

RET 蛋白に BMTS を作用させた後、蛋白質のチロシンリン酸化や RET 蛋白の BMTS との結合による重合化をウエスタンブロット法で解析し、RET のキナーゼ活性を試験管内キナーゼアッセイにより測定した。

C. 研究結果

(1) RET 遺伝子を移植した NIH3T3 細胞に BMTS を作用させると、細胞内蛋白質のチロシンリン酸化が誘導された。その時、(2) BMTS は、RET 分子を重合させて、そのキナーゼ活性を増強させた。(3) 細胞外ドメインを欠失するミュータント分子の遺伝子である RET-PTC-1 を移植した細胞では、BMTS によるキナーゼ活性の増強は認められなかった。一方、(4) 免疫沈降法で分離した RET-PTC-1 ミュータント分子に試験管の中で直接 BMTS を作用させたところ、キナーゼ活性が増強した。

D. 考察

本年度は、蛋白質システインと選択的に強い親和性を持つ化学物質、BMTS の標的となるシステイン残基が、細胞表面と細胞内の両方に存在すること、いずれの標的システインに BMTS が作用した場合にも、RET チロシンキナーゼの活性は増強すること、を示した。現在までに、水銀、砒素、カルボニル化合物などを用いた実験の結果から、チロシンキナーゼの活性化という一つの指標で見た場合にも、酸化ストレスやカルボニル化合物の作用点は、一つではないことが間接的に示唆されてきたが、今回、システインを介する蛋白質の架橋である BMTS の作用を解析した結果から、酸化ストレスの作用点は、細胞表面と細胞内の両方にあることが証明された。なお、BMTS が結合する RET 分子の細胞外ドメインの上のシステインは、細胞膜の直上に位置す

るシステインに富む領域であろうと推定されるが、もともと分子内で S-S 結合をつくるこの領域のシステインも酸化ストレスの標的になり得ることを示すものといえる。この成績は、加齢に伴って細胞に反復作用する酸化ストレスが複数の異なる機序で老化にかかわるシグナルを起動し得ることを示す。

E. 結論

システインとの選択的な結合を介する蛋白質の架橋剤である BMTS を、受容体型チロシンキナーゼ RET を発現する細胞に作用させて影響を調べた実験の結果から、シグナルの誘導にかかわる酸化ストレスの標的は、細胞の表面と内部の両方にあると結論された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakashima, I., Takeda, K., Kawamoto, Y., Okuno, Y., Kato, M., Akhand, A.A. and Suzuki, H.: The highly conserved MXXCW motif initially switches on protein tyrosine kinase activity. Proceeding of the 11th Biennial

Meeting of the Society for Free Radical Research International, in press.

Liu, W., Akhand, A.A., Takeda, K., Kawamoto, Y., Itoigawa, M., Kato, M., Suzuki, H., Ishikawa, N.,

Nakashima, I.: Protein phosphatase 2A-linked and -unlinked caspase-dependent pathways for downregulation

of Akt Kinase triggered by 4-hydroxynonenal.

Cell Death Different., in press.

Nakashima, L., Liu, W., Akhand, A.A., Takeda, K., Kawamoto, K., Kato, M. and Suzuki, H.:

4-Hydroxynonenal triggers multistep signal transduction cascades for suppression of cellular functions. *J. Mol. Asp. Med.*, in press.

Hossain, K., Akhand, A.A., Kawamoto, Y., Du, J., Takeda, K., Wu, J., Yoshihara, M., Tsuboi, H., Kato, M.,

Suzuki, H. and Nakashima, L.: Arsenite-induced membrane rafts-dependent Akt activation of which inhibition accelerates caspase activation. *Free Rad. Biol. Med.*, in press.

Du, J., Cai, S., Suzuki, H., Akhand, A. A., Ma, X., Takagi, Y., Miyata, T., Nakashima, L. and Nagase, F.:

Involvement of MEKK1/ERK/p21Waf1/Cip1 signal transduction pathway in inhibition of IGF-1-mediated cell growth response by methylglyoxal. *J. Cell. Biochem.*, in press.

Nakashima, L., Du, J., Yokoyama, T., Kawamoto, Y., Ohkusu-Tsukada, K. and Isobe, K.: Transgenic Mouse Models for Immunosenescence. *Current Genomics*, in press.

Akhand, A.A., Ikeyama, T., Akazawa, S., Kato, M., Hossain, K., Takeda, K., Suzuki, H., Takahashi, M. and Nakashima, L.: Evidence of both cell surface and intracellular cysteine targets of protein modification for activation of RET kinase. *Biochem. Biophys.*

Res. Commun. 292:826-831, 2002.

Nakashima, L., Kato, M., Akhand, A.A., Suzuki, H., Takeda, K., Hossain, K. and Kawamoto, Y.:

Redox-linked signal transduction pathway for protein tyrosine kinase activation. *Antioxid. Redox Signal.* 4:517-531, 2002.

Nakashima, L., Suzuki, H., Akhand, A.A. and Kato, M.: Redox control of T cell death. *Antioxid. Redox Signal.* 4:353-356, 2002.

Akhand, A.A., Du, J., Liu, W., Hossain, K., Miyata, T., Nagase, F., Kato, M., Suzuki, H. and Nakashima, L.:

Redox-linked cell surface-oriented signaling for T-cell death. *Antioxid. Redox Signal.* 4:445-454, 2002.

Ma, X., Du, J., Nakashima, L. and Nagase, F.: Menadione biphasically controls JNK-linked cell death in leukemia Jurkat T cells. *Antioxid. Redox Signal.* 4:371-378, 2002.

Kamei, K., Nimura, Y., Nagino, M, Aono, K. and Nakashima, L.: Surgical stress reduces mortality from endotoxin shock, *Langenbeck's Arch. Surgery.* 386:512-517, 2002.

Wu, J., Suzuki, H., Akhand, A.A., Zhou, Y-W., Hossain, K. and Nakashima, L.: Modes of activation of mitogen-activated protein kinases and their roles in

cepharantine-induced apoptosis in human leukemia cells. *Cell Signal*. 14:509-515, 2002.

Kato, M., Takeda, K., Kawamoto, Y., Iwashita, Y., Iwashita, T., Akhand, A.A., Senga, T., Yamamoto, M., Sobue, G., Hamaguchi, M., Takahashi, M. and Nakashima, I.: Repair by Src kinase of function-impaired RET with multiple endocrine neoplasia type 2A mutation with substitutions of tyrosines in the carboxyterminal kinase domain for phenylalanine, *Cancer Res*. 62:2414-2422, 2002.

Hayakawa, A., Wu, J., Kawamoto, Y., Zhou, Y.W., Tanuma, S., Nakashima, I. and Suzuki, H.: Activation of caspase-8 is critical for sensitivity to cytotoxic anti-Fas antibody-induced apoptosis in human ovarian cancer cells. *Apoptosis* 7:107-113, 2002.

Koike C, Fung JJ, Geller DA, Kannagi R, Libert T, Luppi P, Nakashima I, Profozich J, Rudert W, Sharma SB,

Starzl TE, Trucco M. Molecular basis of evolutionary loss of the alpha 1,3-galactosyltransferase gene in Higher primates. *J. Biol. Chem*. 277:10114-20, 2002

2. 学会（国際学会）発表

Nakashima I, Liu W and Akhand AA: 4-hydroxynonenal triggers a novel signal transduction cascade for a positive feedback regulation of caspase activation. First International Meeting of the HNE-Club, Oral communication of selected posters. Faculty of Natural Science, University of Salzburg,

Nakashima I, Takeda K, Kawamoto Y, Kato M, Akhand AA and Suzuki H: A conserved cysteine residue in the catalytic domain plays a key role in activation of protein tyrosine kinase RET. XIth Meeting of the Society for Free Radical Research International, Redox regulation in cellular signaling: glutathionylation/protein thiols (selected oral presentation). Rene Descartes University, Paris, France, July 16-20, 2002.

分担研究報告書
老化促進ストレスと神経細胞死
分担研究者 祖父江 元
(名古屋大学大学院医学系研究科神経内科、教授)

研究要旨：球脊髄性筋萎縮症（SBMA）は、アンドロゲン受容体（AR）遺伝子内の CAG リピートの異常延長により、運動ニューロンなどが特異的に変性死に陥る。AR 遺伝子の CAG リピートが蛋白質に翻訳され、異常延長したポリグルタミン鎖になることで、変異 AR が新たな毒性を獲得することが判明している。我々は、chicken β -actin プロモーターの調節下で異常延長した CAG リピートをもつヒトの全長の AR 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作成し、雄には去勢術を雌にはテストステロン投与を施行し、去勢術には顕著な治療効果を認め、テストステロン投与には運動機能障害を増悪させる効果があることを見いだした。さらに、LHRH アナログ（leuprorelin）と、AR アンタゴニスト（flutamide）をこのマウスに投与し、leuprorelin では去勢と同等の運動機能改善効果がみられたが、flutamide では治療的効果は認められなかった。Hsp70 高発現マウスと雄 AR-97Q マウスとを交配することで double Tg を作成し、Hsp70 高発現によりマウスの運動機能は改善し、治療効果が認められた。

A. 研究目的

球脊髄性筋萎縮症（SBMA）は、アンドロゲン受容体（AR）遺伝子内の CAG リピートの異常延長により、運動ニューロンなどが特異的に変性死に陥る。AR 遺伝子の CAG リピートが蛋白質に翻訳され、異常延長したポリグルタミン鎖になることで、変異 AR が新たな毒性を獲得することが判明している。SBMA では変異 AR からなる核内封入体(NI)とびまん性核内集積が特徴的な病理所見であり、この NI に転写因子などが取り込まれて細胞機能障害を来すことなどが病因として想定され、変異 AR が核内へ移行することが病態を形成する上で重要な意味を持つ。また、ポリグルタミン鎖の延長した病因蛋白は折り

たたみ異常を持ち（misfold 蛋白）、つまり 3 次元構造が変化して病原性を発揮していることも想定されている。培養細胞モデルにおいては、分子シャペロンを高発現させることによって NI の形成と細胞死の抑制が可能である。私達が作成した CAG リピートが異常延長したヒト androgen 受容体(AR)を発現するトランスジェニックマウス(Tg)では、雄の去勢術に顕著な治療効果を認めた。今年度は、Tg に HSP70 を高発現させ、また、精巣からのテストステロン分泌を去勢と同等に抑制する LHRH アナログ（leuprorelin）を投与して、その有効性を検討した。

B. 研究方法

Chicken β -actin プロモーターの調節下で異常延長した CAG リピートをもつヒトの

全長の AR 遺伝子を発現する Tg を作成し、雄 Tg に対し去勢術、雌 Tg に対し testosterone enanthate の皮下投与を施行した。また、抗アンドロゲン療法剤である LHRH アナログ (leuprorelin) とアンドロゲンアンタゴニスト (flutamide) も雄 Tg に皮下投与し、効果を検討した。Tg と HSP70 高発現マウスおよびその littermate とのダブルトランスジェニックマウスを作成し、運動機能、寿命、体重変化、病理学的所見、変異 AR の生化学的解析などを比較検討した。

(倫理面への配慮)

実験中にはマウスに苦痛を与えぬよう十分に配慮した。

C. 研究結果

Tg の表現型 ; チキン β -アクチンプロモーター 調節下に 24CAG ないし 97CAG を有するヒト AR を pCAGGS ベクターにサブクローニングし、microinjection にて Tg を作成し、24 繰り返しのマウス (AR-24Q) 3 系統と、97 繰り返しのマウス (AR-97Q) 5 系統とを得た。AR-24Q のマウスはいずれも無症状であったが、AR-97Q の 5 系統の内 3 系統では進行性の運動障害が認められた。症状は雄の AR-97Q マウスにおいて重篤かつ急速に進行したが、雌では症状が認められないか、あっても雄より遥かに軽症であった。ウエスタンプロットでは、変異 AR の高発現が認められ、変異 AR モノマーに加え、ゲルの上部に留まる蛋白複合体と切断された変異 AR 断片も認めた。変異蛋白は脊髄、脳、心、筋および膵などに認めた。ゲル上部に留まる

変異蛋白の発現は雄でより大量に認め、その殆どは核分画に存在していた。transgene の mRNA レベルでの発現の性差は明らかでなかった。AR-24Q マウスでは異常な病理所見は認められなかったが、AR-97Q マウスにおいては、異常延長したポリグルタミンに対する特異的抗体 (1C2) による免疫染色で、核のびまん性染色や核内封入体が脊髄、大脳、小脳、脳幹や後根神経節の神経細胞および心や筋、膵などの非神経組織に認められた。神経組織では運動ニューロンの核に最も著明な核のびまん性染色や核内封入体が認められた。核の染色は雄でより高頻度に認められ、症状やウエスタンプロットの性差に一致する結果が得られた。電子顕微鏡による 1C2 の免疫染色では核内封入体に対応する顆粒状凝集体と、びまん性染色に対応する微細凝集体とが観察された。筋病理では、雄マウスにおいて顕著な混合性病変が認められた。細胞脱落は明らかでなかったが、脊髄運動ニューロンの断面積や脊髄前根の大径線維の軸索径は、雄 AR-97Q マウスにおいて有意に縮小していた。雄 AR-97Q マウスの去勢による治療 ; 症状や病理所見の性差に基づき、雄の AR-97Q マウスに去勢を施行した。対照群 (sham operation) では著しい運動機能障害を認めしたが、去勢された AR-97Q マウスでは運動障害はほとんど認めなかった。ウエスタンプロットでは、ゲル上部に留まる変異 AR よりなる蛋白複合体が、対照群に比べ去勢マウスにおいて著明に減少し、核分画における変異 AR もまた、去勢マウスにおいて著明に減少した。1C2 免疫染色における核のびまん性染

色や核内封入体は、去勢により劇的に改善した。これらの結果は、去勢により変異 AR の核内移行を抑制したことを意味する。血清テストステロン値は去勢により測定感度以下に低下した。

雌 AR-97Q マウスに対するテストステロン投与；次に症状の乏しい雌 AR-97Q マウスにテストステロンを投与すると、雌 AR-97Q マウスの運動機能は著しく低下した。ウエスタンブロットおよび免疫染色では核内の変異 AR がテストステロン投与群において著明に増加した。

雄 AR-97Q マウスに対する薬剤治療；去勢による雄 AR-97Q マウスの治療効果に基づき、抗アンドロゲン療法剤である LHRH アナログ (leuprorelin) とアンドロゲンアンタゴニスト (flutamide) の効果を検討した。LHRH アナログの投与では去勢と同等の表現型抑制効果が認められ、運動機能や病理所見は著しく改善したが、アンドロゲンアンタゴニストの投与では治療効果は認められなかった。さらに leuprorelin による治療では、初期の一過性のテストステロン上昇に同期して運動機能の軽度低下が認められ、その後著しい改善がみられた。抗ポリグルタミン抗体を用いた病理学的検索でも、投与初期には核のびまん性染色が増加したものの、投与継続にて減少し、NI のみが残存する傾向が認められた。

Hsp70 高発現による治療；分子シャペロンである Hsp70 は、構造異常を有する変異タンパクを refolding することでその毒性を軽減することが示唆されている。Hsp70 高発

現マウスと雄 AR-97Q マウスとを交配した double Tg では、Hsp70 高発現によりマウスの運動機能は改善し、治療効果が認められた。これらの改善効果は、HSP70 発現に関し homozygotes で顕著であった。病理学的には double Tg の脊髄、筋では Hsp70 と変異 AR が核内に共存し、びまん性核内 AR 集積及び NI が減少した。Western blot でも脊髄や筋で HSP70 の高発現を確認し、変異 AR の減少効果が得られ、変異 AR モノマーも減少していた。

D. 考察

トランスジェニックマウスに対する内分泌学的介入

我々の作成した 97CAG を有するヒト AR を有する Tg は、進行性の運動障害と神経病理所見を呈し、性差を認めた。これより、その病態にリガンドであるテストステロンが深く関与していることが示唆された。去勢は雄 Tg の表現型を著しく改善し、ウエスタンブロットや免疫染色では核内に局在する変異 AR が去勢によって劇的に減少した。これは、去勢によるテストステロン減少が変異 AR の核内移行を抑えるためと考えられる。他方、雌 Tg の症状は軽微であったが、テストステロン投与により著明に増悪し、テストステロン増加による変異 AR の核内移行促進が原因と考えられた。また、LHRH アナログは精巣からのテストステロン分泌を抑制することで去勢と同様に変異 AR の核内移行を抑制し、SBMA の病態を著しく抑制するが、アンドロゲンアンタゴニストは、AR 機能は抑制する

もののその核内移行は抑制しないため、表現型を改善できないと考えられた。さらに leuprorelin による治療では、初期の一過性のテストステロン上昇に同期して運動機能の軽度低下が認められ、その後著しい改善がみられた。抗ポリグルタミン抗体を用いた病理学的検索でも、投与初期には核のびまん性染色が増加したものの、投与継続にて減少し、核内封入体のみが残存する傾向が認められた。これらの結果は、SBMA が leuprorelin により可逆的に治療されうる可能性を示唆するものと考えられる

トランスジェニックマウスに対する分子シャペロンによる治療

Hsp70 は、変異 AR を refolding することで毒性を軽減するのみならず、ubiquitin-proteasome 系を介した分解を促進することで、結果として核内に蓄積する変異 AR の量を減少させ、病態を改善させるものと考えられた。

E. 結論

SBMA を始めとするポリグルタミン病では、変異蛋白が cleavage などの修飾を受け核内に移行し、凝集していくことで転写因子などのタンパク相互作用を介して病態を形成するものと考えられている。変異蛋白の核内移行を抑制する我々の方法は病態に根ざした治療法であり、他のポリグルタミン病にも応用可能な方法と考えられる。ことに、LHRH アナログはすでに前立腺癌の治療薬として広く使用され、その安全性も確立されているこ

とから、SBMA の治療として有望と考えられる。我々は現在、その臨床試験を計画中である。ポリグルタミン病の治療法は、様々な方法を組み合わせて行うことになると考えられる。Hsp70 などの分子シャペロンも、高発現させることで治療効果を発揮できるものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Masahisa Katsuno, Hiroaki Adachi, Akito Kume, Mei Li, Yuji Nakagomi, Hisayoshi Niwa, Chen Sang, Yasushi Kobayashi, Manabu Doyu and Gen Sobue. Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* 35: 843-854, 2002.
2. Hiroaki Adachi, Masahisa Katsuno, Makoto Minamiyama, Chen Sang, Gerasimos Pagoulatos, Moriaki Kusakabe, Atsushi Yoshiki, Yasushi Kobayashi, Manabu Doyu and Gen Sobue. HSP70 chaperone over-expression ameliorates phenotypes of the SBMA transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant AR protein. *J Neurosci* 2003. (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・教授)

要旨：本研究は神経変性に関わる刺激が加わったときのミクログリアの反応を *in vitro* と *in vivo* 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しておこなうものである。前年度までの研究によりミクログリアには性質の異なるサブタイプがあり、刺激して活性化された場合に神経保護作用を示すものと傷害された神経の細胞死を促進するものがあることがわかった。このとき両者のミクログリアでの ROS の産生量が大きく異なることも同定した。さらに、神経保護的に作用しているミクログリアに HIV 由来 nef 遺伝子を導入すると ROS 産生量が増大し、神経傷害作用を示すように変化することがわかった。そこで本年度は nef 遺伝子産物と ROS 産生量およびミクログリアの神経細胞傷害性との関わりを詳細に検討するために、nef 遺伝子導入ミクログリアをクローン化し、nef 発現量の差による性質の違いを検討した。

キーワード：ミクログリア、活性酸素、HIV 由来 nef

1. 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
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。最近アルツハイマー病な
どの神経変性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
究は神経変性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。

前年度までの研究によりミクログリアには
性質の異なるサブタイプがあり、刺激して活
性化された場合に神経保護作用を示すものと
傷害された神経の細胞死を促進するものとが
あることがわかった。このとき両者のミク
ログリアでの ROS の産生量が大きく異なるこ
とも同定した。さらに、神経保護的に作用し
ているミクログリアに HIV 由来 nef 遺伝子
を導入すると ROS 産生量が増大し、神経傷
害作用を示すように変化することがわかった。
そこで本年度は nef 遺伝子産物と ROS 産生
量およびミクログリアの神経細胞傷害性との
関わりを詳細に検討するために、nef 遺伝子
導入ミクログリアをクローン化し、nef 発現
量の差による性質の違いを検討した。

2. 研究方法

- (1) ミクログリアの共培養での作用の解析：
神経細胞死のモデルとして 無血清時の
N18 のアポトーシスに注目し、一次培養
または株化ミクログリアの Ra2, 6-3, 6-1

と共培養したときの N18 の生存率の変化
を WST 法と PI 染色による FACS 分析で
無刺激およびミクログリア活性化条件で
検討した。さらに N18 の細胞死に対し
て保護的である Ra2 に HIV 由来 nef を
導入した細胞も共培養に用いた。

- (2) nef 発現 Ra2 細胞のクローン化：nef 遺
伝子を導入した Ra2 細胞を限界希釈法に
より TP96 プレートにまきこみ、単一細
胞播種が確認できた well から得られた細
胞 15 種類を得た。それぞれの細胞につい
て nef mRNA の発現量と蛍光抗体染色-
FACS 定量法により nef 発現量を定量し
た。このうち、nef 高発現細胞 4a と nef 低
発現細胞 12d を実験に用いた。

- (3) 活性酸素産生量の定量：無刺激および活
性化条件での一次培養、株化ミクログリ
ア、nef 導入 Ra2 についてチトクローム
C 法で細胞外に放出される活性酸素を測
定し、細胞内活性酸素蛍光指示薬である
H2DCF を用いた FACS 分析により細胞
内活性酸素産生量を定量した。

3. 研究結果

Ra2 細胞に nef 遺伝子を導入すると、
GM-CSF 依存的な増殖はわずかに遅れるも
のの、増殖因子依存性そのものには影響が
無く、培地から GM-CSF を除去することによ
り Ra2 と同様に増殖が停止した。したがっ
て、nef の強制発現によって Ra2 細胞は悪性
の形質転換が起こらないことがわかった。一
方、神経細胞傷害モデルシステムで N18 神
経細胞株と共培養した場合、Ra2 は神経細胞

死に対して保護的であるのに対し、Ra2 に HIV 由来 nef 遺伝子を強制発現させた細胞は作用が逆転し、無血清によって誘導した N18 細胞死を促進する事がわかった

nef 遺伝子を強制発現したミクログリア細胞株 nefRa2 は nef タンパク質を発現していることが Western blot および蛍光抗体染色で確認できた。nef 導入によって Ra2 がもつ GM-CSF 依存的な増殖能は変化がみられず、培地から GM-CSF を除去すると増殖が停止した。

このとき、活性酸素産生量は神経細胞死を促進するものでは産生量が高いことがわかった。そこで、限界希釈法により nef Ra2 をクローン化し、nef 発現量が高い株 4a と低い株 12d を得た。それらの ROS 産生を測定したところ、nef 発現量に依存した ROS 産生の増大が観察できた。

4. 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つ

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できた。

一方で、ミクログリアは単離培養条件下では活性酸素、NO、蛋白分解酵素、アラキドン酸誘導体、興奮性アミノ酸、キノリン酸、サイトカイン、 β -アミロイドタンパクなど、多くの細胞障害性もしくは細胞毒生を持った物質を産生する。最近では interferon- γ により活性化されたミクログリアがアミロイドペプチドにより神経細胞障害性の物質を産生することが報告され、アルツハイマー病のような神経変性疾患の発症に深く関与している可能性が示されている。さらにいくつかのノックアウトマウスでは標的遺伝子がミクログリアの機能遺伝子として働いていることから、損傷に応答したミクログリアの活性化やそれにともなってみられる神経細胞死が見られなくなるという事実も知られている。

しかし in vivo において活性化ミクログリアの集積や増殖が観察されることが知られている脳虚血や神経線維切断による神経細胞の変性のモデルにおいて、損傷を受けていない神経細胞に対してミクログリアがアポトーシスを誘導する証拠はまったくない。むしろ、培養下では活性化ミクログリアは細胞毒性を持った因子を産生すると同時に多くの神経保護作用を持った因子も産生する。

今回の研究結果から、ミクログリアには役割の異なる複数のサブタイプが存在し、老化

促進ストレスの原因物質である活性酸素の産生システムが異なることが明らかになった。活性酸素産生量が多いミクログリアは障害を受けた神経細胞との共培養では神経細胞にとって毒性に働くが、活性酸素産生量が少ないミクログリアは反対に傷害を受けた神経細胞に保護的に働くことがわかった。また、神経細胞に保護的に働くミクログリアに HIV 由来遺伝子である nef を発現させると活性酸素産生量が増大すると同時に神経保護作用が無くなり、傷害神経にとって毒性に働くようになることがわかった。

我々は脳の一次培養から明確に分画できる2つのサブタイプを同定しており、それらは細胞表面抗原の発現や増殖因子依存性が異なるほか、刺激に対する感受性やその応答も異なり、活性化の調節メカニズムや役割などが異なったミクログリアであると考えられる。したがって、ミクログリアの両面性はひょっとしたら役割の異なるサブタイプが存在することで説明できるかも知れない。

5. まとめ

ミクログリアには Ra2 のような神経細胞に保護的な影響を与えるものと、6-1、6-3のように細胞死を誘導するものの2タイプが存在することが考えられ、その影響はミクログリアの ROS 生成能に相関する事が示唆された。さらに、神経細胞に保護的な影響を与えた Ra2 が HIV-1 Nef 蛋白の導入で逆の性質を示した結果から、HIV-1 Nef 蛋白の作用点が、神経細胞に与えるミクログリアの性質をコントロールする可能性が考えられた。

6. 研究発表

[論文発表]

- 5、 Sawada M, Imai F and Suzuki H. Brain-Specific Migration and Protective Roles in Brain Damage of Microglia. *Advance in Behavioral Biology*. 53:217-20. (2002)
- 6、 Ohara, Y., Himeda, T., Asakura, K., Sawada, M.: Distinct cell death mechanisms by Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection in microglia and macrophage. *Neurosci. Lett.* 327, 41-44, 2002.
- 7、 Salimi, K., Moser, K., Zassler, B., Reindl, M., Embacher, N., Schermer, C., Weis, C., Marksteiner, J., Sawada, M., Humpel, C.: Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances survival of GM-CSF dependent rat GMIR1-microglial cells. *Neurosci. Res.* 43, 221-229, 2002.
- 8、 Frederik Vilhardt, Olivier Plastre, Makoto Sawada, Kazuo Suzuki, Maciej Wiznerowicz, Etsuko Kiyokawa, Didier Trono, and Karl-Heinz Krause: The HIV-1 Nef protein and phagocyte NADPH oxidase activation. *J. Biol. Chem.* 277:42139-42143, 2002.
- 9、 Kenji F. Tanaka, Haruo Kashima, Hiromi Suzuki, Kenji Ono, Makoto Sawada: Existence of functional α_1 - and α_2 -adrenergic receptors on microglia. *J Neurosci. Res.* 70:232-237, 2002.

分担研究報告書

生体防御の異常と老化ストレスに関する研究

分担研究者 丸山光生

(国立長寿医療研究センター老化機構、室長)

研究要旨：老化に伴う免疫系の変化は高齢者の生体防御機能の低下や老化そのものに供なうストレスと密接に関わっていると考えられている。とりわけ、獲得免疫系の根幹をなす免疫記憶において、免疫記憶とよばれる原理（われわれの体が特定の病気を記憶し以後、再感染を防ぐことができる能力を有しているということ）は何百年も遡って知られていることだか、その記憶の維持に携わる細胞、分子機構と老化ストレスについては解明されていない点が多い。本分担研究では免疫記憶の維持に携わる細胞、分子機構について胚中心の機能に焦点をあて、記憶B細胞が誘導され、維持されていく間に特異的に働く分子を明らかにし、遺伝子改変動物個体での検証から老化ストレスとの因果関係の解明を試みる。具体的には、cDNA サブトラクションと *in vitro* キナーゼアッセイを組み合わせたスクリーニング法を用いて、胚中心 B 細胞で高発現している遺伝子群のうちシグナル伝達関連因子をコードする遺伝子の単離を行った。

A. 研究目的

人を含む生体は複雑な生体防御機構を構築し、恒常性を保っている。ストレス等による防御機構の破綻はひいては老化と深い連関があると考えられている。本研究はこれらの因果関係を検証するために免疫記憶の維持に携わる細胞、分子機構について胚中心の機能に焦点をあて、記憶B細胞が誘導され、維持されていく間に特異的に働く分子の解明を試みる。老化ストレスと免疫力低下の因果関係を見だし、遺伝子から細胞、そして遺伝子改変マウスといった個体レベルまでさまざまな形で、その検証、すなわち機序解明への糸口を開いていくことを目的にしている。

B. 研究方法

1. 遺伝子スクリーニング

胚中心における免疫記憶の誘導、維持に関与する分子機構と酸化ストレス変化に関、特に胚中心 B 細胞で高発現している遺伝子群のうちシグナル伝達関連因子をコードするもののスクリーニングを開始した。cDNA サブトラクションライブラリー (6.4×10^4 クローン) と *in vitro* キナーゼアッセイを組み合わせたスクリーニング法を用いて、胚中心 B 細胞で高発現している遺伝子群のうちシグナル伝達関連因子をコードする遺伝子の単離を行った。

2. 遺伝子発現

クローン 10C mRNA について、その発現パターンをマウスの心臓、肝臓、脾臓、肺、脳、腎臓、骨格筋、精巣 RNA を用

いたノーザンブロットングにより検討した。また免疫細胞におけるクローン 10C mRNA の発現を調べるため、マウス脾臓より磁気ビーズ法で分離した B 細胞、T 細胞、そして樹状細胞から採取した RNA による RT-PCR を行った。

3. 蛋白解析ならびにホモログ

用いたスクリーニング系がシグナル伝達関連タンパクを得るための系として機能しているか否かを検証するためにクローン 10C タンパクについて、モチーフ検索を行った。また、クローン 10C タンパクについて、進化の過程で種を越えて保存されているか否かを解析する目的でドメイン構造も解析した。

(倫理面への配慮) 研究対象となる材料でヒト由来の試料(血液を含む)は使うことはなかった。胚性幹細胞を含めマウス由来の細胞、試料あるいは個体を用いる時はいかなる実験も長寿医療研究センターの定める倫理規定、動物実験ガイドラインを厳守した上で計画、実行した。

C. 研究結果

1. 遺伝子スクリーニング

6.4×10^4 クローンのプラスミドライブラリーを作製した。これらを 4 群のライブラリーに分配し(一群当たり 1.6×10^4 クローン)、COS1 細胞に導入し、ライブラリー導入細胞に特異的なリン酸化されたタンパクを検出した。特異的なリン酸化が認められた細胞可溶化物から、導入したプラスミドを回収し、分配を繰り返した後、同様に COS1 細胞に導入し、in vitro キナーゼアッセイによるスクリーニングを繰り返した。最終的にリン酸化反

応に關与しているものを 2 クローン(クローン 8A とクローン 10C) 単離することができた。それらの cDNA 配列を解読し、BLAST (basic local alignment search tool) にて検索したところ、両者とも新規のタンパクの一部をコードしているものであることが明らかになった。EST (expressed sequence tag) に対して検索を行った結果、クローン 10C については相同性の高い cDNA 配列が存在し、2,073 アミノ酸よりなるタンパクをコードしていることが明らかになった。一方クローン 8A に関しては、相同性をもつ cDNA は登録されておらず、クローン 8A を含む cDNA がコードするタンパクの一次構造を予測することはできなかった。

2. 遺伝子発現

クローン 10C mRNA について、その発現パターンをマウスの種々の組織 RNA を用いたノーザンブロットングにより検討した結果、脾臓で高い発現が認められ、このタンパクが免疫系で何らかの役割を担っていることが示唆された。次にマウス脾臓より磁気ビーズ法で分離した B 細胞、T 細胞、そして樹状細胞から採取した RNA による RT-PCR を行ったところ、いずれの細胞でも発現が認められた。また、領域の異なる 2 つのプロンプを用いてノーザンブロットングを行ったところ、いずれの場合においても 1 本しかバンドが検出されず、相同性の高いタンパクが存在する可能性が低いことが示唆された。

3. 蛋白解析、ホモログならびに遺伝子構造の解析

クローン 10C タンパクについて、モチー

検索を行ったところはアミノ酸 167 番目～273 番目に pleckstrin homology (PH)ドメインを有することが明らかになった。また、クローン 10C タンパクについてさらなるドメイン構造を解析した結果、同様のドメイン構造をもち、クローン 10C タンパクのホモログと考えられるものが、ヒト、線虫、ショウジョウバエに存在することが明らかになり、このタンパクが、進化の過程で種を越えて保存されていることが示唆された。さらにクローン 10CcDNA のゲノム構造を解析した結果、本遺伝子の遺伝子座は X 染色体上に存在し、49 個のエクソンより構成されていることが明らかになった。

D. 考察

遺伝子スクリーニングについて、単離されたクローン 10C 遺伝子産物が PH ドメインを有していた。この PH ドメインは細胞膜のイノシトール 3 リン酸に結合するモチーフであり、多くの場合、PI3 キナーゼが関与するシグナル伝達系に関わっていることが知られている。今回のスクリーニング系がシグナル伝達関連タンパクを得るためのスクリーニング系として機能していることが実証された。また 10C 遺伝子産物ホモログが多く種の保存されていると言う事実から機能的に重要な遺伝子産物であるという事、また存在する遺伝子座が Btk あるいは SAP といった他の B 細胞活性化におけるシグナル伝達関連分子や記憶細胞の形成維持との関連が指摘されている因子の存在する X 染色体に隣接した形で存在することも 10C 遺伝子の生理的機能を今後解明していく上で意義深い事実と考えられる。

E. 結論

1. 胚中心 B 細胞で高発現している遺伝子群のうちリン酸化によるシグナル伝達に関与しているタンパク (クローン 10C) を単離し、遺伝子発現およびタンパクについて解析することができた。
2. クローン 10C cDNA のゲノム構造を解析した結果、クローン 10C の遺伝子座は免疫記憶との関連が注目されている SAP に近い X 染色体上に存在し、49 個のエクソンより構成されていることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

上川奈都子, 錦見昭彦, 磯部健一, 丸山光生
マウス胎児由来繊維芽細胞の細胞老化に伴い発現が増加する遺伝子の単離と同定
第24回日本分子生物学会年会 2002年12月11-14日、横浜

磯部健一, 伊藤佐知子, 丸山光生, 中島日出夫, 羽根田正隆
アルツハイマー病におけるミクログリアの役割 (第1報)
第29回日本免疫学会年会 2002年12月4-6日、東京

錦見昭彦, 上川奈都子, 磯部健一, 丸山光生
胚中心で高発現しているシグナル伝達関連因子のスクリーニング) 第29回日本免疫学会年会 2002年12月4-6日、東京

上川奈都子, 錦見昭彦, 磯部健一, 丸山光生

研究成果の刊行に関する一 覧表

Takeuchi A., Mishina Y., Miyaishi O., Kojima E., Hasegawa T. and Isobe K. Heterozygosity for Zfp148 causes complete loss of fetal germ cells during mouse embryogenesis. *Nature Genetics* 33;172-176, 2003.

Yamamoto K, Shimokawa T, Yi H, Isobe K., Kojima T, Loskutoff DJ, Saito H. Aging accelerates endotoxin-induced thrombosis : increased responses of plasminogen activator inhibitor-1 and lipopolysaccharide signaling with aging. *Am J Pathol.* 2002 ;161(5):1805-14.

Yamamoto K, Shimokawa T, Yi H, Isobe K., Kojima T, Loskutoff DJ, Saito H. Aging and obesity augment the stress-induced expression of tissue factor gene in the mouse. *Blood.* 2002 1;100(12):40

Maehara K, Uekawa N, Isobe K. Effects of histone acetylation on transcriptional regulation of manganese superoxide dismutase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 5;295(1):187-92, 2002.

Yamamoto K, Takeshita K, Shimokawa T, Yi H, Isobe K., Loskutoff DJ, Saito H. Plasminogen activator inhibitor-1 is a major stress-regulated gene: implications for stress-induced thrombosis in aged individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22;99(2):890-5. 2002

T. Fujii, T. Endo, J. Fujii and N. Taniguchi: Differential expression of glutathione reductase

and cytosolic glutathione peroxidase, GPX1, in developing rat lungs and kidneys. *Free Rad. Res.*, 36, 1041-49, 2002.

Y. Miyamoto, Y. H. Koh, W. Che, Y. S. Park, N. Fujiwara, T. Ookawara, K. Suzuki and N. Taniguchi: Dysfunction of antioxidative enzymes and redox regulation under nitrosative stress and glycoxidative stress. *International Congress Series*, 1245, 23-30, 2002.

M. Xian, N. Fujiwara, Z. Wen, T. Cai, S. Kazuma, A. J. Janczuk, X. Tang, V. V. Telyatnikov, Y. Zhang, X. Chen, Y. Miyamoto, N. Taniguchi and P. G. Wang: Novel Substrates for Nitric Oxide Synthases. *Bioorg. Med. Chem.*, 10, 3049-55, 2002.

H. Eguchi, Y. Ikeda, S. Koyota, K. Honke, K. Suzuki, J. M. Gutteridge and N. Taniguchi: Oxidative Damage Due to Copper Ion and Hydrogen Peroxide Induces GlcNAc-Specific Cleavage of an Asn-Linked Oligosaccharide. *J. Biochem.*, 131, 477-84, 2002.

Y. S. Park, N. Fujiwara, Y. H. Koh, Y. Miyamoto, K. Suzuki, K. Honke and N. Taniguchi: Induction of Thioredoxin Reductase Gene Expression by Peroxynitrite in Human Umbilical Vein Endothelial Cell. *Biol. Chem.*, 383, 683-91, 2002.

I. Laffont, M. Takahashi, Y. Shibukawa, K. Honke, V. V. Shuvaev, G. Siest, S. Visvikis and N. Taniguchi: Apolipoprotein E activates Akt pathway in neuro-2a in an isoform-specific manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 292, 83-87, 2002.

J. Niwa, S. Ishigaki, N. Hishikawa, M. Yamamoto, M. Doyu, S. Murata, K. Tanaka, N. Taniguchi and G. Sobue: Dorfin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 277, 36793-98, 2002.

T. Ookawara, T. Kizaki, E. Takayama, N.

Imazeki, O. Matsubara, Y. Ikeda, K. Suzuki, J. L. Li, T. Tadakuma, N. Taniguchi and H. Ohno: Nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296, 54-61, 2002.

Y. Shibukawa, M. Takahashi, I. Laffont, K. Honke and N. Taniguchi: Downregulation of hydrogen peroxide-induced PKC δ activation in N-acetylglucosaminyltransferase III transfected HeLaS3 cells. *J. Biol. Chem.*, 278(5):3197-203, 2003.

R. Takamiya, M. Takahashi, M. Theingi, Y. S. Park, N. Miyazawa, T. Endo, N. Fujiwara, H. Sakiyama, Y. Misonou, Y. Miyamoto, J. Fujii and N. Taniguchi: Glycation Proceeds Faster in Mutated Cu, Zn-Superoxide Dismutases Related to Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *FASEB J.*, in press, 2003.

Nakashima, I., Takeda, K., Kawamoto, Y. Okuno, Y., Kato, M., Akhand, A.A. and Suzuki, H.: The highly conserved MXXCW motif initially switches on protein tyrosine kinase activity. *Proceeding of the 11th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International*, in press.

Liu, W., Akhand, A.A., Takeda, K., Kawamoto, Y., Itoigawa, M., Kato, M., Suzuki, H., Ishikawa, N., Nakashima, I. : Protein phosphatase 2A-linked and -unlinked caspase-dependent pathways for downregulation of Akt Kinase triggered by 4-hydroxynonenal. *Cell Death Different.*, in press.

Nakashima, I., Liu, W., Akhand, A.A., Takeda, K., Kawamoto, K., Kato, M. and Suzuki, H.: 4-Hydroxynonenal triggers multistep signal transduction cascades for suppression of cellular functions. *J. Mol. Asp. Med.*, in press.

Hossain, K., Akhand, A.A., Kawamoto, Y., Du, J., Takeda, K., Wu, J., Yoshihara, M., Tsuboi, H., Kato, M., Suzuki, H. and Nakashima, I.: Arsenite-induced membrane rafts-dependent Akt activation of which inhibition accelerates caspase activation. *Free Rad. Biol. Med.*, in press.

Du, J., Cai, S., Suzuki, H., Akhand, A. A., Ma, X., Takagi, Y., Miyata, T., Nakashima, I. and Nagase, F.: Involvement of MEKK1/ERK/p21 Waf1/Cip1 signal transduction pathway in inhibition of IGF-1-mediated cell growth response by methylglyoxal. *J. Cell. Biochem.*, in press.

Nakashima, I., Du, J., Yokoyama, T., Kawamoto, Y., Ohkusu-Tsukada, K. and Isobe, K.: Transgenic Mouse Models for Immunosenescence. *Current Genomics*, in press.

Akhand, A.A., Ikeyama, T., Akazawa, S., Kato, M., Hossain, K., Takeda, K., Suzuki, H., Takahashi, M. and Nakashima, I.: Evidence of both cell surface and intracellular cysteine targets of protein modification for activation of RET kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292:826-831, 2002.

Nakashima, I., Kato, M., Akhand, A.a., Suzuki, H., Takeda, K., Hossain, K. and Kawamoto, Y.: Redox-linked signal transduction pathway for protein tyrosine kinase activation. *Antioxid. Redox Signal.* 4:517-531, 2002.

Nakashima, I., Suzuki, H., Akhand, A.A. and Kato, M.: Redox control of T cell death. *Antioxid. Redox Signal.* 4:353-356, 2002.

- Akhand, A.A., Du, J., Liu, W., Hossain, K., Miyata, T., Nagase, F., Kato, M., Suzuki, H. and Nakashima, I.: Redox-linked cell surface-oriented signaling for T-cell death. *Antioxid. Redox Signal.* 4:445-454, 2002.
- Ma, X., Du, J., Nakashima, I. and Nagase, F.: Menadione biphasically controls JNK-linked cell death in leukemia Jurkat T cells. *Antioxid. Redox Signal.* 4:371-378, 2002.
- Kamei, K., Nimura, Y., Nagino, M, Aono, K. and Nakashima, I.: Surgical stress reduces mortality from endotoxin shock, *Langenbeck's Arch. Surgery.* 386:512-517, 2002.
- Wu, J., Suzuki, H., Akhand, A.A., Zhou, Y-W., Hossain, K. and Nakashima, I.: Modes of activation of mitogen-activated protein kinases and their roles in cepharanthine-induced apoptosis in human leukemia cells. *Cell Signal.* 14:509-515, 2002.
- Kato, M., Takeda, K., Kawamoto, Y., Iwashita, Y., Iwashita, T., Akhand, A.A., Senga, T., Yamamoto, M., Sobue, G., Hamaguchi, M., Takahashi, M. and Nakashima, I.: Repair by Src kinase of function-impaired RET with multiple endocrine neoplasia type 2A mutation with substitutions of tyrosines in the carboxyterminal kinase domain for phenylalanine, *Cancer Res.* 62:2414-2422, 2002.
- Hayakawa, A., Wu, J., Kawamoto, Y., Zhou, Y.W., Tanuma, S., Nakashima, I. and Suzuki, H.: Activation of caspase-8 is critical for sensitivity to cytotoxic anti-Fas antibody-induced apoptosis in human ovarian cancer cells. *Apoptosis* 7:107-113, 2002.
- Koike C, Fung JJ, Geller DA, Kannagi R, Libert T, Luppi P, Nakashima I. Profozich J, Rudert W, Sharma SB, Starzl TE, Trucco M. Molecular basis of evolutionary loss of the alpha 1,3-galactosyltransferase gene in Higher primates. *J. Biol. Chem.* 277:10114-20, 2002
- Masahisa Katsuno, Hiroaki Adachi, Akito Kume, Mei Li, Yuji Nakagomi, Hisayoshi Niwa, Chen Sang, Yasushi Kobayashi, Manabu Doyu and Gen Sobue. Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* 35: 843-854, 2002.
- Hiroaki Adachi, Masahisa Katsuno, Makoto Minamiyama, Chen Sang, Gerasimos Pagoulatos, Moriaki Kusakabe, Atsushi Yoshiki, Yasushi Kobayashi, Manabu Doyu and Gen Sobue. HSP70 chaperone over-expression ameliorates phenotypes of the SBMA transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant AR protein. *J Neurosci* 2003. (in press)
- Sawada M. Imai F and Suzuki H. Brain-Specific Migration and Protective Roles in Brain Damage of Microglia. *Advance in Behavioral Biology.* 53:217-20. (2002)
- Ohara, Y., Himeda, T., Asakura, K., Sawada, M.: Distinct cell death mechanisms by Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection in microglia and macrophage. *Neurosci. Lett.* 327, 41-44,

2002.

Salimi, K., Moser, K., Zassler, B., Reindl, M., Embacher, N., Schermer, C., Weis, C., Marksteiner, J., Sawada, M., Humpel, C.: Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances survival of GM-CSF dependent rat GMIR1-microglial cells. *Neurosci. Res.* 43, 221-229, 2002.

Frederik Vilhardt, Olivier Plastre, Makoto Sawada, Kazuo Suzuki, Maciej Wiznerowicz, Etsuko Kiyokawa, Didier Trono, and Karl-Heinz Krause: The HIV-1 Nef protein and phagocyte NADPH oxidase activation. *J. Biol. Chem.* 277:42139-42143, 2002.

Kenji F. Tanaka, Haruo Kashima, Hiromi Suzuki, Kenji Ono, Makoto Sawada: Existence of functional α_1 - and α_2 -adrenergic receptors on microglia. *J Neurosci. Res.* 70:232-237, 2002.