

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850209

研究課題名(和文) 蛋白凝固剤トランスグルタミナーゼのグリア細胞機能調節因子としての可能性

研究課題名(英文) Transglutaminases might be involved in lipopolysaccharide-induced glial activation.

研究代表者

高野 桂 (Takano, Katsura)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：50453139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：トランスグルタミナーゼ(TG)は蛋白質の架橋結合形成酵素であり、生体内ではTG1～7までと血液凝固第13因子の8種類の存在が知られている。各TGは特定の組織に発現し特定の機能を果たす酵素であるが、中でもTG2は全身に広く分布する多機能酵素であり、これまでの研究において神経変性疾患への関与が指摘されている。本研究では、グリア細胞でのTG2の発現変化と細胞機能との関連を検討した結果、活性化したグリア細胞ではTG2の発現とTG活性の上昇が見られることが明らかとなり、グリア細胞の主要な機能である一酸化窒素の産生や死細胞等の異物の貪食に、TG2発現あるいはTG活性が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Activation of glia has been observed in neurodegenerative diseases. Engulfment of neurons by activated microglia may play roles in the pathogenesis of neurodegeneration. Transglutaminase 2 (TG2) is a cross-linking enzyme, which is activated in neurodegenerative diseases. We previously demonstrated in cultured astrocytes that the expression of TG2 was increased by lipopolysaccharide (LPS)-stimulation. LPS-induced NO production was inhibited by cystamine (inhibitor of TG activity); suggesting that TG2 induction in the activated astrocytes may associate with NO production. In the present study, we examined the expression of TG2 in mouse microglial cell line BV-2. We found that LPS increased TG2 expression and TG activity also in BV-2 cells. LPS increased the endocytosis in BV-2 cells, and cystamine significantly suppressed the LPS-induced endocytosis. These results suggest that the increased expression of TG2 in activated microglia might be involved in the mechanism of their endocytosis.

研究分野：神経化学

キーワード：グリア細胞 トランスグルタミナーゼ アストロサイト ミクログリア 一酸化窒素 エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系は、主に神経細胞とグリア細胞により構築される。神経細胞は相互のネットワーク形成を通じて直接的に神経情報伝達に参与するのに対して、グリア細胞は神経細胞の物理的保護や生存性決定、あるいは伝達物質前駆体の供給等に中心的役割を演じる。近年、グリア細胞が脳内の環境を監視し、神経細胞の正常な情報伝達に積極的に参与していることも明らかになりつつある。グリア細胞はアストロサイト、ミクログリアおよびオリゴデンドロサイトに分類され、アストロサイトは上述のように神経細胞の支持に働くのに対して、脳内マクロファージであるミクログリアは、傷害された神経細胞の除去やサイトカイン等の産生による免疫応答に寄与し、オリゴデンドロサイトは脳内において神経軸索の髄鞘を形成するのが主な役割である。しかしながら、アストロサイトやミクログリアの異常活性化は、脳虚血やアルツハイマー病、パーキンソン病等の神経変性疾患発症メカニズムに深く関与することも指摘されている。

トランスグルタミナーゼ(TGs)は蛋白質のグルタミン残基とリジン残基との間で架橋結合を形成する酵素であり、ヒトでは8種類の遺伝子が同定されている。中でもtissue-type transglutaminase (tTG; TG2)は生体内に広く存在し、種々のストレス状況下において発現誘導されることが報告されており、多機能酵素として知られている。また、血液凝固第13因子の活性部位であるAサブユニット(FXIII-A)もTGsの1つであり、血液凝固以外に、細胞内でのシグナル伝達に関与するとの報告がある。

近年、前述の様々な神経変性疾患において、TG2の発現上昇が認められることや、それらの疾患に特徴的な凝集体の構成蛋白がTG2の基質となること、アルツハイマー病患者の死後脳においてミクログリアでのFXIII-Aの発現が上昇していることなどが報告されていることから、中枢神経系におけるTGsの役割が注目されてきている。また、TGsの阻害剤であるシスタミンにより、ポリグルタミン病モデル動物における神経細胞保護および症状改善が認められることも報告されていることから、TGsの機能制御による凝集体形成抑制および神経変性抑制の可能性が期待される。脳におけるTGsの解析は神経細胞に関するものが多く、グリア細胞に関する報告は少ない。我々はこれまでに、ラット由来培養アストロサイトにTG2が発現しており、lipopolysaccharide (LPS)刺激によりTG2発現が増加すること、またLPS誘導性のNO産生にTGが関与する可能性を報告している。

生理的条件下で脳内に静的に常在しているミクログリアは、貪食機能が必要な場合には強く活性化され、貪食機能が不必要な場合には逆に活性化が沈静されて、脳内の機能と構造の巧妙な維持を行っている。ミクログリ

アの活性化と沈静化のバランスが崩壊すると、周辺の神経細胞に対する破壊作用が優勢となり、死細胞だけでなく、生きている神経細胞さえも貪食により除去してしまう可能性が報告されている。したがって、貪食能などのミクログリアの主要な機能の調節は、神経細胞の維持において非常に重要である。しかしながら、ミクログリアにおけるTGsの発現とその機能解析はこれまでのところほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

これまでのTGsの機能解析は神経細胞に関するものが多く、グリア細胞での種々のTGsの発現変化やその機能についての詳細な検討はなされていない。そこで本研究では、グリア細胞におけるTGsの生理的役割および病態時における変化を解明する。脳病態時にはグリア細胞の活性化が報告されており、グリア細胞が病態の発症・増悪の原因ともなることが示唆されている。種々のTGsの中でも特にTG2とFXIII-Aは神経変性疾患への関与が示唆されており、TG2はマクロファージにおける死細胞貪食に関与するとの報告もある。しかしながら、FXIII-Aは血液凝固に関する論文がほとんどで、グリア細胞はもちろんのこと、中枢神経系に関する報告もほとんどなされていない。本研究では、アストロサイトやミクログリアの各種培養細胞を用いてTGsの発現変化の検討を行い、グリア細胞におけるその機能的役割を解明する。

3. 研究の方法

蛋白質凝固剤として食品加工によく用いられる酵素:トランスグルタミナーゼ(TGs)は、細胞の増殖や分化にも関与している可能性が示唆されている。本研究では、脳機能維持に重要なグリア細胞の機能に関して、TGsが細胞内での主要な機能調節分子である可能性について検証する。本研究では、培養細胞を用いて、グリア細胞におけるTGsの発現変化とその機能を検討した。

*TGsはグリア細胞の機能調節分子なのか？

(1) TGsの発現および活性測定

ラット由来培養アストロサイトおよびマウスミクログリア細胞株であるBV-2細胞を用いてTGsの発現および活性測定を行った。リアルタイムPCR法を用いてmRNAレベルの解析を、western blotting法を用いて蛋白質レベルの解析を行った。TGs活性はTGsの基質となるbiotin-conjugated pentylamineを細胞に取り込ませ、蛋白と結合したpentylamineのbiotin基を、horse radish peroxidase (HRP)標識したNeutrAvidinで認識し、化学発光基質で検出することにより、測定した。

また、グリア細胞を活性化することが報告されているlipopolysaccharide (LPS)やamphotericin B (AmB)、パーキンソン病モデル作製に使用される6-hydroxydopamine

(6-OHDA)やロテノン、酸化ストレスを引き起こす過酸化水素 (H_2O_2) を培養液に添加し、TGs の発現および活性の変化を解析した。

(2) TGs 発現調節メカニズムの検討

TG2 の発現には転写因子 NF- κ B や酸化ストレスが関与することがすでに報告されている。したがって、(1) で解析した TGs の発現変化が、NF- κ B 阻害剤や抗酸化剤によって抑制されるかどうかを検討した。

(3) グリア細胞機能における TGs の役割

末梢の細胞において、TGs が遊走や貪食に関与する可能性が示唆されている。ミクログリアの貪食能に対する影響を検討するため、蛍光顕微鏡を用いて蛍光マイクロビーズの取り込みを測定した。蛍光マイクロビーズ以外に、実験的に細胞死を誘導した神経細胞をミクログリアに添加し、貪食程度を解析した。また、LPS でグリア細胞を活性化すると一酸化窒素 (NO) を産生することが知られている。NO 産生は DAN 試薬法により測定し、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の蛋白質発現を western blotting 法により解析した。

さらに、これらのグリア細胞機能に対して、TGs 活性阻害剤の添加による影響を検討した。

(4) 蛋白凝集に対する TGs の影響

神経変性疾患に特徴的な凝集体の形成が、(1)、(2) で検討したグリア細胞の TGs 発現変化によって変化するのかどうかを検討した。アルツハイマー病に特徴的な凝集体 (老人斑) に含まれるアミロイド β は、試験管内でもアミロイド線維状凝集体を形成することが知られている。グリア細胞の培養上清を添加することにより、凝集体形成に変化が起こるかどうかを、アミロイド β 抗体を用いた western blotting 法により解析した。

4. 研究成果

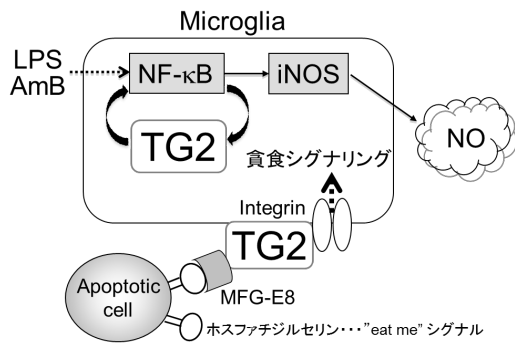
これまでの研究において、培養アストロサイトを LPS で刺激すると、TG2 の mRNA および蛋白質発現が誘導されることを報告している。また、LPS 誘導性の TG2 発現は、転写因子 NF- κ B の阻害剤を同時に添加しておくことで抑制されたことから、NF- κ B によって調節されていると考えられる。さらに、LPS によって誘導された iNOS 蛋白質発現と NO 産生は、TG 阻害剤であるシスタミンを同時に添加しておくことによって抑制されたことから、TG2 発現あるいは TG 活性が NO 産生に関与している可能性が示唆された (Takano et al., *Neurochemistry International*, 2010)。

本研究において、パーキンソン病モデル作製に使用される 6-OHDA およびロテノンを培養アストロサイトに添加したところ、LPS と同様に TG2 蛋白質発現の増加が認められた。酸化ストレスを直接引き起こす H_2O_2 を添加した場合においても、TG2 蛋白質発現の増加が認められた。6-OHDA、ロテノンによるアストロサイトの TG2 発現増加は酸化ストレスを介

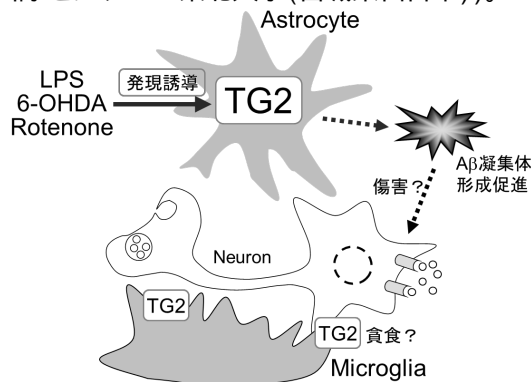
していると考えられる (学会発表)。したがって、パーキンソン病を含む神経変性疾患における脳内での TG2 発現上昇に、アストロサイトの TG2 発現増加が関与することが示唆された。

一方、もう一つのグリア細胞であるミクログリアにおける TGs の発現を、マウスミクログリアの細胞株である BV-2 細胞を用いて解析した。その結果、TGs のうち TG2 と FXIII-A が発現しており、LPS で 24 時間刺激することにより、TG2 の mRNA 発現が上昇し、FXIII-A mRNA 発現は低下した。LPS 刺激により、TG2 蛋白質発現も増加し、TG 活性も有意に上昇した。転写因子 NF- κ B の阻害剤を LPS と同時に添加すると、TG2 発現増加と TG 活性の上昇は抑制されたが、FXIII-A 発現の低下は変化しなかった。したがって、LPS による TG2 発現誘導には転写因子 NF- κ B が関与することが示唆された (学会発表)。BV-2 細胞において、LPS 刺激によって NO 産生が誘導され、TG 阻害剤の添加により抑制されたことから、アストロサイトと同様に、BV-2 細胞においても、LPS 誘導性の NO 産生に TG が関与することが示唆された。さらに、ミクログリアの主要な機能の一つである貪食能を蛍光マイクロビーズの取り込みによって評価したところ、LPS 刺激により BV-2 細胞のビーズ取り込みが上昇した。同様に、死細胞の貪食を評価するため、ヒト神経芽細胞種 SH-SY5Y 細胞を H_2O_2 に曝露し、得られた死細胞の核を蛍光色素で染色したものを BV-2 細胞に取り込ませた。その結果、死細胞の貪食も LPS 刺激により有意に上昇した。これらの LPS 刺激による蛍光ビーズまたは死細胞の取り込み増加は、TG 阻害剤を LPS と同時に添加しておくことによって抑制された。したがって、LPS によって活性化された BV-2 細胞の貪食に、TG が関与することが示唆された (雑誌論文, 学会発表)。

抗真菌薬である amphotericin B (AmB) は、我々のこれまでの研究において、培養アストロサイトおよびミクログリアを活性化し、iNOS 発現および NO 産生を誘導することを報告している。また、AmB は、培養アストロサイト、ミクログリアに添加した場合だけでなく、ラット脳内に投与することにより、特定の神経栄養因子の発現を増加させた (雑誌論文, 学会発表)。上述のように、LPS 刺激により BV-2 細胞の TG2 発現が増加したことから AmB による TG2 発現の変化を解析した。その結果、AmB によっても BV-2 細胞の TG2 発現が増加した。さらに、AmB 刺激によって蛍光マイクロビーズおよび死細胞の取り込みが上昇し、TG 阻害剤を AmB と同時に添加することによって抑制された。したがって、AmB によって誘導される BV-2 細胞の貪食においても、TG が関与することが示唆された (学会発表, 学会発表)。



神経変性疾患に特徴的な凝集体形成に、アストロサイトの TGs 発現が関与するかどうかを検討するため、アルツハイマー病の老人斑の主要な構成分子であるアミロイド (A β) の凝集体形成に対する影響を解析した。アストロサイトの培養上清を A β と混和し 37 $^{\circ}$ C でインキュベートしたところ、新鮮な培養液と混和してインキュベートした場合と比較して、A β の凝集体形成が促進された。この時、TG 阻害剤を同時に添加すると、凝集体形成は遅延した。したがって、アストロサイトに発現する TGs が凝集体形成に関与する可能性が示唆される(第 89 回日本生化学会大会にて発表予定、Kawabe et al., 2016 年 9 月 25-27 日, 仙台国際センター・東北大学(宮城県仙台市))。



以上の結果から、アストロサイトおよびミクログリアにおいても TGs が発現しており、中でも神経変性疾患において発現が上昇すると報告されている TG2 は、グリア細胞を活性化した際に発現増加することが明らかとなった。グリア細胞の活性化は、神経変性疾患において認められ、NO などの細胞障害性物質の産生やミクログリアによる過剰な貪食活性は、疾患発症の原因ともなりうるということが報告されている。本研究の結果から、これらのグリア細胞の機能変化に TG2 の発現変化が寄与している可能性が示唆された。さらに、神経変性疾患に特徴的な凝集体の形成に、アストロサイトの TGs が関与する可能性が示唆された。したがって、神経変性疾患において、グリア細胞の TGs 変化と細胞機能変化が、新規の重要な治療ターゲットとなる可能性が期待される。神経変性疾患は未だ進行抑制薬が臨床で使用されているのみで、治療薬が開発されていないため、予防または治療のターゲットとなりうる新規の分子は極めて重要である。本研究では、グリア細胞を用いた実

験での検討結果が得られたため、今後は、この結果が神経細胞に及ぼす影響を解析するとともに、動物を用いた in vivo での検討を行う必要がある。

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 3 件)

Mitsuaki Moriyama, Yuki Fujimoto, Shizuka Rikimaru, Miharu Ushikai, Eishi Kuroda, Kenji Kawabe, Katsura Takano, Akihiro Asakawa, Akio Inui, Kazuhiro Eto, Takashi Kadowaki, David S Sinasac, Yoshiyuki Okano, Masahide Yazaki, Shu-ichi Ikeda, Chunhua Zhang, Yuan-Zong Song, Osamu Sakamoto, Shigeo Kure, Hiroshi Mitsubuchi, Fumio Endo, Masahisa Horiuchi, Yoichi Nakamura, Ken-ichi Yamamura, Takeyori Saheki. Mechanism for increased hepatic glycerol synthesis in the citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double-knockout mouse: urine glycerol and glycerol 3-phosphate as potential diagnostic markers of human citrin deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1852; 1787-1795. 2015. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.04.023. 査読有.

Kenji Kawabe, Katsura Takano, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura. Lipopolysaccharide-stimulated transglutaminase 2 expression enhances endocytosis activity in mouse microglial cell line BV-2. *Neuroimmunomodulation*, 22; 243-249. 2015. doi: 10.1159/000365484. 査読有.

Akiko Motoyoshi-Yamashiro, Katsura Takano, Kenji Kawabe, Takeshi Izawa, Hidemitsu Nakajima, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura. Amphotericin B induces glial cell line-derived neurotrophic factor in rat brain. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 76; 1353-1358. 2014. <http://doi.org/10.1292/jvms.14-016>. 査読有.

〔学会発表〕(計 14 件)

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、2016 年 3 月 26-29 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)。

Katsura Takano, Kumiko Sugita, Natsumi Ishida, Mitsuaki Moriyama, Satoshi Hibino, Tominari Choshi, Rika Murakami, Masashi Yamada, Hiroto Suzuki, Osamu Hori, Yoichi

Nakamura. A dibenzoylmethane derivative inhibits lipopolysaccharide-induced NO production. 第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 9-11 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)。

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、2015 年 12 月 1-4 日、神戸ポートアイランド(神戸ポートピアホテル・神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸商工会議所)(兵庫県神戸市)。

Mitsuaki Moriyama, Ryosuke Kurebayashi, Kenji Kawabe, Ayano Hashimoto, Katsura Takano, Yoichi Nakamura. Acetate attenuates LPS-induced nitric oxide production in cultured astrocytes. 第 58 回日本神経化学会大会、2015 年 9 月 11-13 日、大宮ソニックシティ(埼玉県大宮市)。

高野桂、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神経細胞死抑制。日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25-28 日、神戸学院大学・兵庫医療大学・神戸サンポーホール・デザイン/クリエイティブセンター神戸(兵庫県神戸市)。

高野桂、河邊憲司、森山光章、中村洋一。Increase of transglutaminase 2 expression and endocytosis activity by amphotericin B in mouse microglial cell line BV-2. 第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 18-20 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)。

高野桂、山崎博史、河邊憲司、森山光章、中村洋一。イミプラミンによる培養アストロサイトの脳由来神経栄養因子 mRNA 発現増加。第 24 回日本臨床精神神経薬理学会/第 44 回日本神経精神薬理学会 合同年会、2014 年 11 月 20-22 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)。

Mitsuaki Moriyama, Yuki Fujimoto, Miharu Ushikai, Katsura Takano, Masahisa Horiuchi, Yoichi Nakamura, Takeyori Saheki. Amino acid and TCA cycle intermediate metabolism in perfused liver of citrin-deficiency model mouse. -Effects of carbohydrate load-, 第 56 回日本先天代謝異常学会総会/第 12 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、2014 年 11 月 9-12 日、江陽グランドホテル(宮城県仙台市)。

高野桂、河邊憲司、森山光章、中村洋一。LPS による BV-2 細胞のエンドサイトーシス上昇とトランスグルタミナーゼの関与。第 126 回日本薬理学会近畿部会、2014 年 10 月 24 日、和歌山県 JA ビル(和歌山県和歌山市)。

高野桂、河邊憲司、森山光章、中村洋一。グリア細胞活性化におけるトランスグル

タミナーゼの発現変化。第 17 回トランスグルタミナーゼ研究会学術集会、2014 年 10 月 14 日、京都国際会議場(京都府京都市)。

高野桂、山城(本吉)晃子、河邊憲司、森山光章、中村洋一。アムホテリシン B によるラット脳でのグリア細胞由来神経栄養因子の発現上昇。第 36 回日本生物学的精神医学会/第 57 回日本神経化学会大会 合同年会、2014 年 9 月 29-10 月 1 日、奈良県文化会館・新公会堂(奈良県奈良市)。

呉林亮佑、高野桂、森山光章、中村洋一。アストロサイトにおける LPS 誘導性 NO 産生に対する酢酸の抑制効果。第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9-12 日、北海道大学(北海道札幌市)。

金本永芝、河邊憲司、高野桂、森山光章、中村洋一。酸化ストレスによる培養アストロサイトの組織型トランスグルタミナーゼの発現・活性上昇。第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9-12 日、北海道大学(北海道札幌市)。

河邊憲司、金本永芝、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。第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9-12 日、北海道大学(北海道札幌市)。

〔その他〕

ホームページ等

- (1) 大阪府立大学教員活動情報 ; http://http://kyoindb.osakafu-u.ac.jp/html/100736_ja.html?k=%E3%82%BF%E3%82%AB%E3%83%8E
- (2) 大阪府立大学・獣医学類/専攻・統合生理学教室ホームページ ; <http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/phys/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究協力者

河邊 憲司 (KAWABE KENJI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・博士課程大学院生、日本学術振興会特別研究員(平成 27 年度 DC2 採用)