

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月14日現在

機関番号： 17401  
 研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2010～2011  
 課題番号： 22790254  
 研究課題名 (和文) グリア細胞由来リポプロテインによる緑内障治療法の開発  
 研究課題名 (英文) A potential treatment of glaucoma by glia-derived lipoproteins.

研究代表者  
 林 秀樹 (HAYASHI HIDEKI)  
 熊本大学・大学院先端機構・特任助教  
 研究者番号： 90508657

研究成果の概要 (和文)：日本の失明原因疾患第一位である緑内障の発症機序とグリア細胞由来リポプロテインによる神経保護機構の解明および新規治療法の開発を本研究の目的とした。緑内障では視神経を構成する網膜神経節細胞の変性が誘導されることから、初代培養網膜神経節細胞に神経障害を誘導し、その変性機構とリポプロテインによる神経保護機構を詳細に解析した。その結果、リポプロテインはカルシウム過剰流入を阻害することで保護効果を発揮することを明らかにし、新規治療法開発に繋がる成果を得た。

研究成果の概要 (英文)：Glaucoma is the leading cause of blindness in Japan. Thus, the aims of this study are to analyze mechanisms of developing glaucoma and neuroprotection by glia-derived lipoproteins. Glaucoma induces degeneration of retinal ganglion cells (RGCs), so we determined whether lipoproteins were able to protect primary cultured RGCs from degeneration induced by glutamate. This study demonstrated that lipoproteins protected RGCs from apoptosis by preventing calcium overload.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：神経化学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：緑内障、リポプロテイン

## 1. 研究開始当初の背景

緑内障の危険因子には、加齢、高眼圧、高血圧、糖尿病などが知られているが、直接的な発症原因は明らかではない。眼圧の上昇により視神経を構成する網膜神経節細胞の軸索が圧迫・障害され、栄養因子などの輸送が

滞ることで神経変性が引き起こされるという説が有力であるが、我が国では正常眼圧緑内障 (眼圧 10-21mmHg) が主な病型である上に、眼圧の比較的低い (10mmHg 付近) 症例でも病状の進行が見られることから、発症機構は、より複雑であると考えられる。しかし現

時点で治療効果が証明されている唯一の治療法が眼圧下降であるため、新たな治療法や治療薬の開発が切望されている。基礎実験の結果に基づき、カルシウム拮抗薬やグルタミン酸受容体阻害薬が視神経保護薬の候補として臨床研究中であるが、これらの薬物に顕著な視神経保護効果があるという報告は現在のところされてはいない。

近年、神経細胞のリポプロテイン受容体がシグナル伝達を誘導し、発生段階での神経細胞の遊走を調節することなどが示され、従来から知られていたリポプロテインを細胞内に取り込む機能以外にも神経系における重要な役割を持つことがわかってきた。これに加え研究代表者は、グリア細胞由来アポリポプロテイン E (アポ E) 含有リポプロテインがリポプロテイン受容体の一つである低比重リポプロテイン受容体関連タンパク質 1 (LRP1) に結合し、フォスホリパーゼ C $\gamma$  1、プロテインキナーゼ C $\delta$ 、グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 $\beta$  を介したシグナル伝達により、網膜神経節細胞を栄養因子欠乏誘導性細胞死 (アポトーシス) から非常に強力に保護することを明らかにした。この神経保護効果は、今まで知られていなかったリポプロテインおよびその受容体の全く新しい機能であり、緑内障に対する新規治療メカニズムの候補として期待できる。

## 2. 研究の目的

緑内障は、何らかの原因で、視神経を構成する網膜神経節細胞が変性し、最終的には失明に至る進行性の神経変性疾患である。本疾患は、我が国の失明原因疾患の第一位、また世界の失明原因疾患の第二位であり、効果的な治療法の開発は、科学的のみならず、社会的にも急務とされる。

研究代表者は以前の研究で、グリア細胞由来のリポプロテインが細胞内シグナル伝達を誘導し、栄養因子欠乏で誘導される網膜神経節細胞の変性を非常に強力に阻害することを明らかにした。本研究では、この研究成果のさらなる応用を目指し、培養網膜神経節細胞を用いて、興奮性神経毒であるグルタミン酸に対するリポプロテインの視神経保護メカニズムを解析し、緑内障に対する新たな治療薬・治療法の開発に繋がる成果を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗体パニング法を用いた網膜神経節細胞の初代培養

本研究には、生後 2 日目のラットを使用した。ラット初代培養網膜神経節細胞の単離は、Barres ら (Neuron 1, 791-803, 1988 年) の方法に従い、行った。本培養法は、抗体をコーティングしたペトリディッシュを用いて、

2 段階の抗体パニングを行うことにより、100%に近い純度で網膜神経節細胞を培養することができる方法である。ラット眼球より取り出した網膜をパパインと共にインキュベーションし、細胞懸濁液を作製。その後、1 番目のパパニングには、抗マクロファージ抗体を使用し、2 番目のパパニングには、網膜神経節細胞のマーカーである抗 Thy1 抗体を使用して、細胞懸濁液中から網膜神経節細胞の単離を行った。網膜神経節細胞を単離後、96 ウェル培養プレートに無血清培養液中で 10 日間以上培養した後に、実験に使用した。

### (2) 大脳皮質グリア細胞の初代培養

グリア細胞の初代培養は、生後 3 日目のラット大脳皮質を使用して行った。ラット脳から大脳皮質を単離後、トリプシンにより細胞懸濁液を作製し、10%血清培養液を用いて約 1 週間培養した。その後、一度播きかえを行い、約 10 日間培養後、実験に使用した。本実験で使用したグリア細胞の構成は、免疫細胞化学的検討から、アストロサイト 82.5%、ミクログリア 16%、オリゴデンドロサイト 0.5%、神経細胞 1%であった。

### (3) グリア細胞由来アポ E 含有リポプロテインの単離

初代培養グリア細胞を 3 日間、無血清培養液中で培養し、培養液を回収した。この培養液をショ糖密度勾配超遠心法により、72 時間超遠心し、10 画分に分画した。各画分の一部を使用してイムノプロットを行い、アポ E の分布を観察した。10 画分中でアポ E 含有量の多い 3 画分を回収し、濃縮して実験に使用した。

### (4) 人工再構成アポ E 含有リポプロテインの作製

コレステロール、フォスファチジルコリン、ヒトリコンビナントアポ E を 10:100:1 のモル比で含む人工再構成アポ E 含有リポプロテインを作製した。クロロホルム中にコレステロールとフォスファチジルコリンを溶解後、窒素ガス下で乾燥させた。トリス緩衝液に懸濁後、コール酸を使用して溶解し、ヒトリコンビナントアポ E を加えた。バイオビーズによりコール酸を除去し、再構成アポ E 含有リポプロテインを形成させた。バイオビーズをフィルター除去後、上記研究の方法

「(3) グリア細胞由来アポ E 含有リポプロテインの単離」と同様に、ショ糖密度勾配超遠心法によりリポプロテインを単離した。

### (5) グルタミン酸による神経細胞障害の誘導

神経細胞障害 (アポトーシス) は、網膜神

経節細胞の培養液中にグルタミン酸を添加することで誘導した。グルタミン酸の処理は2時間行い、その後通常の培養液に交換した。24時間培養後、ヘキスト33258で核を染色することにより、アポトーシス細胞を検出した。核の染色像が、凝集や断片化を示している細胞をアポトーシス細胞として判定し、均一に染色された核を持つ細胞を健康な細胞として判定した。

#### (6) 細胞内シグナル経路の解析

網膜神経節細胞におけるアポE含有リポ蛋白の神経保護機構の解析は、主にイムノブロットや阻害剤などを用いて行った。イムノブロットは、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動法でタンパク質を分離後、ニトロセルロース膜に転写して行った。抗体陽性バンドの検出には、化学発光法を用いた。

#### (7) 蛍光指示薬を用いた細胞内カルシウム動態の観察

初代培養網膜神経節細胞をカルシウム蛍光指示薬であるFluo 8-AMと30分間インキュベーションし、培養液で2回洗浄後、蛍光顕微鏡を使用して観察を行った。蛍光の観察には、MetaFluor画像解析ソフトを用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) グルタミン酸誘導性神経変性機構

本研究では、培養液中にグルタミン酸を添加することで神経変性を誘導した。この神経変性は、アポトーシスの誘導に関わる酵素であるカパーゼの阻害剤で抑制された。またカルシウムを除去した培養液中では、グルタミン酸添加により、神経変性は誘導されなかった。さらに、グルタミン酸受容体の一つであるN-メチル-D-アスパラギン酸受容体、カルシウム依存性タンパク質分解酵素であるカルパイン、カルシウム依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリン、ミトコンドリアを介したアポトーシスの誘導に重要なタンパク質であるBaxなど、それぞれの阻害剤によりグルタミン酸誘導性神経変性が抑制された。以上より、グルタミン酸による神経変性は、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体を介した細胞内カルシウム負荷によるカパーゼ依存性のアポトーシスであることが示唆された。

#### (2) アポE含有リポ蛋白は網膜神経節細胞をアポトーシスから保護する

本研究では、対照群の網膜神経節細胞が約10%のアポトーシス様核染色像を呈したのに対し、グルタミン酸添加群（アポトーシス群）では約50%のアポトーシス様核染色像が検出された。これに対し、グリア細胞由

来アポE含有リポ蛋白を添加した群では、対照群と同程度まで神経細胞が保護された。グリア細胞は、様々な神経保護因子を放出することが知られている。このことから本実験の神経保護効果が、リポ蛋白に結合する他のグリア細胞由来神経保護因子に由来する可能性を除くために、人工再構成アポE含有リポ蛋白を作製した。その結果、人工再構成アポE含有リポ蛋白は、グリア細胞由来アポE含有リポ蛋白と同程度の神経保護効果を発揮することが明らかとなった。

#### (3) アポE含有リポ蛋白による細胞内カルシウム負荷抑制機構

カルシウム蛍光指示薬を用いた実験から、網膜神経節細胞の細胞内カルシウム濃度がグルタミン酸添加により著しく上昇することが確認された。これに対し、人工再構成アポE含有リポ蛋白は、カルシウム濃度上昇を抑制することが明らかとなった。また、このカルシウム濃度上昇抑制効果は、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体阻害薬と同程度であり、リポ蛋白と阻害薬の同時処理でも、抑制効果は変化しなかった。このことから人工再構成アポE含有リポ蛋白による神経細胞内カルシウム濃度上昇抑制効果は、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体を介するカルシウム流入抑制であることが考えられた。

#### (4) アポE含有リポ蛋白の神経保護効果におけるリポ蛋白受容体の役割

研究代表者による以前の研究で、栄養因子欠乏誘導性神経変性に対し、低比重リポ蛋白受容体関連タンパク質1 (LRP1) による細胞内シグナルが、保護効果に重要であることが示された。このことから、グルタミン酸誘導性神経変性に対する保護効果にも、LRP1が関与するかを検討した。本研究では、抗LRP1抗体による人工再構成アポE含有リポ蛋白の神経細胞内カルシウム濃度上昇抑制効果への影響を観察した。その結果、抗LRP1抗体が、リポ蛋白の細胞内カルシウム濃度上昇抑制効果を阻害することが示された。このことからアポE含有リポ蛋白は、LRP1を介してN-メチル-D-アスパラギン酸受容体の働きを抑制している可能性が示された。

以上の研究成果から、網膜神経節細胞のグルタミン酸によるアポトーシス誘導機構が明らかとなった。この誘導機構には、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体を介したカルシウム流入が重要であり、細胞内でカルパイン、カルシニューリン、Bax、カパーゼが関与していることが示された。また本研究では、

アポE含有リポタンパク質による網膜神経節細胞の神経保護機構の一端が明らかとなった。この神経保護機構にはリポタンパク質受容体である LRP1 が関与しており、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体を介するカルシウム流入を抑制することで、神経保護効果を発揮することが示された。これらの研究成果は、視神経を構成する網膜神経節細胞に対するリポタンパク質の新たな役割およびその機構を明らかにしたものであり、今後、本研究をさらに発展させることで、緑内障の新たな治療法開発に繋がる成果であると考えられる。

#### 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4件)

- ① 林 秀樹 中枢神経系の脂質代謝と神経変性疾患 日本薬理学雑誌、査読無、137: 227-231, 2011
- ② Hayashi, H. Lipid metabolism and glial lipoproteins in the central nervous system. Biol Pharm Bull、査読有、34: 453-461, 2011
- ③ Takahara, Y., Inatani, M., Hayashi, H., Adachi, N., Iwao, K., Inoue, T., Iwao, M., and Tanihara, H. Dynamic imaging of axonal transport in living retinal ganglion cells in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci、査読有、52: 3039-3045, 2011
- ④ Vance, J. E., and Hayashi, H. Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. Biochim Biophys Acta、査読有、1801: 806-818, 2010

[学会発表] (計3件)

- ① Hayashi H. Low density lipoprotein receptor-related protein-1 mediates the neuroprotection of apolipoprotein E-containing lipoproteins against glutamate neurotoxicity. Jpn. J. Pharmacol. 第85回日本薬理学会年会、2012. 3. 15、京都国際会館 (京都)
- ② Hayashi H. Protection from neurodegeneration by apolipoprotein E-containing lipoproteins. 第84回日本生化学会大会、2011. 9. 23、京都国際会館 (京都)

- ③ Hayashi H., Vance J.E. Protection of neurons from apoptosis by apolipoprotein E-containing lipoproteins. 第53回日本神経化学会年会 (Neuro2010) 2010. 9. 2、神戸国際会議場 (神戸)

[図書] (計1件)

- ① Hayashi H. Oxford University Press, Lipids, lipid mediators and other signaling molecules. Neuroglia, 3<sup>rd</sup> Edition (分担執筆) (2012年発行予定)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

- ①名称: リポタンパク質含有複合体およびリポタンパク質を用いた神経変性抑制剤ならびに神経変性抑制方法

発明者: 林 秀樹

権利者: 熊本大学、東京医科歯科大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-205390

出願年月日: 平成23年9月20日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://sendou.kuma-u.jp/research/hayashi.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 秀樹 (HAYASHI HIDEKI)

熊本大学・大学院先端機構・特任助教

研究者番号: 90508657