

鶏卵に含まれる脳内炎症抑制成分の機能解析

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻・特任准教授 小林 郁子

■ 緒 言

疫学調査により、鶏卵の摂取がアルツハイマー型認知症(AD)の発症リスクを低減する可能性が報告されている。鶏卵は良質なタンパク質を含み、その摂取がAD予防に寄与すると考えられてきた。しかし、最新の疫学調査では、タンパク質以外の低分子化合物の関与が示唆されている¹⁾。本研究では、鶏卵の新たな抗AD効果の可能性を探るため、老化およびAD発症に伴い増加し、病態の進行に深く関与する脳内炎症に着目した。脳内の炎症反応を調節する主な細胞はミクログリアである。そこで、ミクログリア細胞株MG6にリポポリサッカライド(LPS)を用いて炎症を惹起し、鶏卵成分のスクリーニングを行った。その結果、鶏卵に特異的に含まれるホスファチジルコリン(PC)がMG6細胞における炎症を抑制することを見出した。

本研究では、PCのミクログリア細胞を介した抗炎症作用の機構を解明し、鶏卵の抗AD作用の一端を明らかにすることを目的とした。

■ 方 法

1. PCによるMG6細胞における炎症性サイトカイン産生の抑制評価

ミクログリア細胞株MG6をプレートに播種し、無血清培地またはPC(50 μMおよび100 μM)を含む無血清培地で1時間培養した。次に、LPSを最終濃度100ng/mLとなるよう添加し、24時間培養して炎症を惹起した。炎症刺激終了後、細胞からtotal RNAおよびタンパク質を抽出した。炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)のmRNA発現は、逆転写定量PCR(RT-qPCR)により測定し、 β -アクチンを内部標準として正規化した。タンパク質発現レベルはウェスタンブロットにより解析し、 β -アクチンをローディングコントロールとして用いた。

2. PCによるMG6細胞におけるMAPKシグナル伝達抑制効果

PCの抗炎症活性がMAPK経路を介して発現するかを検討するため、ウェスタンブロッティングによりMAPKシグナルのリン酸化レベルを評価した。MG6細胞を無血清培地またはPC(50 μMおよび100 μM)を含む無血清培地で24時間培養した。次に、LPSを最終濃度100ng/mLとなるよう添加し、1時間培養して炎症を誘導した。培養終了後、細胞からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティングによりp38マイトジェン活性化プロテインキナーゼ(p38 MAPK)、c-Jun N末端キナーゼ(JNK)、細胞外シグナル制御プロテインキナーゼ(ERK)の3つの主要なサブファミリーのリン酸化レベルを解析した。

3. LPS刺激MG6細胞におけるPCによるNF- κ B核内転位の抑制

MG6細胞を無血清培地またはPC(50 μMおよび100 μM)を含む無血清培地で24時間プレインキュベートした後、LPS(100ng/mL)を添加し1時間刺激した。その後、NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent Kit(Thermo Fisher, Rockford, IL, USA)を用いて核画分および細胞質画分のタンパク質を分離した。次に、ウェスタンブロッティングを用いて、細胞質および核におけるI κ B α 、リン酸化I κ B α (p-I κ B α)、NF- κ B p65、およびLamin B1の発現量を解析した。 β -アクチンおよびLamin B1は、それぞれ細胞質画分および核画分のローディングコントロールとして使用した。

また、MG6細胞におけるNF- κ B p65タンパク質の細胞内局在を免疫蛍光染色により可視化した。核はDAPIで染色し、NF- κ B p65とともに蛍光顕微鏡を用いて撮像した。

4. PCがMG6細胞のLPS刺激下で核におけるc-Fosおよびc-Junタンパク質レベルに与える影響

MG6細胞を無血清培地またはPCを含む無血清培地で24時間プレインキュベートした後、LPS(100ng/mL)で1時間刺激を行った。次に、核および細胞質タンパク質を、手法3と同様に単離し、核画分におけるc-Fosおよびc-Junの発現量をウェスタンブロッティングで解析した。また、MG6

細胞における c-Fos タンパク質の局在を免疫蛍光染色により可視化した。

5. 統計処理

データは、一元配置分散分析(one-way ANOVA)およびダネット検定(Dunnett's test)を用いて解析し、3回の独立した実験から得られた平均値±標準誤差(SEM)として示した。##p<0.001 および ***p<0.001 は、それぞれコントロール群および LPS 処理群との比較で有意差があることを示す。

■ 結 果

LPS 誘発炎症性メディエーターの産生に対する PC の効果を、RT-qPCR およびウェスタンプロット分析により調べた。LPS 刺激は、MG6 細胞において TNF- α 、IL-1 β および IL-6 の mRNA 発現を大きく増加させたが、PC 処理はこれらを用量依存的に減少させた(Figure 1 上段)。また、タンパク質レベルでは、MG6 細胞への LPS 刺激が TNF- α 、IL-1 β および IL-6 の発現を増加させた一方で、PC(50 および 100 μ M) 添加によりこれらの発現が抑制された(Figure 1 下段)。これらの結果は、PC 処理が LPS 刺激によるミクログリア細胞での TNF- α 、IL-1 β および IL-6 の発現を抑制し、抗炎症作用を示すことを示唆している。

MAPK シグナル伝達経路は炎症性サイトカインの制御に重要で、p38 MAPK、JNK、ERK が炎症誘発カスケードに関与している^{2,3)}。我々は、JNK および p38 MAPK のリン酸化状態を調べ、MG6 細胞における MAPK 経路が PC の抗炎症活性と関連しているかを評価した。LPS で刺激した MG6 細胞では、リン酸化 JNK および p38 MAPK の発現が増加し、PC はこれらのリン酸化を用量依存的に抑制した(Figure 2)。これらの結果は、MAPK 経路の制御が PC の抑制効果に関与している可能性を示唆している。

LPS 刺激により活性化されたミクログリアでは、I κ B α がリン酸化され分解され、NF- κ B が核に転移して炎症性サイトカインを活性化する⁴⁾。LPS で活性化した MG6 細胞において、PC が I κ B α のリン酸化および NF- κ B p65 の核内移行に与える影響を調べた。LPS 刺激により、I κ B α の分解と NF- κ B p65 の核内移行が促進された(Figure 3 上段)。PC は I κ B α のリン酸化を用量依存的に抑制し、NF- κ B p65 の核内移行も阻害した。免疫蛍光染色により、LPS 刺激で増加した核内 NF- κ B p65 の蛍光強度が 100 μ M の PC で抑制された(Figure 3 下段)。これらの結果は、PC が NF- κ B の核内移行を抑制することを示している。

AP-1 は MAPK 経路の下流で炎症性サイトカインを活性化する転写因子であり、c-Jun と c-Fos の二量体から構成される⁵⁾。刺激を受けてリン酸化されると、AP-1 は細胞質から核に移行し、炎症誘発メディエーターの生成を促進する⁶⁾。そこで、LPS 刺激を受けた MG6 細胞における c-Fos および c-Jun の核内移行に対する PC の影響をウェスタンプロットで評価した。LPS 刺激により、c-Fos および c-Jun の核内タンパク質発現が増加した(Figure 4 上段)。しかし、PC 処理は c-Fos の核内レベルを用量依存的に抑制し、c-Jun の核内レベルも 100 μ M で抑制された。免疫蛍光染色により、LPS 刺激で c-Fos の核内移行が増加したことが確認され(Figure 4 下段、LPS Merge)、100 μ M の PC 処理によりこの移行が抑制された(Figure 4 下段、LPS+PC Merge)。これらの結果は、PC が c-Fos および c-Jun の核内移行を抑制することを示している。

■ 考 察

本研究では、PC が LPS 刺激ミクログリア細胞において、TNF- α 、IL-6、IL-1 β といった炎症性サイトカインの産生を顕著に抑制することを明らかにした。さらに、これらのサイトカイン産生に関与する重要な経路である NF- κ B および MAPK 経路を抑制することが示された。

TLR ファミリーの一員である TLR4 は、細胞膜に存在する膜貫通型タンパク質であり、ミクログリア細胞に高発現し、LPS を認識することが知られている⁷⁾。LPS が TLR4 を活性化すると、MyD88 または TRIF がリクルートされ、NF- κ B および MAPK 経路を活性化させ、炎症性サイトカインの産生を誘導する^{8,9)}。この過程では、NF- κ B が I κ B α と結合し、刺激により I κ B α が分解されると、NF- κ B は核に移行して炎症関連遺伝子の転写を促進する¹⁰⁾。

AP-1 は、Fos ファミリーおよび Jun ファミリーからなる二量体複合体で、非刺激状態では細胞質に存在し、刺激を受けると核内に移行して炎症メディエーターの産生に関与する^{11,12)}。また、MAPK 経路は細胞機能に重要な役割を果たし、LPS 刺激により JNK および p38 MAPK が活性化され、AP-1 の核内移行を促進する。

本研究では、PC が JNK および p38 MAPK のリン酸化を抑制し、それに伴い c-Jun および c-Fos の

核内移行も抑制することが示された。PC が細胞膜の主要成分であり、細胞シグナル伝達に関与し、細胞増殖に影響を与える可能性があることも示唆された。

以上をまとめると、LPS 刺激を受けた MG6 ミクログリア細胞において、PC 処理が TLR4/MyD88 経路の下流である $I\kappa B\alpha$ および JNK/p38 MAPK の活性化を抑制し、NF- κB p65 および AP-1 構成因子である c-Fos と c-Jun の核内移行も抑制することが明らかとなった。

■ 要 約

アルツハイマー病(AD)は、脳内の神経炎症によって引き起こされ、ミクログリアの制御不能な活性化を招く神経変性疾患である。コリンを構成成分とするホスファチジルコリン(PC)は鶏卵に豊富に含まれ、栄養補助食品として広く利用されている。疫学研究では、AD 患者が PC を摂取することで認知機能の改善が期待されると報告されているが、その科学的メカニズムは未解明である。本研究では、マウス MG6 ミクログリア細胞をリポ多糖(LPS)で刺激した炎症モデルにおいて、PC の抗炎症作用とその分子機序を調査した。PC は、LPS 刺激により増加した腫瘍壞死因子 α (TNF- α)、インターロイキン-1 β (IL-1 β)、インターロイキン-6(IL-6)などの炎症性サイトカインの発現を顕著に抑制した。また、PC はインヒビター $\kappa B\alpha$ ($I\kappa B\alpha$)のリン酸化を抑制し、それによって核内因子 κB (NF- κB)の核内転位を阻害した。さらに、PC は c-Jun N 末端キナーゼ (JNK) および p38 マイトジエン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) のリン酸化を抑制し、c-Fos と c-Jun からなるアクチベーター・プロテイン-1(AP-1)の核内移行も阻害した。結論として、PC は NF- κB および JNK/p38 MAPK 経路を介してミクログリア細胞における LPS 誘発炎症を抑制し、これらの作用により、鶏卵および PC が神経炎症抑制を介してアルツハイマー病などの病態を抑制する可能性を示唆している。

■ 文 献

- 1) Margara-Escudero HJ, Zamora-Ros R, de Villasante I, Crous-Bou M, Chirlaque MD, Amiano P, Mar J, Barricarte A, Ardanaz E, Huerta JM. Association Between Egg Consumption and Dementia Risk in the EPIC-Spain Dementia Cohort. *Front Nutr.* 2022 Feb 23 ; 9 : 827307. doi : 10.3389/fnut.2022.827307. PMID : 35284440 ; PMCID : PMC8906465.
- 2) Xie Z, Smith CJ, Van Eldik LJ. Activated glia induce neuron death via MAP kinase signaling pathways involving JNK and p38.Glia. 2004 ; 45(2) : 170-9. doi : 10.1002/glia.10314. PMID : 14730710
- 3) Xing B, Xin T, Hunter RL, Bing G. Pioglitazone inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase is associated with altered activity of p38 MAP kinase and PI3K/Akt. *J Neuroinflammation.* 2008 ; 5 : 4. Epub 20080118. doi : 10.1186/1742-2094-5-4. PMID : 18205920
- 4) Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003 ; 21 : 335-76. Epub 20011219. doi : 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126. PMID : 12524386
- 5) Jeong YH, Oh YC, Cho WK, Yim NH, Ma JY. Hoveniae Semen Seu Fructus Ethanol Extract Exhibits Anti-Inflammatory Activity. *Mediators Inflamm.* 2019 ; 2019 : 9184769. Epub 20190904. doi : 10.1155/2019/9184769. PMID : 31565034
- 6) Averill-Bates D. Reactive oxygen species and cell signaling. Review. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2024 ; 1871(2) : 119573. Epub 20231108. doi : 10.1016/j.bbamcr.2023.119573. PMID : 37949302
- 7) Kim KW, Lee YS, Choi BR, Yoon D, Lee DY. Anti-Neuroinflammatory Effect of the Ethanolic Extract of Black Ginseng through TLR4-MyD88-Regulated Inhibition of NF- κB and MAPK Signaling Pathways in LPS-Induced BV2 Microglial Cells. *Int J Mol Sci.* 2023 ; 24(20). Epub 20231018. doi : 10.3390/ijms242015320.
- 8) Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 2003 ; 301(5633) : 640-3. Epub 20030710. doi : 10.1126/science.1087262.
- 9) Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014 ; 5 : 461. Epub 20140925. doi : 10.3389/fimmu.2014.00461.
- 10) Cho HG, Kim DU, Oh JY, Park SJ, Kweon B, Bae GS. Anti-Neuroinflammatory Effects of. *Curr Issues Mol Biol.* 2024 ; 46(1) : 884-95. Epub 20240119. doi : 10.3390/cimb46010056.
- 11) Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonthaler HB, et al. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther.* 2008 ; 10(1) : 201. Epub

20080118. doi : 10.1186/ar2338.

- 12) Jeong YH, Oh YC, Cho WK, Yim NH, Ma JY. *Hoveniae Semen Seu Fructus Ethanol Extract Exhibits Anti-Inflammatory Activity*. *Mediators Inflamm.* 2019 ; 2019 : 9184769. Epub 20190904. doi : 10.1155/2019/9184769.

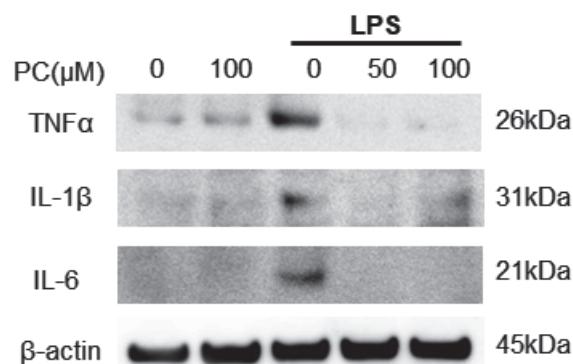
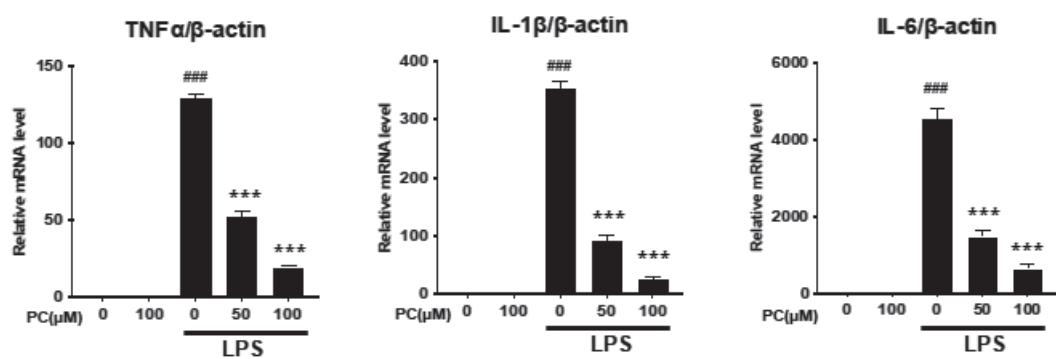


Figure 1. ホスファチジルコリン(PC)が MG6 細胞における LPS 誘発性炎症性サイトカイン産生に与える影響

上段は RT-qPCR の結果、下段は ウェスタンブロッティングによるタンパク質の発現解析の画像を示す。

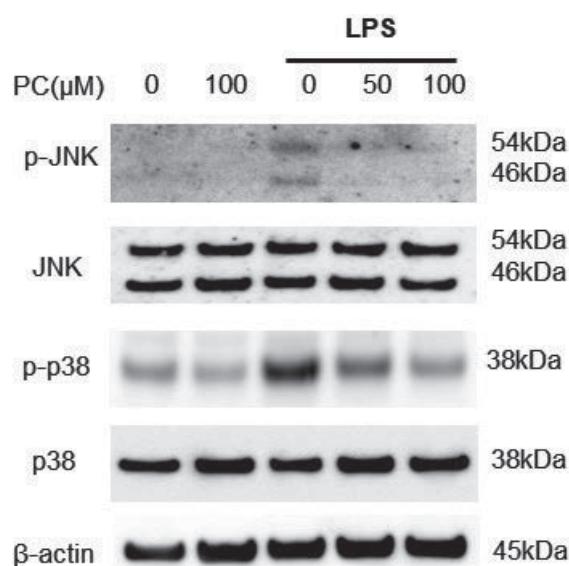


Figure 2. PC による MG6 細胞における MAPK シグナル伝達抑制効果

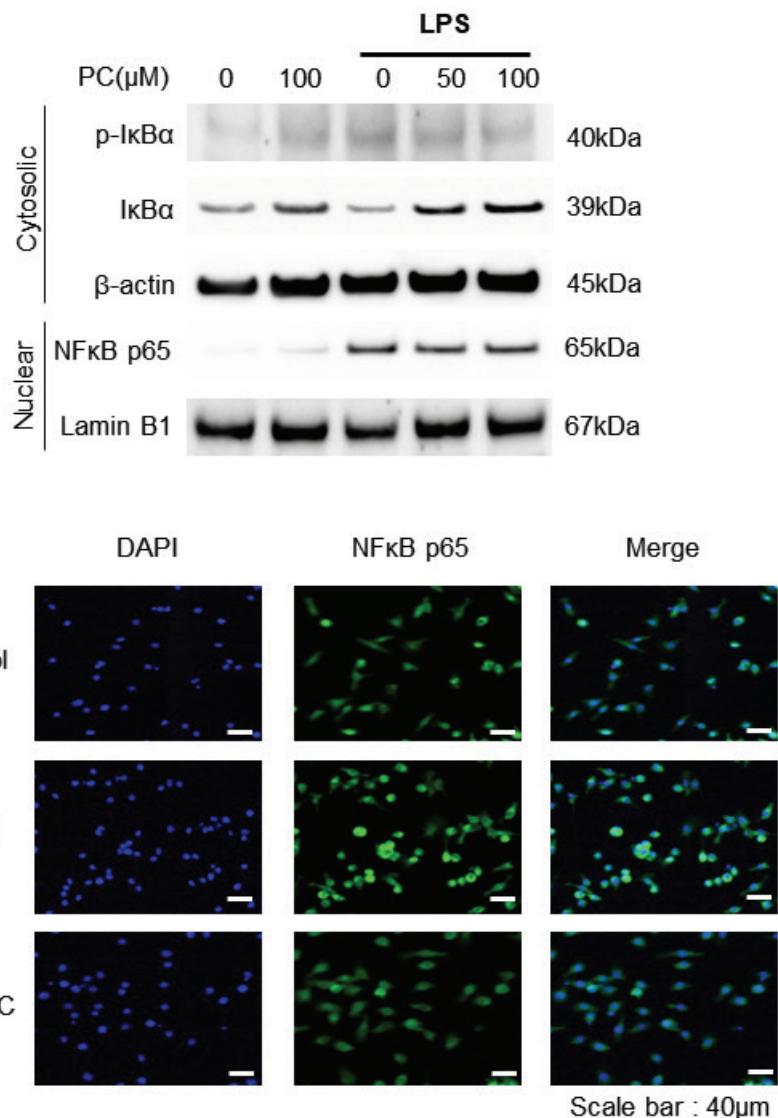


Figure 3. LPS 刺激 MG6 細胞における PC による NF- κ B 核内転位の抑制
 上段：細胞質画分におけるウェスタンブロッティング I κ B α および p-I κ B α の発現レベル、ならびに核画分における NF- κ B p65 の発現レベルをウェスタンブロット法により解析した。
 下段：NF- κ B p65 タンパク質の細胞内局在を免疫蛍光染色により可視化した。核は DAPI で染色した。スケールバー = 40 μ m。

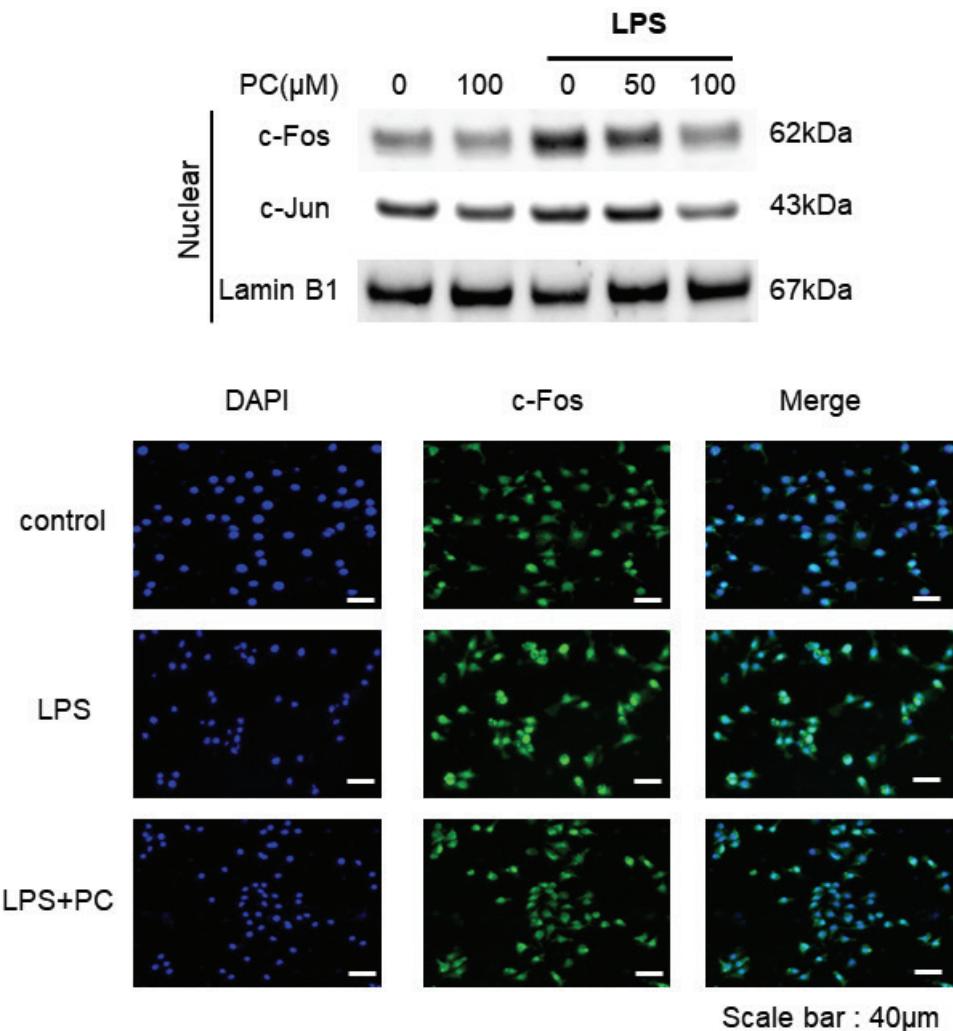


Figure 4. PC が MG6 細胞における LPS 刺激下での c-Fos および c-Jun タンパク質の核内レベルに与える影響

上段：核画分における c-Fos および c-Jun の発現レベルをウェスタンブロッティングで解析した。
下段：c-Fos および c-Jun タンパク質の核内局在を免疫蛍光染色により可視化した。核は DAPI で染色した。スケールバー = 40 μ m。