

図 1 細胞の神経系浸潤の直接観察システム
右下：マイクログリアの神経系への浸潤を動画でとらえた。

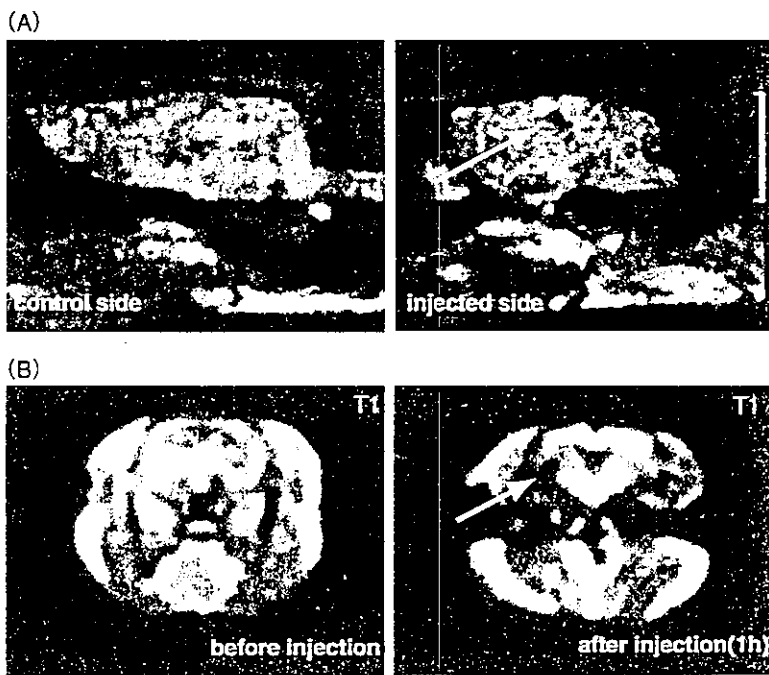


図 2 脳に侵入したマイクログリアを MRI で可視化する
A：2,000 個のマイクログリアを脳に直接注入後撮像。
B： 2×10^6 のマイクログリアを頸動脈に注入後撮像。
黄色矢印はマイクログリアを指す。

ログリアが観察できることから、外来性マイクログリアの一部は脳に侵入後、内在性マイクログリアと同様に脳に生着しつづけることがわかった²⁾。このことから、疾患遺伝子を補償するように遺伝子操作を加えたり、あらかじめ薬物を取り込ませたマイクログリアを血管内に注入することによって、脳をターゲットとした遺伝子治療やドラッグデリバリーシステムとして利用できると考えられた⁵⁾。

細胞が血液中から組織に浸潤する仕組みのイメージング

一般的に血液中に存在する細胞が組織に浸潤す

る場合には、血管内皮細胞どうしの間隙を通り抜ける“細胞間通過経路(trans-cellular pathway)”を通ると考えられている。一方、脳の血管系では血管内皮細胞どうしは密着帯(tight junction)とよばれる構造により強く接着しており、この構造により血液成分が脳に移行しないようになっている。これが血液脳関門の本体である。したがって、血液中の細胞の通過は起こりにくく、また通過が起こると血液脳関門の破綻が起こる。そこで、マイクログリアを血管に注入するときに水溶性の蛍光色素を同時に注入したところ、マイクログリアが脳に移行する場合には血液脳関門の破綻が起こらない

ことが判明した。形態学的な解析の結果から、ミクログリアは細胞自身が血管内皮細胞を通過する“細胞内通過経路”で脳に移行することが想定できた。

そこで、脳・神経系に特異的な細胞の浸潤を可視化するために図1のような微小循環解析システムを作出して、血管注入した外来性ミクログリアの動態を単細胞として経眼球下に観察を行った。このシステムでは眼組織の血管を観察する際、脳定位固定装置により麻酔を施した被検動物を固定して観察する必要があり、顕微鏡は落斜型ステージ固定式正立顕微鏡(オリンパス社製 BX51W1)、レンズは高開口数水浸対物レンズ(XLUMPLF 20xW/N.A.=0.95)を用いた。このシステムにより、血流中に注入したミクログリア細胞が血管内皮細胞に接着する様子がリンパ球とは異なることが観察できた。

ミクログリアの脳内動態と疾患部集積能力のイメージング

しかし、脳内への侵入は顕微鏡などでは直接観察することができない。そこで、PETやMRIなどの非侵襲的な画像化の手法により、脳に侵入した細胞のモニタリングを検討した。PETは非常に高感度であるが、現状ではその解像度の点で細胞のモニタリングには適さない。そこで著者らはMRIによる検出を検討した。ミクログリアは通常の状態でも高い貪食能を示すことから、MRIの陰性造影効果があるマグネタイト微粒子を取り込ませて脳内で観察できるかどうかを検討した(図2)。まず、どのくらいの細胞数が検出できるかについて検討するためにマグネタイト標識ミクログリアを直接ラット脳に注入してMRIで撮像したところ、2,000個の細胞でも十分に観察できることがわかった。そこで、マグネタイト標識ミクログリアラット頸動脈に投与したところ、ミクログリアの脳内への浸潤が観察できることがわかった。

一方、ミクログリアは種々の疾患により神経細胞などが変性すると活性化され、疾患部分に集積しその一部が増殖することが観察される。実際にAlzheimer病やParkinson病、脳梗塞、脳腫瘍などの種々の脳疾患でミクログリアが活性化している

ことなどから、神経細胞の変性や生存維持に対する作用が注目されている。このような疾患部集積能力は外来制に導入したミクログリアにもみられるため、導入するミクログリアをあらかじめマグネタイト粒子で標識しておけば、高感度で非侵襲的な疾患のモニタリングができる。しかし、実際の診断にミクログリアそのものを用いることは難しい。ところが、このようなミクログリアの疾患部集積能力は効率は低下するもののミクログリア膜断片でもみられることを、バイオベンチャー企業のティッシュターゲティングジャパン社が見出した。同社ではミクログリア膜ベジクルにマグネタイト標識を施し、投与することによって高感度診断薬として利用できることを示した。現在、製剤化キットを作製し、実用化に向けた開発を行っている。

ミクログリアは一過性脳虚血後の神経細胞死に対して保護的に作用する

これまでミクログリアは脳の疾患に応答して活性化され、末梢のマクロファージと同様に脳の細胞に対して攻撃的に作用すると考えられてきた。それでは外来性のミクログリアが脳内に長期存在しても悪影響はないのであろうか。著者らは、ミクログリアに性質の異なったサブタイプが存在し、また、サブタイプの性質を保持していると考えられる複数の株化細胞の樹立に成功した(「サイドメモ」参照)。これらの株化細胞は血液中に注入した場合、いずれも脳移行性を示すことがわかった。またこれらの株化ミクログリアの培養下での性質はかならずしもneurotoxicではないことがわかってきた。さらに、これらの株化ミクログリアは増殖因子依存的に増殖し、因子非存在下では増殖能を失い分岐したミクログリアの形態(通常脳内でみられる形態)をとるため、生体内に移入しても腫瘍化する危険性はないと考えられる。もともと脳内に存在する細胞の状態に戻るため、脳内に移植または移入してもほとんど悪影響はもたないと思われる。

それでは病変部位ではどのような作用をもつのであろうか。著者らは、ミクログリアの脳特異的に移入する性質を利用して、一過性前脳虚血を起

こしたスナネズミ血管にミクログリア導入を行い、遅延性神経細胞死がみられる海馬 CA1 領域の錐体細胞層に標識ミクログリアが集積することを見出した^{6,7)}。このとき、海馬の広範囲にわたって内在するミクログリアの集積活性化が観察できた。さらに、ミクログリアを脳内導入した場合や虚血再灌流直後にミクログリアを注入した場合においては、有意に CA1 錐体細胞の神経細胞死が抑制されることがわかった。したがって、ミクログリアは神経変性に対して、これまでの考えとは反対に保護的に作用している可能性が考えられる。すくなくとも脳に導入した外来性ミクログリアは神経細胞にはよい働きをすると考えられ、単にミクログリアを導入しても神経細胞死を抑制できるかもしれない。Alzheimer 病や Parkinson 病などの有効な治療法がない神経変性疾患に対する有効性を早急に調べる必要がある。

サイド メモ

ミクログリアには性質の異なる 亜集団が存在する

ミクログリアはいろいろな刺激にตอบสนองして形態変化するばかりでなく、多種多様な性質を示す。そこで、貪食細胞を特異的に染色する蛍光色素を用いて脳由来ミクログリアを染色して FACS (fluorescence activated cell sorter) により分析し、蛍光強度と前方散乱 (forward scatter : FS, 一般に細胞の大きさに相関する) の強度で二次元に展開してみたところ、正常マウス由来の培養には同程度の高い貪食能をもち FS の異なる 2 つの亜集団が存在することがわかった。これらの細胞は高い貪食能をもち、マクロファージとは異なり培養下で分岐状に誘導できた。しかし、この 2 つの集団は、増殖因子応答性やサイトカインの発現、表面抗原の発現に大きな差があることがわかった。さらに、T 細胞に対する抗原提示能や障害を受けた神経細胞に対する応答も異なっていた。したがって、脳内における役割も異なっていることが推定でき、ミクログリアの多様性の一部は性質や役割の異なる亜集団が存在することにより表現されている可能性が考えられる。

ヒト疾患への応用

著者らが開発した株化ミクログリアを用いた脳をターゲティングしたドラッグデリバリーシステムは、細胞を用いた、いわゆる cell therapy であるため、工夫によってあらゆる脳神経疾患の治療に応用できると考えている。また、血管に注入するだけで脳に特異的に移入されるので、重篤な手術を行うことなく目的を達成できる。マウスやラットでは尾静脈に注入した細胞も脳に移入できることから、ヒトの場合、静脈の点滴などでも導入できると考えられる。

しかし、ヒトミクログリアを分離することは多くの制約があり難しく、さらに遺伝子導入が可能な株化細胞を確立することはほとんど不可能である。さらに、ヒトに注入する場合は自己非自己の問題も考えなければならない。それではどうするか。第一点として、ミクログリアのように脳に特異的に侵入する能力をもつ細胞をほかで探すことである。著者らは最近、骨髄の未分化幹細胞中に、脳に侵入する能力をもった細胞がごくわずかに存在することを発見した⁸⁾。この細胞を特異的に分離することができればミクログリア同様に血管注入で治療に使うことができる。第二点目としては、移植可能な細胞、たとえば自己の骨髄細胞や臍帯血細胞に脳に侵入するための認識分子遺伝子を導入して発現させれば、ヒト細胞を脳に特異的に移入できることになる(最近このような性質の分子を前出のバイオベンチャー企業、ティッシュターゲティングジャパン社が分離することに成功し特許を申請したようである)。どちらかでも成功すれば十分にヒト疾患の治療に対して応用できる可能性があると考えている。

文献

- 1) Sawada, M. et al. : *Int. J. Dev. Neurosci.*, 13 : 253, 1995.
- 2) 澤田 誠 : 細胞工学, 18 : 550-558, 1999.
- 3) Imai, F. et al. : *Neurosci. Lett.*, 237 : 49-52, 1997.
- 4) Sawada, M. et al. : *FEBS Lett.*, 433 : 37-40, 1998.
- 5) 澤田 誠 : 神経研究の進歩, 45 : 63-72, 2001.
- 6) Imai, F. et al. : *Neurosci. Lett.*, 272 : 127-130, 1999.
- 7) Suzuki, H. et al. : *Neurosci. Lett.*, 312 : 95-98, 2001.
- 8) Ono, K. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 262 : 610-614, 1999.

良いミクログリア, 悪いミクログリア

澤田 誠, 鈴木 弘美

・ミクログリアは「いいやつ」か 「悪いやつ」か

アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性を伴う疾患だけでなく, 脳腫瘍やてんかん, 統合失調症に至るほとんどすべての脳疾患においてミクログリアの活性化が見られることが報告されている (図1) (1-6). 脳全体に広汎に存在するいわゆる休止ミクログリアはその検出が難しいが, 活性化ミクログリアはマクロファージ様の性質を持つようになるため, マクロファージを認識する種々の抗体で検出でき, 脳疾患の病理像では疾患部位に集積した活性化ミクログリアが多数観察することができる。しかもそれらがあたかも神経変性や炎症などの疾患の原因を引き起こしているようにさえ見える。さらに, 単離したミクログリアが細胞傷害性をもつ因子を産生すること, 活性化したミク

ログリアが病理切片においても培養下においても細胞傷害性のマクロファージと区別が付けることが難しいことから, 種々の脳疾患において, ミクログリアが病変を形成する「悪役」として考えられてきた。しかし, より多くの抗体や染色法が開発され, それらを用いた疾患脳の検索が行われた結果, ミクログリアの活性化は病変部に局限しているわけではなく, 正常な組織像を呈する部分にも出現していることも明らかになりつつある (7,8)。このようなミクログリアは少なくとも病態形成とは無関係であり, 「悪いミクログリア」とは明らかに異なる作用をしていると考えられる (図1)。それでは, このような正常組織部分で活性化したミクログリアは何をしていて, 病変の形成に関係する「悪いミクログリア」とどのように違うのだろうか?

たしかに単離されたミクログリアは培養条件下で活性化されると活性酸素, 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 (図2) (9,10)。実際に, ある培養条件では神経細胞との共培養でミクログリアが神経細胞のアポトーシスを誘導し

Good or bad? Microglia in the brain diseases
Makoto Sawada, Hiromi Suzuki
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所 [〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ケ窪 1-98]
Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University (Toyoake, Aichi 470-1192, Japan)

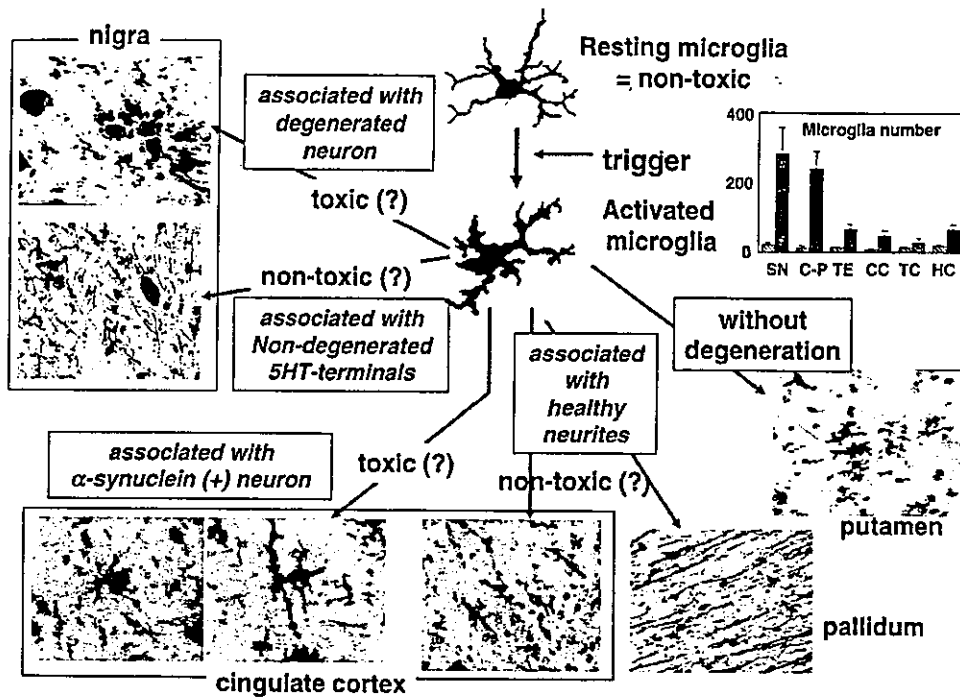


図1 ミクログリアの活性化と神経変性との関わり

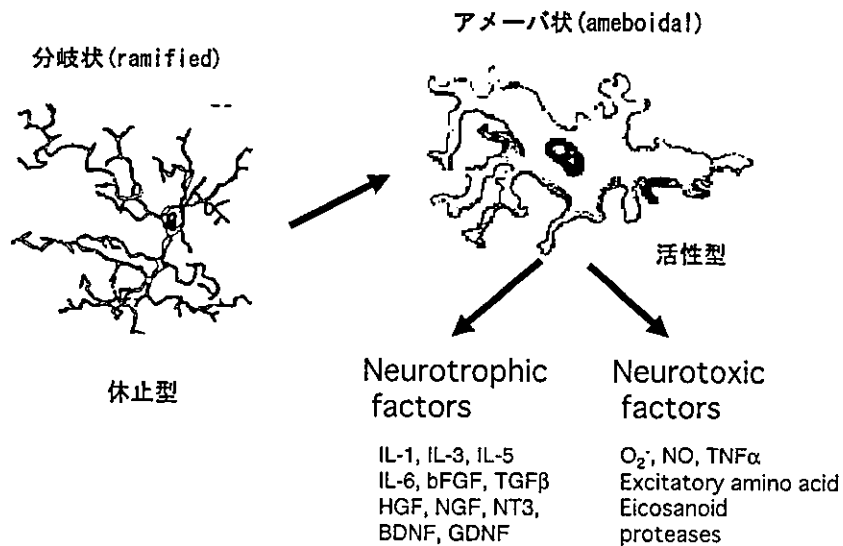


図2 ミクログリアの活性化と産生する因子

(11), また, ミクログリアが産生する TNF により培養オリゴデンドロサイトの細胞死がおこる。また 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 (12)。さ

らにいくつかのノックアウトマウスではノックアウトした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たために, 損傷に応答したミクログリアの活性化やそれとともに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マイ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(13)。むしろ、マイクログリアの細胞毒生を媒介すると考えられている TNF α の受容体ノックアウトマウスでは細胞死が増大することが報告されている(14)。また、一過性脳虚血では海馬全体のマイクログリアが活性化されるが、神経細胞死がおこらない CA2, CA3 や歯状回でのマイクログリアは TGF β mRNA を発現し神経変性を抑制するように働いていることも示唆されている(15)。実際に培養下では活性化マイ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(9, 10)。少なくとも周産期や新生仔の脳で多量に見られる活性化マイクログリア (ameboid form) は神経細胞に toxic ではないようである。なぜなら、脳は正常に発達するからである。

・外来性に動員したマイクログリアは傷害部位で神経保護的に働く

ところで、筆者らは単離したマイクログリアを特異的に染色する蛍光色素を用いて染色してラットの腋窩動脈に注入し細胞の組織配向性を調べたところ、注入したマイクログリアが脳に特異的に侵入できることを見いだした(16, 17)。この侵入においてはどのようなわけか血液脳関門が崩壊しないので、マクロファージやそのほかの炎症性細胞の影響を考えずにマイクログリアの脳内での動態を調べることができる。そこで、この特殊な性質を使って神経傷害モデル動物脳にマイクログリアを導入して調べることにした。マイクログリアが脳にとってよい細胞であるか悪い細胞であるかについては直接脳内で調べるのが良いと思われるからである。

実際には一過性前脳虚血を起こした砂ネズミで遅延性神経細胞死が見られる海馬 CA1 領域

の錐体細胞層に標識マイクログリアを集積させることを行った。この時、内在するマイクログリアも海馬の広範囲に渡って集積活性化し、一過性脳虚血処理をしたが、遅延性細胞死が見られなかった例においても内在マイクログリアの集積活性化が観察できた(18)。さらに、マイクログリアを脳内導入した場合や虚血再還流直後にマイクログリアを注入した場合においては有意に CA1 錐体細胞の神経細胞死が抑制されることがわかった。したがって、このシステムで調べる限りにおいてはマイクログリアは海馬 CA1 錐体細胞の虚血後にみられる遅延性神経細胞死に対して保護的であると考えられる(19)。

このようなマイクログリアの神経細胞死に対する保護作用が脳虚血後の遅延性細胞死以外の神経変性や障害を受けていない健全な神経細胞に対してみられるかどうかは今後検討する必要があるが、少なくともマイクログリアを導入したマウス脳の長期観察からは神経変性などを生じせしめているような所見は得られておらず、導入したマイクログリアは周囲の脳内細胞に対して悪影響を及ぼすことはないように思える(20)。

・マイクログリアとマクロファージは性質が異なる

マイクログリアは脳に存在するマクロファージ様の細胞と考えられてきたが、血管内に注入した場合の組織移行性の違いに明らかにみられるように、その性質には大きな違いがあることが徐々に明らかになりつつある(20)。

そもそもマイクログリアは、20世紀の初頭に del Rio Hortega によって開発された炭酸銀染色法により染色される、不規則な形をした小型の細胞として同定された。通常の成熟動物脳では、分岐した突起をもった細胞として観察できるが、del Rio Hortega はこれを休止マイクログリアと定義し、脳に侵襲が加えられるとマクロファージに分化して損傷の修復を行うと仮定した(21)。筆者らは分子レベルでマイクログリアの

性質を調べるために単離培養法を確立し, ほぼ純粋なミクログリアを得ることに成功した(22). 単離培養下のミクログリアはマクロファージによく似た性質を示すものの, ある条件下では分枝した形態に誘導できる(23). この性質は単離したマクロファージでは見られず, 正常脳で見られるミクログリアの形態(ramified form)を反映していると考えられる. さらに CD4, CD14, IL-5 の発現誘導や(24, 25), IL-2 受容体の発現誘導に明らかにマクロファージとは異なる性質を持つことがわかった(26). 筆者らは最近 SAGE (serial analysis of gene expression) 法の変法である PROGENEX 法による遺伝子発現パターンの分析をミクログリアとマクロファージで実施し, マクロファージには発現していないミクログリア特異的に発現する数種類の遺伝子を同定することにも成功した(27). つまり遺伝子発現の調節レベルでも両者は異なるというわけである.

・ミクログリアの多様性 (28)

一方, ミクログリアはいろいろな刺激に応答して形態変化するばかりでなく, 多種多様な性質を示す. 単離したミクログリアを血清存在下で培養すると CD4, CD14 などの表面抗原を発現し, IL-1 α , IL-5, インターフェロン α , TGF β を産生するマクロファージに酷似した性質を示す. 正常動物脳の休止ミクログリアは CD14 を発現していないが, 培養下で誘導した ramified form は CD14 の mRNA の発現が非常に弱くなり, 形態ばかりでなく機能的にも休止ミクログリアの性質を示すようになる. 一方, リポ多糖やインターフェロン γ を培地中に加えると, アメーバ状の活性化されたミクログリア (ameboidal または activated) になる. この状態のミクログリアは貪食能が増大しスーパーオキシドラジカルを産生するほか, リソゾーム酵素群の活性化も起こる. しかしその他の機

能はリポポリ多糖で活性化された場合とインターフェロン γ で活性化された場合とで大きく異なる. 前者の場合には IL-1 α , β , IL-6, 8, 10, TNF α ; TGF β , M-CSF など多くのサイトカイン産生の増大や, IL-2 受容体の発現誘導, CD4 の発現の低下がみられ, この活性化は IL-10 や TGF β を添加することで基底状態に戻すことができる.

後者の場合にはサイトカインでは IL-5 の産生がみられるだけで, 主な変化は MHC クラス I および II を表現し, 抗原提示細胞様の性質を持つようになることである. これは IL-4 や TGF で抑制できる. さらに, ミクログリアは M-CSF や GM-CSF などのコロニー刺激因子によって増殖するが, このとき rod shape と呼ばれる形態をとる.

このようにミクログリアはマクロファージに似た性質を持つものの, 明らかにマクロファージとは異なる細胞であり, しかも非常に多様性に富んだ細胞であることがわかる. しかし培養系を用いた解析では, ミクログリアの多様性が個々の細胞が持つものなのか, それとも細胞としての性質の異なる亜群の集合の結果であるのかは残念ながら決定できない. それは, これまでは単離ミクログリアを組織マクロファージの一形態という一面からみた細胞集団としてしか扱っていなかったからに他ならない.

・ミクログリアは性質の異なる複数の亜集団からなる

貪食細胞を特異的に染色する蛍光色素を用いて脳由来の混合培養を染色すると, 多数の貪食細胞が確認できる. この細胞集団を FACS (fluorescence activated cell sorter) を用いて 2 つのパラメータで分析して二次元に展開してみたところ, 性質の異なる 2 つの亜集団が存在することがわかった. 詳細な解析の結果から, この 2 つのミクログリアの集団は細胞表面マーカーの発現パターンやサイトカイン産生能,

MHC 抗原の発現,さらには NGF や BDNF と
いった神経栄養因子の産生能も両者で異なる
ことが判明し,2つのサブタイプはそれぞれ異
なった役割を持つミクログリアの亜集団である
と考えられる (28).

筆者らはこの亜集団のそれぞれの性質を保持
したミクログリア細胞株を樹立することに成功
している (29-31). 驚くべきことに,樹立した
ミクログリア細胞株にはさらに特殊な性質を
持った別の亜集団ともいえる細胞株も樹立す
ることができた(32). したがって,ミクログリア
にはさらにいくつかの亜集団があり,多様な性
質や役割を持っていると考えられる.

・ミクログリアの亜集団の活性酸素産生
と神経障害性

近年,活性酸素やフリーラジカルが生命維持
に不可欠な生体成分や代謝系を破壊すること
により,広範な疾患に関与していることが明ら
かにされつつある(33-36). 活性酸素,NO などの
ラジカル類は神経細胞に対しても障害性を示す

ことから,中枢神経疾患や脳梗塞,さらに脳の
老化に対する活性酸素との関連が注目されてい
る (37-40).

脳内で活性酸素やフリーラジカルを産生する
中心的な細胞はミクログリアである.しかし,活
性酸素産生は活性化されたミクログリアでは均
一に産生されるのだろうか.そこで筆者らは,脳
から分離したミクログリアの一次培養集団につ
いて PMA 刺激誘導性の活性酸素産生を測定し
てみた.すると,産生能が高い集団と低い集団
が存在することがわかった.

次にこれらの亜集団に対応する株化ミクログ
リアを用いて神経障害性について株化神経細胞
を用いた神経傷害モデルで検討してみた.する
と,用いた株化ミクログリアの一つは PMA 刺
激誘導性の活性酸素産生がほとんど無く,傷害
された神経細胞に対し保護作用を示すことがわ
かった.一方,もう一つの株化ミクログリアは
マクロファージに比べてその産生量は低いもの
の有意な PMA 刺激誘導性の活性酸素産生を示
し,傷害された神経細胞に対して神経細胞死を
促進した.また,活性化された状態では傷害を

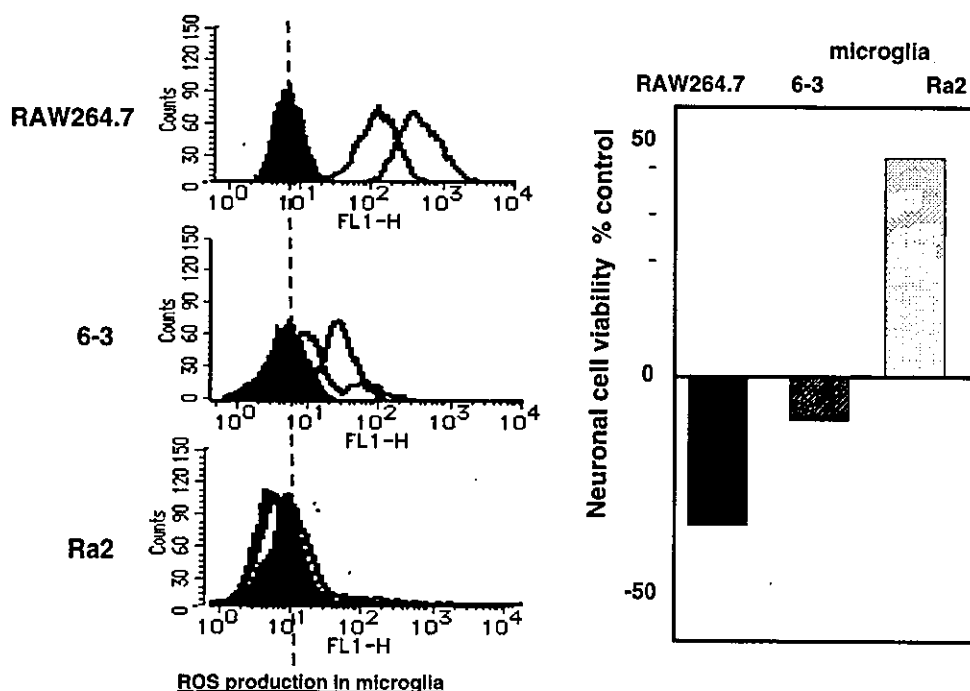


図3 ミクログリアの活性酸素産生と神経毒性

受けていない神経細胞に対しても傷害性を示した (図 3)。

このように, ミクログリアには障害を受けた神経細胞に対して培養下では全く反対の作用を持つ亜集団が存在するため, 脳内でも同様に「よいミクログリア」と「悪いミクログリア」が存在するのではないかと考えられる。実際に, ラット線状体に末梢の炎症細胞が浸潤しないような傷害を起こすと, その傷害部位の周囲に広範囲に活性化型のミクログリアが集積することが観察できるが(41), 損傷部位に接している部分では iNOS の mRNA が発現するミクログリアが観察できるが, それ以外の周辺部では iNOS 陰性の活性化ミクログリアが観察できる(42)。それぞれのミクログリアのどちらが「よいミクログリア」でどちらが「悪いミクログリア」であるのかは直接証明することができないが, 培養条件では iNOS が誘導された状態のミクログリアは神経傷害性を持つことが知られているため, 損傷部位に接し iNOS 陽性のミクログリアが「悪いミクログリア」であるようにも思える。そうすると周辺部に広範囲にわたって活性化されているミクログリアは組織損傷による 2 次的な傷害から周囲の神経組織を保護しているという見方もできる。

前述の神経傷害培養モデルで検証した 2 種類のミクログリアの遺伝子発現のプロファイリングを行ってみるといくつかの違いがあることがわかった。それらの一部, たとえば IL-12 の発現様式(29), 抗原提示に関わる分子群(32), ヒスチジン脱炭酸酵素の発現(43) などについてはタンパク質レベルや生物活性レベルで既に確認をしている。しかしそれらはミクログリアの善し悪しを決定づけるものとは考えられない。いずれにしても複数の亜集団の存在を明らかとし性質を把握する事が, 今後のミクログリアの関与が示唆されている多くの神経変性疾患のメカニズムを解明する上で不可欠であると考えられる。

・ミクログリアの「善し」「悪し」のちがい

ところで, ミクログリアの「よい」「悪い」は何によって決まるのだろうか? 一般に食細胞では貪食活性に連動した活性酸素産生がおこるが, ミクログリアにおいても同様で, 産生する活性酸素の大部分は O_2^- であり, phox タンパク質複合体からなる NADPH オキシダーゼによって産生される(44)。そのため両者の違いはこの酵素の発現量の違いである可能性が考えられる。ところが, phox タンパクを western blot 法で分析したところ「よいミクログリア」にも他方と同程度の発現が確認できた。従って両者とも「刀」は持っているわけである。「よい」「悪い」の違いはその「刀」を抜くか抜かないかなのではないかと考えた。では、「よいミクログリア」に「刀」を抜かせることができるのだろうか?

・ミクログリアの毒性転換 (toxic change) モデル

筆者らはこれまでの研究において細胞の持つ性質の解明の一手段として細胞内に存在しない様な外来遺伝子, たとえばウイルスの遺伝子を導入してその変化を調べデフォルメされた機能を解析することで複雑な細胞現象を調べることを行ってきた(45, 46)。その一つにミクログリアへの HIV-1 由来 nef 遺伝子導入がある(44)。

ミクログリアに HIV-1 由来 nef 遺伝子を導入した当初の理由は AIDS 脳症におけるミクログリアの活性化と神経毒性発現のメカニズムを調べることにあった。さまざまな AIDS 治療薬の開発によりもはや致死性の疾患というよりは慢性感染症の様相を呈するまでに至った HIV 感染は, その感染者の 20% 以上が慢性期に AIDS 脳症を発症する。AIDS 脳症では脳炎

や痴呆, 認識傷害等の神経傷害が起こり, 老人性痴呆症, またはアルツハイマー氏病に類似した症状を呈する(4). HIV 脳症は日和見感染によってではなくウイルス自身の活動によって起こり, 痴呆症状は神経細胞がアポトーシスにより死滅する事により発症するが, その神経細胞死の誘導メカニズムについては明らかになっていない. 一方, 脳での HIV の感染ターゲットがミクログリアである事が報告されているため, AIDS 脳症ではミクログリアが感染により過度に活性化されて機能異常を呈し, 神経傷害性を示すサイトカインやラジカル類を大量に放出する事によって最終的に神経細胞をアポトーシスにより死滅させるのではないかと考えた. HIV-1 ウイルスの nef は, 同定された当初は特別な機能を見いだすことができず negative factor と考えられたため nef と名付けられていたが, 近年, 猿の AIDS の原因ウイルスとして知られている SIV で, nef の欠損しているウイルスが SIV を発症しない事が明らかとなり, nef が発症に深く関与する遺伝子であると考えられるようになった.

今回の実験の場合, ミクログリアの中で効率よく目的タンパク質を発現させる必要があるため, 「よいミクログリア」に相当する細胞に, 国立感染症研究所鈴木和男博士, スイスジュネーブ大学の Krause 教授の協力のもと, レンチウイルスシステムを用いて Nef タンパク質を発現する細胞株を作成した(44).

えられた細胞は増殖性や形態などに顕著な変化が見られなかったが, 通常培養下で多量の活性酸素を産生し, 神経細胞の細胞死を促進した. 一方, 親株や不活性ミュータント G2A nef を導入した細胞では活性酸素産生がほとんど見られなかった. このとき, NADPH オキシダーゼのタンパク質量には変化がなかった(44).

以上のことから, 「よいミクログリア」でも状況によっては「刀」を抜いて神経を殺すようになることがわかった.

・アルツハイマー病発症におけるミクログリアの toxic change の可能性

それでは一般の神経疾患においてミクログリアは「刀」を抜くことがあるのだろうか? まず, アルツハイマー病を例に考えた.

アルツハイマー病の原因の一つに A β 仮説がある. 培養神経細胞に A β を添加すると神経細胞は徐々に死滅し, また動物に A β を脳内投与すると痴呆症状が表れる(47). 家族性アルツハイマー病患者由来の点変異を有する APP 遺伝子トランスジェニックマウスで進行性の神経変性, 老人斑の蓄積, 学習能力の低下が報告されている(48)ほか, A β ワクチン療法により脳内 A β レベルを低下させると行動異常が改善することが報告されている(49). 一方, ミクログリアは A β を異物として認識し貪食し, その結果活性化されて様々な神経障害性因子, 及びラジカル類を放出する(50, 51). この活性化が神経細胞死を助長しているとも考えられている. しかし, 最近ではミクログリアは A β を貪食することによって排除し, むしろ無毒化しているとの報告もあり(52, 53), 詳細は未だ明らかではない.

そこで, 「よいミクログリア」に A β を添加したときにこれまで見てきたような変化が起こるかどうかを調べることにした. 蛍光物質のチオフラビン T で標識した A β 重合体をミクログリアに負荷したところ速やかな取り込みが見られたが, それに伴って大量の活性酸素産生が「よいミクログリア」「悪いミクログリア」ともに見られた. この活性酸素産生は添加直後から観察され, 数時間でピークを呈した後徐々に低下する傾向が見られた. この低下はミクログリアの細胞死による細胞数の減少と一致していた. したがって, 大量の A β にさらされたミクログリアは, 「よいミクログリア」であれ「悪いミクログリア」であれ, 速やかにそれを取り込み, 活性酸素を大量に産生して, A β によって障害を

受けたほかの細胞を排除するように働くとともに、自らも死滅する。また、あるミクログリアの亜集団では取り込んだ Aβ 重合体の蛍光強度が死滅する速度より早く減少することがわかった。つまり、Aβ 重合体を分解している可能性が示されたわけである。

以上のことから、「よいミクログリア」がもつ「刀」は、障害を受けて機能しなくなった細胞のような不必要な細胞を排除するために利用されていると考えられる。この考え方をさらに前に進めてみると、「悪いミクログリア」とはこの刀の使い方がうまくコントロールされない状態なのではないだろうか。そう考えると、元々「悪いミクログリア」というものは存在しないのではないかとも思える。

・ミクログリアの2段階活性化と毒性転換

Aβ 重合体を負荷したミクログリアにおいて、nef 導入ミクログリアと同様に、活性酸素生成能が過剰に増大するほか、ほかの細胞傷害性因子も産生し、神経細胞死を誘導して毒性転換

する事が明らかとなった。筆者らは Aβ 以外にもドーパミン神経特異的な神経毒 MPP+ を添加した場合や、活性化された状態に血清成分を付加するなど、複合的な活性化によって同様な毒性転換が起こることを見いだしている。

筆者らはこれまでの研究から、ミクログリアの活性化には2段階のステップがあるのではないかと考えている(図4)。つまり、もともと神経保護的に作用するミクログリアが、何らかの作用を受けて毒性転換 toxic change すると考えている。軽度な活性化では神経保護的な作用を示すミクログリアが、何らかの因子の作用を受けて神経毒性を持つように変化すると考えている。ミクログリアの活性化は脳神経疾患の治療における標的として重要であると考えているが、筆者らの研究で開発した nef 発現ミクログリアが毒性転換することから、nef が作用する細胞質内因子がこのような活性化の状態を制御している可能性がある。このミクログリアの活性化のメカニズムに関わる細胞内因子が同定できれば、新規な薬剤開発ターゲットが分子レベルで明らかになる可能性があると考えている。

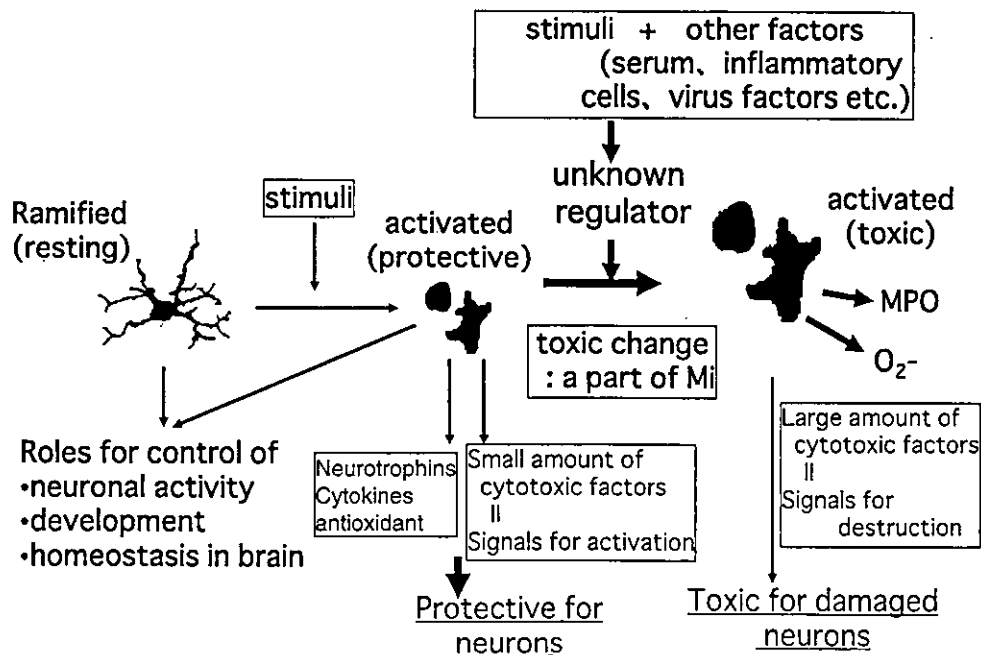


図4 ミクログリアの活性化と毒性転換

----- 文 献 -----

1. Togo, T., Akiyama, H., Kondo, H., Ikeda, K., Kato, M., Iseki, E., Kosaka, K. (2000) Expression of CD40 in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *Brain Res* 885, 117-121.
2. Nagatsu, T., Sawada, M. (2004) in press.
3. Kaul, M., Garden, G.A., and Lipton, S.A. (2001) Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature. Review.* 410. 988-994.
4. Graeber, M.B., Scheithauer, B.W., Kreutzberg, G.W. (2002) Microglia in brain tumors. *Glia*, 40, 252-259.
5. Jankowsky, J.L., Patterson, P.H. (2001) The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog. Neurobiol.* 63, 125-149.
6. Munn, N.A. (2000) Microglia dysfunction in schizophrenia: an integrative theory. *Med Hypotheses* 54, 198-202.
7. Imamura, K., Hishikawa, N., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M., and Hashizume, Y. (2003) Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* 106, 518-526.
8. Imamura, K., Sawada, M., Ozaki, N., Naito, H., Iwata, N., Ishihara, R., Takeuchi, T., and Shibayama, H. (2001) Activation mechanism of brain microglia in patients with diffuse neurofibrillary tangles with calcification: a comparison with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 15, 45-50.
9. 澤田 誠 (1997) 脳のサイトカインネットワーク, 蛋白質核酸酵素 42, 504.
10. Sawada, M., Suzumura, A., and Marunouchi, T. (1995) Cytokine network in the central nervous system and its roles in growth and differentiation of glial and neuronal cells, *Int. J. Dev. Neurosci.* 13: 253.
11. Thery, C., Chamak, B., Mallat, M. (1993) : Neurotoxicity of brain macrophages. *Clinical Neuropathology*, 12: 288-290.
12. Meda, L., Cassatella, M.A., Szendrei, G.I. et al. (1995) Nature, Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. 374: 647-650.
13. Kreutzberg, G.W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *TINS*, 19 312-318.
14. Bruce, A.J., Boling, W., Kindy, M.S. et al. (1996) Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nature Medicine*, 2 788-794.
15. Finsen, B., Lehrmann, E., Castellano, B. et al. (1996) The role of microglia and brain macrophages in transient global cerebral ischaemia. *In* Topical issues in microglia research, eds. E.A. Ling, C.K. Tan & C.B.C. Tan, pp.297-318, Goh Bros. Enterprise Humanities Press.
16. Imai, F., Sawada, M., Suzuki, H., Kiya, N., Hayakawa, M., Nagatsu, T., Marunouchi, T., Kanno, T. (1997) Migration activity of microglia and macrophages into rat brain. *Neurosci. Lett.*, 237: 49-52.
17. Sawada, M., Imai, F., Suzuki, H., Hayakawa, M., Kanno, T., Nagatsu, T. (1998) Brain-specific gene expression by immortalized microglial cell-mediated gene transfer in the mammalian brain. *FEBS Lett.*, 433: 37-40.
18. Imai, F., Sawada, M., Suzuki, H., Zlokovic, B.V., Koijima, J., Kuno, S., Nagatsu, T., Nitatori, T., Uchiyama, Y., Kanno, T. (1999) Exogenous microglia enter the brain and migrate into ischaemic hippocampal lesions. *Neurosci. Lett.* 272, 127-130.
19. Sawada, M., Imai, F., Suzuki, H., Kanno, T. (2000) Brain specific migration and protective roles in ischemic brain lesion of microglia. *Rev. Neurol. IV th Eur Meeting of Glial Cell Function in Health and Disease.* 78.
20. 澤田 誠 (1999) ミクログリアの新規な性質と脳での役割-ミクログリアは脳でなにをしているか. *細胞工学* 18: 550-558.
21. Hortega, P. del Rio (1932) *In* Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System, ed. W. Penfield Vol. 2, pp. 483-534, Hoeber.
22. Sawada, M., Suzumura, A., Yamamoto, H., Marunouchi, T. (1990) Activation and proliferation of the isolated microglia by colony stimulating factor-1 and possible involvement of protein kinase C. *Brain Res*, 509: 119-24.
23. Suzumura, A., Marunouchi, T., Yamamoto, H. (1991) Morphological transformation of microglia in vitro. *Brain Res.* 545: 301-306.
24. Sawada, M., Suzumura, A., Marunouchi, T.: Down regulation of CD4 expression in cultured microglia by immunosuppressants and lipopolysaccharide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189: 869-876, 1992.
25. Sawada, M., Suzumura, A., Itoh, Y., Marunouchi, T. (1993) Production of interleukin-5 by mouse astrocytes and microglia in culture. *Neurosci. Lett.*, 155: 175-178.

26. Sawada, M., Suzumura, A., Marunouchi, T. (1995) Induction of functional interleukin-2 receptor in mouse microglia. *J Neurochem*, 64: 1973-1979.
27. Inoue, H., Sawada, M., Ryo, A., Tanahashi, H., Wakatsuki, T., Hada, A., Kondoh, N., Nakagaki, K., Takahashi, K., Suzumura, A., Yamamoto, M., Tabira, T. (1999) Serial analysis of gene expression in a microglial cell line. *Glia*, 28: 265-271.
28. 澤田 誠 (1995) ミクログリアの多様性と発生学的起源. *細胞*, 27, 193-198.
29. Suzumura, A., Sawada, M., Takayanagi, T. (1998) Production of interleukin-12 and expression of its receptors by murine microglia. *Brain Research*, 787: 139-142.
30. Okada, M., Irie, S., Sawada, M., Urae, R., Urae, A., Iwata, N., Ozaki, N., Akazawa, K., and Nakaniishi, H. (2003) Pepstatin A induces extracellular acidification distinct from aspartic protease inhibition in microglial cell lines. *Glia* 43, 167-174.
31. Salimi, K., Moser, K., Zassler, B., Reindl, M., Embacher, N., Schermer, C., Weis, C., Marksteiner, J., Sawada, M., and Humpel, C. (2002) Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances survival of GM-CSF dependent rat GMIR1-microglial cells. *Neurosci Res* 43, 221-219.
32. Kanzawa, T., M., Sawada, K., Kato, K., Yamamoto, H., Mori and R., Tanaka (2000). Differentiated regulation of allo-antigen presentation by different types of murine microglial cell lines. *J Neurosci Res* 62, 383-388.
33. Kleinerman, ES., Ceccorulli, LM., Bonvini, E., Zicht, R., and Gallin, JI. (1985) Lysis of tumor cells by human blood monocytes by a mechanism independent of activation of the oxidative burst. *Cancer. Res.* 45, 2058-2064.
34. Hagen, TM., Huang, S., Curnutte, J., Fowler, P., Martinez, V., Wehr, CM., Ames, BN., and Chisari, FV. (1994) Extensive oxidative DNA damage in hepatocytes of transgenic mice with chronic active hepatitis destined to develop hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12808-12812.
35. Wade, CR., and van, Rij. AM. (1990) Reperfusion injury and lipid peroxidation. *Lancet* 335, 1464-1465.
36. Massion, PB., Feron, O., Dessy, C., and Balligand, JL. (2003) Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ. Res. Review* 93, 388-398.
37. Eliasson, MJ., Huang, Z., Ferrante, RJ., Sasamata, M., Molliver, ME., Snyder, SH., and Moskowitz, MA. (1999) Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *J. Neurosci.* 19, 5910-5918.
38. Shimo-Nakanishi, Y., Hasebe, T., Suzuki, A., Mochizuki, H., Nomiyama, T., Tanaka, Y., Nagao, I., Mizuno, Y., and Urabe, T. (2004) Functional effects of NAD(P)H oxidase p22(phox) C242T mutation in human leukocytes and association with thrombotic cerebral infarction. *Atherosclerosis*. 175, 109-115.
39. Melov, S., Schneider, JA., Day, BJ., Hinerfeld, D., Coskun, P., Mirra, SS., Crapo, JD., and Wallace, DC. (1998) A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 18, 159-163.
40. Lee, CK., Weindruch, R., and Prolla, TA. (2000) Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat. Genet.* 25, 294-297.
41. Takeuchi, A., Isobe, K., Miyaishi, O., Sawada, M., Fan, Z.H., Nakashima, I., Kiuchi, K. (1998) Microglial NO induces delayed neuronal death following acute injury in the striatum. *Eur. J. Neurosci.*, 10, 1613-1620.
42. Takeuchi, A., Miyaishi, O., Kiuchi, K., Isobe, K. (2001) Macrophage colony-stimulating factor is expressed in neuron and microglia after focal brain injury. *J. Neurosci. Res.* 65, 38-44.
43. Katoh, Y., Niimi, M., Yamamoto, Y., Kawamura, T., Morimoto-Ishizuka, T., Sawada, M., Takemori, H., and Yamatodani, A. (2001) Histamine production by cultured microglial cells of the mouse. *Neurosci Lett* 305, 181-184.
44. Vilhardt, F., Plastre, O., Sawada, M., K., Suzuki, K., Wiznerowicz, M., Kiyokawa, E., Trono D., and Krause K. H. (2002) The HIV-1 Nef protein and phagocyte NADPH oxidase activation. *J Biol Chem* 277, 42136-42143.
45. Sawada, M., Suzumura, A., Yoshida, M., Marunouchi, T. (1990) Human T-cell leukemia virus type I trans activator induces class I major histocompatibility complex antigen expression in glial cells. *J. Virol.*, 64, 4002-4006.
46. Sawada, M., Kondo, N., Marunouchi, T. (1995) Programmed cell death of PC12 induced by adenovirus E1A. *Neurosci. Lett.*, 191, 173-176.
47. Lorenzo, A., Yuan, M., Zhang, Z., Paganetti, P.A., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Mautino, J., Vigo, F.S., Sommer, B., Yankner, B.A. (2000) Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 3, 460-464.
48. Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: prog-

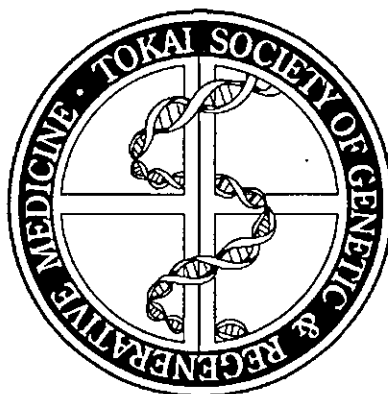
- ress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 97, 353-356.
49. Schenk, D. (2000) Amyloid- β immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 824-828.
50. Weldon, D.T., Rogers, S.D., Ghilardi, J.R., Finke, M.P., Cleary, J.P., O'Hare, E., Esler, W.P., Maggio, J.E., and Mantyh, P.W. (1998) Fibrillar beta-amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS in vivo. *J. Neurosci.* 18, 2161-2173.
51. Tan, J., Town, T., Paris, D., Mori, T., Suo, Z., Crawford, F., Mattson, M. P., Flavell, R. A., and Mullan, M. (1999) Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after beta-amyloid stimulation. *Science*. 286, 2352-2355.
52. Rogers, J., Strohmeier, R., Kovelowski, C.J., and Li, R. (2002) Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia*. 40, 260-269.
53. Akiyama, H and Patrick, L.M. (2003) Specificity of mechanisms for plaque removal after A β immunotherapy for Alzheimer disease. *Nat Med*. 10, 117-118.

TOKAI SOCIETY OF GENETIC & REGENERATIVE MEDICINE

第31回東海遺伝子・再生医療研究会

日 時：平成16年2月7日(土) 午後1時より

場 所：藤田保健衛生大学病院外来棟4階
(愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98)



主 催：東海遺伝子・再生医療研究会

事務局：名古屋大学大学院 医学研究科 脳神経外科学内
Tel. 052-744-2355, Fax 052-744-2361

事務局代表 吉田 純
事務局幹事 若林 俊彦

第31回研究会当番幹事：

丸野内 棟 (藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 応用細胞学研究部門)
澤田 誠 (藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 難病治療共同研究部門)

共 催：日本遺伝子治療学会



脳・神経系に特異的な細胞浸潤のイメージング

鈴木弘美, 小野健治, 澤田 誠

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・難病治療共同研究部門

ミクログリアは脳に存在するマクロファージ様の細胞で高い貪食機能を持つため蛍光マイクロビーズなどの人工物を効率良く取り込み細胞の標識ができる。我々はこのミクログリアと骨髄前駆細胞のごく一部の細胞が血液中から脳に特異的に侵入することを見出した。脳は血液脳関門が存在するため末梢からの投与では脳に特異的に導入することがないが、この性質を利用すると脳に特異的に遺伝子や薬物を運ぶDDSに基づいた新しい治療法や診断法、さらには予防法を確立することができると考えられる。今回、脳・神経系に特異的な細胞の浸潤を可視化するために微小循環解析システムを作出し、血管注入した外来性ミクログリアの動態を単細胞として経眼球下に観察を行ったところ、血流中のミクログリア細胞が遊走する様子が観察できた。今回の観察ではミクログリアが神経組織に遊走する様子は観察できなかったが、いろいろな病態モデルを作成することにより観察できると考えている。我々は一過性前脳虚血モデル動物に蛍光標識をしたミクログリアを血管注入すると、神経傷害部位に集積すること、金属微粒子マグネタイトを取り込ませたミクログリアを血管注入すると、MRIの陰影画像として細胞の浸潤をモニタリングすることに成功している。このことから、今回のシステムとMRIによる非侵襲モニタリングを組み合わせることにより、ミクログリアを用いた脳・神経系を標的化したDDSの精度や有効性を改善できる可能性があると考えている。

(研究の一部はバイオベンチャー研究開発拠点整備事業による支援を受けて行った)

骨髄移植初期に脳内へ移行する細胞の性質に関する解析

小野健治, 吉原賢, 鈴木弘美, 澤田誠

藤田保健衛生大学総合医科学研究所難病治療共同研究部門

近年、骨髄移植後脳へ移行する細胞の一部が神経細胞へ分化転換することが報告され議論をよんでいる。我々はこれまでに GFP 発現骨髄細胞を用いて血液脳関門に損傷が起こらない条件下で骨髄移植を行うと、一部の未分化骨髄細胞が移植後初期に脳内へ移行することを報告してきた。そこで本研究においては、移植初期に脳内へ移行する細胞の性質及び分化転換の有無について検討を行った。移植後初期及び長期において脳切片の免疫染色を行うと、脳へ移行した細胞は造血系細胞マーカーを発現していたが、神経系細胞マーカーの発現は見られなかった。脳細胞培養系に骨髄細胞を共培養した場合においても、造血系細胞マーカーを発現し神経細胞マーカーの発現は見られなかった。脳へ移行した細胞の DNA contents について調べると、ほとんどの細胞が G0/G1 期に arrest しており異性体を示すものは見られなかった。移植後脳を培養するとこれらの細胞は増殖し、形態や抗原発現においてミクログリアと類似していた。これらのことから、生理的条件と同様の条件下では脳内へ移行する細胞は神経細胞やアストロサイトなどの神経系細胞への分化転換を起こさないと考えられた。以上の結果から、骨髄細胞中に微量に存在する脳移行性画分を分離し用いることができれば、自己細胞により脳へ選択的に遺伝子や薬物を送り込むことが可能になり、脳におけるさまざまな疾患を対象とした新規な治療法が確立できると考えられる。

第47回日本神経化学学会大会

Neuro2004

第27回日本神経科学大会

合同大会

プログラム・抄録集

会 期：2004年9月21日(火)～23日(木)

会 場：大阪国際会議場

〒530-0005 大阪市北区中之島5-3-51

TEL：06-4803-5555 (代表)

主 催：日本神経化学学会

日本神経科学学会

共 催：(財)ルイ・パストゥール医学研究センター

第47回日本神経化学学会大会 大会長 遠山 正彌

第27回日本神経科学大会 大会長 村上富士夫

実行委員

片山 泰一	大阪大学大学院医学系研究科	小田 洋一	大阪大学大学院生命機能研究科
山口 淳	大阪大学大学院医学系研究科	勝丸 博信	大阪大学大学院生命機能研究科
森 泰丈	大阪大学大学院医学系研究科	小林 裕明	大阪大学大学院生命機能研究科
井上 浄	大阪大学大学院医学系研究科		

P3-115 FGF-2 facilitates axonal regeneration of the injured spinal cord via inducing CNS-derived fibroblasts proliferation

Hitomi Soumiya¹, Takahiro Jikoh¹, Hidefumi Fukumitsu¹, Shoei Furukawa¹
¹Laboratory of molecular biology, Gifu pharmaceutical University, Gifu, Japan

We have already reported that FGF-2 facilitates axonal regeneration and improves locomotion activity in the completely transected spinal cord. In this study, we examined how FGF-2 affects to axonal regeneration in the injured spinal cord. The rat spinal cords were completely transected at the position of T10, and 1 ml each of FGF-2 (1 mg/ml) or vehicle solution was injected five times into rostral and caudal sites of the injury. FGF-2 increased in the number of the cells in the lesion site, compared with control. The majority of them are fibronectin-positive fibroblasts. To characterize FGF-2 induced fibroblasts (FIF), we tested whether FIF promotes the cortical neuritic extension compared with meninx-derived fibroblasts (MDF) invading the lesion site. We also investigated their property by using RT-PCR and immunocytochemical technique. The results suggested that FIF is involved in the therapeutic effect of FGF-2.

P3-117 In vitro and in vivo characterization of novel semaphorin 3A inhibitors

Kaoru Kikuchi¹, Akiyoshi Kishino¹, Osamu Konishi¹, Kazuo Kumagai¹, Nobuo Hosotani¹, Ikutarou Saji¹, Chikao Nakayama¹, Toru Kimura¹
¹Research Division, Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd., Osaka, Japan

Semaphorins are thought to act as inhibitory factors for regeneration of injured axons as well as neural development. However, direct evidence to support the hypothesis has not been available. We isolated novel semaphorin 3A (Sema3A) inhibitors from the fungus *Penicillium* sp. The inhibitors completely abolished collapsing and repulsive activity of Sema3A *in vitro* at less than several μ M. Analysis for mechanism of action suggested that the inhibitors interact with Sema3A directly and inhibited the binding of Sema3A to its receptor. When a Sema3A inhibitor was administered in the lesion site of rats following olfactory nerve axotomy, the regeneration of the olfactory nerve was significantly accelerated. The result suggested the involvement of Sema3A in neural regeneration as an inhibitory factor. The inhibitors should be excellent molecular probes to investigate the function of Sema3A both *in vitro* and *in vivo*.

2004 Elsevier Science Ireland Ltd. and the Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

P3-119 Analysis of progenitor cells in the striatum and midbrain by MPTP administration

Hideki Ohizumi¹, Masahiro Yamaguchi², Hideki Mochizuki¹, Yoshikuni Mizuno¹
¹Department of Neurology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan, ²Department of Physiology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan

We examined the progenitor cells in the striatum and midbrain by MPTP administration. To explore the repair processes mediated by brain progenitor cells, we focused on a selective lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway by MPTP administration. To detect the progenitor cells in the brain, we used transgenic mice expressing green fluorescent protein (GFP) under the nestin promoter. A single dose of MPTP was administered i.p. to 10 week old transgenic mice. Immunocytochemistry was performed. Abundant nestin and S100 beta immunoreactivities were predominately found in the striatum of MPTP-treated transgenic mice expressing GFP under the nestin promoter. Profound astrogenesis in the striatum of young adult mice in response to toxic dopaminergic insult was found.

P3-116 Does retinoic acid trigger axonal regeneration of fish optic nerve after injury ?

Kazuhiro Mawatari¹, Toru Matsukawa², Kayo Sugitani¹, Satoru Kato²
¹Department of Laboratory Sciences, Kanazawa University, Kanazawa, Japan, ²Department of Molecular Neurobiology, Kanazawa University, Kanazawa, Japan

We cloned a goldfish homolog to chicken purpurin, a retinol-binding protein in the goldfish retina 2-5 days after optic nerve transection. We further prepared the recombinant purpurin from E.coli inserted by purpurin encoding cDNA. In retinal explant culture system, purpurin alone did not affect any change of neurite outgrowth, but a concomitant addition of purpurin with retinol induced a dramatic enhancement of neurite outgrowth in the adult goldfish retina for 5 days of culture. Retinoic acid, a metabolite of retinol also induced a comparable neurite outgrowth to the purpurin with retinol. Furthermore, the neurite promoting effect of purpurin with retinol was completely blocked by presence of disulphiram, a specific inhibitor of retinoic acid synthesizing enzyme. The data all together suggest that retinoic acid triggers neurite outgrowth of optic nerve in the adult goldfish retina after lesion.

P3-118 Possible neurogenesis in the hippocampal CA3 subfield after trimethyltin-induced neural damage

Norito Nishiyama¹, Yokio Yoneda², Kiyokazu Ogita¹
¹Dept Pharmacol, Setsunan Univ, Osaka, Japan, ²Lab Mol Pharemcol, Kanazawa Univ, Grad Sch, Nat Sci Tech, Kanazawa, Japan

Our previous studies have indicated that trimethyltin chloride (TMT) leads to enhancement of neurogenesis in the dentate gyrus following neurodegeneration in the dentate granule cells selectively. Here we find possible neurogenesis in the hippocampal CA3 subfield after TMT treatment in mice. Positive cells immunoreactive to 5-Bromo-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate and proliferating cell nuclear antigen were markedly increased in the hippocampal CA3 subfield and dentate gyrus 2 to 7 days after TMT treatment. Furthermore, Nestin-positive cells were increased transiently in the CA3 subfield 2 to 5 days after treatment. Double staining of NeuN with BrdU revealed that NeuN co-localized with most of BrdU-positive cells in the CA3 subfield. These results suggest that the hippocampal CA3 subfield have the ability of generating neurons following the dentate neurodegeneration induced by TMT in mice.

P3-120 Characterization of immature bone marrow cells migrating into the brain parenchyma after bone marrow transplantation

Kenji Ono¹, Hiromi Suzuki¹, Makoto Sawada¹
¹Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University, Toyoake, Japan

We have reported that some immature bone marrow cells (BMC) migrating into the brain parenchyma in an early phase after bone marrow transplantation (BMT) express early hematopoietic markers. The present study further characterizes GFP-positive BMC in the brain after BMT. Immuno-double labeling confirmed that BMC in the brain expressed hematopoietic, but not neural markers and some of them preserved immaturity at even four and eighteen weeks after BMT. Analysis of the DNA content indicated that most of the migrated BMC were arrested at the G0/G1 phase. When cells from the transplanted brain were cultivated, GFP-positive BMC became proliferative. About 40% of them changed morphology to ramified form like microglia and expressed microglial markers. Furthermore, a part of them expressed immature hematopoietic markers. Thus a part of BMC can transform to the cells indistinguishable from microglia or microglial precursor cells when migrated into the brain.

バイオイメージング

第13回学術集会要旨集

