

141. ミクログリアの活性化を調節する内在性制御因子の同定

田中 達英

Key words : ミクログリア, IRF7

旭川医科大学 医学部 解剖学講座
機能形態学分野

緒言

正常時のミクログリアは静止型として存在するが、脳損傷時や炎症を伴う神経疾患に、ミクログリアは病変部位に集積して活性化型となる。活性化ミクログリアは障害を受けた神経細胞を排除し、神経栄養因子などの液性因子を産生して神経細胞の修復や再生に寄与する一方、神経変性疾患や多発性硬化症、脳腫瘍などの多岐にわたる病態の病変部に集積し、神経細胞死を引き起こして病状を悪化させることが報告されている。活性化ミクログリアは組織傷害性細胞としての側面と保護性細胞としての側面を持つことから、脳組織に対して活性化ミクログリアはその二面性が議論されている。この二面性は細胞内でどのように制御されているのかは明らかにされていない。筆者はミクログリアの傷害的性質の決定と保護的性質の決定にはスイッチ因子が調節すると考えており、この仮説に基づいてミクログリアの病態への方向性（軽減か憎悪か）を決定する分子機序の解明を目指した。

方法および結果

新生仔マウス大脳皮質から調整した初代培養ミクログリアを Lipopolysaccharide (LPS) で処理すると傷害性因子である Tumor necrosis factor (TNF)- α や Interleukin (IL)-1 β , また、保護性ミクログリアマーカーである CD86, Inducible nitric oxide synthase (iNOS) の発現量が上昇するのに対して、IL-4 で処理すると保護性因子である Nerve growth factor (NGF) や Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) などの神経栄養因子や保護性ミクログリアマーカーである Arginase (Arg)1, CD206 の発現量が上昇することを qRT-PCR, 免疫染色法で確認した (図1)。また、保護性ミクログリアは傷害性ミクログリアと比べて貪食能が亢進し、保護性ミクログリアの conditioned medium (CM) を cortical neuron に処理すると軸索伸長が促進された (図1)。さらに傷害性ミクログリアの形態は細胞体が肥大するのに対して保護性ミクログリアの形態は細長い突起を持つものが多かった。これらのことから、傷害性ミクログリアと保護性ミクログリアはそれぞれ異なった性質を持っていることが明らかになった。

続いて、傷害性ミクログリアと保護性ミクログリアは細胞外の刺激に応じてシフトするのかを検討するため、ミクログリアを LPS または IL-4 で 18 時間処理した後、medium を交換し、更に刺激する試薬も IL-4 または LPS に交換して、各フェノタイプのマーカー発現を調べた。その結果、LPS で刺激後、medium を交換して IL-4 で刺激すると時間依存的に傷害性マーカー (CD86, IL-1 β , Chemokine (C-C motif) ligand (CCL5)) の発現量は減少し、保護性マーカー (Arg1, CD206, Insulin-like growth factor (IGF)-1) の発現は時間依的に上昇した (図2)。また、IL-4 でミクログリアを刺激した後 LPS 刺激に変換すると傷害性マーカーは上昇し、保護性マーカーは減少した (図2)。さらに細胞の形態や貪食能もまた細胞外の刺激に応じて変化することも確認された。以上の結果から、傷害性と保護性ミクログリアは細胞外の刺激に応じてフェノタイプがシフトすることが示唆された。

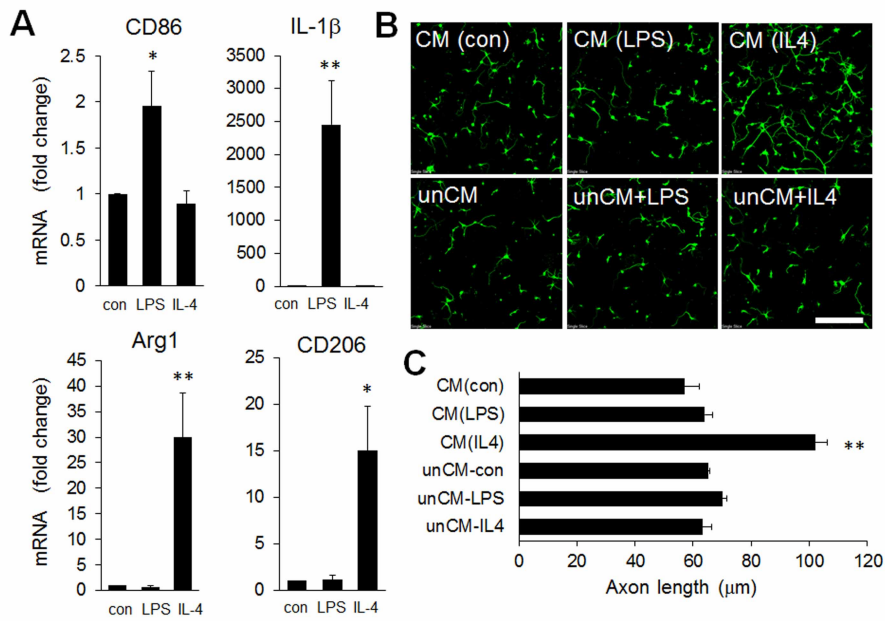


図1. 傷害性および保護性ミクログリアの性質.

A) ミクログリアを LPS または IL-4 で処理した際の傷害性および保護性マーカーの発現プロファイル. Error bar: SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. B) ミクログリアの conditioned medium (CM) を cortical neuron に処理したときの軸索伸長. CM (con): 未処理のミクログリア CM. CM (LPS or IL-4): LPS または IL-4 処理したミクログリア CM. unCM: unconditioned medium. Scale bar: 200 μm . C) B の定量解析. Error bar: SEM. ** $P < 0.01$. 統計処理は多重比較検定 (Tukey-Kramer).

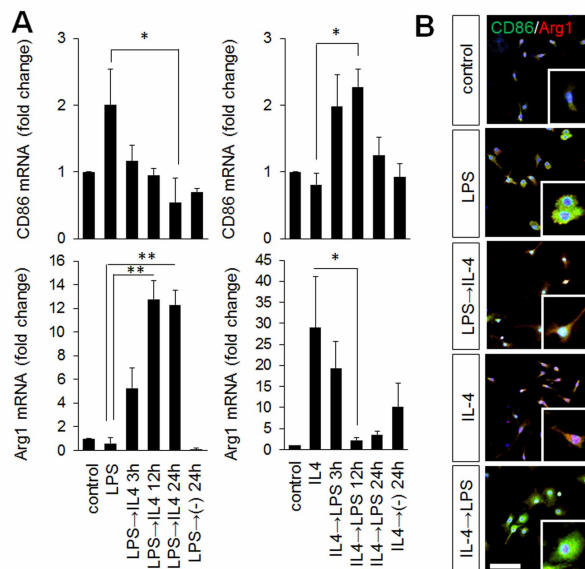


図2. 細胞外刺激に応じたミクログリアフェノタイプの変換.

A) LPS または IL-4 処理したミクログリアを IL-4 または LPS 処理に変換した際の傷害性および保護性マーカーの発現. qRT-PCR. Error bar: SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. B) 免疫染色. Scale bar: 100 μm . 統計処理は多重比較検定 (Tukey-Kramer).

では、ミクログリアに発現するどのような因子がフェノタイプのスイッチに寄与しているのでしょうか。最近になり、マクロファージやミクログリアにおいて Interferon regulatory factor (IRF) が細胞の活性化を制御していることが報告されている。本研究では、傷害性および保護性ミクログリアの性質を制御している内在性因子として、転写因子である IRF ファミリーに着目した。IRF は 1-9 までが知られており、その中でも LPS 刺激で発現量が顕著に亢進する IRF7 に着目した。ミクログリアを LPS で刺激すると IRF7 の発現量が上昇するが、IL-4 刺激によって保護性ミクログリアへシフトさせると、IRF7 の発現量は時間依存的に減少した。一方で保護性ミクログリアから傷害性ミクログリアにシフトさせると IRF7 の発現量は時間依存的に上昇した。

IRF7 は *in vitro* において傷害性ミクログリアまたは保護性ミクログリアから傷害性ミクログリアにシフトさせた時に発現が上昇することから、IRF7 の傷害性マーカーに及ぼす影響について検討した。IRF7 の発現を siRNA でノックダウンすると LPS 誘導性の傷害性マーカーの発現量は抑制された (図 3)。さらにミクログリアを保護性ミクログリアから傷害性ミクログリアにシフトさせた時の傷害性マーカー発現量も IRF7 の発現を siRNA でノックダウンしたもので抑制された (図 3)。これらのことから、IRF7 は傷害性マーカーの発現を制御していることが明らかになった。

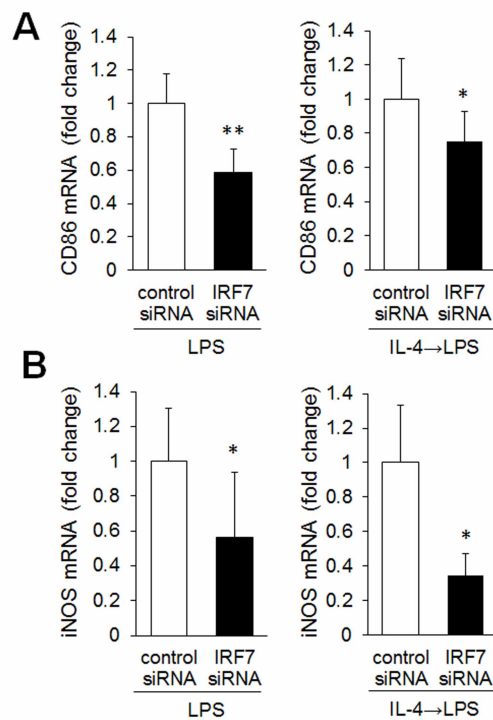


図 3. IRF7 を siRNA でノックダウンした際の傷害性および保護性マーカーの発現。

A) LPS 処理したミクログリアおよび IL-4 処理後に LPS 処理に変換した際の傷害性マーカーの発現プロファイルおよび B) 保護性マーカーの発現プロファイル。Error bar: SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. 統計処理は 2 群比較検定 (paired t-test).

IRF7 の *in vivo* での動態を調べるため、損傷部位にミクログリアの集積が認められる脊髄損傷モデルマウスで検討した。Th8 レベルで損傷を施したマウスにおいて傷害性マーカー (CD86, iNOS, IL-1 β) は損傷後 14 日にかけて徐々に発現量が増大したのに対して保護性マーカー (Arg1, CD206, Ym1) は損傷後 3 日または 7 日で発現量がピークに達した後、14 日目では減弱した。IRF7 は損傷部に集積するミクログリアで発現することを免疫染色で確認した上で発現プロファイルを調べたところ、傷害マーカーと同じ発現パターン、つまり、損傷後徐々に発現量が増大したことから、*in vivo* においても IRF7 は傷害マーカーの発現に関与していることが示唆された (図 4)。

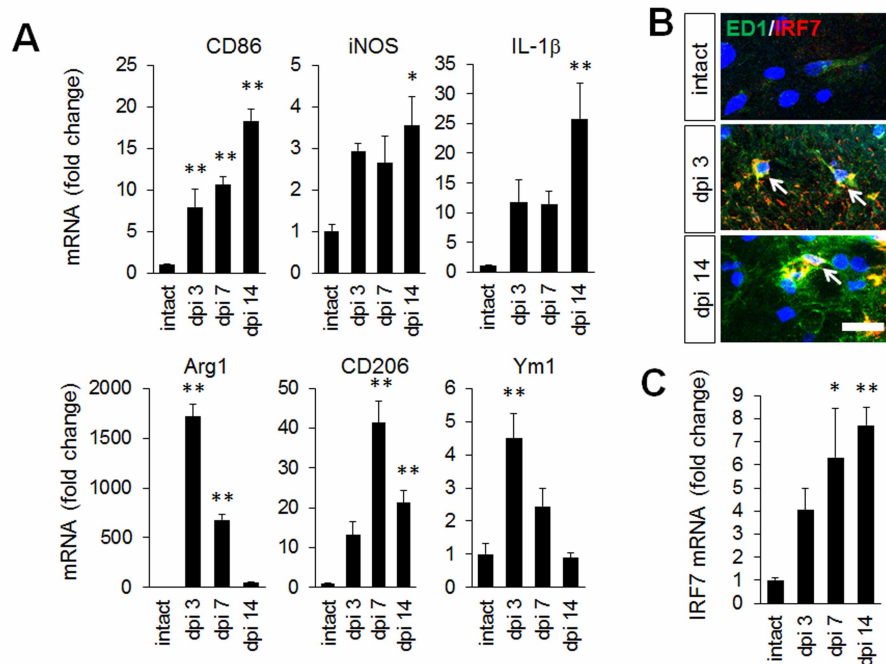


図4. 脊髄損傷時における傷害性および保護性マーカーの発現と IRF7 の発現プロファイル。

A) 脊髄損傷後の傷害性および保護性マーカーの発現プロファイル。 Error bar: SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. B) 脊髄損傷後の IRF7 の発現。 Scale bar: 50 μ m. C) 脊髄損傷後の IRF7 の発現プロファイル。 Error bar: SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. 統計処理は多重比較検定 (Tukey-Kramer)。

考 察

傷害性ミクログリアと保護性ミクログリアは細胞外の刺激に応じてフェノタイプがシフトすることが明らかになった。これは、ミクログリアの持つ二面性は各フェノタイプ集合体のどちらが多いかで決定されるのではなく、フェノタイプを変換させる内在性因子があるということを示唆する。また、IRF7 の発現を siRNA で抑制すると傷害性ミクログリアのマーカーである CD86 や iNOS の発現が顕著に抑制されたことから、ミクログリアの傷害的性質の決定には IRF7 が関与することが示唆されたり。しかしながら、詳細は割愛したが、siRNA で IRF7 の発現を抑制しても傷害性マーカー IL-1 β の発現には影響を及ぼさなかった。IRF7 は傷害性ミクログリアの性質を調節してはいるが、全ての傷害性ミクログリアの機能までは関与していないと思われる。ミクログリアの傷害的性質と保護的性質の決定には IRF7 以外の複数の因子が関与しているかもしれないし、傷害性ミクログリアまたは保護性ミクログリアの性質を決定するマスター因子が存在するのかもしれない。この点については今後の研究が必要である。

本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) Tanaka, T., Murakami, K., Bando, Y. & Yoshida, S. : Interferon regulatory factor 7 participates in the M1-like microglial polarization switch. *Glia*, **63** : 595-610, 2015.