

- 4386.
- 9) Seto, S., Uenoyama, A., & Miyata, M. (2005) *J. Bacteriol.*, **187**, 3502–3510.
 - 10) Nakane, D. & Miyata, M. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 19518–19523.
 - 11) Uenoyama, A. & Miyata, M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12754–12758.
 - 12) Ohtani, N. & Miyata, M. (2007) *Biochem. J.*, **403**, 71–77.
 - 13) Nagai, R. & Miyata, M. (2006) *J. Bacteriol.*, **188**, 6469–6475.
 - 14) Miyata, M., Ryu, W.S., & Berg, H.C. (2002) *J. Bacteriol.*, **184**, 1827–1831.
 - 15) Miyata, M. (2007) in *Molecular Mechanism of Mycoplasma Gliding—A Novel Cell Motility System* (Lenz, P. ed.), pp. 137–175, Springer, New York.

宮田 真人

(大阪市立大学大学院理学研究科)

Secrets of *Mycoplasma*, both in our lab—Cell motility without motor proteins or cytoskeletons—

Makoto Miyata (Graduate School of Science, Osaka City University, Sumiyoshi-ku, Osaka 558–8585, Japan)

脳内グリア細胞における ATP センサーを介した情報伝達

1. はじめに

脳内グリア細胞の新しい役割に注目が集まっており、これまでニューロンのみで展開されていた脳機能研究にグリア細胞の視点を導入する重要性が認識されるようになってきた。グリア細胞は大きく分類すると、アストロサイト、オリゴデンドロサイト及びミクログリアからなる。このなかで最大数を占めるアストロサイトは、シナプスを取り囲む構造を呈し、各種神経伝達物質受容体を発現しており、ニューロン活動に依存してシナプス外に漏出した化学伝達物質に反応して、液性因子『グリア伝達物質 (gliotransmitter)』を放出することにより、グリア細胞、ニューロンさらに血管系の細胞と極めてダイナミックにコミュニケーションをとっている¹⁾。従って、アストロサイトの生理及び病態生理は脳の生理機能及び病態の解明に直結するとして注目されている。また、オリゴデンドロサイトがミエリン鞘を形成することは古くからよく知られており、ニューロンの伝導速度に強く影響を与えるだけでなく、その機能不全が種々の病態と関連することが報告されている。これら外胚葉由来のアストロサイト及びオリゴデンドロサイト

と異なり、ミクログリアは中胚葉由来で、血液脳関門が未熟な頃に脳内に進入した血球系の細胞が定住して脳に特化したと考えられている。脳内免疫担当細胞として知られ、種々のサイトカイン放出、傷害部位への遊走能²⁾、貪食能を呈して抗原提示を行う。本稿では、特にミクログリアの機能に焦点を当て、脳が障害を受けた際のミクログリアと傷害ニューロンのコミュニケーションについて述べる。これらコミュニケーションにアデノシン三リン酸 (ATP) 等細胞外ヌクレオチドが重要な役割を果たしている。

2. 細胞間情報伝達物質としての ATP とその受容体

ATP は、エネルギーの通貨としてあまねく細胞内に存在するよく知られた分子である。しかし、ATP は種々の刺激に反応して細胞外に放出され、細胞間情報伝達物質としても重要な役割を果たす。これを認識する ATP センサー P2 受容体の分子の実態は 1993 年に初めて明らかとされ、以来チャンネル型 P2X 受容体 7 種類 (P2X₁₋₇) 及び G タンパク質共役型 P2Y 受容体 8 種類 (P2Y_{1,2,4,6,11-14}) の存在が明らかとなった。注目すべき点は、ほとんどすべての臓器・組織は、何らかの P2 受容体を発現していることであり、その広範な分布から ATP は多種多様の生理機能とリンクしている可能性が示唆されている。

ミクログリアには、P2X₄、P2X₇ 及び P2Y₁₂ 受容体が発現していることが既に報告されており、種々の重要な生理機能と係わっている。例えば 2003 年に津田らが報告したように、P2X₄ 受容体は神経因性疼痛モデル動物の脊髄ミクログリア特異的に発現が亢進し、触刺激を痛みと感じてしまうメカニカルアロディニアを引き起こす³⁾。メカニカ

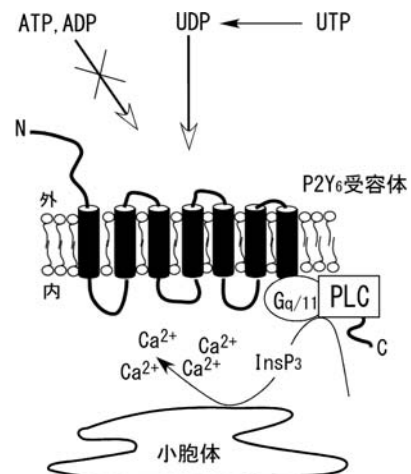


図1 P2Y₆受容体リガンド及び細胞内シグナル

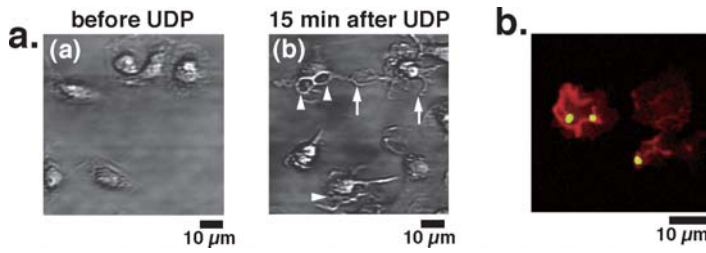


図2 UDP刺激によるミクログリアの形態変化

a. UDP (100 μM) 刺激15分後, ミクログリアは突起を伸展させ(矢印), 細胞内にファゴソーム様の構造を呈する(矢頭). b. ファゴサイトキャップと呼ばれるアクチンが集積した構造が観察され, 周辺部にガイモザンビーズの接着が観察できる.

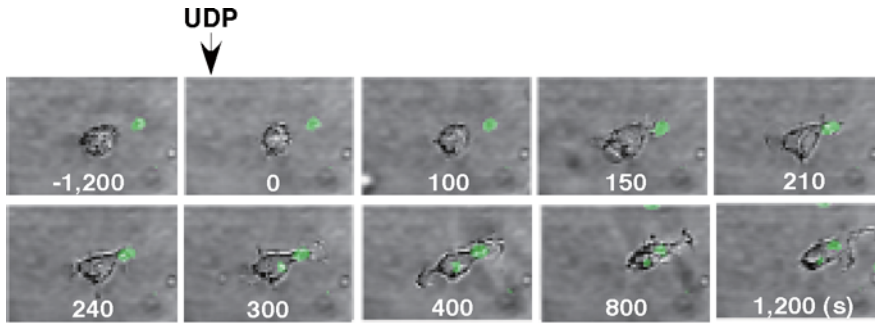


図3 UDP刺激によるミクログリアの貪食能
UDP刺激によりミクログリアは蛍光ラベルしたガイモザンビーズ(画面右上)の貪食を開始する.

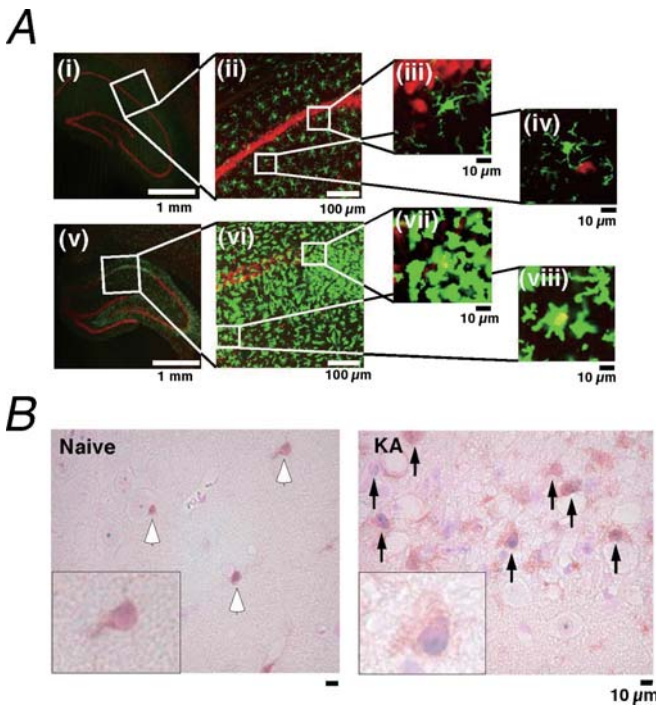


図4 KA処置後の海馬の神経細胞及びミクログリアの形態変化及びP2Y₆受容体の発現亢進

A. KA処置3日後の海馬神経細胞及びミクログリアの免疫染色像. 神経細胞 (NeuN, 赤), ミクログリア (Iba1, 緑). (i)-(iv) 無処置コントロール動物, (v)-(viii) KA処置3日後.
B. *In situ* hybridizationによるミクログリア特異的なP2Y₆受容体mRNAの発現亢進. KA処置3日後の海馬CA3領域ではミクログリア (Iba1, 茶)が増大し, そこにP2Y₆mRNA (黒矢印, 青)が局在している.

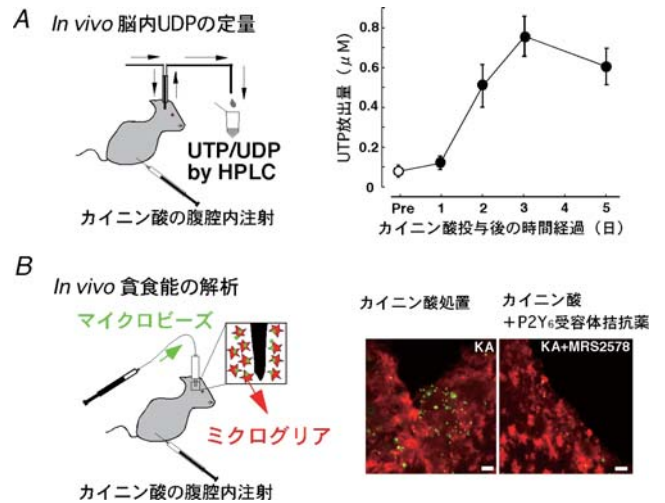


図5 *In vivo* KAモデルにおけるUDP/P2Y₆受容体依存的なミクログリアの貪食

A. マイクロダイアリス法によるUTPの測定. 海馬CA3領域にダイアリスプローブを挿入し, KA処置後の細胞外UTP濃度を経時的に定量した. Nucleotidaseの分解を防ぐためにNTPDase阻害剤存在下で実験を行ったため, UDPの代わりにUTPを定量した. B. *In vivo* 貪食モデル. 海馬CA3領域に蛍光ビーズを注入し, KA処置3日後に脳を取り出し, ミクログリアに取り込まれている蛍光ビーズを共焦点レーザー顕微鏡にて定量した.

ルアロディニアには、P2Y₁₂も重要な役割を果たしている⁴⁾。またP2Y₁₂受容体はケモタキシスセンサーとして働き、傷害部位へミクログリアを誘引する²⁾。このようなATP/P2Y₁₂受容体によるミクログリアのケモタキシスは*in vivo*でも認められ⁵⁾、これはP2Y₁₂受容体欠損動物では認められない⁶⁾。今回我々は、ミクログリアの各種ヌクレオチドに対する応答性を検討し、ミクログリアがUDP (uridine 5'-diphosphate) に非常に高い応答性を示すこと、UDPの特異的受容体タンパク質P2Y₆受容体が、ミクログリアに非常に強く発現していることを見出し、その機能を詳細に解析した⁷⁾。

3. ミクログリアのP2Y₆受容体

図1にP2Y₆受容体及び細胞内シグナル伝達の模式図を示した。P2Y₆受容体はP2受容体であるが、ATP及びADPといったアデニンヌクレオチドを認識せず、ピリミジンヌクレオチドであるUTPの代謝産物UDPにより活性化される。UTPを代謝する細胞外酵素ecto-nucleotidase (NTPDase)は脳内に豊富に存在している。P2Y₆受容体の発現は、脾臓、胎盤、肺、小腸及び脳で多い。ミクログリアのP2Y₁₂受容体はケモタキシスを誘導したが、P2Y₆受容体活性化はミクログリアのケモタキシスには影響しなかった。しかし、驚いたことにUDP刺激わずか15分後には、ミクログリアの形態の劇的な変化、つまり突起の伸展(図2a(b)矢印)、ファゴソーム様の胞構造(図2a(b)矢頭)が多くの細胞体部位で観察された。P2Y₆受容体はミクログリアの貪食(phagocytosis)能と関連しているのだろうか? UDPで刺激すると、ミクログリアは近傍の蛍光ゼイモザンビーズに触手を伸ばし、即座にこれを貪食した(図3)。この貪食応答は、P2Y₆受容体の薬理的な抑制、及びアンチセンスオリゴヌクレオチドによるP2Y₆受容体ノックダウンによりほぼ消失することから、P2Y₆受容体依存的であることが確認できた。また、UDP濃度(5-1,000 μM)依存的であった。P2Y₆受容体は脳内の掃除屋brain's garbage menのスイッチなのである。

4. 神経細胞傷害時の貪食センサー P2Y₆受容体

ミクログリアの貪食は上述したようにUDP/P2Y₆受容体依存的であるが、この貪食作用が*in vitro*実験系でのみ生じる人為的な結果ではないこと、つまり*in vivo*モデルで実際に起きるかどうかを確認した。まず、カイニン酸(KA)の腹腔内投与による痙攣モデルを作成し、海馬の神経細胞及びミクログリアの変化を詳細に検討した。図4

に、KA投与により痙攣を誘発したラットの3日後の海馬の神経細胞及びミクログリア像を示した。KA投与により、海馬CA1及びCA3領域の神経細胞(NeuN陽性シグナル、赤)が消失し、その周りに非常に活性化したミクログリア(Iba1陽性細胞、緑)が劇的に増大した。狭拡大像を観察すると、いくつかのミクログリアでは神経細胞を貪食している像が認められた(vii及びviii)。また、Bでは*in situ* hybridizationと免疫染色の二重染色により、KA投与により増大したミクログリア(黒矢印、茶)特異的に、P2Y₆mRNAシグナル(青)が観察された。つまり、KA処置により、ミクログリアが傷害部位に集積し、そのミクログリア特異的にP2Y₆受容体のupregulationが起きるのである。最後に、このKAモデルを用いてUDP(UTP)の放出及び蛍光ビーズの取り込みを*in vivo*で確認した。KA投与3日後に細胞外UTP濃度は最大となり(図5A)、これは海馬CA1及びCA3領域の錐体神経細胞の脱落が起きる時期とよく一致していた。また、この時期にはP2Y₆受容体を高発現したミクログリアの集積も観察される(図4)。このとき、海馬に注入した蛍光ビーズは、ミクログリアに取り込まれ、これは、P2Y₆受容体拮抗薬及びアンチセンスによるP2Y₆受容体ノックダウンにより消失した。つまり、*in vitro*及び*in vivo*どちらにおいてもミクログリアはUDPをそのセンサーP2Y₆受容体で感知して、貪食を開始し、傷害細胞及びその断片を脳内から排除することが明らかとなった。

5. おわりに

前述したように、神経細胞が損傷すると、その周辺部位に活性化したミクログリアの集積が認められるが、これは、神経細胞が傷害されると細胞内に存在する高濃度(5 mM)ATPが漏出し、これが化学誘引物質として働き、ミクログリアのP2Y₁₂受容体を介して化学走性を誘発すること²⁾に起因している。損傷細胞周辺に集合したミクログリアは両刃の剣であり、神経細胞を修復することも貪食することも行う。もはや修復不可能であると判断した場合に、ミクログリアは傷害された神経細胞やその残片を貪食によって脳内から除去し、脳内環境を整える。しかし、これまでミクログリアが神経細胞のダメージの程度をどのように見分け、またどのようなシグナルで貪食を開始するのかがよくわかっていなかった。ミクログリアにとっては、『To eat or not to eat, that is a problem』であったわけであるが、今回我々は、損傷部位から漏出する(放出される)UDPがその貪食を促すシグナルであり、またミクロ

グリア P2Y₆ 受容体がそのセンサーであることを明らかにした。ATP も UDP も神経細胞の傷害を周辺細胞に知らせる重要な分子として働き、共にミクログリアのダイナミックな動きを制御している。しかし ATP は P2Y₁₂ 受容体を介して化学走性を制御するが食食能には全く影響せず、逆に UDP は P2Y₆ 受容体を介して食食能を亢進させるが化学走性には関与していなかった。このように、ミクログリアは、細胞外ヌクレオチド ATP 及び UDP をそれぞれ厳密に見分け、それぞれの分子に応じた独立した応答を行うことにより、病態時の脳機能を極めて巧妙に制御しているのである。

本研究は、他に高坂新一所長（国立精神神経センター神経研究所）、最上由香里博士（国立医薬品食品衛生研究所）ら、計 10 名による共同研究による結果である。

- 1) Koizumi, S., Fujishita, K., Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., & Inoue, K. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 11023–11028.
- 2) Honda, S., Sasaki, Y., Ohsawa, K., Imai, Y., Nakamura, Y., Inoue, K., & Kohsaka, S. (2001) *J. Neurosci.*, **21**, 1975–1982.
- 3) Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., & Inoue, K. (2003) *Nature*, **424**, 778–783.
- 4) Tozaki-Saitoh, H., Tsuda, M., Miyata, H., Ueda, K., Kohsaka, S., & Inoue, K. (2008) *J. Neurosci.*, **28**, 4949–4956.
- 5) Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., & Gan, W.B. (2005) *Nat. Neurosci.*, **8**, 752–758.
- 6) Haynes, S.E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M.E., Gan, W.B., & Julius, D. (2006) *Nat. Neurosci.*, **9**, 1512–1519.
- 7) Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B.V., Jacobson, K.A., Kohsaka, S., & Inoue, K. (2007) *Nature*, **446**, 1091–1095.

小泉 修一¹, 井上 和秀²

¹山梨大学医学部薬理学,

²九州大学大学院薬学研究院薬理学)

Regulation of brain function mediated by glial ATP sensors
Schuichi Koizumi¹ and Kazuhide Inoue² (¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Yamanashi, 1110 Shimokato, Chuo, Yamanashi 409–3898, Japan; ²Department of Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University)

弾性線維形成におけるファイブリン (fibulin) ファミリータンパク質の役割

1. はじめに

我々の体は、細胞できているというよりも、細胞と細胞が住んでいる建物＝細胞外マトリックスできていると表現するほうが適切である。もともと引っ張りや圧迫に弱い細胞は、自らの回りに細胞外マトリックスを形成して、組織の形を保っている。組織の強度を担う細胞外マトリックスはコラーゲン線維やグリコサミノグリカンであるが、これらは強度は大きいものの伸び縮みができない。一方、肺や動脈や皮膚のように、伸び縮みはその機能に必須である組織もある。引き伸ばしても元に戻る特性を弾性というが、組織の弾性を担っているのが弾性線維という細胞外マトリックスである。

弾性線維のターンオーバーは非常に遅いため、加齢によって劣化が蓄積し、体の組織の弾性の低下をもたらす。弾性が低下する結果、皮膚はたるみ、動脈は硬化し、肺は無理に引き伸ばされて肺気腫となる。加齢だけでなく、弾性線維の分解につながる刺激はいくつもある。たとえば、紫外線は真皮における弾性線維分解酵素（エラスターゼ）の発現を誘導し、喫煙は肺にマクロファージを誘導してエラスターゼの分泌を促進する。エラスターゼのノックアウトマウスでは喫煙による肺気腫がおこらないことが報告されており、この疾患の発症において弾性線維分解が鍵となるステップであることがわかる。動脈においては、弾性線維は太い動脈の質量の実に半分を占めており、脈圧（収縮期圧－拡張期圧）を吸収している。加齢または何らかの理由によって弾性線維の機能が低下すると、動脈は硬い管となって脈圧が上昇する。脈圧の上昇は心疾患の予後を悪化させることがわかっている。これらの例でわかるように、弾性線維の劣化・分解によって組織が伸び縮みできなくなることは、高齢化社会における大きな問題となる疾患の直接原因となっている。

これらの問題に対する根本的な解決は、弾性線維の再生であろう。弾性線維の再生をめざすなら、弾性線維の作り方を知らねばならない。弾性線維の本体は、線維状にならないで多数の箇所を架橋されたエラスチンタンパク質である。架橋されて不溶化したエラスチンは、ゴムのように伸び縮みできる特殊な性質を帯びる。弾性線維形成の本質的