

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16892

研究課題名（和文）L-アセチルカルニチンの重要性ならびに神経保護治療への応用

研究課題名（英文）Neuroprotection of L-Acetylcarnitine

研究代表者

前川 重人（Maekawa, Shigeto）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：80625294

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：申請者の研究室ではこれまでの研究成果から、緑内障患者の前房水ならびに視神経挫滅後のマウス網膜神経節細胞においてL-アセチルカルニチンが増加することを発見した。本研究では緑内障病態におけるL-アセチルカルニチンの重要性ならびに神経保護治療への応用への可能性を検証した結果、L-アセチルカルニチンの合成酵素であるアセチルカルニチントランスフェラーゼ（CrAT）が緑内障モデル動物に対し神経保護効果を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障は本邦の中途失明原因の第一位の疾患であり、視覚障害によるQuality Of Life (QOL) の低下は社会的な問題となっている。このため、緑内障の病態を明らかにし、有効な予防及び治療を講ずることは重要な臨床課題である。本研究では神経保護を示す物質の候補として自施設における緑内障患者の検体や緑内障モデル動物を用いたメタボローム解析結果に焦点を当て、その代謝制御のメカニズムや病態における生理的意義を検証した点で既存研究から飛躍している。本研究結果は緑内障の新たな治療法開発の基礎的分子基盤としての貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：Our previous studies have revealed that L-acetylcarnitine is increased in the anterior chamber fluid of glaucoma patients and in mouse retinal ganglion cells after optic nerve crush. In this study, the importance of L-acetylcarnitine in the pathogenesis of glaucoma and its potential for neuroprotective therapy were examined, and it was found that acetylcarnitine transferase (CrAT), a synthetic enzyme of L-acetylcarnitine, showed neuroprotective effects in animal glaucoma models.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障 アセチルカリニチントランスフェラーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障は視神経を構成する RGC の軸索障害と、それに伴う RGC 死により視野障害を呈する眼科疾患である。主なリスクファクターは加齢であり、近年の超高齢化社会に伴う高齢者の増加により緑内障患者は増加の一途を辿っている。緑内障の根本的な発症原因は高眼圧であり、眼圧下降治療以外に有効な治療がない。一方で、眼圧下降治療が有効ではない患者も少なからず存在することから、眼圧下降治療に対して抵抗性を示す患者群の病態解明は特に重要な課題である。

申請者らは、眼圧非依存的な緑内障病態の一つの側面を反映すると考えられる視神経軸索挫滅による障害モデルマウスを作製し、核酸、アミノ酸、脂質などの代謝産物を網羅的に解析するメタボロミクスをおこなった。代謝産物は組織や細胞の生理的環境を反映した最終的な表現型とも言える。そのためメタボロミクスは、細胞内における動的な生理的イベントを解析できる点で優れており、生命現象や病的機構の発見に有用である。申請者らの研究室で実施したメタボロミクスにより視神経軸索挫滅モデルマウスの網膜を解析したところ、RGC 死に伴って変動する代謝物群を同定した (Sato et al., Sci Rep. 2018)。申請者が着目したのは、網膜神経節細胞死に伴って増加する代謝物群であり、その多くがカルニチン関連代謝物であった。カルニチンは生体の脂質代謝に関与するアミノ酸誘導体であり、脂質を燃焼してアセチル CoA から ATP を産生する酸化において脂肪酸をミトコンドリア内部に運搬する役割を担っている。代謝物の局在を解析するイメージング MS の結果から、視神経軸索挫滅モデルマウスの RGC においては L-アセチルカルニチンが増加しており (Sato et al., Sci Rep. 2018)、酸化の亢進によるエネルギー供給が推測された。L-アセチルカルニチンはその合成酵素であるアセチルカルニチントランスフェラーゼ (CrAT) により産生される。網膜神経節細胞に対し AAV2-CRISPR/Cas9 システムを用い特異的に CrAT 遺伝子をノックアウトした結果、マウス網膜 RGC 数が減少したことから CrAT は RGC の維持に必須であることが示唆された (Katayama et al., Life Sci Alliance. 2019)。上述の先行研究から、申請者は CrAT により合成される L-アセチルカルニチンが RGC の生存維持に必須であり、軸索絞扼による RGC 障害時においてエネルギー代謝を維持するため代償的に酸化を亢進すると考えている。一方でカルニチンや CrAT に関する既報は骨格筋や心筋に着目されており、神経細胞における詳細な解析は報告されていない。

2. 研究の目的

そのため本申請では L-アセチルカルニチンならびに CrAT の神経細胞維持における分子メカニズムならびに CrAT の過剰発現による神経保護作用について検証することを目的とした。

3. 研究の方法

発現ベクター pAAV-MCS (アジレント社) に CrAT 遺伝子の CDS 領域全長をマウス網膜 cDNA から鋳型として導入し、CrAT 過剰発現プラスミドを作製した。マウス海馬由来神経細胞株 (HT22) にトランスフェクションしたのち、細胞内および培地中の L-アセチルカルニチンならびにカルニチン代謝物を LC-MS/MS で測定し、CrAT のカルニチン代謝における影響を確認した。

AAV2 ベクターの感染効率を調べるため、AAV2-CMV-mCherry をマウス眼硝子体内に 1×10^9 gc/eye で投与し、一か月後に眼球摘出してサンプリングをおこなった。また、網膜神経節細胞数を評価するため、マウス摘出眼球を 4% PFA で固定したのち網膜を剥離単離し、抗 RBPMS を用いて免疫染色した。網膜進展標本を作製したのち、蛍光顕微鏡 (キーエンス社) で網膜全体を撮影し、網膜の部位別に撮影、網膜神経節細胞ならびに AAV2 感染細胞の細胞数を計測し定量的な評価をおこなった。

また、AAV2 ベクターに CrAT を過剰発現するプラスミドを制限酵素で切断、ライゲーション試薬を用いてパッケージングし、カラムクロマトグラフィーで精製することで網膜神経節細胞特異的に CrAT 遺伝子を過剰発現させるウイルスベクターを作製した。本ベクターをマウス眼硝子体内に 1×10^9 gc/eye で投与し、一か月後に視神経挫滅処置をおこない網膜神経節細胞障害を誘導した。視神経挫滅処置 7 日後に眼球摘出し、抗 RBPMS 抗体により残存する網膜神経節細胞数を計測した。

培養細胞におけるドキシサイクリン誘導性の CrAT 発現細胞の作製のため、2 種類のレンチウイルスベクター (EGFP:T2A:Puro-TRE>mCrat、CMV>tTS/rtTA/Hygro) を用いた。これらのベクターを MOI 50 の条件で 8-16 μ g/ml ポリブレン添加条件により 2 回感染させた。ウイルスベクター感染効率を確認するため EGFP 発現を蛍光顕微鏡 (キーエンス社) ならびに qPCR により実施した。qPCR には total RNA を抽出し (キアゲン社) cDNA 合成を SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System (Invitrogen)、qPCR を ABI 7500 FAST で実施した。ドキシサイクリン投与 (500-5000 ng/ml) 投与後の CrAT 遺伝子発現量も上記と同様の手法で qPCR により確認した。

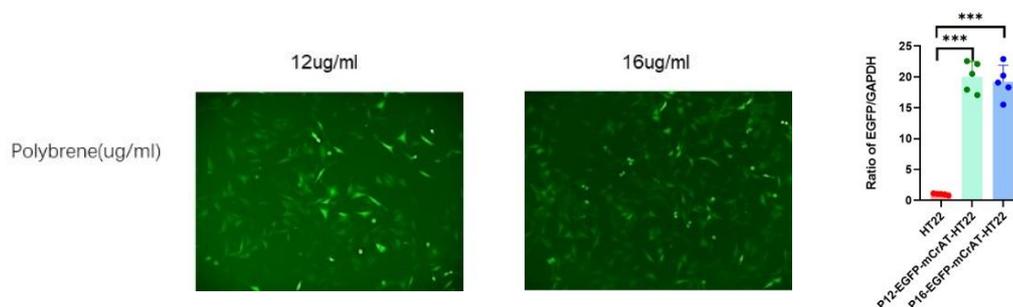
4. 研究成果

作製した CrAT 過剰発現プラスミドを HT22 細胞株にトランスフェクションし、24 時間後に細胞を回収してウェスタンブロッティングにより CrAT タンパク質の発現誘導を評価した。その結果、CrAT 過剰発現プラスミドを導入した細胞内の CrAT 量はコントロールである Mock に比較して約 2 倍に増加していることが確認された。質量分析計による分析の結果、CrAT 過剰発現プラスミドを導入した細胞内の L-アセチルカルニチンは約 2 倍に増加していたが、一方で培養上清中の L-アセチルカルニチン量に有意な差を認めなかった。

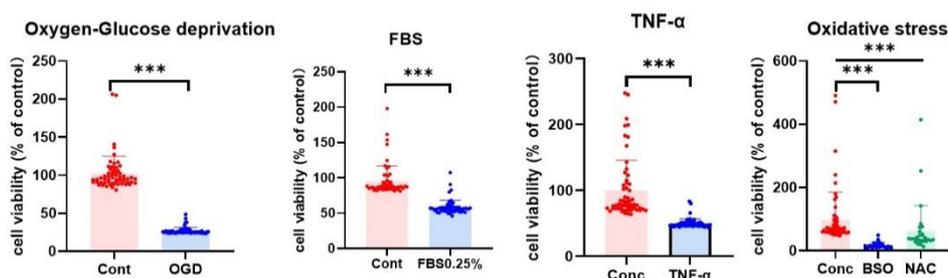
続いて、CrAT を *in vivo* で目的細胞ある網膜神経節細胞に遺伝子導入するにあたり、使用する AAV2 ベクターの感染効率を評価した。標的細胞である網膜神経節細胞を抗 RBPMS 抗体で緑色に標識し、AAV2 感染細胞を AAV2-mCherry により赤色で標識した。その結果、視神経周囲、網膜中間部ならびに網膜周辺部の各部位における AAV2 の網膜神経節細胞に対する感染効率 (RBPMS・mCherry 陽性の共染色細胞数/RBPMS 陽性細胞数) は約 50%程度であった。

AAV2 ベクターが網膜神経節細胞に感染することを確認できたため、AAV2 ベクターに CrAT 過剰発現プラスミドをパッケージングして網膜神経節細胞内で CrAT を過剰発現するウイルスベクター (AAV2-CMV-mCrAT-OE) を作製した。このウイルスベクターをマウス硝子体内に投与し、一か月後に視神経挫滅処置をおこない網膜神経節細胞障害を誘導した。視神経挫滅処置 7 日後に眼球摘出し、抗 RBPMS 抗体により残存する網膜神経節細胞数を計測した。その結果、残存する網膜神経節細胞数は AAV2-CMV-mCrAT-OE 投与群において、コントロールベクター群に比較して有意に多い結果であった。

上述の実験結果から、CrAT は視神経挫滅時による網膜神経節細胞障害に対して神経保護的に働くことが示された。そのため、CrAT の細胞保護における分子メカニズムを調べる目的で、CrAT を時期特異的に発現する Tet-On ベクターを導入した HT22 細胞の作製を試みた。その結果、Tet-On ベクターを導入した HT22 細胞では EGFP 陽性が蛍光顕微鏡での観察で確認された。また、qPCR の結果、EGFP の発現誘導が定量的にも確認され、CrAT を発現誘導するための TRE を搭載したベクターが感染していることが示された (図)。



さらに、ドキシサイクリン処理 (24-72 時間) により CrAT の遺伝子発現が有意に上昇 (約 20-30 倍) することを qPCR により確認した。ドキシサイクリンにより可逆的に CrAT 発現調節が可能な細胞を作製することに成功した。また予備検討として低酸素/低グルコース障害モデル、FBS 欠損モデル、TNF 障害モデル、BSO (グルタチオン合成阻害剤) による酸化ストレス負荷モデルを通常 HT22 細胞を用いて実験系を樹立した (図)。今後、様々なストレス負荷による CrAT の細胞保護メカニズムを検証する予定であり、緑内障への治療応用にむけた知見が得られることが期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤孝太
2. 発表標題 カルニチンアセチルトランスフェラーゼの過剰発現による神経保護効果の検討
3. 学会等名 第33回日本緑内障学会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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