

## 論文の内容の要旨

### Involvement of microglial TRPV4 in glial scar formation

#### (グリア瘢痕形成におけるマイクログリアの TRPV4 の関与)

小野寺 純也

#### 【序論】

中枢神経系に損傷が生じると、反応性アストロサイトが傷害部位を取り囲む構造(グリア瘢痕)を形成する。また、グリア瘢痕の形成には、損傷部位に集積した脳内免疫細胞マイクログリアが関与することも知られている。しかし、グリア瘢痕形成におけるマイクログリア-アストロサイト相互作用の関与の有無やそのメカニズムには不明な点が多い。

TRPV4(Transient receptor potential vanilloid 4)は温度刺激や機械刺激によって活性化する非選択的陽イオンチャネルである。中枢神経系の損傷により、マイクログリアを含め様々な細胞で TRPV4 の発現上昇が報告されている。従って、損傷領域における TRPV4 の機能がグリア瘢痕形成に関与する可能性がある。そこで、マイクログリアの TRPV4 に着目し、そのグリア瘢痕形成への関与の有無やメカニズムの解明を目的とした研究を行った。

#### 【結果・考察】

##### 1. マイクログリアの TRPV4 は、グリア瘢痕形成に必要である

グリア瘢痕形成に対するマイクログリア TRPV4 の関与を調べるため、培養海馬切片のグリア瘢痕を誘導した(図 1A)。グリア瘢痕は外傷により形成されるため、ビーズを切片上に静置し、その重みによる局所的な細胞死を誘導した。その後、マイクログリアマーカー Iba1 の集積や、アストロサイトのグリア瘢痕マーカー GFAP の発現上昇が認められ、グリア瘢痕形成が確認された。まず、TRPV4 をマイクログリア特異的にノックアウト(KO)する遺伝子改変マウスを用いてグリア瘢痕を作成し、その GFAP 密度を調べた

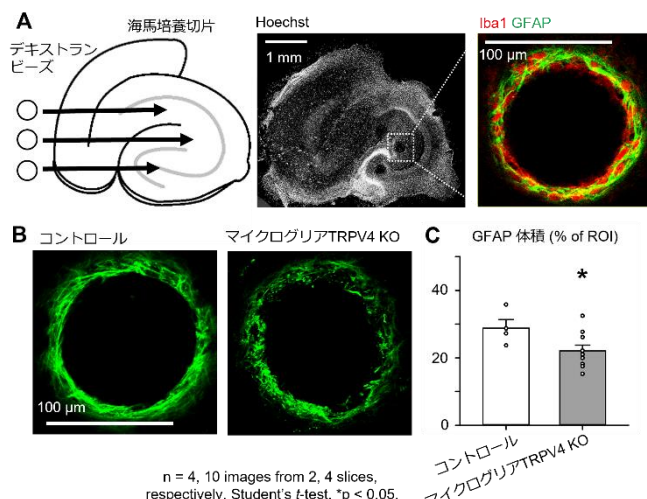


図1. (A)グリア瘢痕モデルの作成。(B) グリア瘢痕マーカー Iba1 の集積や、アストロサイトのグリア瘢痕マーカー GFAP の発現比較。(C) グリア瘢痕を占めるGFAP密度。

図1. (A)グリア瘢痕モデルの作成。(B) グリア瘢痕マーカー Iba1 の集積や、アストロサイトのグリア瘢痕マーカー GFAP の発現比較。(C) グリア瘢痕を占めるGFAP密度。

(図 1B)。その結果、コントロールマウス(TRPV4<sup>fl/fl</sup>)群に比べて、マイクログリア TRPV4 KO マウス(CX3CR1<sup>CreERT2/+</sup>; TRPV4<sup>fl/fl</sup>)群の GFAP 密度が有意に低かった(図 1C)。以上より、マイクログリア TRPV4 はグリア瘢痕形成に必要であることが示唆された。

## 2. TRPV4 依存的にマイクログリアから放出された液性因子が、アストロサイトの GFAP 発現量を増加させる

TRPV4 依存的にマイクログリアから分泌された液性因子が、アストロサイトの GFAP 発現量に与える影響を調べた。そのために、TRPV4 賦活化薬の GSK1016790A(GSK)曝露後の初代マイクログリア培養上清を、初代アストロサイトに処置した(図 2A)。すると、溶媒曝露培養上清群に比べ、GSK 曝露培養上清群ではアストロサイトの GFAP 密度が上昇した(図 2B)。また、GSK 自体は GFAP 密度に直接影響しなかった(図 2C)。以上の結果より、TRPV4 依存的にマイクログリアから分泌された液性因子が、アストロサイトの GFAP 発現量を増加させることが示唆された。

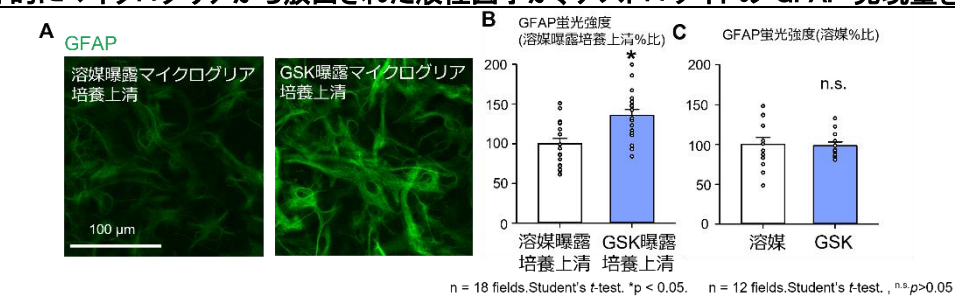


図2. (A) 初代アストロサイトのGFAP免疫染色像。(B) GSK曝露マイクログリア培養上清の処置により、GFAP蛍光強度が上昇した。(C) GSKのみでは、GFAP蛍光強度に変化は見られなかった。

そのために、TRPV4 賦活化薬の GSK1016790A(GSK)曝露後の初代マイクログリア培養上清を、初代アストロサイトに処置した(図 2A)。すると、溶媒曝露培養上清群に比べ、GSK 曝露培養上清群ではアストロサイトの GFAP 密度が上昇した(図 2B)。また、GSK 自体は GFAP 密度に直接影響しなかった(図 2C)。以上の結果より、TRPV4 依存的にマイクログリアから分泌された液性因子が、アストロサイトの GFAP 発現量を増加させることが示唆された。

## 3. マイクログリア TRPV4 の活性化により、リソソームエキソサイトーシスが促進される

TRPV4 依存的なマイクログリアの液性因子分泌のメカニズムを調べた。マイクログリア TRPV4 の局在を調べたところ、TRPV4 がリソソームマーカーCD68 と共局在することが分かった(図 3A)。TRPV4 の活性化がリソソームの性質に影響すると考えられるため、まず TRPV4 の活性化がリソソーム pH に与える影響を検証した。そのために、pH 感受性蛍光色素の pHrodo で標識された大腸菌を初代マイクログリアに貪食させた(図 3B)。GSK を処置したところ、pHrodo 蛍光強度が有意に減少した(図 3C)。従って、TRPV4 の活性化はリソソーム pH を上昇させることが示唆された。次に、TRPV4 の活性化がリソソームの機能に与える影響を調べた。本研究では、pH 上

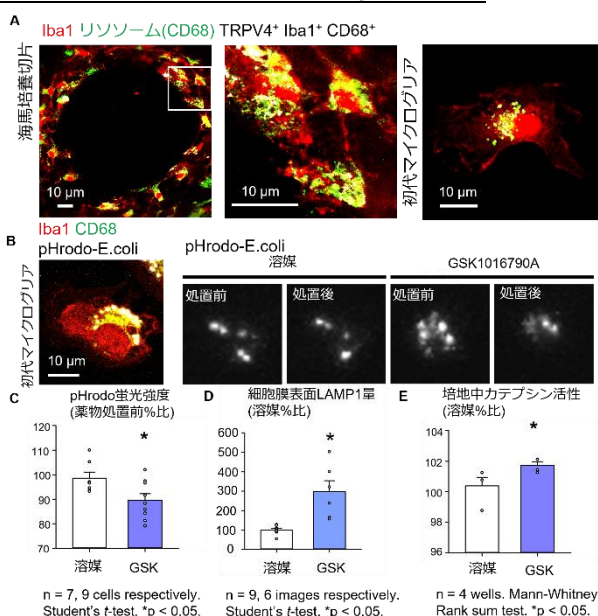


図3. (A) TRPV4とCD68が共局在した。(B) pHrodo-E.coliをマイクログリアに貪食させた。(C)GSK処置により、pHrodoの蛍光強度が減少した。(D)GSK処置により、細胞表面LAMP1が増加した。(E)GSK処置により、培地中のカテプシン活性が上昇した。

次に、TRPV4 の活性化がリソソームの機能に与える影響を調べた。本研究では、pH 上

昇に伴い生じることが知られるリソソームエキソサイトーシス(Lysosomal exocytosis; LE)に着目した。LEの指標として、細胞膜 LAMP1 の発現量と培養上清中のリソソーム酵素の活性度合いを定量したところ、GSK 処置によりいずれの値も有意に高くなった(図 3D, E)。以上より、マイクログリアの TRPV4 の活性化は LE を促進することが示唆された。

#### 4. リソソームエキソサイトーシスの阻害により、グリア瘢痕形成が抑制される

LEにより、リソソームからカテプシン B などの酵素が細胞外へ分泌される。そこで、マイクログリアの LE がマイクログリア-アストロサイト間のコミュニケーションを担い、アストロサイト GFAP 発現に貢献すると仮説を立て、これを検証した。そのために、LE 阻害薬の Vacuolin-1(Vac)をグリア瘢痕モデルに処置したところ、グリア瘢痕における GFAP 密度が低下した(図 4)。また、LE によりマイクログリアから分泌される因子の一つであるカテプシン B を処置することで GFAP 密度が上昇した。以上の結果より、グリア瘢痕形成にはマイクログリアの LE が必要であることが示唆され、それを担う分子の一つにカテプシン B が関与することも示唆された。

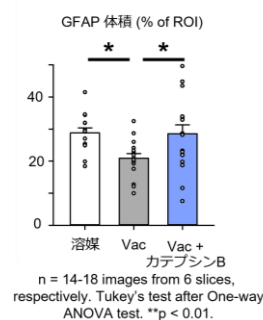


図4. Vac処置によりGFAP体積が減少し、更にカテプシンB処置すると上昇した。

#### 5. マイクログリア TRPV4 ノックアウトにより、外傷性脳損傷モデルにおけるグリア瘢痕形成が抑制される。

外傷性脳損傷モデルマウスのグリア瘢痕形成に、マイクログリア TRPV4 が関与するかを調べた。そのために、外傷を加えたマウス脳表における GFAP 体積を調べた。野生型マウスに比べ、マイクログリア TRPV4 KO マウスでは傷害部位の GFAP 密度が有意に低下した。また野生型マウス脳表への Vac 処置によっても同様の現象が生じた。以上より、in vivo のグリア瘢痕形成にマイクログリアの TRPV4 依存的な LE が関与することが示唆された。

#### 【総括・展望】

本研究により、グリア瘢痕の形成メカニズムにマイクログリアの TRPV4 が関与することが示唆された。マイクログリアにおける TRPV4 は LE を促進する機能を担い、マイクログリア-アストロサイト間のコミュニケーションを可能とする。具体的には、リソソームから放出されたカテプシン B などの液性因子が、アストロサイトのグリア瘢痕マーカーの発現を促進すると考えられる。グリア瘢痕はその形成時期によって神経保護性または神経障害性を示すと考えられている。本研究の新規メカニズムは、脳損傷などの治療に応用されることが期待される。