

Title	ADP and ATP control phagocytosis in rat microglial cells through the activation of Gi/o-coupled P2Y12 receptors
Author(s)	都築, 千鶴
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54149
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	都 築 千 鶴
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 23456 号
学位授与年月日	平成22年2月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	ADP and ATP control phagocytosis in rat microglial cells through the activation of $G_{i/o}$ -coupled $P2Y_{12}$ receptors (ADPとATPは $G_{i/o}$ -共役型 $P2Y_{12}$ 受容体を介してラットマイクログリアの食食を制御する)
論文審査委員	(主査) 教授 倉智 嘉久 (副査) 教授 金井 好克 教授 岡村 康司

論文内容の要旨

〔目的〕

マイクログリアは脳内に存在するマクロファージ様の細胞で、損傷部位に向かって移動し、死滅細胞を食食すると共に、様々なサイトカインを分泌することによって、神経細胞の保護や再生に貢献し、脳の恒常性維持に中心的な役割を果たすことが指摘されている。障害された細胞から放出されるヌクレオチドは、このような作用の引き金になることが示唆されており、これらはプリン受容体を介して機能する。近年、プリン受容体を介したマイクログリアの様々な生理機能が解明されている。しかしながら、マイクログリアの機能におけるヌクレオチドの役割はまだ完全に理解されていない。そこで申請者は、プリン受容体を介したマイクログリアの機能制御の解明を研究の目的とした。

〔方法〕

新生ラット(2日齢)から大脳皮質を取り出し、細胞を単離して約2週間培養後、振とうによりマイクログリアを回収した。食食は、種々の条件下で細胞に蛍光で標識したザイモザンを添加し、共焦点顕微鏡下で取り込まれたザイモザンの総数を全細胞数で割った値で評価した。キナーゼのリン酸化は、ELISAを用いて評価した。カルシウムイメージングは、細胞にFluo-4を前処理した後に蛍光強度を測定した。

〔成績〕

マイクログリアによる食食に及ぼすヌクレオチドの影響及び、それに関与する受容体の特性

検討したヌクレオチドやアデノシンのうち、これまでに報告のあるUDP以外にも、ADPとATPによって、マイクログリアの食食が増強された。ADPはUDPよりも食食を強化した。ATPの効果はUDPと同程度であった。ADPやATPの反応は、 $100 \mu\text{M}$ でピークになり、それより高濃度では減少した。アデノシンは食食に影響しなかった。以上より、ADPやATPのマイクログリアの食食に対する作用には、 $P2X$ 受容体や $P1$ 受容体ではなく、 $P2Y$ 受容体が関与することが示唆された。 $P2Y$ 受容体のうち、ADPによって最も強く活性化される受容体には、 G_i 共役型 $P2Y_1$ 受容体と $G_{i/o}$ 共役型 $P2Y_{12}$ 、 $P2Y_{13}$ 受容体が存在する。 $G_{i/o}$ タン

パク質の阻害剤であるPTXで細胞を処理すると、ADPによる食食の増加は抑制された。次に、P2Y₁₂、P2Y₁₃受容体の特異的阻害剤であるCangrelor、P2Y₁受容体の特異的阻害剤であるMRS2179、そして、P2Y₁₃受容体の特異的阻害剤であるMRS2211で細胞を処理すると、CangrelorでのみADPによる食食の増強が抑制された。従って、ADPによるマイクログリアの食食の増強には、G_{i/o}共役型P2Y₁₂受容体が深く関わる事が考えられた。

食食の増強におけるチロシンキナーゼ、リン脂質代謝酵素の関与

食食の初期段階に必要なSrcファミリーチロシンキナーゼ(SFK)やSykの阻害剤によって、ヌクレオチド非依存性の食食ベース活性と共に、ヌクレオチド依存性の増強効果も抑制された。よって、両者の機構にこれら二種類のキナーゼが関与することが示された。マイクログリアにザイモザンとADPを同時に添加すると、両キナーゼの活性化に重要な部位のチロシン残基のリン酸化が増大した。またSFKとSykのリン酸化は、SFKの阻害剤であるPP2で抑制され、細胞をCangrelorで処理すると、ADPを添加してもこれらのリン酸化は増加しなかった。従って、ADPによって活性化されたP2Y₁₂受容体がSFKのリン酸化を促進し、その結果、活性化したSFKがSykをリン酸化することで、一部の食食成分を増強させると考えられた。また、ADPで増加した食食成分は、Sykの阻害剤であるPiceatannolでほぼ完全に消滅したが、PP2では40%しか抑制されなかった。この結果より、ADPの食食に対する効果は、SFKもSykのチロシンリン酸化も関与せずに惹起されることが示唆された。更に、Sykによって活性化される、リン脂質代謝酵素であるホスホリパーゼCやPI3-キナーゼの阻害薬で細胞を処理すると、ADP刺激下・非刺激下の両条件にて食食がほぼ完全に抑制された。よって、これらの二つの酵素はマイクログリアの食食に必須であると考えられた。また、細胞内カルシウムキレート剤で処理しても、食食のベース活性やADPの効果は影響されなかった。よって、カルシウムイオン動態は、マイクログリアの食食に関与しないと考えられた。

〔 総 括 〕

ラット培養マイクログリアにおいて、ADPとATPは、P2Y₁₂受容体を刺激することで、食食を促進することが明らかになった。また、その過程には、チロシンキナーゼやホスホリパーゼC・PI3-キナーゼが重要な役割を果たしていると考えられた。P2Y₁₂受容体はADP依存性の遊走も誘引するので、この受容体はマイクログリアの生理機能の制御に中心的な役割を果たしていると結論づけられる。

論文審査の結果の要旨

マイクログリアは脳内に存在する免疫系細胞で、損傷部位への遊走、死滅細胞の食食、そして様々なサイトカインの分泌により、脳の恒常性維持に中心的な役割を果たすことが指摘されている。障害された細胞から放出されるヌクレオチドは、このような作用の引き金になることが示唆されており、これらはプリン受容体を介して機能する。本研究で、ラット培養マイクログリアにおいて、ADPとATPは、プリン受容体のひとつであるP2Y₁₂受容体を刺激することで、食食を促進することが明らかになった。ADPはP2Y₁₂受容体を介して、食食の初期段階において、重要な役割を果たすチロシンキナーゼを活性化することによって、食食を増強することが示唆された。P2Y₁₂受容体はADP依存性の遊走も誘引するので、この受容体はマイクログリアの生理機能の制御に中心的な役割を果たしていると考えられる。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文に値すると考えられる。