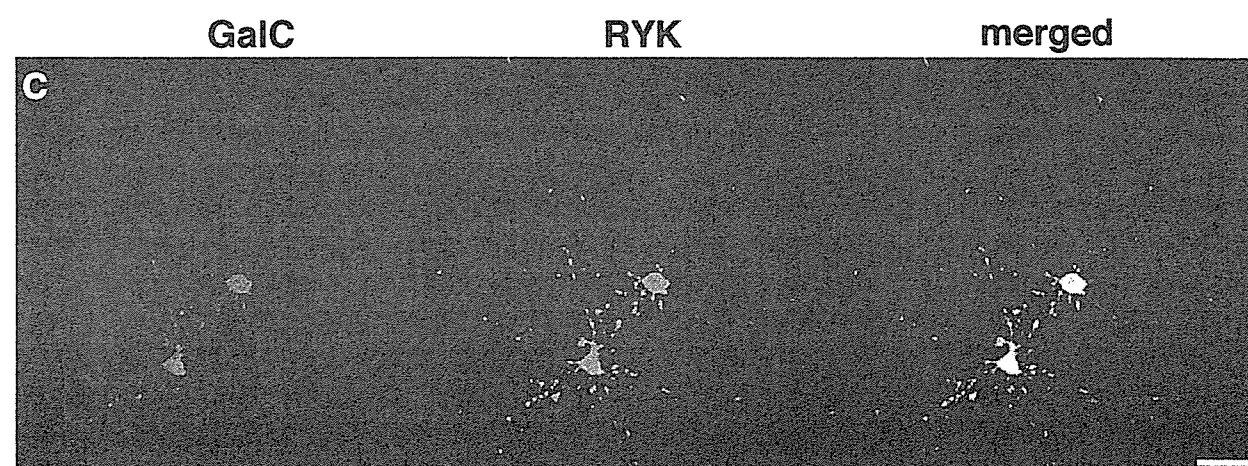
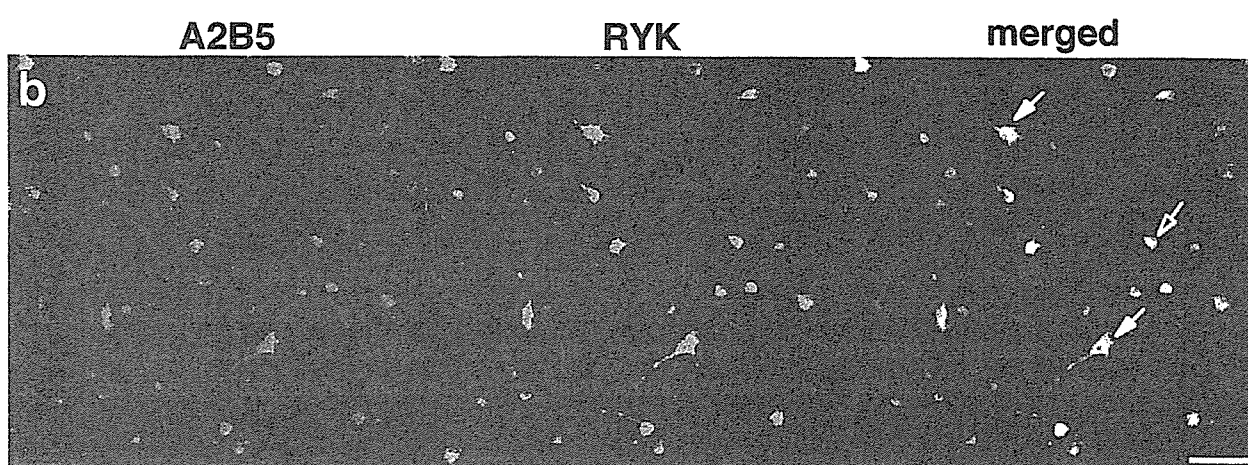
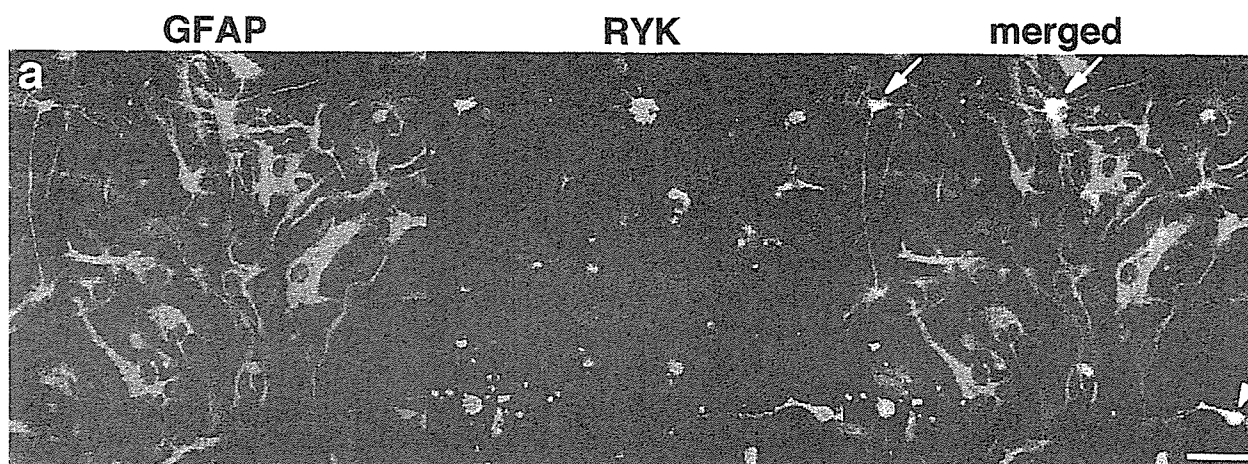


図1 初代培養細胞におけるRYKの発現

(a) GFAP陽性細胞のうち、突起を持った細胞（矢印）がRYK陽性であった。形態的にこれらはtype-2アストロサイトであると考えられた。

(b) A2B5陽性細胞のうち多くがRYKを発現していた。それらの中にはtype-2アストロサイトに特徴的な多角形で長い突起を持つ細胞（矢印）と、O-2A前駆細胞に特徴的な小型で短い突起を持つ細胞（白ぬき矢印）がみられた。

(c) GalC陽性細胞の多くがRYKを発現していた。

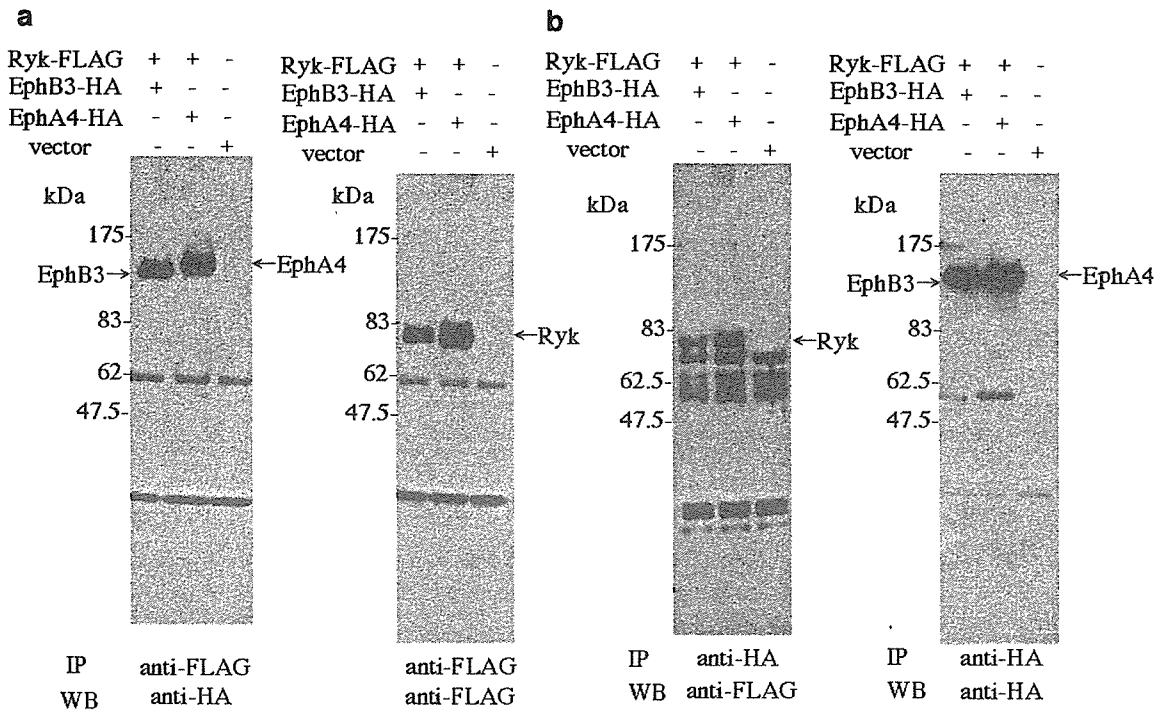


図2 RYKとEphレセプターの結合

(a) COS7細胞にRYKFLAGとEphB3またはEphA4を共発現させ、抗FLAG抗体で免疫沈降後、抗HAまたは抗FLAG抗体でウエスタンブロットを行った。

(b) 同様に共発現を行い、抗HA抗体で免疫沈降後、抗HAまたは抗FLAG抗体でウエスタンブロットを行った。

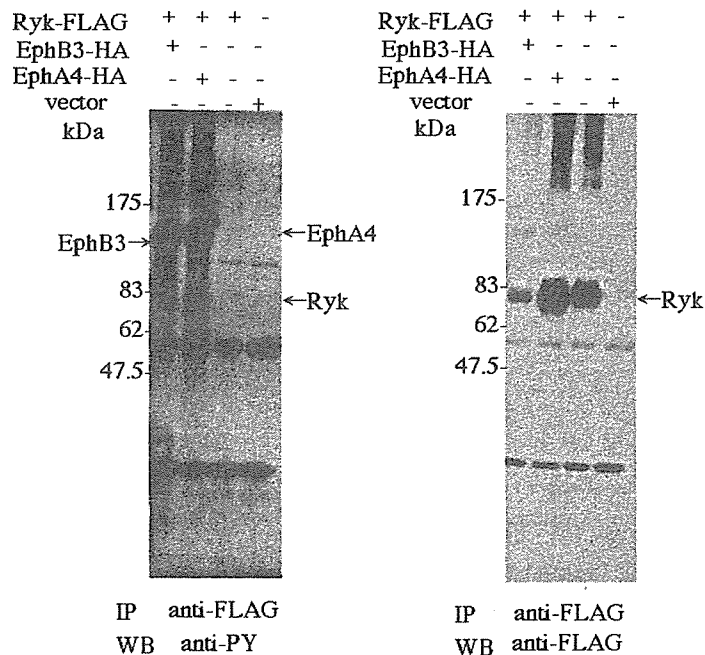


図3 Eph受容体によるRYKのリン酸化

RYKFLAGとEphB3HAまたはEphA4HAを共発現させた細胞のみでRYKのリン酸化がみられた。RYKFLAGを単独で発現させた細胞ではRYKのリン酸化はみられなかった。

同じメンブレンに対して抗FLAG抗体でウエスタンブロットを行い、RYKFLAGの発現を確認した。

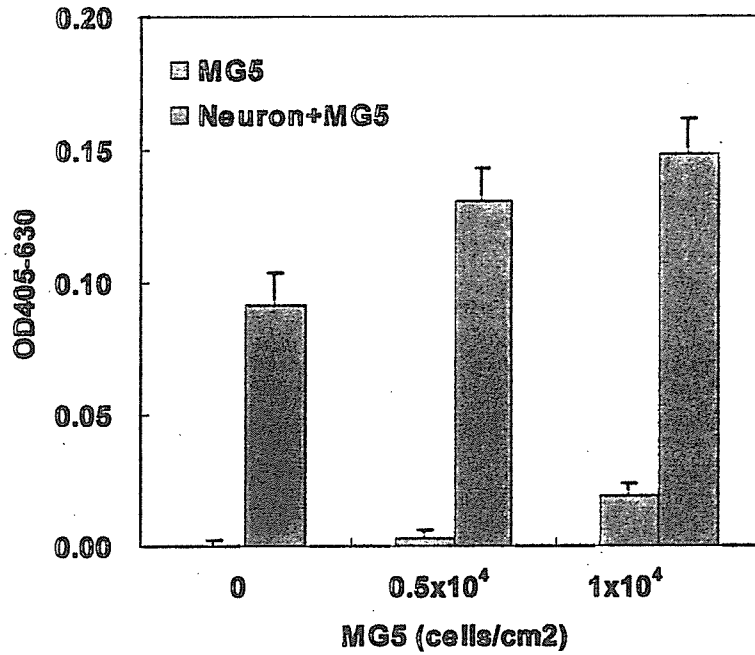


図4. ミクログリア細胞の神経細胞生存促進作用
 ミクログリア細胞のみ(□)、神経細胞とミクログリア細胞(■)を無血清培地で48時間培養後、生細胞数をWST法により測定した。mean±SD

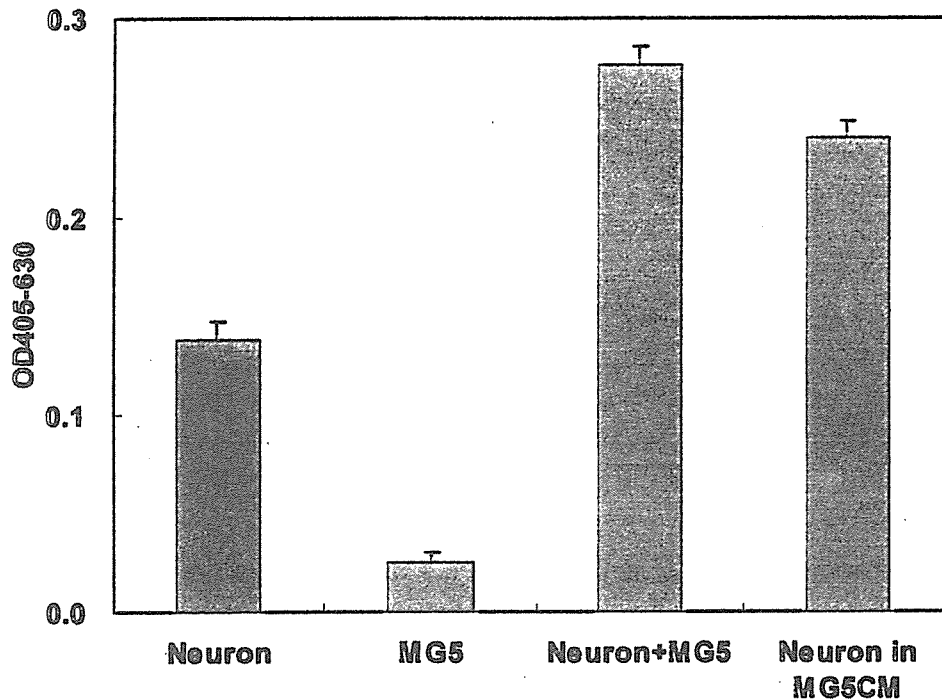


図5. ミクログリア細胞培養上清の神経細胞生存促進作用
 マウス初代培養神経細胞をミクログリア細胞存在下、非存在下無血清培地であるいはミクログリア細胞の培養上清中で48時間培養後、生細胞数をWST法により測定した。(mean±SD)

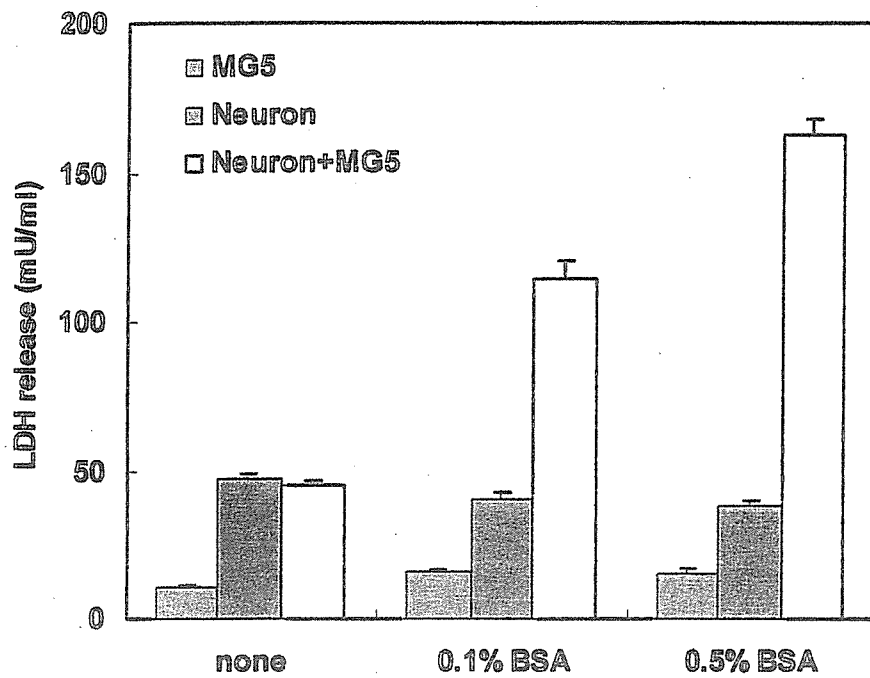


図6. 血清アルブミンを添加時のミクログリア細胞の神経細胞障害作用
 ミクログリア細胞のみ(■)、神経細胞のみ(▨)、神経細胞とミクログリア細胞(□)
 を無血清培地中に血清アルブミンを添加し、48時間培養した後、死細胞より放出される
 培養上清中のLDH活性を測定した。mean±SD

表 1 DNA アレイ法によって特定された神経細胞保護性(C1)と神経細胞障害性(S1)培養条件下でのマイクログリア遺伝子発現の変化

#	Gene	Genbank #	Spot Intensity		RATIO
			C1	S1	
1	gap junction beta 4 protein (GJB4); connexin 31.1 (CXN31.1; CX31.1)	M91236	28	5	5.6
2	msh-like homeobox protein 3 (MSX3)	U62523	20	5	4.0
3	insulin promoter factor 1 (IPF1); islet/duodenum homeobox protein 1 (IDX1); somatostatin transactivating factor 1 (STF1); pancreas/duodenum homeobox protein 1 (PDX1)	X74342	17	3	5.7
4	zinc finger protein GLI3	X95255	15	3	5.0
5	cAMP responsive element binding protein 1	M95106	17	1	17.0
6	tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3; TNFIP3); A20 zinc finger protein	U19463	12	3	4.0
7	SA2 NUCLEAR PROTEIN	AJ002636	17	1	17.0
8	butyrate response factor 1	M58566	50	10	5.0
9	POU domain (class 2) associated factor 1	U43788	42	5	8.4
10	G2/mitotic-specific cyclin B1 (CCNB1; CYCB1); CCN2	X64713	20	5	4.0
11	fas-associated factor 1 (FAF1)	U39643	16	3	5.3
12	activator of apoptosis harakiri (HRK); neuronal death protein 5 (DP5); BID3	D83698	33	5	6.6
13	Sentrin; ubiquitin-like protein SMT3C; ubiquitin-homology domain protein PIC1; UBL1; SUMO-1; GAP modifying protein 1; GMP1	AF033353	23	5	4.6
14	transforming growth factor beta receptor 1 (TGF-beta receptor 1; TGFR1); ESK2	D25540	32	5	6.4
15	interferon-gamma receptor	M28233	25	5	5.0
16	inhibin beta-C precursor (INHBC); activin beta-C subunit	U95962	28	5	5.6
17	INTERFERON BETA PRECURSOR (IFN-BETA)	K00020	13	3	4.3
18	interleukin 11 (IL-11)	U03421	10	1	10.0
19	proto-oncogene tyrosine-protein kinase fyn	U70324	17	3	5.7
20	serine proteinase inhibitor 3 (SPI3)	U25844	180	32	5.6
21	CDC42 GTP-binding protein; G25K	U37720	12	3	4.0
22	Calmodulin	X61432	28	5	5.6
23	47-kDa heat shock protein precursor (HSP47); collagen-binding protein 1 (CBP1); serine protease inhibitor J6	J05609	10	0	Down
24	phospholipase A2; 14-3-3 protein zeta/delta; protein kinase C inhibitor protein 1 (KCIP1); mitochondrial import stimulation factor S1 subunit; YWHAZ	D78647	1245	219	5.7
25	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRTase; HPRT)	J00423	16	3	5.3
					UP
26	fos-related antigen 2 (FRA2); fos-L2	X83971	4	18	4.5
27	HSP86; heat shock 86-kDa protein	M36830	3	12	4.0
28	SODIUM- AND CHLORIDE-DEPENDENT GLYCINE TRANSPORTER 1 (GLYT-1).	X67056	18	80	4.4
29	tumor necrosis factor receptor 2 precursor (TNFR2); TNFRSF1B2	M59378	250	1026	4.1
30	monotype chemoattractant protein 3	S71251	52	376	7.2
31	macrophage inflammatory protein 1 beta (Act 2)	M35590	366	1781	4.9
32	cytokine inducible SH2-containing protein 3 (CISH3); suppressor of cytokines signaling protein 3 (SOCS3)	U88328	18	85	4.7
33	CD84 antigen	AF043445	3	17	5.7
34	lysosomal membrane glycoprotein 2	J05287	3	13	4.3
35	immunoresponsive gene 1	L38281	8	57	7.1
36	lipocalin 2	X14607	83	503	6.1
37	major urinary protein 1	M16355	7	30	4.3
38	translocator of inner mitochondrial membrane 44	U69898	0	11	UP
39	ceruloplasmin	U49430	3	19	6.3
40	endoplasmic reticulum protein	M73329	3	16	5.3
41	DEAD (aspartate-glutamate-alanine-aspartate) box polypeptide 5	X65627	1	12	12.0
42	small inducible cytokine B2 (SCYB2); macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2-alpha; MIP2A)	X53798	2	17	8.5
43	small inducible cytokine A2	J04467	14	172	12.3
44	small inducible cytokine A3 precursor (SCYA3); macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP1A); TY-5; SIS-alpha; heparin-binding chemotaxis protein; L2G25B	M23447	34	238	7.0
45	low-density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1	D00622	435	1064	2.4
46	lipocortin 1	M24554	3	19	6.3

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社