

総説

ミクログリアの活性化と脳内亜鉛

高知大学医学部薬理学講座 東洋一郎 清水孝洋 清水翔吾 齊藤源顕

要約

脳内亜鉛 (Zn^{2+}) は生体において重要な微量元素である。哺乳類の脳内 Zn^{2+} の一部は海馬のグルタミン酸神経細胞のシナプス小胞内に貯蔵され学習記憶など重要な中枢神経機能に関与している。その一方で、脳虚血・再灌流直後には大量の貯蔵 Zn^{2+} が細胞外へ放出され神経細胞死に大きく関与していると報告されている。ミクログリアは中枢神経系における免疫担当細胞であり、生理的な脳内では自身の細長い突起を介して周囲の環境を監視している。しかし、パーキンソン病やアルツハイマー病などの中枢神経疾患では慢性的なミクログリアの活性化が惹起され神経細胞死に関与していることが示されている。最近、脳虚血・再灌流モデル動物を用いた検討から、活性化ミクログリアには神経傷害性に機能する M1 型と神経保護性の M2 型の 2 つの異なる極性が存在することが明らかになり、M1 型極性誘導の促進とそれに伴う炎症応答の増大化が脳疾患の重篤化に関与していると指摘されている。本稿では、ミクログリアの活性化機構ならびに M1 型極性誘導の促進機序に対する脳内 Zn^{2+} の役割について概説する。

KEY WORDS ミクログリア, 脳虚血・再灌流, ペリジニン

はじめに

ミクログリアは、中枢神経系において自然免疫応答を担う重要な細胞として知られている。生理的な脳内において、このようなミクログリアは細長い突起を伸ばした静止型の状態で脳全体に分布しており、突起をダイナミックに変化させながら周囲の環境を監視し、中枢神経系機能の維持に関与している。一方、脳虚血・再灌流など病的な脳内において静止型ミクログリアは突起を退縮させアメーバ様の形態へと変化し、ミクログリアの活性化が誘導される。活性化型ミクログリアは神経保護的に機能する半面、過剰な活性化は脳疾患の発症や病態の重篤化に関与していることが知られ

ている。

脳内亜鉛 (Zn^{2+}) の一部は海馬のグルタミン酸神経細胞内に貯蔵されており、神経活動に伴って一定量の貯蔵 Zn^{2+} が細胞外へ放出される。このような生理的な脳環境における脳内 Zn^{2+} は学習記憶などの脳機能に重要な役割を担っている。しかし、てんかん発作や脳虚血・再灌流直後の海馬では大量の貯蔵 Zn^{2+} が細胞外へ放出され、その後の神経細胞死に大きく関与していることが多くの研究から明らかになっている。しかし、ミクログリアの活性化に対する脳内 Zn^{2+} の役割に関しては十分に理解されていない。

本稿では、脳内 Zn^{2+} が関与するミクログリアの活性化制御機構に着目しながら、筆者らが明ら

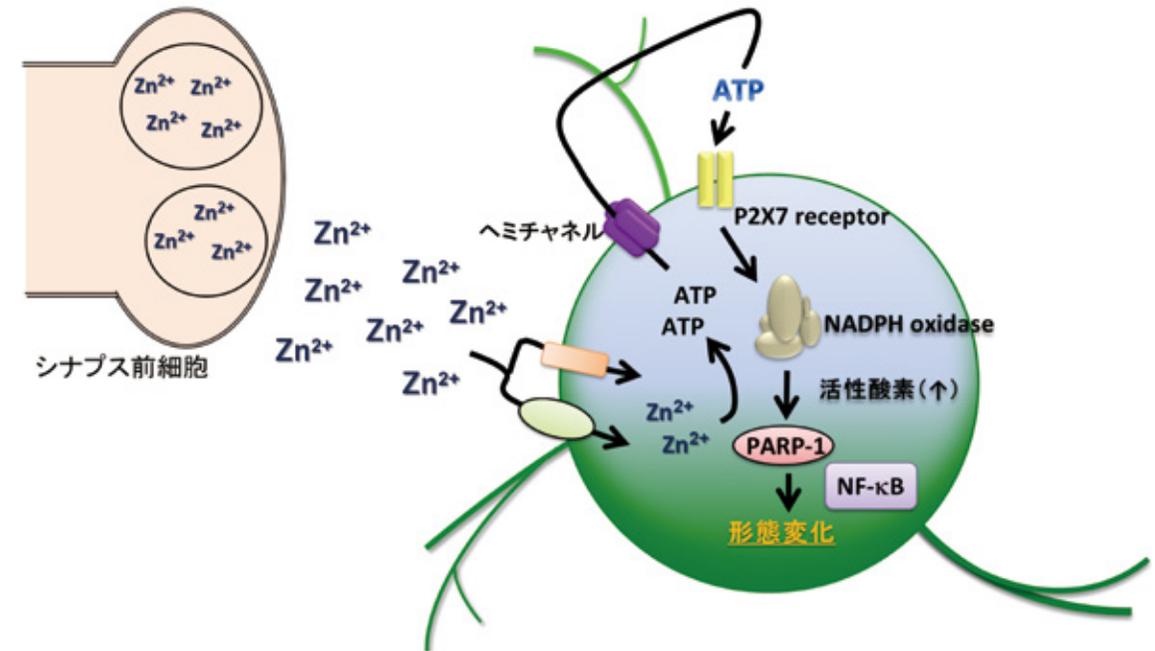


図1 脳内 Zn^{2+} によるミクログリアの形態変化と亜鉛シグナル

かにした海洋微細藻由来化合物であるペリジニンのミクログリアに対する効果を紹介する。

1. 脳虚血・再灌流後のミクログリアの活性化と脳内 Zn^{2+}

脳損傷によって惹起される活性化型ミクログリアの表現型は段階的に誘導される。その反応は活性化刺激によって様々であるが、静止型ミクログリアの特徴である細長い突起の退縮ならびにアメーバ様の形態への変化は普遍かつ迅速な活性化型ミクログリアの表現型である¹⁾。筆者らは静止型のマウス初代培養ミクログリアに $ZnCl_2$ を暴露することで形態変化が惹起されることを見出し、さらにマウスの海馬への $ZnCl_2$ 投与も同様にミクログリアの形態変化が惹起されることを明らかにしている。また、亜鉛キレート薬である CaEDTA を脳虚血・再灌流直後のマウス脳室内へ投与したところ、再灌流後の海馬で観察されるアメーバ様の活性化型ミクログリアの著増が阻止

されることを観察しており²⁾、これらの知見から脳虚血・再灌流直後に大量放出される Zn^{2+} はミクログリアの活性化に大きく関与していると考えられる (図1)。

2. 脳虚血・再灌流後のミクログリアの活性化と亜鉛シグナル

グルタミン酸や7-ケトコレステロールなど内在性ミクログリア活性化関連因子は数多く同定されている。これら関連因子が誘導する細胞内シグナル伝達経路に関しては不明な部分が多く残されているが、転写因子である nuclear factor-kappa B (NF- κ B) の重要性が認識されており、さらに NF- κ B が作用するためにはコアクチベーターである poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)-1 の活性化が必要であることも知られている。 $ZnCl_2$ 刺激によってミクログリアでは形態変化と共に NF- κ B の活性化が観察され、NF- κ B または PARP-1 の阻害剤、ならびに PARP-1 欠損マウス

由来ミクログリアでは $ZnCl_2$ 刺激による形態変化が抑制される。つまり、 $ZnCl_2$ 刺激によるミクログリアの形態変化は $NF-\kappa B$ と PARP-1 の活性化が重要であることを示している。

以前より、ミクログリアは感染やその他の刺激に対して NADPH oxidase を介して活性酸素を産生し自然免疫応答に関与していることがよく知られている。一方、最近の研究により産生された活性酸素はミクログリアの活性化を促進させることも明らかになってきた^{3), 4)}。NADPH oxidase が関与するミクログリアの活性化メカニズムの詳細は不明であるが、酸化ストレスによって PARP-1 の活性化が惹起されることは様々な細胞種の研究から示されている^{5), 6)}。 $ZnCl_2$ 刺激後のミクログリアにおいても細胞内活性酸素レベルが増加し、さらに NADPH oxidase 阻害剤が $ZnCl_2$ 刺激による細胞内活性酸素レベルの増加だけでなく、PARP-1 の活性化と形態変化も抑制することが観察されている。興味深いことに、PARP-1 阻害剤は $ZnCl_2$ による細胞内活性酸素レベルの増加には効果を示さなかった。これらの知見は、NADPH oxidase の活性化が PARP-1 の上流で $ZnCl_2$ 刺激によるミクログリアの形態変化に関していることを示唆している。

最近、アデノシン三リン酸 (ATP) がミクログリアやアストロサイトなどグリア細胞から放出され、グリア伝達物質としてグリア細胞の機能制御に重要な役割を担っていることが明らかになってきた。具体的には、アルツハイマー病の原因物質として考えられているアミロイド β によるミクログリアの活性化誘導が挙げられる。アミロイド β 刺激を受けたミクログリアは ATP 放出とオートクライン的ならびにパラクライン的な P2X7 受容体への結合が引き起こされ、これによって炎症性サイトカイン産生が惹起されることが報告されている⁷⁾。これに対して筆者らは、 $ZnCl_2$ 刺激されたミクログリアからも ATP が放出されることを見出し、この放出はミクログリアの Zn^{2+} 取り込みによって惹起され、ヘミチャネルを介して放出されることを明らかにしている。また、これらの知見に加えて $ZnCl_2$ によるミクログリアの細胞内

活性酸素レベルの増加をはじめ PARP-1 の活性化ならびにアメーバ様の形態変化がヘミチャネル阻害薬ならびに P2X7 受容体選択的拮抗薬によって阻害されることも観察している。すなわち、 $ZnCl_2$ によるミクログリアの形態変化は、ミクログリアによる①細胞外 Zn^{2+} の取り込み、②ヘミチャネルを介した ATP 放出、③オートクライン的/パラクライン的な P2X7 受容体の活性化、④ NADPH oxidase の活性化を介した細胞内活性酸素レベルの増加、⑤ PARP-1 ならびに $NF-\kappa B$ の活性化が関与している“亜鉛シグナル”によって惹起されることが示唆される (図 1)⁸⁾。

3. 活性化ミクログリアの極性誘導と脳内 Zn^{2+}

最近、活性化ミクログリアは炎症性サイトカインを産生し神経傷害性に機能する M1 型と神経栄養因子などを産生し神経保護性に機能する M2 型の異なる 2 つの極性が存在することが明らかになってきた。また、脳虚血・再灌流モデル動物を用いた検討より、再灌流後の脳内では M1 型ミクログリアが著増することが報告され、M1 型極性誘導の促進とそれに伴う炎症応答の増大化が認知症など脳虚血・再灌流後の病態や脳機能障害に大きく関与していると考えられている⁹⁾。

筆者らは、予め $ZnCl_2$ 刺激した初代培養ミクログリアに lipopolysaccharide を暴露することで M1 型へ極性誘導したところ、lipopolysaccharide で誘導される炎症性サイトカイン産生が増大することを見出し、さらにこの増大化にミクログリアの Zn^{2+} 取り込み、P2X7 受容体の活性化、細胞内活性酸素レベルの増加が関与していることを解明している。つまり、ミクログリアは $ZnCl_2$ 刺激によって惹起される亜鉛シグナルを介してプライミングされ、その後の M1 型極性誘導によって誘導される炎症性サイトカイン産生が増大化されると推測できる。また、マウス脳室内への CaEDTA 投与は脳虚血・再灌流後の海馬で惹起されるミクログリアの M1 型極性誘導と炎症性サイトカイン遺伝子の発現増加を抑制し、認知機能の低下を阻

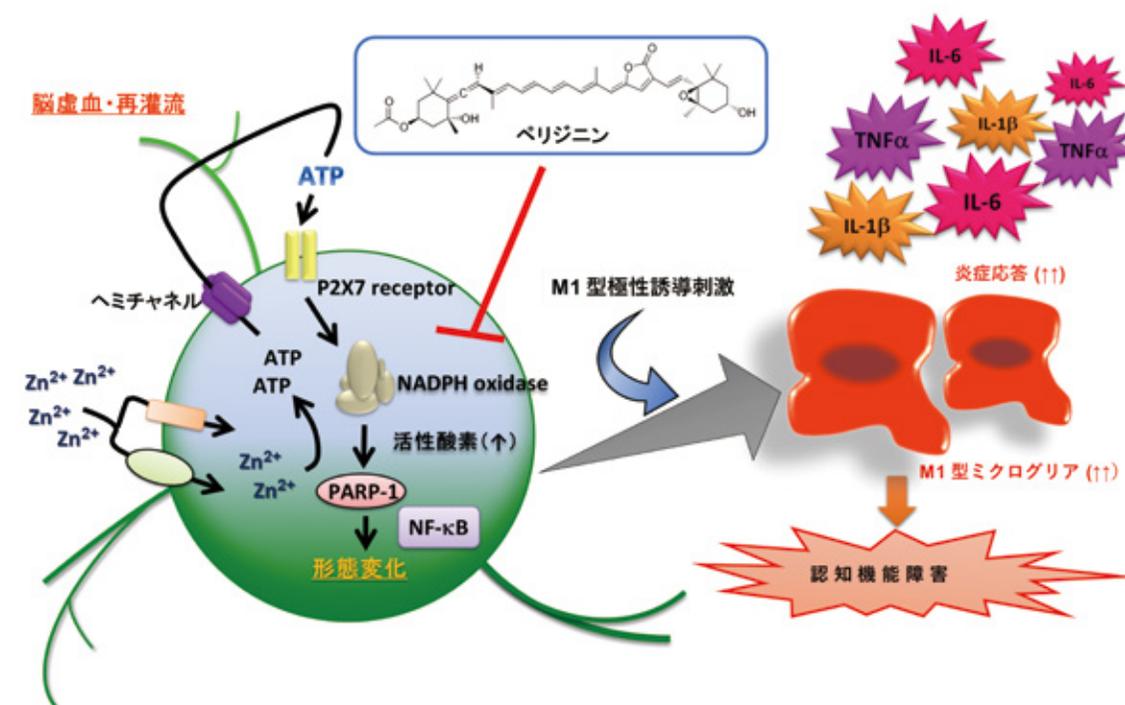


図 2 脳内 Zn^{2+} による M1 型極性誘導の増大化とペリジニンの効果

止した。以上の知見をまとめると、脳虚血・再灌流によって過剰に放出される Zn^{2+} は亜鉛シグナルを介してミクログリアをプライミングし、ミクログリアの M1 型極性誘導ならびに炎症反応を増悪化することで認知機能障害の発症に関与していると考えられる (図 2)¹⁰⁾。

4. 脳卒中後認知症の予防標的としての亜鉛シグナル

健常脳においてミクログリアの M1 型/M2 型極性誘導はそのバランスが厳密に制御され、脳内に侵入した異物や傷害細胞の排除ならびに脳修復に大きく関与している。しかし、脳卒中やアルツハイマー病などの脳疾患ではそのバランスが崩れていることが報告されている。特に上述したように、虚血・再灌流後脳における M1 型極性誘導の増大化を介した炎症応答の増悪化が病態の重篤化に関与していると考えられており、筆者らは脳虚血・再灌流直後の大量放出 Zn^{2+} による亜鉛シグ

ナルを介したミクログリアのプライミングが増大化の引き金であると考えている。すなわち、亜鉛シグナルは脳虚血・再灌流後の M1 型極性誘導の増大化を抑制するための重要な予防ならびに治療標的となりうる可能性がある。

海洋微細藻由来のペリジニンは、遅延型過敏症モデルマウスにおける好酸球の遊走能と耳介腫脹を抑制するなど末梢の免疫系への作用が報告されているが¹¹⁾、中枢神経系の免疫担当細胞であるミクログリアへの作用は明らかになっていない。そこで筆者らのグループは Zn^{2+} 刺激による M1 型ミクログリアの炎症性サイトカイン産生の増大化に対するペリジニンの効果を検討したところ、ペリジニンは Zn^{2+} に対するキレート作用を有しないが Zn^{2+} 暴露後の細胞内活性酸素レベルの増加を抑止し、M1 型ミクログリアの炎症性サイトカイン産生の増大化を阻止することを見出した。さらに予めペリジニンを脳室内前投与したマウスは脳虚血・再灌流後の海馬における M1 型ミクログリアの極性誘導ならびに炎症性サイトカイン産

生の増大化が抑制され記憶障害も阻止されることが観察された。つまり、ペリジニンは脳虚血・再灌流後のM1型極性誘導の促進と炎症応答の増大化を介した認知障害を阻止し、その作用機序は Zn^{2+} に対するキレート作用ではなく、亜鉛シグナルの少なくとも細胞内活性化レベルの増加より上流の過程を抑制し、ミクログリアのプライミングを阻止することで作用を示すと考えられる(図2)¹²⁾。

おわりに

脳卒中は主要な死亡要因である。昨今の医療進歩により死亡率は減少している反面、患者数は依然と多く、治療後も認知症など深刻な後遺症が長期にわたって持続することが少なくない。最近の脳卒中研究から脳卒中後の病態ならびに後遺症の重篤化に活性化ミクログリアの関与が指摘されて

いる。しかし、その活性化は十分に解明されておらず、そのためミクログリアを標的とした治療薬または予防薬の開発に至っていない。本稿で紹介したように筆者らは、脳虚血・再灌流後の認知障害の機序に海馬神経細胞からの大量放出 Zn^{2+} による亜鉛シグナルを介したM1型ミクログリアの極性誘導の促進と炎症応答の増悪化が関与することを見出し、さらに海洋微細藻由来化合物であるペリジニンの脳室内前投与が亜鉛シグナルを抑制し認知障害を阻止することを明らかにしている。脳卒中患者は脳虚血発作を繰り返す傾向が強く、再発ごとに認知症などの後遺症が重篤化する。この点を考慮すると、ペリジニンは脳卒中患者に対して再発後の認知症の発症及び重篤化を阻止することを目的とした予防薬シーズになる可能性が考えられる。投与経路や治療可能時間域などの今後の詳細な検討が期待される。

◆文献

- Giulian D, Li J, Bartel S, Broker J et al : Cell surface morphology identifies microglia as a distinct class of mononuclear phagocyte. *J Neurosci* 15 : 7712-7726, 1995
- Kauppinen MT, Higashi Y, Suh SW et al : Zinc triggers microglial activation. *J Neurosci* 28 : 5827-5835, 2008
- Min KJ, Pyo HK, Yang MS et al : Gangliosides activate microglia via protein kinase C and NADPH oxidase. *Glia* 48 : 197-206, 2004
- Mander PK, Jekabsone A, Brown GC : Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase. *J Immunol* 176 : 1046-1052, 2006
- Kauppinen TM, Chan WY, Suh SW et al : Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 : 7136-7141, 2006
- Schreiber V, Dantzer F, Ame JC et al : Poly(ADP-ribose) : novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 : 517-528, 2006
- Sanz JM, Chiozzi P, Ferrari D et al : Activation of microglia by amyloid β requires P2X7 receptor expression. *J Immunol* : 4378-4385, 2009
- Higashi Y, Segawa S, Matsuo T et al : Microglial zinc uptake via zinc transporters induces ATP release and the activation of microglia. *Glia* 59 : 1933-1945, 2011
- Hu X, Li P, Guo Y et al : Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* 43 : 3063-3070, 2012
- Higashi Y, Aratake T, Shimizu S et al : Influence of extracellular zinc on M1 microglial activation. *Sci Rep* 7 : 43778, 2018
- Onodera K, Konishi Y, Taguchi T et al : Peridinin from the marine symbiotic dinoflagellate, *Symbiodinium* sp., regulates eosinophilia in mice. *Mar Drugs* 12 : 1773-1787, 2014
- Ueba Y, Aratake T, Onodera KI, Higashi Y et al : Attenuation of zinc-enhanced inflammatory M1 phenotype of microglia by peridinin protects against short-term spatial-memory impairment following cerebral ischemia in mice.



◆東 洋一郎略歴

- | | |
|-------|---|
| 1999年 | 鳥取大学大学院医学研究科生命科学専攻修士課程修了 |
| 2003年 | 岡山大学大学院医学研究科生理学系専攻博士課程修了
徳島大学分子酵素学研究センター・機関研究員 |
| 2005年 | 米国カリフォルニア州立大学
サンフランシスコ校神経内科学部門・研究員 |
| 2007年 | 京都薬科大学衛生化学分野・研究員 |
| 2008年 | 熊本大学薬学部先端DDS学分野・特任助教 |
| 2009年 | 高知大学医学部脳神経外科講座・助教 |
| 2015年 | 高知大学医学部薬理学講座・助教(学内講師) |

Activation of microglia and brain zinc

Youichirou Higashi, Takahiro Shimizu, Shogo Shimizu, Motoaki Saito

Department of Pharmacology, Kochi Medical School, Kochi University

Zinc (Zn^{2+}) is one of the most essential trace elements in the body. In mammalian brain, Zn^{2+} is sequestered into synaptic vesicles of hippocampal glutamatergic neurons, which plays an important role in the brain functions including learning and memory. On the other hand, in response to brain ischemia and reperfusion, the stored Zn^{2+} is massively released into extracellular space, resulting in neuronal cell death. Microglia, the major cellular component of the innate immune system of the central nervous system, are continuously surveying their local microenvironment by extending/withdrawing ramifications under normal physiological conditions. However, under neuropathological conditions such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease, chronic activation of microglia has been shown to be involved in neuronal cell death. Recent study using an animal model of brain ischemia and reperfusion revealed that activated microglia can exhibit either the detrimental M1 phenotype or the protective M2 phenotype, and that the M1 microglial population was found to gradually grow in a time-dependent manner following brain ischemia and reperfusion, suggesting that the M1 phenotype of microglia can be involved in exacerbating the residual consequences of brain ischemia. This article discusses the role of brain Zn^{2+} in regulation of microglial activation in the hippocampus following brain ischemia and reperfusion.

Keyword : microglia, brain ischemia and reperfusion, peridinin

Address for correspondence

Department of Pharmacology, Kochi Medical School, Kochi University, Kohasu, Okoh-cho,
Nankoku 783-8505, Japan.

E-mail address

higasi@kochi-u.ac.jp