

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06441

研究課題名(和文) トランスグルタミナーゼを標的とした神経変性疾患の発症機構解明

研究課題名(英文) Changes of transglutaminases in neurodegenerative diseases

研究代表者

高野 桂 (Takano, Katsura)

大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・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、グリア細胞活性化時にTG2発現が上昇し、それがNO産生や貪食能に関与すること、また、アルツハイマー病に特徴的な脳内A β 蓄積に関して、アストロサイトから放出されたTGsはA β 凝集を促進し、ミクログリアはTG2との結合を介してA β を取り込んで活性化することを報告した。アルツハイマー病の治療薬としての可能性が期待されているレチノイン酸(ATRA)は、アストロサイトとミクログリアにおいて、LPS刺激によるNO産生を抑制する一方で、TG2発現とTG活性を上昇させ、ミクログリアの貪食能を上昇させた。以上の結果から、グリア細胞に発現するTGsの変化が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。本研究成果により、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)：Transglutaminases (TGs) are crosslinking enzymes contributing to various physiological functions. Among them, TG2 is unique as multifunctional enzyme. TG2 is normally expressed at low levels and activated under various pathological conditions such as inflammation and neurodegenerative diseases. Increased TG activity may contribute to the formation of insoluble deposits; however, the roles and mechanisms remain to be clarified. On the other hand, aberrant activation of glia; excessive production of nitric oxide and inflammatory cytokines, phagocytosis of viable neurons, and so on, causes neurodegeneration. In the present study, we demonstrated that TG2 was upregulated in astrocytes and microglia by LPS-induced activation and involved in glial functions such as NO production and endocytosis. TGs derived from astrocytes accelerated A β aggregation. Microglia endocytosed A β through the binding with TG2. Therefore, TGs might be a novel therapeutic target for neurodegeneration.

研究分野：神経化学

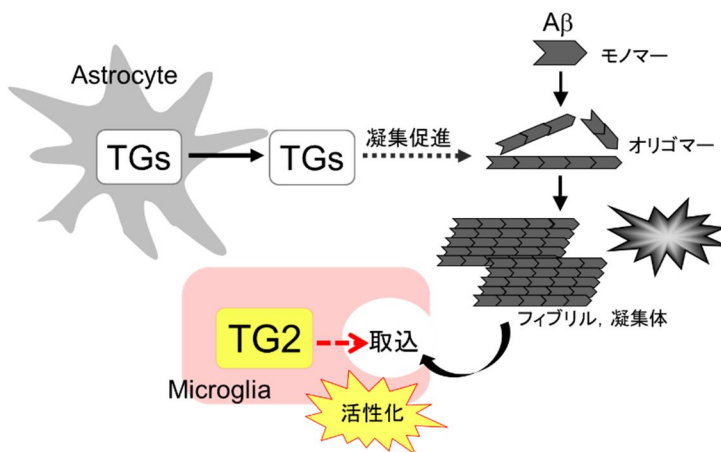
キーワード：トランスグルタミナーゼ ミクログリア アストロサイト 神経変性疾患 神経炎症

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病などの神経変性疾患において、ミクログリアやアストロサイトの機能異常が疾患発症の原因となる可能性が指摘されている。ミクログリアは脳内の免疫細胞であり、通常は貪食による異物や死細胞の除去、神経細胞のネットワークの刈り込み、刺激に応答して活性化し一酸化窒素(NO)や炎症性サイトカインなどの産生による脳の防御および神経栄養因子の産生による神経細胞の生存維持を行っている。一方で過剰に活性化すると、生存している神経細胞さえも貪食によって除去してしまったり、NOや炎症性サイトカインなどの細胞傷害性物質を過剰に産生することにより神経細胞を傷害したりして、神経細胞死をもたらす。アストロサイトは神経伝達物質やイオン濃度の調節、血液脳関門・脳実質の支持などを行うことにより脳のホメオスタシス維持に寄与している。また、活性化すると、ミクログリアと同様にNOや炎症性サイトカイン、神経栄養因子の産生を行う。したがって、アストロサイトの機能異常も、神経細胞の機能的な障害や変性・脱落につながる可能性がある。これらのグリア細胞の機能異常、特に過剰な活性化は神経炎症 neuroinflammation として神経変性疾患の原因と考えられており、神経炎症の抑制・制御が疾患の発症や増悪を抑える治療ターゲットとなると期待されている。

蛋白質の架橋結合形成酵素であるトランスグルタミナーゼ(TGs)は、ヒトで8種類のアイソザイムが知られている。各TGは特定の組織に発現し生理作用を発揮しているが、中でもトランスグルタミナーゼ2(TG2)(別名; 組織型トランスグルタミナーゼ(tissue-type TG))は全身の細胞に広く分布しており、細胞の増殖・分化やアポトーシス、転写調節、細胞外マトリックスの構築、貪食や炎症反応への関与など様々な作用をもつ多機能酵素である。種々のサイトカインによる刺激など炎症反応時にTG2発現は増加することが知られており、これまでの我々の研究の結果、アストロサイトやミクログリアにおいても、細胞活性化時にTG2の発現が上昇し、NO産生や貪食能に関与することを報告した(引用文献 1-4)。グリア細胞においてもTG2が炎症反応に関与することは、TG2の制御が神経炎症や神経変性疾患の治療につながる可能性があると考えられる。

また、アルツハイマー病に特徴的な脳内の病変として、アミロイド(A β)が蓄積・凝集して沈着する老人斑があげられる。A β は単量体(モノマー)から複数集まった多量体(オリゴマー)を経て凝集体を形成することが知られている。このA β が神経細胞を傷害することによってアルツハイマー病が発症するという「アミロイド仮説」がよく知られているが、実験的にA β が直接神経細胞死を起こす濃度に比べ、脳内でのA β 濃度は低いことが知られている。また、A β 除去をターゲットとした様々な薬物が開発され、非臨床/臨床研究が行われているが、未だ著明な効果をもたらす治療薬は見つかっていない。近年、A β によって引き起こされるグリア細胞の活性化が長年続くことによってアルツハイマー病の発症・増悪が引き起こされるという、神経炎症に着目した研究や治療薬開発が進められるようになってきている。さらに、アルツハイマー病の脳内ではTG2発現が上昇していることが以前から報告されており、TG2がA β の凝集に関与するとの報告もある。このA β とTG2、グリア細胞の機能変化との関係において、我々は、A β とグリア細胞を用いた実験結果から、アストロサイトは細胞外のA β モノマーを取り込んで細胞外のA β 濃度を低下させる一方で、アストロサイトから放出されたTGsがA β 凝集を促進することを見いだした(引用文献 5)。また、ミクログリアがA β によって活性化される際に、TG2との結合を介した取り込みが関与する可能性を報告した(引用文献 6)。したがって、グリア細胞におけるTG2の発現が、A β の凝集やそれによる神経炎症に関与する可能性が示唆される。



<引用文献> 本研究の研究代表者に下線を示した

1. 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.
2. 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.
3. 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.

2. 研究の目的

本研究では、グリア細胞における TG2 および他の TGs 発現変化・TG 活性変化と NO 産生や貪食能などのグリア細胞の機能変化との関係を解析することにより、グリア細胞における TGs 発現とその細胞機能に対する役割を検討する。また、TGs の変化を介してグリア細胞の機能調節を行うことが可能なのか、神経炎症に対する調節機構となり得るのかの可能性を探究する。

3. 研究の方法

(1) 【グリア細胞の機能変化】

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 を用いて細胞機能変化を解析した。グリア細胞の活性化は実験的によく用いられるリポポリサッカライド(LPS)で行った。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。

(2) 【TGs の発現および活性測定】

TGs 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。

(3) 【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、A β の溶液をグリア細胞の培養上清と混和し、37℃ で一定時間静置した後、凝集体形成度合いを western blotting 法により検出した。

4. 研究成果

神経炎症に最も関係すると考えられる細胞はミクログリアである。マウスミクログリア細胞株である BV-2 細胞を用いて LPS によって活性化させた。ビタミン A(レチノール)の代謝産物であるオールトランスレチノイン酸(ATRA)は、細胞の増殖や分化に関与するとともに抗炎症作用を示すことが報告されている。また、A β 産生を抑制したり、神経新生を促進したりする作用を持つことにより、アルツハイマー病治療薬としての効果が期待されている。BV-2 細胞を LPS で刺激すると NO 産生が誘導された。この時、同時に ATRA を添加すると、LPS 誘導性の NO 産生は有意に抑制された。したがって、BV-2 細胞においても ATRA は抗炎症作用を示すと考えられる。一方、ATRA を添加した BV-2 細胞で貪食能を測定すると、LPS なしで ATRA のみによって貪食能の上昇が認められた。また、ATRA を添加した BV-2 細胞では、TG2 蛋白質発現と TG 活性が上昇していた(論文投稿中)。我々のこれまでの研究結果では、LPS 刺激によって TG2 発現は上昇し、TG 活性阻害剤であるシスタミンを添加すると、LPS 誘導性の NO 産生も貪食能上昇もともに抑制されたことから、TG2 発現の上昇は NO 産生も貪食能も上向きに調節すると考えていた。しかしながら、ATRA による機能調節に関しては、単独で TG2 発現を増加させ貪食能を上昇させる一方で、LPS 誘導性の NO 産生を抑制したことから、NO 産生の調節には TG2 発現が関与しないと考えられる。ミクログリアによる貪食能の上昇は、A β を含む異物の除去に有益である一方で、過剰になると生存している神経細胞さえも取り込んで除去してしまう危険性がある。したがって、ATRA による BV-2 細胞の機能調節のメカニズムについてはさらなる検討が必要である。

培養アストロサイトでも同様に ATRA の効果を検討したところ、BV-2 細胞と同様に、LPS 誘導性の NO 産生を抑制した一方で、TG2 発現と TG 活性は上昇した。また、アストロサイトの培養上清を A β 溶液と混和して A β 凝集を解析したところ、刺激なしの培養上清に対して、ATRA を添加した細胞の培養上清では A β の凝集が促進されていた。この A β 凝集の促進は、TG 活性阻害剤シスタミンで抑制されたことから、TGs が寄与していると考えられる(論文投稿中)。ATRA によるアストロサイトの TGs 上昇は、細胞外の A β 凝集を促進する可能性が示唆された。A β は、単量体(モノマー)では細胞毒性を示さず、多量体(オリゴマー)や凝集体が神経細胞への毒性やグリア細胞活性化作用を示すと考えられている。今回の結果は、ATRA を添加したアストロサイトの培養上清を用いた変化であるため、この変化が神経細胞に与える影響について、さらに検討する必要がある。

本研究において、ATRA はミクログリアとアストロサイトに対して抗炎症作用だけでなく、別の機能変化をもたらす可能性が示唆された。病態時における ATRA の効果について、さらに詳細に検討を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Tomoki Minamihata, Katsura Takano, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura	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 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, Yasunori Nishimura, Ryosuke Kurebayashi, Tomoki Minamihata, Kenji Kawabe, Katsura Takano, Yoichi Nakamura	4. 巻 14
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	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 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 Tomoki Minamihata, Katsura Takano, Yoichi Nakamura, Ryoya Seto, Mitsuaki Moriyama	4. 巻 47
2. 論文標題 Increase in cellular lysophosphatidylserine content exacerbates inflammatory responses in LPS-activated microglia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2602～2616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-021-03425-8.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tomoki Minamihata, Katsura Takano, Yoichi Nakamura, Mitsuaki Moriyama.
2. 発表標題 Increase in intracellular lysophosphatidylserine content exacerbates inflammatory response by cultured microglia.
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoki Minamihata, Katsura Takano, Mitsuaki Moriyama.
2. 発表標題 Effects of shingosine kinase 1 inhibition on sphingolipid metabolic pathway and inflammatory responses in microglia.
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022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