

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350921

研究課題名(和文) 脂質異常症による神経新生障害の機序解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms by which neurogenesis is impaired in dyslipidemic patients

研究代表者

石塚 俊晶 (Ishizuka, Toshiaki)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・教授)

研究者番号：30399117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス神経前駆細胞への酸化LDL刺激は、増殖に明らかな影響を与えなかったが、神経細胞への分化を有意に抑制することを見出した。さらに、神経前駆細胞において、酸化LDL受容体であるLOX-1を介してPKCの活性化やAktおよびCREBのリン酸化抑制により神経細胞への分化を抑制している機序が明らかになった。脂質異常症におけるうつ病や認知症の発症において、LOX-1阻害による神経新生障害の改善が新たな治療につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We revealed that stimulation with oxidized LDL (ox-LDL) significantly suppressed the differentiation of mouse neural progenitor cells into neural cells. In addition, it was found that the effects of ox-LDL is due to the activation of LOX-1 which activates PKC and inhibits the phosphorylation of Akt and CREB. Thus, the modulation of LOX-1 may ameliorate the impaired neurogenesis and neuropsychiatric function in dyslipidemic patients.

研究分野：総合領域

キーワード：神経前駆細胞 神経分化 酸化LDL LOX-1 PKC Aktリン酸化 CREBリン酸化

1. 研究開始当初の背景

近年、成体における脳の神経新生が海馬や側脳室にて行われていることが明らかになった。特に、海馬歯状回の神経前駆細胞は、虚血や外傷等の脳損傷時に増殖し神経新生を促進させることが報告されている。一方、高脂肪食で飼育し脂質異常症を呈したマウスでは、海馬歯状回での神経新生が低下し、不安、抑うつ、記憶障害がみられることが報告されている。脂質異常症では、酸化修飾された低比重リポ蛋白(酸化 LDL)が血中で増加していることが知られている。脳内の免疫担当細胞であるミクログリアを酸化 LDL で刺激すると、IL-1 β や TNF α 等の炎症性サイトカインやスーパーオキシドの産生促進がみられるが、これらの産生物質は神経前駆細胞の増殖や分化に対して、必ずしも一定の影響を及ぼしていない。

2. 研究の目的

マウス骨髄由来間葉系幹細胞において、酸化 LDL 受容体の発現が確認され、酸化 LDL の刺激が間葉系幹細胞の増殖や分化に影響をもたらすことが報告されている。また、我々は、近年、マウス骨髄由来間葉系幹細胞への高濃度グルコース刺激が酸化ストレスの増大をもたらし、低酸素環境での転写因子 HIF-1 α の発現誘導および VEGF や PDGF 等の血管新生因子の発現・産生を抑制していることを見出した。これらの事から、酸化 LDL が、通常酸素環境および低酸素環境において、神経前駆細胞の増殖および神経細胞への分化に対して何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。

また、脂質異常症では抗動脈硬化リポ蛋白である高比重リポ蛋白(HDL)の血中での低下がみられるとの報告や、高齢者の血中 HDL 値と認知機能に正の相関がみられるとの報告がある。さらに、ラット間葉系幹細胞を HDL で刺激すると細胞増殖の促進や酸化ストレスによるアポトーシスの抑制がみられている。しかし、HDL が神経前駆細胞に及ぼす直接的な影響は明らかになっていない。

そこで、我々は、マウス人工多能性幹細胞(iPS 細胞)よりマウス神経前駆細胞を作製し、酸化 LDL や HDL の刺激が神経前駆細胞の増殖や神経細胞への分化に与える影響を検討した。また、マウス神経前駆細胞での酸化 LDL 受容体や HDL 受容体の発現を確認するとともに、それぞれの受容体をノックダウンした時の変化や細胞内メカニズムに関して薬理学的手法を用いて検討した。さらに、低酸素環境でのマウス神経前駆細胞の HIF-1 α 発現誘導や増殖および分化に与える酸化 LDL や HDL の影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) マウス iPS 細胞から分化誘導したマウス神経前駆細胞を用いて、蛍光抗体染色を行い、蛍光顕微鏡にて酸化 LDL 受容体および HDL 受

容体の発現を確認した。次に、マウス神経前駆細胞に酸化 LDL や HDL による刺激を行い、細胞増殖は MTT アッセイ法で、神経細胞への分化は神経細胞特異的なマーカーである MAP2 および NeuN の発現を蛍光抗体染色やウェスタンブロット法でそれぞれ解析した。さらに、神経前駆細胞に酸化 LDL 受容体あるいは HDL 受容体の siRNA を導入して、それぞれの受容体をノックダウンした後、酸化 LDL や HDL 刺激がもたらす作用に対する影響を検討した。

(2) マウス iPS 細胞から分化誘導した神経前駆細胞を低酸素環境(1, 3, or 5% O₂)にて培養した。培養開始時に、酸化 LDL や HDL による刺激を行い、低酸素環境における神経前駆細胞の HIF-1 α 発現、細胞増殖、神経細胞への分化に与える影響を検討した。また、HIF-1 α の分解を阻害するプロリル水酸化酵素阻害薬やプロテアソーム活性阻害薬を前添加し、酸化 LDL や HDL 刺激がもたらす作用への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) マウス iPS 細胞を、低接着性ディッシュに 1.5×10^4 cells/cm² の密度で播種し LIF 不含培地で培養することにより胚様体を形成させた。形成開始 4 日後に BMP-4 受容体アンタゴニストである Noggin 20 ng/ml で刺激し、さらに 3 日後にマトリゲルでコートしたディッシュに接着させて、Nestin 陽性の神経前駆細胞への分化を誘導した。

(2) (1)で得られたマウス神経前駆細胞に、EGF, bFGF, N2 等の増殖因子とともに酸化 LDL 1~10 μ M あるいは HDL 2~20 μ M の刺激を行った。刺激 24~48 時間後の細胞数を MTT アッセイで評価したところ、酸化 LDL あるいは HDL 刺激では、いずれも有意な細胞数の増加はみられなかった。

(3) 次に、マウス神経前駆細胞をレチノイン酸 3 μ M で 7~14 日間培養することにより神経細胞への分化を誘導した。この分化誘導時に、酸化 LDL 1~10 μ M あるいは HDL 2~20 μ M の刺激を行った。酸化 LDL 3 or 10 μ M の刺激により、分化誘導後の MAP2, NeuN の発現が有意に低下し、神経細胞への分化に対する抑制作用が認められた。一方、HDL の刺激はいずれの濃度においても有意な影響を与えなかった。

(4) 蛍光抗体染色にて、マウス神経前駆細胞において、酸化 LDL 受容体である LOX-1 の発現を確認した。次に、LOX-1 siRNA をマウス神経前駆細胞に導入し発現のノックダウンを行った後、神経細胞への分化誘導を行った。LOX-1 siRNA 導入は、レチノイン酸による神経細胞分化には影響を与えなかったが、酸化 LDL による神経分化抑制作用は有意に阻害し

た。これより、酸化 LDL の神経分化抑制作用は LOX-1 を介した作用であることが示唆された。

(5) 血管内皮細胞や間葉系幹細胞等での検討により、酸化 LDL の刺激は、LOX-1 を介して PKC や PKA の活性化促進および Akt リン酸化抑制をもたらすことが報告されている。そこで、PKC や PKA の関与を検討した。PKC 阻害薬は酸化 LDL によるマウス神経前駆細胞の神経分化抑制作用を有意に阻害したが、PKA 阻害薬は有意な影響を与えなかった。次に、マウス神経前駆細胞での Akt リン酸化を解析したところ、レチノイン酸では有意な変化がみられなかったが、酸化 LDL の添加で有意な Akt リン酸化抑制がみられた。さらに、神経細胞への分化に重要とされる CREB のリン酸化を検討したところ、レチノイン酸により CREB のリン酸化が有意に誘導されたのに対し、酸化 LDL の添加はレチノイン酸による CREB リン酸化を有意に抑制することが明らかになった。以上の結果から、マウス神経前駆細胞において、酸化 LDL が LOX-1 を介して PKC 活性化や Akt および CREB リン酸化抑制をもたらす、神経分化抑制作用を発揮していることが示唆された。

(6) 低酸素環境(1, 3, or 5% O₂)にて、マウス神経前駆細胞の培養を行い、酸化 LDL 1~10 μM あるいは HDL 2~20 μM の刺激による細胞増殖への影響を検討したが、刺激 24~48 時間後の細胞数にいずれも有意な影響はみられなかった。また、レチノイン酸による神経細胞への分化誘導に対して、低酸素環境は有意な影響を与えず、酸化 LDL による神経分化抑制作用も通常酸素環境での作用と有意な差はみられなかった。さらに、低酸素環境による神経前駆細胞での HIF-1α 発現に対しても、酸化 LDL あるいは HDL の影響はみられなかった。これより、低酸素環境は、酸化 LDL による神経前駆細胞の神経分化抑制作用に影響を与えないことが示唆された。

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 5 件)

石塚 俊晶、幹細胞機能に影響を及ぼす細胞内機能の解明と再生医療への応用、防衛医科大学校雑誌 41: 47, 2016. 査読無

Hirose W, Uchiyama T, Nemoto A, Harigai M, Itoh K, Ishizuka T, Matsumoto M, Yamaoka K, Nanki T. Diagnostic performance of measuring antibodies to the glycopeptidolipid core antigen specific to Mycobacterium avium complex in patients with rheumatoid arthritis: results from a cross-sectional observational study. Arthritis Res Ther 17: 273, 2015. 査読有

Ishizuka T, Goshima H, Ozawa A, Watanabe Y. Stimulation of 5-HT₄ receptor enhances differentiation of mouse induced pluripotent stem cells. Clin Exp Pharmacol Physiol 41: 345-350, 2014. 査読有

Ishizuka T, Goshima H, Ozawa A, Watanabe Y. Involvement of β-adrenoceptors in the differentiation of human induced pluripotent stem cells into mesodermal progenitor cells. Eur J Pharmacol 740: 28-34, 2014. 査読有

石塚 俊晶、渡邊 康裕、多能性幹細胞の機能調節に関わる細胞膜受容体、日本薬理学雑誌、144: 13-16, 2014. 査読無

〔学会発表〕(計 23 件)

石塚 俊晶、小澤 亜也子、勝浦 美枝子、野村 さやか、佐藤 泰司、脂質異常症における神経新生障害の機序解明：酸化 LDL 刺激は神経前駆細胞の分化を抑制する、第 90 回日本薬理学会年会、2017.3、長崎

野村 さやか、梅田 香織、石塚 俊晶、榎島 誠、橋本 祐一、石川 稔、代謝性疾患治療を指向した LXRβ 選択的アゴニストの創製、第 90 回日本薬理学会年会、2017.3、長崎

太田 宏之、田村 吏沙、佐藤 泰司、丹生谷 正史、野々山 恵章、石塚 俊晶、西田 育弘、アデノシン分解酵素の神経保護作用、第 90 回日本薬理学会年会、2017.3、長崎

Morohashi T, Tsutsui S, Hayashi Y, Kawaguchi M, Nakanishi H, Nakata T, Ishizuka T, Meredith A, Satoh Y. BK channel activation at spinal microglia is important for the induction of neuropathic pain in mice. 16th World Congress of Pain, 2016.9, Yokohama

Tsutsui S, Morohashi T, Otsubo Y, Endo S, Satoh T, Wood J, Ishizuka T, Satoh Y. Roles of extracellular signal-regulated protein kinase 2 (ERK2) in the peripheral nervous system for the mechanism of pain transmission. 16th World Congress of Pain, 2016.9, Yokohama

Ishizuka T, Ozawa A, Katsuura M, Satoh Y. Involvement of G-coupled receptor-dependent cyclic AMP/PKA signaling pathway on neural differentiation of mouse iPS cells. International Society for Stem Cell Research 2016, 2016.6, San Francisco

廣瀬 恒、内山 隆司、根本 明日香、針谷 正祥、伊藤 健司、石塚 俊晶、松本 光世、南木 敏宏、関節リウマチ患者における抗 GPL core IgA 抗体測定の肺 MAC 症診断に対する有用性の評価、第 60 回日本リウマチ学会総会、2016.4、横浜

佐藤 泰司、湯舟 晋也、遠藤 昌吾、風間 富栄、石塚 俊晶、発達期の神経発達における ERK の役割、第 89 回日本薬理学会

年会、2016.3、横浜

石塚 俊晶、小澤 亜也子、勝浦 美枝子、佐藤 泰司、腸管幹細胞から腸管上皮細胞への分化に対する Wnt3a, TNF およびニコチンの影響、第 89 回日本薬理学会年会、2016.3、横浜

石塚 俊晶、幹細胞機能に影響を及ぼす細胞内機構の解明と再生医療への応用、平成 27 年度防衛医科大学校学術集会、2015.11、所沢

穂苅 量太、石塚 俊晶、渡邊 康裕、栗原 千秋、渡辺 知佳子、ニコチンによる消化管免疫装置からのリンパ球流出に与える影響、第 30 回喫煙科学研究財助成研究発表会、2015.7、東京

渡邊 康裕、石塚 俊晶、小澤 亜也子、新田 宗光、ヒト多能性幹細胞の分化に及ぼすニコチン性アセチルコリン受容体の役割、第 30 回喫煙科学研究財助成研究発表会、2015.7、東京

Ishizuka T, Ozawa A, Sado A, Arata M, Watanabe Y. Effects of TNF-alpha and nicotine on differentiation of human endodermal progenitor cells into intestinal epithelial cells. International Society for Stem Cell Research 2015, 2015.6, Stockholm, Sweden

石塚 俊晶、小澤 亜也子、新田 宗光、渡邊 康裕、マウス人工多能性幹細胞の神経前駆細胞への分化における G 蛋白質共役型受容体を介した cAMP/PKA シグナル伝達系の役割、第 88 回日本薬理学会年会、2015.3、名古屋

石塚 俊晶、小澤 亜也子、新田 宗光、渡邊 康裕、ヒト人工多能性幹細胞の肝細胞および腸管上皮細胞への分化に対するニコチンの影響、第 35 回日本臨床薬理学会、2014.12、東京

Ishizuka T, Ozawa A, Arata M, Watanabe Y. Involvement of cannabinoid receptors or muscarinic acetylcholine receptors on differentiation into neural progenitor cells in mouse induced pluripotent stem cells. Neuroscience 2014, 2014.11, Washington

Watanabe Y, Ishizuka T, Ozawa A, Sado A, Arata M. The stimulation of muscarinic acetylcholine receptors inhibits differentiation of mouse induced pluripotent stem cells to neural progenitor cells. Congress of the European Neuroendocrine Association 2014, 2014.9, Granada, Spain.

石塚 俊晶、小澤 亜也子、新田 宗光、渡邊 康裕、Involvement of muscarinic acetylcholine receptors on proliferation and differentiation into neural progenitor cells of mouse induced pluripotent stem cells. 第 57 回日本神経化学学会大会、2014.9、奈良

石塚 俊晶、小澤 亜也子、新田 宗光、

渡邊 康裕、ムスカリン型アセチルコリン受容体刺激は cyclic AMP/PKA シグナル伝達系を阻害してマウス人工多能性幹細胞の神経前駆細胞への分化を抑制する、第 131 回日本薬理学会関東部会、2014.9、横浜

Watanabe Y, Ishizuka T, Ozawa A, Arata M. Stimulation with β -adrenoceptor enhances differentiation of human induced pluripotent stem cells into cardiovascular progenitor cells via PKA-dependent p38 MAPK activation. World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2014.7, Cape Town, South Africa

① 石塚 俊晶、小澤 亜也子、新田 宗光、渡邊 康裕、マウス人工多能性幹細胞の内胚葉系前駆細胞および肝細胞への分化に対するニコチンの影響、2014.7、東京

② Ishizuka T, Ozawa A, Arata M, Watanabe Y. Involvement of 5-hydroxytryptamine receptors or cannabinoid receptors on differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into neural progenitor cells. International Society for Stem Cell Research 2014, 2014.6, Vancouver, Canada

③ 廣瀬 恒、内山 隆司、伊藤 健司、石塚 俊晶、松本 光世、根本 明日香、南木 敏宏、関節リウマチにおけるキャピリア MAC 抗体 ELISA の有用性と肺 MAC 症の危険因子の検討、第 58 回日本リウマチ学会総会、2014.4、東京

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

石塚 俊晶 (ISHIZUKA TOSHIAKI)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授
研究者番号：30399117

(2) 研究分担者

鈴木 豪 (SUZUKI GO)
宇宙航空研究開発機構・有人宇宙技術部門・主任医長
研究者番号：50649035

渡邊 康裕 (WATANABE YASUHIRO)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・名誉教授
研究者番号：90127324

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()