

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05999

研究課題名(和文) 中枢グリア細胞による非感染性神経炎症反応の解析：神経変性疾患の一般機序

研究課題名(英文) Non-infectious neuroinflammatory response by glia: general mechanism of neurodegenerative diseases

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・客員研究員

研究者番号：90180413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経炎症反応のモデルとしてアストロサイトとミクログリアの培養細胞を用いて、その細胞機能を調節する新たな数因子を見出すことができた。アストロサイト炎症反応を増強するものとして亜鉛イオン( $Zn^{2+}$ )と短・中鎖脂肪酸(C2-4, C6-C12)を、反対に抑制するものとしてエクオール(S-equol)を、またアストロサイトが発現・放出するインスリンが炎症反応により抑制されることを見出した。興味深いことに、短・中鎖脂肪酸はミクログリア炎症反応を抑制した。またリゾリン脂質(lysophosphatidylinositolとlysophosphatidylserine)もミクログリア炎症反応を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血神経細胞障害やアルツハイマー病をはじめとする各種神経変性疾患においては、細菌性感染や白血球浸潤がない状況下でも、グリア細胞を主役とする神経炎症反応が起こって病態が増悪していると考えられる。新型コロナウイルス感染症の後遺症としての神経障害も脳内のグリア細胞による神経炎症反応が原因となっている可能性が高い。今回見出されたいくつかの因子の作用機構や標的をさらに検討することにより、治療薬が創出されることにつながることを期待される。

短中鎖脂肪酸がアストロサイトの炎症反応を増強しミクログリアのそれを反対に抑制したことは両グリア細胞の相補的な新たな役割を示すものであり学術的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：We found several factors which regulated the cell functions using astrocyte and microglial cell cultures as a model of the neuroinflammatory reaction. Zinc ion ( $Zn^{2+}$ ) and short/middle chain fatty acids (C2,4/C6-C12) enhanced astrocyte inflammation, on the contrary, S-equol (an isoflavone) suppress the inflammation. We also found that astrocytes express and release insulin, and that inflammation reaction depressed the expression. Interestingly, in microglia, the short/middle chain fatty acids cause suppression of the inflammation. In addition, the lysophospholipid (lysophosphatidylinositol and lysophosphatidylserine) also lead to suppression of the microglial inflammatory reaction.

研究分野：神経科学

キーワード：ミクログリア アストロサイト 非感染性神経炎症 亜鉛イオン エクオール 短中鎖脂肪酸 インスリン リゾリン脂質

## 1. 研究開始当初の背景

中枢グリア細胞のうちミクログリアは脳マクロファージとも呼ばれ、従来は障害を受けたニューロンを処理するために活性化するとされてきたが、逆にミクログリアの活性化が神経障害の原因や増悪要因となる可能性が近年重要視されている。またサイトカインやケモカインの産生能力が高く、リポ蛋白との強い相互作用をもちコレステロール代謝にも重要な役割を果たしている。一方、脳内で最も数の多いアストロサイトはイオン動態やシナプス構造の維持などを通じてニューロンを支持する細胞とされてきたが、ニューロンの活動制御に積極的に関わっている証拠や神経栄養因子などの重要な産生源であること、抗酸化ストレス機能を発揮する細胞であること等が次々に明らかとなっている。

ミクログリア及び、特にアストロサイトは末梢の免疫細胞とは明らかに異なるものであるが、免疫細胞様の反応をする。髄膜炎などの稀有な病態以外では遭遇することがないにもかかわらず、これらグリア細胞はリポポリサッカライド(LPS)に反応して、まるで末梢における炎症反応と同様な活性化を受け、サイトカインや活性酸素種(ROS)、NOを産生・放出する。虚血神経細胞障害やアルツハイマー病、パーキンソン病をはじめとする各種神経変性疾患においては、髄膜炎のような細菌性の感染や末梢での炎症のような白血球の浸潤がない状況下でも、これらグリア細胞を主役とする神経炎症反応が起こって病態が増悪・進行していると考えられる。例えば、脳虚血においても、エネルギー源が断たれたことによりニューロン死がおこるのではなく、血液再灌流時にニューロン周囲のグリア細胞が異常に活性化してその活性化産物がニューロン死を導く可能性が高い。アルツハイマー病における進行性のニューロン脱落でも、アミロイド $\beta$ を中心とする細胞外凝集体が周囲のグリア細胞を緩慢に活性化して進行性のニューロン死を導くと考えることもできる。これら病態は白血球の浸潤を伴わない非感染性の神経炎症反応の異常な状況であるといえる。

## 2. 研究の目的

ミクログリアは食作用や神経栄養因子の産生・放出を通じて中枢の恒常性の維持に貢献しているが、神経変性疾患時には炎症性サイトカインや一酸化窒素(NO)の産生が高まるなど過度に活性化することによりニューロンに対して悪影響を及ぼすと考えられている。本研究の最終的な目的は、各種神経変性疾患の病因をグリア細胞による神経炎症反応と捉え、培養ミクログリア及びアストロサイトを用いた神経炎症反応モデルにおける活性化反応にみられる細胞機能変化が、種々の要因によりいかなる制御を受けているかを解析し、その詳細を明らかにすることにより各種の中枢神経障害の克服を目指す基盤を構築することである。各種神経変性疾患の病因については各々の疾患ごとに様々な発症メカニズムが創案され、詳しく検討されてきているが、一般的にグリア細胞による神経炎症反応と捉える視点は新しいと言える。

## 3. 研究の方法

初代培養アストロサイトは胎齢19日ラット大脳皮質から、ミクログリアは生後1日のラット全脳からそれぞれ常法により調製する。これらの細胞とマウスミクログリア株化細胞であるBV-2細胞を用いた。

細胞生存率の評価についてはMTT法を用いた。NO産生については、NO<sub>2</sub>産生量をDAN試薬法で、iNOS発現量はmRNAをRT-PCR法でタンパク質はイムノブロット法で定量評価した。活性酸素種(ROS)についてはH<sub>2</sub>DCFDA添加後のDCF蛍光強度測定により定量評価した。貪食能については蛍光標識したマイクロビーズの取り込み量を写真解析により定量評価した。サイトカイン類はBio-Plex MAGPIXにより定量した。

#### 4. 研究成果

各種の中枢神経障害の克服を目指す基盤を構築することを目的として、培養アストロサイト及びミクログリアを用いた炎症モデルにおける活性化反応を制御する各種薬剤を検索した。得られた研究成果は以下の項目である。

##### (1) 亜鉛イオン( $Zn^{2+}$ ) (アストロサイト炎症反応の増強)

LPS で誘導されるアストロサイトの炎症反応が亜鉛イオン( $Zn^{2+}$ )により増強されることを見出した。その機序としては、 $Zn^{2+}$ が細胞内 ROS 産生や p38MAPK のリン酸化を促進し、それらを介して iNOS 蛋白の発現を増強して LPS 誘導性の NO 産生を増加させることが示された。これらのことから  $Zn^{2+}$ は神経変性疾患時のアストロサイトにおいて炎症性反応を強める方向に働き、ニューロンの傷害を増悪する可能性が示唆される。

##### (2) エクオール (アストロサイト炎症反応の抑制)

ダイズに多く含まれ、エストロゲン様作用を持つことが知られるイソフラボンのうちエクオール(S-equol)は LPS で誘導されるアストロサイトの iNOS 発現と NO 産生を抑制した。その作用機序としては、細胞膜に存在する G 蛋白共役型エストロゲン(ER)受容体である GPR30 の関与が考えられた。活性化アストロサイトが産生する NO を抑制することは、中枢神経細胞の保護に繋がることから、エクオールの効果と作用機序の更なる解明が期待される。

##### (3) インスリン (アストロサイトによるその発現放出が炎症により抑制)

従来ほとんど注目されていなかったが、アストロサイトにインスリンが発現しておりそれを放出していることを見出した。またその発現は LPS による炎症反応の活性化や amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) 刺激により抑制されることも見出した。 $A\beta$  による細胞内活性酸素種の上昇が インスリン合成の減少に寄与している可能性が考えられる。中枢でのインスリンの動態や機能についてもグリア細胞が積極的に関与している新事実は、今後中枢疾患の治療法や薬剤標的として注目される可能性が高い。

##### (4) 短・中鎖脂肪酸 (ミクログリア炎症反応の抑制)

短鎖脂肪酸である酢酸(C2)や酪酸(C4)は食品中に含まれたり腸内細菌の発酵により産生され、血液循環に入り、血液脳関門を通過して中枢に作用しうると考えられ、躁様状態モデルラットの移動・探索活動の増加が酪酸の脳室内投与により抑えられることも報告されている。

培養ミクログリアにおいて、酢酸が LPS(リポポリサッカライド)刺激による NO 産生や iNOS 蛋白質の発現を濃度依存的に有意に抑制することを見出した。加えて、酢酸は LPS 刺激による ROS 産生や LPS 誘導性の GSH 減少の程度も抑制した。つまり、酢酸は NO と ROS の産生を減少させることで神経炎症反応を抑制することを示唆している。

一方、中鎖脂肪酸(C6-C12)は細胞のエネルギー源として利用しやすい基質と考えられており、中鎖脂肪酸を多く含むココナッツ油の継続摂取によりアルツハイマー病患者の認知機能の低下や異常行動が改善される報告もあることから、中枢に対する中鎖脂肪酸の効果に関心が高まっている。これら中鎖脂肪酸をリガンドとする受容体についても報告があるが中枢での機能については謎が多い。

培養ミクログリアにおいて、LPS 刺激による NO 産生と iNOS 蛋白質の発現は中鎖飽和脂肪酸(ラウリン酸(LA:C12)とオクタン酸(OA:C8))存在下で濃度依存的に抑制された。LPS 刺激による ROS 産生の増加や貪食能の上昇も、これらの同時添加により抑制された。中鎖脂肪酸受容体 GPR40 のアンタゴニスト(GW1100)の添加は、LA により抑制された LPS 誘導性 NO 産生と貪食能を拮抗した。中鎖脂肪酸はミクログリアの活性化を、GPR40 を介する経路を介して神経炎症反応を抑制する可能性が示唆される。

#### (5)短・中鎖脂肪酸 (アストロサイト炎症反応の増強)

興味深いことに、アストロサイトの細胞機能を反対に増強することが見出された。LPS 刺激による NO 産生と iNOS 蛋白質発現は、C4 から C12 の脂肪酸の存在下で増強され、また LPS 刺激による ROS 産生の増加も増強された。さらに LPS 刺激による炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ )産生も酪酸の同時添加により増強が認められた。酪酸の代わりに短鎖脂肪酸受容体 GPR41 アゴニストを LPS と同時添加すると LPS 単独刺激群に比べ NO 産生、iNOS 発現、ROS 産生がいずれも増強した。

短鎖および中鎖脂肪酸はアストロサイトの活性化を GPR41 を介する経路により増強することが示唆される。

#### (6) リゾリン脂質 (ミクログリア炎症反応の抑制)

リゾリン脂質はリン脂質の 2 つある脂肪酸の片方が切り取られて生成する内在性の脂質であり、炎症や免疫機能において調節因子として機能することが明らかとなってきた。その中で lysophosphatidylinositol(LysoPI)と lysophosphatidylserine(LysoPS)に着目して検討を加えた。

LysoPI は、LPS により誘導されたミクログリア NO 産生、iNOS 発現、炎症性サイトカイン (IL-6) 産生、ROS 産生、貪食活性の全てを減少させた。NO 産生の抑制は GPR55 アンタゴニスト (CID16020046) で影響を受けなかったが、貪食活性の抑制は解除された。

LysoPS は LPS 誘導性のミクログリア NO 産生、iNOS 発現、炎症性サイトカイン (IL-6, TNF- $\alpha$ ) 産生、ROS 産生、貪食活性を抑制した。細胞内 LysoPS 合成酵素阻害剤 (KC01) を用いると、LPS 誘導性 NO 産生および iNOS 発現は抑制されたが、貪食活性には影響しなかった。

以上の結果より、LysoPI は活性化ミクログリアの炎症反応を抑制し、その作用の一部は受容体 GPR55 を介していることが判明した。また、細胞内で合成される内因性の LysoPS は一部のミクログリア炎症反応を増悪させる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 8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 Saheki T, Moriyama M, Kuroda E, Funahashi A, Yasuda I, Setogawa Y, Gao Q, Ushikai M, Furuie S, Yamamura KI, Takano K, Nakamura Y, Eto K, Kadowaki T, Sinasac DS, Furukawa T, Horiuchi M, Tai YH.	4. 巻 9 (1)
2. 論文標題 Pivotal role of inter-organ aspartate metabolism for treatment of mitochondrial aspartate-glutamate carrier 2 (citrin) deficiency, based on the mouse model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep. 2019 Mar 12;9(1):4179.	6. 最初と最後の頁 4179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-39627-y.	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 Moriyama M, Nishimura Y, Kurebayashi R, Minamihata T, Kawabe K, Takano K, Nakamura Y.	4. 巻 Epub
2. 論文標題 Acetate suppresses lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in primary rat microglia but not in BV-2 microglia cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Curr Mol Pharmacol. [Epub ahead of print]	6. 最初と最後の頁 Epub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1874467213666200420101048.	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 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 (MFG-E8).	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 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 Mitsuaki Moriyama, Shunsuke Fujitsuka, Kenji Kawabe, Katsura Takano, Yoichi Nakamura	4. 巻 43
2. 論文標題 Zinc Potentiates Lipopolysaccharide-induced Nitric Oxide Production in Cultured Primary Rat Astrocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 363-374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-017-2431-5	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, 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 Mitsuaki Moriyama, Ayano Hashimoto, Hideyo Satoh, Kenji Kawabe, Mizue Ogawa, Katsura Takano, Yoichi Nakamura	4. 巻 2018
2. 論文標題 S-Equol, a Major Isoflavone from Soybean, Inhibits Nitric Oxide Production in Lipopolysaccharide-Stimulated Rat Astrocytes Partially via the GPR30-Mediated Pathway.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Inflammation	6. 最初と最後の頁 e-pub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/8496973	査読の有無 無
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 Moriyama M, Minamihata T, Jayakumar AR, Norenberg MD.	4. 巻 114
2. 論文標題 Acetate attenuates the astrocyte swelling and brain edema in severe liver failure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 S37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14309/ajg.0000000000000372	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 Minamihata T, Takano K, Moriyama M, Nakamura Y.	4. 巻 43
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 無
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 Moriyama M, Nishimura Y, Kurebayashi R, Minamihata T, Kawabe K, Takano K, Nakamura Y.	4. 巻 14(2)
2. 論文標題 Acetate suppresses lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in primary rat microglia but not in BV-2 microglia cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Molecular Pharmacology: in press	6. 最初と最後の頁 253-260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1874467213666200420101048	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Y. Nakamura, Y. Nishimura, K. Takano, M. Moriyama
2. 発表標題 Medium-chain fatty acids attenuate neuroinflammatory responses by activated microglia
3. 学会等名 XIV European Meeting on Glial cells: Porto/ Portugal (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Moriyama M, Satoh H, Takano K, Nakamura Y.
2. 発表標題 Butyrate augments nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated rat astrocytes
3. 学会等名 Neuro2019, Niigata, 7/25-7/28 (国際学会)
4. 発表年 2019年

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 ミクログリアリア炎症反応に対するLysophosphatidyl inositolの抑制効果
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020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
研究分担者	森山 光章  (Moriyama Mitsuaki)  (20275283)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授   (24403)	
研究分担者	高野 桂  (Takano Katura)  (50453139)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授   (24403)	

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
---------	---------