

平成22年 3月31日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890174

研究課題名（和文） 糖尿病性網膜症におけるリポプロテインの役割と治療への応用

研究課題名（英文） Roles and possible treatment of lipoproteins in diabetic retinopathy

研究代表者

林 秀樹（HAYASHI HIDEKI）

熊本大学・大学院先端機構・特任助教

研究者番号：90508657

研究成果の概要（和文）：本研究は糖尿病の3大合併症の一つである糖尿病性網膜症の発症機序解明とリポプロテインによる新たな治療法開発を目的とした。糖尿病性網膜症では、視神経を構成する網膜神経節細胞が障害されることが知られていることから、培養網膜神経節細胞に障害を誘導し、リポプロテインによる神経細胞保護機構を詳細に解析した。その結果、リポプロテインの受容体を介した新たな神経保護機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）： The aims of this study are to analyze mechanisms of development of diabetic retinopathy and to develop novel treatments for this disorder. Diabetic retinopathy is one of the major complications in diabetes and induces dysfunction of retinal ganglion cells (RGCs). Thus, RGCs in cultures were led injury, analyzed the mechanisms of neuronal death and determined whether lipoproteins protect neurons. This study showed the mechanism of neuroprotection via the receptor of lipoproteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：神経細胞、リポプロテイン、眼疾患

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性網膜症は、糖尿病の3大合併症の一つとして知られており、日本では緑内障と並んで中途失明の主な原因である。世界においても、糖尿病患者は先進国を中心に急増しており、それに伴う糖尿病性網膜症患者の増

加は深刻な問題となっている。また視覚は、主要な感覚、いわゆる五感（視覚、嗅覚、聴覚、触覚、味覚）の中でも最も重要な感覚の一つであり、失明に至らない場合でも、視覚障害により生活の質が著しく低下する。これらのことから糖尿病性網膜症に対する新た

な治療法の開発は大変重要であり、急務とされる。

近年、グリア細胞が中枢神経系の神経伝達やシナプス形成などに関わることが明らかとなり、グリア細胞-神経細胞間の相互機能を示す研究結果が多く報告されるようになってきた。しかしながら中枢神経系、特に網膜の脂質研究に関しては、末梢循環系の研究に比較して研究報告が少ない。最近の研究で、神経細胞の LDLr ファミリー受容体がシグナル伝達を誘導することが示され、従来から知られていたりポプロテインを細胞内に取り込む役割以外にも重要な機能を持つことがわかってきた。このようなことから網膜の LDLr ファミリー受容体も脳内の受容体と同様に多くの生理学的、病態生理学的機能を持つことが予想される。糖尿病性網膜症に対しては現在、抗 vascular endothelial growth factor 抗体、protein kinase C 阻害薬、advanced glycation end-products 産生阻害薬などが開発または臨床試験中であり、これらは主に血管新生または血管閉塞の抑制を目的としている。しかしながら生体の防御反応と考えられるグリア細胞の活性化とそれに続くアポ E 発現量の増加、アポ E 含有リポプロテインによる LDLr ファミリーの受容体刺激は、神経細胞保護効果を示すことから、糖尿病性網膜症の神経障害を抑えることが期待できる。

2. 研究の目的

研究代表者は以前の研究で、グリア細胞（特にアストロサイト）由来のアポリポプロテイン E（アポ E）含有リポプロテインが神経細胞の low density lipoprotein receptor (LDLr) ファミリーの受容体を介したシグナル伝達により、神経突起伸長促進効果および神経細胞死抑制効果を発揮することを明らかにした。そこで本研究は、これまでの研究手法および成果を糖尿病性網膜症研究に発展させ、本疾患にみられる神経障害の発生機序解明とリポプロテインおよび LDLr ファミリーの受容体を介した新たな治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) イムノパニング法による網膜神経節細胞の初代培養

本研究には、生後 2 日目のラットを使用した。ラット初代培養網膜神経節細胞の単離は、Barres ら (Neuron 1, 791-803, 1988 年) の方法を用いて行った。本培養法は、抗体をコーティングした培養ディッシュを用いて、2 ステップのイムノパニングを行うことによ

り、ほぼ 100% の純度で網膜神経節細胞を培養することができる方法である。パパインにより、網膜細胞の懸濁液を作成後、1 番目のステップには、抗マクロファージ抗体を使用し、2 番目のステップには、網膜神経節細胞のマーカである抗 Thy1 抗体を使用して、網膜神経節細胞の単離を行った。細胞を単離後、96 ウェル培養プレートに無血清培養液中で 7 日以上培養した後、実験に使用した。

(2) グリア細胞の初代培養

グリア細胞の初代培養は生後 3 日目のラット大脳皮質を使用して行った。大脳皮質を単離後、トリプシンにより細胞懸濁液を作成し、10% 血清培養液を用いて約 1 週間培養した。その後、播きかえを行い、約 10 日間培養後、実験に使用した。本実験で使用したグリア細胞の構成は、免疫細胞化学的検討から、アストロサイト 82.5%、ミクログリア 16%、オリゴデンドロサイト 0.5%、神経細胞 1% であった。

(3) グリア細胞由来アポ E 含有リポプロテインの単離

初代培養グリア細胞の培養液を回収後、シヨ糖密度勾配超遠心法により、分離し、12 画分に分画した。各画分の一部を使用してイムノプロットを行い、アポ E の分布を観察した。12 画分中でアポ E 含有量の多い 4 画分を回収し、濃縮して実験に使用した。

(4) 神経細胞障害の誘導と評価方法

神経細胞障害（アポトーシス）の誘導は、網膜神経節細胞の培養液中から栄養因子を除去することにより行った。具体的には、網膜神経節細胞を栄養因子が入っていない培養液で 3 回洗浄後、栄養因子が入っていない培養液中で 24 時間培養し、神経細胞障害を誘導した。細胞障害は、ヘキスト 33258 で核を染色することにより検出した。核の染色像が、凝集や断片化を示している細胞をアポトーシス細胞として判定した。

(5) アポ E 含有リポプロテインの蛍光標識

シヨ糖密度勾配超遠心法で単離したグリア細胞由来アポ E 含有リポプロテインを、Texas Red Protein labeling kit により標識し、洗浄、濃縮して実験に使用した。

(6) 細胞内シグナル経路の解析

網膜神経節細胞におけるアポ E 含有リポプロテインによる神経保護機構の解析は、主にイムノプロット、阻害剤、small interfering RNA により行った。イムノプロットの検出は、化学発光法を用いた。Small interfering RNA をトランスフェクション後、24 時間、48 時間で細胞を回収し、イムノプロットにより

標的タンパク質の発現量が減少していることを確認した。

4. 研究成果

(1) アポE含有リポプロテインは神経細胞をアポトーシスから保護する

網膜神経節細胞に対する神経障害は、培養液中から栄養因子を除去することにより誘導し、24時間後の核の染色像を検出することで、神経細胞死の割合を算出した。本実験から、対照群の網膜神経節細胞が約10%のアポトーシス様の核染色像を呈したのに対し、栄養因子除去により神経障害を誘導した群(アポトーシス群)では70から90%のアポトーシス様核染色像が検出された。驚くべきことに、アポトーシス群の条件にアポE含有リポプロテインを添加した群(アポE群)では、ほぼ対照群と同程度までアポトーシス様の核染色像が改善された。このことからアポE含有リポプロテインは、網膜神経節細胞をアポトーシスから保護することが示された。

(2) アポE含有リポプロテインによる神経保護効果に、リポプロテインの細胞内への取り込みは必要ない

通常、リポプロテインが脂質を細胞内へ運搬する際、受容体により細胞内へと取り込まれることから、アポE含有リポプロテインの神経保護に、リポプロテインの細胞内への取り込みが必要か否かを検討した。アポE含有リポプロテインをTexas redで蛍光ラベルし、網膜神経節細胞の培養液中に添加後、顕微鏡下で細胞内へのリポプロテイン取り込みの程度を観察した。リポプロテインの細胞内への取り込みをcytochalasin Dにより阻害したところ、蛍光陽性の細胞はcytochalasin D非添加群で69%に対し、添加群では8%であり、リポプロテインの細胞内への取り込みがcytochalasin Dにより著しく阻害された。同条件でcytochalasin D添加により、アポE含有リポプロテインの神経保護効果が影響を受けるかを検討したところ、cytochalasin Dによる変化は見られなかった。このことからアポE含有リポプロテインによる神経保護効果にリポプロテインの細胞内への取り込みは必要ないことが示された。

(3) アポE含有リポプロテインの神経保護機構にcalcineurinが関与する

研究代表者による以前の研究で、LDL受容体ファミリーの受容体により誘導される細胞内シグナルが、神経保護効果に重要であることが示されたことから、どのような分子がこの神経保護効果に関与するかを探索した。本実験から、calcineurinの阻害剤であるFK506によって神経細胞死が抑制されること、

またアポE含有リポプロテインの添加によってcalcineurinの恒常活性化体の形成が抑制されることが示された。これらのことから栄養因子除去によるアポトーシスの誘導にはcalcineurin活性化が関わっており、アポE含有リポプロテインの神経保護機構には、その活性抑制が重要であることが示された。

(4) アポE含有リポプロテインの神経保護機構にphospholipase C gamma1が関与する
研究代表者による以前の研究で、protein kinase C deltaが神経保護機構に関与していることが明らかとなっていることから、その上流の分子として推測されるphospholipase Cの関与を検討した。Phospholipase Cは、protein kinase C deltaの活性化を誘導するdiacylglycerolを産生する酵素である。はじめにphospholipase Cの阻害剤であるU73122を添加したアポトーシス実験を行ったところ、アポE含有リポプロテインによる神経保護効果が著しく阻害された。次にphospholipase C gamma1の発現量をsmall interfering RNAを用いて抑制し、アポトーシス実験を行った結果では、ほぼ完全にアポE含有リポプロテインによる神経保護効果が消失した。これらの結果からアポE含有リポプロテインのアポトーシスに対する神経保護機構にphospholipase C gamma1が関わっていることが明らかとなった。

(5) アポE含有リポプロテインの酸化ストレスに対する神経保護効果

本研究では、これまで培養液中から栄養因子を除去することによりアポトーシスを誘導してきた。そこで、次にアポE含有リポプロテインによる神経保護効果は、栄養因子除去以外の因子により誘導される障害に対しても有効か否かを検討した。本実験では、様々な神経障害や神経変性に関わると思われる酸化ストレス障害に対する神経保護効果を検討した。酸化ストレスは、網膜神経節細胞の培養液中に過酸化水素を添加することで誘導した。実験結果から、アポE含有リポプロテインは、過酸化水素により誘導される酸化ストレス障害に対しても神経保護効果を持つことが示された。

以上の研究成果から、アポE含有リポプロテインによる網膜神経節細胞のアポトーシスに対する神経保護機構が明らかとなった。この神経保護機構には、リポプロテインの細胞内への取り込みは必要ではなく、神経細胞の表面で受容体による細胞内シグナル伝達が誘導され、そのシグナル経路にはcalcineurinやphospholipase C gamma1が関与することが明らかとなった。またアポE含有リポプロテインによる神経保護効果は、栄養

因子欠乏だけでなく、酸化ストレスにより誘導される神経細胞障害に対しても、有効であることが明らかとなった。これらの研究成果は、視神経を構成する網膜神経節細胞に対するリポプロテインによる新たな役割およびそのメカニズムを明らかにしたものであり、今後、本研究をさらに発展させることで、糖尿病性網膜症の新たな治療法開発に繋がると考えられる。

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2件)

Vance JE, Hayashi H

Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system

Biochimica et Biophysica Acta

査読有、(2010) (in press)

Hayashi H, Campenot RB, Vance DE,

Vance JE

Protection of neurons from apoptosis by apolipoprotein E-containing lipoproteins does not require lipoprotein uptake and involves activation of phospholipase C 1 and inhibition of calcineurin

The Journal of Biological Chemistry

査読有、284 (2009) 29605-29613

[学会発表](計3件)

発表者：林 秀樹

発表表題：リポプロテイン受容体による網膜神経節細胞保護機構の解析

学会名：第2回レチナ・リサーチミーティング

年月日：2009年12月12日

場所：東京大学医科学研究所

発表者：林 秀樹

発表表題：Lipoproteins derived from glia protect retinal ganglion cells from apoptosis

学会名：第4回緑内障サマーキャンプ

年月日：2009年7月31日

場所：天津プリンスホテル

発表者：林 秀樹

発表表題：グリア細胞由来リポプロテインによる神経細胞保護シグナルの解析

学会名：第82回日本薬理学会年会

年月日：2009年3月17日

場所：パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ等

<http://sendou.kuma-u.jp/research/hayashi.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 秀樹 (HAYASHI HIDEKI)

熊本大学・大学院先端機構・特任助教

研究者番号：90508657