

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500441

研究課題名(和文) リポ蛋白受容体を介した視神経保護薬の開発研究

研究課題名(英文) Neuroprotection via lipoprotein receptors against optic neuropathy

研究代表者

林 秀樹 (Hideki, Hayashi)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90508657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：日本第一位の失明原因疾患である緑内障は視神経変性疾患であり、新たな治療薬の開発が望まれている。研究代表者は以前、アポリポ蛋白Eを含むリポ蛋白が培養網膜神経節細胞の栄養因子欠乏で誘導される変性に対し、強力な保護効果を発揮することを明らかにした。本研究では、リポ蛋白受容体を介したグルタミン酸毒性に対する神経保護機構の解明とともに、緑内障モデル動物に対する視神経保護効果を明らかにし、新規治療薬開発につながる成果を得た。

研究成果の概要(英文)：The leading cause of blindness in Japan is glaucoma, which is one of neurodegenerative disorders. We have previously demonstrated that apolipoprotein E-containing lipoproteins strongly protect primary cultured retinal ganglion cells from trophic factors-withdrawal-induced neurodegeneration. In this study, we showed a neuroprotective mechanism of apolipoprotein E-containing lipoproteins via the lipoprotein receptor against glutamate-induced neurotoxicity. We believe that the results of this study provide a novel therapeutic approach for glaucoma.

研究分野：神経科学

キーワード：リポ蛋白 緑内障 グルタミン酸

1. 研究開始当初の背景

緑内障は、網膜神経節細胞の変性・消失を特徴の一つとする視神経変性疾患であり、我が国の第一位、世界では白内障に次いで第二位の失明原因疾患である。緑内障の危険因子としては、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。現時点で治療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、日本では緑内障患者の約7割が正常眼圧緑内障であることから、新たな治療法の開発が望まれている。

網膜で受けた視覚情報は、視神経を構成する網膜神経節細胞を介して脳内へと伝達される。このため網膜神経節細胞の障害は、視覚情報の欠落(視野欠損や失明)に直結する。ゆえに網膜神経節細胞の保護は、緑内障に対する直接的かつ合理的な治療法であると考えられる。基礎実験に基づき、視神経保護薬の候補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研究が行われているが、これらの薬物の緑内障に対する顕著な保護効果は確認されていない。

神経細胞は一生を共に生きる非常に長い寿命を持った細胞である。このため、神経系には様々な障害から機能を維持・回復するための強固な防御機構が存在すると考えられる。研究代表者は以前の研究で、グリア細胞由来のアポリポ蛋白(アポ)E含有リポ蛋白が、網膜神経節細胞において軸索損傷後の再伸長促進効果を発揮すること、またリポ蛋白受容体の一つである low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) に結合し、フォスホリパーゼ C 1 (PLC 1) プロテインキナーゼ C (PKC) グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 (GSK3) を介して、栄養因子欠乏による細胞死(アポトーシス)から網膜神経節細胞を強力に保護することを明らかにした。グリア細胞は脳虚血や外傷などによる神経障害に応答し、大量のアポE含有リポ蛋白を放出することから、研究代表者はアポE含有リポ蛋白によるこれらの現象(軸索再伸長促進、神経保護)を、グリア細胞が神経障害に対して備える生体防御機構の一部であると考えた。

2. 研究の目的

研究代表者によるこれまでの研究で、グリア細胞由来のアポEを含有するリポ蛋白が受容体 LRP1 を介して、栄養因子欠乏により誘導されるアポトーシスのみでなく、興奮性神経毒(グルタミン酸)誘導性神経障害に対しても保護効果を発揮することを見出した。また緑内障モデル動物を用いた予備実験では、アポE含有リポ蛋白の硝子体内注射が視神経を部分的に保護できることを発見した。そこで本研究は以下の2点を研究目的とした。

(1) 網膜神経節細胞におけるリポ蛋白受容

体を介したグルタミン酸神経毒性に対する神経保護機構の解明

(2) リポ蛋白受容体シグナルの神経保護効果を応用した新規緑内障治療法の開発

3. 研究の方法

(1) 抗体パニング法による網膜神経節細胞の初代培養

生後2日目または3日目の新生児ラットを使用した。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)の方法に従った。2種類の抗体を用いたパニングにより、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。網膜神経節細胞を単離後、96ウェル培養プレートまたは35mm培養ディッシュに無血清培養液中で10日間以上培養し、実験に使用した。

(2) 人工再構成アポE含有リポ蛋白の作製

ヒト組換えアポE蛋白、コレステロール、フォスファチジルコリンを1:10:100(モル比)で含む人工再構成アポE含有リポ蛋白を作製した。コレステロールとフォ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蛋白を加えた。バイオビーズ(Bio-Rad)を添加し、コール酸を除去することで、再構成アポE含有リポ蛋白を形成した。バイオビーズを除去後、ショ糖密度勾配超遠心法によりリポ蛋白を単離した。

(3) アポE含有リポ蛋白の単離

高密度リポ蛋白と同等の比重のアポE含有リポ蛋白を単離するため、上記(2)で作製したリポ蛋白溶液をショ糖密度勾配超遠心法により、48時間超遠心した。10画分に分画し、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。10画分中の高密度リポ蛋白画分のうちアポE含有量の多い3画分を回収し、濃縮後、実験に使用した。

(4) グルタミン酸神経毒性の誘導

初代培養網膜神経節細胞の培養液中にグルタミン酸を添加し、神経変性(アポトーシス)を誘導した。2時間後、通常の培養液に交換し、24時間後のヘキスト33342による核染色像により、アポトーシス細胞を検出した。核の染色像が、凝集や断片化した細胞をアポトーシス細胞として判定した。アポトーシスの検出は、ヘキスト試薬による核染色のほか、カルセイン/プロピディウムアイオダイドキットによる細胞障害検出法を使用した。実験によってはグルタミン酸に代わり、イオンチャネル共役型グルタミン酸受容体であるN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体アゴニストのNMDAを使用した。

(6) 細胞内シグナル伝達の解析

アポE含有リポ蛋白の神経保護効果に伴う細胞内シグナル伝達経路の解析は、主にイムノプロットや阻害剤などにより行った。イムノプロットは、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、PVDF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) 細胞内カルシウム濃度変化の解析

網膜神経節細胞の培養液中にカルシウム蛍光指示薬 Fluo 8-AM を添加し、30分間インキュベーションした。その後、蛍光顕微鏡下でグルタミン酸添加時の蛍光強度の変化を観察した。蛍光強度の解析には、MetaFluor画像解析ソフトを用いた。

(8) 共免疫沈降による NMDA 受容体と LRP1 の複合体形成の解析

アポE含有リポ蛋白による NMDA 受容体と LRP1 の複合体形成の変化を解析するために、アポE含有リポ蛋白処置15分後の網膜神経節細胞を回収し、抗 NMDA 受容体抗体または抗 LRP1 抗体を用いて共免疫沈降を行った。細胞溶解液に溶解後、22G 注射針を用いてホモジナイズした。各抗体と共に12時間、4℃でインキュベーション後、蛋白質Gセファロースを用いて免疫沈降を行った。蛋白質Gセファロースを洗浄後、イムノプロット用のサンプルを作製した。

(9) 緑内障モデル動物に対するアポE含有リポ蛋白硝子体内注射の視神経保護効果

緑内障モデルマウスとして GLAST 欠損マウスを使用した。本緑内障モデルマウスは現在、唯一の遺伝子改変正常眼圧緑内障モデル動物である。3週齢の GLAST ホモ欠損マウスの硝子体内に人工再構成アポE含有リポ蛋白を注入し、3週間後の網膜神経節細胞の状態をイムノプロットや組織切片のヘマトキシリン-エオシン染色により観察した。

4. 研究成果

(1) グルタミン酸神経毒性による神経変性機構

初代培養網膜神経節細胞の培養液中にグルタミン酸を添加したが、グルタミン酸のみでは神経障害が誘導されず、グルタミン酸神経毒性の誘導にはグリシンの共存が必要であることがわかった。NMDA 受容体は、その活性にグリシンを必要とすることから、今回のグルタミン酸誘導性神経変性には NMDA 受容体が関与することが示唆された。またアポトシス誘導時に検出されるホスファチジルセリンの細胞表面への転座が、annexin-V-EGFP 添加により観察されたこと、さらにミトコンドリアからのシトクロムcの遊離が観察されたことから、本研究の神経変性の形態がアポトシスであることが示唆された。

(2) グルタミン酸神経毒性に対するアポE

含有リポ蛋白の神経保護機構

対照群の神経変性が約10%なのに対し、グルタミン酸添加群では約50%が神経変性を誘導した。これに対し、アポE含有リポ蛋白は20%程度まで神経変性の誘導を抑制した。この神経保護機構の解析のために、抗 LRP1 抗体を使用し、蛍光指示薬 Fluo-8AM による細胞内カルシウム濃度変化やアポE含有リポ蛋白の神経保護効果に対する影響、LRP1-NMDA 受容体複合体の形成を観察した。その結果、アポE含有リポ蛋白が LRP1 に結合し、LRP1-NMDA 受容体複合体の形成を促進することで細胞外からのカルシウム流入を抑制していることが示唆された。また、イムノプロットによる蛋白質のリン酸化状態の解析から、以前の研究で明らかにした LRP1-PLC 1-PKC -GSK3 という神経保護経路も同時に働いていることが示された。

(3) 正常眼圧緑内障モデルマウス (GLAST 欠損マウス) で誘導される視神経変性に対するアポE含有リポ蛋白の神経保護効果

人口再構成アポE含有リポ蛋白またはマウス血清から単離した HDL (高密度リポ蛋白) を3週齢で硝子体内投与後、6週齢で網膜を回収した。網膜切片上の網膜神経節細胞層の細胞数計測、イムノプロットによる網膜神経節細胞マーカー蛋白質 (Brn-3a) の解析の結果、両群において、リポ蛋白による神経保護効果が観察された。また上記結果に加えて、GLAST 欠損マウスの硝子体液中では、LRP1 のリガンドの一つである 2-マクログロブリンが増加していることを発見した。また培養細胞による実験から、この 2-マクログロブリンがアポE含有リポ蛋白による神経保護効果を妨害することを明らかにした。

以上の結果から、網膜神経節細胞のグルタミン酸神経毒性に対するアポE含有リポ蛋白の神経保護機構の一端を明らかにすることができた。またアポE含有リポ蛋白の LRP1 を介する神経保護機構は、正常眼圧緑内障モデルマウスで誘導される視神経変性に対しても保護効果を発揮することが示された。さらに、アポE含有リポ蛋白の神経保護効果を妨害する 2-マクログロブリンの存在を明らかにした。本研究で明らかにした LRP1 を介する神経保護機構は、新たな緑内障治療薬開発につながると考えている。

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)

Nagayasu, Y., Morita, S., Hayashi, H., Miura, Y., Yokoyama, K., Michikawa, M., and Ito, J., Increasing Cellular Level of Phosphatidic Acid Enhances FGF-1 Production in Long Term-cultured Rat

Astrocytes. Brain Res, 査読有, 1563, 2014, 31-40

Ito, J., Nagayasu, Y., Hoshikawa, M., Kato, K.H., Miura, Y., Asai, K., Hayashi, H., Yokoyama, S., and Michikawa, M. Enhancement of FGF-1 release along with cytosolic proteins from rat astrocytes by hydrogen peroxide. Brain Res, 査読有, 1522, 2013, 12-21

Bai, N., Hayashi, H., Aida, T., Namekata, K., Harada, T., Mishina, M., and Tanaka, K. Dock3 interaction with a glutamate-receptor NR2D subunit protects neurons from excitotoxicity. Mol Brain, 査読有, 6, 2013, 22

Hayashi, H., Eguchi, Y., Fukuchi-Nakaishi, Y., Takeya, M., Nakagata, N., Tanaka, K., Vance, J.E., and Tanihara, H. A potential neuroprotective role of apolipoprotein E-containing lipoproteins through low density lipoprotein receptor-related protein 1 in normal tension glaucoma. J Biol Chem, 査読有り, 287, 2012, 25395-25406

[学会発表](計19件)

林秀樹、伊藤玲奈、上野菜、袁博、高木教夫、アポE含有リポプロテインによる神経保護とその妨害因子の働き、第135回日本薬学会年会2015年3月28日、神戸学院大学(神戸)

林秀樹、小沢由、袁博、高木教夫、グリア細胞由来LRP1リガンドの神経保護における役割、第88回日本薬理学会年会、2015年3月19日名古屋国際会議場(名古屋)

林秀樹、袁博、高木教夫、グルタミン酸誘発神経障害に対するアポE含有リポプロテインとalpha2-マクログロブリンの神経保護におけるバランス、第87回日本生化学会大会、2014年10月16日京都国際会館(京都)

林秀樹、袁博、高木教夫、アポE含有リポタンパク質とalpha2-マクログロブリンの神経保護効果における役割、第57回日本神経化学会大会第36回日本生物学的精神医学会合同大会、2014年10月1日、奈良県文化会館(奈良)

Hayashi H. and Takagi N., Protective effects of high-density lipoproteins against glutamate-induced neurotoxicity in retinal ganglion cells, 2nd Asian International Symposium of Traditional Medicines, 2014年5月10日、東京薬科大

学(八王子)

林秀樹、アポE含有リポプロテインのグルタミン酸誘発神経細胞死に対する保護機構、第86回日本生化学会大会、2013年9月11日(横浜)

林秀樹、グリア細胞由来アポリポ蛋白E含有リポ蛋白による神経細胞死の制御機構、第84回日本動物学会岡山大会、2013年9月26日、岡山大学(岡山)

Hayashi H., A protective role of apolipoprotein E-containing lipoproteins in glutamate-induced neurodegeneration. The Target Meeting's 2nd World Neuroscience Online Conference, 2013年6月18日(Online)

Hayashi H., Neuroprotection by apolipoprotein E-containing lipoproteins against glaucomatous optic neuropathy. 第86回日本薬理学会年会、2013年3月23日、福岡国際会議場(福岡)

林秀樹、アポリポ蛋白E含有リポ蛋白のグルタミン酸神経障害に対する保護作用、第54回日本脂質生化学会、2012年6月8日、九州大学(福岡)

Hayashi H., Neuroprotection by apolipoprotein E-containing lipoproteins via a low density lipoprotein receptor related protein-1 against glutamate-induced degeneration in vitro and in vivo. 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry, 2012年9月30日、神戸国際会議場(神戸)

Hayashi H., A potential therapeutic role of apolipoprotein E-containing lipoproteins in glaucomatous optic neuropathy. Joint meeting with the International Conference on the Bioscience of Lipids and Canadian Lipoprotein Conference, 2012年9月7日、Banff (Canada)

[図書](計2件)

Hayashi H., Springer, Neuroprotection and neurodegeneration for retinal diseases, 2014, pp25-41

Hayashi H., Oxford University Press, Neuroglia Third Edition, 2012, pp281-291

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：リポ蛋白を用いた 2-マクログロブリンの神経保護抑制効果抑止剤及び眼科用組成物

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：PCT/JP2012/073920

出願年月日：平成 24 年 9 月 19 日

国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/ouyoseika>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 秀樹 (HAYASHI HIDEKI)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90508657

(2) 研究協力者

Jean E. Vance

アルバータ大学・医学部・教授