

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15390

研究課題名(和文) グリア細胞に発現するトランスグルタミナーゼの神経変性疾患発症への寄与解明

研究課題名(英文) Transglutaminases in glial cells and neurodegenerative diseases

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに、アストロサイトやミクログリアの活性化時にTG2発現が上昇すること、その発現上昇がNO産生に関与することを報告している。また、ミクログリアの貪食能にもTG2の関与が示唆された。アルツハイマー病に特徴的なA β はグリア細胞を活性化するとともに高濃度では直接神経細胞を障害する。本研究結果から、アストロサイトはA β を取り込む一方で、細胞外に放出したTGsによってA β の凝集を促進する可能性が示唆された。また、ミクログリアによるA β の取り込みにはTG2との結合が関与すると考えられた。以上の結果から、グリア細胞に発現するTGsの変化が疾患時の機能変化に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリア細胞の機能制御が正常な脳内環境の維持に重要であることは周知の事実となりつつあり、グリア細胞の炎症反応を単に抑制する化合物は報告されているが、対症療法にすぎない。TGsは神経変性疾患での発現上昇などは知られているものの、グリア細胞での発現およびその機能についての報告は少ない。また、TGs活性阻害剤がハンチントン病モデル動物において症状軽減および延命効果があるとの報告もあり、TGsは新規の脳疾患治療薬のターゲットとなりうる。本研究結果により、グリア細胞におけるTGsの発現および機能調節機構が解明されれば、神経変性疾患における神経細胞死を保護する新たな薬剤の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Transglutaminase (TG) is a crosslinking enzyme and contributes to various physiological functions. TGs have 8 isozymes and TG2 among them is unique as multifunctional enzyme. TG2 is normally expressed at low levels and activated under various pathological conditions. In CNS, TGs are expressed in neurons and glial cells. It has been shown that TGs are aberrantly-activated in neurodegenerative diseases including Alzheimer's. Increased TG activity may contribute to the formation of insoluble deposits; however, the mechanisms remain to be clarified. On the other hand, it also has been shown that aberrant activation of glia; excessive production of nitric oxide and inflammatory cytokines, phagocytosis of viable neurons, and so on, causes neurodegeneration. We demonstrated that TG2 was upregulated in astrocytes and microglia by activation and involved in glial functions such as inflammation and endocytosis. Therefore, TGs might be a novel therapeutic target for neurodegeneration.

研究分野：神経化学

キーワード：ミクログリア アストロサイト トランスグルタミナーゼ 神経変性疾患 アルツハイマー病

蛋白質の in vitro 凝集体形成実験系を用いて、グリア細胞における TGs 発現変化の凝集体構造への影響を解析し、培養細胞に曝露した時の反応を評価する。グリア細胞における TGs の変化が神経細胞に及ぼす影響を検討するため、グリア細胞と神経細胞の共培養系などを用いて、細胞刺激剤などによるグリア細胞活性化と神経細胞の変化を解析する。

3. 研究の方法

蛋白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、グリア細胞に発現する TGs がどのような役割を果たしているのか解析する。

(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 BV-2 を用いて TGs の発現および活性を測定した。mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で、蛋白質発現を western blotting 法により解析した。TGs 活性は TGs の基質となる biotin 標識 pentylamine を細胞に取り込ませ、蛋白と結合した pentylamine の biotin 基を ABC 法を用いて検出することにより測定した。

(2)【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するため、アミロイドβ (Aβ)の溶液をグリア細胞の培養上清と混和し、37 °C で一定時間インキュベート後の凝集体形成度合いを western blotting 法により検出した。

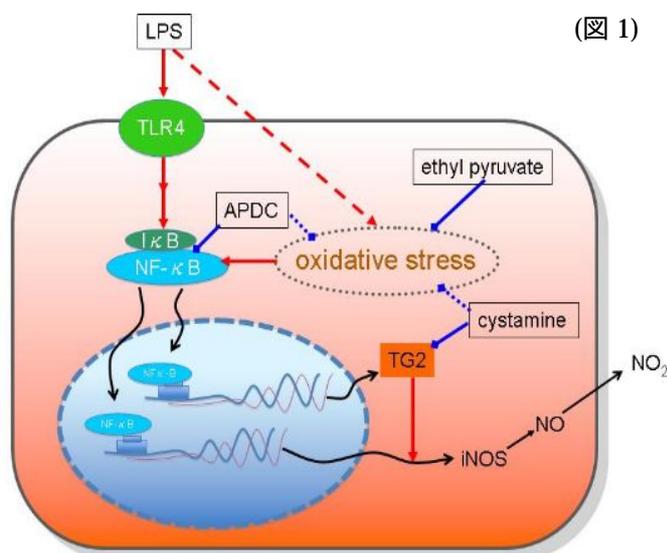
(3)【グリア細胞の機能変化】

ミクログリアは Aβを含む異物や死細胞の貪食が主要な機能の1つである。一方、Aβはミクログリアやアストロサイトを活性化し、一酸化窒素(NO)やサイトカイン等の産生を誘導するとともに、神経細胞死を引き起こすことが知られている。

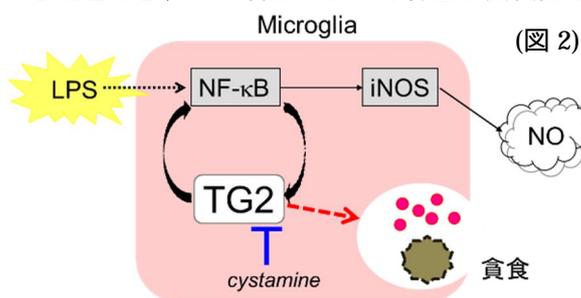
グリア細胞を活性化した際の NO 産生は DAN 試薬法により定量した。貪食能は蛍光マイクロビーズまたは実験的に細胞死を起こした神経細胞を一定時間細胞に取り込ませ、蛍光顕微鏡下で観察することにより解析した。さらに、神経細胞とグリア細胞の共培養系において、ミクログリアマーカーである Iba1 およびアストロサイトマーカーである GFAP の抗体を用いて免疫染色を行うことにより、細胞の形態学的変化を解析した。

4. 研究成果

(1)申請者はこれまでにグリア細胞を活性化した際の炎症応答を測定し、種々の化学物質によって応答に変化が起こることを報告してきた。これらの研究を行う中で、グリア細胞の炎症反応にも TG2 が関与する可能性を考え、培養アストロサイトを用いた実験において、細胞活性化剤であるリポポリサッカライド(LPS)により TG2 発現が誘導されること、その発現増加は転写因子 NF-κB 阻害剤の添加により抑制されることから NF-κB の活性化を介していることを確認している。また、TG2 活性阻害剤であるシスタミンを LPS と同時に添加すると、LPS 誘導性の一酸化窒素(NO)産生が抑制されることから、TG2 発現と NO 産生が関連している可能性を見出している(図 1、研究業績)。また、マウスミクログリアの細胞株である BV-2 細胞を用いた実験においても、同様に、LPS による TG2 発現の増加と NO 産生への関与を見出している。BV-2 細胞ではさらに貪食能についても検討を行い、蛍光マイクロビーズや過酸化水素によって細胞死を起こした神経細胞の取り込みを測定したところ、LPS 刺激によって有意な貪食能の上昇が認められた。LPS 誘導性の TG2 発現増加と貪食能上昇は TGs 活性阻害剤シスタミンの添加により抑制されたことから、LPS 刺激で増加した TG2 や TG 酵素活性が BV-2 細胞における貪食能にも関与すると考えられる(図 2、研究業績)。背景で述べたように、活性化したミクログリアにおける貪食能に TG2 が関与すること(研究業績 ,)は、TGs の活性制御により、ミクログリアの異常活性化を介した神経細胞死を制御できる可能性を示唆するものである。



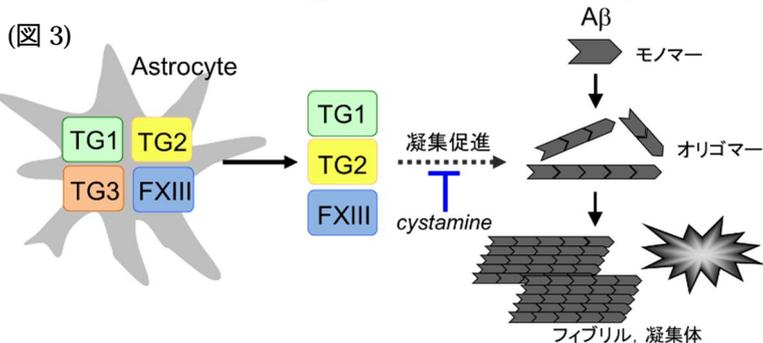
(図 1)



(図 2)

(2)次に、ラット由来培養アストロサイトをを用いて TGs の発現を解析したところ、脳に発現していると言われる 4 種類 (TG1、TG2、TG3、FXIII) 全ての発現が認められた。また、培養液中の蛋白質を解析したところ、TG1、TG2、FXIII は細胞外への放出も検出された。

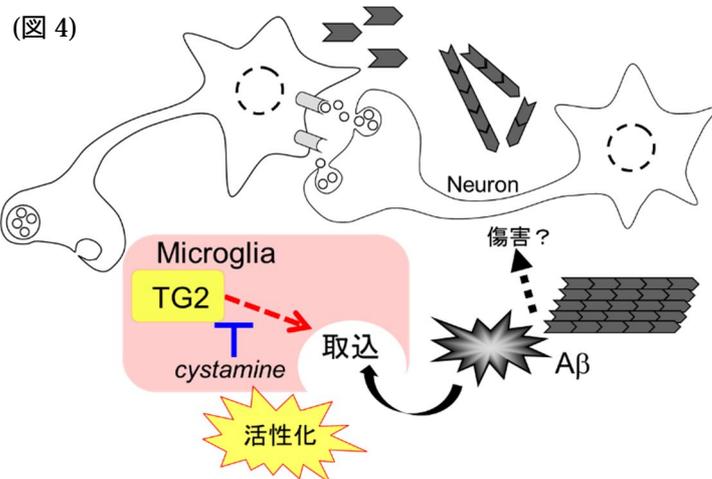
アルツハイマー病に特徴的な病変である老人斑の主たる構成蛋白質はアミロイドβ (Aβ) であり、Aβ凝集体が神経細胞死に關与すると考えられている。アストロサイトやミクログリアが細胞外の Aβを除去する役割を担っており、細胞外 Aβ濃度を低く保っている。



実際、精製 Aβ蛋白質を培養ア

ストロサイトに添加したところ、培養液中の Aβ量は時間経過とともに低下したことから、アストロサイトが Aβを取り込んだと考えられる。また、精製 Aβ蛋白質は高濃度では試験管内でも 37 でインキュベートすることによってモノマーからオリゴマー、凝集体形成への反応が進行する。アストロサイトの培養液を精製 Aβ蛋白質と混和したところ、Aβの凝集が促進され、TGs 活性阻害剤シスタミンの添加によって抑制されたことから、アストロサイトから放出された TGs が Aβ凝集を促進したと考えられる。さらに、凝集 Aβ をアストロサイトに曝露したところ、TG2 蛋白質の発現が増加した(図 3、研究業績)。したがって、アストロサイト由来の TGs がアルツハイマー病の病態悪化に關与する可能性が示唆される。

(3)上述のように、アルツハイマー病の脳内では Aβ凝集体が神経細胞死に關与すると考えられている(アミロイド仮説)。しかしながら、Aβが直接神経毒性を示す濃度に比べ、アルツハイマー病の脳内 Aβ濃度は低いことが報告されている。このアミロイド仮説の矛盾に対して、ミクログリアの活性化による神経細胞死誘導に關与する可能性が示唆される。神経細胞とグリア細胞との



の混合培養系に Aβを添加して免疫染色を行ったところ、Aβは主にミクログリアに取り込まれミクログリアは活性化した。このミクログリアによる Aβの取り込みは TGs 活性阻害剤シスタミンにより抑制されたこと、介在蛋白質を介した Aβと TG2 の結合が観察されたことから、TG2 が關与することが示唆された(図 4、研究業績)。したがって、TG2 を介したグリア細胞の Aβ取り込みと活性化がアルツハイマー病の病態悪化に關与する可能性が示唆される。

<引用した研究業績>

Katsura Takano, Kensuke Shiraiwa, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura (2010) Transglutaminase 2 expression induced by lipopolysaccharide stimulation together with NO synthase induction in cultured astrocytes. *Neurochem Int*, 57, 812-818.

Kenji Kawabe, Katsura Takano, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura (2015) Lipopolysaccharide-stimulated transglutaminase 2 expression enhances endocytosis activity in mouse microglial cell line BV-2. *Neuroimmunomodulation*, 22, 243-249.

Kenji Kawabe, Katsura Takano, Mitsuaki Moriyama, Yoichi 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.

Kenji Kawabe, Katsura Takano (2017) Microglial endocytosis and transglutaminases. *Global Drugs and Therapeutics*, 2(4), DOI: 10.15761/GDT.1000132.

Kenji Kawabe, Katsura Takano, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura (2017) Transglutaminases derived from astrocytes accelerate amyloid-beta aggregation. *Neurochem Res*, 42(8), 2384-2391.

Kenji Kawabe, Katsura Takano, Mitsuaki Moriyama, Yoichi 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.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tomoki Minamihata, Katsura Takano, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura	4. 巻 43(5)
2. 論文標題 Lysophosphatidylinositol, an endogenous ligand for G protein-coupled receptor 55, has anti-inflammatory effects in cultured microglia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 1971-1987
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10753-020-01271-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Katsura Takano, Natsumi Ishida, Kenji Kawabe, Mitsuaki Moriyama, Satoshi Hibino, Tominari Choshi, Osamu Hori, Yoichi Nakamura	4. 巻 119
2. 論文標題 A dibenzoylmethane derivative inhibits lipopolysaccharide-induced NO production in mouse microglial cell line BV-2.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 126-131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2017.04.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Katsura Takano, Keisuke Koarashi, Kenji Kawabe, Masanori Itakura, Hidemitsu Nakajima, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura	4. 巻 119
2. 論文標題 Insulin expression in cultured astrocytes and the decrease by amyloid .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 171-177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2017.10.017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kenji Kawabe, Katsura Takano, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura	4. 巻 43
2. 論文標題 Microglia endocytose amyloid beta through the binding of transglutaminase 2 and milk fat globule EGF factor 8 protein.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 32-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-017-2284-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kenji Kawabe, Katsura Takano, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura.	4. 巻 42
2. 論文標題 Amphotericin B increases transglutaminase 2 expression associated with upregulation of endocytotic activity in mouse microglial cell line BV-2.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 1488-1495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-017-2205-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kenji Kawabe, Katsura Takano, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura.	4. 巻 42
2. 論文標題 Transglutaminases derived from astrocytes accelerate amyloid-beta aggregation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2384-2391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-017-2258-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katsura Takano, Masato Ogawa, Kenji Kawabe, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura.	4. 巻 43
2. 論文標題 Inhibition of gap junction elevates glutamate uptake in cultured astrocytes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 50-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-017-2316-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kenji Kawabe, Katsura Takano.	4. 巻 2
2. 論文標題 Microglial endocytosis and transglutaminases.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Global Drugs and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15761/GDT.1000132	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katsura Takano, Yuki Komada, Kenji Kawabe, Mistuaki Moriyama, Yoichi Nakamura.	4. 巻 2
2. 論文標題 Exendin-4 increases extracellular superoxide dismutase expression in cultured astrocytes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Global Drugs and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15761/GDT.1000S1001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 南畑朋輝, 森山光章, 高野桂, 中村洋一
2. 発表標題 ミクログリア炎症反応に対するLysophosphatidylinositolの抑制効果
3. 学会等名 第63回日本神経化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Katsura Takano
2. 発表標題 Changes in Glial Cell Functions by TGs in Neurological Diseases
3. 学会等名 Gordon Research Conference "'Transglutaminases in Human Disease Processes'" (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高野桂, 河邊憲司, 森山光章, 中村洋一
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Katsura Takano, Kenji Kawabe, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura
2. 発表標題 Transglutaminases derived from astrocytes might accelerate amyloid-beta aggregation
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高野桂, 河邊憲司
2. 発表標題 中枢グリア細胞におけるトランスグルタミナーゼ2の発現上昇
3. 学会等名 第21回トランスグルタミナーゼ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Katsura Takano, Kenji Kawabe, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura
2. 発表標題 Transglutaminases in neurodegenerative diseases
3. 学会等名 Neurovascular and Neurodegenerative Diseases (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Katsura Takano, Keisuke Koarashi, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura.
2. 発表標題 Effects of amyloid-beta and lipopolysaccharide on insulin expression in cultured astrocytes.
3. 学会等名 第60回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高野桂, 河邊憲司, 森山光章, 中村洋一.
2. 発表標題 ミクログリアによるアミロイド 取り込みにおけるmil k fat globule EGF factor 8 proteinとトランスグルタミナーゼの関与.
3. 学会等名 第132回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河邊憲司, 高野桂, 森山光章, 中村洋一.
2. 発表標題 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.
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関