

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16875

研究課題名(和文) 低酸素性虚血性脳症におけるミクログリアでのLOX-1の役割解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) The role of LOX-1 in inflammatory activation of microglial under hypoxic-ischemic conditions

研究代表者

青木 良則 (Aoki, Yoshinori)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：70726629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：新生児低酸素性虚血性脳症におけるLectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1)の役割について、ラットミクログリア初代培養細胞を用いて検討した。低酸素虚血下のミクログリアでLOX-1の発現が亢進し、炎症性メディエーターの産生と関連することを明らかにした。さらにLOX-1の発現亢進は、p38-MAPK、NF- κ Bの活性化を介して炎症性メディエーターの産生と関連していた。これらの分子はLOX-1シグナル伝達経路にあり、その抑制はミクログリアの傷害性の分子発現様式を変化させ、炎症性メディエーターの産生を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児低酸素性虚血性脳症は先進国において1000出生あたり1-8の発生率であり、重篤な後遺症につながる予後不良な疾患である。低体温療法などすでに臨床に導入されている治療法があるものの、いまだに治療効果としては不十分であり、有効な治療法の開発が望まれている。本研究成果から、LOX-1とそのシグナル伝達経路は新生児低酸素性虚血性脳症に対する新しい治療法開発のターゲットとなることが再確認された。さらに、本研究の細胞モデルは今後の新規治療法開発に役立つものであり、本研究ではそのような有用な実験系の確立、および新規治療法開発につながる重要な知見を発見することができた。

研究成果の概要(英文)：I performed oxygen glucose deprivation treatment of primary rat microglial cells and evaluated the expression levels of LOX-1, cytokines and chemokines using siRNA and inhibitors. As a result, I found that defects in oxygen and nutrition induced LOX-1 expression and led to the production of inflammatory mediators, such as the cytokines and the chemokines. Then, the LOX-1 signal transduction pathway was blocked by inhibitors, LOX-1 siRNA, the p38-MAPK inhibitor SB203580, and the NF- κ B inhibitor BAY11-7082, and the production of inflammatory mediators was suppressed. Moreover, it was hypothesized that LOX-1 in microglial cells was autonomously overexpressed by positive feedback of the intracellular LOX-1 pathway. Microglial cells are known to contribute to various neurological diseases. Hypoxic and ischemic brain injuries result in lifelong neurological and mental deficiency. LOX-1 and its related molecules or chemicals may be major therapeutic candidates.

研究分野：小児科学

キーワード：新生児低酸素性虚血性脳症

1. 研究開始当初の背景

今日の本邦の周産期医療は新生児死亡率を大きく下げ、その医療水準は国際的にもトップレベルにあり、世界的リーダーである。しかし、未熟児出生数の増加と重症化する後障害は新たな問題である。後者の主な要因は、新生児低酸素性虚血性脳症 (HIE: Hypoxic Ischemic Encephalopathy) の予測不能性と未発達な治療による。HIE の発生は胎児モニタリングを行なっていても防げないことが少なくない。また、HIE の治療法開発は世界的に行われているが、十分な安全性と有効性が示された治療法はない。HIE の病態は、胎児仮死や新生児仮死に引き続いて生じ、中枢神経系の低酸素虚血による機能不全により起こり、重度の場合は不可逆的で重篤な後遺症 (脳性麻痺、てんかん、知的障害など) をきたす。細胞レベルでは、低酸素虚血の結果として ATP 量が欠乏し、細胞膜イオンポンプの機能障害による細胞死が引き起こされる。また、蘇生により再灌流が起こると低酸素虚血状態から回復するが、細胞外興奮性アミノ酸の蓄積、酸化ストレス、ミトコンドリア機能不全、神経炎症などが生じ細胞死が進行する。唯一 HIE に対する有効性が示されている低体温療法を行っても死亡や重度後遺症が高率に発生するため、根治的な治療法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

ラット新生仔低酸素性虚血性脳症モデル (HIE モデル) において病側脳で LOX-1 の発現が上昇し、抗 Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) 中和抗体の投与により梗塞巣、脳浮腫、神経細胞のアポトーシスが改善する (参考文献 1)。LOX-1 は酸化 LDL の受容体であり、動脈硬化形成の増悪因子として知られている (参考文献 2)。これまでの研究から、HIE モデルの脳病巣では LOX-1 発現細胞は 90%以上がミクログリアである (参考文献 3)。ミクログリアは中枢神経系の免疫担当細胞であるが、サイトカインやアポトーシス関連分子の発現に関与している。一方、古くから HIE の病態にサイトカインやアポトーシスが関与していることが知られている。HIE に陥った極初期段階で LOX-1 が関わり、LOX-1 を制御することが新たな治療につながる事が考えられる。そこで、HIE モデルの in vitro 実験系を確立し、分子細胞学的に HIE における LOX-1 の役割について明らかにすることを目的とし、本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) HIE モデルの in vitro 実験系の確立:

④ラットミクログリア初代培養細胞の作成: 生後 0 から 3 日齢の Sprague Dawley ラットの脳を取り出し、無菌的に細分化と filtering を行い mixed glial culture として予備培養を行った。その後、shaking 法によりミクログリアを単離した (参考文献 4)。単離された細胞は、ミクログリアのマーカーである Iba-1 抗体陽性細胞が 98%以上であることを確認した (図 1)。

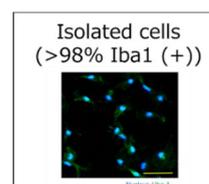


図 1 初代培養細胞

⑤HIE モデルの作成: ④の初代培養細胞を用いて、低酸素低血糖 (OGD: Oxygen glucose deprivation) 負荷により作成した。具体的には、単離したミクログリア細胞を、無糖培地へ交換したのち、BIONIX-2 hypoxic cell culture kit (Sugiyamagen, Tokyo, Japan) を用いて無酸素状態で 6 時間置き、通常培地に交換し解析に用いた。

⑥HIE モデルの検証: HIE モデルと同様に、LOX-1、炎症性サイトカインやケモカインなどの炎症性メディエーターの発現変化を定量 PCR と免疫細胞化学、ウエスタンブロット、網羅的サイトカインアッセイで解析した。OGD 負荷をした OGD 群と、対照群 (CTL 群) で比較した。

(2) siRNA による LOX-1 ノックダウンの実験:

④LOX-1 細胞内シグナル系への影響: LOX-1 siRNA (Silencer Select Rat *Olr1* (Thermo Fisher Scientific)) を、Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent を用いて OGD 負荷前に投与した。LOX-1 siRNA を使用した LOX-1 siRNA 群と、既知の RNA をノックダウンしないように設計された Negative control siRNA を使用した Neg siRNA 群を作成し、⑥と同様の解析を行った。

⑤ミクログリアの極性解析: CTL 群、OGD 群、LOX-1 siRNA 群でマイクロアレイ解析を行い、ミクログリアの極性分布を調べた。ミクログリアはマクロファージと同様、M1 (細胞傷害性) あるいは M2 (細胞保護性) の極性を持ち、活性化を有する際にどちらに傾くかが病巣形成に影響を及ぼすことが知られている。HIE の極初期病態の形成にミクログリアがどのように関与するのかを考察するのに重要である。また、この 3 群に対して代謝物質の変化を調べるためメタボローム解析 (CE-TOFMS) も行った。

(3) LOX-1 細胞内シグナル伝達系の解明実験:

LOX-1 細胞内シグナル伝達系には、PKC や MAPK、NF- κ B などが関与することが知られている。まずは上記 ⑥を用いて、低酸素低血糖 (OGD) 負荷ミクログリアにおいて LOX-1 の発現変化と関

連があるシグナル伝達分子を抽出した。さらに、これらの分子の阻害物を OGD 負荷前に投与し、LOX-1 の発現変化、炎症性メディエーターの発現変化などを解析した。

(4) LOX-1 細胞内シグナル伝達系を標的とした新規治療法のスクリーニング:

LOX-1、および LOX-1 細胞内シグナル伝達系を阻害する作用を有する化合物について、本研究で作成した細胞モデルを用いてスクリーニングを行う。低酸素低血糖 (OGD) 負荷を行った HIE ミクログリアにこれらの化合物を投与し、LOX-1 の発現変化、炎症性メディエーターの発現・産生変化や、細胞の viability の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 低酸素虚血によりミクログリアで LOX-1 の発現が誘導され、サイトカイン、ケモカインの産生が増加した。

ラットミクログリア初代培養細胞に対して OGD 負荷を行い、CTL 群との違いを調べた。免疫細胞化学では、CTL 群では LOX-1 陽性細胞をほとんど認めなかったのに対して、OGD 群では多数の LOX-1 陽性細胞を認めた (図 2)。OGD による *Olr1* mRNA、および LOX-1 タンパクの変化は、それぞれ定量 PCR、ウェスタンブロッティングでも有意な増加であった (図 2)。次に網羅的サイトカイン、ケモカイン測定の結果、炎症性サイトカインである IL-1、IL-6、TNF の培養上清中の濃度は OGD 群では CTL 群と比べ有意に高く、ケモカインである CCL2、CCL5、CCL3 の培地中の濃度も OGD 群では CTL 群と比べ有意に高かった。

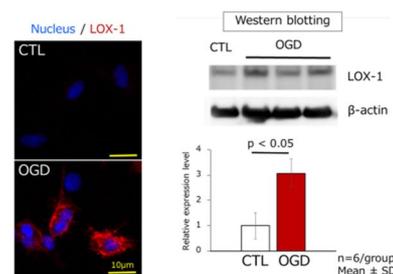


図 2 OGD による LOX-1 の発現変化

(2) LOX-1 ノックダウンにより、サイトカイン、ケモカインの産生は抑制された。

網羅的サイトカイン、ケモカイン測定の結果、炎症性サイトカインである IL-1、IL-6、TNF の培養上清中の濃度は OGD 群、Neg siRNA 群では CTL 群と比べ有意に高く、LOX-1 siRNA の導入により抑制された (図 3)。ケモカインである CCL2、CCL5、CCL3 の培地中の濃度も OGD 群、Neg siRNA 群では CTL 群と比べ有意に高く、LOX-1 siRNA の導入により抑制された (図 3)。IL-1、IL-7、IL-12、CCL20、CXCL-1、G-CSF、VEGF も同様に OGD 群で CTL 群と比べ有意に高く、LOX-1 siRNA 群では抑制された。IFN、IL-4、M-CSF は 4 群間で差を認めなかった。またその他のサイトカイン 7 項目については、4 群で測定感度以下だった。Nos2 (iNOS) mRNA の発現は OGD 群、Neg siRNA 群で CTL 群に比べ有意に上昇しており、LOX-1 siRNA の導入により抑制された。ROS の産生量も OGD 群で CTL 群と比較して優位に上昇しており、LOX-1 siRNA 導入により抑制された。

以上より、ミクログリアにおいて、低酸素虚血により誘導された炎症性サイトカイン・ケモカインや iNOS、ROS などの炎症性メディエーターの産生は LOX-1 のノックダウンで抑制されたことから、LOX-1 と直接的、あるいは間接的に関連があると考えられた。

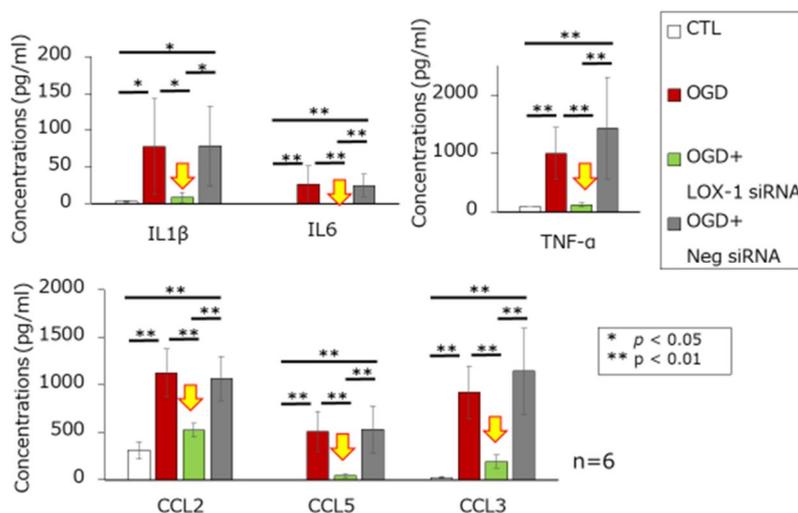


図 3 培養上清中のサイトカイン、ケモカイン濃度

(3) LOX-1 ノックダウンにより、ミクログリアの遺伝子発現パターンが傷害性的フェノタイプから細胞保護・抗炎症性的フェノタイプに変化した

CTL 群、OGD 群、LOX-1 siRNA 群の 3 群についてマイクロアレイによる解析を行った。3 群の主成分分析の結果、この 3 群はそれぞれ特徴的な集団を形成しており、さらに LOX-1 siRNA 群は CTL 群と OGD 群の中間に位置していた。

次に、CTL 群と OGD 群、および OGD 群と LOX-1 siRNA 群を比較し、共通の発現変動遺伝子

(Differentially expressed genes (DEGs)) を抽出した。CTL 群と比較して OGD 群で発現が上昇し、かつ LOX-1 siRNA 群で OGD 群と比較して発現が抑制された遺伝子は 248 個であった。その上位には、サイトカイン、ケモカインや免疫応答のシグナル伝達に関わる遺伝子などが含まれていた。反対に、CTL 群と比較して OGD 群で発現が低下し、LOX-1 siRNA 群で発現が回復していた遺伝子は 250 個であった。その中には、シナプスの形成・成熟に関わる遺伝子などが含まれていた。さらに、3 群での M1 マーカーの遺伝子、および M2 マーカーの遺伝子発現パターンを比較すると、CTL 群と比較し OGD 群では M1 型への極性変化がみられ、LOX-1 のノックダウンにより M1 マーカー発現の抑制、M2 マーカー発現の回復がみられた (図 4)。

遺伝子セット解析では、CTL 群に比べて OGD 群で発現が上昇し、LOX-1 siRNA 群で発現が抑制された KEGG pathway は 22 個あり、“Cytokine cytokine receptor interaction”、“Chemokine signaling pathway” などサイトカイン・ケモカインシグナルに関わるもの、および “Nod like receptor signaling”、“Toll like receptor signaling”、“JAK STAT receptor signaling” など自然免疫応答 (innate immune signaling) に関連したものが含まれていた。一方、CTL 群に比べて OGD 群で発現が低下し、LOX-1 siRNA 群で発現が回復していた KEGG pathway は 1 個であり、シナプスの形成・成熟に関わる遺伝子セットである “Axon guidance” であった。

以上の結果のうち、OGD により炎症性メディエーターの発現が誘導されるという結果は前述の定量 PCR、および分泌サイトカイン・ケモカイン測定の結果と一致するものであった。さらに、自然免疫応答に関わる遺伝子群が変化していたことは、これらの遺伝子群が低酸素虚血下のミクログリアにおける LOX-1 の活性化と関連があることを示唆するものであった。

次に CTL 群、OGD 群、LOX-1 siRNA 群の 3 群

について CE-TOFMS 法によりメタボローム解析を行ったが、意義のある変化は見いだせなかった。

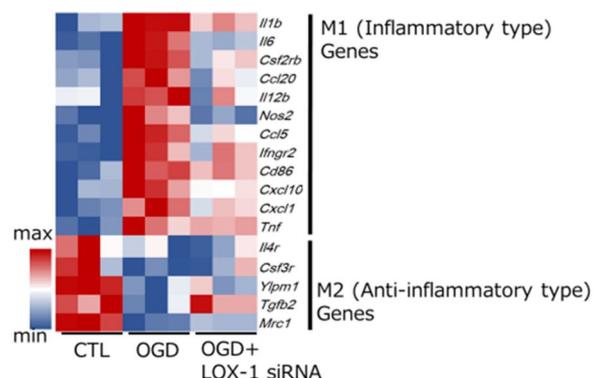


図 4 遺伝子発現パターンの比較

(4) LOX-1 細胞内シグナル伝達経路の解明実験

結果(3)の遺伝子の中から、他の細胞における LOX-1 シグナル伝達経路を構成し、かつミクログリアの活性化プロセスにおいて重要と考えられている p38-MAPK、ERK1/2、および転写因子である NF- B に注目し解析を行った。

全 p38-MAPK に対するリン酸化 p38-MAPK の比は CTL 群と比較して OGD 群、Neg siRNA 群で上昇しており、LOX-1 siRNA 群では抑制された。一方で、全 ERK1/2 に対するリン酸化 ERK1/2 の比については、LOX-1 siRNA 群は OGD 群、Neg siRNA 群と差を認めなかった。NF- B p65 は免疫細胞化学において、CTL 群、LOX-1 siRNA 群では核周囲が陽性であったのに対して、OGD 群、Neg siRNA 群では核に一致し陽性であった。核分画のウェスタンブロットングにおいても同様に、CTL 群と比較して OGD 群、Neg siRNA 群では NF- B p65 の発現が上昇しており、LOX-1 siRNA 群では発現が抑制されていた。以上より、ミクログリアにおいて低酸素虚血により誘導された LOX-1 の発現は、p38-MAPK、NF- B の活性化と関連があり、これらシグナル伝達分子の活性化を介して炎症性メディエーターの産生を誘導することが示唆されたが、ERK1/2 は関与していないと考えられた。

p38-MAPK および NF- B の活性化と、LOX-1 発現との関連、さらにはミクログリア活性化との関連を調べるために、それぞれの阻害剤を使用した解析を行った。OGD 投与 1 時間前に p38-MAPK の阻害剤である SB203580 を加えた SB 群、および OGD 投与 30 分前に NF- B 阻害剤である BAY11-7082 を加えた BAY 群を CTL 群、OGD 群と比較した。

培養上清中のサイトカイン、ケモカインの濃度を測定した結果、OGD 群と比較して SB 群、BAY 群では炎症性サイトカインの IL-1、IL-6、TNF の産生が抑制された。定量 PCR においても分泌サイトカインの濃度測定結果と同様に、OGD 群で上昇した炎症性サイトカインである *Il1b*、*Il6*、*Tnfa* mRNA の発現は、SB 群、BAY 群では有意に抑制された。ケモカインの *CCL2*、*CCL5*、*CCL3* の培養上清中の濃度も、OGD 群と比較し SB 群、BAY 群では抑制された。一方で、LOX-1 の発現については、免疫細胞化学により、OGD 群と同様に、SB 群、BAY 群では多数の LOX-1 陽性細胞が見られた。定量 PCR でも、*Olr1* (LOX-1) の発現は OGD 群と同様に SB 群、BAY 群においても CTL 群と比較して上昇していた。また、クロマチン免疫沈降アッセイでは、*Olr1* (LOX-1) のプロモーター領域に NF- B と HIF-1 が結合することが分かった。

これらの結果をまとめると、OGD により発現が誘導された LOX-1 からのシグナルは p38-MAPK の活性化、NF- B の活性化により伝達され、炎症性サイトカイン・ケモカインや iNOS などの炎症

性メディエーターの産生に至ると考えられる。そして、LOX-1 のノックダウンと同様に p38-MAPK、NF- κ B 活性化の阻害はこれら炎症性メディエーターの産生を抑制した。本研究の成果はここまでであり、本研究の細胞モデルにおいて LOX-1、および LOX-1 細胞内シグナル伝達系を阻害する作用を有する化合物の発見には至らなかった。

5 . 参考文献

- (1) Akamatsu T, Dai H, Mizuguchi M, Goto Y, Oka A, Itoh M, LOX-1 is a novel therapeutic target in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Pathol.* 184(6):1843-52 (2014).
- (2) Taye A, El-Sheikh AA, Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 pathways. *Eur J Clin Invest.* 43(7):740-5 (2013).
- (3) Akamatsu T, Sugiyama T, Oshima T, Aoki Y, Mizukami A, Goishi K, Shichino H, Kato N, Takahashi N, Goto YI, Oka A, Itoh M. Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1-Related Microglial Activation in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: Morphologic Consideration. *Am J Patho.* 191(7): 1303-1313 (2021).
- (4) Sanagi T Yabe T, Yamada H, The regulation of pro-inflammatory gene expression induced by pigment epithelium-derived factor in rat cultured microglial cells. *Neurosci letters.* 380(1-2); 105-110 (2005).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 青木良則
2. 発表標題 LOX-1 mediates the inflammatory activation of microglial under hypoxic-ischemic conditions
3. 学会等名 Neuroscience 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木良則
2. 発表標題 The role of LOX-1 in inflammatory activation of microglia under hypoxic-ischemic conditions
3. 学会等名 12th World congress for Neurorehabilitation (国際学会)
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
---------	---------