

助成番号 27-2-50

ミクログリアにおける膜リン脂質ダイナミクスの調節機構解明と 難治性疼痛治療への応用

国立研究開発法人 国立国際医療研究センター 研究所 脂質生命科学研究所

山本 将大

1. 諸言

ミクログリアは脳や脊髄に存在するグリア細胞のひとつで、中枢神経系に存在する常在性マクロファージとも呼ばれる、中枢の免疫担当細胞である。病態時のミクログリアは細胞体の肥大化や細胞増殖を伴う活性化状態になり、ダメージを受けた細胞の貪食や液性因子の産生放出を引き起こす。近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症、多発性硬化症などの中枢神経系疾患のリスク遺伝子の主要発現細胞であることが明らかになった¹⁾。さらに、神経系組織の損傷によって引き起こされる神経障害性疼痛は、麻薬性鎮痛薬モルヒネでさえ奏効しない難治性の慢性疼痛疾患であるが、本疾患においてもミクログリアが重要な役割であることも知られている²⁾。このように、ミクログリアはさまざまな神経系疾患の治療薬開発における標的細胞として近年注目されている。

すべての細胞と細胞内小器官は生体膜に覆われており、生体膜の主要成分はグリセロリン脂質（以下、リン脂質）である。リン脂質は親水性の極性基と疎水性の2本の脂肪酸によって構成される。その組合せパターンによって1,000種類以上の多様性を有し、組織や細胞種によって膜リン脂質組成はまったく異なる。リン脂質の多様性形成機構は長らく謎であったが、主に2006年以降、責任酵素としてリゾリン脂質アシル転移酵素（LPLAT）ファミリーが次々と遺伝子同定・機能同定され始めた。最近になり少しずつLPLAT遺伝子欠損マウスの解析が進み、がんや糖尿病時に起こる膜リン脂質変動は受容体などの膜タンパク質機能に影響する可能性が報告された^{3,4)}。しかしながら、膜リン脂質多様性の生理的意義や病態時における役割はいまだ謎が多く残されている。

本研究では、神経障害性疼痛病態時の脊髄ミクログリアを構成する生体膜リン脂質に着目し、脂質が担う難治性疼痛への寄与を解析する。

2. 方法

2.1 実験動物

8週齢以降のC57BL6系マウスを用いた。また、リン脂質生合成酵素LPLATファミリーの

各種欠損マウスを用いた。

2.2 疼痛モデルの作製

マウス左後肢の神経支配に関わる第4腰部（L4）脊髄神経を切断することで、神経障害性疼痛の病態モデルマウスを作製した。また、同マウスの右後肢をコントロールとした。

2.3 疼痛評価

物理的な接触刺激に対する反応性の評価には、von Frey 試験を実施した。

2.4 ミクログリアの単離

イソフルラン麻酔下、左心室より生理食塩水を灌流することで脱血し、その後、損傷を与えた L4 脊髄神経が投射する脊髄領域（L3-4）を実体顕微鏡下で採取した。採取した脊髄組織を左右に分離し、それぞれを損傷側および非損傷側の脊髄サンプルとした。脊髄組織からのミクログリア単離は、組織の酵素処理による単一細胞化、ミエリン除去、PE 標識 anti-CD11b 抗体、anti-PE 抗体および MACS 装置を用いて行った。

2.5 脂質分析

単離したミクログリアに対し、メタノールとクロロホルムを用いた脂質抽出を行い、その後、LCMS を用いた包括的なリン脂質分析を実施した⁵⁾。

3.結果

3.1 末梢神経損傷後ミクログリアの経時的なリピドミクス解析

末梢神経損傷の 12 時間後より、ミクログリアは細胞体を肥大化させた活性化型へと形態変化することが知られている⁶⁾。神経損傷後、1 日、4 日、7 日、14 日目に脊髄ミクログリアを単離し、リピドミクス分析を実施した（図 1、未発表データのため、論文発表後に公開する）。

3.2 LPLAT-A 欠損マウスの解析

LPLAT-A 欠損マウスを用いて、神経障害性疼痛モデルを作製した。神経損傷 7 日後のミクログリアを単離し、リピドミクス分析を実施した（図 2、未発表データのため、論文発表後に公開する）。

3.3 LPLAT-B 欠損マウスの解析

LPLAT-B 欠損マウスを用いて、神経障害性疼痛モデルを作製した。神経損傷 7 日後のミクログリアを単離し、リピドミクス分析を実施した（図 3、未発表データのため、論文発表

後に公開する)。

3.4 LPLAT-C 欠損マウスの解析

LPLAT-C 欠損マウスを用いて、神経障害性疼痛モデルを作製した。神経損傷 7 日後のミクログリアを単離し、リピドミクス分析を実施した (図 4、未発表データのため、論文発表後に公開する)。

3.5 LPLAT-D 欠損マウスの解析

LPLAT-D 欠損マウスを用いて、神経障害性疼痛モデルを作製した。神経損傷 7 日後のミクログリアを単離し、リピドミクス分析を実施した (未発表データのため、論文発表後に公開する)。

4. 考察

本研究から、末梢神経損傷後の複数のタイムポイントにおいて脊髄ミクログリアを単離し、包括的なリン脂質解析を実施した。その結果、ミクログリアを構成する生体膜リン脂質は、複数の LPLATs によって制御されていることが明らかになった。

未発表の内容のため、詳細は論文発表後に公開する。

5. 結語

ミクログリアにおける生体膜リン脂質の制御機構および細胞機能との関係性が明らかになれば、中枢神経系の難治性疾患に対する革新的な治療法の創出へつながることが期待できる。

6. 文献

- 1) Prinz M, Jung S, Priller J. Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell*. 2019;179(2):292-311.
- 2) Inoue K, Tsuda M. Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Neurosci*. 2018;19(3):138-152.
- 3) Bi J, Ichu TA, Zanca C, Yang H, Zhang W, Gu Y et al. Oncogene Amplification in Growth Factor Signaling Pathways Renders Cancers Dependent on Membrane Lipid Remodeling. *Cell Metab*. 2019;30(3):525-538.e8.
- 4) Ferrara PJ, Rong X, Maschek JA, Verkerke AR, Siripoksup P, Song H et al. Lysophospholipid acylation modulates plasma membrane lipid organization and insulin sensitivity in skeletal muscle. *J Clin Invest*. 2021;131(8):e135963.
- 5) Hashidate-Yoshida T, Harayama T, Hishikawa D, Morimoto R, Hamano F, Tokuoka SM et al.

Fatty acid remodeling by LPCAT3 enriches arachidonate in phospholipid membranes and regulates triglyceride transport. *Elife*. 2015;4:e06328.

6) Kohno K, Kitano J, Kohro Y, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Tsuda M. Temporal Kinetics of Microgliosis in the Spinal Dorsal Horn after Peripheral Nerve Injury in Rodents. *Biol Pharm Bull*. 2018;41(7):1096-1102.

7.成果発表

本研究の成果は、2022年5月31日現在で未発表である。