

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791358

研究課題名(和文) ミクログリアの細胞機能調節によるアルツハイマー病治療の検討

研究課題名(英文) A study of microglial function to cure Alzheimer disease

研究代表者

長野 貴之 (Nagano, Takayuki)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：10368516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：PGE2はミクログリアの生存率を低下させた。この生存率低下はアポトーシスによるものであった。ミクログリアのアポトーシスはEP2アゴニストbutaprostとEP4アゴニストPGE1 alcoholによっても誘導された。しかし、PGE2による生存率低下はEP1-EP4のすべてのアンタゴニストによる影響を受けなかった。他方、PGE2による生存率低下はGSK-3阻害薬SB216763により抑制された。さらにPGE2はGSK-3のリン酸化レベルを低下させた。以上の結果からPGE2はミクログリアにアポトーシスを引き起こし、このアポトーシスにはGSK-3が関与している可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：PGE2 reduced cell viability in cultured rat microglia. This reduction in cell viability was due to apoptosis. Microglial apoptosis was also induced by two PGE2 receptor agonists, an EP2 agonist butaprost and an EP4 agonist PGE1 alcohol. However, PGE2-reduced cell viability was not reversed by EP1 - EP4 antagonists. On the other hand, PGE2-reduced cell viability was reversed by GSK-3 inhibitor SB216763. In addition, phosphorylated GSK-3 level was reduced by PGE2. These data suggest that PGE2 induces apoptosis in microglia, and this apoptosis is involved in GSK-3.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：ミクログリア アポトーシス 細胞死 プロスタグランジン cyclic AMP GSK-3

## 1. 研究開始当初の背景

### ミクログリア

ミクログリアはアストロサイトや神経細胞などと共に脳を構成する細胞の1つである。ミクログリアは脳内における免疫担当細胞として知られ、遊走 (migration)、貪食 (phagocytosis)、増殖 (proliferation)、サイトカイン遊離 (cytokine release)などの細胞機能 (microglial function)を持つ (J. Biochem. (Tokyo), 130, 169-175, 2001; Glia, 53, 67-73, 2006)。

### アルツハイマー病とミクログリア

アルツハイマー病は amyloid の沈着と、それに伴う神経細胞死 (neuronal cell death) によっておこる認知症である (Science, 297, 353-356, 2002)。amyloid 沈着の周辺にはミクログリアの集積が確認されており、このミクログリアは amyloid を貪食し、除去していると考えられている (Brain Res. Rev., 48, 234-239, 2005)。また、ミクログリアの遊走が阻害されると、ミクログリアの amyloid への集積がなくなり、amyloid 沈着が増加すると報告されている (Nat. Med., 13, 432-438, 2007)。一方、amyloid によりミクログリアは腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) や一酸化窒素 (nitric oxide, NO) といった細胞障害性因子を産生するようになり、このことが神経細胞を死に至らしめるとも考えられている (J. Neurosci., 25, 2566-2575, 2005; J. Neurosci., 27, 5394-5404, 2007)。したがって、ミクログリアの貪食や遊走を亢進させ、細胞障害性因子の遊離を抑制すると、アルツハイマー病を治療できる可能性がある。

アルツハイマー病と prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)  
ヒトのアルツハイマー病患者の脳脊髄液中の PGE<sub>2</sub> 量は健常者に比べて多く (Neurology, 53, 1495-1498, 1999)、PGE<sub>2</sub> 合成に関わる COX-2、mPGES-1 の発現量も上昇している (Neuroscience, 87, 319-324, 1998; Alzheimers Dement., 4, 6-13, 2008)。アルツハイマー病のモデル動物である APP トランスジェニックマウスにおいては、PGE<sub>2</sub> 受容体の一つ EP2 の発現量が上昇している (Ann. Neurol., 64, 304-314, 2008)。また、COX 阻害薬である ibuprofen は amyloid の沈着を抑制し (J. Neurosci., 23, 7504-7509, 2003)、EP2 ノックアウトによっても amyloid の沈着が抑制されている (J. Neurosci., 25, 10180-10187, 2005)。これらの報告から、アルツハイマー病に PGE<sub>2</sub> が関与している可能性は高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

PGE<sub>2</sub> は EP2 を介して培養ミクログリアの amyloid 貪食を減少させた (Brain Res., 1323, 11-17, 2010)。また、PGE<sub>2</sub> は EP2 を介して培養ミクログリアの ATP による遊走も減少させた (Brain Res., 1221, 1-5, 2008)。これらの研究成果から、PGE<sub>2</sub> は EP2 を介してミクログリアに作用し、アルツハイマー病を悪化させている可能性があると考えられる。まずはアルツハイマー病と PGE<sub>2</sub> とミクログリアとの関係をさらに調べるために、PGE<sub>2</sub> のミクログリア生存に対する影響について検討した。

## 3. 研究の方法

0-2 日齢のラット大脳皮質よりグリア細胞を調製し、14-28 日間の培養後、ミクログリアを単離培養した。培養ミクログリアに PGE<sub>2</sub> もしくは EP1-EP4 アゴニスト、EP1-EP4 アンタゴニストを処置した。薬物処置後の細胞の生存は MTT 法および培地中への LDH の遊離量を測定することにより行った。アポトーシスは DNA の断片化を電気泳動にて検討し、さらに PARP の分解をウエスタンブロットで検討することで行った。GSK-3 の活性はそのリン酸化レベルをウエスタンブロットで検出することで行った。

## 4. 研究成果

PGE<sub>2</sub> はミクログリアにアポトーシスを誘導した  
PGE<sub>2</sub> のミクログリア生存に対する影響について検討した。培養ミクログリアの生存については MTT 法で検討した。ミクログリアの生存率は 10<sup>-6</sup> M 以上の PGE<sub>2</sub> の 12-24 時間処置により減少した。6 時間の処置では 10<sup>-5</sup> M までの濃度が生存率に影響をあたえることはなかった。

この生存率低下が細胞死によるものなのか、増殖を抑制したのものなのかを判断するため、培地中への LDH の遊離について検討した。すると、10<sup>-6</sup> M 以上の PGE<sub>2</sub> の 24 時間処置により LDH 遊離が増加した。したがって、PGE<sub>2</sub> による生存率低下は細胞死を誘導しているものと考えられた。PGE<sub>2</sub> による細胞死がアポトーシスかどうかを判断するため、DNA の断片化について検討を行った。すると、PGE<sub>2</sub> は DNA の断片化を誘導した。PGE<sub>2</sub> によるアポトーシスは、PGE<sub>2</sub> により PARP の分解が促進されたことから裏付けられた。PGE<sub>2</sub> によるアポトーシスにどの caspase が関与しているかどうか調べるため、caspase 阻害薬を用いて検討した。10 種類の caspase 阻害薬 (Z-VAD-FMK、Z-WEHD-FMK、Z-VDVAD-FMK、Z-DEVD-FMK、Z-YVAD-FMK、Z-VEID-FMK、Z-IETD-FMK、

Z-LEHD-FMK、Z-AEVD-FMK、Z-LEED-FMK)を $10^{-5}$  Mまで検討したが、どれもPGE<sub>2</sub>による生存率低下に影響を与えなかった。

以上の結果から、PGE<sub>2</sub>によるミクログリアの生存率低下はcaspase非依存的なアポトーシスによるものであることが示唆された。

#### PGE<sub>2</sub>は既報のEP受容体に作用せずにアポトーシスを誘導した

PGE<sub>2</sub>による生存率低下は、PGE<sub>2</sub>の受容体EP1-EP4の各アンタゴニスト、SC-51322、AH6809、L-798,106、GW627368Xの $10^{-5}$  Mまでによる影響を受けなかった。

一方、EP2アゴニストbutaprost、EP4アゴニストPGE<sub>1</sub> alcoholの各 $10^{-6}$  Mはミクログリアの生存率を減少させたが、EP1アゴニスト17-phenyl trinor PGE<sub>2</sub>、EP3アゴニストsulprostoneの各 $10^{-6}$  Mは影響を与えなかった。同様に、butaprost、PGE<sub>1</sub> alcoholはLDH遊離、DNA断片化、PARPの分解を誘導したが、これらの誘導は17-phenyl trinor PGE<sub>2</sub>、sulprostone処置では認められなかった。またEP1からEP4までの選択的アゴニストのうち、butaprostは細胞内cAMP量の増加を誘導したが、PGE<sub>1</sub> alcohol、17-phenyl trinor PGE<sub>2</sub>、sulprostone処置では認められなかった。

以上の結果を考察すると、PGE<sub>2</sub>は既報のEP1-EP4のいずれかに作用してアポトーシスを誘導したとは考えにくい。

#### PGE<sub>2</sub>による生存率低下にはGSK-3が関与している可能性がある

PGE<sub>2</sub>によるミクログリアのアポトーシスに関わる分子を見つけるため、様々な薬物の生存率に対する影響を調べた。すると、PGE<sub>2</sub>による神経細胞のアポトーシスに関与が報告されているGSK-3の阻害薬であるSB216367はPGE<sub>2</sub>によるミクログリアの生存率低下を抑制した。さらにGSK-3のリン酸化に関与する可能性のあるセリンスレオニンホスファターゼの阻害薬であるokadaic acidによってもPGE<sub>2</sub>による生存率低下が抑制された。一方で、チロシンホスファターゼの阻害薬であるorthovanadate、PGE<sub>2</sub>による線維芽細胞のアポトーシスに関与が報告されているPTENの阻害薬であるbpV(pic)、ネクローシスの阻害薬であるnecrostatin-1、プロスタグランジントランスポートの阻害薬であるbromocresol green、EP1のセカンドメッセンジャーであるCa<sup>2+</sup>のキレーターBAPTA-AM、EP2の細胞内シグナルに関与するアデニル酸シクラーゼの阻害薬SQ22536、EP4経路に関与することが報告されているPI3Kの阻害薬LY294002は、いずれもPGE<sub>2</sub>による生存率低下に影響を与えなかった。

以上の結果から、PGE<sub>2</sub>によるミクログリアのアポトーシスにGSK-3が関与している可能性が考えられた。

そこでGSK-3の活性化をGSK-3のリン酸化レベルにて判断した。GSK-3のリン酸化レ

ベルの測定はウエスタンブロットにより行った。リン酸化GSK-3およびリン酸化GSK-3はPGE<sub>2</sub>の用量依存的に減少した。この減少はPGE<sub>2</sub>処置後1時間において確認され、この処置時間では細胞死は認められなかった。さらに、PGE<sub>2</sub>のリン酸化GSK-3レベル減少の効果がどの受容体を介しているのかを検討するために、同様の検討をPGE<sub>2</sub>の代わりにEP1からEP4までの選択的アゴニストを用いて行った。しかし、EP1からEP4までいずれの選択的アゴニストもリン酸化GSK-3およびリン酸化GSK-3の発現量に影響を与えなかった。

以上の結果は、PGE<sub>2</sub>のアポトーシスはEP1からEP4までのいずれのアンタゴニストによっても抑制されないことと矛盾はしない。したがって、PGE<sub>2</sub>によるアポトーシスはEP1からEP4までの受容体を介さず、GSK-3のリン酸化レベルを低下させることで誘導されるものである可能性が考えられる。ただし、GSK-3のリン酸化レベルに対する影響はEP2アゴニストのbutaprostとEP4アゴニストのPGE<sub>1</sub> alcoholでは認められず、一方でbutaprostとPGE<sub>1</sub> alcoholはアポトーシスを誘導した。このことはGSK-3の活性化とアポトーシスが単純に関連しないことを示唆しており、さらなる詳細な検討が必要であると考えられる。

今回の結果から、アルツハイマー病においてもミクログリアの生存はPGE<sub>2</sub>により調節されている可能性が考えられる。PGE<sub>2</sub>はミクログリアの食欲なども抑制していることから、PGE<sub>2</sub>シグナルはアルツハイマー病を悪化させている可能性があり、したがって、PGE<sub>2</sub>シグナルを抑制することはアルツハイマー病の改善につながる可能性がある。

#### 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 1件)

Takayuki Nagano, Shinya H. Kimura, Motohiko Takemura, Prostaglandin E<sub>2</sub> induces apoptosis in cultured rat microglia. Brain Res. in press (doi: 10.1016/j.brainres.2014.05.011) 査読有

[学会発表](計 1件)

長野貴之、木村信也、竹村基彦 プロスタグランジン E<sub>2</sub> はミクログリアにアポトーシスを誘導する 第86回日本薬理学会年会 2013年3月21日~2013年3月23日 福岡国際会議場(福岡県)

[図書](計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長野 貴之 (NAGANO, Takayuki)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10368516

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：