

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07768

研究課題名(和文) 中枢グリア細胞における酸化ストレス防御のためのスーパーオキシドディスムターゼの役割

研究課題名(英文) Roles of Superoxidedismutase in Central Glia for Protection from Oxidative Stress

研究代表者

中村 洋一 (Nakamura, Yoichi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：90180413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞障害性の高いスーパーオキシドを消去する3種のディスムターゼのうち、細胞外で機能するEC-SODの活性は、中枢においてアストロサイトで顕著である。アストロサイトのEC-SODに及ぼす各種の刺激を検索したところ、3つの興味深い結果を得た。脳浮腫のモデルとして、培養液を水希釈するとEC-SOD活性が上昇した。また、exendin-4 (GLP1 agonist)の添加によりEC-SOD発現が上昇した。一方、プリオンペプチド (PrPc106-126)を添加するとEC-SOD活性が約1/10に減少した。これらの結果は酸化的ストレスに起因する各種中枢疾患克服にアストロサイト研究の重要性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Among three types of superoxidedismutase (SOD), extracellular type (EC-SOD) is abundant in astrocytes in CNS. We examined several stimulations on EC-SOD in astrocytes and found three interesting results. When the culture medium was diluted with water, as a brain edema model, EC-SOD activity increased significantly. The addition of exendin-4 (an agonist for GLP-1 receptor) increased the expression of EC-SOD in mRNA and protein. The stimulation with a fragment of prion protein (PrPc106-126) decreased EC-SOD activity to about 10%. These results suggest the importance of the studies focused on astrocytes for conquest of various central diseases due to oxidative stress.

研究分野：基礎獣医学

キーワード：細胞外スーパーオキシドディスムターゼ アストロサイト 脳浮腫 プリオン蛋白 エキセンディン4

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患の治療戦略の基盤構築のために、我々はグリア細胞機能に注目して、特にミクログリアとアストロサイトの機能変化を起こす薬剤や、刺激によって起こった機能変化を押さえ込む薬剤などの検索に注力してきた。本研究課題では、脳内で活性酸素種を低減して酸化ストレスからの保護に重要な役割を果たしているアストロサイトの EC-SOD の存在や動態について検討することとした。

2. 研究の目的

銅イオン(Cu^{2+})の代謝に関連したものであることが予想されている正常プリオン蛋白(PrP_c)の機能詳細は不明である。 Cu^{2+} を利用する生体機能分子の中で、最も重要な酵素のひとつにスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)があるが、中枢神経系における SOD 活性についての知見は少なく、その局在や活性調節機序の詳細も不明な点が多い。中枢神経活動にはニューロン/グリア細胞の相互作用や、グリア細胞による構造的/機能的支援が不可欠である。中枢グリア細胞には様々な受容体を発現していることが知られているが、それら受容体がグリア細胞機能をどの様に調節しているのかについて、全貌は明らかとなっていない。最近我々はアストロサイトの EC-SOD 活性が他の中枢細胞に比して著しく高いことを見いだした。本研究の目的は、この高いアストロサイトの EC-SOD 活性をニューロン細胞障害に対する重要な保護機構の一つとして位置付けて、その活性がどのような要因により変動するかについて検討を加え、脳内における役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

- (1)初代培養アストロサイトは胎齢20日齢のWistarラット胎仔大脳皮質から調製した。CO₂インキュベーター内で3週間培養後、実験に用いた。
- (2)EC-SOD活性は生細胞培養液にWST-1色素とO₂⁻産生系を直接添加し、O₂⁻の発色反応とSODによる除去が競合的に奪い合うことを利用し、WST-1発色阻害率からSOD活性を算出した。

- (3)EC-SOD蛋白の発現量に関しては、抗EC-SOD抗体(Enzo Life Sciences, Inc. (Plymouth Meeting, PA, USA))を用いて、ウェスタンブロット法により β -actinを内部標準として評価した。
- (4) EC-SOD mRNAの発現量に関してはリアルタイムPCR法によりrRNA量を内部標準として評価した。
- (5)プリオン蛋白の断片による刺激には、PrP₁₀₆₋₁₂₆ (Sigma)をリン酸緩衝液 pH 5.0 中で2 mM に溶解して2日間37°Cで静置して繊維化させたものを用いた。

4. 研究成果

平成 27 年度に得られた興味深い結果のひとつは、低浸透圧刺激によりアストロサイトの細胞膜表面の EC-SOD 活性が上昇したことである。脳浮腫は肝性脳症や外傷を始めとするいくつかの中枢疾患の病態要因となるが、アストロサイトはそのような状況下で中枢細胞の機能破綻を防御する機能を担うとされている。アストロサイトは自らの細胞浮腫を助長して、中枢間質の低浸透圧化を軽減することにより、ニューロンの浮腫による破綻を防御している可能性が指摘されており、我々の経験でも培養アストロサイトはニューロンやミクログリアに比して低浸透圧に対する抵抗性は非常に高い。

アストロサイトの培養液に水を 5~40% vol 加えた状態で 24 時間培養すると、水添加量依存的に EC-SOD 活性が 2 倍程度に上昇した。このとき生細胞数はほとんど変化しなかったが、100 ng/ml LPS 刺激による NO 産生量は減少した。低浸透圧の状況下でアストロサイトの細胞膜表面 SOD 活性が上昇することは、上記の脳浮腫に対するニューロン防御機構に加えて抗酸化作用の増強による保護があることが示唆される。

平成 28 年度にはエクセンディン 4 (Ex-4) に EC-SOD 発現増強効果を見出したことである。Ex-4 はアメリカドクトカゲの唾液由来のペプチド(39 a.a.)で glucagon-like peptide-1 (GLP-1)の類似体である。GLP-1 は脳において延髄の孤束核ニューロンでも産生されており、GLP-1 受容体がニューロンやグリア細胞にも広く発現し神経保護的に働くことが報告されている。アミロイド

β による酸化ストレスを介したニューロン死を抑制することや、グルタミン酸の興奮毒性に対して保護的に作用すること、あるいは活性化アストロサイトの炎症性サイトカイン産生を低下させるという報告があり、アルツハイマー病やパーキンソン病のモデルマウスでも神経保護効果が報告されている。

興味深い結果は、Ex-4 により刺激された培養アストロサイトでは EC-SOD の mRNA と蛋白質発現が濃度依存的に増加し、それは GLP-1 受容体阻害薬により抑制されることから GLP-1 受容体を介した反応であることが示唆される。しかしながら EC-SOD 活性の増加は観察できなかった。翻訳後修飾や培養液中へ遊離についても更なる検討が必要であるが、神経保護作用を示す Ex-4 の作用機序として新に提唱できる可能性が高い。

平成 29 年度に得られた興味深い結果は、プリオン蛋白断片(PrP₁₀₆₋₁₂₆)のアストロサイト EC-SOD 活性に与える影響である。プリオン病の原因とされる異常化プリオン蛋白の異常化する前の正常プリオン蛋白(PrP_c)の生理機能の詳細は未だ不明であるが、その構造には Cu²⁺と結合する部位があり、Cu²⁺を細胞内に取り込む働きをしているとする仮説が成り立つ。SOD1 と SOD3(=EC-SOD)は Cu²⁺を補助因子として必要とするので、PrP_c が EC-SOD 活性に何らかの影響を与えている可能性がある。

アストロサイトを PrP₁₀₆₋₁₂₆ で 4 日間刺激すると EC-SOD 活性が約 10%までに減少するという結果を得た。今後 3 種類の SOD の mRNA と蛋白レベルの変化や細胞内 Cu²⁺の定量などを合わせて論文報告したい。

細胞外での PrP_c の蓄積は SOD 活性を抑制し、酸化的ストレスに脆弱となった結果、進行性のニューロン脱落に至る可能性がある。家族性 ALS も SOD の異常が原因となっていることが知られているおり、PrP_c と SOD の関連が明らかになればプリオン病や ALS をはじめとする中枢神経疾患の病態解明に新しい展開が導かれる可能性がある。

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 10 件)

- ① K Kawabe, K Takano, M Moriyama, Y Nakamura. (2018) Microglia endocytose amyloid-beta through the binding of transglutaminase 2 and milk fat globule EGF factor 8 protein (MFG-E8). *Neurochem Res* 43(1), 32-40. DOI: 10.1007/s11064-017-2284-y
- ② K Takano, M Ogawa, K Kawabe, M Moriyama, Y Nakamura. (2018) Inhibition of gap junction elevates glutamate uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Res*, 43(1),50-56. DOI: 10.1007/s11064-017-2316-7
- ③ M Moriyama, S Fujitsuka, K Kawabe, K Takano, Y Nakamura (2018) Zinc potentiates lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in cultured primary rat astrocytes. *Neurochem Res*, 43(2), 363-374. DOI: 10.1007/s11064-017-2431-5
- ④ K Takano, N Ishida, K Kawabe, M Moriyama, S Hibino, T Choshi, O Hori, Y Nakamura. (2018) A dibenzoylmethane derivative inhibits lipopolysaccharide-induced NO production in mouse microglial cell line BV-2. *Neurochem Int*, in press. DOI:10.1016/j.neuint.2017.04.002
- ⑤ K Takano, K Koarashi, K Kawabe, M Itakura, H Nakajima, M Moriyama, Y Nakamura. (2018) Insulin expression in cultured astrocytes and the decrease by amyloid b. *Neurochem Int*, in press. DOI:10.1016/j.neuint.2017.10.017
- ⑥ M Moriyama, A Hashimoto, H Satoh, K Kawabe, M Ogawa, K Takano, Y Nakamura (2018) S-Equol, a major isoflavone from soybean, inhibits nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated rat astrocytes partially via the GPR30-mediated pathway. *Int J Inflammation*, in press. DOI: 10.1155/2018/8496973
- ⑦ K Kawabe, K Takano, M Moriyama, Y Nakamura. (2017) Amphotericin B increases transglutaminase 2 expression associated with upregulation of

endocytotic activity in mouse microglial cell line BV-2. *Neurochem Res*, 42(5), 1488-1495.

DOI:10.1007/s11064-017-2205-0

- ⑧ K Kawabe, K Takano, M Moriyama, Y Nakamura. (2017) Transglutaminases derived from astrocytes accelerate amyloid-beta aggregation. *Neurochem Res*, 42(8), 2384-2391. DOI: 10.1007/s11064-017-2258-0
- ⑨ M Moriyama, R Kurebayashi, K Kawabe, K Takano, Y Nakamura (2016) Acetate attenuates lipopolysaccharide- induced nitric oxide production through an anti-oxidative mechanism in cultured primary rat astrocytes. *Neurochem Res*, 41(11), 3138-3146. DOI: 10.1007/s11064-016-2038-2
- ⑩ K Kawabe, K Takano, M Moriyama, Y Nakamura (2015) Lipopolysaccharide-stimulated transglutaminase 2 expression enhances endocytosis activity in mouse microglial cell line BV-2. *Neuroimmunomodulation*, 22(4), 243-249. DOI:10.1159/000365484

〔学会発表〕(計 13 件)

- ① 高野桂, 河邊憲司, 森山光章, 中村洋一. グリア細胞におけるトランスグルタミナーゼ発現と細胞機能における役割. 日本薬学会第 138 年会, 金沢(2018/3)
- ② Y Nishimura, M Moriyama, K Takano, Y Nakamura. Medium chain fatty acid attenuates lipopolysaccharide-induced NO production in cultured microglia. 第 60 回日本神経化学学会大会, 仙台 (2017/9)
- ③ K Takano, K Koarashi, M Moriyama, Y Nakamura. Effects of amyloid- β and lipopolysaccharide on insulin expression in cultured astrocytes. 第 60 回日本神経化学学会大会, 仙台 (2017/9)
- ④ 西村恭徳, 森山光章, 高野桂, 中村洋一. ココナッツ油主成分ラウリン酸によるミクログリア活性化の抑制. 第 160 回日本獣医学会学術集会, 鹿児島 (2017/9)
- ⑤ 高野桂, 河邊憲司, 森山光章, 中村洋一. ミクログリアによるアミロイド β 取り込みにおける milk fat globule EGF factor 8

protein とトランスグルタミナーゼの関与. 第 132 回日本薬理学会近畿部会, 大阪 (2017/11)

- ⑥ 河邊憲司, 高野桂, 森山光章, 中村洋一. 中枢グリア細胞におけるトランスグルタミナーゼの機能. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017), 神戸 (2017/12)
- ⑦ K Takano, K Sugita, N Ishida, M Moriyama, S Hibino, T Choshi, R Murakami, M Yamada, H Suzuki, O Hori, Y Nakamura A dibenzoylmethane derivative inhibits lipopolysaccharide-induced NO production. 第 89 回日本薬理学会年会, 横浜, (2016/3)
- ⑧ 高野桂, 杉田くみこ, 日比野俐, 町支臣成, 村上里香, 山田昌司, 鈴木啓仁, 堀修, 森山光章, 中村洋一, ジベンゾイルメタン誘導体による培養アストロサイトの機能変化. 日本薬学会第 136 年会, 横浜(2016/3)
- ⑨ K Kawabe, K Takano, M Moriyama, Y Nakamura. Microglia uptake amyloid- β via milk fat globule EGF factor 8. 第 38 回日本生物学的精神医学会/第 59 回日本神経化学学会大会 合同年会, 福岡(2016/9)
- ⑩ M Moriyama, K Kawabe, A Hashimoto, Y Nishimura, K Matoba, K Takano, Y Nakamura. Effects of acetate on LPS-induced nitric oxide production in primary rat microglia and BV-2 cell line. 第 38 回日本生物学的精神医学会/第 59 回日本神経化学学会大会合同年会, 福岡 (2016/9)
- ⑪ K Kawabe, K Takano, M Moriyama, Y Nakamura. Astrocytes accelerate amyloid-beta; aggregation by transglutaminase activity. 第 89 回日本生化学学会大会, 仙台(2016/9)
- ⑫ M Moriyama, R Kurebayashi, K Kawabe, A Hashimoto, K Takano, Y Nakamura Acetate attenuates LPS-induced nitric oxide production in cultured astrocytes. 第 58 回日本神経化学学会大会, 大宮 (2015/9)
- ⑬ 河邊憲司, 高野桂, 森山光章, 中村洋一 ミクログリアの組織型トランスグルタミ

ナーゼ発現とエンドサイトーシスに対するアンホテリシン B の効果. BMB2015 第38回日本分子生物学会年会/第88回日本生化学会大会 合同大会, 神戸 (2015/12)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 洋一 (NAKAMURA Yoichi)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：90180413

(2)研究分担者

森山 光章 (MORIYAMA Mitsuaki)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：20275283

高野 桂 (TAKANO Katsura)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：50453139