

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07322

研究課題名(和文) 遅発性神経細胞死を抑制する新規脳血管疾患治療薬の基盤開発

研究課題名(英文) Developing novel therapeutic strategies for cerebrovascular disease by delayed neuronal death inhibition

研究代表者

塚原 完 (Tsukahara, Tamotsu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：00529943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳海馬におけるミクログリアの活性化は神経炎症を引き起こし、神経細胞傷害に関与する可能性が示され、神経変性疾患の発症機序におけるミクログリア細胞の役割が注目されている。我々は神経機能性脂質の一つである環状ホスファチジン酸(cPA)の代謝安定体である2-カルバcPAに対するミクログリア結合タンパク質を同定した。nanoLC-MS/MS質量分析により明らかにされたタンパク質はアデニンヌクレオチド交換輸送体(ANT2)と呼ばれるミトコンドリア関連タンパク質であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身における慢性炎症は、脳内炎症を誘発し、認知機能を低下させる。これらの過剰な炎症作用がcPAにより抑制的に制御され、神経細胞死抑制効果をもたらすことを明らかにした。脳における免疫細胞であるミクログリアの活性化により引き起こされる脳内炎症が、周辺の神経細胞を損傷させ、認知機能を低下させることを我々は予想している。今回同定した新規標的分子は、 γ -シヌクレインの凝集・蓄積などにも関与することが報告されていることから、cPAによる神経細胞傷害抑制作用がパーキンソン病やレビー小体型認知症の予防・治療薬への開発へもつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Using metabolically stabilized cPA carba-derivative (2ccPA)-immobilized magnetic beads, we identified adenine nucleotide translocase 2 (ANT2) as a 2ccPA-interacting protein in microglial cells. 2ccPA was tested for its ability to inhibit apoptosis caused by phenylarsine oxide in microglial cells. This damage was significantly improved upon 2ccPA treatment, along with cell proliferation, apoptosis, reactive oxygen species production, and intracellular ATP levels. This is the first report to suggest the direct binding of 2ccPA to ANT2 in microglial cells and provides evidence for a new benefit of 2ccPA in protecting microglial cells from apoptotic death induced by the ANT2-mediated signaling pathway.

研究分野：脂質生化学

キーワード：炎症 ミクログリア 環状ホスファチジン酸 細胞死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

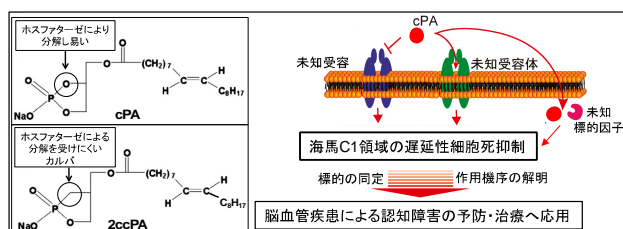
本研究は、脳血管疾患の新たなメカニズムを解明するために、海馬の免疫担当細胞であるミクログリアにおける環状ホスファチジン酸 (cPA) の新規シグナル経路を明らかにする。cPA は、海馬において神経突起伸張を促進し、虚血が引き起こす遅発性神経細胞死を抑制するが、受容体を含めた作用機序は未だ解明されていない。cPA は LPA と受容体を共有するが、一部対照的な作用を示し、特に海馬への作用は cPA 特有である。これは、海馬領域に cPA の標的タンパク質が存在し、特有の作用を誘導している可能性を示唆するものである。そこで本研究は、海馬の免疫担当細胞であるミクログリアから cPA に作用する標的タンパク質 (受容体) を cPA 固定化ビーズで単離・同定し、シグナル経路を含めた機能解析を行い、細胞死に関与する責任分子を同定する。さらに責任分子に対する創薬スクリーニングを展開し、リード化合物については、その有用性を検証する。最終的には脳血管疾患の新規治療法へと発展し得る創薬の開発に貢献することを目標とする。

2. 研究の目的

本研究は、海馬の免疫担当細胞であるミクログリアに存在する環状ホスファチジン酸 (cPA) の標的タンパク質を同定し、その機能解析及び cPA を介した詳細なシグナル経路を明らかにする。さらに脳血管疾患の予防・治療につながる創薬開発へ橋渡しをすることを目的とする。生理活性脂質の多くは、刺激に応じて産生され速やかに代謝される。また、遺伝子の直接産物ではないため研究が困難な分野である。本研究では、cPA と同等以上の生理活性を示す誘導体 2 カルバ cPA (2ccPA) を磁性粒子に固定し、標的タンパク質を探索する。これにより効率的に cPA の標的を同定できる可能性が高い。また、従来は既知標的分子の配列を基にホモログ検索で標的探索が行われてきたが、本研究は配列に捉われない新規な cPA の受容体または標的分子の発見に繋がる点にも特色がある。加えて、新しい神経細胞死抑制のメカニズムに基づいて予防・治療法の開発を行おうとするアイデアは独自性が高い。神経細胞死を抑制する責任分子の同定は、脳血管疾患の制御機構の理解を深める大きな手掛かりになる。加えて、新規の予防法や治療薬開発の可能性を広げる意味において、医学・薬学分野への大きな波及効果が期待され、社会貢献ができる研究である。

3. 研究の方法

環状ホスファチジン酸 (cPA) の構造類似体 LPA と相互作用を持つタンパク質を LPA 結合型のビーズで単離・同定に成功しており (FEBS Open Bio, 2014)、これを応用して cPA 結合型ビーズを用いることで、cPA 特異的に作用する海馬の免疫担当細胞であるミクログリア由来タンパク質を単離・同定することが可能となり細胞死抑制に重要な作用機序の解明につながると考えた。



cPA の環状部分は活性に重要な構造であるが、ホスファターゼ分解を受け易い欠点がある。しかし、本研究では生体内でも安定に存在可能で、cPA と同等以上の生理活性を示し、代謝安定な誘導体 2 カルバ cPA (2ccPA) を磁性粒子に固定することで精製途中の分解の懸念を払拭でき、より高い確率で標的分子を同定できることが期待される。アルキン基を導入した 2ccPA は、既に合成済みであり、アジド基をもつ磁性ビーズは多摩川精機 (株) より購入した。

4. 研究成果

(1) cPA 結合型ナノ磁性微粒子(ビーズ)の調製

cPA の環状リン酸基は、活性に重要な構造であるが、ホスファターゼなどによる酵素的な分解を受け易いため、本研究では代謝に安定な誘導体 2 カルバ cPA (2ccPA) を磁性粒子に固定した。アジド基とアルキン基のクリック反応を利用して、磁性微粒子に 2ccPA を固定し、この 2ccPA 固定

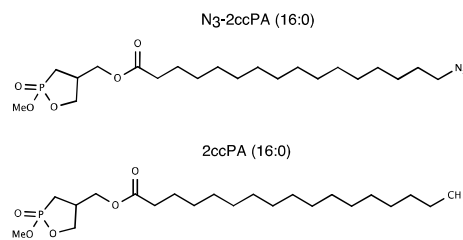


Fig.1 2ccPA 固定化磁性ビーズの調製 (Cellular Signalling, 2020 より)

化ビーズを用いてアフィニティー精製を進めた。使用する磁性微粒子 (FG ビーズ) は、分散・可動性に優れ、単位体積あたりの表面積が大きく、多くのリガンドが固定化できる。また、非特異的吸着が少なく従来のビーズよりも効率よく精製できる特徴を持つ。

(2) アフィニティー精製と標的タンパク質の同定

海馬の免疫担当細胞であるミクログリアから膜タンパク質画分を調製し、アフィニティー精製により 2ccPA 特異的に結合するタンパク質の単離・精製を進めた。膜画分から、界面活性剤を含

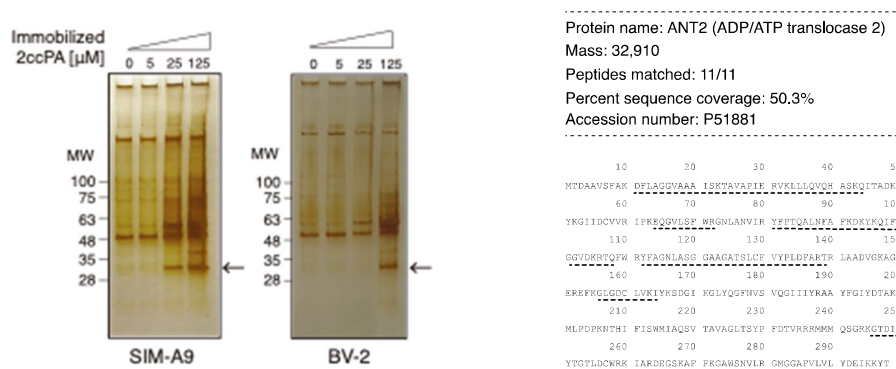


Fig.2. SDS-PAGE と銀染色による標的タンパク質の同定 (Cellular Signalling, 2020 より)

む緩衝液を用いて膜タンパク質を可溶化し、この画分と 2ccPA ビーズとを混合させ精製を行った (Fig.2)。膜タンパク質は界面活性剤により抽出効率や安定性が異なるため、複数の界面活性剤による可溶化スクリーニングも考慮し、組織中の夾雑物は硫酸やカプリル酸で分画後、濃縮した。得られた結合タンパク質は 2 次元電気泳動法で分離した後、スポットを nanoLC-MS/MS 質量

分析で解析し、タンパク質を同定した。cPA との特異性は、競合阻害試験および Pull-down assay で検証した(Fig.3)。

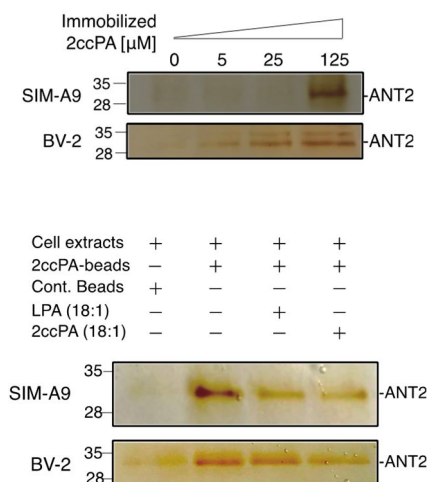


Fig.3 Pull-down assay(上)および競合阻害試験(下) (Cellular Signalling, 2020 より)

(3) 標的タンパク質(ANT2)の *in vitro* 解析

フェニルアルシンオキシド(PAO)は ANT へ結合することで細胞死が誘導されることが報告されている。そこで、PAO による ANT2 の結合を 2ccPA により阻害されるかどうか細胞増殖試験(MTT assay)およびフローサイトメーターによるアポトーシス試験(細胞死試験)により明らかにした。

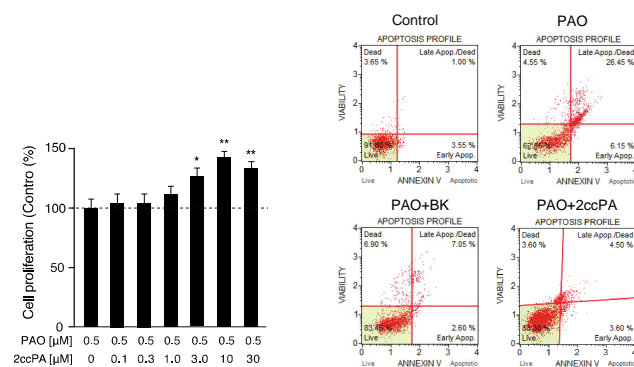


Fig.4. ミクログリア細胞における細胞増殖試験(上)とアポトーシス試験(下) (Cellular Signalling, 2020 より)

2ccPA は ANT2 を介した PAO による細胞増殖およびアポトーシス誘導を抑制することが明らかとなった(Fig.4)。次に、同定した ANT2 が PAO を介して活性酸素(ROS)を産生するかどうか確認した。初めに ANT2 に対する siRNA を設計し、PAO を暴露させることにより細胞内 ROS レベルを測定したところ、siRNA によりノックダウンされた細胞では有意に ROS の産生が減少していた(Fig.5)。また、この PAO 処理における生細胞数の変化を測定したところ、2ccPA 暴露により抑制されることを明らかにした。この結果より、2ccPA が ANT2 へ結合することにより、PAO による ROS 発生と生細胞数の減少を抑制することが明らかとなった。今回、cPA 特異的に結合する海馬の免疫担当細胞であるミクログリア由来のタンパク質を単離・同定し、cPA の細胞死抑制のシグ

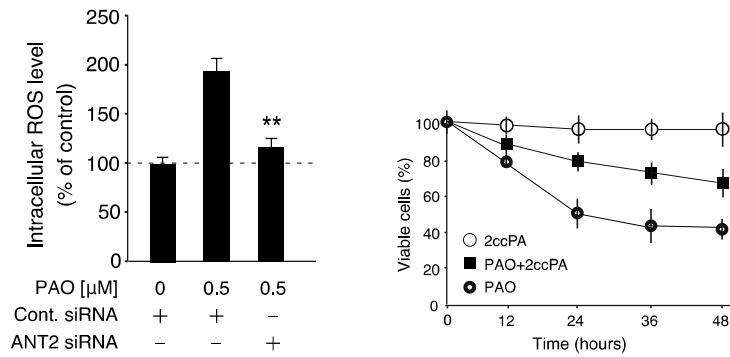


Fig.5. ANT2 ノックダウンと ROS 産生試験 (Cellular Signalling, 2020)

ナル経路及び責任分子を明らかにすることができた。本研究は、cPA の新たな生理学的意義を解明するのに加えて、脳血管疾患の新たなメカニズム解明が期待でき、学術的に意義のある結果である。高齢化や生活習慣の欧米化、糖尿病患者の増加に伴い、脳血管疾患の患者数は増加の一途をたどり、高齢者の寝たきりの大きな要因となっている。脳血管疾患に対する治療は、薬物療法、カテーテル治療、バイパス手術等がなされており多くの患者の救命に貢献しているが、発作を発症してからの治療には十分な効果を発揮し得ていないのが現状である。加えて、一過性脳虚血による遅発性神経細胞死を原因とする病態に対して、現在までに十分な効果を示す治療薬は無く、新たな薬剤の開発が求められている。本研究は、cPA を介した遅発性神経細胞死の抑制作用の機序を解明し、脳血管疾患に対して新しい予防法・治療法を提案し、遅発性神経細胞死の抑制という新規な作用を持つ創薬の開発へ繋げるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tamotsu Tsukahara, Hisao Haniu, Takeshi Uemura & Yoshikazu Matsuda	4. 巻 8
2. 論文標題 Therapeutic Potential of Porcine Liver Decomposition Product: New Insights and Perspectives for Microglia-Mediated Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines8110446	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 -
1. 著者名 Yoshikazu Matsuda, Hisao Haniu, Tamotsu Tsukahara, Takeshi Uemura, Toshio Inoue, Ken-Ichi Sako, Jun Kojima, Tatsuro Mori, Kazusaburo Sato	4. 巻 141
2. 論文標題 Oral administration of porcine liver decomposition product for 4 weeks enhances visual memory and delayed recall in healthy adults over 40 years of age: A randomized, double-blind, placebo-controlled study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Gerontology	6. 最初と最後の頁 111064
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exger.2020.111064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kazutoshi Hisano, Shiori Kawase, Tetsuhiko Mimura, Hironori Yoshida, Hiroki Yamada, Hisao Haniu, Tamotsu Tsukahara, Taiga Kurihara, Yoshikazu Matsuda, Naoto Saito, Takeshi Uemura	4. 巻 534
2. 論文標題 Structurally different lysophosphatidylethanolamine species stimulate neurite outgrowth in cultured cortical neurons via distinct G-protein-coupled receptors and signaling cascades	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 179-185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.11.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tamotsu Tsukahara, Yasuka Sahara, Nigel Ribeiro, Ryoko Tsukahara, Mari Gotoh, Satoshi Sakamoto, Hiroshi Handa, Kimiko Murakami-Murofushi	4. 巻 82
2. 論文標題 Adenine nucleotide translocase 2, a putative target protein for 2-carba cyclic phosphatidic acid in microglial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 109951
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cellsig.2021.109951	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 -

1. 著者名 Kazutoshi Hisano, Hironori Yoshida, Shiori Kawase, Tetsuhiko Mimura, Hisao Haniu, Tamotsu Tsukahara, Taiga Kurihara, Yoshikazu Matsuda, Naoto Saito, Takeshi Uemura	4. 巻 170
2. 論文標題 Abundant oleoyl-lysophosphatidylethanolamine in brain stimulates neurite outgrowth and protects against glutamate toxicity in cultured cortical neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 327-336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamotsu Tsukahara	4. 巻 65
2. 論文標題 1-O-alkyl glycerophosphate-induced CD36 expression drives oxidative stress in microglial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 109459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2019.109459	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamotsu Tsukahara, Hisao Haniu, Takeshi Uemura, Yoshikazu Matsuda	4. 巻 10
2. 論文標題 Porcine liver decomposition product-derived lysophospholipids promote microglial activation in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-60781-1	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石田 季子, 羽二生 久夫, 塚原 完, 植村 健, 佐藤 和二郎, 佐古 兼一, 井上 俊夫, 松田 佳和
2. 発表標題 長谷川式認知症スケールに対するブタ肝臓分解物の効果
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会 (京都)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐原 慈佳 , 塚原 完
2. 発表標題 ミクログリア細胞における2ccPA結合タンパク質の同定と細胞死制御作用
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会 (横浜) 誌上開催
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	松田 佳和 (Matsuda Yoshikazu) (20377633)	日本薬科大学・薬学部・教授 (32425)	
研究分担者	羽二生 久夫 (Haniu Hisao) (30252050)	信州大学・学術研究院医学系・准教授 (13601)	

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
---------	---------