

主論文の要旨

**Agonists for G-protein-coupled receptor
84(GPR84) alter cellular morphology and
motility but do not induce pro-inflammatory
responses in microglia**

〔G蛋白共役型受容体GPR84作動薬はミクログリアの形態と
運動性を変化させるが、炎症応答は引き起こさない〕

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)

魏 丽

【背景と目的】

ミクログリアは脳に常在し、多様な脳の疾患や損傷に応答する脳内の免疫担当細胞として知られている。脳の炎症や損傷によりミクログリアは活性化し、その形態を変化させ多様な機能を発揮する。ミクログリアは脳内の損傷・炎症環境によって、神経保護的あるいは神経毒性的に作動する。このようにミクログリアは相反する機能を併せ持つ細胞であるが、これらの異なる機能発揮に至る分子メカニズムはほとんどわかっていない。以前、当研究室で行われた末梢運動神経損傷モデルを用いた網羅的研究において、神経損傷に応答しミクログリアには多彩なG蛋白共役型受容体(GPCR)が発現することが明らかとなった。このスクリーニングで得られたGPCRのなかで、運動神経損傷時にミクログリアで最も強力に発現が誘導された分子がGPR84であった。GPR84は当初内因性のリガンドが不明なオルファン受容体として登録されたが、中鎖脂肪酸の受容体であることが最近明らかとなった。GPR84は、ミクログリアのみならず末梢のマクローファージでも発現していることが知られている。末梢のマクローファージにおいては遊走能や炎症性サイトカインの発現に関与するという報告がある。一方、中枢でGPR84は神経損傷や多発性硬化症モデルマウスのミクログリアにおいて発現誘導されることは報告されているが、中枢のミクログリアにおける機能は未だ不明であった。そこで我々は、内因性のリガンドである中鎖脂肪酸のCapric acidや天然型アゴニストのEmbelin、合成アゴニストである6-n-Octylaminouracil (6-OAU)を初代培養ミクログリアに投与することにより、ミクログリアにおけるGPR84の機能について解析した。

【対象および方法】

生後0-1日のマウス新生仔(C57BL/6)を用いて大脳半球よりミクログリアを単離、培養した。初期培養ミクログリアに内因性のリガンドであるCapric acid, 天然に存在するアゴニストのEmbelin、合成アゴニストの6-n-Octylaminouracil (6-OAU)を投与し、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) やiNOS、IL-12p35、IL-12p40、CXCL1などのmRNA発現をreal-time PCR法で解析した。また、NF κ B(p65)の核移行を免疫細胞化学的に同定し炎症応答の指標として用いた。細胞の形態および運動性については、インキュベーター顕微鏡 (LCV110) を使用し経時的に観察した。またGPR84はG α_i タンパクと結合することが知られているため百日咳毒素の事前投与によりG α_i pathwayを阻害し、同様に実験を行った。さらにDBA/2J系統のマウスでは、Gpr84遺伝子の第2エクソンで2塩基欠損が生じており、フレームシフトのためGPR84タンパクが正常に産生されないことが知られている。そこで、DBA/2Jマウス新生仔から得られた初代培養ミクログリアを用い、アゴニストやリガンドの機能について同様の実験を行った。

【結果】

GPR84刺激は培養ミクログリアの炎症性応答を惹起しない : Capric AcidやEmbelin, 6-OAUなどのアゴニスト投与群において、vehicle投与群と比較して炎症関連分子 (IL1-

β , IL6, TNF- α , iNOS) mRNAの発現に有意な差は認められなかった。また、NFkB(p65)の核移行は炎症性応答のマーカーとして用いられるので、ミクログリアを6-OAU, Embelin, Capric acidで刺激後にパラフォルムアルデヒドで固定し、NFkB(p65)抗体を用いて免疫染色を行った。核移行は核染色のDAPIとNFkBを蛍光二重染色し、その蛍光強度をリニアスキャンすることにより測定した(Fig.1)。何れのアゴニストも核移行を促進しなかった。

GPR84アゴニストはミクログリアのラップリングと運動性を亢進する：初代培養ミクログリアに作動薬を投与すると、直ちにミクログリアの細胞膜ラップリングが観察された。特に6-OAU刺激によるラップリングが著しく、投与後2分では9割以上のミクログリアが強いラップリングを示した。Embelinや内因性のCapric acidも6-OAUよりは弱いラップリングを惹起した。これらの至適濃度はおよそ1 μ Mであった(Fig.2)。また、ミクログリアの運動性の解析には、タイムラプスを用いて投与後約30分にわたり細胞の形態と移動のイメージを撮像した。いずれのリガンドやアゴニストの投与においてもミクログリアはラップリングしながら活発に移動を開始した(Fig. 3)。移動距離をトレースしその速度を計算すると、アゴニストである6-OAUやEmbelinでは距離/速度ともにvehicle投与に比べて約3倍、内因性リガンドのCapric Acidでは約2倍であった(Fig.4)。

GPR84刺激によるラップリングや運動性の亢進はG α_i Pathwayを介する：GPR84はG α_i に共役していることが知られているので、GPR84刺激による細胞運動能（速度および移動距離）の亢進がG α_i Pathwayであることを確認するため、6-OAU投与において百日咳毒素(PTX)事前投与を行った。その結果、PTX投与は6-OAUによるラップリングや運動性を著しく抑制した。また、Forskolinを用いcAMPを上昇させてから、6-OAUを投与するとcAMP濃度の低下を観察した(Fig. 5)。

GPR84 欠失ミクログリアでは6-OAU刺激により運動性は亢進しない：DBAなどの一部のマウスの系統では、Gpr84遺伝子の第2エクソンで2塩基の欠失が生じているために、フレームシフトを起こしGPR84タンパク自体は発現していない。そこで、GPR84を欠損しているDBA/2Jマウス由来のミクログリアを培養し同様の実験を行なったが、6-OAU等刺激によるラップリングや細胞移動能の亢進は認められなかった。

【考察】

初代培養ミクログリアにおいて、GPR84を介するシグナルはG α_i 経路を介してラップリングや運動能（移動距離と速度）を促進するが、炎症性サイトカイン等の産生は促進しないことを、本研究は明らかにした。末梢マクロファージを用いた実験では、アゴニスト投与により炎症性サイトカインの発現亢進が見られることから、ミクログリアではGPR84を介するシグナルは炎症応答を惹起しないことが明らかになった。一方、運動性の亢進についてはミクログリアもマクロファージも共に見られる共通の現象であると考えられる。脳常在のミクログリアと末梢のマクロファージは同じミエロイド系の細胞であると考えられるが、起源も異なり、多くの異なる機能を有していると考

えられる。また、共通の受容体であっても、その下流で引き起こされる表現型が異なることは十分ありうると考えられる。今回検討したアゴニストのうち6-OAUは内因性リガンドあるいは天然型アゴニストよりは強いミクログリアの運動性亢進作用が見られた。このことから、6-OAUあるいはその類縁体アゴニストを中枢で作用させることにより、ミクログリアの活動性を亢進させることが可能になる。GPR84を標的とした薬剤開発は、ミクログリアの機能低下を原因の一部とするアルツハイマーなどの神経変性疾患の予防・治療薬の開発につながる可能性がある。

【結語】

ミクログリアに発現し、損傷や炎症で発現が亢進するGPR84を介するシグナルは、ミクログリアの遊走性を促進することに関与していると考えられる。これにより炎症部位や損傷部位へのミクログリアの移動が促進し、貪食による細胞の残骸の除去や炎症部位の隔離に関与していることが予想される。本研究はGPR84の機能的意義をin vitroで解析したものであるが、今後神経障害性疼痛や多発性硬化症などのin vivoモデルを用いてその機能解析が必要である。