

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19700326

研究課題名（和文）脳におけるアポリポ蛋白 E による自然免疫制御機構について

研究課題名（英文）Signaling pathway for Apolipoprotein E inhibition of innate immune

研究代表者 大久保 信孝 (OHKUBO NOBUTAKA)
 愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号：10432791

研究成果の概要：アポリポ蛋白 E (apoE) は LPS 刺激によるマイクログリア細胞からの炎症性サイトカインの分泌を抑制した。これは TLR4 シグナル経路の活性化を抑制することにより、炎症性サイトカインの転写を抑制していると考えられた。また、apoE は TLR2,3 シグナル経路の活性化も抑制した。apoE による TLR シグナル抑制経路には LDL 受容体や LRP は関与せず、スカベンジャー受容体 B が関与していた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経科学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：老化性痴呆疾患 アポリポ蛋白 E 自然免疫 炎症性サイトカイン ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

アポリポ蛋白 E (apoE) の変異がアルツハイマー病の危険因子となることは国際的に合意を得ている。apoE のアイソフォームの 1 つ apoE₄ は晩期発症型アルツハイマー病の危険因子である。しかし、apoE の変異がアルツハイマー病の発症に至る分子機構は未だ解明されていない。

一方、アルツハイマー病患者の脳では、補体系の活性化や炎症性サイトカインの産生など、慢性的な自然免疫機構の活性化が見られる。これまでこの自然免疫機構の活性化はアミロイドベータ (A β) などの病的産物を取り除くための 2 次的な反応の結果によるものだと考えられてきた。しかし抗炎症剤の投与に

よりアルツハイマー病の発症頻度が低くなること、進行が遅延することなどが相次いで報告され、慢性的な自然免疫系の活性化がアルツハイマー病の発症と進行に直接関与することが示された。しかしそのメカニズムは全く未知であった。

このような中、我々は培養マイクログリア細胞を用いた研究で、apoE が炎症性サイトカインの産生に関わる事を見出した。このことは apoE が脳における免疫系、とくに自然免疫に大きく関わっていることを示している。apoE による炎症抑制機構を知ることで、アルツハイマー病発症における apoE の役割とアルツハイマー発症や進行における炎症の役割の両方を解明できると考えられた。

2. 研究の目的

研究の目的は「apoE が自然免疫を制御することを証明し、そのメカニズムを明らかにする。」ことである。apoE がマイクログリア細胞から産生される炎症性サイトカインを抑制する事を証明し、TLR の下流シグナル経路に着目し解析を行った。

3. 研究の方法

(1) apoE による炎症性サイトカイン分泌への影響

apoE の免疫関連部位は受容体結合領域内 133 から 149 番目のアミノ酸配列にある。そこで、このアミノ酸配列のペプチド (Cog133) を作製し、apoE のモデルとして本実験に用いた。作製した Cog133 の純度は 99.9% 以上であった。

1×10^6 cells/ml のマウスマイクログリア細胞 BV2 を 12 ウェルプレートで 37 °C、5% CO₂ の環境下で静置培養した。24 時間後、LPS または LPS と Cog133 を加えた新しい培地に交換しさらに 24 時間培養を継続した。このとき培養上清に含有される TNF α 、IL-6 の分泌量を ELISA 法で、一酸化窒素の分泌量を培養上清の Nitrite を指標に Griess 法で計測した。BV2 の継代は 10% FCS を含む DMEM 培地を用い、実験には 1% FCS を含むフェノールレッド不含 DMEM 培地を用いた。ELISA 法にはアクティブモチーフ社製 ELISA キットを用いた。

(2) apoE による TLR4 シグナル経路への影響

LPS 刺激による一酸化窒素、TNF α 、IL-6 など炎症性サイトカインの産生経路は TLR4 シグナル経路として知られている。この経路の下流タンパク質である p38MAP キナーゼ、JNK、ERK、I κ B の活性化が Cog133 の存在によりどのように変化するかをウエスタンブロット法、ゲルシフト法を用いて計測した。BV2 細胞を 6 ウェルプレートで培養し LPS または LPS と Cog133 を加えた新しい培地に交換 30 分後、細胞を 2 回 PBS で洗浄、Laemmli サンプルバッファーを 200ml 加え、得られたタンパク質溶解液を 95 °C、5 分で加熱し、ウエスタンブロットのサンプルとした。ウエスタンブロット法に用いた p38MAP キナーゼ、JNK、ERK、I κ B およびそれぞれのリン酸化抗体、抗マウス IgG の抗体はいずれもセルシグナルテクノロジー社製のものを用いた。ゲルシフト法では 1×10^6 cells/ml の濃度で BV2 細胞を 6 ウェルプレートで培養し LPS または LPS と Cog133 を加えた新しい培地に交換 30 分後、細胞を 2 回 PBS で洗浄、常法に従って核抽出物を得た。 γ -³²P によりラベルされた NF κ B 結合配列の DNA をプローブとして核抽出物に加え、氷上で 1 時間反応後電気泳動した。コ

ールドプローブはラベルしていないプローブを用い、スーパーシフトにはセルシグナルテクノロジー社製 p65NF κ B 抗体を用いた。

(3) apoE 受容体の関与の測定

Cog133 による炎症性サイトカイン分泌抑制効果に既知 apoE 受容体が関与するか調べた。BV2 細胞を培養、トランスフェクション試薬 (FuGENE6、ロッシュ社) と RNAi (Ambion 社) の混合試薬を培養上清に加え細胞に取り込ませた。取り込まれた遺伝子配列のタンパク質の発現が減弱している事をリアルタイム PCR 法またはウエスタンブロット法にて調べ、50% 以上減弱している細胞の培養上清に LPS または LPS と Cog133 を加え 24 時間後の培養上清の一酸化窒素分泌量を調べた。

(4) apoE の TLR4 以外の TLR ファミリーへの効果

ペプチドグリカン (PGN)、PolyI:C、Imiquimod をそれぞれ TLR2、TLR3、TLR7 のアゴニストとして培養上清に加え、24 時間後の一酸化窒素分泌量を測定し、Cog133 による炎症抑制効果を評価した。PGN および PolyI:C は Sigma 社、Imiquimod は Aldara 社より得た。

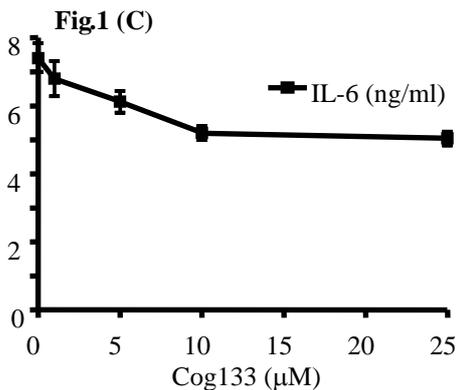
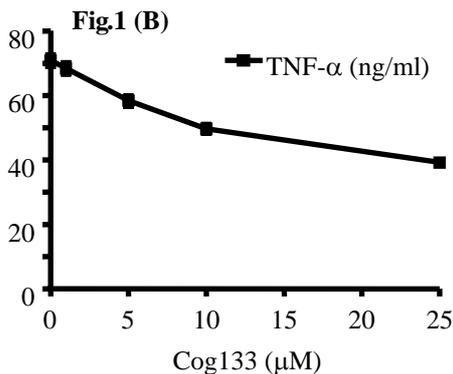
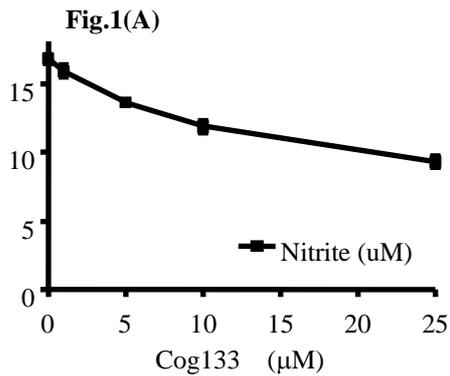
(5) 他細胞での効果

Cog133 による炎症抑制効果がマウスマイクログリア細胞以外の細胞でも見られるか、マウスマクロファージ細胞 RAW264.1、ヒト単芽球系細胞 THP-1 および THP-1 を phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) でマクロファージ様に分化させた細胞を用いて 24 時間後の TNF α の産生量を測定し、Cog133 による炎症抑制効果を評価した。

4. 研究成果

(1) apoE による炎症性サイトカイン分泌への影響

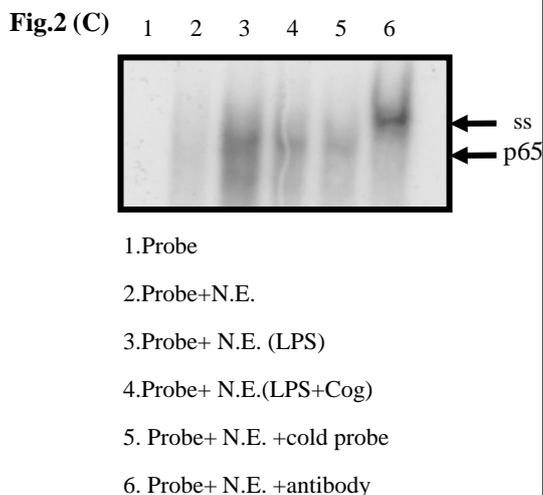
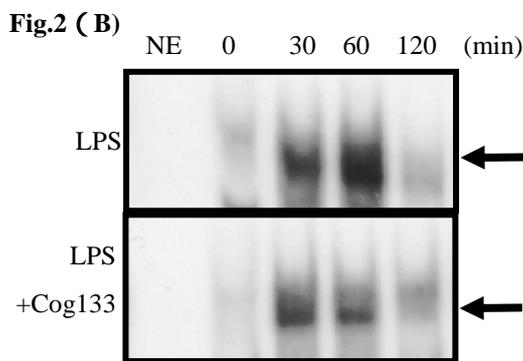
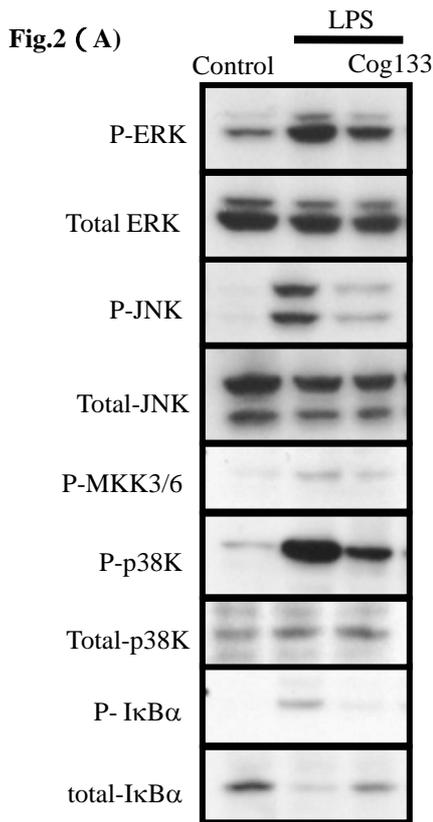
BV2 細胞を LPS 刺激し、24 時間後の NO、IL-6、TNF α といった炎症性サイトカインの分泌量を培養上清中の濃度で計測した。LPS 刺激により NO は 17mM、TNF α は 69nM、IL-6 は 7.4nM の分泌が見られた。さらにこの培養上清に Cog133 を加えておくと濃度依存的に炎症性サイトカインの分泌を抑制した。(Fig.1A, B, C) NO、IL-6、TNF α のいずれにおいても Cog133 濃度が 10 μ M まで抑制効果が増加したが、それ以上の濃度では細胞死が見られ、細胞あたりの炎症性サイトカインの抑制効果に変化がなくなった。以上の結果から Cog133 にはマイクログリア細胞からの炎症性サイトカインの分泌を抑制する能力を有する事がわかった。また、今後の実験において Cog133 は細胞死がほとんど見られない 10 μ M の濃度で用いた。



(2) apoEによるTLR4シグナル経路への影響
 マイクログリア細胞において培養上清に添加されたLPSはTLR4にて受容され、p38MAPキナーゼ、JNK、ERK、IκB等がリン酸化される。これによりNOを産生するiNOSが活性化し、IL-6やTNFα等炎症性サイトカインが分泌される。Cog133はLPSによる炎症性サイトカインの分泌を抑制した。そこで、Cog133がどのようにLPS刺激により産生される炎症性サイトカインの分泌を抑制されるのかウエスタンブロット法あるいはゲルシフト法を用いて調べた。LPS刺激30分後、BV2細胞ではp38MAPキナーゼ、JNK、ERK、IκBのいずれのタンパク質もリン酸化された。このとき、Cog133を同時に加えるとp38MAPキナーゼ、JNK、ERK、IκBのいずれのタンパク質もリン酸化が抑えられた。(Fig.2A)

さらに、p38MAPキナーゼの上流であるMKK3および6のリン酸化もLPS刺激によりリン酸化がおり、Cog133の存在によりリン酸化が減少した。p38MAPキナーゼ、JNK、ERKの総量はLPSやapoEで変化しなかった。一方、IκBの総蛋白量はLPSの刺激により減少し、Cog133はIκB量の減少を抑制していた。(Fig.2A)

IκBはリン酸化を受けると速やかに分解されることが知られている。さらに、通常結合しているNFκBがIκBより遊離し、核に移行して転写因子として働く。そこで、培養上清にLPSあるいはLPSとCog133を加えたBV2細胞の核抽出物を用いてゲルシフト法を行い、核に移行したNFκB量を計測した。NFκBの核移行はLPS刺激30分で増加し、60分後に最大となり、120分までに速やかに元の状態に戻る事がわかった。さらに、培養上清にCog133を加えておくとNFκBの核移行は優位に抑えられていた。(Fig.2B) 次にCog133の有無による核移行したNFκB量を比較するため、LPS刺激60分後培養上清にCog133を加えたBV2細胞と加えなかったBV2細胞からの核抽出物を用いてゲルシフト法を行った。プローブのみまたはプローブと刺激を行っていない細胞からの核抽出物の混合液ではまったくバンドは見られなかった。(Fig.2C レーン1および2)しかし、LPS刺激を行った核抽出物にプローブを加えるとバンドが見られた。(Fig.2C レーン3)培養上清にCog133を含む細胞にLPS刺激を行い得られた核抽出物にプローブを加えたとき、バンドは見られるもののCog133を含まない培養細胞より得られた核抽出物よりも明らかにバンドは減弱していた。(Fig.2C レーン4)以上の結果から、Cog133はNFκBの核移行を抑制する事がわかった。ここで見られたバンドがNFκBであることを証明するために、放射性同位体で標識を行っていないコールドプローブを加えた。その結果、得られたバンドは消失した。(Fig.2C レーン5)また、核抽出物とプローブの反応液にさらにNFκBの抗体を添加しておくともスーパーシフトバンドが見られた。(Fig.2C レーン6)



(3) apoE 受容体の関与の測定

Cog133 による炎症性サイトカイン分泌抑制効果に既知 apoE 受容体が関与するか調べた。あらかじめ apoE 受容体 RNAi を取り込ませたマイクログリア細胞に、LPS 刺激で炎症性サイトカインの産生を行った。このとき Cog133 に炎症抑制効果に変化があるかどうかを調べた。一酸化窒素を指標として用い、刺激のない状態で 24 時間に放出される一酸化窒素量を 100 としたときの変化を調べた。BV2 細胞には apoE 受容体の LDL 受容体または LRP、あるいはその両方の RNAi を取り込ませた。apoE 受容体の減弱がおこっていることはウエスタンブロット法で確認した。LDL 受容体または LRP、あるいはその両方の RNAi を取り込ませた BV2 細胞においても LPS 刺激により一酸化窒素の産生に変化はなかった。さらに、培養上清に Cog133 を添加すると LPS 刺激による一酸化窒素の分泌は減少した。(Fig.3A) apoE 受容体を減弱させても Cog133 の働きに変化がなかったことから、Cog133 による炎症抑制効果には apoE 受容体が関与していないと考えられた。

一方で近年 apoE がスカベンジャー受容体に結合することが報告された。さらに、LPS もスカベンジャー受容体に結合する。そこで、Cog133 がスカベンジャー受容体に結合しその下流で TLR シグナル経路を抑制する可能性を考え、apoE 受容体と同様にスカベンジャー受容体の RNAi を作製してその関与を調べた。また、RNAi が細胞内で働いていることはウエスタンブロット法で調べた。スカベンジャー受容体 A または CD36 の RNAi を取り込ませても LDL 受容体や LRP と同様、Cog133 による抑制効果に変化はなかった。(データ未発表)しかし、スカベンジャー受容体 BI の RNAi を取り込ませた細胞では LPS 刺激による一酸化窒素の産生に変化はなかったが、Cog133 の抑制効果は減少した。(Fig.3B) さらにスカベンジャー受容体 B のスプライシングバリエーションであるスカベンジャー受容体 BII のバリエーション部分由来の RNAi を取り込ませた細胞を用いて Cog133 の炎症抑制効果を調べた。その結果、スカベンジャー受容体 BI 由来の RNAi を取り込ませた細胞と同様、Cog133 による抑制効果は減少した。(Fig.3B) スカベンジャー受容体 B のノックダウンにより Cog133 の炎症抑制効果が減弱したことから、Cog133 による炎症性サイトカイン分泌の抑制効果にスカベンジャー受容体 B が関与している事がわかった。

Fig.3 (A)

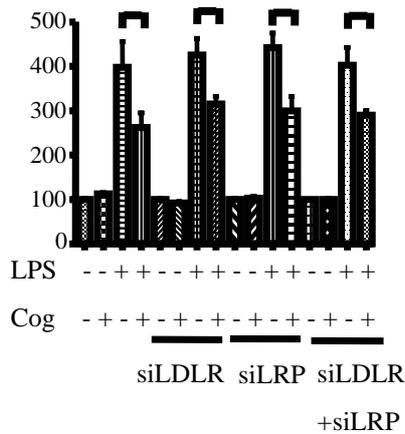
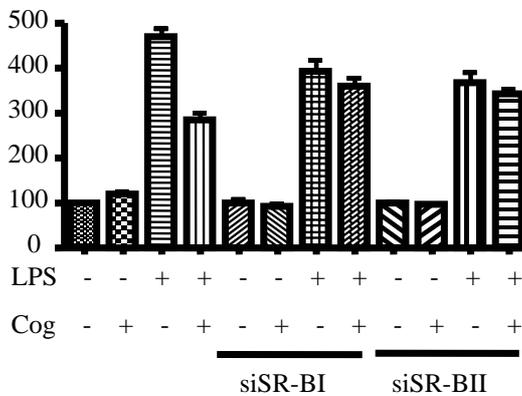


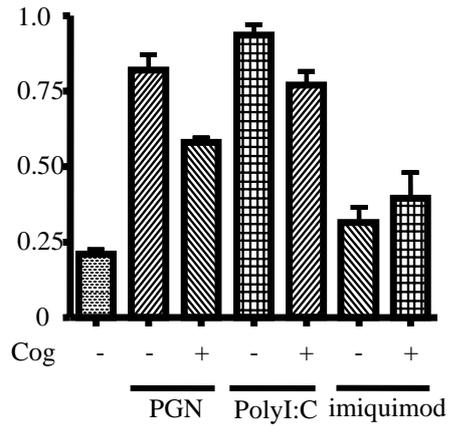
Fig.3 (B)



(4) apoE の TLR4 以外の TLR ファミリーへの効果

ペプチドグリカン (PGN)、 PolyI:C、 Imiquimod はそれぞれ TLR2、 TLR3、 TLR7 のアゴニストとして知られ、それぞれの下流シグナル経路の活性化を介して炎症性サイトカインの産生が起こる。そこで LPS の代わりにこれらを刺激として用い、それぞれの TLR の下流シグナル経路を活性化させ炎症性サイトカインの産生を行った。このとき Cog133 が炎症抑制効果を持つかどうかを調べた。 PGN、 PolyI:C、 Imiquimod で刺激することで、 BV2 細胞は一酸化窒素の分泌を行った。一酸化窒素の産生量はコントロール群と比較して PGN は 4 倍、 PolyI:C は 4.4 倍、 Imiquimod は 1.5 倍であった。この培養上清に Cog133 を加えておくと、 PGN または PolyI:C 刺激による一酸化窒素の分泌は抑制されたが、 Imiquimod 刺激による一酸化窒素の分泌を抑える事はできなかった。(Fig.4) 以上の結果から、 Cog133 は TLR4 のみならず TLR2、 TLR3 の下流シグナル経路も抑制することがわかった。また TLR7 の下流経路は抑制しないことがわかった。

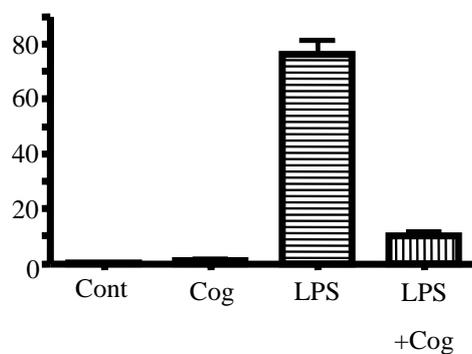
Fig.4



(5) 他細胞での効果

Cog133 による炎症抑制効果がマウスマイクログリア細胞以外の細胞でも見られるか調べた。ヒト単芽球系細胞 THP-1 およびマウスマクロファージ細胞 RAW264.1 を用い、 LPS 刺激にて産生される TNFα の分泌量を Cog133 の有無で比較した。ヒト単芽球系細胞 THP-1 の培養上清に LPS を加えると TNFα の分泌が増加した。このとき、培養上清に Cog133 を加えておくと TNFα の分泌は優位に抑制された。(データ未発表) さらに THP-1 を PMA を加えた培地で 3 日培養し、ヒトマクロファージ様細胞に分化させ LPS で刺激した。マクロファージ様細胞においても LPS 刺激により TNFα の分泌は増加し、培養上清に Cog133 を加えておくと TNFα の分泌を優位に抑制した。(Fig.5) また RAW264.1 細胞においても LPS 刺激により産生した TNFα を Cog133 は抑制した。(データ未発表) 以上の結果から、 Cog133 による炎症抑制効果はマウスのみならずヒトでも見られ、さらにマイクログリア細胞のみならず単球、マクロファージ細胞などでも見られる事がわかった。

Fig.5



以上の結果、apoE は TLR シグナル経路の活性化を抑制する事でその下流の炎症性サイトカインの分泌を抑制する事がわかった。また、TLR4のみならず TLR3 や TLR2 シグナル経路の活性化も抑制する事がわかった。この apoE による炎症抑制効果はヒト細胞でも見られ、マイクログリア細胞のみならず単球細胞やマクロファージ細胞でも見られる事がわかった。

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 4 件)

Samukawa K, Suzuki Y, Ohkubo N, Aoto M, Sakanaka M and Mitsuda N Protective effect of ginsenosides Rg2 and Rh1 on oxidation-induced impairment of erythrocyte membrane properties. *Biorheology* 査読有 45(6), 2008 689-700

Ohkubo N, Vitek MP, Morishima A, Suzuki Y, Miki T, Maeda, N and Mitsuda N Reelin signals survival through Src-family kinases that inactivate BAD activity. *J Neurochem.* 査読有 103(2), 2007 820-830

Suzuki Y, Ohkubo N, Aoto M, Maeda N, Cicha I, Miki T and Mitsuda N Participation of caspase-3-like protease in oxidation-induced impairment of erythrocyte membrane properties. *Biorheology* 査読有 148(7), 2007 3383-3390

Brown CM, Xu Q, Ohkubo N, Vitek MP and Colton CA Androgen-mediated immune function is altered by the apolipoprotein E gene. *Endocrinology* 査読有 44(3), 2007 179-190

[学会発表](計 8 件)

大久保信孝 アポリポ蛋白 E 由来ペプチドによる炎症制御メカニズムの解析 第 30 回免疫・感染・炎症研究会 2009 年 1 月 30 日 愛媛(松山)

大久保信孝、鈴木洋司、青戸守、青野賢治、満田憲昭 STAT3 コンディショナルノックアウトマウスにおける貧血の解析 第 60 回日本生理学会中四国大会 2008 年 11 月 15 日 愛媛(松山)

鈴木洋司、大久保信孝、青戸守、満田憲昭 酸化ストレスによる赤血球膜の酸化障害と Ginsen 由来サポニンの保護効果 第 60 回日本生理学会中

四国大会 2008 年 11 月 15 日 愛媛(松山)

青戸守、新沢康英、鈴木洋司、大久保信孝、満田憲昭、辻本賀英 Essential role of p38 MAPK in caspase-independent, iPLA2-dependent cell death under hypoxia/low glucose conditions 第 60 回日本生理学会中四国大会 2008 年 11 月 15 日 愛媛(松山)

鈴木洋司、大久保信孝、寒川慶一、前田信治、満田憲昭 第 85 回日本生理学会大会 2008 年 3 月 27 日 東京(新宿)

大久保信孝、鈴木洋司、満田憲昭 アポリポ蛋白 E 由来ペプチドによる炎症抑制シグナル伝達の解析 第 85 回日本生理学会大会 2008 年 3 月 26 日 東京(新宿)

大久保信孝、鈴木洋司、満田憲昭 アンドロゲンによる炎症抑制作用はアポリポ蛋白 E の遺伝子型により変化する 第 59 回日本生理学会大会 2007 年 11 月 10 日 徳島(徳島)

鈴木洋司、大久保信孝、寒川慶一、前田信治、満田憲昭 赤血球の酸化障害に対する Ginseng 由来サポニン分画の保護効果 第 59 回日本生理学会大会 2007 年 11 月 10 日 徳島(徳島)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大久保 信孝(OHKUBO NOBUTAKA)
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：10432791

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし