

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06781

研究課題名(和文) 神経障害時のグリア細胞由来リポ蛋白による神経保護に関する研究

研究課題名(英文) A study on neuroprotection by glia-derived lipoproteins against nerve injury

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患の一つである緑内障は、視神経を構成する網膜神経節細胞が何らかの原因で変性し、視野を欠損する。研究代表者は以前の研究で、アポリポタンパク質Eを含むリポタンパク質が網膜神経節細胞の変性に対し、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、リポタンパク質の網膜神経節細胞に対する新たな保護機構の解明を試みるとともに、グリア細胞から放出される神経保護妨害因子に対する働きを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Glaucoma is one of the neurodegenerative disorders and the leading cause of blindness in Japan. In our previous study, apolipoprotein E-containing lipoproteins strongly protect primary cultured retinal ganglion cells from glutamate-induced neurodegeneration. Here, we determined a novel neuroprotective mechanism of apolipoprotein E-containing lipoproteins and defined roles of an inhibitory factor against the protective effect of apolipoprotein E-containing lipoproteins.

研究分野：神経科学

キーワード：緑内障 リポタンパク質 グルタミン酸

## 1. 研究開始当初の背景

すでに超高齢社会に突入した日本において、加齢に伴う疾患を予防・治療し、健やかな生活を送り続けることは我々の切なる願いである。しかし加齢に伴う疾患の多くは、生活習慣や免疫力の低下、代謝調節機能の異常やストレスなど多因子性であり、発症機序の解明や治療法・治療薬の開発が困難である。その中でも脳血管疾患や神経変性疾患は、一度障害を受けた神経細胞の再生や破壊されたネットワークの再構築が難しく、発症機序が不明なことも多いことから、特に機能回復が困難な疾患の一群である。ゆえに神経細胞が障害を受け変性する前に保護し、機能を維持することが重要と考えられる。

脳内環境の異常や外傷により神経障害が誘導されると、周辺のグリア細胞からアポリポタンパク質（アポ）Eを含むリポタンパク質の放出量が劇的に増加する。この放出量の増加は、グリア細胞が神経細胞の膜修復に必要な脂質を供給するための反応であると考えられていた。

研究代表者は、上記の神経障害に対するグリア細胞の反応が神経細胞の異常シグナルに対応した神経-グリア連関による神経保護機構の一つであると考え、研究を開始した。

その結果、アポE含有リポタンパク質が神経細胞の軸索障害後の再伸長を促進すること（Hayashi et al., J Biol Chem 2004, Anal Biochem 2004）、またリポタンパク質受容体 low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) を介する細胞内シグナル伝達により、栄養因子欠乏誘導性の神経変性を抑制することを証明した（Hayashi et al., J Neurosci 2007, J Biol Chem 2009）。さらにアポE含有リポタンパク質は LRP1 を介した神経保護シグナルにより、興奮性神経毒グルタミン酸によるカルシウム依存性の神経変性を抑制し、視神経変性疾患（緑内障）モデル動物に対して神経保護効果を発揮した（Hayashi et al., J Biol Chem 2012）。

上記より、神経障害に応答したグリア細胞からのアポE含有リポタンパク質放出の劇的な増加は、神経機能の破綻を防ぎ、恒常性を維持するための生体防御機構の一つであると考えられる。しかしながら研究開始当初、神経細胞からグリア細胞に向けて発せられるアポE含有リポタンパク質放出誘導機構や、長い突起を有する神経細胞が局所で受けた神経保護シグナルを細胞体へと伝達する機構に関しては知見が得られていなかった。

## 2. 研究の目的

神経障害時に神経細胞からグリア細胞に向けて発せられる神経保護分子（アポE含有リポタンパク質）誘導機構を解明する。コンパートメント培養法を応用した神経-グリア部分共培養を用い、アポE含有リポタンパク質放出誘導に両細胞の直接接合が必要か否かを明らかにする。液性因子が関わる場合には、因子の特定にも挑戦する。

グリア細胞由来アポE含有リポタンパク質により遠位の軸索から細胞体へ伝達される神経保護シグナルの存在を明らかにする。そこで神経-グリア部分共培養を用い、軸索を介したシグナルによる細胞体での遺伝子やタンパク質の変化を解析し、逆行性神経保護に重要な因子を特定、メカニズムを明らかにする。

## 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SD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, 1988）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）ミューラーグリア細胞の初代培養

生後2日目から4日目の新生児C57BL/6Jマウスを使用した。マウス網膜を単離し、トリプシンで37、45分間処理後、パスツールピペットを用いて細胞懸濁液を作製した。細胞懸濁液を10%ウシ胎児血清入りのDMEM培養液で約1週間培養後、細胞を播き変え、さらに約1週間培養後に実験に使用した。

### （3）人工再構成アポE含有リポタンパク質の作製

ヒト組換えアポEタンパク質、コレステロール、ホ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含有リポタンパク質を作製した。コレステロールとホ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タンパク質を加えた。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含有リポタンパク質を形成した。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タンパク質を単離した。

### （4）アポE含有リポタンパク質の単離

高密度リポタンパク質と同等の比重のアポE含有リポタンパク質を単離するため、上記(3)で作製したリポタンパク質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タンパク質画分のうちアポE含有量の多い3画分を回収し、濃縮後、実験に使用した。

#### (5) 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。

### 4. 研究成果

#### (1) コンパートメント培養法を利用した逆行性神経保護効果の検討

神経細胞単独のコンパートメント培養による実験で、細胞体コンパートメントへのグルタミン酸添加による神経変性に対して、軸索コンパートメントへのアポE含有リポタンパク質添加が保護効果を発揮した。本結果は、アポE含有リポタンパク質が軸索で誘発した何らかの保護シグナルが逆行性に細胞体へと伝わり、細胞体近傍部で誘発された神経変性を抑制したこと(逆行性神経保護)を示している。

#### (2) コンパートメント培養法を利用した逆行性神経保護機構の解析(細胞内カルシウム濃度変化)

軸索コンパートメントへのアポE含有リポタンパク質添加による神経保護効果に、細胞体でのカルシウム濃度変化が関与するかを検討した。解析には、カルシウム蛍光指示薬であるFluo 8-AMを使用し、蛍光顕微鏡下でリアルタイム解析を行った。その結果、軸索コンパートメントへのアポE含有リポタンパク質の添加の有無に関わらず、細胞体でのグルタミン酸刺激によるカルシウム濃度上昇のレベルに変化は観察されなかった。このことから細胞内へのカルシウム流入後の細胞死誘導機構に逆行性の神経保護シグナルが関与すると考えられた。

#### (3) コンパートメント培養法を利用した逆行性神経保護機構の解析(細胞内シグナル分子の変化)

逆行性神経保護効果に関わる細胞内シグナル分子のリン酸化レベルの変化をイムノプロット法により検討した。しかしながら現在までのところ、軸索コンパートメントへのアポE含有リポタンパク質添加による神経保護に重要なシグナル分子は明らかにできていない。今後は蛍光免疫染色やPCR解析などにより逆行性神経保護機構に関わる因子の特定を目指す。

#### (4) 神経障害時に神経細胞からグリア細胞に向けて発せられる神経保護分子(アポE含有リポタンパク質)誘導機構の検討

コンパートメント培養法を用いて、神経障害誘導時にグリア細胞からのアポE含有リポタンパク質の放出を誘導するシグナルの解明を試みた。しかしながら本シグナル経路を特定するには至らなかった。ところが本解析の遂行にあたり、アポE含有リポタンパク質が、神経保護を妨害する2マクログロブリンの放出を抑制することを発見した。

#### (5) ミューラーグリア細胞からの2マクログロブリン放出に及ぼすアポE含有リポタンパク質の効果

初代培養ミューラーグリア細胞の培養液中にアポE含有リポタンパク質を添加し、24時間後の2マクログロブリン放出量(培養上清中含量)をイムノプロット法により解析した。その結果、アポE含有リポタンパク質添加によって、濃度依存的に2マクログロブリン放出量が減少することが示された。またミューラーグリア細胞内のタンパク質発現量も同様に減少していることが明らかとなった。

以上の結果から、細胞体近傍部で誘発される神経変性に対する逆行性神経保護機構の存在を明らかにすることができた。しかしながら詳細なメカニズムについては不明であり、今後の検討課題である。また本研究の遂行中に、アポE含有リポタンパク質がミューラーグリア細胞からの2マクログロブリン放出に影響を及ぼすことを明らかにした。2マクログロブリンはアポE含有リポタンパク質の神経保護効果を妨害する因子として働くことから、今後、より詳細な検討を行うことで、本研究成果を緑内障治療法の開発研究に繋げたいと考えている。

### 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7件)

Yamada M, Hayashi H, Yuuki M, Matsushima N, Yuan B, Takagi N. Furin inhibitor protects against neuronal cell death induced by activated NMDA receptors. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 5212. doi:10.1038/s41598-018-23567-0. 査読有

Kisoh K, Hayashi H, Itoh T, Asada M, Arai M, Yuan B, Tanonaka K, Takagi N. Involvement of GSK-3 Phosphorylation Through PI3-K/Akt in Cerebral Ischemia-Induced Neurogenesis in Rats. *Mol Neurobiol*. 2017 Dec;54(10):7917-7927. doi: 10.1007/s12035-016-0290-8. 査読有

Hayashi H, Takagi N. Endogenous Neuroprotective Molecules and Their Mechanisms in the Central Nervous System. *Biol Pharm Bull*. 2015; 38(8): 1104-8. doi: 10.1248/bpb.b15-00361. 査読有

[学会発表] (計 23 件)

林 秀樹、森みすず、袁 博、高木 教夫 ラット緑内障モデルに対するアポ E 含有リポタンパク質の視神経保護因子としての働き 第 138 回日本薬学会 2018 年

林 秀樹、森みすず、橋爪 達哉、原嶋 美奈、降矢 実穂、森 寛子、袁 博、高木 教夫 リポタンパク質受容体 LRP1 を介した視神経保護と網膜グリア細胞の働き 第 90 回日本生化学会 2017 年

林 秀樹、森みすず、橋爪 達哉、原嶋 美奈、降矢 実穂、森 寛子、袁 博、高木 教夫 ラット緑内障モデルのリポタンパク質受容体 LRP1 を介した視神経保護と網膜グリア細胞の働き 第 19 回応用薬理シンポジウム 2017 年

林 秀樹、森みすず、橋爪 達哉、原嶋 美奈、降矢 実穂、森 寛子、袁 博、高木 教夫 視神経保護におけるアポリポタンパク質 E 含有リポタンパク質と 2-マクログロブリンの役割 第 59 回日本脂質生化学会 2017 年

H. Hayashi Neuroprotective roles of apo E-containing lipoproteins against optic nerve degeneration Bridging Discovery Research with Therapies 2017

H. Hayashi, M. Mori, M. Harashima, T. Hashizume, M. Furiya, H. Mori, B. Yuan, N. Takagi Apolipoprotein E containing lipoproteins prevent optic nerve degeneration with a reduction of alpha 2 macroglobulin secretion from retinal glia *Neuroscience* 2017

林 秀樹、森みすず、橋爪 達哉、原嶋 美奈、降矢 実穂、森 寛子、袁 博、高木 教夫 視神経保護におけるアポ E 含有リポタンパク質とアルファ 2-マクログロブリンの働き 第 137 回日本薬学会年会 2017 年

H. Hayashi, M. Mori, Y. Ban, B. Yuan, N. Takagi Neuroprotective functions of apolipoprotein E-containing lipoproteins in neurons and glia of retina *Neuroscience* 2016

林秀樹、森みすず、伊藤玲奈、小沢由、上野菜、坂祐樹、袁博、高木教夫 網膜の神経変性に対するアポ E 含有リポタンパク質の神経保護効果 第 89 回日本薬理学会年会 2016 年

[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: 特許第 6031718 号

取得年月日: 平成 28 年 11 月 4 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<https://www.ps.toyaku.ac.jp/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