

主論文の要旨

**Phospholipid localization implies
microglial morphology and function via Cdc42 *in vitro***

リン脂質の局在化による Cdc42 を介した
ミクログリアの形態と機能変化

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
機能形態学講座 機能組織学分野

(指導：木山 博資 教授)

時實 恭平

【緒言】

ミクログリアは脳内の環境に応じてその形態と機能を大きく変化させる。正常な成熟脳内では、ミクログリアは多数の突起を有し、それらの先端が伸展縮退を繰り返し、脳内状況を絶えず監視している(ラミファイド型)。一方、脳に損傷や炎症が生じると、突起を退縮させアメーバ様の形態を示し、食食や炎症制御などに関連する機能を発揮する(amoeboid型/活性化型)。このように、ミクログリアの形態と機能には相関があるとされているが、詳しい分子メカニズムは依然明らかになっていない。その原因の一つとして、これまでの研究ではラミファイド型のミクログリアを培養系では十分再現できず、培養実験におけるラミファイド型ミクログリアの研究が困難であったことが上げられる。

そこで、本研究では細胞膜を構成するリン脂質の局在・非対称性およびその構成割合に着目し、膜透過性の高いリン脂質のリゾ体(リゾリン脂質)を用いて解析した。本研究により、lysophosphatidylserine(LysoPS)を用いることでミクログリアをラミファイド型に誘導し、かつ炎症性サイトカインの発現を抑制させることが明らかになった。

【対象及び方法】

生後0-1日のマウスを用いて大脳半球よりミクログリアを単離、培養した。ミクログリア細胞にLysoPSを投与し、走査型電子顕微鏡(SEM)およびインキュベータ顕微鏡を用いて形態の観察をおこなった。細胞の分子局在の証明は免疫組織化学法にておこなった。細胞に局在する脂質量の測定を目的としてLC-MS/MS解析を用いた。また形態変化に関わる細胞内シグナルの解析では各種阻害薬投与、AAVによる遺伝子発現操作およびプルダウン法によるGTP活性化タンパクの解析をおこなった。さらに細胞に存在するPhosphatidylserine(PS)を特異的に染色するためPSと特異的に結合するevectin-2 PH domainにGSTタグを結合させたタンパクを用い、免疫染色をおこなった。細胞の機能については、炎症性サイトカインのmRNA発現をreal-time PCR法で解析した。

【結果】

初代培養ミクログリアはLysoPSを投与することで急速に突起を形成し(図1A~D)、伸縮を繰り返した(図1E)。一方細胞体の動きは低下し(図1F, G)、形態や細胞動態は*in vivo*におけるラミファイド型と酷似していた。LysoPSはGPR34のリガンドであることが知られており、LysoPSによるミクログリアの形態変化はGPR34を介している可能性が考えられた。そこでGPR34欠損ミクログリアに対してLysoPSを投与したところ、野生型と同様の形態変化を示し、受容体は関与していないことが明らかになった(図1H)。またLC-MS/MS解析により投与したLysoPSはミクログリア細胞に取り込まれ(図2A)、一部はPSに転換されていることがわかった(図2B)。次にLysoPSによる形態変化に関わる細胞内シグナルを解析するため各種阻害薬を用いて形態変化

を観察した。その結果、Cdc42 の阻害薬により LysoPS による形態変化は抑制された。次に Cdc42 のドミナントネガティブフォーム(DN)を過剰に発現させることにより Cdc42 の機能をミクログリア細胞において阻害した。Cdc42 DN を過剰に発現した細胞では LysoPS による形態変化が有意に抑制された(図 2C)。またプルダウン法を用いた GTP 活性化タンパクの解析では LysoPS 投与後すぐに活性化 Cdc42 が上昇していることが明らかになった(図 2D)。次に LysoPS による形態変化において Cdc42 と PS との関わりを明らかにするため、それらの局在について解析したところ、LysoPS 投与後のミクログリアでは PS と Cdc42 の局在が比較的一致していることが明らかになった。Cdc42 はネガティブチャージをもつ PS の極性頭部に結合することが知られており、その結合には Cdc42 C 末においてプレニル化が必要である。そこでプレニル化阻害薬(GGTI 298)を用いて LysoPS 投与後の形態変化および PS と Cdc42 の局在の変化を検討した。プレニル化阻害により LysoPS による形態変化が抑制され、PS と Cdc42 のシグナルは異なる局在を示した(図 2E)。形態変化と並んで、LysoPS はミクログリアの炎症性サイトカイン mRNA 発現を抑制することがわかった(図 2F)。

【考察】

本研究において得られた、LysoPS によるミクログリアの形態変化は生体内のミクログリアと非常に良く似た特徴を持ち、かつ抗炎症表現型を示した。これによりミクログリアの形態と機能の間に強い関連があることが示唆された。またこの形態変化は GPR34 欠損ミクログリア細胞でもみられたことから受容体非依存的な現象であると考えられ、細胞に LysoPS が取り込まれ PS に変化することから細胞内脂質局在の変化が形態変化に重要であることが示唆された。さらにその形態変化には、Cdc42 が PS により膜にリクルートされ活性化することが必要であり、Cdc42 を介するシグナルが LysoPS による形態変化に重要な役割を担っていることが示唆された。このように、ミクログリア細胞の形態および機能の制御は、ミクログリアを介する神経傷害性疼痛や神経変性疾患および精神疾患に対して新たな治療効果を開発するうえで有用なツールとなると考えられる。

【結論】

初代培養ミクログリアに LysoPS を投与することによりラミファイド型ミクログリアを培養系で作製することに成功した。細胞内の Cdc42 が PS によって膜へリクルートされ活性化することが形態変化に重要である。また形態変化と同時に炎症性サイトカインを抑制し、ミクログリアの機能も変化させることが示された。