

脳内ミクログリアに発現する転写制御因子に関する分子薬理学的研究

| | |
|---------|---|
| 著者 | 中里 亮太 |
| 著者別表示 | Nakazato Ryota |
| 雑誌名 | 博士論文要旨Abstractおよび要約Outline |
| 学位授与番号 | 13301甲第4193号 |
| 学位名 | 博士（創薬科学） |
| 学位授与年月日 | 2015-03-23 |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/42312 |



脳内ミクログリアに発現する
転写制御因子に関する分子薬理学的研究
**Molecular pharmacological study of transcription factors
expressing in microglia within the brain**

金沢大学大学院医薬保健総合研究科

創薬科学専攻 薬物学研究室

氏名 中里 亮太

1. はじめに

中枢神経系を構成する細胞は、神経細胞とそれを取り囲むように存在するグリア細胞の大きく二つに分類される。グリア細胞の1つであるミクログリア細胞は、脳内マクロファージとも呼ばれ、中枢の免疫担当細胞として知られている (Kreutzberg., 1996)。近年では中枢神経系の疾患との関連性に注目が集まっており、実際、アルツハイマー病やパーキンソン病、虚血性脳疾患、神経障害性疼痛などの様々な脳疾患において、ミクログリアの活性化が報告されている

(Monif et al., 2010; Masuda et al., 2013)。ミクログリア細胞を活性化させる細胞外刺激には Adenosine-5'-triphosphate (ATP)や各種サイトカインなど様々なものが知られており、それらをミクログリアに発現する各種受容体が感知することで様々なミクログリアの機能が制御されている。活性化したミクログリアの実際の機能としては、死んだ細胞の残骸や異物の貪食 (Koizumi et al., 2007)、傷害部位への走化性 (Honda et al., 2001)、および炎症性サイトカインやケモカインの放出 (Ferrari et al., 1997; Hide et al., 2000; Shigemoto-Mogami et al., 2001; Kataoka et al., 2009) などが一般的に知られている。この様な、ミクログリアの機能や病態発症への関与についての報告は近年急激に増加しており、新たな薬物治療のターゲットとしても注目が集まっている。

しかしながら、これらミクログリアの生理学的意義や機能発現メカニズムの詳細な解明までには至っておらず、特に、ミクログリアの活性化および機能を制御する転写因子の報告は非常に少ないのが現状である。ミクログリア細胞において機能的に発現する転写因子の探索および解明は、ミクログリア細胞の機能解明のみならず、各種中枢疾患における薬物治療の重要なターゲットを提示できる可能性を秘めている。

一方、我々の研究室ではこれまで、「骨」と「中枢」が共通の恒常性メカニズムを持つことを報告してきた (Hinoi et al., 2007; Takarada et al., 2009; Takahata et al., 2011)。このような脳組織と骨関節系組織の生理学的共通性の解明は、未知の脳機能や神経変性疾患治療に対する新たな知見をもたらす可能性を秘めている。

そこで本研究では、ミクログリアの機能制御を行う新たな転写因子の探索を目的として、骨のマスターレギュレーターである Runt-related transcription factor-2 (Runx2)に着目し解析を行った。

2. 方法・結果・考察

2.1 マウスミクログリア細胞における Runx2 の発現

始めに、免疫組織化学法により **Runx2** の発現について検討を行ったところ、マウス大脳皮質および海馬においてミクログリアマーカータンパク質である坑 **Iba1** 抗体による染色と、抗 **Runx2** 抗体による染色の両陽性細胞が観察された。続いて、ミクログリア細胞を活性化する各種薬物によりマウスミクログリア細胞株 **BV-2** 細胞を刺激したところ、病態時などに細胞外濃度が上昇することが知られる **ATP** を **1 mM** という高濃度で刺激した場合においてのみ、暴露開始から **3** 時間目に **Runx2 mRNA** が、**6** および **12** 時間目に **Runx2** タンパク質が一過的に発現上昇することが明らかとなった。しかしながら、**1 mM ATP** の長期的な **ATP** 曝露は細胞死を誘発し、これは **siRunx2** によるノックダウンでも同様に観察された。そこで、**1 mM ATP** を **30** 分間だけ曝露する短期間 **ATP** 曝露条件下における **Runx2** の発現について検討を行ったところ、**mRNA** およびタンパク質いずれも発現上昇が観察されたが、この条件では細胞死は引き起こされなかった。**ATP** 長期曝露、短期曝露いずれの条件下においても、**ATP** 受容体の **1** つである **P2X₇** 受容体の選択的なアンタゴニストである **100 μM oxATP** により阻害され、さらには **P2X₇** 受容体選択的なアゴニストである **300 μM BzATP** により、**1 mM ATP** と同程度の **Runx2 mRNA** の発現上昇が観察された。しかしながら、カルシニューリンの阻害剤であるシクロスポリン **A** や **FK506** の前処置により長期間 **ATP** 曝露による **Runx2 mRNA** の発現上昇は有意に抑制されたが、短期間 **ATP** 曝露による **Runx2 mRNA** の発現上昇は有意に抑制されなかった。どのような転写因子が **ATP** 曝露による **Runx2** 発現上昇に関与するのかについて検討を行うため、**Runx2** 遺伝子プロモーター領域を含むレポーターベクターを用いて検討を行った。その結果、いくつかの転写因子発現ベクターの導入によりルシフェラーゼ活性の著明な上昇が認められ、これら転写因子の **BV-2** 細胞における **mRNA** の発現量について検討を行ったところ、

CCAAT-enhancer-binding protein β (C/EBPβ) の **mRNA** 発現および核内でのタンパク質発現上昇が認められた。また、**C/EBPβ siRNA** 導入による **C/EBPβ** 発現低下に伴い、**Runx2** タンパク質の発現量も有意に減少した(**Fig.1**)。

以上の結果より、高濃度細胞外 **ATP** の曝露において、**Runx2** の発現が **P2X₇** 受容体の活性化を介して一過的に上昇することが明らかとなった。その発現上昇は **Ca²⁺/calmodulin** シグナルの活性化は介した転写因子 **C/EBPβ** の発現上昇および転写活性化が関与する可能性が示唆された。また、長期 **ATP** 曝露条件と短期間 **ATP** 曝露条件ではまた違った細胞内経路により **Runx2** の発現上昇が認められた。ミクログリア細胞は病態時や何らかの傷害時に活性化するが、その活性化は異常の継続時間にとともに変化することが知られており、病態の重症度や持続時間によるミクログリアの性質変化に、この **Runx2** が関与している可能性も考えられる。

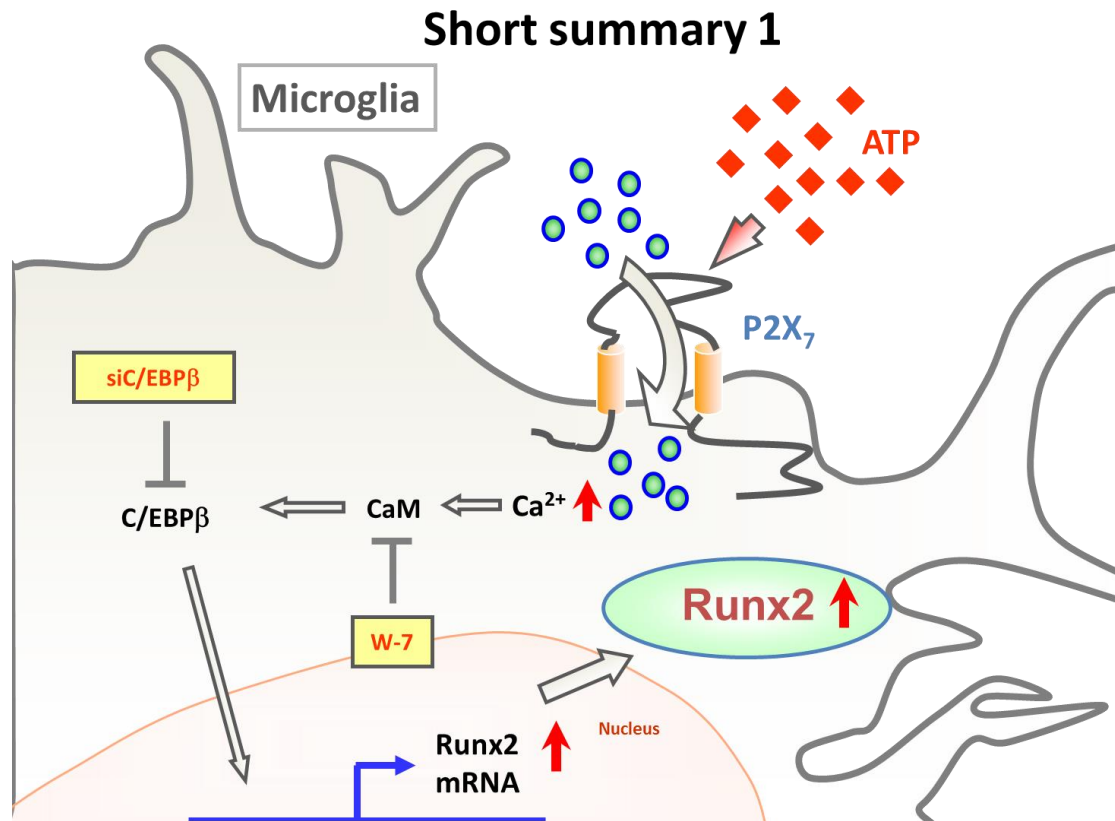


Fig.1

2.2 Runx2 過剰発現 BV-2 細胞を用いたミクログリア細胞の機能解析

Runx2 の機能解明を目的として Runx2 発現ベクター導入により Runx2 を過剰発現させた BV-2 細胞において各種遺伝子発現を検討したところ、マトリックスメタロプロテアーゼの 1 つである *Mmp13* に加え、ケモカイン受容体である *Cx3cr1*、*Ccr2* および炎症性サイトカインである *Tnfa* の mRNA 発現がそれぞれ上昇し、また貪食・飽食能の指標となる蛍光ビーズの取り込み能も有意に増加した。また、Transwell を用いた実験から細胞の走化能も増加傾向が認められた。一方、shRunx2 導入により Runx2 をノックダウンした BV-2 細胞では短時間 1 mM ATP 暴露により発現上昇した *Mmp13* の mRNA 発現が有意に抑制された。

以上の結果より、ミクログリア細胞に発現する Runx2 は、転写因子として、ミクログリア細胞に発現する特定の遺伝子の発現を制御することで、走化性、貪食能、サイトカインの放出といったミクログリアの有する主要な機能を制御している可能性が示唆された(Fig.2)。

2.3 Runx2 コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析

最後に、実際の生体内でのミクログリア細胞における **Runx2** の役割について **Cre/loxP** システムを用いたコンディショナルノックアウトマウスを作製し、ミクログリアが病態発症に大きく関与する神経障害性疼痛モデルを用いて痛みに対する影響について検討を行ったところ、**Runx2** コンディショナルノックアウトマウスでは神経損傷による痛みの過敏化が有意に抑制された。

以上の結果より、実際の生体内ミクログリア細胞においても **Runx2** が機能的に発現し、ミクログリア細胞の異常による病態発症に関与する可能性が示唆された。

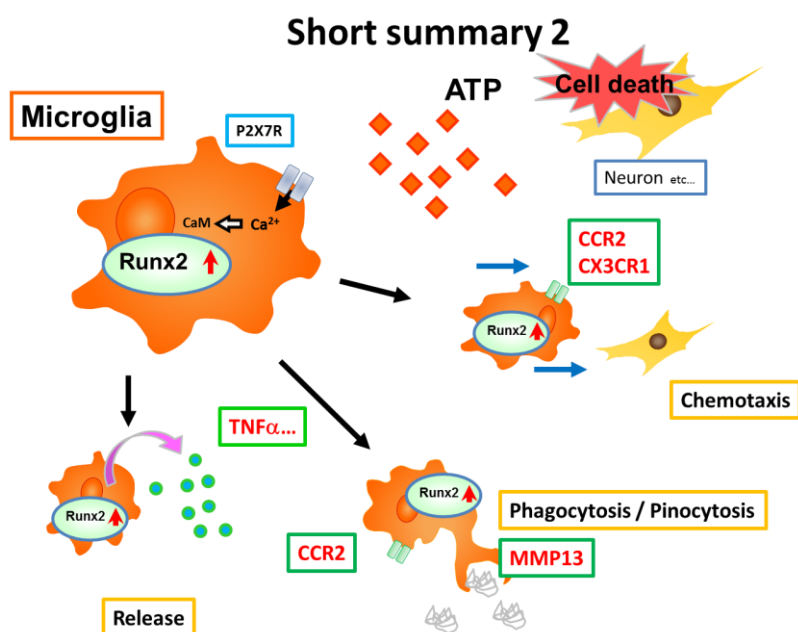


Fig.2

3. おわりに

本研究結果より、ミクログリア細胞において骨のマスターレギュレーターである **Runx2** が発現しており、さらにその発現は高濃度細胞外 ATP により **P2X₇** 受容体の活性化を介して上昇することがあきらかとなった。実際の機能としては転写因子として *Mmp13* やケモカイン受容体、サイトカインなどの様々な因子の発現を制御することで、実際のミクログリアの機能である貪食能や走化能などを調節する可能性が示唆された。さらに、コンディショナルノックアウトマウスの実験により、ミクログリア細胞の活性化により引き起こされる神経障害性疼痛の発症機序に **Runx2** が関与している可能性が示唆された。

本研究で明らかとなったミクログリア細胞における **Runx2** の機能は、ミクログリア細胞の活性化を制御する可能性を示すものであり、薬物治療のターゲットとして非常に興味深いものである。これらの解析がミクログリア細胞の更な

る機能解明と、中枢の各種疾患に対する治療法や治療薬の開発に新たな展望をもたらすことを期待したい。

4. 引用文献

Ferrari, D., Wesselborg, S., Bauer, MK., and Schulze-Osthoff, K. (1997). Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65. *J Cell Biol* 139, 1635-1643.

Hide, I., Tanaka, M., Inoue, A., Nakajima, K., Kohsaka, S., Inoue, K., and Nakata, Y. (2000). Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia. *J Neurochem* 75, 965-972.

Hinoi, E*, Takarada, T*, Uno, K., Inoue, M., Murafuji, Y., and Yoneda, Y. (2007). Glutamate suppresses osteoclastogenesis through the cystine/glutamate antiporter. *Am J Pathol* 170, 1277-1290. *Equally contributed.

Kataoka, A., Tozaki-Saitoh, H., Koga, Y., Tsuda, M., and Inoue, K. (2009). Activation of P2X7 receptors induces CCL3 production in microglial cells through transcription factor NFAT. *J Neurochem* 108, 115-125.

Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, BV., Jacobson, KA., Kohsaka, S., and Inoue, K. (2007). UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446, 1091-1095.

Kreutzberg, GW. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19, 312-318.

Masuda T, Tsuda M, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Ozato K, Tamura T, Inoue K. (2013). IRF8 is a critical transcription factor for transforming microglia into a reactive phenotype. *Cell Rep*. 1(4):334-340.

Monif, M., Burnstock, G., Williams, DA. (2010). Microglia: proliferation and activation driven by the P2X7 receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 1753-1756.

Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Tsuda, M., Ohsawa, K., Kohsaka, S., and Inoue, K. (2001). Mechanisms underlying extracellular ATP-evoked interleukin-6 release in mouse microglial cell line, MG-5. *J Neurochem* 78, 1339-1349.

Takahata, Y*., Takarada, T*., Hinoi, E., Nakamura, Y., Fujita, H., and Yoneda, Y., (2011). Osteoblastic GABA(B) receptors negatively regulate osteoblastogenesis toward disturbance of osteoclastogenesis mediated by receptor activator of nuclear factor-kB ligand in mouse bone. *J Biol Chem* 286, 32906-32917. *Equally contributed.

Takarada, T., Yoneda, Y. (2009). Transactivation by Runt related factor-2 of matrix metalloproteinase-13 in astrocytes. *Neuroscience Letters* 451, 99-104.