

ミクログリアに対して炎症誘導作用を持つWnt3A、Wnt5Aシグナル経路の炎症誘導により起こる細胞増殖、細胞遊走やNO産生に及ぼすLDL receptor related protein 4 (LRP4) の影響

棚 橋 浩^{*1*2}

¹九州女子大学家政学部栄養学科 北九州市八幡西区自由ヶ丘1-1 (〒807-8586)

²信州大学大学院医学系研究科神経可塑性学教室 松本市旭3-1-1 (〒390-8621)

(2023年6月26日受付、2023年8月2日受理)

要 旨

ミクログリアは感染症や脳損傷時に炎症を誘発したり抑制する事で脳内の恒常性を維持している。Wnt5Aでミクログリアを刺激すると炎症誘発・炎症応答遺伝子の発現や細胞遊走を促進する事からWnt5Aを発現しているアストロサイト-ミクログリア間の作用によりこれらが制御されている可能性が報告されている。LRP4は運動神経終末から分泌されるアグリンの受容体でシナプス後部のアセチルコリン受容体の集積化を促進する事で神経・筋接合部の形成維持に働くがWntsの受容体としても働きWntシグナルの抑制やWntsによるアセチルコリン受容体の集積化も報告されている。

本研究ではLRP4を欠失したマウス由来の初代培養ミクログリアを用いWnt3A、Wnt5Aによる細胞増殖、NO産生と細胞遊走能を同腹の野生型ミクログリアと比較した。これらWntsの添加により炎症誘発・炎症応答遺伝子の発現、細胞増殖、NO産生や細胞遊走能の増加が見られたがLRP4の有無による有意な差は見られずLRP4はWnt3A、Wnt5Aによるミクログリアの炎症応答には関与していないと考えられる。

1. 緒言

中枢神経系を構成するグリア細胞には、ニューロンと同じ外肺葉に由来するアストロサイト、オリゴデンドロサイトとマクロファージなどの造血細胞と同じ中胚葉に由来するミクログリアがある。ミクログリアは中枢神経系の免疫担当細胞であり、脳内のグリア細胞の約5～15%を占める。正常な脳ではミクログリアは細かく枝分かれした突起を無数に伸ばした小さな細胞体を持つ静止型ミクログリア (ramified microglia) として均等に配置している。近年、静止型ミクログリアは多くの突起をアンテナの様に動かして神経シナプス新生、余分な神経シナプスの除去、シナプス伝達の制御を行う等の機能が分かっている。一方、脳損傷・感染症などの病態時にはいち早く感知して突起が短く大きな細胞体を持つ活性型ミクログリア (amoeboid microglia) へと劇的に形態を変化させる。活性型ミクログリアは、分裂促進因子 (macrophage-colony stimulation factor : M-CSF、granulocyte macrophage-colony stimulation factor : GM-CSF) やケモカイン (GRO α 、MCP-1、MIP-1、MIP-2、RANTES) を放出して病変部に遊走、増殖して死亡した細胞やダメージを受けた細胞の破片、不要なものを貪食して取り除き、貪食により取り込んだものの一部を抗原提示能して免疫反応を活性化させる。活性化ミクログリアにも神経傷害性ミクログリア (M1型ミクログリア) と神経保護性ミクログリア (M2型ミクログリア) の2つのタイプが存在することが分かっており、M1型ミクログリアは、IFN- γ 、TNF- α や損傷または死滅した細胞から放出されるダメージ関連分子パターン (DAMPs : damage-associated molecular patterns) を認識して、炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6、TNF- α) や活性酸素種 (スーパーオキシド、過酸化水素など)、一酸化窒素 (NO) を放出したり細胞内の炎症誘発性の遺伝子であるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX2) の発現を増加させる。M2ミクログリアは、IL-4やTGF- β を認識してIL-10 やTGF- β などの抗炎症性サイトカインや神経栄養因子・保護因子 (NGF、BDNF、NT-4、NT-5、bFGF、GDNF、IL-6、HGF、CNTF、LIF) を放出する^{1, 2)}。

Wingless/int1 (Wnts) ファミリー蛋白質は哺乳類では19種類存在する分泌リポ糖蛋白質で、その受容体蛋白質Frizzled (FZD) ファミリー (FZD₁₋₁₀) を介して神経発達、シナプス形成、神経可塑性、幹細胞の維持、神経免疫に重要な役割を果たしている³⁻⁶⁾。ミクログリアではFZDsとその共受容体が発現しておりWnt3AやWnt5Aで刺激すると炎症誘発性サイトカイン、ケモカインや他の免疫応答遺伝子の発現や増殖性、

浸潤性の増加といった炎症を誘発させる形質転換が起こる⁷⁻⁹⁾。一方、リポ多糖 (LPS) でマイクログリアを刺激して炎症反応を誘発させると Wnt3A や Wnt5A は炎症反応を抑えるように働く¹⁰⁾。この様に Wnts は二極性を持ち、状況に応じて恒常性の維持に働いている可能性が報告されている¹⁰⁾。

筋細胞膜にある LRP4 は運動神経終末から分泌される神経細胞型アグリンの直接の受容体でアグリンが LRP4 に結合すると MuSK を活性化してシナプス後部の分化を促進し、アセチルコリン受容体のクラスター化を進めて神経筋接合部形成を促進することになる^{11, 12)}。LRP4 は様々な臓器で発現しており、中枢神経系では主にアストロサイトで発現している^{13, 14)}が、神経細胞での発現も確認されている¹⁵⁾。また筆者は初代培養マイクログリア細胞でも LRP4 蛋白質が発現していることを報告している¹⁶⁾。LRP4 を完全に欠失したマウスは出生直後に呼吸不全で死亡し、多様な表現型を持つ¹⁷⁾。アストロサイト特異的に LRP4 を欠失させたマウスの海馬ではアストロサイトからの ATP の放出が促進されることでグルタミン酸を介した神経伝達が抑制されることが報告されている¹⁴⁾。またこのマウスでは活動性の低下や空間認識に障害がある事、てんかん発作誘導に対して抵抗性があることが報告されている¹⁴⁾。

Wnt5A、Wnt9B や Wnt11 をリガンドとした非古典的経路がある。古典的 Wnt シグナルは、遺伝子発現や細胞増殖、分化などに関与し、非古典的 Wnt シグナルは細胞運動、細胞極性、古典的 Wnt シグナル経路の抑制などに関与している。古典的経路では Wnt が存在しない場合には、 β -カテニンは分解複合体によってユビキチン化されて分解されるために細胞内に蓄積できないが、Wnt が FZD/LRP5 共受容体あるいは FZD/LRP5 共受容体に結合すると、この分解複合体の機能が停止、 β -カテニンが細胞内に蓄積するとともに核移行して TCF/LEF 転写因子と共に転写誘導を行う¹⁸⁾。非古典的 Wnt シグナルは β -カテニン非依存性経路で Rho や Rac 等の低分子量 G 蛋白質、JNK や PKC、CaMK 等のキナーゼを活性化する。非古典的 Wnt 経路のリガンドである Wnt-5A はアストロサイトやマイクログリアで発現しており^{8, 19)}、アストロサイトで発現している Wnt-5A がアストロサイト-マイクログリア間の作用によりマイクログリアに炎症誘発を起こす可能性も報告されている⁸⁾。

LRP4 は LRP5 や LRP6 の様に Wnt1 の受容体として働き競合して Wnt/FZD/LRP5 や Wnt/FZD/LRP6 シグナリングを抑制する可能性が報告されている^{20, 21)}。更に LRP4 は sclerostin、DKK、Wise の docking protein として働き Wnt シグナリングや BMP シグナルを調節することも報告されている^{22, 23)}。そしてマウス細胞では神経細胞型アグリンによって誘導される LRP4/MuSK を介したアセチルコリン受容体のクラスター化が Wnt3 で促進され、Wnt3A で抑制される^{24, 25)}。また Wnt9A、Wnt9B、Wnt10B、Wnt11、Wnt16 により LRP4/MuSK 依存性のアセチルコリン受容体のクラスター化が起こること²⁶⁾や Lrp4 を完全に欠失したマウス胎児の眼では Wnt シグナル関連遺伝子の発現の変化も見られる²⁷⁾。これらの報告からマイクログリアにおいても Wnts シグナルに LRP4 が関与している可能性が考えられる。

本研究では LRP4 を完全に欠失した胎児マウス由来の初代培養マイクログリアを用いて Wnt3A や Wnt5A でマイクログリアに炎症を誘発させ、マイクログリアの細胞増殖能、NO 放出、細胞遊走能について同腹の野生型胎児マウス由来のマイクログリアと比較することでマイクログリアでの LRP4 の Wnt シグナルへの関与について解析した。

2. 方法

2.1 Lrp4 欠失マウス

C57BL/6J コンジェニック系統マウス B6 Thy1.1 由来の胚幹細胞 Bruce4 を使って我々が作製した Lrp4 を片アリル欠失したヘテロ接合体マウス (Lrp4^{+/-}) については先に述べた¹³⁾。マウスの Lrp4 遺伝子型は先に述べた方法により決定した¹³⁾。本研究は研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (文部科学省研究振興局 ライフサイエンス課) に則り、信州大学動物実験倫理委員会の許可 (許可番号 200057, 230073, 270015) を得て行なった。全ての外科手術はセボフルラン (Mylan Inc.) を用いた吸入麻酔下にて行い、動物の苦痛は最小限になるように施術した。

2.2 ミクログリアの培養

雌雄のLrp4^{+/-}マウス¹²⁾を21時に同じケージに入れ、翌日9時に雌マウスの膣栓を確認した。この時を1 dpc (day post coitus)とした。19 dpcの妊娠Lrp4^{+/-}雌マウスより胎児(胎齢E18.5)を取り出して断頭、開頭して脳を取り出し、Hanks' balanced salt solution (HBSS)入りの10 cm ペトリ皿に移した。実態顕微鏡下で脳から髄膜に付いた線維芽細胞が混入しないように髄膜を十分に剥離して取り去った。ピペット操作により100 μ m Falcon[®]セルストレーナー (Corning Inc.) を用いて50 ml遠心管に濾しとり、1,000 rpmで10分間遠心後に細胞塊をHBSSで再懸濁して遠心後に細胞塊を4 mlの10%ウシ胎児血清 (BioWest)、5 mg/mlインスリン (Sigma-Aldrich)、0.01%ストレプトマイシン硫酸塩、0.01%ペニシリンG、0.2%グルコース、含有のEagle's 最小必須培地MEMに懸濁してVIOLAMO 25 cm² ベントキャップ細胞培養フラスコ (AS ONE) に分注して37°Cにて5%炭酸ガス培養器で培養した。

ミクログリアの分離培養は主としてSuzumuraらの方法²⁸⁾によった。詳細は先の論文¹⁵⁾で報告しているが、要点を以下に記す。培養開始2日目に非付着細胞を含む培養液を吸引し、培地を交換した。以後3日ごとに培地を交換して2週間培養した。フラスコを回転式シェーカー (TAITEC Corp.) 上で120 rpmで37°C、2時間振盪して遊離した細胞を回収、遠心して上清を除きMEM培地10 mlで懸濁後非コート9 cm径ポリスチレンディッシュ (SANPLATEC Corp) に撒き37°Cで5分間静置して上清を吸引除去した。ディッシュにMEM培地を5 ml加え、手でゆっくり振盪して非付着細胞を除く操作を3回繰り返した後、MEM培地を2 ml加えてラバーポリスマン (AGC Inc.) で付着細胞をこそぎ取りピペット操作で分散後に細胞数を計測した。実験に応じて必要な細胞数を培養容器に移して培養を続けた。

2.3 ウェスタンブロット解析

初代培養ミクログリア細胞をCellLytic™Mプロテアーゼインヒビター (Sigma) を添加したRIPA buffer (50 mM Tris [pH7.5], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid sodium salt, 0.1% sodium dodecyl sulfate) 中でホモジナイズして遠心後 (15,800 g, 30分) 後、上清を回収した。蛋白質濃度はPierce[®]660nm Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) で測定し、等量の蛋白質量の細胞抽出液をSDS-PAGEで電気泳動後、PVDF膜に転写した。抗原抗体反応を増強させるために抗体はCan Get Signal[®] (TOYOBO) で希釈して反応に用いた。ブロットの化学発光はDensitograph AE-6930 (ATTO Corp.) で検出し、Lane analyzer 10H (ATTO Corp.) で定量解析した。ウサギ抗LRP4抗体は先に作製したLRP4C50抗体¹²⁾を用いた。ウサギ抗Iba I 抗体016-20001、マウス抗GAPDH抗体MAB374は富士フィルム和光純薬、Chemicon International Inc.よりそれぞれ購入した。

2.4 MTT assay

Lrp4完全欠失マウス (KO)、同腹の野生型マウス (WT) 由来の初代培養ミクログリア、それぞれ4系統を96-well cell culture plate (TrueLine) に 3×10^4 cells/cm²濃度でphenol red不含の培地中で培養し、1時間後に300 ng/mlの組み換えヒトWnt3A (R&D Systems 5036-WN/CF) あるいは300 ng/mlの組み換えヒト/マウスWnt5A (R&D Systems 645-WN) を添加し24時間後にMTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assayを行った。

本方法は細胞増殖度を測定する為にミトコンドリア内でデヒドロゲナーゼによりテトラゾリウム(淡黄色)がホルマゾン(暗緑色)に還元される反応を利用している。ホルマゾン生成量はチミジン取り込みと同等に生細胞数と有意に相関する²⁹⁾。

PBS(-)に溶解した5 mg/ml MTT (Sigma-Aldrich) をFBS-freeの培地に0.5 mg/mlの濃度に希釈し、その200 mlを上記の96-well plateから培地を取り除き加えた。5%炭酸ガス培養器の中で37°Cで2時間反応させた後、MTT反応溶液を取り除き100 mlのMTT溶出液 (4 mM HCl, 0.1% NP-40を2-プロパノールに溶解) を各wellに加えてシェーカーで30分間攪拌し色素を溶出させ、Multiscan FCプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific Inc.) で590 nmの吸光度を測定した。

2.5 定量的RT-PCR

KOマウスと同腹のWTマウス由来の初代培養ミクログリアをそれぞれ6系統を24-well cell culture plate (TrueLine) に 3×10^4 cells/cm²濃度でまいた。24時間後、Wnt3A、Wnt5Aによる炎症応答を調べるために細胞を300 ng/mlのWnt3AあるいはWnt5Aを添加し、更に12時間培養した。

細胞からtotal RNAをISOGEN (NIPPON GENE) で抽出しRNA濃度を260 nmの吸光度より決定した。1 mgのRNAからReverTraAce® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO)を用いて20 mlの系でcDNAを合成した。定量的RT-PCRは1 mlのcDNA、0.4 mMのプライマー (表1) とSYBR® Premix ExTaq™ II Tli RNaseH Plus (Takara Bio)の10 mlの反応系でStepOnePlus™ Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて初期変性95°C 30秒の後、PCRサイクル (変性95°C 5秒, アニール・伸長60°C 30秒) 40サイクルの反応を行った。GAPDH RNAを用いて標準化し、相対的mRNAレベルは $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 法³⁰⁾で解析した。

2.7 NO産生の測定 (Griess test)

KOマウス、同腹のWTマウス由来の初代培養ミクログリア、それぞれ6系統を96-well cell culture plate に 3×10^4 cells/cm²濃度でphenol red不含の培地中で培養し、24時間後に300 ng/mlのWnt3AあるいはWnt5Aを添加し、更に24時間培養後にGriess testにより培地中のNOの測定を行った。

本方法はNOが酸化されて生じるNO₂によるジアゾニウム塩化物とナフチルエチレンジアミンのアゾカップリングを利用してNO量を間接的に測定する方法である³¹⁾。

それぞれの細胞培養上清 (100 ml) を96-well cell culture plateに移し、等量のGriess 試薬³¹⁾ (1% sulphanilamide, 0.1% naphthyl-ethylene-diamine, 5% H₃PO₄) を加えて暗所で室温30分反応させた。Multiscan FCプレートリーダーで540 nmの吸光度を測定した。NaNO₂希釈液を用い検量線を作成した。

2.8 Transmigration assay

細胞遊走能を定量化するためにゼラチンでコートした半透明のポリカーボネート膜フィルター (直径6.5-mm, 8 mmポアサイズ) を含むBoyden chamber, Transwell® Permeable Supports (Corning Inc.) を用いてtransmigration assayを行った。 2×10^4 cellsのミクログリア細胞の入った100 mlのphenol red不含の培地をchamberに入れ、500 mlの培地を入れた24-well cell culture plate (Corning Inc.) の上に被せ培養を開始した。1時間後に300 ng/mlのWnt3AあるいはWnt5Aを添加し、更に24時間培養した。chamberの培地を除き、綿棒でchamber内側の細胞を拭き取り、ポリカーボネート膜の外側をPBS(-)で洗浄後、トリプシン処理をして遊走したミクログリア細胞を回収し細胞数を計測した。また遊走したミクログリア細胞を観察するために10%ホルマリン溶液で5分間固定後、メタノールで5分処理した後、ヘマトキシリンで細胞核を染色し、画像をAxio Observer Z1 光学顕微鏡 (Zeiss) で取得した。

2.9 統計処理

PRISM version 6.0d (GraphPad) ソフトプログラムを用いて検定を行った。2群の比較 (図2, 図3) はF-testでnormal distributionを確認後、Student's t-testでP<0.05を有意差ありとした。全ての値は平均値±SDで表した。4群あるいは6群の多重比較 (図2-図5) はBrown-Forsythe testでnormal distributionを確認後、Tukey-Kramer's post hoc testでP<0.05を有意差ありとした。全ての値は平均値±SDで表した。

表1. 定量的PCRに使用したオリゴヌクレオチドプライマー

Genes	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
COX2	TGCCTGGTCTGATGATGTATGCCA	GTATGTCGCACACTCTGTTGTGCT
IL-6	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
TNF α	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
GAPDH	AAATGGTGAAGGTCGGTGTG	TGAAGGGGTCGTTGATGG

3. 結果

3.1 初代培養マイクログリア細胞でのLRP4の発現

4匹の妊娠マウスより6匹のKO胎児、6匹の同腹のWT胎児が得られ、それぞれより初代培養マイクログリア細胞を調整した。この操作初代培養マイクログリア細胞でLRP4蛋白質が発現していることは、先に報告している¹²⁾。また上記の12系統の初代培養マイクログリアでのマイクログリアマーカー IBA1の発現をウェスタンブロット解析で調べたところ、KOとWTの間に有意差はなく(図1)、KOとWTで同程度の純度の初代培養マイクログリア細胞が得られたと考えられる。

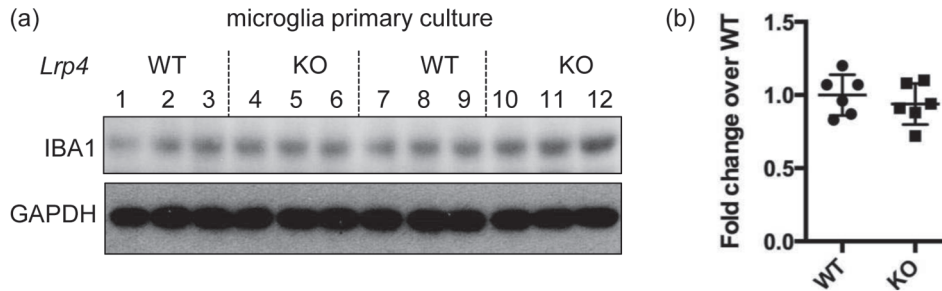


図1. KOマウスと同腹のWTマウスのマイクログリアマーカーIBA1蛋白質の発現

(a) ウェスタンブロット. WTマウス、KOマウス由来のマイクログリア細胞のIBA1蛋白質、ローディングコントロールGAPDH蛋白質 (b) WTとKOのIBA1蛋白質量/GAPDH蛋白質量比. WTの平均値を1とした。エラーバーはSD WT(n=6)とKO(n=6)の間にIBA1蛋白質量/GAPDH蛋白質量比に有意差はない。

3.2 Lrp4を完全欠失した初代培養マイクログリアでのWnt3AやWnt5Aによる炎症誘発・炎症応答遺伝子の発現

今回調整した初代培養マイクログリアが、Wnt3AやWnt5Aにより炎症誘導・炎症応答をするか確認するためにWnt3AやWnt5AをWT、KOマイクログリア細胞に添加し、12時間後に細胞からRNAを調整して炎症を誘発するCOX2、炎症応答サイトカインIL-6、TNF α のmRNAの発現を定量的RT-PCRで調べた。これらWntsを加えるとKO、WTいずれのマイクログリア細胞においてもCOX2、IL-6、TNF α のmRNA発現に有意な増加が見られ、炎症誘発・炎症応答を確認できたが、LRP4の有無による有意な差はなかった(図2)。

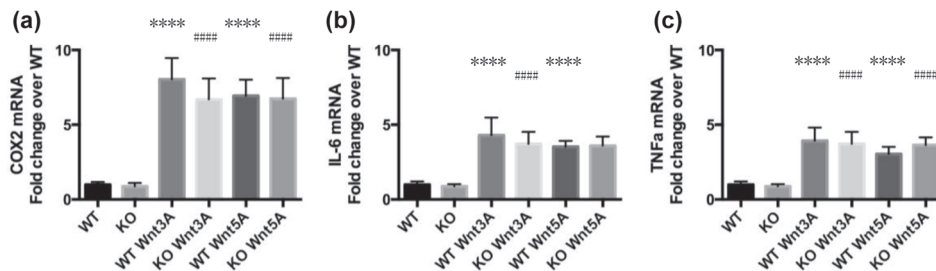


図2. Lrp4を欠失した初代培養マイクログリアでのWnt3A、Wnt5A添加による炎症誘導・炎症応答 WT(n=6)とKO(n=6)の初代培養マイクログリアに300 ng/mlのWnt3A、Wnt5Aを添加し12時間後にRNAを調整してCOX2、IL-6、TNF α mRNAの発現を定量的RT-PCRで調べた。WTの平均値を1とし多重比較した(2方法 統計処理参照)。WTと比較し**** $P < 0.001$, KOと比較し##### $P < 0.001$ 。エラーバーはSD。Wnt3A、Wnt5Aを添加したWTとKO間には有意差はない。

3.3 Wnt3A、Wnt5Aにより細胞増殖度は増加するが、それにLRP4の有無は影響しない

Wnt3AによりN13マイクログリア様細胞の炎症性サイトカインの発現が増加するが細胞数には顕著な変化がない事⁷⁾、Wnt5Aにより初代培養マイクログリアの炎症性サイトカインの発現とMTT assayにより測定した細胞増殖度が増加する事が報告されている⁸⁾。KO、WT それぞれ6系統の初代培養細胞の細胞増殖度をMTT

assayで調べたところ300 ng/ml濃度のWnt3A、Wnt5Aの添加により細胞増殖度はいずれも増加するが、LRP4の有無による有意な差は見られなかった (図3)。

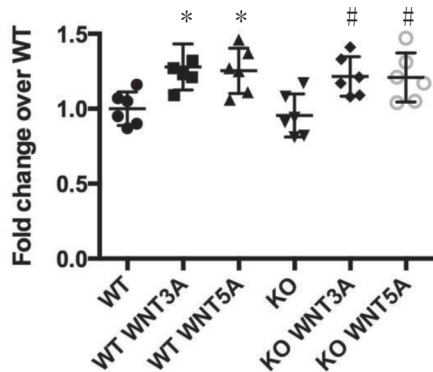


図3. *Lrp4*を欠失した初代培養マイクログリアでのWnt3A、Wnt5A添加による細胞増殖の差 WT (n=6)とKO (n=6)の初代培養マイクログリアに300 ng/mlのWnt3AあるいはWnt5Aを添加し24時間後に細胞増殖度をMTT assayで調べた。Wnt3A、Wnt5Aの添加により細胞増殖度は増加するが、LRP4の有無による有意な差は見られなかった。WTの平均値を1とし多重比較した(2.方法 統計処理参照)。WTと比較し* $P < 0.05$ 、KOと比較し# $P < 0.05$ 。エラーバーはSD。

3.4 WNT-3AやWNT-5Aにより炎症誘発を起こしたマイクログリアからのNO分泌は増加するが、それにLRP4の有無は影響しない

炎症誘発によりマイクログリアからのNO分泌は増加する。Wnt3AやWnt5Aにより炎症誘発を起こしたマイクログリアから培地中へのNO分泌に変化があるか、それにLRP4が関与しているか調べるためにGriess testにより培地中のNOの測定を行った。Wnt3AやWnt5Aを加えるとKO、WTいずれのマイクログリア細胞においてもNO分泌の増加が見られた。しかし、LRP4の有無による有意な差は見られなかった (図4)。

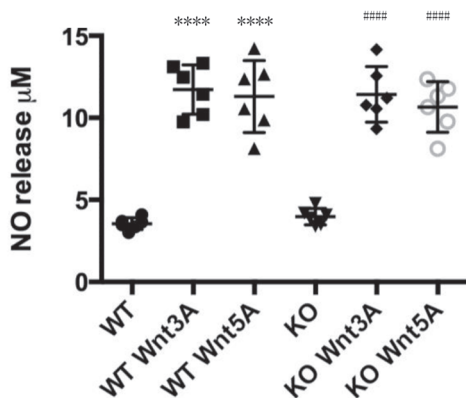


図4. *Lrp4*を欠失した初代培養マイクログリアでのWnt3A、Wnt5A添加によるNO産生 WT (n=6)とKO (n=6)の初代培養マイクログリアに300 ng/mlのWnt3AあるいはWnt5Aを添加し24時間後に培地中のNO量をGriess testで調べた。Wnt3A、Wnt5Aの添加により培地中のNO量は増加するが、LRP4の有無による有意な差は見られなかった。多重比較した(2.方法 統計処理参照)。WTと比較し**** $P < 0.001$ 、KOと比較し#### $P < 0.001$ 。エラーバーはSD。

3.5 Wnt3AやWnt5Aにより炎症誘発を起こしたマイクログリアの細胞遊走能にLRP4は影響しない

コラーゲンマトリックスを使ったinvasion assayではWnt5Aにより初代培養マイクログリアの細胞浸潤能が増加する事が報告されている⁸⁾。Wnt3AやWnt5Aにより炎症誘発を起こしたマイクログリアの細胞遊走能に及ぼすLRP4の影響を定量するためにBoyden chamberを用いたtransmigration assayを行った。Wnt3AやWnt5Aを加えるとKO、WTいずれのマイクログリア細胞においてもBoyden chamberの裏面に遊走したマイクログリア細胞の細胞数の増加が見られたが、LRP4の有無による有意な差は見られず (図5)、LRP4は、炎症誘発を起こしたマイクログリアの細胞遊走能に影響を及ぼさないと考えられた。

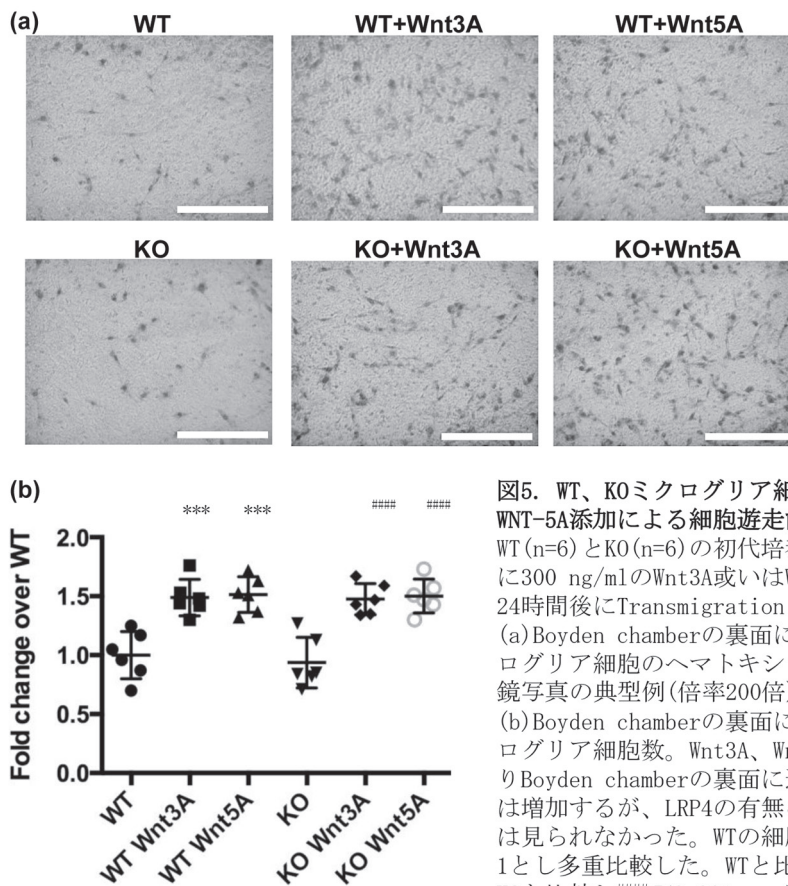


図5. WT、KOミクログリア細胞のWNT-3A、WNT-5A添加による細胞遊走能の比較
WT (n=6) とKO (n=6) の初代培養ミクログリアに300 ng/mlのWnt3A或いはWnt5Aを添加し24時間後にTransmigration assayを行った。(a) Boyden chamberの裏面に遊走したミクログリア細胞のヘマトキシリン染色の顕微鏡写真の典型例(倍率200倍) バーは50 μ m (b) Boyden chamberの裏面に遊走したミクログリア細胞数。Wnt3A、Wnt5Aの添加によりBoyden chamberの裏面に遊走した細胞数は増加するが、LRP4の有無による有意な差は見られなかった。WTの細胞数の平均値を1とし多重比較した。WTと比較し*** P 0.005、KOと比較し#### P 0.001。エラーバーはSD。

4. 考察・結論

初代培養ミクログリアにおいてWnt3A、Wnt5Aによる細胞増殖能、炎症誘発遺伝子COX2や炎症応答サイトカイン遺伝子IL-6、TNF α の発現、炎症に応答したNO放出、細胞遊走能の増加が見られた。しかしLRP4を完全に欠失した初代培養ミクログリアと同じ処理をした同腹のWT細胞との間には、これらのミクログリアの炎症応答で見られる現象に有意な差が見られなかった。これらの結果と先の報告¹⁶⁾と合わせてLRP4は初代培養ミクログリア細胞を用いたin vitroの系ではWnt3A、Wnt5Aによる炎症誘発により応答する遺伝子発現、細胞増殖、NO放出や細胞遊走などの炎症応答には関与していないと考えられる。

しかし、アストロサイト特異的にLRP4を欠失させた条件付きノックアウトマウスを用いたin vivoの系による解析では海馬においてアストロサイトからのATPの放出が促進されることでグルタミン酸を介した神経伝達が抑制される¹⁴⁾。この遺伝子改変マウスでは活動性の低下や空間認識に障害があり、てんかん発作誘導に対して抵抗性がある事やこれらの表現型がアデノシンA1レセプター拮抗剤によって変わる事が報告されている¹⁴⁾。また実験的に虚血を誘導したアストロサイト特異的条件付きKOマウスでは同腹の非KOマウスに比べて脳損傷が少なく、ATPの放出やその誘導体アデノシンの産生が促進され、LRP4がアデノシン-A2Aレセプターを介したシグナル伝達を調整している事も報告されている³²⁾。

最近の研究から神経活動に応じて神経細胞やアストロサイトから分泌されたATPはミクログリア突起を誘導し、ミクログリアの表面酵素によってアデノシンに分解されて、それが神経細胞のアデノシンA1レセプターに結合することで神経活動が抑制される事が分かってきている³³⁾。またミクログリアに発現するATP受容体にはP2X4、P2X7、P2Y2、P2Y4、P2Y6、P2Y12が知られているが、各サブタイプの活性化はミクログリアに対して全く異なる細胞応答を引き起こす^{34, 35)}。更にWnt-5Aはアストロサイトやミクログリアで発現しており^{8, 19)}、アストロサイトで発現しているWnt-5Aがアストロサイト-ミクログリア間の作用によりミクログリアに炎症誘発を起こす可能性も報告されている⁸⁾。

この様に本研究は今後、ミクログリア単独の *in vitro* の系でなく *in vivo* での解析やアストロサイト細胞との共培養による解析が必要となる。また Wnt3A、Wnt5A による神経保護性ミクログリア (M2型ミクログリア) に及ぼす影響のメカニズムも調べる必要があると考えられる。

5. 謝辞

本研究はJSPS科研費23500441 (代表者: 棚橋浩)、26430014 (代表者: 棚橋浩)、公益財団法人沖中記念成人病研究所研究費助成 (代表者: 棚橋浩)、公益財団法人山口育英奨学会学術研究助成 (代表者: 棚橋浩) の助成を受けた。本研究において開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- [1] Kettenmann H., Hanisch U. K., Noda M. and Verkhratsky A., (2011) Physiology of microglia, *Physiol. Rev.*, 91 (2011) 461-553
- [2] Prinz M., Jung S. and Priller J., (2019) Microglia Biology: One Century of evolving concepts, *Cell*, 179 (2019) 292-311
- [3] Inestrosa N. C. and Arenas E., (2010) Emerging roles of Wnts in the adult nervous system, *Nat. Rev. Neurosci.*, 11 (2010) 77- 86
- [4] Salinas P. C., Wnt signaling in the vertebrate central nervous system: from axon guidance to synaptic function, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 4 (2012) pii:a008003
- [5] Clevers H. and Nusse R., Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease, *Cell*, 149 (2012) 1192- 1205
- [6] Marchetti B. and Pluchino S., Wnt your brain be inflamed? Yes, it Wnt!, *Trends Mol. Med.*, 19 (2013) 144- 156
- [7] Halleskog C., Mulder J., Dahlström J., Halleskog C., Mulder J., Dahlström J., Mackie K., Hortobágyi T., Tanila H., Kumar Puli L., Färber K., Harkany T. and Schulte G., WNT signaling in activated microglia is pro-inflammatory, *Glia*, 59 (2011) 119- 131
- [8] Halleskog C., Dijksterhuis J. P., Kilander M. B., Becerril-Ortega J., Villaescusa C. J., Lindgren E., Arenas E. and Schulte G., Heterotrimeric G protein-dependent WNT-5A signaling to ERK1/2 mediates distinct aspects of microglia proinflammatory transformation, *J. Neuroinflammation*, 9 (2012) 111
- [9] Halleskog C. and Schulte G., Pertussis toxin-sensitive heterotrimeric G(α i/o) proteins mediate WNT/ β -catenin and WNT/ERK1/2 signaling in mouse primary microglia stimulated with purified WNT-3A, *Cell. Signal.*, 25 (2013) 822- 828
- [10] Halleskog, C. and Schulte, G., (2013) WNT-3A and WNT-5A counteract lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory changes in mouse primary microglia, *J. Neurochem.*, 125 (2013) 803-808
- [11] Zhang B., Luo S., Wang Q., Suzuki T., Xiong W. C. and Mei L., (2008) LRP4 serves as a coreceptor of agrin, *Neuron*, 60 (2008) 285-297
- [12] Kim N., Stiegler A. L., Cameron T. O., Hallock P. T., Gomez A. M., Huang J. H., Hubbard S. R., Dustin M. L. and Burden S. J., Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK, *Cell*, 135 (2008) 334-342
- [13] Tanahashi H., Tian Q. B., Hara Y., Sakagami H., Endo S. and Suzuki T., (2016) Polyhydramnios in Lrp4 knockout mice with bilateral kidney agenesis: Defects in the pathways of amniotic fluid clearance, *Sci. Rep.*, 6 (2016) e20241
- [14] Sun X. D., Li L., Liu F., Huang Z. H., Bean J. C., Jiao H. F., Barik A., Kim S. M., Wu H., Shen C., Tian Y., Lin T. W., Bates R., Sathyamurthy A., Chen Y. J., Yin D. M., Xiong L., Lin H. P., Hu J. X., Li B. M., Gao T. M., Xiong W. C. and Mei L., Lrp4 in astrocytes modulates glutamatergic

- transmission, *Nat. Neurosci.*, 19 (2016) 1010-1018
- [15] Tian Q. B., Suzuki T., Yamauchi T., Sakagami H., Yoshimura Y., Miyazawa S., Nakayama K., Saitoh F., Zhang J. P., Lu, Y., Kondo H. and Endo S., Interaction of LDL receptor-related protein 4 (LRP4) with postsynaptic scaffold proteins via its C-terminal PDZ domain-binding motif, and its regulation by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II, *Eur. J. Neurosci.*, 23 (2006) 2864-2876
- [16] 棚橋浩、ミクログリアに対して炎症誘導、抗炎症作用の二極性を持つWNT-3AとWNT-5Aシグナル経路へのLRP4の関与、九州女子大学学術情報センター紀要、6 (2023) 87-94
- [17] 棚橋浩、神経筋接合部の維持に必須であるlow-density lipoprotein-receptor related protein4 (LRP4) の発現異常による多様な表現型、常磐大学人間科学部紀要人間科学、38(2) (2021) 49-63
- [18] Miller J. R., The Wnts, *Genome Biol.*, 3 (2001) reviews3001.1
- [19] Yeh H., Woodbury M. E., Dixie K. L. I., Ikezu T. and Ikezu S., Microglial WNT5A supports dendritic spines maturation and neuronal firing, *Brain Behavior Immunity*, 107 (2023) 403-413
- [20] Johnson, E. B., Hammer, R. E. and Herz, J., Abnormal development of the apical ectodermal ridge and polysyndactyly in *Megf7*-deficient mice, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 3523-3538
- [21] Li Y., Pawlik B., Elcioglu N., Aglan M., Kayserili H., Yigit G., Percin F., Goodman F., Nurnberg G., Cenani A., Urquhart J., Chung B. D., Ismail S., Amr K., Aslanger A. D., Becker C., Netzer C., Scambler P., Eyaid W., Hamamy H., Clayton-Smith J., Hennekam R., Nürnberg P., Herz J., Temtamy S. A. and Wollnik B., LRP4 mutations alter Wnt/beta-catenin signaling and cause limb and kidney malformations in Cenani-Lenz syndrome, *Am. J. Hum. Genet.*, 86 (2010) 696-706
- [22] Choi H. Y., Dieckmann M., Herz J. and Niemeier A., *Lrp4*, a novel receptor for Dickkopf 1 and sclerostin, is expressed by osteoblasts and regulates bone growth and turnover in vivo, *PLoS One*, 4 (2009) e7930
- [23] Ohazama A., Johnson E. B., Ota M., Choi H. J., Porntaveetus T., Oommen S., Itoh N., Eto K., Gritli-Linde A., Herz J. and Sharpe P. T., *Lrp4* modulates extracellular integration of cell signaling pathways in development, *PLoS One*, 3 (2008) e4092
- [24] Henriquez J. P., Webb A., Bence M., Bildsoe H., Sahores M., Hughes S. M. and Salinas P. C., Wnt signaling promotes AChR aggregation at the neuromuscular synapse in collaboration with agrin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105 (2008) 18812-18817
- [25] Wang J., Ruan N. J., Qian L., Lei W. L., Chen F. and Luo Z. G., Wnt/beta-catenin signaling suppresses Rapsyn expression and inhibits acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction, *J. Biol. Chem.*, 283 (2008) 21668-21675
- [26] Zhang, B., Liang, C., Bates, R. Yin Y., Xiong W. C. and Mei L., Wnt proteins regulate acetylcholine receptor clustering in muscle cells, *Mol. Brain*, 5 (2012) 7
- [27] Tanahashi H. and Suzuki T., Deletion of *Lrp4* increases the incidence of microphthalmia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 506 (2018) 478-484
- [28] Suzumura, A., Mezitis, S. G. E., Gonatas, N. K. and Silberberg, D. H., MHC antigen expression on bulk isolated macrophage-microglia in vitro: induction of class II MHC antigen expression by interferon- γ , *J. Neuroimmunol.*, 15 (1987) 263-278
- [29] Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth.*, 65 (1983) 55-63
- [30] Livak K. J. and Schmittgen T. D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} method, *Methods*, 25 (2001) 402-408
- [31] Green L. C., Wagner D. A., Glogowski J., Skipper P. L., Wishnok J. S. and Tannenbaum S. R., Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.*, 126 (1982) 131-

138

- [32] Ye X. C., Hu J. X., Li L., Li Q., Tang F. L., Lin S., Sun D., Sun X. D., Cui G. Y., Mei L. and Xiong W. C., Astrocytic Lrp4 (Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 4) contributes to ischemia-induced brain injury by regulating ATP release and adenosine-A2AR (adenosine A2A receptor) Signaling, *Stroke*, 49 (2018) 165-174
- [33] Badimon A., Strasburger H. J., Ayata P., Chen X., Nair A., Ako Ikegami A., Hwang P., Chan A. T., Graves S. M., Uweru J. O., Ledderose C., Kutlu M. G., Wheeler M. A., Kahan A., Ishikawa M., Wang Y. C., Loh Y. H. E., Jiang J. X., Surmeier D. J., Robson S. C., Junger W. G., Sebra R., Calipari E. S., Kenny P. J., Eyo U. B., Colonna M., Quintana F. J., Wake H., Gradinaru V. and Schaefer A., Negative feedback control of neuronal activity by microglia, *Nature*, 586 (2020) 417-423
- [34] Lalo U. and Pankratov Y., ATP-mediated signaling in the central synapses, *Neuropharmacology*, 229 (2023) 109477
- [35] 斎藤秀俊、津田誠、井上和秀、ATP受容体による中枢機能調節：ミクログリアの役割、*日薬理誌*、136 (2010) 93-97

Effects of LDL receptor-related protein 4 (LRP4) on cell proliferation, cell migration and NO production induced by inflammation of Wnt3A and Wnt5A signaling pathways that have inflammation-inducing effects on microglia

Hiroshi TANAHASHI^{*1,*2}

¹ Department of Nutrition, Faculty of Home Economics, Kyushu Women's University
1-1 Jiyugaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu-shi 807-8586, Japan

² Department of Neuroplasticity, Graduate School of Medicine, Shinshu University
3-1-1 Asahi, Matsumoto-shi 390-8621, Japan

Abstract

Microglia maintain brain homeostasis by inducing and suppressing inflammation during infection and brain injury. LRP4 is a receptor for agrin, which is secreted from motor nerve endings and promotes the accumulation of acetylcholine receptors in the postsynaptic region, thereby maintaining the formation of neuromuscular junctions. receptor accumulation by Wnts has also been reported.

In this study, I compared the cell proliferation, NO production, and migration ability of Wnt3A and Wnt5A in primary cultured microglia derived from mice lacking LRP4 with those of wild-type microglia from the same stomach. The addition of these Wnts increased the expression of inflammation-inducing and inflammation-responsive genes, cell proliferation, NO production, and cell migration ability, but there was no significant difference between the presence and absence of LRP4, suggesting that LRP4 is not involved in the inflammatory response of microglia induced by Wnt3A and Wnt5A.

Key words : LRP4, microglia, migration, NO, Wnt