

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07376

研究課題名(和文) 視神経変性に対するリポタンパク質の神経保護機構の解明

研究課題名(英文) The neuroprotective mechanism of lipoproteins for optic nerve degeneration.

研究代表者

林 秀樹 (Hideki, Hayashi)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：90508657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障は視神経が障害を受け視野欠損を生じる進行性の神経変性疾患である。研究代表者は以前の研究で、グリア細胞由来アポリポタンパク質E含有リポタンパク質(E-LP)の視神経保護効果に対しアルファ2マクログロブリン(a2M)が妨害因子として働くことを示した。本研究では、E-LPが網膜グリア細胞のa2M発現を抑制する機構を明らかにし、この妨害因子を減少させることで間接的にE-LPの視神経保護効果を発揮しやすい環境を作ることができる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、視覚障害原因疾患第1位の緑内障に対し、眼圧降下薬以外の治療薬の開発を目的としてグリア細胞由来アポリポタンパク質E含有リポタンパク質(E-LP)の視神経保護効果に着目した。以前の研究で明らかにしたE-LPの直接的な視神経保護効果に加え、本研究結果ではE-LPがグリア細胞に対し妨害因子を抑制することで視神経保護効果を発揮しやすい環境を整えている可能性を示した。本成果を発展させることによりE-LPの視神経保護機構を利用した新たな緑内障治療薬の開発研究が進展することを期待する。

研究成果の概要(英文)：Glaucoma is a progressive neurodegenerative disease in which the optic nerve is damaged and visual field defect is induced. In the previous study, we showed that alpha 2 macroglobulin (a2M) acts as an interfering factor in the optic nerve protective effect of glia-derived apolipoprotein E-containing lipoproteins (E-LP). In this study, we elucidated the mechanism by which E-LP suppresses a2M expression in retinal glia, and it is possible to provide an environment in which E-LP can indirectly exert the optic nerve protective effect by reducing this interfering factor a2M.

研究分野：神経化学

キーワード：リポタンパク質 神経保護 緑内障 グリア細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障は視神経が障害を受け視野欠損を生じる進行性の神経変性疾患であり、日本の中途失明原因疾患の第一位、世界の第二位である。直接的な発症原因は明らかではなく、多因子性の疾患と考えられている。本疾患に対し、臨床で効果が証明されている唯一の治療法は眼圧下降であるが、日本の緑内障患者の70%以上は正常眼圧緑内障のため、眼圧調節に頼らない治療薬の開発が切望されている。これまでの基礎研究の成果に基づき視神経保護薬としてカルシウム拮抗薬やグルタミン酸受容体阻害薬の臨床試験が行われたが、顕著な保護効果は認められなかった。

血液脳(網膜)関門によって末梢循環と隔てられた中枢神経系では、主にグリア細胞が細胞外脂質環境の調節や神経細胞への脂質の供給を行っている。神経障害時には周辺のグリア細胞が活性化され、グリア細胞由来アポリポタンパク質(アポ)E含有リポタンパク質(E-LP)の放出量が劇的に増加する。研究代表者は、この反応が生体の恒常性維持のための自己防衛機構であると考え研究を行った。その結果、E-LPが網膜神経節細胞の軸索損傷後の再伸長を促進すること(Hayashi et al., J Biol Chem 2004) また低密度リポタンパク質受容体ファミリーの一つである低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1(LRP1)を介して神経保護シグナルを誘導すること(Hayashi et al., J Neurosci 2007, J Biol Chem 2009) さらにグルタミン酸誘発性のカルシウム依存性神経細胞死を抑制すること(Hayashi et al., J Biol Chem 2012)を明らかにした。

2-マクログロブリン(a2M)は血清中に高濃度に存在するプロテアーゼ阻害タンパク質であり、E-LPと同様にLRP1のリガンドとして働く。緑内障患者の前房水中においてa2M含量が著しく上昇すると報告されているが、その役割は未解明である。研究代表者による予備実験で、a2MはE-LPのLRP1を介する神経保護効果を競合的に阻害し、初代培養網膜グリア細胞のa2M発現量はE-LP添加により減少することが示された。

上記よりE-LPはLRP1を介して神経保護シグナルを誘導するとともにグルタミン酸誘発性のカルシウム過剰流入を抑制するだけでなく、E-LPの動きを妨害するa2Mの発現を抑制することで効果的に視神経保護効果を発揮できる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者が明らかにしたグリア細胞由来の生体内神経保護分子であるE-LPと、神経保護妨害因子として働くa2Mの網膜グリア細胞における視神経変性時の役割に注目し、初代培養網膜神経節細胞、網膜グリア細胞および緑内障モデル動物を用いて、LRP1を介する視神経保護機構を解明することを目的とする。

本研究計画で解析するE-LPによる神経保護機構は、LRP1を介して直接的に保護シグナルを刺激するだけでなく、グリア細胞由来の神経保護妨害因子であるa2Mの発現を抑制することで間接的にも保護効果を促進するという全く新しい仕組みであり、発症機構が明らかでない緑内障の新規治療薬として期待できる。

3. 研究の方法

(1) 人工再構成E-LPの作製

ヒト組換えアポE、コレステロール、ホスファチジルコリンを1:10:100(モル比)で含む人工再構成E-LPを作製した。コレステロールとホスファチジルコリンをクロロホルムに溶解後、窒素ガス下で乾燥させ、トリス緩衝液に懸濁した。コール酸ナトリウムを加えたのち、ヒト組換えアポEを加えた。バイオビーズ(Bio-Rad)を添加し、コール酸を除去することで、再構成E-LPを形成した。バイオビーズをシリンジフィルターにより除去後、4℃保存した。

(2) E-LPの単離

1.1 g/mL、1.2 g/mL、1.3 g/mL ショ糖溶液を積層し、密度勾配を作製した。4℃保存した人工再構成E-LPを含む溶液をショ糖密度勾配の最上層に積層した。高密度リポタンパク質と同等の比重のE-LPを単離するため、ショ糖密度勾配超遠心法により、160,000 x g、48時間遠心した。12画分に画し、各画分の一部を使用したイムノプロットにより、アポEの分布を確認した。12画分中の高密度リポタンパク質画分のうちアポE含有量の多い3画分を回収し、限外濾過により濃縮後、実験に使用した。

(3) ラット緑内障モデルの作製

イソフルランによる吸入麻酔下、ラットの硝子体内に視神経変性を誘導するN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA) 4 µL (20 nmol) を注射し、緑内障モデルを作製した。硝子体内投与3日後

および7日後の網膜を採取した。視神経変性の評価は網膜神経節細胞のマーカータンパク質である Brn-3a のイムノプロットにより行った。また NMDA 投与時に E-LP を硝子体内投与し、視神経障害・保護時の前房水および網膜の a2M 含量や a2M mRNA 発現量の変化を解析した。また *in vitro* および *in vivo* 研究の結果、重要と考えられる細胞内シグナル分子を解析した。

(4) 網膜神経節細胞の逆行性蛍光標識

イソフルランで麻酔したラットを脳固定器 (NARISHIGE) に固定し、ラムダ縫合と矢状縫合の交点から側方に約 0.5 mm の位置に直径 2mm の穴を開けた。4% Fluorogold (FG) を含む GELFORM を上丘の表面に置き、bone wax を用いて頭蓋骨の穴を塞いだ後、縫合した。1週間後、眼球を取り出し、4カ所(耳側、鼻側、上、下)に切り込みをいれ、網膜フラットマウントを作製した。解析はフラットマウントの中心から上下左右に 2000 μ m 移動した縦 750 μ m \times 横 1000 μ m 範囲の画像中の細胞数を MetaMorph ソフトウェアによりカウントした。

(5) 網膜グリア細胞の初代培養

生後2日目から4日目の新生児 C57BL/6J マウスを使用した。マウス網膜を単離し、トリプシンで 37、45 分間処理後、パストールピペットを用いて細胞懸濁液を作製した。細胞懸濁液を 10% ウシ胎児血清入りの DMEM 培養液で約 1 週間培養後、細胞を播き変え、さらに約 1 週間培養後実験に使用した。

(6) 初代培養網膜グリア細胞の免疫蛍光染色

約 2 週間培養した網膜グリア細胞をリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄後、4% パラホルムアルデヒドで 10 分間固定した。PBS で 15 分間洗浄し、ブロッキング液 (0.1% Tween20 / PBS / 5% BSA / 10% serum) で 60 分間ブロッキングした。なお、ブロッキング液内の血清は使用する二次抗体の種類により適切なものを選択した。ブロッキング後は PBS で 15 分間洗浄し、ブロッキング液で希釈した一次抗体を用いて 4 時間で一晩インキュベーションした。翌日、PBS で 15 分間洗浄した後、一次抗体と同様の希釈方法を用いて 500 倍に希釈した二次抗体を用いて 60 分間反応させた。その後 PBS で 15 分洗浄し、PBS で 1000 倍に希釈した Hoechst33342 を室温で 10 分間反応させた後、再度 PBS で洗浄を行い、封入した。

(7) 初代培養網膜グリア細胞に対する E-LP の処理

初代培養網膜グリア細胞における E-LP の a2M 発現に及ぼす影響を解析した。予備実験の結果から E-LP の a2M 発現抑制効果が観察されていたが、当時、a2M 発現抑制効果を担う受容体は特定できていなかった。ゆえに阻害剤 (receptor-associated protein) や受容体の siRNA を用いて、受容体の関与の検討と特定を行った。また発現抑制に関わる細胞内シグナルの変化を解析した。

4. 研究成果

(1) NMDA 誘発性ラット緑内障モデルの視神経変性に対する E-LP の保護効果

ラット硝子体内に NMDA を 20 nmol 投与することで視神経変性を誘導し、3日後および7日後に網膜を回収した。また同時に E-LP を硝子体内投与することで視神経を保護できるか検討したところ、イムノプロット解析において網膜神経節細胞マーカーである Brn3a の減少を E-LP 投与が強力に抑制することを明らかにした。また NMDA の硝子体内投与が、細胞死誘導の指標である cleaved caspase 3 の著しい増加を誘発し、この増加に対し E-LP が抑制することを示した。さらに網膜神経節細胞の逆行性蛍光標識による視神経変性の評価でも同様に、NMDA 硝子体内投与による FG 陽性網膜神経節細胞の減少が、E-LP 投与により抑制されることが示された。これらの結果から NMDA 誘発性ラット緑内障モデルの確立の成功と、NMDA 誘発性視神経変性に対し E-LP の硝子体内投与が保護効果を発揮することが示された。

(2) NMDA 誘発性ラット緑内障モデルの前房水中 a2M 含量に対する E-LP の効果

上記(1)のラット緑内障モデルに PBS または E-LP を硝子体内投与し、3日後の前房水を採取した。この前房水中の a2M 含量をイムノプロット解析したところ、PBS 処置群と比較して NMDA 処置群で a2M の著しい増加が確認された。また、この増加に対し E-LP 投与が a2M 含量を強力に抑制することが示された。

(3) 初代培養網膜グリア細胞の a2M 発現に対する E-LP の効果

上記(2)で NMDA 硝子体内投与により増加した a2M 発現量を E-LP 投与が抑制したが、この現象が E-LP の神経保護効果に由来するのか、または網膜グリア細胞に直接作用しているのかを検討するため、網膜グリア細胞の初代培養を行い、E-LP 処置による a2M 発現変化を解析した。その結果、網膜グリア細胞の a2M 発現量は E-LP 処置の濃度依存的に減少することが明らかになった。

(4) E-LP による初代培養網膜グリア細胞の LRP1 を介した a2M 発現抑制

網膜グリア細胞の E-LP による a2M 発現抑制機構が受容体を介しているかを検討するため、

LRP1 siRNA を用いたノックダウン実験を行った。その結果、LRP1 のノックダウンにより E-LP による a2M の発現抑制効果が減弱した。このことから E-LP が網膜グリア細胞の LRP1 を介して a2M 発現を抑制することが明らかになった。

(5) E-LP による初代培養網膜グリア細胞の細胞内シグナル分子の変化

網膜グリア細胞の E-LP 処置による細胞内シグナル分子の変化を検討するために、初代培養網膜グリア細胞に E-LP を処置し、4 時間後の細胞を回収した。回収したサンプルをイムノプロット法により解析し、各シグナル分子のリン酸化レベルの変化を検出した。解析した分子は、Akt、Erk、GSK3、CREB、JNK、p38 および STAT3 であった。その結果、PBS 処置群に対して E-LP 処置群の STAT3 リン酸化レベルが有意に増加した。このことから LRP1 の下流で STAT3 が a2M 発現調節に関わっている可能性が推察された。

(6) E-LP の網膜グリア細胞 a2M 発現抑制に対する STAT3 阻害薬の効果

上記 (5) の結果を受け、STAT3 阻害薬である Stattic を用いて、E-LP の網膜グリア細胞 a2M 発現抑制効果に対する影響を検討した。その結果、Stattic が E-LP の網膜グリア細胞 a2M 発現抑制効果を阻害した。このことから網膜グリア細胞において、LRP1 の下流で STAT3 が a2M 発現調節を担っていることが示唆された。

以上のことから本研究で NMDA 誘発性ラット緑内障モデルを確立し、E-LP による視神経保護効果を明らかにした。またヒト緑内障患者で観察される前房水中の a2M 含量の増加を、同モデルで確認し、この増加に対して E-LP が抑制効果を発揮することを示した。さらに初代培養網膜グリア細胞に対し E-LP が LRP1 を介して STAT3 を活性化し a2M 発現量を抑制する機構を明らかにした。A2M が E-LP の視神経保護効果を競合的に妨害するという以前の結果を考慮すると、本研究の結果は E-LP による網膜グリア細胞を介した妨害因子抑制による間接的な視神経保護効果を示す有用な成果であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamada Mariko, Hayashi Hideki, Suzuki Kaori, Sato Shoko, Inoue Daisuke, Iwatani Yui, Ohata Meiko, Yuan Bo, Takagi Norio	4. 巻 9
2. 論文標題 Furin-mediated cleavage of LRP1 and increase in ICD of LRP1 after cerebral ischemia and after exposure of cultured neurons to NMDA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11782
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-48279-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 H. Hayashi, M. Mori, M. Yamada, B. Yuan, N. Takagi
2. 発表標題 Neuroprotective roles of apolipoprotein E containing lipoproteins in neurons and glia of retina
3. 学会等名 Neuroscience 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹村映美、林 秀樹、向垣内千早、袁 博、高木 教夫
2. 発表標題 アポE含有リポタンパク質による初代培養網膜グリア細胞の 2マクログロブリン発現調節機構の解析
3. 学会等名 第140回 日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村唯、堀之北一朗、林 秀樹、高木 教夫
2. 発表標題 虚血性脳神経障害時のLRP1プロセッシングと神経細胞死の関連
3. 学会等名 第140回 日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 秀樹、森 みすず、原嶋美奈、橋爪達哉、向垣内千早、山田まりこ、袁 博、高木教夫
2. 発表標題 網膜のリポタンパク質受容体LRP1と視神経生存
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideki Hayashi, Misuzu Mori, Mariko Yamada, Bo Yuan, Norio Takagi
2. 発表標題 Apo E-containing lipoproteins protect retinal ganglion cells from glaucomatous optic neuropathy via an LRP1-mediated pathway
3. 学会等名 59th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mariko Yamada, Hideki Hayashi, Yui Iwatani, Kaori Suzuki, Bo Yuan, Norio Takagi
2. 発表標題 A possible neuroprotective mechanism of preventing LRP1 cleavage after ischemic brain damage
3. 学会等名 59th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideki Hayashi, Mariko Yamada, Misuzu Mori, Mio Kobayashi, Hikaru Koide, Takuya Kojima, Chihaya Mukaigaito, Bo Yuan, Norio Takagi
2. 発表標題 Protective effects of apolipoprotein E-containing lipoproteins against glaucomatous optic neuropathy
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideki Hayashi, Misuzu Mori, Mariko Yamada, Bo Yuan, Norio Takagi
2. 発表標題 Roles of low density lipoprotein receptor-related protein 1 ligands in glaucomatous optic neuropathy
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 秀樹、森 みすず、山田 まりこ、袁 博、高木 教夫
2. 発表標題 ラット緑内障モデルのアポE含有リポタンパク質による視神経保護と 2-マクログロブリンの働き
3. 学会等名 第60回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田 まりこ、林 秀樹、井上 大輔、大畑 芽衣子、松嶋 菜穂子、袁 博、高木 教夫
2. 発表標題 虚血性脳神経障害時の LRP1 プロセッシングと神経生存
3. 学会等名 第60回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 秀樹、高木教夫
2. 発表標題 リポタンパク質受容体LRP1シグナルによる視神経保護
3. 学会等名 第63回 日本神経化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 秀樹、高木教夫
2. 発表標題 グリア細胞由来リポタンパク質のLRP1を介した神経保護と緑内障治療への応用
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京薬科大学応用生化学教室ホームページ https://www.ps.toyaku.ac.jp/ouyoseika/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------