

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19880025
 研究課題名（和文） 脳内でのポリアミンの生理学的機能—グリア細胞機能調節因子としての可能性—
 研究課題名（英文） Physiological function of polyamines in brain — possible regulating factor of glial function —

研究代表者
 高野 桂 (TAKANO KATSURA)
 大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
 研究者番号：50453139

研究成果の概要：脳内には神経細胞以外に補助細胞であるグリア細胞が存在し、その活性変化は神経変性疾患発症メカニズムに関与することが指摘されている。グリア細胞の1つであるアストロサイトにおいて、細胞活性化刺激を行うことにより、神経変性疾患の凝集体形成に関わる酵素であるトランスグルタミナーゼの発現上昇が認められた。したがって、グリア細胞の活性化にトランスグルタミナーゼが関与し、活性化したグリア細胞において発現増加したトランスグルタミナーゼが神経変性疾患の原因となる可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,370,000	0	1,370,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：獣医生理学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学，基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：ミクログリア，アストロサイト，神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系は、主に神経細胞とグリア細胞により構築されるが、神経細胞が相互のネットワーク形成を通じて直接的に神経情報伝達に関与するのに対して、グリア細胞は神経細胞の物理的保護や生存性決定、あるいは伝達物質前駆体の供給等に中心的役割を演じると理解される。現在のところ、グリア細胞はアストロサイト、ミクログリアおよびオリゴデンドロサイトに分類されるが、グリア細胞の活性変化は、脳虚血やアルツハイマー病等の神経変性疾患発症メカニズムに深く関与することが指摘されている。一方、ポリア

ミン類（プトレッシン、スペルミジン、スペルミン）は、細胞核内では細胞増殖や細胞分化を促進する因子として機能するが、細胞膜上では脳内グルタメイト受容体に対する強い効果を有する。例えば、NMDA 受容体チャネル開口の促進作用や、AMPA 受容体チャネル遮断作用などが知られており、特に NMDA 受容体に対するアゴニスト作用は、ポリアミン類の神経興奮毒性を強く示唆するものである。事実、ポリアミン類は神経細胞の異常興奮や、あるいは一過性虚血に伴い細胞外に放出されることが知られている。また、ポリアミン類は酵素的に代謝されて毒性の高いアルデ

ヒド類や活性酸素種を生成するため、細胞外ポリアミン濃度上昇が神経細胞傷害を引き起こす可能性も示唆される。

これまでポリアミン類に関する研究は、中枢神経系では特に神経細胞に対する影響が多く検討されているが、グリア細胞に対する検討はあまりなされていない。我々は、グリア細胞におけるポリアミンの影響に関する研究として、培養液中に、ある特定のポリアミン（スペルミジン、スペルミン）を添加することにより、アポトーシス経路を介したミクログリアの細胞死が誘導されることを報告している。また、その細胞死には、ポリアミン代謝産物のうち、過酸化水素よりもアルデヒド類であるアクロレインの関与が大きいことや、培養アストロサイトでは、ポリアミンおよびアクロレインによる細胞死に対してミクログリアよりも抵抗性を示すことも見出しており、ポリアミンがグリア細胞の活性制御に関わるのかもしれない。ポリアミンおよびポリアミン代謝産物によって誘導される細胞死に対して、培養ミクログリアとアストロサイトが明確に異なる感受性を示すメカニズムについては、さらなる解析が必要である。

このように、中枢神経系における細胞内外のポリアミン濃度の制御は、生理学的にも病理学的にも重要であると考えられる。実際、脳梗塞患者の脳内では早期にポリアミン代謝酵素の活性が上昇することやポリアミン代謝産物のひとつであるアクロレイン濃度の上昇が報告されており、脳梗塞の診断への応用が期待されている。しかしながら、細胞内外のポリアミン濃度調節を担うポリアミントランスポーターは、様々な細胞で存在が報告されているにも関わらず、中枢神経系ではラット大脳皮質スライスやシナプトソームなどを用いた研究がほとんどで、特定の細胞に限局した十分な検討がなされておらず、その特性もほとんど知られていないのが現状である。

一方、培養液中に添加したポリアミンによる細胞死には、トランスグルタミナーゼが関与していることが示唆されている。トランスグルタミナーゼは、蛋白質の架橋形成を行う酵素であり生体内において様々な生理活性を持つが、中でも組織型トランスグルタミナーゼ（トランスグルタミナーゼ2; TG2）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において脳内に高発現することや、これらの神経変性疾患における凝集体の形成に関与する可能性が報告されている。病態時におけるグリア細胞での発現上昇の可能性も指摘されており、生理学的および病理学的状況下でのグリア細胞の機能調節メカニズムを解析するには、グリア細胞におけるトランスグルタミナーゼの機能解明も重要

な課題である。

2. 研究の目的

本研究目的は、グリア細胞におけるポリアミンの生理学的重要性を検討し、この研究成果を通じて、その生理学的および治療学的意義を追及することである。

研究背景で述べたように、細胞増殖や細胞分化に必須の因子であるポリアミンは、中枢神経系の中でも、神経細胞に対する影響の検討が多く報告されており、本研究では特にグリア細胞に着目したポリアミンの生理学的重要性について詳細な解析を行う。これまでに我々が見出している、培養液中に添加したポリアミンによる細胞死誘導に関連し、培養アストロサイトとミクログリアにおいて、ポリアミンおよびポリアミン代謝産物に対する感受性の差異が起こるメカニズムについて検討する。また、病態時におけるポリアミン濃度上昇メカニズム解明のため、グリア細胞におけるポリアミン輸送活性の解析を行う。さらに、脳虚血やパーキンソン病、アルツハイマー病等の神経変性疾患においては、グリア細胞活性化の関与が指摘されている。一方、蛋白質の架橋形成を触媒する酵素であるトランスグルタミナーゼは、ポリアミン誘導性細胞死への関与も示唆されており、また、神経変性疾患患者の脳内で高発現することも報告されていることから、グリア細胞におけるトランスグルタミナーゼの機能を検討し、生理的および病理的状況下での変化と役割を検討する。

中枢神経系の中でも、特にグリア細胞に着目して、その活性調節および機能変化を解析することにより、神経変性疾患における病態発現メカニズムの解明、および神経細胞障害を防御する新たな治療理論構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) グリア細胞におけるトランスグルタミナーゼの機能を解明するため、培養アストロサイトとミクログリアを用いて、RT-PCR法によるトランスグルタミナーゼのmRNA発現、およびウェスタンブロッティング法による蛋白質発現の解析を行う。ピオチンまたは蛍光標識したトランスグルタミナーゼ基質を細胞内に取り込ませ、電気泳動または蛍光顕微鏡での観察を行うことにより、細胞のトランスグルタミナーゼ活性を測定する。また、グリア細胞において細胞活性化によく用いられるグラム陰性細菌の外膜成分、リポポリサッカライド(LPS)などで細胞を刺激し、その後のトランスグルタミナーゼの発現変化や活性変化を解析することにより、生理学的あるいは病理学的なグリア細胞におけるトランスグルタミナーゼの機能を検討する。

(2) 培養アストロサイトとミクログリアを

用いて、ポリアミンおよびポリアミン代謝産物に対する反応を解析する。細胞間での感受性の差異を含めた細胞死メカニズム解明に向け、RT-PCR法などを用いて、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)等の酸化ストレスに関連した変動因子の検討を行う。また、細胞内の主要な抗酸化物質であるグルタチオンの定量や、SODの活性測定などを行う。

(3) グリア細胞におけるポリアミントランスポーターの機能解析を行うため、放射標識したポリアミンを用いて、培養細胞での取り込み実験を行うことにより、ポリアミン輸送活性を評価し、培養アストロサイトとミクログリアで、輸送活性やイオン要求性等の比較検討を行う。

4. 研究成果

(1) 中枢神経系は、主に神経細胞とグリア細胞により構築されており、グリア細胞の活性変化は、脳虚血やアルツハイマー病等の神経変性疾患発症メカニズムに深く関与することが指摘されている。一方、蛋白質の架橋形成を行う酵素であるトランスグルタミナーゼは、神経変性疾患患者の脳内において高発現することが知られており、培養マクロファージにおける炎症反応に関与することも示唆されている。培養アストロサイトを、細胞活性化剤であるリポポリサッカライド(LPS)で刺激し、トランスグルタミナーゼの発現変化を解析したところ、LPSの濃度依存的にトランスグルタミナーゼの発現増加が認められた。細胞活性化の指標として一酸化窒素(NO)産生を評価したところ、LPS刺激により誘導型NO合成酵素であるiNOSの発現およびNO産生が認められた。

また、LPS刺激によるトランスグルタミナーゼの発現誘導メカニズムを解析するため、培養アストロサイトにおいて、LPSと同時に転写因子NF- κ Bの阻害剤である ammonium pyrrolidine-1-carbodithioate (APDC) を添加し、24時間後のトランスグルタミナーゼの蛋白質発現を検出した。その結果、LPSによって誘導されるトランスグルタミナーゼの発現増加が抑制された。したがって、培養アストロサイトにおいて、LPS刺激によって誘導されるトランスグルタミナーゼの発現増加は、NF- κ Bを介することが示唆された。同様に、LPS刺激によるiNOSの発現およびNO産生もまたAPDCによって抑制されたことから、培養アストロサイトにおけるNO産生もNF- κ Bを介すると考えられる。

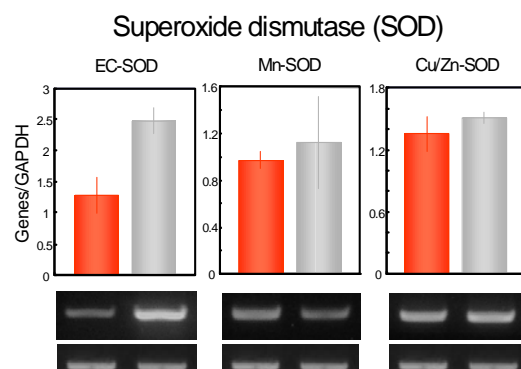
次に、抗酸化作用を持つことが知られているピルビン酸の誘導體、ピルビン酸エチルをLPSと同時に添加し、トランスグルタミナーゼとiNOSの発現およびNO産生を評価した。その結果、ピルビン酸エチルによっても、これらの誘導が抑制されたことから、LPS刺激

によるトランスグルタミナーゼ誘導およびNO産生には、細胞内の酸化ストレスが関与している可能性が示唆される。

さらに、培養アストロサイトにおいて、トランスグルタミナーゼの阻害剤であるシスタミンをLPSと同時に添加しNO産生を測定したところ、LPSによるiNOS発現誘導およびNO産生が抑制された。したがって、グリア細胞の活性化にトランスグルタミナーゼが関与している可能性が示唆されるとともに、活性化したグリア細胞において発現増加したトランスグルタミナーゼが神経変性疾患の原因となっている可能性が考えられる。

(2) これまで述べてきたように、我々はグリア細胞におけるポリアミンの影響に関する研究として、培養液中にポリアミンを添加することにより、ミクログリアの細胞死が誘導されることを明らかにした。また、その細胞死には、ポリアミン代謝産物のうち、過酸化水素よりもアルデヒド類であるアクロレインの関与が大きいことや、培養アストロサイトでは、ポリアミンおよびアクロレインによる細胞死に対してミクログリアよりも抵抗性を示すことも見出しており、ポリアミンがグリア細胞の活性制御に関わるのかもしれない。

さらに、ポリアミンによる培養ミクログリアの細胞死は、抗酸化剤である還元型グルタチオンやN-アセチルシステインによって抑制されたことから、酸化ストレスが関与していると考えられる。そこで、培養アストロサイトとミクログリアにおけるポリアミンおよびアクロレインに対する感受性の差異に関して、活性酸素の除去に働く酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)のmRNA発現を両細胞で比較したところ、Mn-SOD、Cu/Zn-SOD、EC-SODという3種類のSODのうち、EC-SODの発現が、ミクログリアに比べ、アストロサイトにおいて高かった(下図)。



を両細胞で比較したところ、ミクログリアに比べアストロサイトのほうが高い値を示したことから、培養アストロサイトとミクログリアにおけるポリアミン感受性の差異に、酸化ストレスに対する抵抗性の差が関与している可能性が推察される。

(3) 病態時における脳内でのポリアミン濃度上昇メカニズムを検討するため、培養アストロサイトとミクログリアを用いて、ポリアミン輸送活性を測定したところ、両細胞ともにポリアミン取り込み活性が観察され、蛋白質あたり活性では、有意な差は認められなかった。また、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法を用いて、培養液中に放出されるポリアミン量の測定を行ったところ、培養アストロサイトでは、高濃度KCl刺激によりポリアミンの細胞外放出が観察された。しかしながら、培養ミクログリアでは検出できなかった。したがって、病態時における脳内ポリアミン濃度上昇に、アストロサイトからの放出が関与する可能性が示唆される。

本研究の結果から、神経変性疾患におけるグリア細胞の活性化にはトランスグルタミナーゼが関与している可能性が示唆される。グリア細胞の活性化は、NOや炎症性サイトカインなどの細胞傷害物質を放出することにより、神経細胞死を誘導する可能性がある。アストロサイトから放出されるポリアミンは、神経細胞に対する傷害を引き起こす可能性も考えられるが、異常に活性化したグリア細胞を抑制することにより、脳内のバランスを維持する役割を果たす可能性が示唆される。一方、トランスグルタミナーゼは蛋白質の架橋形成を触媒する酵素であり、神経変性疾患の病理学的特徴である凝集体形成に関与することが推察されている。以上のことから、グリア細胞におけるトランスグルタミナーゼを制御することは、神経細胞障害の防御に重要であり、治療薬のターゲットとなり得る。グリア細胞において発現増加したトランスグルタミナーゼが実際に細胞外に放出されるかどうか、凝集体形成、神経細胞障害を引き起こすかどうかについては今後の検討課題である。

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 2 件)

- ① Hikari Miura, Katsura Takano, Yasuko Kitao, Satoshi Hibino, Tominari Choshi, Rika Murakami, Hiroto Suzuki, Masashi Yamada, Satoshi Ogawa, Osamu Hori. A carbazole derivative protects cells against endoplasmic reticulum (ER) stress and glutathione depletion. *Journal of Pharmacological*

Sciences, 108; 164-171. 2008. 査読有。

- ② Akiko Motoyoshi, Hidemitsu Nakajima, Katsura Takano, Mitsuaki Moriyama, Yukiko Kannan, Yoichi Nakamura. Effects of Amphotericin B on the expression of neurotoxic and neurotrophic factors in cultured microglia. *Neurochemistry International*, 52; 1290-1296. 2008. 査読有。

[学会発表] (計 3 件)

- ① 高野桂、白岩謙介、森山光章、中村洋一. LPS-induced transglutaminase 2 expression and the involvement of NO production in cultured astrocytes. 第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 16-18 日、パシフィコ横浜。
- ② 高野桂、白岩謙介、森山光章、中村洋一. LPS-induced transglutaminase 2 expression and the involvement of NO production in rat brain astrocyte. 第 51 回日本神経化学学会大会、2008 年 9 月 11-13 日、富山国際会議場。
- ③ 高野桂、中村洋一. 血清存在下でのポリアミンによる培養ミクログリアの細胞死誘導. 第 12 回グリア研究会、2007 年 11 月 17 日、名古屋大学。

[その他]

- (1) 大阪府立大学
教員活動情報データベース検索 ;
<http://gweb.acs.osakafu-u.ac.jp:7780/kyoinkensaku/>
- (2) 学会発表プロシーディング
① Katsura Takano, Kensuke Shiraiwa, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura. LPS-induced transglutaminase 2 expression and the involvement of NO production in cultured astrocytes. *Journal of Pharmacological Sciences*, 109, Suppl. 1; 124P. 2009.
- ② Katsura Takano, Kensuke Shiraiwa, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura. LPS-induced transglutaminase 2 expression and the involvement of NO production in rat brain astrocyte. *神経化学(Bulletin of the Japanese Society for Neurochemistry)*, 47 (No. 2, 3); 262. 2008.
- ③ 高野桂、中村洋一. 血清存在下でのポリアミンによる培養ミクログリアの細胞死誘導. 第 12 回グリア研究会 プログラム, 12. 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 桂 (TAKANO KATSURA)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号 : 50453139