

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：33902

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2023

課題番号：20K22728

研究課題名（和文）脂質代謝物によるミクログリアの活性化と天然核内受容体アゴニストによる抑制作用

研究課題名（英文）Activation of microglia by lipid metabolites and inhibitory effect by natural nuclear receptor agonists

研究代表者

篠田 知恵（坪井知恵）（Shinoda(Tsuboi), Tomoe）

愛知学院大学・薬学部・助教

研究者番号：70736355

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：脂質異常症はアルツハイマー症（AD）発症の危険因子である。中枢のミクログリアの活性化による炎症反応がAD発症を誘発すると考えられるようになってきたことから、「脂質代謝の変調」による「ミクログリアの活性化」がAD発症に先駆するのではないかと考えた。脂質代謝の変調として用いたパルミチン酸（PA）が炎症マーカーやアポトーシス誘導因子のmRNA発現を上昇させ、それをレチノイドX受容体（RXR）アゴニストであるベキサロテン（BEX）が抑制することが示唆された。この結果より、PAによるミクログリアの活性化はRXRを介して抑制されると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今までミクログリアの活性化を脂質代謝の変調の観点から調べるアプローチ法はなかった。ADプレクリニカル期における「脂質代謝の変調」という新しいパラメーターを明らかにすることで、ミクログリアの活性化の理解が大きく進むことが期待される。また、NRによる遺伝子転写調節はアゴニストの微妙な構造の違いで異なる。AD治療薬としての既存のアゴニストは重篤な副作用を示すものが多い。今後、異なる遺伝子発現誘導をするであろう、構造の多様性に富む天然由来NRアゴニストの探索を行い、AD治療に対し病態生理機能の調節に有用である新しいアプローチ法と治療薬の発見に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Dyslipidemia is a risk factor for the development of Alzheimer's disease (AD). Since it is now believed that inflammatory responses caused by activation of central microglia induce the onset of AD, we hypothesized that "activation of microglia" caused by "alteration of lipid metabolism" may precede the onset of AD.

It was suggested that palmitic acid (PA), used as a lipid metabolism modulator, increased the mRNA expression of inflammatory markers and apoptosis-inducing factors, and that this was suppressed by the retinoid X receptor (RXR) agonist bexarotene (BEX). These results suggest that PA-induced microglial activation is suppressed via RXR.

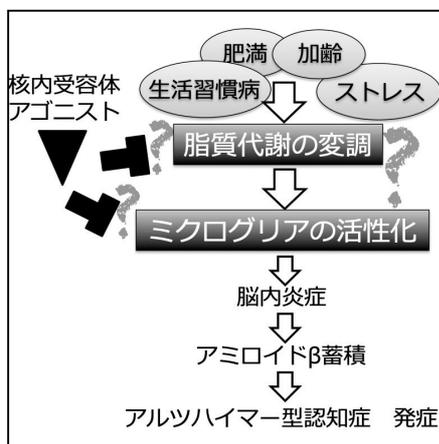
研究分野：天然医薬資源学

キーワード：脂質代謝 アルツハイマー ミクログリア 核内受容体 炎症

1. 研究開始当初の背景

認知症の約 70%はアルツハイマー症 (AD) によって生じるが、根本的な治療法や治療薬は未だ存在していない。超高齢化社会を迎え認知症患者が年々増加する日本において、AD の予防・治療・診断法の確立は喫緊の課題である。アミロイド (A β) が老人斑として脳内に蓄積し、神経細胞の死に至ることが AD の原因だと古くから考えられてきた。一方、近年、脳内のミクログリアの活性化が原因となり早期認知機障害が起こることが明らかになったことから、AD の原因の一つとして脳内の炎症が考えられるようになってきた。加齢やストレスなどが原因となり、中枢の免疫担当細胞であるミクログリアが活性型へと変化し、脳内炎症が惹起される。その後、アミロイド β の産生や蓄積が起こり、神経細胞死が誘導されることで AD が発症すると考えられるようになってきた。しかし、何がミクログリアの炎症反応を惹起するのか、またその病的意義について未だ不明な点が多く、AD と脳の免疫系との関連を明らかにすることは AD 研究の重要な研究目標の一つである。

一方、HDL 新生を通してコレステロール代謝を司るアポリポrotein E (ApoE) の遺伝子多型が AD 発症と関係することや、コレステロール合成阻害薬が AD 発症を抑制することより、脂質代謝は AD 発症に重要な役割を持つと予想される。実際、脂質異常症をはじめとする生活習慣病は AD 発症の危険因子であると考えられている。脂質代謝関連因子であり、食食関連因子でもある ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) の過剰発現によりニューロンの A の産生が減少するという報告や、脳内炎症時にミクログリアで脂質蓄積がみられるという報告から、AD 発症初期に起こる脳内炎症は「脂質代謝の変調」による「ミクログリアの活性化」が原因ではないかと考えた。また、核内受容体 (NR) である肝臓 X 受容体 (LXR) の活性化がミクログリアのリポ多糖による炎症作用を抑制するという報告があることから、天然由来 NR は脂質代謝の変調、ミクログリア活性化の抑制に対して有効である可能性が極めて高い。NR による遺伝子転写調節はアゴニストの微妙な構造の違いで異なる。AD 治療薬としての既存の合成アゴニストは重篤な副作用を示すものが多く、開発が中止されているものが多い。そこで、既存の合成 NR アゴニストとは異なる遺伝子発現誘導をするであろう、構造の多様性に富む天然由来 NR アゴニストの探索に着目をした。



2. 研究の目的

本研究では、脂質代謝の変調とミクログリアの活性化との関連を明らかにすることで、AD のまさしく最初期での「脳内炎症」病態の解明に対して新たな知見を示すと共に、脳内の脂質代謝の改善とミクログリアの正常な活動を高める天然由来 NR アゴニストを用いた薬物の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

マウス由来ミクログリア細胞株として MG5 と BV-2 細胞を用い、37 °C、5% CO₂ の条件で培養した。MG5 の培養には、アストロサイト様 A1 細胞の培養上清と 10% Fetal bovine serum (FBS)、0.5% Penicillin/Streptomycin を含む高グルコース Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) を 7:3 の割合で混合した培地を用いた。A1 細胞の培養上清は、A1 細胞を播種し 90-100%コンフルエントになった後、新しい 10%FBS、0.5% Penicillin/Streptomycin を含む高グルコース DMEM に替え、約 24 時間後に培地を回収し 0.45 μ m のフィルターシリンジでフィルタレーションして作製した。BV-2 の培養には 0.5% Penicillin / Streptomycin ならびに 10% FBS を含む Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) 培地を用いた。脂質代謝の変調として、飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (PA)、過酸化脂質である 4-ヒドロキシノネニナル (4-HNE) およびメチルグリオキサール (MGO) を用いた。

細胞を播種後、培地に PA 及び 4-HNE 及び MGO を添加して 8 時間培養した。その後、細胞を回収して RNA 抽出を行った後、炎症マーカーや小胞体ストレス関連因子の mRNA 発現を調べた。また、様々な NR アゴニストを PA と同時に細胞に添加し培養後、上記の mRNA 発現を調べ、その効果を検証した。核内受容体アゴニストは Am80 (RAR アゴニスト)、Bexarotene (BEX) (RXR アゴニスト)、T0901317 (LXR アゴニスト)、WY14643 (PPAR α アゴニスト)、GW501516 (PPAR δ アゴニスト)、Rosiglitazone (PPAR γ アゴニスト) を使用した。RXR アゴニストの作用検証の為に、HX531 および PA452 および UVI3001 (いずれも RXR アンタゴニスト) を BV-2 に添加し 30 分間前処理後、PA ならびに BEX を添加し、8 時間培養し同様に

mRNA 発現を調べた。更に RXR ノックダウン細胞を作成するため、SIGMA より RXR のプレデザイン shRNA を購入した。BV2 細胞にリポフェクタミン 2000 を用いて RXR shRNA をトランスフェクションし、48~72 時間インキュベートした。その後、ピューロマイシン 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加した培地に交換し、さらに一週間程度培養してセレクションを行い RXR α ノックダウン (KD) 細胞株を樹立した。

4. 研究成果

脂質代謝の変調として、PA200 μM を用い、炎症性サイトカインである *Tnfa* mRNA 発現を調べたところ、MG5 ならびに BV-2 共に *Tnfa* mRNA 発現の増加が認められた。その反応性は BV-2 細胞の方が大きかったことから、以後の実験は BV-2 細胞を用いた。BV-2 細胞を用いて、PA の濃度および刺激時間の条件検討を行った。まず、PA を 50、100、200、500 μM の濃度で細胞に添加し 8 時間培養後、MTT 法により細胞生存率を調べた。その結果、500 μM で有意な細胞生存率の低下が認められた。次に 50、100、200 μM の PA を BV-2 細胞に添加し 8 時間培養後の *Tnfa* mRNA 発現を調べたところ、200 μM で有意な増加が認められた。刺激時間を検討する為に、PA 200 μM を細胞に添加後、4、8、12、24 時間培養後の *Tnfa* mRNA 発現を調べたところ、PA 添加 8 時間の刺激で最も高い発現が認められた (Fig. 1)。以上の結果から、PA による炎症の誘導は、200 μM の濃度で 8 時間刺激する条件で行うこととした。また、同様に過酸化脂質である 4-HNE および MGO を用いて実験を行ったが、MG5 および BV-2 細胞の *Tnfa* mRNA 発現に変化が認められなかった。以上の結果より、脂質代謝の変調として PA がミクログリア細胞株に対し炎症反応を惹起させることが明らかとなり、以後の実験では PA を用いることとした。

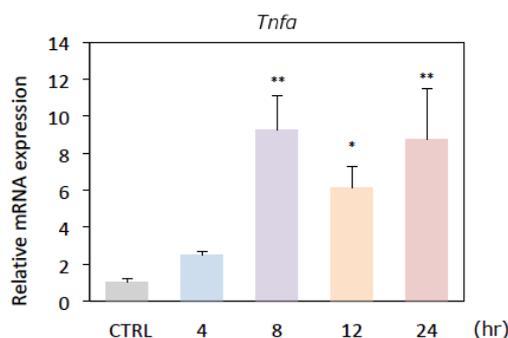


Fig. 1. PA刺激による*Tnfa* mRNA発現の経時的な変化
** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. CTRL, by Dunnett's tests (n=3-6).

次に、PA 200 μM の 8 時間の刺激により *Tnfa* 以外の炎症マーカーも誘導されるのか調べた。PA によって、炎症性サイトカインである *Il-1 β* 、*Il-6*、そして *Cox2* の mRNA 発現が有意に上昇し、脂質代謝関連因子 *Abca1* の抑制がみられた。更に、遊離飽和脂肪酸による炎症反応は TLR4 を介す炎症経路だけでなく、小胞体ストレスを介した経路も存在することから、小胞体ストレス依存性のアポトーシスに関連する *Atf4*、*Chop* ならびに *Cas12* の mRNA 発現を調べたところ、PA によってそれらの mRNA 発現は上昇した。以上の結果より、PA によってミクログリアに炎症反応が惹起されること、そして小胞体ストレス反応が惹起され、アポトーシス誘導が促進される可能性が示された。

核内受容体アゴニストは、転写因子 NF- κB や AP-1 の転写活性の抑制などによって細胞内への炎症シグナルを遮断し、炎症性サイトカインの産生を抑制する作用が示されている。そこで次に、PA による炎症反応に対する核内受容体アゴニストの抗炎症作用を調べた。200 μM の PA と同時に 1 μM 核内受容体アゴニストを BV-2 細胞に添加し、*Tnfa* の mRNA 発現を調べた。核内受容体アゴニストは Am80 (RAR アゴニスト)、Bexarotene (BEX) (RXR アゴニスト)、T0901317 (LXR アゴニスト)、WY14643 (PPAR α アゴニスト)、GW501516 (PPAR δ アゴニスト)、Rosiglitazone (PPAR γ アゴニスト) を使用した。PA による *Tnfa* mRNA 発現の上昇は、RXR アゴニストである BEX によって有意に抑制された (Fig. 2)。そこで次に、PA による他の炎症マーカー (*Il-1 β* 、*Il-6*、*Cox2*) および、小胞体ストレス関連因子 (*Atf4*、*Chop*、*Cas12*) に対する BEX による作用を同様に調べたところ、PA による *Il-1 β* 、*Il-6*、*Cox2*、*Atf4*、*Chop*、*Cas12* の mRNA 発現の増加が有意に抑制された。これらの結果より、ミクログリアの PA による炎症反応や小胞体ストレスならびにアポトーシスは BEX によって抑制されることが示唆された。故に、PA 誘導による炎症反応は RXR を介して抑制される可能性が推察された。

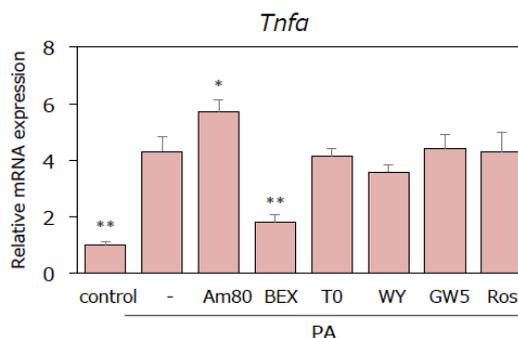


Fig. 2. *Tnfa* mRNA発現に対する核内受容体アゴニストによる影響
** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. PA, by Dunnett's tests (n=3).

そこで、BEX の作用が RXR を介しているかを RXR アンタゴニストを用いて検証した。BV-2 細胞を 10 μM HX531 および PA452 および UVI3001 で 30 分間処理した後、PA および BEX を添加し、*Tnfa* mRNA 発現に及ぼす効果を調べた。*Tnfa* mRNA 発現は PA によって増加し、BEX によって抑制されたが、HX531 添加によって PA 群と同程度まで増加した。一方、HX531

単独投与群では PA 単独投与群と差はみられなかった (Fig. 3)。しかし、PA452 も HX531 同様の結果を示したが、アンタゴニスト単独群で *Tnfa* mRNA 発現が上昇してしまっ。また、UVI3003 は細胞毒性を示したことから濃度の検討を行った結果、5 μ M の濃度で *Tnfa* mRNA の抑制傾向が得られた。この結果より、BEX の抗炎症作用は RXR を介した作用であると考えられる。そこで、RXR α の KD 細胞を作成し、更に検証を行うこととした。

リポフェクトアミンを用い、5 種類の RXR α shRNA を BV-2 細胞へ導入した。shRNA 導入後、細胞を回収し *Rxra* mRNA 発現を RT-qPCR 法を用いて調べることで KD 効率を評価した。その結果、*Rxra* mRNA の発現がコントロールに比べて約

半減している細胞を得ることができたことから、50%程度の KD 効率をもつ細胞を得ることができた。その内、RXR α の KD 効率の高い 3 種類の shRNA (sh86、sh103、sh131) を用い、更に導入方法の条件検討したところ、*RXR α* mRNA の発現がコントロールに比べて 30%程度まで減している細胞を得ることができた (Fig. 4)。今回得られた RXR KD 細胞を用い、RXR を介したミクログリアの活性化抑制の機序を調べていく予定であったが、RXR KD 細胞の樹立がうまくいかず難航してしまっ。今後、今回樹立できた RXR KD 細胞を用いて検証を進めると共に、各種の天然由来 RXR アゴニストを用いてその効果を検証していく予定である。

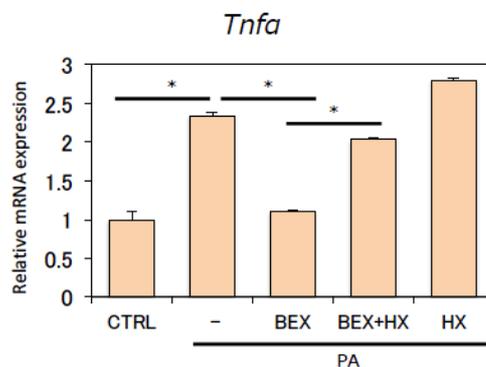


Fig. 3. PAによる*Tnfa* mRNA発現誘導に対するBEXの抑制効果に及ぼすRXRアンタゴニストの作用

*p < 0.05 vs. PA, by Tukey-Kramer tests (n=3).

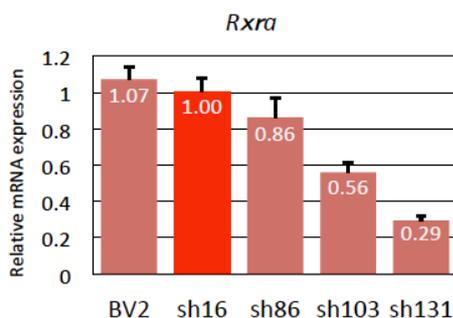


Fig. 4. RXR α KD細胞株におけるRXR α mRNA発現

数字はコントロールshRNA (sh16) を導入した細胞のRXR α mRNA発現量に対する比を示す (n=1).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------