

脊髄由来ミクログリアの新たな機能制御に関する ATP 受容体の役割

森岡 徳光

The Roles of ATP Receptors in the Regulation of Various Functions in Spinal Microglia

Norimitsu MORIOKA

*Department of Pharmacology, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences,
1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan*

(Received April 5, 2011)

It is shown that glial cells have a pivotal influence on the formation of neuronal network in central nerve system. Moreover, spinal microglia has some important roles in the development and progression of various neurological disorders. Therefore, it is possible that modulation of microglial activity may be sufficient to alleviate those harmful responses. ATP is one of signaling molecules in the spinal cord, and involved in regulation of several microglial functions through the binding of P2X and P2Y receptors. Thus, I focused on the ATP-mediated regulation mechanisms for the two important proteins, which are p38 MAP kinase and excitatory amino acid transporters (EAATs), in cultured spinal microglia. Mounting evidence indicates that p38 in spinal microglia has crucial roles in some neurological diseases. Furthermore, it is recently suggested that microglial EAATs might participate in the homeostasis of glutamate in synapses. This review summarizes our finding regarding the involvement of P2Y receptors and β -adrenergic receptors in the regulation of p38 phosphorylation, and the mechanism of P2X7 receptor-mediated downregulation of EAATs function.

Key words—microglia; spinal cord; ATP; p38; excitatory amino acid transporter; noradrenaline

1. はじめに

従来、中枢神経機能の本質はニューロン活動に基づいており、シナプスを介したニューロンネットワークが機能発現において唯一の機構であると考えられてきた。ところが近年の研究により、中枢神経系を構成する細胞の中で、ニューロンよりも圧倒的に数多く存在するグリア細胞がニューロン活動、ひいては脳機能に様々な影響を与えていることが明らかとなってきた。実際、グリア細胞は中枢神経系における全細胞の約70%を占めている。主にアストロサイト、ミクログリア及びオリゴデンドロサイトの3種がよく知られており、これらの細胞がニューロンへのエネルギー補給や組織損傷の修復だけでなく、シナプス情報伝達や神経機能維持にも積極的に関与していることが数多く報告されている。¹⁾そ

れゆえ、これらグリア細胞機能の異常は中枢神経機能に多大な影響を及ぼすことが想像でき、実際にアルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患やうつ病、統合失調症などの神経精神疾患、慢性疼痛や炎症性疾患などの発症・維持に関与していることが明らかとなっている。²⁻⁵⁾

グリア細胞の1つであるミクログリアは、主に中枢神経系において免疫担当細胞として機能している。ミクログリアは組織損傷、感染などに速やかに応答し、サイトカイン・ケモカイン等を始めとする生理活性物質を産生放出することにより様々な病態発症に関与している。ミクログリアに関する研究では、大脳皮質を始めとする脳での役割に注目が集まっていたが、近年脊髄におけるミクログリアの病態・機能に対する重要性も注目されるようになってきた。特に脊髄での病変が主因となる筋萎縮性側索硬化症や慢性疼痛、脊髄損傷後の機能障害に脊髄ミクログリアが寄与している可能性が報告されている。⁶⁻⁸⁾ それゆえ、ミクログリアの細胞機能を調節する薬物の創製は、様々な脊髄神経疾患に対する治

広島大学大学院医歯薬学総合研究科薬効解析科学
(〒734-8553 広島市南区霞 1-2-3)

e-mail: mnori@hiroshima-u.ac.jp

本総説は、平成22年度日本薬学会中国四国支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

療薬への応用が期待できることから、これらの活性・機能調節メカニズムに対して精力的に研究が行われている。実際、脊髄ミクログリアの活性化及び機能制御には複数のシグナル分子及び機能タンパクが関与していることが明らかとなってきた。それらの中で、筆者らはミクログリア機能調節に影響を及ぼすメカニズムとして ATP-P2 受容体を介した MAP kinases (MAPKs) 及びグルタミン酸トランスポーター (EAATs) の調節機構に注目している。ATP は代表的なミクログリア活性化因子の 1 つであり、複数の P2 受容体サブタイプを介して様々なミクログリア機能の制御に関与している。⁹⁾ また MAPKs の中で特に p38 が脊髄ミクログリアにおける機能調節に必須であり、これらの細胞が寄与する神経変性疾患に対して重要な役割を担うことが報告されている。¹⁰⁾ さらに、EAATs はシナプス間隙でのグルタミン酸濃度を制御することによりシナプス情報伝達に関与するタンパクであり、最近は病態時におけるミクログリア-EAATs の重要性に注目が集まっている。¹¹⁾

そこで筆者は脊髄由来培養ミクログリアを用いて、(1) ATP による p38 活性化 (リン酸化) に関与する P2 受容体サブタイプ、(2) ATP 誘発性 p38 リン酸化に対するノルアドレナリンを介した抑制作用、(3) P2X7 受容体を介した EAATs 制御メカニズムを明らかにした。^{12,13)} 本総説ではこれまでの研究で得られた成果を抜粋して紹介したい。

2. 脊髄ミクログリアにおける ATP による p38 リン酸化に対するアドレナリン受容体を介した制御機構¹²⁾

2-1. ATP による p38 活性化に関与する P2 受容体サブタイプ

P2 受容体は、イオンチャネル内蔵型である P2X 受容体と G タンパク質共役型である P2Y 受容体に大別される。これまでに、脊髄ミクログリアにおいては P2X4, P2X7 及び P2Y12 受容体の機能・役割について明らかにされているが、^{7,14,15)} 筆者らはこれら以外の受容体サブタイプ、特に複数の P2Y 受容体が発現していることを確認している。初代培養脊髄ミクログリアに対して ATP (100 μ M, 5 分間) で刺激を行うと、MAPKs (extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38, c-Jun N-terminal kinase (JNK)) の著しい活性化 (リン酸化) が認められた。これまでに慢性疼痛モデル

動物を用いた *in vivo* 解析では、脊髄ミクログリアにおいて p38 が強く活性化されていることから、¹⁶⁾ 筆者らは特に p38 に注目して解析を行った。ATP による p38 リン酸化に関与する P2 受容体を同定する目的で薬理学的手法により検討したところ、P2Y 受容体遮断薬である reactive blue 2 によって有意に抑制されたが、P2X 受容体拮抗薬である PPADS, TNP-ATP 及び brilliant blue G (BBG) によっては無影響であった。さらに phospholipase C 阻害薬である U73122 によっても ATP による p38 リン酸化は完全に拮抗された。これらの結果は、脊髄ミクログリアでの ATP により誘導される p38 活性化には P2Y 受容体が主に寄与していることを示唆している。

2-2. ATP 誘発性 p38 リン酸化に対するアドレナリン受容体を介した抑制制御¹²⁾

坐骨神経を損傷させることで作製した慢性疼痛モデルラットの脊髄くも膜下腔内に p38 阻害薬を投与すると、疼痛が緩和されることが知られている。¹⁷⁾ それゆえ、筆者らは脊髄ミクログリアの p38 を抑制する内因性因子は、新たな創薬のターゲットになると考えた。その候補物質として内因性のノルアドレナリンに着目した。ノルアドレナリンは脊髄下行性抑制神経の伝達物質であり、三環系抗うつ薬やアドレナリン α 2 受容体作動薬などのノルアドレナリン系薬物が鎮痛作用を示すことも報告されている。^{18,19)} しかしながら脊髄におけるノルアドレナリン-アドレナリン受容体の機能としては、そのほとんどが神経細胞に対するものであり、ミクログリアなどのグリア細胞に対する報告はない。そこで、脊髄ミクログリアにおける ATP 誘発性 p38 リン酸化に対するノルアドレナリンの影響について検討を行った。その結果、ノルアドレナリン (10 μ M) を 60 分間前処置することにより、ATP による p38 リン酸化は約 50 % 抑制されることがわかった。一方で、同じ下行性抑制神経の伝達物質であるセロトニン (10 μ M) では ATP 誘発性 p38 リン酸化に対して無影響であった。また、ノルアドレナリンは ATP による ERK 並びに JNK のリン酸化に対しては抑制効果を示さなかった。

次にノルアドレナリンによる p38 抑制作用に関与するアドレナリン受容体の同定を行った。まずラット脊髄ミクログリアに発現するアドレナリン受容

体サブタイプを RT-PCR により解析したところ、 $\beta 1$ 及び $\beta 2$ 受容体の発現が認められたが、 $\alpha 1$, $\alpha 2$ 及び $\beta 3$ 受容体の発現は認められなかった。次にアドレナリン受容体遮断薬を用いて薬理的に検討を行ったところ、ノルアドレナリンによる p38 抑制作用は β 受容体遮断薬である propranolol (10 μM)、及び $\beta 1$ 受容体選択的遮断薬 atenolol (30 μM) と $\beta 2$ 受容体選択的遮断薬 ICI118551 を併用することにより完全に拮抗された。一方で atenolol 並びに ICI118551 それぞれ単独の前処置では、ノルアドレナリンの作用に対して十分な拮抗作用を示さなかったことより、 $\beta 1$ 及び $\beta 2$ 両受容体がこの作用に関与していると思われる。次にノルアドレナリンの p38 リン酸化抑制作用に関与する細胞内情報伝達系について解析を行った。アドレナリン β 受容体は Gs 共役型であり cAMP-protein kinase A (PKA) の関与が予想されるため、これらの経路に対する薬物を用いて検討した。脊髄ミクログリアに cAMP 膜透過性アナログである dibutyryl cAMP (dbcAMP; 1 mM)、あるいは PKA を選択的に活性化させる 6-benzoyl cAMP (300 μM) をそれぞれ 60 分間前処置することにより、ATP 誘発性 p38 リン酸化が有意に抑制された。さらにノルアドレナリンによる p38 抑制作用は PKA 阻害薬である KT5720 (1 μM) を前処置することにより完全に消失した。これらの結果から、ノルアドレナリンによる p38 抑制作用には、 $\beta 1$ 及び $\beta 2$ 受容体刺激により引き起こされる cAMP-PKA 経路の活性化が重要であることが示唆された。

ノルアドレナリンによる抑制作用には 60 分という前処置時間を要することから、ノルアドレナリンによるなんらかの転写・タンパク誘導作用に関与している可能性が考えられた。そこで、RNA 転写阻害薬である actinomycin D (100 ng/ml) 及びタンパク合成阻害薬である cycloheximide (100 nM) の影響について検討を行ったところ、これら両薬物をそれぞれ前処置することによりノルアドレナリンによる p38 抑制作用はほぼ完全に消失することが明らかとなった。

2-3. ATP 誘発性 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 産生に対するノルアドレナリンの抑制作用 ノルアドレナリンによる p38 抑制作用が実際にミクログリアの細胞機能に影響を及ぼしているかを確認す

るため、ATP による tumor necrosis factor- α (TNF- α) 産生に対する影響を検討した。ミクログリアを起源とする TNF- α は、脳及び脊髄において様々な疾患との関連が示唆されているサイトカインの 1 つである。脊髄ミクログリアを ATP (100 μM) で刺激すると TNF- α mRNA 量並びに細胞外への TNF- α 放出量が著明に上昇しており、これらの反応は p38 阻害薬で拮抗された。さらにノルアドレナリンは、ATP による TNF- α mRNA 量並びに TNF- α 放出量を有意に減弱させ、これらの作用は β 受容体を介していることが明らかとなった。

以上の結果より、ATP により P2Y 受容体を介して活性化された p38 は、ノルアドレナリンにより負に制御されている可能性が示唆された。本作用には $\beta 1/2$ 受容体を介した cAMP-PKA 経路が関与しており、さらにこれらによって転写・翻訳誘導される未同定の抑制性タンパク質が p38 活性を調節している可能性が考えられる (Fig. 1)。またこの作用が実際にミクログリアからの炎症性サイトカイン放出を抑制することからも、生体におけるノルアドレナリンが関与する作用、例えば疼痛制御に一部関与していることが予想される。

3. 脊髄ミクログリアにおける ATP による EAATs 制御機構¹³⁾

3-1. ATP-P2X7 受容体を介したグルタミン酸取り込み能の抑制作用 坐骨神経を損傷させた慢性疼痛モデルラットの脊髄後角においてアストロサイトの EAATs 発現は著明に減少するのに対して、ミクログリアにおける EAATs の発現は上昇していることが報告されている。¹¹⁾ この結果は、平常時におけるシナプスでのグルタミン酸クリアランスは主にアストロサイトの EAATs に依存するが、神経損傷などの病態時においてはその役割がミクログリアにシフトし、ミクログリア-EAATs の重要性が高まる可能性を示唆している。筆者らは培養脊髄ミクログリアにおける EAATs 機能に着目し、そのグルタミン酸輸送制御に ATP-P2 受容体が重要な役割を果たしていることを世界に先駆けて見出した。¹³⁾

培養脊髄ミクログリアには、主要な EAATs である GLAST 及び GLT-1 が発現・機能していることを mRNA、タンパクレベル及び EAATs 阻害薬 (t-PDC; 100 μM , dihydrokainic acid; 1 mM) を用いた検討により確認した。そこで脊髄ミクログリアにお

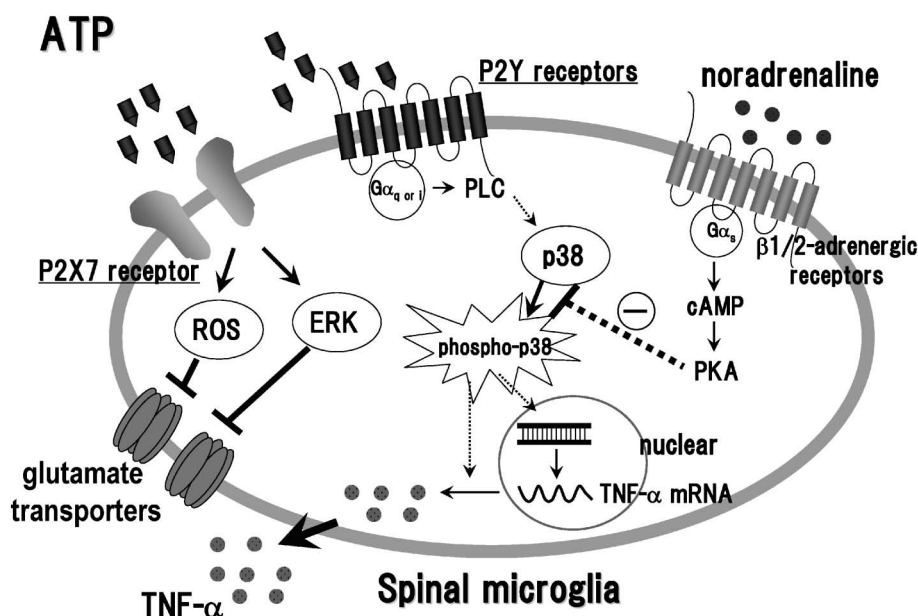


Fig. 1. Schematic Illustration of ATP-mediated Regulation for p38 Phosphorylation and Glutamate Transporters in Spinal Microglia

ける ATP (1 mM) 前処置によるグルタミン酸取り込み能に及ぼす影響を検討したところ、5分間前処置により有意な抑制効果が観察され、30分間により最大の抑制効果を示した。また P2X7 選択的作動薬である BzATP (100 μ M) 前処置によっても有意なグルタミン酸取り込み抑制作用が観察されたが、P2Y 作動薬 (ADP, UTP, UDP-galactose; 各 100 μ M) によっては無影響であった。さらに ATP 及び BzATP によるグルタミン酸取り込み抑制作用は P2X7 選択的遮断薬である brilliant blue G (2 μ M) 及び oxidized ATP (300 μ M) を前処置することによりほぼ完全に消失した。次に P2X7 受容体はイオンチャンネル内蔵型受容体であることから、BzATP によるグルタミン酸取り込み抑制作用に対する細胞外イオン (Na^+ 及び Ca^{2+}) 流入の影響について検討した。しかしながら、BzATP による前処置時においてのみ細胞外 Na^+ 及び Ca^{2+} を除去した条件下においても BzATP によるグルタミン酸取り込み抑制作用は通常時と同様に観察された。

3-2. ATP によるグルタミン酸取り込み能制御に対する MAPKs 及び活性酸素種の関与 次に P2X7 受容体活性化がいかなるメカニズムを介して EAATs 活性を制御しているのかについて検討した。P2X7 受容体刺激により MAPKs が活性化されることが報告されていることから、²⁰⁾ BzATP によるグルタミン酸取り込み抑制作用に対する MAPKs 阻

害薬の効果について検討した。その結果、MEK-ERK 阻害薬 U0126 (10 μ M) 前処置により BzATP による抑制効果は有意に減少したが、p38 阻害薬 (SB202190 10 μ M) 及び JNK 阻害薬 (SP600125 10 μ M) によっては無影響であった。

一方で、P2X7 受容体活性化により活性酸素種 (ROS) が産生されることが知られている。²¹⁾ また、EAATs には酸化還元反応領域が存在し、これらがトランスポーター機能に影響を及ぼすことも報告されている。²²⁾ そこで、BzATP によるグルタミン酸取り込み抑制作用に対する抗酸化剤の効果について検討した。その結果、抗酸化剤 *N*-acetyl-cysteine (NAC, 2 mM) 前処置により BzATP による抑制効果は有意に減少した。また、U0126, NAC 単独では BzATP による抑制効果に対して部分的な減弱作用を示すのみであったが、両薬物を併用することによりほぼ完全に抑制効果は消失した。これらの結果より、P2X7 受容体活性化による EAATs 機能制御には MEK-ERK 及び redox 調節が関与している可能性が示唆された (Fig. 1)。

3-3. ATP-P2X7 によるグルタミン酸取り込みの kinetics に対する影響 BzATP によるグルタミン酸取り込みの kinetics に及ぼす影響について Eadie-Hofstee 解析を行った。その結果、BzATP 処置により親和性 (K_m) に対して全く影響を及ぼさなかったが、最大取り込み量 (V_{max}) が著しく減少

していることが観察された。そこで次に、細胞膜上に発現している EAATs 量を biotin-avidin 法を用いて検討したが、BzATP 処置によっては細胞膜上 GLAST 及び GLT-1 量に影響を及ぼさなかった。これらの結果は、P2X7 活性化による EAAT 機能制御には EAAT 自身の細胞膜からの trafficking とは異なったなんらかのメカニズムが関与している可能性が示唆された。

4. おわりに

脊髄ミクログリアには ATP 受容体である P2Y 及び P2X7 が存在し、それぞれ異なるタイプの MAPKs を活性化させることにより、それぞれ異なる細胞機能調節に関与していることを見出した (Fig. 1)。ATP による P2Y 受容体を介した p38 リン酸化はサイトカイン産生などの脊髄ミクログリア活性化に重要である一方で、ノルアドレナリン-アドレナリン受容体を介した抑制機構も存在しており、p38 活性は複合的に調節されている可能性が示唆された。さらに、ATP は P2X7 受容体を介して EAATs を負に制御することにより、本来神経保護的にも作用するミクログリア機能を障害し、その結果、グルタミン酸による神経毒性を悪化させている可能性が示唆された。これらのメカニズムは、神経変性疾患や慢性疼痛などにおけるミクログリアを介した脊髄機能障害に関与している可能性が予想されることから、本研究で得られた知見を基にしたミクログリア機能調節薬が新たな創薬ターゲットになり得ることが期待される。

謝辞 本総説で紹介した研究は、広島大学大学院医歯薬学総合研究科薬効解析科学並びに歯科薬理学にて得られた成果であり、終始御指導・御鞭撻を頂きました仲田義啓教授並びに土肥敏博教授（現広島大学名誉教授、日本薬科大学教授）に深甚なる謝意を申し上げます。また研究を遂行するにあたりご協力頂きました、両教室員の皆様に深く感謝致します。

REFERENCES

- 1) Allen N. J., Barres B. A., *Nature*, **457**, 675–677 (2009).
- 2) Perry V. H., Nioll J. A., Holmes C., *Nat. Rev. Neurol.*, **6**, 193–201 (2010).

- 3) Gao H.-M., Hong J.-S., Zhang W., Liu B., *J. Neurosci.*, **22**, 782–790 (2002).
- 4) Müller N., Schwarz M. J., *Curr. Pharm. Des.*, **14**, 1452–1465 (2008).
- 5) Marchand F., Perretti M., McMahon S. B., *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 521–532 (2005).
- 6) Boillee S., Yamanaka K., Lobsiger C. S., Copeland N. G., Jenkins N. A., Kassiotis G., Kollias G., Cleveland D. W., *Science*, **312**, 1389–1392 (2006).
- 7) Tsuda M., Shigemoto-Mogami Y., Koizumi S., Mizokoshi A., Kohsaka S., Salter M. W., Inoue K., *Nature*, **424**, 778–783 (2003).
- 8) Peng W., Cotrina M. L., Han X., Yu H., Bekar L., Blum L., Takano T., Tian G.-F., Goldman S. A., Nedergaard M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 12489–12493 (2009).
- 9) Fields R. D., Burnstock G., *Nat. Rev. Neurosci.*, **7**, 423–436 (2006).
- 10) Ji R.-R., Suter M. R., *Mol. Pain*, **3**, 33 (2007).
- 11) Xin W.-J., Weng H.-R., Dougherty P. M., *Mol. Pain*, **5**, 15 (2009).
- 12) Morioka N., Tanabe H., Inoue A., Dohi T., Nakata Y., *Neurochem. Int.*, **55**, 226–234 (2009).
- 13) Morioka N., Abidin M. J., Kitayama T., Morioka K., Nakata Y., Dohi T., *Glia*, **56**, 528–538 (2008).
- 14) Hide I., Tanaka M., Inoue A., Nakajima K., Kohsaka S., Inoue K., Nakata Y., *J. Neurochem.*, **75**, 965–972 (2000).
- 15) Kobayashi K., Yamanaka H., Fukuoka T., Dai Y., Obata K., Noguchi K., *J. Neurosci.*, **28**, 2892–2902 (2008).
- 16) Jin S.-X., Zhuang Z.-Y., Woolf C. J., Ji R.-R., *J. Neurosci.*, **23**, 4017–4022 (2003).
- 17) Tsuda M., Mizokoshi A., Shigemoto-Mogami Y., Koizumi S., Inoue K., *Glia*, **45**, 89–95 (2004).
- 18) Leventhal L., Smith V., Hornby G., Andree T. H., Brandt M. R., Rogers K. E., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **320**, 1178–1185 (2007).
- 19) Li X., Eisenach J. C., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **299**, 939–944 (2001).
- 20) Suzuki T., Hide I., Ido K., Kohsaka S., Inoue K., Nakata Y., *J. Neurosci.*, **24**, 1–7 (2004).
- 21) Parvathenani L. K., Tertyshnikova S., Greco C. R., Roberts S. B., Robertson B., Posman-

tur R., *J. Biol. Chem.*, **278**, 13309–13317 (2003).

22) Trotti D., Danbolt N. C., Volterra A., *Trends Pharmacol. Sci.*, **19**, 328–334 (1998).