

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591279

研究課題名(和文) 脂質ラフトを標的としたアストロサイト障害抑制の検討

研究課題名(英文) Astrocyte protection by targeting lipid rafts

研究代表者

朝倉 邦彦 (ASAKURA, Kunihiko)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：50333159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：視神経脊髄炎(NMO)患者血清中にaquaporin4(AQP4)に対する抗体が存在する。AQP4には2つのisoformが存在し、このAQP4の2つのisoformを同時に発現する系を作製した。この発現細胞では、AQP4の大部分は脂質ラフト画分に存在した。AQP4発現細胞に、NMO-IgGと補体の添加で約60%の細胞に細胞死が認められたが、methyl-b-cyclodextrinやsimvastatinで前処置を行うと、細胞死が約20%に減少した。このことから、AQP4分子の脂質ラフトへの局在を減少させることにより抗AQP4抗体の作用を軽減させNMO病態を軽減させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neuromyelitis optica (NMO)-IgG is highly specific diagnostic marker for NMO and contributes directly to disease pathogenesis. The target antigen of NMO-IgG was identified as aquaporin-4 (AQP4). There are two major AQP4 isoforms, M1 and M23. We generated M1, M23, and M1/M23 co-expressing astrocyte cell lines. Most of M1 is localized in lipid raft on the membrane; in contrast, M23 is localized in both lipid raft and non-raft fractions when expressed independently. When both M1 and M23 are expressed, the majority of AQP4 is localized in lipid rafts. Cholesterol depletion with methyl-b-cyclodextrin or simvastatin resulted in the relocation of AQP4 from lipid rafts to non-rafts fraction. This change in the localization of AQP4 on membrane significantly reduced complement-dependent cytotoxic effects of NMO-IgG without affecting AQP4 orthogonal arrays. Thus, these data strongly suggest that the targeting of AQP4 in the lipid rafts is closely related to the pathogenic effects of NMO-IgG.

研究分野：神経内科

キーワード：アクアポリン4 視神経脊髄炎 脂質ラフト

1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎(NMO)患者血清中に、アクアポリン4(AQP4)と反応する抗AQP4抗体が存在することが示された。AQP4はアストロサイト足突起に広く分布し、NMOはアストロサイトの障害によって生じる可能性が示唆されている。AQP4は323個のアミノ酸からなるAQP4M1とN末端が22個短いAQP4M23の2種類のAQP4分子が存在し、生体内ではAQP4はheterotetramerの状態が存在する。培養アストロサイトにおいてAQP4はlipid raft画分に存在することが報告され(JBC, 2009)、研究開始当初我々はAQP4M1がlipid raftに存在することを確認していた。それまではAQP4M1またはAQP4M23の単独での発現系を用いて抗AQP4抗体の作用が検討されてきたが、等量のAQP4M1/M23を発現する系はなく、実際の抗AQP4抗体の作用については明確となっていない。最近の知見では、IL-6によって末梢血中のplasmablast(CD20抗原陰性)からの抗AQP4抗体を産生が促進されることが示された(PNAS, 2011)。すなわち、抗CD20抗体によるB細胞抑制のみでは治療が困難な可能性が示唆され、新たな治療法の開発が期待される。

一方、Sphingosine-1-phosphate(S1P)は、免疫系などにおいて重要な調節因子として作用しており、Sphingosine kinase 1(SphK1)により合成され、SphK1は、lipid raftに存在すると考えられている(Arch. Biochem. Biophys., 2009)。S1Pがplasmablastの遊走を制御している可能性が示されている(JI, 2008)。多発性硬化症の治療に用いられるFingolimod(FTY720)は、S1P1受容体アゴニストとして作用し、リンパ組織からのリンパ球の遊走を阻害するとされる免疫抑制剤で、その作用機序は単にリンパ組織に作用するだけでなく、血液脳関門を通過し中枢で直接アストロサイトに作用していることが最近示されている(PNAS, 2011他)。アストロサイトはS1P受容体とSphK1を発現しており、脳内での免疫反応におけるS1P/S1P受容体とSphK1の重要性が示唆されている(PLoS ONE, 2011)。

以上のことから、FingolimodをはじめとするS1P受容体アゴニストはNMOにおけるアストロサイト障害を抑制する可能性とともにplasmablast抑制の可能性がある。従って、AQP4やSphK1が存在するlipid

raftを阻害する、高脂血症治療薬statinやfilipinを用いることにより、アストロサイト障害抑制の可能性が考えられた。

2. 研究の目的

Gateway system (Invitrogen)を用いてAQP4M1とAQP4M23の2種類のAQP4分子に異なる蛍光色素のタグを付けた上で同時に細胞に発現させて、より生理的な状態(heterotetramer)に近いAQP4発現系を作製する。この発現系を用いて、抗AQP4抗体(NMO患者血清)の直接的な作用を補体の存在下と非存在下で検討するとともに、細胞内シグナル伝達を解析する。

また、AQP4が存在するlipid raft microdomainをmethyl- β -cyclodextrinやstatin投与により阻害した場合の、培養細胞における抗AQP4抗体の作用(細胞障害発現の有無)を検討して、lipid raftを標的としたNMO治療の可能性について検討する。

3. 研究の方法

ヒト全長AQP4 cDNAから全長cDNA AQP4M1と22個N末端の短いAQP4M23をPCR法で発現ベクターに組み込みC末端に異なる蛍光色素のタグをつける。これらのベクターからPCR法で遺伝子を切り出し、Gateway system (Invitrogen)を用いて、AQP4M1とAQP4M23の各々の上流にプロモータをつなぎ合わせたplasmidを作製する(これにより、遺伝子導入した細胞では、AQP4M1とAQP4M23が同量発現する)。作製したplasmidをAQP4を発現していないアストロサイト細胞株(OS3)や同じくAQP4を発現しないBHK-21などの細胞にlipofection法によりtransfectionし、stable transformantを作製する。このときベクター内に組み込まれたテトラサイクリンオペレーターを利用してAQP4の発現量を調節する。

このAQP4発現細胞にNMO患者血清を加えて、位相差顕微鏡で形態変化を補体の存在下・非存在下で行い、その変化を解析する。

アストロサイト細胞株にAQP4 M1とAQP4M23を同時に発現させた細胞に、正常血清またはNMO患者血清を2%濃度で添加し、添加後0, 5, 10, 15, 30, 60分後の全細胞蛋白を回収し、抗チロシンリン酸化抗体、抗セリン・スレオニンリン酸化抗体でウェスタンブロットを行い、各リン酸化

の変化を調べた。また、細胞内シグナル伝達の下流に存在する MAPK のリン酸化についても検討した。

AQP4 M1/M23 発現細胞を methyl- β -cyclodextrin (2.5mM) で 24 時間処理した後、正常血清または NMO 患者血清を 2% 濃度で添加し、添加後 0, 5, 10, 15, 30, 60 分後の細胞を回収し、抗チロシンリン酸化抗体、抗セリン・スレオニンリン酸化抗体でウエスタンブロットを行い、各リン酸化の変化を調べるとともに MAPK のリン酸化についても検討した。

4. 研究成果

M1 の C 末端に RFP、M23 の C 末端に AcGFP をつけた発現ベクターを作製し、BHK-21 細胞で stable transformant が得られた。この細胞は蛍光顕微鏡下では、赤い蛍光の M1 と緑色の蛍光の M23 が同時に発現していることが確認され、Western blotting でもその発現が確認された。

Native gel electrophoresis と抗 AQP4 抗体による Western blotting での M1 と M23 の同時発現細胞での解析では、AQP4 分子は 240kDa 以上の位置に認められ、シヨ糖密度勾配超遠心法による抗 AQP4 抗体と抗 GFP 抗体を用いた解析では、M23 は可溶性画分と不溶性画分の両方の画分に存在した。

この細胞株に、非働化した NMO 患者血清を 2% 濃度で反応させたところ、一部の細胞は培養 1 - 2 時間で接着性を失い浮遊した。形態変化した細胞をトリパンブルーで染色したが、細胞死は認められなかった。M1/RFP または M23/AcGFP を単独発現した細胞にも非働化した NMO 患者血清を 2% 濃度で加えたが、形態変化は認められなかった。補体存在下では、NMO-IgG 添加により約 45 分で 60% 程度の細胞死を認めた。一方コレステロールのキレート剤である methyl- β -cyclodextrin で細胞を前処置すると、その細胞死は約 20% に減弱した。同様の結果が、コレステロール合成阻害剤である simvastatin 処理でも確認された。

AQP4 M1/M23 発現細胞に正常血清を添加すると、分子量 40kDa 付近に添加後 5 分からチロシンリン酸化の亢進が認められ、血清添加 30 分後まで持続した。血清添加後 5 分と 10 分での反応が最も顕著であった。NMO 患者血清を加えると、正常血清を加えた場合と同じく分子量 40kDa 付近に添加後 5 分よりチロシンリン酸化亢進が

認められ、添加後 60 分程度まで持続し、正常血清を加えた場合よりも強いリン酸化反応が認められた。一方、AQP4 M1/M23 発現細胞を methyl- β -cyclodextrin で前処理し、脂質ラフトを障害した場合、NMO 患者血清添加によるチロシンリン酸化の亢進は減弱し、正常血清との差はなくなっていた。

セリン・スレオニンリン酸化反応は正常血清を添加した場合と NMO 患者血清を添加した場合で差は認められなかった。また、methyl- β -cyclodextrin で前処理した場合も、セリン・スレオニンリン酸化反応は正常血清を添加した場合と NMO 患者血清を添加した場合で差は認められなかった。

MAPK のリン酸化は、正常血清を添加すると添加後 5 分からリン酸化の亢進が認められ、血清添加 30 分後まで持続した。血清添加後 5 分と 10 分での反応が最も顕著であった。NMO 患者血清を加えると、正常血清を加えた場合と同じく添加後 5 分よりリン酸化の亢進が認められ、添加後 60 分まで持続し、正常血清を加えた場合よりも強いリン酸化反応が認められた。

methyl- β -cyclodextrin で処理した場合、NMO 患者血清添加によるリン酸化の亢進は減弱し、正常血清との差は消失していた。methyl- β -cyclodextrin などによって脂質ラフトを障害することにより、AQP4 分子の局在が変化し、NMO 患者血清による形態変化が認められた細胞が、NMO 患者血清を加えても形態変化をきたさないことが示された。また、同様の結果が simvastatin 投与により得られたことから、スタチンはアストロサイト足突起の脂質ラフトを標的として、AQP4 分子の脂質ラフトへの局在を減少させることにより抗 AQP4 抗体の作用を軽減させ NMO 病態を軽減させる可能性が示唆され、statin による治療の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 5 件)

Asakura K., Ueda A, Mutoh T. Lipid rafts and their possible involvements in neuroimmunological disorders. *Front Biosci* (Landmark Ed) 20: 303-313, 2015. 査読有.
<https://www.bioscience.org/2015/v20/af/4310/fulltext.htm>

Asakura K. Amyloid- β hypothesis in Alzheimer's disease and neurotoxicity of

oligomeric amyloid through glial cells. *Clin Exp Neuroimmunol*. 6:116-117, 2015. 査読無.

Fukui T, **Asakura K**, Hikichi C, Ishikawa T, Murai R, Hirota S, Murate KI, Kizawa M, Ueda A, Ito S, Mutoh T. Histone deacetylase inhibitor attenuates neurotoxicology of clioquinol in PC12 cells. *Toxicology* 331: 112-118, 2015. 査読有.
DOI: 10.1016/j.tox.2015.01.013.

Hirota S, Ito S, Fukui T, Murate K, Shima S, Ueda A, **Asakura K**, Mutoh T. Voriconazole-responsive disseminated nodular lesions on spinal MRI. *Inter Med* 54:215-218, 2015. 査読有.

Asakura K, Ueda A, Shima S, Ishikawa T, Hikichi C, Hirota S, Fukui T, Ito S, Mutoh T. Targeting of aquaporin 4 into lipid rafts and its biological significance. *Brain Res* 1583: 237-244, 2014. 査読有
DOI: 10.1016/j.brainres.2014.08.014.

[学会発表](計8件)

Fukui T, **Asakura K**, Hirota S, Ishikawa T, Shima S, Ueda A, Ito S, Mutoh T. Histone Deacetylase Inhibitor Attenuates Neurotoxicity of Clioquinol. 第56回日本神経学会総会. 2015年5月23日. 新潟. 新潟コンベンションセンター.

朝倉邦彦 福井隆男, 廣田政古, 石川等真, 植田晃広, 島さゆり, 伊藤信二, 武藤多津郎. アクアポリン4のチロシンリン酸化反応. 第26回日本神経免疫学会. 2014年9月4日. 金沢. 金沢歌劇座.

植田晃広, 島さゆり, 石川等真, 福井隆男, 村手健一郎, 廣田政古, 引地智加, 木澤真努香, 伊藤信二, **朝倉邦彦**, 武藤多津郎. 抗中性糖脂質抗体陽性の脳脊髄根末梢神経炎(EMRN)の1例. 第19回日本神経感染症学会学術集会. 2014年9月4日. 金沢. 金沢歌劇座.

朝倉邦彦 福井隆男, 廣田政古, 石川等真, 植田晃広, 島さゆり, 伊藤信二, 武藤多津郎. NMO-IgG1による細胞内シグナル伝達への影響. 第55回日本神経学会総会. 2014年5月21日. 福岡. 福岡国際会議場.

Mutoh T, Shima S, Ishikawa T, Ueda A, **Asakura K**. New autoantibodies against neutral glycolipids in encephalomyeloneuropathy. 2014.4.29. The 66th American Academy of Neurology Annual

Meeting; Philadelphia.

朝倉邦彦, 植田晃広, 河村直樹, 島さゆり, 新美芳樹, 武藤多津郎. 脂質ラフトを標的としたアストロサイト障害抑制. 第25回日本神経免疫学会. 2013年11月28日. 下関. 海峡メッセ下関.

朝倉邦彦, 植田晃広, 河村直樹, 島さゆり, 新美芳樹, 武藤多津郎. 脂質ラフトを標的としたアストロサイト障害抑制. 第54回日本神経学会総会. 2013年5月30日. 東京. 東京国際フォーラム.

朝倉邦彦, 植田晃広, 木澤真努香, 伊藤信二, 武藤多津郎. 生理的アクアポリン4発現系におけるその細胞内局在解析. 第24回日本神経免疫学会. 2012年9月20日. 軽井沢. 軽井沢プリンスホテル.

[その他]
ホームページ等
<http://www.fujita-hu.ac.jp/~sinkei/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
朝倉 邦彦 (ASAKURA, Kunihiko)
藤田保健衛生大学医学部・脳神経内科学・教授
研究者番号: 50333159

(2)研究分担者
武藤 多津郎 (MUTOH, Tatsuro)
藤田保健衛生大学医学部・脳神経内科学・教授
研究者番号: 60190857