

老化因子が血管周囲のミクログリアに与える影響

山下 直輝 (筑波大学 生物学類)

指導教員：鶴田 文憲 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

ヒトやマウスの脳では老化に伴って認知機能が低下することが知られており、その主な要因として神経炎症の亢進が挙げられる。神経炎症は脳内の免疫担当細胞であるミクログリアによって媒介されており、老化した脳ではミクログリアの活動が過剰になることで炎症が亢進している。先行研究では炎症に関わる老化促進因子として β 2-microglobulin (B2m) が同定されている。B2m は MHC クラス I 分子のサブユニットとしてほとんどの有核細胞表面に発現し、その一部は細胞外へ遊離している。脳内において B2m はミクログリアで多く発現しており、発現量は加齢とともに上昇する。また血中および脳脊髄液中の B2m 濃度が加齢に伴って上昇すると認知機能の低下が起こることが報告されている。しかし、ミクログリアの B2m 発現上昇と、ミクログリア周囲環境の B2m 濃度上昇のどちらが炎症の制御に重要であるかは明らかでない。そこで本研究では、B2m がミクログリアを制御し、老化表現型を引き起こす分子メカニズムの解明を目的とした。

【実験方法】

(1) プラスミド作製

B2m をマウス (C57BL/6) 脳 cDNA ライブラリからクローニングして、pCS4 ベクター (pCS4-mCherry) の BglIII の制限酵素サイトに組み込んだ。

(2) 遺伝子導入

ヒト胎児腎細胞 (HEK293T) とマウスのミクログリア細胞株 (BV2) を用いて実験を行った。HEK293T は DMEM、BV2 は DMEM/F12 を培地として用いた。リポフェクション法により B2m-mCherry を細胞に遺伝子導入した。トランスフェクション試薬には 1.0 mg/mL Polyethylenimine MAX (Polysciences) を用いた。

(3) ウェスタンブロッティング

サンプルとして培養上清と細胞抽出液を回収した。培養上清は、条件培地から 100 μ L 回収して 3000g で 5 分間遠心を行い、上清 90 μ L を回収した。細胞抽出液では、細胞を冷却した PBS で洗浄した後、Lysis Buffer を用いて細胞を溶解した。回収したサンプルに Sample buffer を添加し、3 分間ボイルを行った。サンプルはアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、Transfer buffer を用いて PVDF 膜へ 100V で 60 分間の転写を行った。PVDF 膜は、5% スキムミルク/TBS-T でブロッキングした後、5% BSA/TBS-T に希釈した一次抗体を 4°C で一晩反応させた。一次抗体には、抗 RFP 抗体 (1:1000, Rockland) を用いた。その後、TBS-T で洗浄し、5% スキムミルク/TBS-T に 1/20000 で希釈した二次抗体を 1 時間反応させた。PVDF 膜を TBS-T で洗浄し、ケミルミワン Super (nacalai tesque) で検出した。

(4) RT-qPCR

total-RNA は Isogen II (Nippongene) を用いて抽出し、Revertra Ace (TOYOBO) と Random primer (TOYOBO) を用いて逆転写を行った。Thunderbird SYBR qPCR Mix

(TOYOBO) を用いて Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, 7900HT) で反応させ、5S をインターナルコントロールとして IL-1 β の mRNA の発現を定量した。

(5) 免疫細胞染色

カバーガラスに BV2 細胞を播種して遺伝子導入を行い、24 時間培養を行った後、PBS で洗浄してから 4%PFA/PBS に置換し、氷上で 10 分間固定した。PBS で洗浄した後、5%BSA/0.25% Triton X-100/PBS を添加して室温で 30 分間透過処理とブロッキングを行った。一次抗体として、抗 GFP 抗体 (1:1000, Abcam)、抗 RFP 抗体 (1:1000, Rockland) を用いて室温で 2 時間反応させた。PBS で洗浄した後、蛍光色素が結合した二次抗体を 30 分間反応させて染色した。核の染色には 1.0 μ g/mL DAPI (Dojindo) を用いた。得られたサンプルは蛍光顕微鏡 (Keyence, BIOREVO BZ-9000) を用いて観察した。得られた画像から、ImageJ を用いて共局在指数 (Pearson's value) を算出した。

【結果・考察】

まず、B2m と mCherry が融合したプラスミドを構築して HEK293T 細胞に導入し、ウェスタンブロッティングを行った。その結果、細胞だけでなく培養上清でも B2m が検出できた。以上の結果から、B2m が細胞外へ放出されていることが示唆された。

次に、細胞外へ遊離した B2m がミクログリアを活性化するかを検証するため、B2m を含んだ培養上清を BV2 細胞に添加して炎症反応を引き起こされるか解析した。B2m を加えてから 3 時間後に qPCR を行った結果、IL-1 β の mRNA 発現量がコントロールと比較して有意に増加していた。この結果から、細胞外に遊離した B2m がミクログリアの炎症反応を促進することが示唆された。

また、B2m の発現上昇がミクログリアの炎症反応を制御するか検証した。BV2 細胞に B2m を過剰発現させ、他の細胞小器官とともに免疫細胞染色を行って観察した。その結果、各細胞小器官と B2m の共局在指数を算出して比較したところ、リソソームのマーカーである LAMP 1 と顕著な共局在が観察された。マクロファージの研究では、B2m がリソソームに蓄積すると炎症反応が誘導されることが明らかにされており、ミクログリアでも同様の現象が起こっている可能性が考えられる。

以上の結果から、加齢に伴う B2m 濃度の上昇がミクログリアの炎症反応を促進する可能性が示唆された。今後は、外因性 B2m がどのような経路でミクログリアの炎症反応を促進しているのかを明らかにしていく。また、ミクログリアで発現上昇した B2m がリソソームに蓄積する可能性が示唆された。今後、内因性 B2m がリソソームに蓄積することで炎症の制御に関与しているか検証していく予定である。