

(続紙 1)

京都大学	博士（薬学）	氏名	金野 真和
論文題目	ミクログリアの細胞内Ca ²⁺ 調節機構に関する研究		
（論文内容の要旨） グリア細胞の一種であるミクログリアは、脳内の免疫担当細胞として働き、正常な神経機能の発現・維持を担う一方で、異常な活性化により遊離される各種因子が中枢神経系疾患の病態形成に重要な役割を果たすことが報告されている。近年、ミクログリアに発現するK⁺チャネルの阻害は神経細胞死を抑制する報告や炎症性メディエーター放出等における細胞内Ca²⁺シグナリングの関与を示す数々の報告を通じて、Ca²⁺、K⁺などのイオンを透過するイオンチャネル活性のミクログリアによる免疫応答における重要性が提唱されてきた。一方で、温度、pH等様々な刺激の細胞センサーとしてのtransient receptor potential（TRP）チャネル、あるいは免疫系細胞において主なCa²⁺流入口として重要な役割を果たすストア作動性Ca²⁺チャネル（SOC）の、ミクログリア機能への関与については、未だ不明な点が多く残されている。本研究において著者は、TRPチャネルファミリーのうち、温和な熱やアラキドン酸、浸透圧変化等で活性化するTRPV4チャネル、加えてSOCの一種であるCa²⁺放出活性化Ca²⁺（CRAC）チャネルに着目し、ミクログリア活性化過程およびCa²⁺動員に対するこれらイオンチャネルの役割を検討し、以下の新知見を得た。 第一章 TRPV4チャネル開口刺激によるリポ多糖（LPS）誘発ミクログリア活性化抑制機構の解明 最初に、成体ICR系雄性マウスを用いて、線条体ミクログリアにおけるTRPV4発現を<i>in situ</i> hybridizationで検出した。続いて、マウス脳室内にミクログリア活性化作用を有するLPS単独またはTRPV4選択的刺激薬4α-PDDと同時に注入すると、LPS誘発のミクログリア形態の増大は顕著に抑制された。そこで、詳細な抑制機構を解明するため、Wistar/ST系新生仔ラット大脳皮質より培養ミクログリアを調製し、各種<i>in vitro</i>実験を行った。まず、ホールセルパッチクランプ法等により培養ミクログリアにおけるTRPV4の機能的な発現を明らかにした。LPSにより惹起される各種ミクログリア活性化指標（TNF-α遊離、galectin-3発現あるいは電位依存性K⁺チャネル電流）の増大は、LPSと同時に4α-PDDで処置することにより抑制されることが明らかになった。ここで、海馬神経細胞においてTRPV4刺激は膜電位の維持に関与すること、および非興奮性細胞において膜電位の脱分極が細胞活			

性を抑制することを踏まえ、TRPV4によるミクログリア活性化抑制作用の機序を検討すべく膜電位変化を測定した。培養ミクログリアに4 α -PDDを適用することにより膜電位の脱分極が観察された。また、4 α -PDD24時間処置後の培養ミクログリアでは、SOCを介するCa²⁺流入は減弱した。加えて、脱分極が及ぼすミクログリア活性化に対する影響を高濃度KClを用いて検討した。高濃度KClは、4 α -PDDと同様にミクログリアの膜電位を脱分極させ、さらにCa²⁺流入およびLPS誘発各種活性化指標を抑制した。以上の結果は、TRPV4開口刺激は細胞膜の脱分極を介してミクログリアの活性化に対して抑制的に働くことを示すものであり、その抑制作用機序としては、脱分極によるSOCを介するCa²⁺流入の減少が関与することが示唆される。

第二章 小胞体Ca²⁺結合タンパク質caluminによるCa²⁺放出活性化Ca²⁺ (CRAC) チャンネルのイオン選択性の制御

Ca²⁺選択性が高いCRACチャンネルの分子実体として、昨今小胞体Ca²⁺センサータンパク質のSTIM1と形質膜チャンネルポアOrai1が同定された。また、小胞体Ca²⁺結合タンパク質caluminが同時期に同定され、SOCへの関与が示唆されている。著者は、まずミクログリアにおけるCRACチャンネルの発現を検出した。その後、caluminとCRACチャンネルの相互作用によるチャンネル活性の調節について詳細に検討すべく、HEK293細胞を用いてCRAC電流のホールセル記録を行った。Orai1とSTIM1二分子にcaluminを加えた三種類のタンパク質を発現したHEK細胞におけるCRACチャンネル電流応答は、応答の時定数が小さく、Na⁺に対するCa²⁺の相対的透過比率は小さい値を示した。続いて、Ca²⁺イメージング法を用いて、小胞体Ca²⁺ストア枯渇剤タプシガルギンの適用によって引き起こされる細胞外からのCa²⁺流入は、caluminとCRACチャンネル共発現細胞において減弱することを見いだした。さらに、免疫共沈降実験により、caluminはOrai1、STIM1両分子とタンパク質間結合する事が示された。以上の結果より、caluminはCRACチャンネルと直接相互作用し、CRACチャンネルのCa²⁺透過性を減少させることが明らかとなった。

以上著者は、TRPV4チャンネルの開口刺激がLPS誘発ミクログリア活性化を抑制し、その抑制機序として、TRPV4の開口が膜電位の脱分極を引き起こし、SOCを介するCa²⁺流入を減少させることに起因することを明らかにした。加えて、ミクログリアにおけるCa²⁺動員へのCRACチャンネルの関与を示唆し、そのCa²⁺イオン透過性制御分子としてcaluminの可能性を提示した。本研究の成果は、ミクログリアのCa²⁺動員の制御に、TRPV4チャンネルやcaluminが重要な役割を果たすことを示唆するものであり、ミクログリアの活性化が関与する各種中枢神経系疾患の新たな治療薬の創製に有用な基礎的知見を提供する。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

グリア細胞の一種であるミクログリアは、脳内の免疫担当細胞として働き、正常な神経機能の発現・維持を担う一方で、異常な活性化により遊離される各種因子が中枢神経系疾患の病態形成に重要な役割を果たすことが報告されている。近年、ミクログリアに発現する K^+ チャネルの阻害は神経細胞死を抑制する報告や炎症性メディエーター放出等における細胞内 Ca^{2+} シグナリングの関与を示す数々の報告を通じて、 Ca^{2+} 、 K^+ などのイオンを透過するイオンチャネル活性のミクログリアによる免疫応答における重要性が提唱されてきた。一方で、温度、pH等様々な刺激の細胞センサーとしてのtransient receptor potential (TRP) チャネル、あるいは免疫系細胞において主な Ca^{2+} 流入口として重要な役割を果たすストア作動性 Ca^{2+} チャネル (SOC) の、ミクログリア機能への関与については、未だ不明な点が多く残されている。本研究において申請者は、TRPチャネルファミリーのうち、温和な熱やアラキドン酸、浸透圧変化等で活性化するTRPV4チャネル、加えてSOCの一種である Ca^{2+} 放出活性化 Ca^{2+} (CRAC) チャネルに着目し、ミクログリア活性化過程および Ca^{2+} 動員に対するこれらイオンチャネルの役割を検討し、以下の新知見を得た。

第一章 TRPV4チャネル開口刺激によるリポ多糖 (LPS) 誘発ミクログリア活性化抑制機構の解明

申請者は最初に成体ICR系雄性マウスを用いて、線条体ミクログリアにおけるTRPV4発現を*in situ* hybridizationで検出した。続いて、マウス脳室内にミクログリア活性化作用を有するLPS単独またはTRPV4選択的刺激薬4 α -PDDと同時に注入すると、LPS誘発のミクログリア形態の増大は顕著に抑制された。そこで、詳細な抑制機構を解明するため、申請者はWistar/ST系新生仔ラット大脳皮質より培養ミクログリアを調製し、各種*in vitro*実験を行った。まず、ホールセルパッチクランプ法等により培養ミクログリアにおけるTRPV4の機能的な発現を明らかにした。LPSにより惹起される各種ミクログリア活性化指標 (TNF- α 遊離、galectin-3発現あるいは電位依存性 K^+ チャネル電流) の増大は、LPSと同時に4 α -PDDで処置することにより抑制されることが明らかになった。ここで、海馬神経細胞においてTRPV4刺激は膜電位の維持に関与すること、および非興奮性細胞において膜電位の脱分極が細胞活性化を抑制することを踏まえ、申請者はTRPV4によるミクログリア活性化抑制作用の機序を検討すべく膜電位変化を測定した。培養ミクログリアに4 α -PDDを適用することにより膜電位の脱分極が観察された。また、4 α -PDD24時間処置後の培養ミクログリアでは、SOCを介する Ca^{2+} 流入は減弱した。

加えて、脱分極が及ぼすミクログリア活性化に対する影響を高濃度KClを用いて検討した。高濃度KClは、4 α -PDDと同様にミクログリアの膜電位を脱分極させ、さらにCa²⁺流入およびLPS誘発各種活性化指標を抑制した。以上の結果は、TRPV4開口刺激は細胞膜の脱分極を介してミクログリアの活性化に対して抑制的に働くことを示すものであり、その抑制作用機序としては、脱分極によるSOCを介するCa²⁺流入の減少が関与することが示唆された。

第二章 小胞体Ca²⁺結合タンパク質caluminによるCa²⁺放出活性化Ca²⁺（CRAC）チャネルのイオン選択性の制御

Ca²⁺選択性が高いCRACチャネルの分子実体として、昨今小胞体Ca²⁺センサータンパク質のSTIM1と形質膜チャネルポアOrai1が同定されている。また、小胞体Ca²⁺結合タンパク質caluminが同時期に同定され、SOCへの関与が示唆されている。そこで申請者は、まずミクログリアにおけるCRACチャネルの発現を検出した。その後、caluminとCRACチャネルの相互作用によるチャネル活性の調節について詳細に検討するために、HEK293細胞を用いてCRAC電流のホールセル記録を行った。その結果、Orai1とSTIM1二分子にcaluminを加えた三種類のタンパク質を発現したHEK細胞におけるCRACチャネル電流応答は、応答の時定数が小さく、Na⁺に対するCa²⁺の相対的透過比率は小さい値を示した。続いて、Ca²⁺イメージング法を用いて、小胞体Ca²⁺ストア枯渇剤タプシガルギンの適用によって引き起こされる細胞外からのCa²⁺流入は、caluminとCRACチャネル共発現細胞において減弱することを見いだした。さらに、免疫共沈降実験により、caluminはOrai1、STIM1両分子とタンパク質間結合する事が示された。以上の結果より、caluminはCRACチャネルと直接相互作用し、CRACチャネルのCa²⁺透過性を減少させることが明らかとなった。

以上、申請者は、TRPV4チャネルの開口刺激がLPS誘発ミクログリア活性化を抑制し、その抑制機序として、TRPV4の開口が膜電位の脱分極を引き起こし、SOCを介するCa²⁺流入を減少させることに起因することを明らかにした。加えて、ミクログリアにおけるCa²⁺動員へのCRACチャネルの関与を示唆し、そのCa²⁺イオン透過性制御分子としてcaluminの可能性を提示した。本研究の成果は、ミクログリアのCa²⁺動員の制御に、TRPV4チャネルやcaluminが重要な役割を果たすことを示唆するものであり、ミクログリアの活性化が関与する各種中枢神経系疾患の新たな治療薬の創製に有用な基礎的知見を提供している。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成24年2月23日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降