

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08050

研究課題名(和文) 神経変性疾患に対する脂質メディエータの作用機構の解明

研究課題名(英文) Neuroprotective effect of fatty acid receptors in microglia

研究代表者

鈴木 健二 (Suzuki, Kenji)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：10187726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病はアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の危険因子であると考えられている。本研究では、糖尿病における慢性炎症とその制御に関わる脂質メディエータ及び各標的タンパク質の機能に着目する。ミクログリアによるTLR4刺激によるサイトカイン産生に対するヒドロキシ酪酸の受容体HCA2の作用を調べ、以下の結果を得た。

ミクログリア細胞株BV-2において、 β -HBIはLPS誘導性のIL-6とIL-1のmRNA産生を抑制した。また、MAPK経路のERKのリン酸化の抑制は観察されたが、NF- κ B経路のシグナルを顕著に抑制する作用は観察されなかった。

研究成果の概要(英文)：Many studies have suggested that type 2 diabetes is associated with an increased risk of several neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's diseases (PD). The ketogenic diet has been used for almost 100 years to treat refractory childhood epilepsy. It has also been studied as a potential therapy for other neurologic diseases, such as PD and AD. Hydroxycarboxylic acid receptor 2 (HCA2), also known as GPR109A, is a G protein-coupled anti-inflammatory receptor. It is present in macrophages, neutrophils and microglia. Beta-hydroxy butyrate (BHB) was identified as the physiological ligand of HCA2. BHB suppressed LPS-induced expression of IL-6 and IL-1 beta in mouse microglia BV-2 cells. The phosphorylation of Erk1/2 was inhibited by the treatment of BHB, but the activation of the NF-kappa B pathway was not significantly influenced.

研究分野：細胞生物学

キーワード：神経変性疾患 脂質メディエータ ミクログリア ケトン体

1. 研究開始当初の背景

日本人の糖尿病患者は境界型も含めると推定 2210 万人といわれ、現在も増加の一途を辿っている。そのほとんどを占める「2 型糖尿病」はインスリン分泌の低下とインスリン作用の障害(インスリン抵抗性)のふたつがその病態を形成し、近年の食生活の欧米化、特に高脂肪食と運動の減少による「肥満」が直接の原因のひとつと考えられているが、その分子機構については未だ不明な点が多い。一方、急速に高齢化が進む中でアルツハイマー病やパーキンソン病等の神経変性疾患は深刻な社会問題となっており、緊急かつ現実的な対応が求められている。

多くの臨床疫学研究から糖尿病が様々な神経変性疾患の後天的危険因子であることを示す研究結果が集積してきているが、その分子メカニズムには不明な点が多い。肥満状態における脂肪細胞を起源とする炎症が全身のインスリン抵抗性発現に深く関わっていることが明らかとなり、このことは神経変性疾患にみられる中枢性炎症との関連から大変興味深い。神経免疫担当細胞であるミクログリアの活性化は、A β の凝集体を除去するなど神経保護的作用をもたらすこともあれば、神経毒性を発揮することもある。Song らは TOLL 様受容体の一種、TLR4 の変異がミクログリアの活性化を阻害し A β の沈着を亢進させ、認知機能の低下をもたらすことを示した。Minoretti らは、TLR4 の遺伝子変異(ミスセンス変異)が、遅発性アルツハイマー病の発症に対して保護的に作用することを報告している。

ケトン体は糖尿病や飢餓時などに肝臓において産生され、脳にとって糖の代わりとなる唯一の代替エネルギーであることはよく知られている。ケトン体及びそれを増やすケトン食が、アルツハイマー病やパーキンソン病など神経変性疾患の改善に有効であることが示す報告が蓄積されてきている。

ヒドロキシ酪酸を基質とする受容体 HCA2 (GPR109A) の神経系における発現や機能についての知見は限られている。最近、HCA2 が神経変性疾患の新規治療標的となる可能性を示唆する報告がなされた。Wakade らはパーキンソン病患者のミクログリアで HCA2 の発現が増加していることを明らかにした。Rahman らはマクロファージにおける HCA2 の活性化が神経細胞死の保護に必要であることを示した。栄養素としての機能に加えて、生体の生理機能を調節する情報伝達分子としての脂質分子の役割に注目が集まってきている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ふたつの脂質メディエータ(ケトン体と長鎖脂肪酸)が、ミク

ログリア/マクロファージにおける免疫応答の調節にどのように関与するか、その免疫応答の制御はどのような分子機構で神経細胞死を抑制するか、を解明することである。

3. 研究の方法

ミクログリアにおけるヒドロキシ酪酸受容体 HCA2 の細胞内情報伝達系を解析する。水溶性ビタミンであるナイアシンの脂肪分解抑制作用が、ヒドロキシ酪酸の受容体 HCA2 の活性化によるものであることが明らかにされたのは 2005 年のことである。最近、HCA2 の癌細胞の増殖やマクロファージにおける免疫応答の調節に対する作用が報告されたが、その分子機構については不明な点が多い。情報伝達分子としてのケトン体の生理機能を明らかにするため、BV-2 細胞と RAW264.7 細胞を用いて、ミクログリアとマクロファージにおける HCA2 下流の細胞内情報伝達系をウェスタンブロットティング等により解析する。また、近年 GPCR の関わるシグナル伝達系においてその重要性が指摘されているアレスチンについて検証するため、RNA 干渉による影響についても調べる。

次にミクログリア/マクロファージにおける TLR4 刺激によるサイトカイン産生に対する HCA2 及び FABP の効果を検証する。Zandi-Nejad らはマクロファージを HCA2 のリガンドであるナイアシンで処理するとサイトカインの産生が抑制されることを報告したが、その分子機構・細胞内情報伝達系については詳細が明らかになっていない。HCA2 下流の情報伝達系についての知見に基づき、TLR4 と HCA2 のクロストークについて各種阻害剤等を用いて分子レベルで詳細に検討する。

最後に、神経変性疾患のモデル系を用いてグルタミン酸や A β が誘導する神経細胞死に対するミクログリアによる保護作用の分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

マウスミクログリア BV-2 細胞において、-HB はリポポリサッカライド(LPS)誘導性の IL-6 と IL-1 の mRNA 産生を抑制した。一方で、同じ炎症性サイトカインである TNF- α 産生に対して -HB は抑制効果を示さなかった。また、ウェスタンブロットティング解析により ERK1/2 のリン酸化などの MAP キナーゼ経路の活性化の抑制は観察されたが、NF- κ B 経路の活性化(I κ B の分解)を抑制する作用は観察されなかった。Gi の阻害剤である百日咳毒素により -HB の抗炎症効果が抑制されたことから、-HB は G タンパク質を通じて MAP キナーゼの活性化を抑制し、炎症性サイトカインの産生を抑制していることが示唆された。マクロファ

ージの免疫応答抑制に対する β -ヒドロキシ酪酸やナイアシンなどの HCA2 リガンドの作用についてもほぼ同様の結果が得られた。

神経細胞死に対するミクログリアの保護作用については明確な結論を見いだすことができなかった。

現在行われている代謝疾患などの慢性疾患に対する治療方策と、アルツハイマー病の発症に関連することとして、以下のよう な知見を得ている。

アミロイド タンパク質の繊維化は麻酔薬の曝露により亢進する。麻酔薬であるミダゾラム処理が神経細胞表面の GM1 ガングリオシドの発現と A β の繊維化を抑制すること、その作用は GABA 受容体を介して調節されていることを明らかにした。

血中コレステロール低下作用を有するスタチン類は脳内のアミロイド タンパク質の沈着を抑制する。ラットアストロサイトをこれらの薬剤で処理すると A β の分解に関わるネプリライシンの細胞外分泌が増加し、A β の分解が亢進することが明らかにした。

抗精神薬であるハロペリドールをアストロサイトに添加すると、GM1 ガングリオシドの発現が亢進すること、この作用は D2 受容体でなく α 1 受容体を介することを明らかにした。

<引用文献>

Aviles-Olmos, I. *et al.* Brain 136: 374-384, 2012.

Song, M. *et al.* J. Neuroinflammation 8:92, 2011.

Minoretti, P. *et al.* Neurosci. Lett. 391:147-149, 2006.

Wakade, C. *et al.* PLoS ONE 9: e109818, 2014.

Rahman M. *et al.* Nature Commun. 5: 3944-3949, 2014.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

Kasahara, R., Yamamoto, N., Suzuki, K. and Sobue, K.: The α 1 receptor regulates accumulation of GM1 ganglioside-enriched autophagosomes in astrocytes. Neuroscience 340, 176-187, 2017.
(査読 有, DOI:10.1016/j.neuroscience.2016.10.058)

Suzuki, K. and Kaneko-Kawano, T.: Biological roles and therapeutic potential of G protein-coupled receptors for free fatty acids and metabolic intermediates. J. Phys. Fitness Sports Med. 5(3), 213-227, 2016.
(査読 有, DOI:10.10.7600/jpfsm.5.213)

Yamamoto, N., Fujii, Y., Kasahara, R., Tania, M., Ohora, K., Ono, Y., Suzuki, K. and Sobue, K.: Simvastatin and atorvastatin facilitates amyloid β -protein degradation in extracellular spaces by increasing neprilysin secretion from astrocytes through activation of MAPK/Erk1/2 pathways. Glia 64(6), 952-962, 2016.
(査読 有, DOI:10.1002/glia.22974)

Kizaki, T., Sato, S., Shirato K., Sakurai, T., Ogasawara, J., Ozawa, T., Ohira, Y., Suzuki, K. and Ohno, H.: Effect of Circadian Rhythm on Clinical and Pathophysiological Conditions and Inflammation. Crit. Rev. Immunol. 35(4), 261-275, 2015.
(査読 有)

Kaneko-Kawano, T. and Suzuki, K.: Mechanical stress regulates gene expression via Rho/Rho-kinase signaling pathway. J. Phys. Fitness Sports Med. 4(1), 53-61 2015.
(査読 有, DOI:10.7600/jpfsm.4.53)

Yamamoto, N., Arima, H., Sugiura, T., Hirate, H., Kusama, N., Suzuki, K. and Sobue, K.: Midazolam inhibits the formation of amyloid fibrils and GM1 ganglioside-rich microdomains in presynaptic membranes through the gamma-aminobutyric acid A receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 447(4), 547-553, 2015.
(査読 有, DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.01.022)

[学会発表] (計 8 件)

宮下恵里花、中村鴻介、正木聡、鈴木健二: BDNF 受容体下流の情報伝達系に対する Necdin の制御 .フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー 2017

大出寧香、倉はるか、鈴木健二、正木聡: スプライシングレポーターを用いた PKM スプライシングスイッチの生理的意義

の解明．フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー 2017 年

山本直樹、谷田守、有馬 一、鈴木健二、
祖父江和哉：脂溶性スタチンはアストロ
サイト細胞表面膜のネプリライシン発
現を低下させる．日本薬学会第 136 年会
2016 年

山本直樹、谷田守、有馬 一、鈴木健二、
祖父江和哉：スタチンとアストロサイ
トのネプリライシン発現調節の検討．第 34
回日本認知症学会学術集会 2015 年

山本直樹、谷田守、大野陽子、笠原梨加、
鈴木健二、祖父江和哉：Leptin inhibits
expression of neprilysin in cultures
astrocytes．第 58 回日本神経化学会大
会 2015 年

河野貴子、鈴木健二：Rho-kinase による
ミオシン軽鎖のリン酸化制御システム
の解析．第 57 回日本平滑筋学会総会
2015 年

井上 恭，渡邊貴之，前田奈美，宮里文
野，河野貴子，鈴木健二：GPR120 の脂肪
細胞分化に対する影響の解析．日本生
化学会近畿支部会 2015 年

河野貴子，太田茜，槇峰希和子，山川
侑季乃，鈴木健二：血管透過性制御にお
けるミオシン軽鎖のリン酸化制御シ
ステムの解析．日本生化学会近畿支部
会 2015 年

〔図書〕（計 1 件）

鈴木健二：My 衛生薬学：テコム（東京）
176-203, 2017 年

6．研究組織

(1)研究代表者

鈴木 健二 (SUZUKI, Kenji)
立命館大学・薬学部・教授
研究者番号：10187726