

ミクログリアの炎症活動の Na⁺依存的な抑制と、 それによる認知症等の精神症状の安定化

井上 浩一，植木 孝俊

名古屋市立大学医学研究科統合解剖学分野

概要 ミクログリアは中枢神経系における炎症作用など免疫応答に重要な役割を持つ。ミクログリアを起点とした炎症応答は統合失調症など精神神経疾患ばかりではなく、高血圧など全身の疾患へ影響を及ぼす。脳と血圧の関係として、経口的な食塩負荷は脳脊髄液のナトリウムの蓄積を促し、血圧上昇に関与することが知られており、食塩負荷がミクログリアの炎症応答に与える可能性が示唆される。一方、我々の研究室では、種々の免疫系細胞において炎症応答に関与するリン酸化酵素 SGK1 を含む SGK の神経系における役割について研究を行っており、ミクログリアにおいても SGK の発現や炎症反応への関与があることを報告した。SGK1 は血圧の調節に関与することが報告されており、本研究ではミクログリアにおいて食塩負荷による炎症性分子の誘導が認められるか、また、その炎症反応に SGK1 が関与するか調査を行った。

まず、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを用いてミクログリア細胞株 BV-2 で SGK1 破壊株を作成した。そして炎症誘導分子 LPS による炎症応答に変化がみられるか検討したところ、野生株に比べ SGK1 破壊株で LPS による iNOS 蛋白及び TNF α の放出は減少した。また、食塩負荷により BV-2 で SGK1 の発現上昇が認められた。SGK1 の発現はストレス性のシグナルである p38 MAPK と JNK の阻害剤により抑制されたことから、これらの細胞内シグナルが SGK1 の発現に関与することが示唆された。続いて、食塩負荷の炎症性分子の発現における影響を調べるため LPS を投与したところ、食塩負荷により iNOS 及び一酸化窒素 (NO) の産生は増大した。反対に、TNF α の放出は減弱した。SGK1 破壊株に食塩負荷を行ったところ、LPS による NO 産生及び TNF α の放出は共に減少した。以上より、食塩負荷によりミクログリアの活性は修飾を受けるが、SGK1 は食塩負荷の有無にかかわらず、炎症性分子の発現を増加させることが示唆された。

1. 研究目的

近年脳機能や脳障害の研究においては神経細胞ばかりでなくグリア細胞も大きな役割を果たしていることがわかり、注目を集めている。グリア細胞の一種であるミクログリアは骨髄球由来の細胞であるとされ、中枢神経系において主に免疫反応や炎症反応に関与する(Aloisi, 2001; Kettenmann *et al.*, 2011)。種々の精神神経疾患の発症に脳内での炎症反応が起因となることが知られるところとなり、脳内炎症反応の中心となるミクログリアの炎症活性制御機構の解明は重要な意義を持つ。

最近では、精神神経疾患ばかりでなく、高血圧など全身の疾患にミクログリアが関与する脳内炎症反応が寄与

することも報告されている。マウスを用いた研究では血圧の上昇は脳内ミクログリアを活性化し、炎症性サイトカインの放出を促進し、慢性的な血圧上昇の土台となる可能性が示唆されている(Shen *et al.*, 2015)。一方で、食塩依存性高血圧を呈するラットやマウスでは、高塩食により脳脊髄液中の Na⁺濃度が上昇し、つづいて血圧の上昇を起こす(Huang *et al.*, 2004)。これらのことから、塩分摂取によるミクログリアの食塩負荷が高血圧と関わっている可能性が示唆される。

ところで、T 細胞、マクロファージなど免疫系細胞の炎症反応に SGK1 というリン酸化酵素が関与することが報告されている(Kleinewietfeld *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2015)。

SGK1 は生存に関わるとされるリン酸化酵素である Akt/PKB と高い相動性を示し、多くの共通の基質を持つ (Lang *et al.*, 2006)。そのため、SGK1 も生存に関与するとされ、実際、がん細胞を中心に SGK の阻害が癌細胞の増殖抑制となることを示した報告は多い (Sherk *et al.*, 2008)。マクロファージや樹状細胞では、SGK1 が免疫・炎症反応にポジティブに作用することが示唆されている一方、T 細胞ではナイーブ T 細胞から T_H17 細胞への分化・成熟に SGK1 が関与する (Kleinewietfeld *et al.*, 2013; Schmid *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015)。このように免疫系細胞での SGK1 の作用については徐々に明らかになってきたが、ミクログリアでは SGK1 を含む SGK の発現および意義は不明であった。我々の研究室では、SGK の神経系における意義について研究を行っており、その過程で、複数のミクログリア細胞株で SGK1 と SGK3 が発現することを報告した (Inoue *et al.*, 2016a; Inoue *et al.*, 2016b)。また、SGK 阻害剤が LPS によるミクログリア細胞株 BV-2 の炎症応答に関与することを見出した。これらのことから、SGK1 を含む SGK が食塩負荷によるミクログリアの活性制御に関与している可能性があると考えた。それらを踏まえ、本研究では、BV-2 を用いてインビトロで食塩負荷による炎症性分子の誘導が認められるか、また、その反応に SGK1 が関与するかどうかを検討した。

2. 研究方法

2.1 動物

マウスミクログリア細胞株 BV-2 は 5%FBS を含む DMEM にて CO₂ インキュベーター内で、37°C で培養した。

2.2 ゲノム編集技術による SGK1 欠損株の作成

SGK1 欠損株の作成には Thermo Fisher Scientific の GeneArt Precision gRNA Synthesis Kit を用い guide RNA (gRNA) を合成した。gRNA と Cas9 蛋白 (Thermo Fisher Scientific) を電気穿孔装置 Neon (Thermo Fisher Scientific) を用い BV-2 細胞に導入し、単離した細胞のゲノムのシーケンスを行い、欠損株を同定した。SGK1 欠損の確認はウェスタンブロッティング法を用いて行った。

2.3 Western blotting 法

種々の条件で培養した BV-2 細胞を Lysis バッファーにて溶解した。30 分氷冷後、15,000 × g で遠心分離を行い、上清液を試料として取得した。その後、等量の蛋白を

Laemmli 法にて調整し、SDS-PAGE にて蛋白を電気泳動し、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンは各種一次抗体を反応させた後、HRP 標識二次抗体を用いて発光させ、シグナルの検出を行った。

2.4 ELISA

Mouse TNF α ELISA Kit (岩井化学) を用いた。24-well plate (400 μ l/well) にて培養した細胞の培養液を 50 μ l とり、Solution B 50 μ l と混合し 96-well plate に移行した。その後は、説明書の指示に従った。検出は分光光度計を用い、450 nm の吸光度から 620 nm での吸光度を引いた値を正味の吸光度とし、標準液と比較した。

2.5 定量的 PCR

種々の条件で培養した BV-2 細胞を細胞溶解液 Isogen (Nippon Gene) にて説明書に従い処理し、total RNA を取得した。その RNA を定量し、Rivatrace (Funakoshi) を用い、cDNA を合成した。合成された cDNA を試料とし、定量的 PCR を SYBR Premix Ex Tag (Takara), Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara) を用い、実施した。解析は $\Delta\Delta C_t$ 法を使用した。

2.6 NO 検出法

24-well plate (400 μ l/well) にて培養した BV-2 細胞の培養液を 100 μ l とり、96-well plate に移行した。10 μ l の 50 ng/ml 2,3-diaminonaphthalene/0.62 N HCl (DAN) を加え、暗所にて室温で 10 分間放置した。その後、5 μ l 2.8 N NaOH を加え反応を停止した後、青色の蛍光強度 (Ex: 365 nm/Em: 450 nm) を測定した。

いずれの実験方法も著者らの最近の報告 (Inoue *et al.*, 2016b; Asai *et al.*, 2018) に詳細が記載されているものと同様の方法で行った。

3. 研究結果

3.1 SGK1 欠損株の作成

我々は SGK1 がミクログリアの炎症反応に関与する可能性をより詳細に検討するために、ゲノム編集技術を用いて SGK1 欠損株の作成を試みた。CRISPR/Cas9 システムのための Cas9 蛋白を合成した gRNA と共に細胞に導入し、導入された細胞を単離・培養した後、ゲノム配列を確認した。いくつかの SGK1 遺伝子片アレル変異、両アレル変異をもつ細胞を見出した (図 1A) ので、SGK1 蛋白の発現を

検討したところ、片アレル変異では *SGK1* の蛋白量が減少しており、両アレル変異では *SGK1* 蛋白の検出ができなくなった(図 1B)。

3.2 *SGK1*KO 株における LPS による炎症性メディエーターの発現

ミクログリアの炎症応答に *SGK1* が関与するかを調べるため、BV-2 細胞に LPS を投与し炎症性メディエーターで

ある iNOS の発現を検討した。図 2A のように、BV-2 に LPS 投与すると iNOS 蛋白は検出された。*SGK1*KO 細胞に同様の処理を行ったところ、iNOS の発現は認められたが、その発現量は野生株と比べ有意に減少した(図 2A)。また、炎症性サイトカインである $TNF\alpha$ の放出を調べたところ、iNOS の発現と同様に *SGK1*KO 株での放出の減少がみられた(図 2B)。

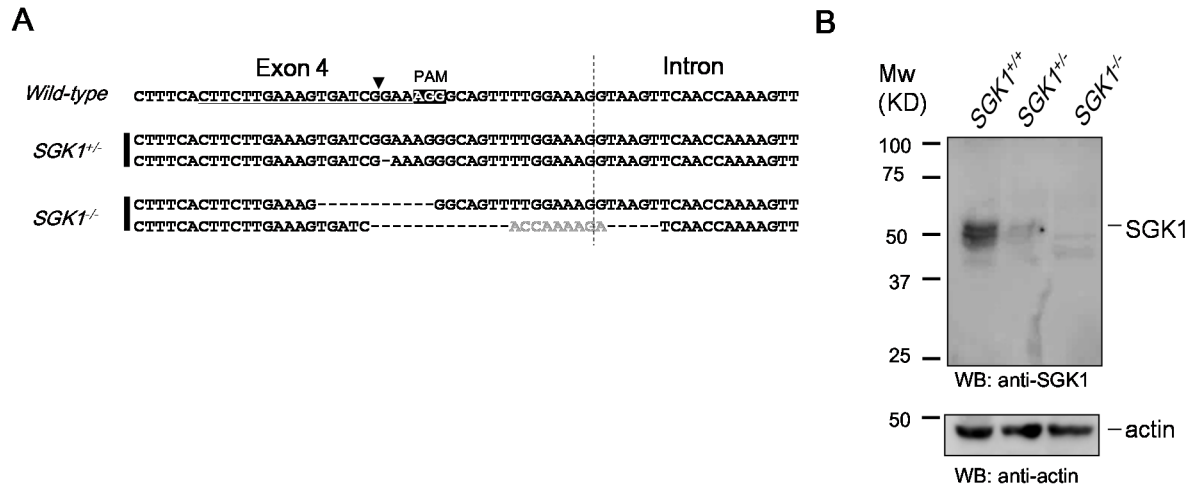


Figure 1. (A) The CRISPR/Cas9 system was applied to BV-2 cells, and mutations in *SGK1* exon 4 were obtained. A protospacer adjacent motif (PAM) is shown with white letters in a black box in the wild-type sequence. Expected cleavage site is indicated by arrowhead. Non-identical nucleotides are shown with gray letters. The border between exon 4 and the following intron is shown by a vertical dashed line. Dashes in the sequences represent deleted nucleotides. (B) Those cells underwent immunoblotting using anti-*SGK1* antibody.

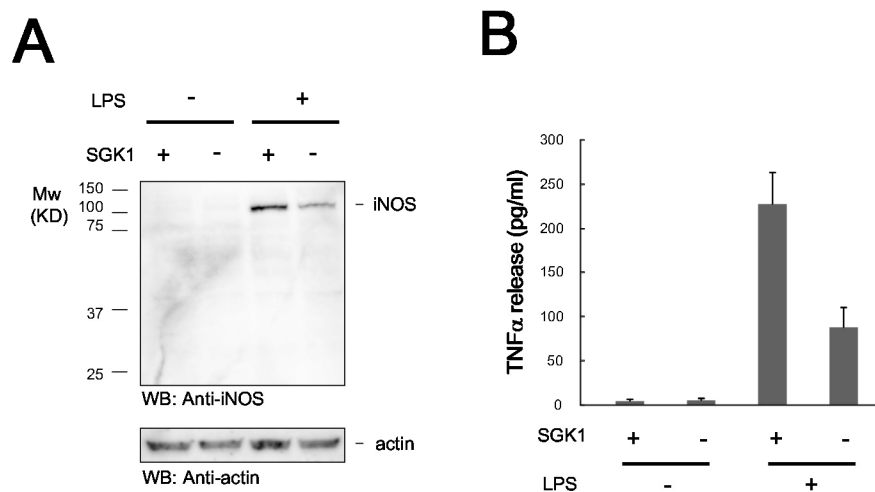


Figure 2. Cells were treated with 500 ng/ml LPS for 8 h (A) or 24 h (B). (A) Immunoblotting was performed and LPS-induced iNOS expression was attenuated in *SGK1*^{-/-} cells. (B) A fifty μ l of medium was taken and ELISA was performed. $TNF\alpha$ release was found to be reduced in *SGK1*^{-/-} cells.

3. 3 NaClによるSGK1発現

NaCl 負荷による神経系に与える影響にミクログリアが関与する可能性が示唆されている(Shen *et al.*, 2015)。また, SGK1 はステロイドをはじめとする種々の刺激により誘導されることが報告されており(Webster *et al.*, 1993; Lang *et al.*, 2006), ミクログリアへの NaCl 負荷が SGK1 の発現に及ぼす影響について検討した。まず NaCl の濃度を変えて 8 時間培養したところ, 50 mM までは濃度依存的な SGK1 の発現上昇を認めたが, それ以上では細胞毒性が観察された(図 3A)。次に培養時間を変えて培養したところ, 培養

開始後 4 時間以降で有意な SGK1 の発現上昇を認めた(図 3B)。

3. 4 NaClによる細胞内シグナルの活性化

NaCl 負荷で p38MAPK など細胞内シグナルが活性化されることが知られている。そこで, NaCl 負荷による p38MAPK を含む MAP キナーゼの活性化の指標となるリン酸化状態の変化を検討した。その結果, NaCl 負荷により p38MAPK と JNK のリン酸化は一時的に亢進した(図 4A)。

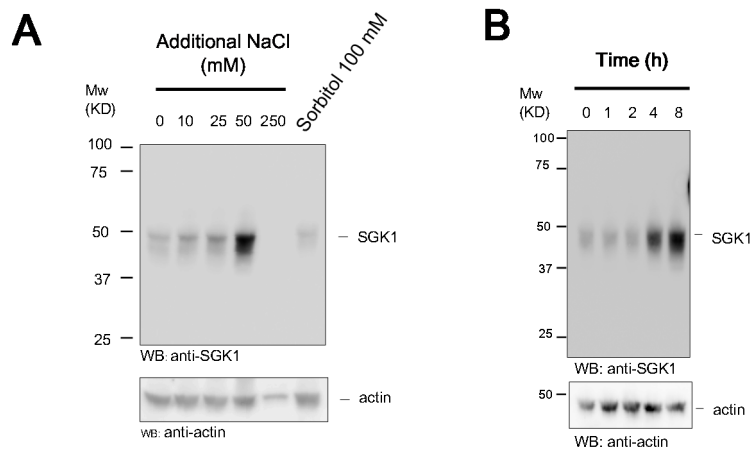


Figure 3. (A) BV-2 cells were treated with the indicated doses of additional NaCl for 8 h. They then underwent immunoblotting using anti-SGK1 antibody. Protein loading was monitored with actin. (B) Cells were incubated with additional 50 mM NaCl for the indicated times. They were examined as described in (A). SGK1 is found to be induced by additional NaCl administration.

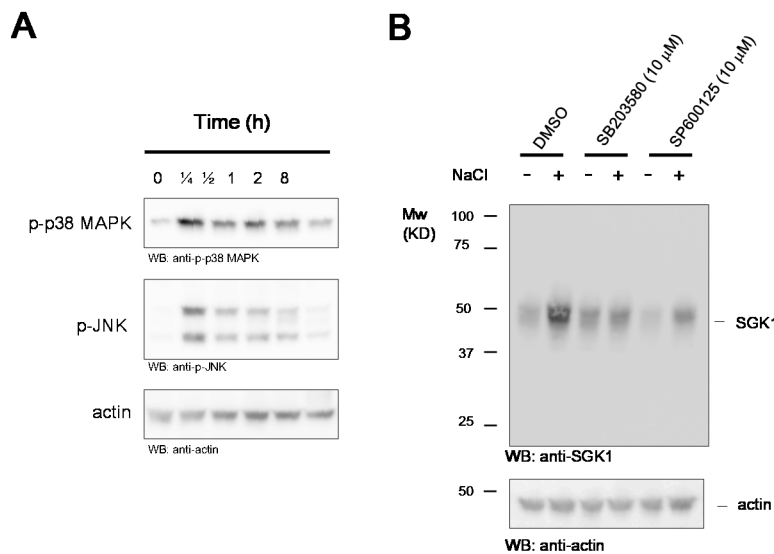


Figure 4. (A) Cells were treated with NaCl. Immunoblotting was carried out using the indicated antibodies. Phosphorylation of p38 MAPK and JNK was elevated (B) Cells were preincubated with p38 MAPK and JNK inhibitors and/or 50 mM NaCl with the indicated reagents. Immunoblotting was performed using anti-SGK1 antibody. The expression of SGK1 is decreased in the presence of inhibitors.

血管内皮細胞等で SGK1 の発現に p38MAPK が関与するという報告があるため、ミクログリアにおける SGK1 の発現に対する影響を検討した。p38MAPK の阻害剤である SB203580 の投与により、SGK1 の発現量は減少した(図 4B)。また、JNK の阻害剤である SP600125 を投与した場合も SGK1 の発現量は減少した(図 4B)。これらのことから、ストレスで活性化されるとされる p38MAPK と JNK は SGK1 の発現上昇に寄与している可能性が示唆される。

3.5 NaCl 負荷による炎症性メディエーターの変化と SGK1 の影響

LPS による炎症性メディエーターのレベルが NaCl 負荷により影響を受けるか検討した。NaCl を追加投与し 4 時間

前培養を行った後、LPS を加えさらに 4 時間培養したところ、LPS による iNOS の mRNA、蛋白の発現レベルが増強された(図 5A, B)。同様に、NO の産生も NaCl 負荷により上昇した(図 5C)。一方、TNF α の放出を検討したところ、NaCl 負荷後 LPS を投与した場合、TNF α の放出は減少した(図 5D)。

上記と同様の実験を SGK1KO 株で行ったところ、iNOS の発現レベル、NO の産生及び TNF α の放出はいずれも減少が認められた(図 6)。これらのことから、NaCl 負荷によるミクログリアの炎症応答は修飾を受けるが、SGK1 の破壊により活性化は減弱する可能性が示唆される。

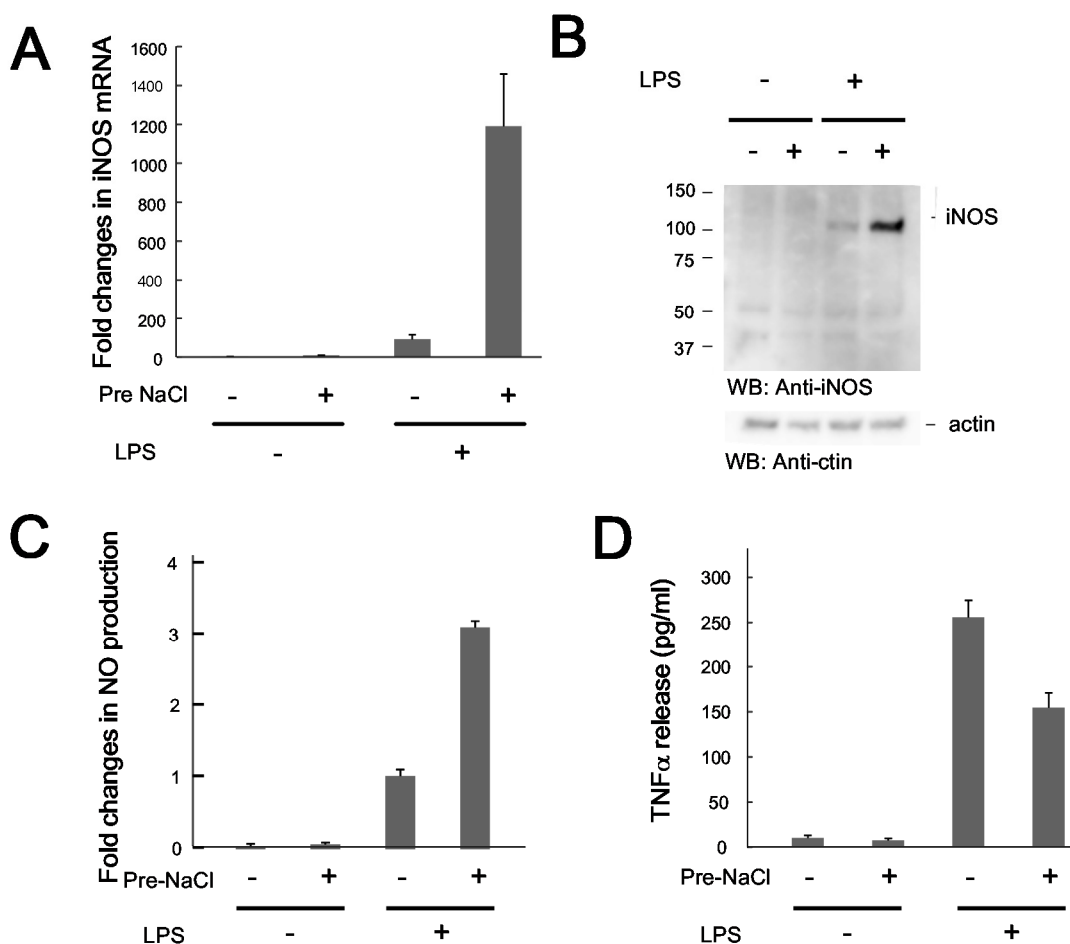


Figure 5. Cells were preincubated in the presence or absence of 50 mM NaCl, followed by treatment with LPS for 4 h (A), 8 h (B) or 24 h (C and D). (A) RNAs were extracted and quantitative real-time PCR was carried out. LPS-induced iNOS expression is enhanced by advanced application of NaCl. (B-D) Immunoblotting for iNOS (B), NO detection (C) and ELISA for TNF α detection (D) were performed. NaCl load enhances iNOS protein and NO production, while it ameliorates TNF α release.

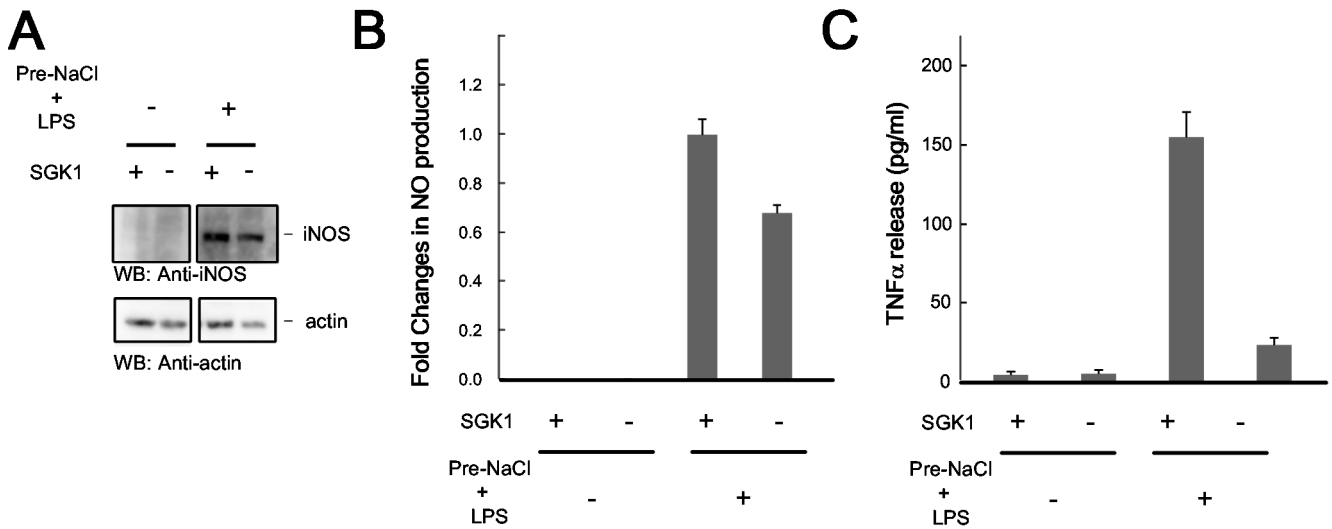


Figure 6. Cells were preincubated in the presence or absence of 50 mM NaCl, followed by treatment with LPS for 8 h (A) or 24 h (B and C). Immunoblotting for iNOS (B), NO detection (C) and ELISA for TNF α detection were performed. iNOS protein, NO production and TNF α release are attenuated in SGK1^{-/-} cells.

4. 考察

ミクログリアは脳内グリアの一種であるが、骨髄由来で脳内の免疫機能をつかさどるとされる。ミクログリアはその活性化により活性酸素の産生をおこし周囲の細胞や組織を傷害し、またサイトカインを放出し炎症を惹起する。そのためミクログリアのストレス応答を詳細に検討することは、脳内炎症に起因する多発性硬化症やアルツハイマー病など種々の疾患の分子病理の解明に有意義であると考えられる。

我々は以前 SGK 阻害剤を用いてミクログリアに炎症応答に SGK1 を含む SGK が関与している可能性を見出している(Inoue *et al.*, 2016b)。食塩負荷がミクログリアを介して高血圧などの全身疾患に関与する可能性が指摘されており、本研究ではミクログリアの炎症応答における食塩負荷の作用と SGK1 の関与を検討した。

図 5 に示すように、NaCl 負荷のみでは iNOS は誘導されないが、LPS による iNOS の誘導が食塩負荷により大きく増強したことから、当初食塩負荷はミクログリアの炎症応答を惹起すると考えた。しかし、一方で、TNF α の放出は NaCl 負荷により減少した。これらのことは、食塩負荷が単にミクログリアの活性状態を惹起あるいは減弱するのではなく、活性を修飾する可能性を示している。

SGK1 の関与に関しては、食塩負荷の有無にかかわら

ず、SGK1 の破壊により NO、TNF α はいずれも減少しており、SGK1 はミクログリアの活性化にポジティブに貢献していることを示唆している。

5. 今後の課題

今回の結果は、食塩負荷が単にミクログリアの活性状態を惹起あるいは減弱するのではなく、活性を修飾する可能性を示している。ミクログリアの活性化には、大別すると細胞傷害に作用する M1 タイプへの変化と保護的に作用する M2 タイプへの変化がある(Kettenmann *et al.*, 2011)。iNOS 及び TNF α はいずれも M1 タイプのミクログリアで上昇する因子であるため、M1/M2 の分化の違いとは考えにくい。M1、M2 のマーカーの発現や他のサイトカインの産生の検討など、今後行っていく必要がある。

また、SGK1 はミクログリアの活性化にポジティブに貢献していることを示唆している。ところが、以前我々は SGK 阻害剤を用いた研究を行っており、その際は SGK 阻害剤の投与により LPS による NO 及び TNF α の発現は増強されている(Inoue *et al.*, 2016b)。両者を考慮すると、SGK3 が LPS による炎症性メディエーターの発現にも関与している可能性があり、今後検討すべき課題と言える。あるいは、阻害剤の特異性もいまだ不明な点も多く、今後検討すべきかもしれない。

さらに、今回得られた食塩負荷によるミクログリアの活性変化や SGK1 の関与が動物モデルを用いて認められるか、検討する必要があると考えている。

謝 辞

本研究を進めるに当たり助成をいただきました公益財団法人ソルト・サイエンス財団の関係各位に深く感謝申し上げます。

6. 文 献

- Aloisi F (2001) Immune function of microglia. *Glia* 36:165-179.
- Asai H, Inoue K, Sakuma E, Shinohara Y, Ueki T (2018) Potential implication of SGK1-dependent activity change in BV-2 microglial cells. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology* 10:115-123.
- Huang BS, Van Vliet BN, Leenen FH (2004) Increases in CSF [Na⁺] precede the increases in blood pressure in Dahl S rats and SHR on a high-salt diet. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 287:H1160-H1166.
- Inoue K, Leng T, Yang T, Zeng Z, Ueki T, Xiong ZG (2016a) Role of serum- and glucocorticoid-inducible kinases in stroke. *J Neurochem* 138:354-361.
- Inoue K, Sakuma E, Morimoto H, Asai H, Koide Y, Leng T, Wada I, Xiong ZG, Ueki T (2016b) Serum- and glucocorticoid-inducible kinases in microglia. *Biochemical and biophysical research communications* 478:53-59.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiological reviews* 91:461-553.
- Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakana H, Yosef N, Linker RA, Muller DN, Hafler DA (2013) Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic T_H17 cells. *Nature* 496:518-522.
- Lang F, Bohmer C, Palmada M, Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Vallon V (2006) (Patho) physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiological reviews* 86:1151-1178.
- Schmid E, Xuan NT, Zahir N, Russo A, Yang W, Kuhl D, Faggio C, Shumilina E, Lang F (2014) Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 sensitive NF-κB signaling in dendritic cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 34:943-954.
- Shen XZ, Li Y, Li L, Shah KH, Bernstein KE, Lyden P, Shi P (2015) Microglia participate in neurogenic regulation of hypertension. *Hypertension* 66:309-316.
- Sherk AB, Frigo DE, Schnackenberg CG, Bray JD, Laping NJ, Trizna W, Hammond M, Patterson JR, Thompson SK, Kazmin D, Norris JD, McDonnell DP (2008) Development of a small-molecule serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 antagonist and its evaluation as a prostate cancer therapeutic. *Cancer research* 68:7475-7483.
- Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, Firestone GL (1993) Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Molecular and cellular biology* 13:2031-2040.
- Zhou H, Gao S, Duan X, Liang S, Scott DA, Lamont RJ, Wang H (2015) Inhibition of serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 enhances TLR-mediated inflammation and promotes endotoxin-driven organ failure. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29:3737-3749.

Na⁺-Dependent Inhibition of Microglial Activity and Its Contribution to Brain Disorders

Koichi Inoue, Takatoshi Ueki

Department of Integrative Anatomy, Nagoya City University School of Medical Sciences

Summary

Microglial cells play a fundamental role in the central nervous system. Their activation can often cause neurodegeneration and the inflammatory responses, resulting in brain diseases such as schizophrenia and Alzheimer's disease. Recent studies have revealed that activation of microglia influences blood pressure through brain inflammation. Considering that an increase in Na⁺ in cerebrospinal fluid (CSF) precedes hypertension through hypothalamic dysfunction, these suggest the possibility that salt load affects microglial activity and the subsequent systemic abnormalities.

Serum- and glucocorticoid-inducible kinases (SGKs) are associated with important physiological and pathophysiological events. Recent studies suggest SGK1 to participate in inflammatory responses in various types of immune cells. We reported that SGKs are expressed and that they may contribute to inflammatory responses in microglial cells. Here, we investigated the relationship between microglial activation and salt load, which can be caused by contemporary diets, through SGK1, in a microglial cell line, BV-2.

We first employed CRISPR/Cas9 system and created *SGK1*-deleted microglial cells (*SGK1*^{-/-} cells). iNOS protein and TNF α release induced by lipopolysaccharide (LPS) were diminished in *SGK1*^{-/-} cells. These results indicate that SGK1 regulates activity of inflammatory responses positively. Then, application of additional NaCl (salt load) augmented SGK1 at the protein level. Activation of stress-induced MAPK signals was assessed, and phosphorylation of p38 MAPK and JNK was elevated by salt load. Inhibitors of p38 MAPK and JNK were administrated, and salt load-induced SGK1 protein was attenuated, suggesting that upregulation of SGK1 is, at least in part, regulated by those signaling pathways. Next, we examined whether salt load influences microglial inflammatory responses. When cells were incubated with salt load in advance, LPS-induced expression of iNOS and nitric oxide (NO) production were enhanced. In contrast, LPS-induced TNF α release was attenuated. Levels of both mediators were reduced in *SGK1*^{-/-} cells. Taken together, these findings suggested that salt load modulates microglial activity and that SGK1 accelerates microglial inflammatory responses.