

主論文の要旨

A DAP12-Dependent Signal Promotes Pro-Inflammatory Polarization in Microglia Following Nerve Injury and Exacerbates Degeneration of Injured Neurons

DAP12 を介するシグナルはミクログリアの炎症反応を促進し神経損傷後の神経細胞死を増悪させる

名古屋大学大学院医学研究科 機能構築医学専攻

機能形態学講座 機能組織学

(指導：木山 博資 教授)

小林 正明

【緒言】

ミクログリアは中枢神経系の免疫担当細胞であり、感染や神経損傷時に素早く反応し、神経保護的あるいは神経傷害的に働くことが知られている。しかし、活性化ミクログリアが損傷後の神経細胞に対してどのような機序で影響を与えているのか、詳細は解明されていない。マウスの舌下神経損傷モデルでは、損傷運動ニューロンが徐々に変性し遅延型神経細胞死を引き起こすことがこれまでの研究でわかっている。この神経細胞死を引き起こす要因として、運動ニューロン変性疾患である **amyotrophic lateral sclerosis (ALS)** と同様に、ミクログリアの過剰な活性化の関与が考えられている。

DNAX activation protein of 12 kDa (DAP12) はミクログリアに発現する膜タンパクで、アルツハイマー病、那須-ハコラ病の危険因子であることが近年報告された。**DAP12** は細胞内ドメインに **immunoreceptor tyrosine-based activation motif (免疫受容体チロシン活性化モチーフ, ITAM)** を有し、ミクログリア活性制御分子として注目されているが、神経損傷時における活性化ミクログリアでの機能についてはこれまで解析されていない。本研究ではマウス舌下神経損傷モデルを用い、神経損傷後のミクログリアの形態、極性変化や遅延型神経細胞死におけるミクログリア **DAP12** の機能解析を行った。

【方法】

DAP12 の機能解析に 10 週齢から 12 週齢の **C57BL/6** 野生型 (WT) マウスと、**DAP12** ノックアウト (KO) マウスを用いた。**DAP12** の発現細胞の同定に **DAP12** の **in situ hybridization (ISH)** と **interferon regulatory factor 8 (IRF8)** 抗体による **immunohistochemical staining (IHC)** の二重染色を行った。**quantitative real-time PCR (qRT-PCR)** を用いて舌下神経核での **DAP12**, **M1/M2** マーカー mRNA の発現量の変化を定量し、ウェスタンブロッティング法にて **DAP12** タンパクの発現を検討した。**ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1)**, **peripherin**, **tumor necrosis factor- α (TNF- α)** 抗体による **IHC** を行い舌下神経核の組織学的な検討を行った。1~3 日齢マウス的大脑を用いてプライマリーミクログリアを作製し、**lipopolysaccharide (LPS)** にて刺激を行った。刺激後培養上清を **enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)** によって解析した。

【結果】

DAP12 mRNA は舌下神経損傷後の 7 日の損傷側舌下神経核において発現上昇を認めた。ミクログリアの転写因子である **IRF8** の **IHC** シグナルと同一細胞にて共局在していることから、損傷側においてミクログリア特異的に **DAP12** の発現が上昇していることが示された (**Fig. 1A**)。ISH の結果と一致して、舌下神経核における **DAP12 mRNA** の発現は 6.43 倍上昇しており (**Fig. 1B**)、**DAP12** タンパクの発現上昇も認められた (**Fig. 1C**)。

神経損傷に反応し、活性化したミクログリアは増殖し、形態を通常の **ramified** 型から **amoeboid** 型に変化させ、一部は運動ニューロンの周囲を取り囲むように存在することが知られている。ミクログリアのマーカーとして **Iba1** を、運動ニューロンのマーカーとして **peripherin** を用いて IHC を行った。舌下神経損傷 1 週間後の WT と KO のミクログリアには明らかな形態的な差異を認めなかった (Fig. 2)。Iba1 陽性のミクログリア細胞数も 1 週間の時点では有意差はなかった (Fig. 3A, B, I)。しかし、損傷 2, 4, 6 週間後においては KO の方で有意にミクログリア細胞数が減少し、活性化期間が短縮していることがわかった (Fig. 3C-H, I)。WT と KO でミクログリア細胞数に差のない損傷 1 週間の舌下神経核において、ミクログリアの極性の違いを検討するために M1/M2 マーカー mRNA の定量を行った。代表的な M1 マーカー、神経傷害性の炎症性サイトカインである **TNF- α** 、**interleukin-1 β** (IL-1 β)、**IL-6** が KO の損傷側において著明に抑制されていた (Fig. 4A)。一方で神経保護的に働くとされる M2 マーカーにおいては WT と KO の間に M1 マーカーのような大きな変化は認められなかった (Fig. 4B)。

この **DAP12 KO** ミクログリアの性質の違いを、プラマリーミクログリアを用いて **LPS** 刺激を行い検討した。KO では舌下神経核の結果と一致して、**TNF- α** 、**IL-1 β** 、**IL-6** の mRNA が抑制されており (Fig. 5A)、細胞上清の **ELISA** においても KO でこれらの有意な低下が認められた (Fig. 5B)。

最後に **peripherin** 陽性運動ニューロンの細胞数を定量することで、**DAP12 KO** マウスにおけるミクログリア由来 **TNF- α** 、**IL-1 β** 、**IL-6** などが、運動ニューロンの遅延型神経細胞死に及ぼす影響を検討した。損傷 4 週間、6 週間では生存運動ニューロン細胞数が KO で有意に高く、**DAP12** 欠損により神経細胞死が抑制され神経細胞の生存率が上昇していることが示された (Fig. 6)。

【考察】

損傷 1 週間におけるミクログリアの増殖、遊走、形態変化においては WT と KO に明らかな差は認められなかったことから、**DAP12** を介するシグナルはこれらの機能には関与していない可能性が考えられた。しかし、この時点において M1 マーカー、炎症性サイトカインの著明な抑制は既に認められており、この性質の違いがミクログリアの損傷 2 週間以降の細胞数の低下、活性化期間の短縮の要因となったことが示唆された。

ALS などの神経変性疾患において、M1 型炎症促進性ミクログリアは神経障害の原因となることが知られている。また、活性化ミクログリアの阻害薬のミノサイクリンを舌下神経損傷モデルに投与した先行論文においても、今回と同様にミクログリアの増殖には影響を及ぼさず、活性化期間の短縮にのみ影響し、神経細胞死を抑制したことが報告されている。これらのことから、**DAP12** を介する炎症促進反応が KO マウスでは抑制され、その結果、神経細胞死が抑制、神経細胞の生存率が上昇したことが示唆された。

【結語】

DAP12 は神経損傷後のミクログリアにおいて発現が誘導され、DAP12 を介するシグナルはミクログリアの活性化期間や炎症性サイトカインの発現量に関与している。DAP12 KO マウスでは舌下神経損傷後の遅延型神経細胞死が抑制されたことから、活性化ミクログリアの DAP12 シグナルを抑制することで、神経保護的作用が期待できる。