

称号及び氏名 博士(獣医学) 南畑 朋輝

学位授与の日付 2023年9月23日

論文名 リゾリン脂質によるグリア細胞炎症反応の制御

論文審査委員 主査 森山 光章

副査 東 泰孝

副査 桑村 充

論文要旨

序章

アルツハイマー病(AD)やパーキンソン病(PD)などの神経変性疾患(ND)の詳細な発病メカニズムや有効な治療法は未だ不明である。特定の遺伝子変異など個々のNDに特異的な原因が解明されつつある一方で、複数のNDに共通した病態変化が注目されている。なかでも神経炎症反応(NI)は数多くのNDに共通する病態として認識され、これまで多くの研究が進められてきた。異常タンパク質の蓄積などによりNIが持続し過剰になると、ニューロンの脱落を招き、NDが発症に至ると考えられている。NIではグリア細胞のうち、とくにミクログリアとアストロサイトが重要な役割を担っており、活性酸素種(ROS)やinterleukin(IL)-6などの炎症性サイトカインを過剰産生することでニューロンの傷害や脱落を招く。よって、NDにおけるNIを抑えるためにはグリア細胞機能を制御する必要があると考えられる。

近年、リン脂質から産生されるリゾリン脂質(LPLs)が脂質メディエーターとして炎症反応や免疫応答を制御することが次々と判明している。中枢神経系(CNS)で豊富なリン脂質種から産生されるLPLsのうち、lysophosphatidic acid (LPA)とlysophosphatidylcholine (LPC)は、グリア細胞の炎症反応を増悪するなど、NIを介してNDを悪化させる可能性が判明している。しかし、lysophosphatidylinositol (LysoPI)とlysophosphatidylserine (LysoPS)についてはNIへの影響を含め不明な部分が多い。また、sphingosine-1-phosphate (S1P)は受容体を介してグリア細胞の炎症反応を増悪することが報告されているが、NIが認められる神経変性時にはS1P量が減少するという報告もなされており、NIへの影響には議論の余地がある。さらに、近年、LysoPIとLysoPS及びS1PもNDへの関与が疑われており、疾患の発症機序の一端や治療標的となる可

能性が報じられているが、詳細な機構等については未だ不明である。そこで本研究では、「LPLs がグリア細胞における炎症反応を介して、NI 及び神経変性に影響する」と考え、LysoPI のグリア細胞炎症反応への影響とその調節機構、LysoPS 分解障害によるグリア細胞炎症反応への影響、S1P 産生の低下によるグリア細胞炎症反応と amyloid-beta (A β) を介したニューロン傷害への影響について検証し、これら 3 種の LPLs によるグリア細胞機能への影響を明らかにすることを目的とした。

第 1 章 LysoPI によるミクログリア炎症反応に対する影響

LPLs は特定の受容体を介して細胞に作用する。LysoPI の細胞膜受容体である G protein coupled receptor (GPR) 55 は CNS の中でも特にミクログリアに高発現していることから、LysoPI 及び GPR55 アンタゴニストを用いてミクログリア機能について検討した。

Lipopolysaccharide (LPS) で実験的に活性化させたマウスミクログリア株化細胞である BV-2 細胞に LysoPI を添加すると、NI の指標の 1 つである一酸化窒素(NO)産生が抑制された。同様に、LPS 誘導性の NO 合成酵素(inducible NO synthase (iNOS))タンパク質発現も LysoPI の同時添加により抑制された。LPS 誘導性の細胞内 ROS 産生及び炎症性サイトカインの IL-6 産生においても同様の変化が見られた。さらに、NI の指標の 1 つである貪食能については、LPS により増加した貪食能が LysoPI の同時添加により抑制された。また、初代培養ミクログリアにおいても LysoPI は LPS 誘導性の細胞内 ROS 産生及び貪食能を抑制した。

続いて、LysoPI による影響への GPR55 の関与を調べた。GPR55 アンタゴニスト (CID16020046)の前処理は、LPS 及び LysoPI を添加された BV-2 細胞での NO 産生には影響しなかったが、LysoPI により抑制された LPS 誘導性貪食能を回復させた。

以上より、LysoPI がミクログリア炎症反応を抑制し、NI の軽減につながる可能性が示唆された。また、GPR55 はミクログリアにおいて貪食能など一部機能の調節に関与しており、抗炎症性に機能する可能性が示唆された。

第 2 章 細胞内 LysoPS 量の変化によるミクログリア機能の調節

LysoPS 分解酵素をコードする ABHD12 遺伝子の変異は、ND である PHARC (Polyneuropathy, Hearing loss, cerebellar Ataxia, Retinitis pigmentosa, Cataract が主症状)の原因となる。ABHD12 の機能喪失により脳実質に LysoPS が蓄積し、活性化ミクログリアが増加することが PHARC モデルマウスにおいて報告されている。ミクログリアにおいて ABHD12 の機能低下により増加した LysoPS が炎症反応を過剰に引き起こし、神経変性を招く可能性が考えられるため、ABHD12 阻害剤を用い炎症反応に対する影響を検証した。

ABHD12 阻害剤(DO-264)を LPS 活性化ミクログリアに添加すると、細胞内 LysoPS 量が増加した。次に、DO-264 による炎症性反応への影響を調べた。BV-2 細胞及び初代培養ミクログリアでともに、LPS 誘導性の貪食能が DO-264 の同時添加により増強された。DO-264 は BV-2 細胞での NO や IL-6 等の炎症性物質産生には影響しなかつ

た。ABHD12 遺伝子ノックダウン BV-2 細胞を作製して NO 産生及び iNOS タンパク質発現への影響を調べると、LPS による NO 産生及び iNOS タンパク質発現はともに、ABHD12 ノックダウン細胞において増強されていた。

以上より、ABHD12 の阻害は細胞内 LysoPS 量の増加を介して、活性化ミクログリアの炎症反応を増悪することが明らかとなった。本結果は PHARC の病態を理解する上で役立つ可能性がある。

第 3 章 S1P 産生の低下によるグリア細胞機能への影響

現在、脳実質に蓄積した A β がグリア細胞を活性化し NI を引き起こすとともに、グリア細胞の A β クリアランスを低下させることでニューロンを傷害し、AD 発症につながると考えられている。さらに、AD 脳では S1P 合成酵素 sphingosine kinase (SK) 1 の発現低下により S1P 量が減少することから、近年、この S1P 量の減少が AD の病態形成に寄与することが示唆されている。SK1 ノックアウトマウスの脳では野生型に比べ LPS による炎症性サイトカイン産生が増加することから、S1P 量がグリア細胞機能に影響することで AD に寄与する可能性を考え、S1P 量の低下がグリア細胞機能に及ぼす影響を検証した。

SK1 阻害剤(PF-543)を LPS 活性化 BV-2 細胞及び培養アストロサイトに添加すると、両細胞において LPS により増加した S1P 量が減少した。次に、グリア細胞の炎症反応への SK1 阻害の影響を調べた。培養アストロサイトの LPS 誘導性 NO 産生及び ROS 産生は、PF-543 の同時添加により増強された。ニューロン、アストロサイト、ミクログリアが混在するニューロン/グリア混合培養系においても、LPS 誘導性 NO 産生が PF-543 の添加により増強された。さらに、LPS と PF-543 を同時添加したアストロサイトの培養上清(ACM)を BV-2 細胞に添加すると、LPS 単独添加した ACM を添加した際と比較して細胞内 ROS 産生が増加した。

次に、SK1 阻害がミクログリアの A β 取り込みに与える影響を調べた。ニューロン/グリア混合培養系に A β と PF-543 を同時添加すると、ミクログリアの A β 取り込みが PF-543 により減少した。この時、A β 添加により増加した軸索がない傷害ニューロンの数とニューロンやその断片を取り込んだニューロン貪食ミクログリアの数が PF-543 の同時添加によりさらに増加した。一方、SK1 活性化剤(K6PC-5)は、LPS によるグリア細胞炎症反応を抑制し、ミクログリア A β 取り込みを増加させ、A β によるニューロン傷害を軽減した。

以上より、細胞内 S1P 量の減少によりグリア細胞の炎症反応が増強されるとともに、A β クリアランスが低下することで、NI が増悪されると考えられた。その結果として AD では、ニューロンの傷害が増加すると考えられた。よって、AD 脳で認められる S1P 量の減少は、グリア細胞を介してその病態悪化に寄与する可能性が示された。

総括

LysoPI, LysoPS 及び S1P はそれぞれ受容体や酵素など独自の機構を介してグリア細

胞の炎症反応を調節し、NIを制御する。LysoPIは受容体GPR55を介してミクログリアの炎症反応を抑制し、LysoPSは分解酵素の不全により細胞内の量が増加するとミクログリアの炎症反応を増悪した。S1Pは合成酵素の不全により細胞内の量が減少すると、グリア細胞の炎症反応を増悪し、A β クリアランスを低下させ、ニューロン傷害を増加させた。したがって、それぞれのLPLsの作用やその量の変化によりもたらされる炎症性変化を是正することが、NIを制御する上で重要であると考えられる。またこれらLPLsは、LysoPIがPD、LysoPSがPHARC、S1PがADとそれぞれ関連することが報告されており、本研究で得られたそれぞれ特有のグリア細胞におけるLPLsの調節機序が、NDの発症メカニズムの一端解明、ひいては治療法の開発に有用であると考えられる。

審査結果の要旨

アルツハイマー病(AD)などの神経変性疾患(ND)の詳細な発症メカニズムは未だ不明であり、その解明が望まれている。複数のNDに共通した病態変化が認められ、そのなかで神経炎症反応(NI)が注目されている。異常タンパク質の蓄積などによりNIが持続するとニューロンの脱落を招き、最終的にNDが発症に至る。NIでは脳内のグリア細胞のうち、とくにミクログリアとアストロサイトが重要な役割を担うとされており、活性酸素種(ROS)やinterleukin (IL)-6などの炎症性サイトカインを過剰産生することでニューロンが傷害され、脱落へと導かれる。従って、ND時にみられるNIを抑えるためにはグリア細胞の機能を制御する必要がある。

近年、細胞膜構成成分であるリン脂質から産生されるリゾリン脂質(LPLs)が脂質メディエーターとして炎症反応や免疫応答を制御する報告が集まってきている。代表的なLPLsであるlysophosphatidylinositol (LysoPI)とlysophosphatidylserine (LysoPS)、sphingosine-1-phosphate (S1P)は、脳内に割合多く存在するにもかかわらず、その役割についてほとんど解析されていなかった。本研究では、上記3種のLPLsに着目し、グリア細胞の機能、とくに炎症反応に与える影響について解析している。

第1章では、マウスミクログリア株化細胞であるBV-2細胞と初代培養ミクログリアを用いて、炎症反応に対するLysoPIの影響を検討している。Lipopolysaccharide (LPS)を添加することで実験的に活性化させたBV-2細胞にLysoPIを添加すると、NIの指標である一酸化窒素(NO)やIL-6産生が抑制された。BV-2細胞または初代培養ミクログリアにみられるLPS誘導性の細胞内ROS産生の増加及び貪食能の亢進は、LysoPIの同時添加により抑制された。LysoPIは細胞膜受容体であるG protein coupled receptor (GPR) 55を介して作用することが報告されていることから、GPR55アンタゴニスト(CID16020046)を用いてその関与を検討したところ、NO産生には影響しなかったが、LysoPIにより抑制されたLPS誘導性貪食能を回

復させた。従って、LysoPI はミクログリア炎症反応に対して抑制的役割を担い、その一部機能は GPR55 を介すると結論づけている。

第 2 章では、LysoPS 分解酵素 ABHD12 の機能異常に基づく細胞内 LysoPS 蓄積の影響を解析し、NI における LysoPS の役割を追求している。ミクログリアの LPS 誘導性貪食能亢進は ABHD12 阻害剤(DO-264)の同時添加により増強された。ABHD12 遺伝子ノックダウン BV-2 細胞を作製し炎症反応に対する解析を進めたところ、LPS による NO 産生及び iNOS タンパク質発現は ABHD12 ノックダウン細胞において増強された。一方、LysoPS 合成酵素である ABHD16 阻害剤(KC-01)の添加は、LPS 誘導性貪食能亢進、細胞内 ROS 産生、NO や IL-6 産生をいずれも抑制した。従って、LysoPS はミクログリアにおいて炎症を増悪する方向に作用することが示された。ND である PHARC (Polyneuropathy, Hearing loss, cerebellar Ataxia, Retinitis pigmentosa, Cataract)症候群は ABHD12 遺伝子の変異により生じる。得られた結果は本疾患の病態を理解する上で重要であると考察している。

第 3 章では S1P 量の増減がグリア細胞の炎症反応に与える影響について解析することにより、NI における S1P の役割を追求している。培養アストロサイトにおいて、LPS 誘導性 NO 産生及び ROS 産生は S1P 合成酵素阻害剤(PF-543)の同時添加により増強された。また、ニューロン、アストロサイト、ミクログリアが混在するニューロン/グリア混合培養系においても、LPS 誘導性 NO 産生は PF-543 の添加により増強された。さらに、LPS と PF-543 を同時添加したアストロサイトの培養上清(ACM)を BV-2 細胞に添加すると、LPS 単独刺激により得られた ACM を添加した場合と比べて細胞内 ROS 産生が増加した。ニューロン/グリア混合培養系に amyloid-beta ($A\beta$)と PF-543 を同時添加すると、ミクログリアの $A\beta$ 取り込みが減少した。 $A\beta$ 添加により増加した傷害ニューロンの数や、ニューロンやその断片を取り込んだニューロン貪食ミクログリアの数を計測したところ、PF-543 の同時添加により増加が認められた。

一方、S1P 合成酵素活性化剤(K6PC-5)の添加は、LPS 添加により誘導される NO 産生や ROS 産生を抑制し、さらに、ミクログリアの $A\beta$ 取り込みを増加させ $A\beta$ によるニューロン傷害を軽減した。従って、細胞内 S1P 量の減少によりグリア細胞の炎症反応が増強されるとともに、 $A\beta$ クリアランスが低下することでニューロンの傷害が増加し、神経変性が増悪されると考えられた。AD 脳で認められる S1P 量の減少は、グリア細胞を介してその病態悪化に寄与する可能性を示した。

本研究では、3 種の LPLs の作用やその量の変化によりもたらされる炎症性反応を是正することが、NI を制御する上で重要であることを明らかにしている。これら知見は、グリア細胞における LPLs の調節機序が ND の発症メカニズムの一端の解明、ひいては予防や治療法の開発に応用可能であることを示唆している。これらの研究成果は、基礎獣医学ならびに基礎医学の発展・展開に貢献するものと考えられる。従って、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。