

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10307

研究課題名(和文) ミクログリア活性化因子としてのキレータブル亜鉛の役割 脳卒中後遺症の克服

研究課題名(英文) The role of chelatable zinc in microglial activation

研究代表者

東 洋一郎 (Higashi, Youichirou)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教

研究者番号：80380062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳虚血時に海馬神経細胞から放出される亜鉛はミクログリアの形態変化を惹起する。脳虚血後、ミクログリアはM1とM2に極性誘導される。今回、我々はM1極性誘導に対する細胞外亜鉛の役割を検討した。亜鉛を前処置したミクログリアにリポ多糖によりM1誘導したところ、炎症性サイトカイン産生が増大化した。この増大化は細胞内亜鉛キレート薬、P2X7受容体拮抗薬、活性酸素除去薬で抑制され、さらに脳虚血による認知障害も亜鉛キレート薬で抑制された。以上のことから、細胞外亜鉛はミクログリアをプライミングしM1誘導後の炎症性サイトカイン産生を増大化し認知障害の惹起に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Here, we examined the role of extracellular zinc in microglial M1 activation. Pretreatment with ZnCl₂ caused aggravation of pro-inflammatory cytokine secretions when M1 activation was induced by lipopolysaccharide. The intracellular zinc chelator, the radical scavenger, and the P2X7R antagonist suppressed the effects of zinc pre-treatment on microglia. Furthermore, ischemia-reperfusion induced endogenous zinc release, resulting in up-regulation of pro-inflammatory cytokine, and the M1 marker, in addition to cognitive impairments, all of which were suppressed by the zinc chelator. Extracellular zinc may prime microglia to enhance the production of pro-inflammatory cytokines through P2X7R activation followed by ROS generation in response to M1 stimuli, which may cause cognitive impairments.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ミクログリア 脳卒中後遺症 キレータブル亜鉛

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は主要な死亡要因である。昨今の医療進歩により死亡率は減少している反面、患者数は依然と多く、治療後も深刻な後遺症が長期にわたって持続することが少なくない。また、このような脳卒中後遺症は自殺や社会復帰の遅れなどの要因となっており医学的のみならず社会的にも重大な問題として認識されている。

脳卒中後遺症、特に認知障害やうつ症状、不安障害などは海馬領域の傷害との関連性が強く示唆されている。また、齧歯類の検討から脳卒中後の海馬における脳傷害に toll-like receptor (TLR) 4 を介する炎症反応の関与が指摘されており、TLR4 欠損マウスでは脳虚血再灌流 1~7 日後に惹起される海馬の神経細胞死や神経学的並びに行動学的障害が軽減または改善していることが報告されている。

ミクログリアは、脳内免疫担当細胞であり TLR4 を発現している主な細胞である。このミクログリアは、TLR4 アゴニストである lipopolysaccharide (LPS) によって活性化し、MyD88 や TRIF、NF- κ B など炎症シグナルを介して炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6 など) 及び nitric oxide (NO) の産生とこれらによる神経細胞死誘導、神経細胞機能障害及び神経細胞死を惹起する proform 型 nerve growth factor (NGF) の産生、神経新生の抑制など脳傷害性機能が誘導されることが知られている。実際に脳卒中患者脳内において、ミクログリアの活性化及び脳脊髄液中の炎症性サイトカイン並びに NO の増加が報告されている。その一方で、活性化ミクログリアは傷害細胞の貪食など脳保護的な機能も発揮する。これら相反するミクログリアの機能誘導は活性化因子や脳内環境に依存することが明らかになってきた。しかし、未だミクログリアの活性化は十分に理解されておらず、そのため治療を目的とした活性化ミクログリアの機能制御は可能になっていない。

以前、代表者らは、脳虚血時に海馬の神経細胞から放出される「キレータブル亜鉛」がミクログリアの活性化因子として機能することを世界で初めて見出し、その活性化機序を詳細に解析しキレータブル亜鉛シグナル (ミクログリアによるキレータブル亜鉛取り込みと、hemichannel による ATP 放出、P2X7 受容体を介した NADPH oxidase ならびに PARP-1 の活性化) として報告している。しかし脳卒中患者脳内におけるキレータブル亜鉛誘導性活性化ミクログリアの役割については明らかになっていない。これに関して代表者らは、予備検討としてキレータブル亜鉛誘導性活性化ミクログリアに LPS を添加したところ、LPS によって惹起される培養液中の IL-1 α ならびに IL-6 の増加が抑制されることを見出し、この結果から「キレータブル亜鉛」の抗炎症作用を推察している。

2. 研究の目的

本研究では、脳卒中の病態の重篤化に關与している TLR 4 の活性化に着目し、(I) TLR4 を介したミクログリアの脳傷害性機能誘導に対する「キレータブル亜鉛」の効果とその機序を解明しつつ、(II) 「キレータブル亜鉛」による機能制御が脳卒中後遺症の軽減または克服に關与するか否かを詳細に解析することで(III)脳卒中後遺症予防及び治療に応用可能なミクログリアの機能制御分子を同定することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) TLR4 を介したミクログリアの脳傷害性機能誘導に対する低濃度キレータブル亜鉛の効果を一明らかにするため、予め低濃度キレータブル亜鉛 (30~60 μ M) 処置した初代培養ミクログリアに TLR4 作用薬であるリポ多糖 (LPS) を添加し 24 時間後の培養液中の炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6、TNF α) 量を ELISA 法により検討した。

(2) 研究(1)で得られたキレータブル亜鉛の効果にキレータブル亜鉛シグナルが關与するか否かを明らかにするため、初代培養ミクログリアに細胞内亜鉛キレート薬または P2X7 受容体拮抗薬、活性酸素除去薬の存在下でキレータブル亜鉛前処置を行い、その後、(1)と同様に LPS 刺激後の炎症性サイトカイン量を ELISA 法により検討した。

(3) 脳虚血時の海馬神経細胞から放出されるキレータブル亜鉛がミクログリアの脳傷害性機能誘導に作用するか否かを検討するため、マウス脳室内に細胞外亜鉛キレート薬 (CaEDTA) を前投与し、両側総頸動脈を 20 分間閉塞することで脳虚血・再灌流モデルマウスを作成した。再灌流 3 日後の海馬より RNA を抽出し、(1)と同様の炎症性サイトカイン遺伝子の発現レベルをリアルタイム PCR 法により検討した。

(4) 再灌流後に惹起される脳傷害性ミクログリアの活性化誘導に対する放出キレータブル亜鉛の効果を検討するため、(3)と同様に CaEDTA 前投与脳虚血・再灌流モデルマウスを作成した。再灌流 3 日後の海馬切片を用いて脳傷害性ミクログリアの細胞表面マーカー分子 (CD16/32) の発現誘導を免疫組織化学染色法により調べた。同時にミクログリアのマーカー分子 Iba-1 についても二重染色して検討した。

(5) 脳卒中後遺症として知られている認知障害と放出キレータブル亜鉛の関連性を検討するため、(3)と同様に細胞外亜鉛キレート薬前投与脳虚血・再灌流モデルマウスを作成した。再灌流 10 日後の認知機能は物体認識試験により調べた。

(6) 脳保護性ミクログリアの活性化誘導における細胞内キレート剤鉛の動態を明らかにするため、IL-4 添加 1~6 時間後のミクログリアにキレート剤鉛プローブである FluoZin-3AM を取り込ませ共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) Control 群と比較して、LPS 処置は培養液中の炎症性サイトカイン量を増加させたが、キレート剤鉛単独処置は効果が認められなかった。しかし、キレート剤鉛前処置したミクログリアに LPS を処置するとキレート剤鉛の濃度依存的に炎症性サイトカイン量がさらに増加した(図 1.)。近年のげっ歯類を用いた検討から、脳虚血・再灌流処置後にはミクログリアの脳傷害性機能誘導を増大化させる内在性因子の存在が指摘されている。しかし、未だその因子は同定されていない。一方、キレート剤鉛は脳虚血時に海馬の神経細胞から細胞外へ放出されることが多くの研究から明らかになっている。以上のことから、今回の結果はキレート剤鉛がミクログリアをプライミングし、その後の脳傷害性機能誘導を増大化する内在性因子であることを示唆している。

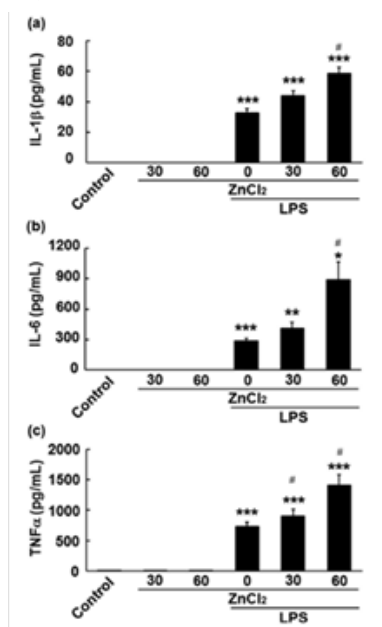


図 1. LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生に対するキレート剤鉛前処置の効果。ELISA 法による培養液中 IL-1 β (a)、IL-6 (b)、TNF α (c)量の測定。

(2) キレート剤鉛前処置による LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生増大化の機序を明らかにするため、細胞内鉛キレート剤 (TPEN) を取り込ませたミクログリアに LPS 処置を行ったところ、キレート剤鉛の炎症性サイトカイン産生増大化作用が抑

制された(図 2.)。さらに、この抑制された炎症性サイトカイン量は LPS 単独処置群と同等レベルであった。同様に、P2X7 拮抗薬 (A438079) ならびに活性酸素除去薬 (Trolox) 存在下でキレート剤鉛前処置した場合も、LPS 単独処置群と同等レベルまで炎症性サイトカインレベルが抑制された(図 2.)。以前、代表者らは脳虚血時に海馬の神経細胞から放出されるキレート剤鉛がミクログリアの活性化因子として機能することを見出し、その活性化機序を詳細に解析しキレート剤鉛シグナル(ミクログリアによるキレート剤鉛取り込みと、hemichannel による ATP 放出、P2X7 受容体を介した NADPH oxidase ならびに PARP-1 の活性化)として報告している。今回の結果は、キレート剤鉛によるミクログリアの脳傷害性機能誘導の増大化の機序も同様にキレート剤鉛取り込みと P2X7 受容体の活性化を介した NADPH oxidase の活性酸素産生が関与していることを示唆する重要な成果である。

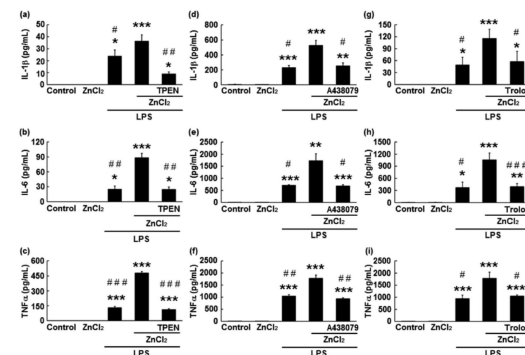


図 2. キレート剤鉛前処置による LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生増大化に対するミクログリアの鉛取り込み、P2X7 受容体、活性酸素産生産生の関与の検討。ミクログリアに TPEN (a)~(c)、A438079 (d)~(f)、Trolox (g)~(i)存在下でキレート剤鉛を前処置し、その後 LPS を添加し ELISA 法により培養液中の IL-1 β (a)~(g)、IL-6 (b)~(h)、TNF α (c)~(i)量を測定した。

(3) ミクログリアの脳傷害性機能誘導には TLR4 の活性化が重要であることが知られている。また、脳虚血・再灌流後には TLR4 の内在性リガンドが傷害細胞から放出されることも報告されている。その一方で、脳内の細胞外キレート剤鉛が脳虚血・再灌流後に増加することが知られているが、検討方法により検出可能なキレート剤鉛濃度が異なるために正確な濃度は不明である。蛍光キレート剤鉛プローブによる解析では 10~30 μ M のキレート剤鉛が神経細胞から放出されると報告されており、原子吸光による測定では、脳虚血・再灌流後の増加したキレート剤鉛濃度はおよそ 100 nM と報告されている。しかし、これらの報告は今回、

初代培養ミクログリアに添加した濃度より低い。このことから、今回は実際に脳虚血時に放出されるキレート剤鉛がミクログリアの脳傷害性機能誘導の増大化に關与しているか否かを検討するために細胞外鉛キレート薬である CaEDTA を脳室内に前処置し、その後、脳虚血・再灌流処置を施した。その結果、脳虚血・再灌流処置により海馬における IL-1 β 、IL-6、TNF α 遺伝子の有意な発現誘導が惹起されたが、CaEDTA 前処置によりこれら遺伝子の発現誘導が阻止された（図3.）。この知見は、脳虚血時に細胞外へ放出されるキレート剤鉛が実際にミクログリアの炎症性サイトカイン遺伝子の発現誘導の増大化に關与していることを示す重要な成果である。

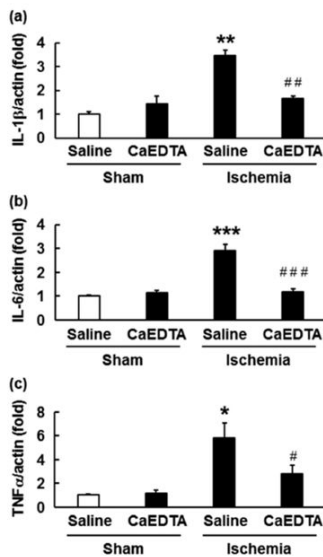


図3. 脳虚血・再灌流処置による炎症性サイトカイン遺伝子発現誘導に対する CaEDTA の効果。リアルタイムPCRにより IL-1 β (a)、IL-6 (b)、TNF α (c) 遺伝子の発現変化を検討した。

(4) 脳虚血・再灌流処置 3 日後の海馬における脳傷害性ミクログリアの誘導を免疫染色法により検討したところ、マーカー分子である CD16/32 が hilus 領域で顕著に誘導されていた。しかし、CaEDTA 前処置は CD16/32 発現を抑制した（図4.）。これらの知見は、脳虚血時に放出されるキレート剤鉛が炎症性サイトカイン遺伝子の発現誘導の増大化のみに關与しているのではなく脳傷害性ミクログリアの誘導を増大化することで、その表現型である炎症性サイトカイン遺伝子の発現誘導を増大化していることを示す重要な成果である。

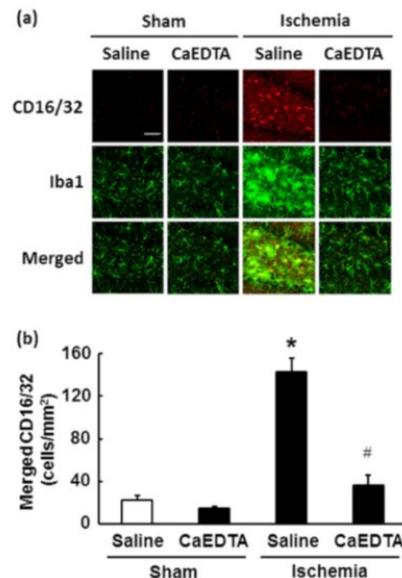


図4. 脳虚血・再灌流後の海馬における脳傷害性ミクログリアの誘導に対する細胞外鉛キレート薬の効果の検討。免疫組織化学染色の結果(a)と CD16/32 陽性ミクログリアの定量化(b)。

(5) 認知障害は脳卒中後遺症の一つであり、患者の生活の質を著しく低下させる。脳内の炎症性サイトカインは主にミクログリアによって産生され、認知機能に影響を及ぼすことが知られている。海馬はこのような炎症応答に脆弱な脳領域であり、海馬における炎症応答は認知機能の障害を惹起することが報告されている。その一方で、通常、炎症性サイトカインは低レベルで発現しており正常な中枢神経系機能に關与している。また、いくつかの報告では、TNF 受容体の欠損マウスが脳虚血・再灌流後の脳傷害が増悪することや抗 IL-6 抗体を脳虚血・再灌流直後に投与すると神経細胞死を増大化することなどが示されている。このようなことから、現在では炎症性サイトカインは脳卒中後の脳修復に關与しており、それは発現レベルとタイミングが重要であると認識されている。今回の検討により、脳虚血・再灌流モデルマウスで観察された物体認知機能の低下が CaEDTA の前処置により阻止されていた（図5.）。この知見は、放出キレート剤鉛によって惹起された脳傷害性ミクログリアによる炎症応答が認知機能を低下させたことを示唆する重要な成果である。

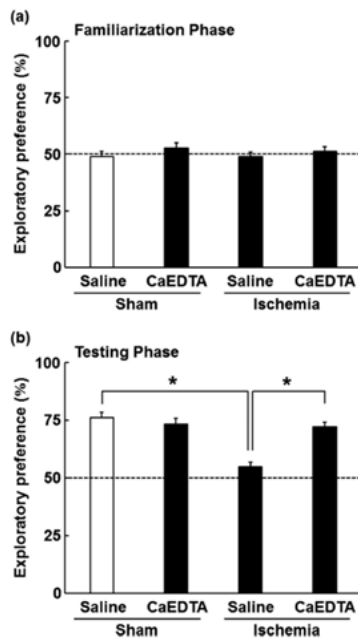


図5 . 脳虚血・再灌流後の認知障害に対するCaEDTAの効果の検討。
物体試験による検討結果。見本段階(a)、テスト段階(b)。

(6) 細胞内キレート剤である FluoZin-3AM を初代培養ミクログリアに取り込ませ、脳保護性ミクログリアに誘導するため誘導剤である IL-4 を添加したところ、添加 6 時間で細胞質に FluoZin-3AM のシグナルが観察された (図 6)。ミクログリアに予め細胞内キレート剤である TPEN を処置し、IL-4 を添加したところ、FluoZin-3AM シグナルが抑制された。しかし細胞外キレート剤の CaEDTA では TPEN のような抑制効果は観察されなかった。一過性の細胞内キレート剤の増加は細胞ホメオスタシスの維持に重要な役割を担っている。神経細胞やアストロサイトでは活性酸素やグルココルチコイド刺激に反応して細胞内キレート剤が増加するが、このキレート剤は細胞外から輸送担体を介して輸送されたり、または細胞内キレート剤結合タンパク質から遊離することで増加することが知られている。代表者らは脳傷害性ミクログリアへの誘導の増大化に細胞外キレート剤が関与していることを本研究で見出している。今回の検討結果は、IL-4 による細胞内キレート剤の増加を CaEDTA が抑制できなかったことから、IL-4 が脳保護性ミクログリアの誘導の際に細胞内キレート剤結合タンパク質に由来する細胞内キレート剤の増加を誘導していることを示唆する重要な成果である。

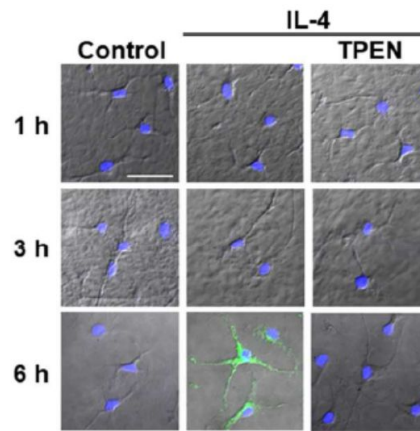


図6 .IL-4 による脳保護性ミクログリアの誘導における細胞内キレート剤の動態についての解析。
FluoZin-3AM(緑)を用いた検討。青は DAPI による核染色。

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 12 件)

(1) Shimizu T, Shimizu S, Wada N, Takai S, Shimizu N, Higashi Y, Kadekawa K, Majima T, Saito M, Yoshimura N. Brain serotonergic nervous system is involved in bombesin-induced frequent urination through brain 5-HT7 receptors in rats. *Br. J. Pharmacol.* 2017 Sep;174:3072-3080. doi: 10.1111/bph.13941. Epub 2017 Jul 4.

査読あり

(2) Higashi Y, Aratake T, Shimizu S, Shimizu T, Nakamura K, Tsuda M, Yawata T, Ueba T, Saito M. Influence of extracellular zinc on M1 microglial activation. *Sci. Rep.* 2017 Feb 27;7:43778. doi: 10.1038/srep43778.

査読あり

(3) Yamamoto M, Shimizu T, Shimizu S, Higashi Y, Nakamura K, Fujieda M, Saito M. Effect of naftopidil on brain noradrenaline-induced decrease in arginine-vasopressin secretion in rats. *J Pharmacol Sci.* 2016 Sep;132(1):86-91. doi: 10.1016/j.jphs.2016.09.002. Epub 2016 Sep 8.

査読あり

(4) Liu N, Shimizu S, Shimizu T, Nakamura K, Yamamoto M, Higashi Y, Saito M. Protective effects of the selective alpha1A-adrenoceptor antagonist silodosin against cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *J Pharmacol Sci.* 2016 Sep;132(1):71-77. doi:10.1016/j.jphs.2016.08.007. Epub 2016 Sep 9

査読あり

(5) Shimizu T, Shimizu S, Higashi Y, Nakamura K, Yoshimura N, Saito M. A Stress-related Peptide Bombesin Centrally Induces Frequent Urination through Brain Bombesin Receptor Types 1 and 2 in the Rat. J Pharmacol Exp Ther. 2016 Mar;356(3):693-701.doi:10.1124/jpet.115.230334. Epub 2016 Jan 4.

査読あり

(6) Yawata T, Higashi Y, Shimizu T, Shimizu S, Nakamura K, Taniuchi K, Ueba T, Saito M. Brain opioid and nociceptin receptors are involved in regulation of bombesin-induced activation of central sympatho-adrenomedullary outflow in the rat. Mol Cell Biochem.2016 Jan;411(1-2):201-11. doi: 10.1007/s11010-015-2582-0. Epub 2015 Oct 1. 査読あり

〔学会発表〕(計 65 件)

(1) 東洋一郎、新武享朗、小野寺健一、清水孝洋、清水翔吾、上羽佑亮、濱田朋弥、Sou Zou、山本雅樹、長尾佳樹、齊藤源顕：海洋由来化合物 A は亜鉛による M1 ミクログリアの増悪化を阻害する。日本薬学会第 138 年会。2018 年

(2) Higashi Y, Shimizu T, Shimizu S, Saito M: Brain zinc modulates microglial activation phenotype. International Society for Zinc Biology (ISZB) Annual Meeting. 2017 年

(3) Higashi Y, Shimizu S, Shimizu T, Saito M : Brain zinc modulates microglial activation phenotype via zinc-induced signaling pathway. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 4 0 回日本分子生物学会年会・第 9 0 回日本生化学会大会) 2017 年

(4) 東洋一郎、清水孝洋、清水翔吾、齊藤源顕：Zn²⁺によるミクログリアの機能制御ー亜鉛シグナルと M1 ミクログリアー。メタルバイオサイエンス研究会 2017 年

(5) 東洋一郎、新武享朗、清水翔吾、中村久美子、清水孝洋、濱田朋弥、齊藤源顕：亜鉛はミクログリアの活性化を制御する。第 90 回日本薬理学会年会。2017 年

(6) 東洋一郎、新武享朗、清水翔吾、清水孝洋、中村久美子、八幡俊男、上羽哲也、齊藤源顕：細胞外キレート剤によるミクログリアの活性化制御。第 17 回日本分子脳神経外科学会。2016 年

(7) 東洋一郎、齊藤源顕：脳内亜鉛によるミクログリアの機能制御。日本薬学会第 136 年会。2016 年

(8) Higashi Y, Saito M: The role of brain zinc in microglial activation. ISTERH2015. 2015 年

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：脳保護剤
発明者：小野寺健一、東洋一郎、齊藤源顕
権利者：同上
種類：特許 (通常)
番号：2017 - 248845
出願年月日：2017 年 12 月 26 日
国内外の別：日本

○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
東洋一郎 (HIGASHI, Youichirou)
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部
門・助教
研究者番号：80380062

(2)研究分担者
上羽 哲也 (UEBA, Tetsuya)
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部
門・教授
研究者番号：00314203

(3)研究分担者
齊藤 源顕 (SAITO, Motoaki)
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部
門・教授
研究者番号：60273893

(4)連携研究者
八幡 俊男 (YAWATA, Toshio)
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部
門・助教
研究者番号：40380323

(5)連携研究者
清水 翔吾 (SHIMIZU, Shogo)
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部
門・助教
研究者番号：90721853