

令和元年6月7日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10946

研究課題名(和文) ミクログリアを介したエリスロポエチンの脳保護作用機序の解明と治療薬開発の基盤研究

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of neuroprotective effect of erythropoietin through microglia and basic research on drug development

研究代表者

田村 哲也 (Tamura, Tetsuya)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90381889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：貧血の治療薬であるエリスロポエチン(EPO)は脳神経保護作用があることが近年知られているが、その機序は不明である。多くの脳疾患では、脳を構成する細胞の一つであるミクログリアが活性化していることが多い。我々は脳に傷害を及ぼす活性化ミクログリアに注目し、ミクログリアにEPOの受容体があることを発見した。

本研究では、ミクログリア培養細胞とマウスを用いて実験を行い、EPOが活性化ミクログリアによる脳への傷害的な作用、例えば炎症性サイトカイン産生や傷害的な貪食などを抑制することにより脳保護効果を示すことを明らかにした。救急・集中治療領域における急性期の脳疾患でEPOが治療薬として有用な可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

貧血の治療薬であるエリスロポエチンの脳神経保護作用の機序の一部を明らかにしたことで、救急・集中治療領域の急性期脳疾患に対するエリスロポエチン治療の適応が明らかになる。そして、エリスロポエチン治療を実際に行うことで急性期の脳障害を最小限にし、意識障害の改善、死亡率の改善、脳後遺症の軽減などが期待できるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Erythropoietin (EPO), which is a therapeutic drug for anemia, has recently been known to have a neuroprotective effect, but the mechanism is unknown. In many brain diseases, microglia, which are one of the cells constituting the brain, are often activated. We focused on activated microglia, which damage the brain, and found that microglia have a receptor for EPO. In this study, experiments were carried out using microglia culture cells and mice, and the neuroprotective effect of EPO was achieved by inhibiting the activity of microglia in the brain, such as inflammatory cytokine production and damaging phagocytosis. EPO may be useful as a therapeutic drug in acute brain diseases in the area of emergency and intensive care.

研究分野：救急、集中治療、麻酔、脳保護

キーワード：EPOの脳神経保護作用 ミクログリア活性 急性脳疾患

1. 研究開始当初の背景

エリスロポエチン (EPO) は主に腎臓で産生される造血ホルモンである。貧血の治療薬として EPO 製剤が商品化され、多くの臨床の現場で安全に、そして比較的容易に使用されている。近年、この EPO の受容体 (EPOR) が中枢神経で発現していることが明らかになり、EPO の神経保護作用が確認された。一方で、中枢神経において EPO は主にグリアのひとつであるアストロサイトから分泌されることが明らかとなり、虚血低酸素状態における神経保護作用が注目されている。そこで申請者らは、アストロサイトから分泌される EPO に注目して研究を続けてきた。その結果、低酸素刺激によってアストロサイトから分泌される EPO が EPOR を発現するオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の低酸素による細胞障害を抑制することを明らかにした (Kato et al. J Neurosci Res 2011)。その研究の中で、母体内感染時羊水中で上昇する炎症性サイトカイン TNF- α でアストロサイトを刺激すると、低酸素刺激による EPO の発現誘導が抑制されることを確認した (Nagaya, Aoyama, Tamura et al. Eur J Neurosci 2014)。

これまで申請者らは、虚血低酸素状態でアストロサイトから分泌される EPO に注目し、細胞レベルの解析で EPO-EPOR シグナルの細胞保護作用を研究してきた。一方で、中枢神経系において、ニューロン、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトの中でも、ミクログリアに EPOR の発現が多いことを世界に先駆けて発見した。ミクログリアは全グリアの 10-20% を占める免疫担当細胞である。刺激のない状況では、ミクログリアは正常組織の周囲に繊毛突起を出して絶えず移動して免疫を監視しているが、神経組織が炎症や変性などの障害を受けると活性化し、傷害の悪化に関与するタイプ (M1) と修復に関与するタイプ (M2) に変化する (Miron et al. Nat Neurosci 2013)。M1 型は主に炎症性サイトカインを産生し、M2 型は主に抗炎症性サイトカインを産生する。また、貪食にも 2 種類あり、傷害的な貪食と保護的な貪食があるとされている。明確な M1 タイプと M2 タイプへの活性制御機構は明らかになっていないが、我々は、M1 型をすべて抑制することが良いということではなく、M1 と M2 のバランスが重要と考えている。多くの脳疾患でミクログリアが活性化しており、ミクログリアに対する EPO 刺激がミクログリアの活性状態に影響を与えるのではと着想した。

2. 研究の目的

本研究計画は、ミクログリアに EPOR の発現が多いことに注目し、ミクログリアの活性調節の観点から EPO の脳保護作用機序を解明することを目的とする。そして救急・集中治療領域で EPO 製剤による新規の脳保護治療法を提示することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) ラット初代培養細胞、BV-2 細胞 (ミクログリアセルライン) における EPOR の確認

日齢 1 日のラット大脳皮質から採取した初代培養細胞からニューロン、ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイトをそれぞれ分離培養し、BV-2 細胞も含めてそれぞれの EPOR の発現を確認する。EPOR の遺伝子発現レベルを RT-PCR で、EPOR そのものを免疫組織染色により視覚的にも確認する。

(2) BV-2 細胞の LPS による活性化と EPO による LPS 活性抑制効果の確認

BV-2 細胞に LPS 投与を行い、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 などの細胞傷害関連遺伝子の発現や iNOS 発現を RT-PCR で確認する。LPS により BV-2 が傷害的な M1 型になったことを確認する。また、EPO 追加投与によるサイトカインや iNOS への影響や、Griess 試薬を用いた ELISA による NO 産生量も確認する。

次に、LPS 刺激 BV-2 細胞の貪食能を評価する。具体的には、ポリスチレンビーズの細胞内取り込みを共焦点顕微鏡で観察し、ビーズを貪食している BV-2 細胞の割合を貪食能の評価項目とした。LPS によって貪食能が高くなるかどうかを確認し、EPO 追加投与が貪食能に及ぼす影響を調査した。

(3) 初代培養ミクログリアにおける LPS 刺激と EPO の効果確認

(2) の実験内容をラット初代培養細胞から分離した primary ミクログリアにおいても施行する。

(4) LPS 投与マウス脳におけるミクログリアの活性化と EPO 追加投与の効果の確認

8 週齢のマウスに対して LPS を腹腔内投与し、マウス脳における EPOR、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 などの遺伝子発現を調べる。また、腹腔内に EPO を追加投与

した場合の各種遺伝子発現の変化を調べる。次に、摘出した脳の凍結切片を使用して、免疫組織学的手法でミクログリアの形態変化を観察する。

(5)EPOによるミクログリア活性化抑制機序の解明

LPS-Toll like receptor-4 (TLR4) シグナルと EPO-EPOR シグナルのクロストークから EPO の神経保護作用機序に関連している経路を明らかにするために、BV-2 に対する LPS 刺激と EPO 投与によるリン酸化 MAPK (ERK, JNK, p-38)、リン酸化 NFkB などの変化をウエスタンブロットで確認する。リン酸化の反応時間は短いため、短時間のタイムコースを設定してリン酸化を検知するのに最適な時間を調べる。有意に変化する経路があればその経路の阻害剤を使用して確認する。また、PI3K-Akt を介した抗酸化作用による機序を予測して、LPS と EPO によるリン酸化 Akt への影響を調査する。

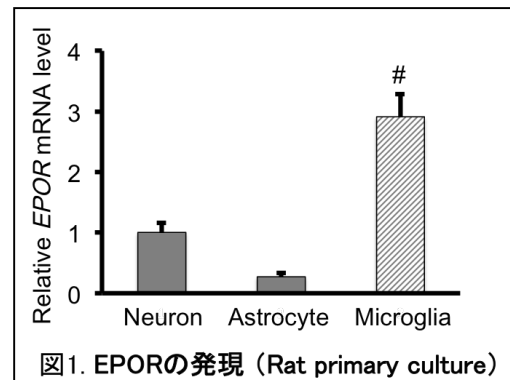
(6)EPOの抗酸化作用の確認とその機序解明

(5)の機序解明にあたって、ミクログリア活性化抑制の機序の一つとして EPO による抗酸化作用があるのではないかと考えている。BV-2 細胞において、LPS 刺激で活性酸素産生量が増加し、EPO 追加投与によって活性酸素が軽減することを確認する。具体的には、活性酸素の存在を染色する蛍光色素を用いて BV-2 における活性酸素量を視覚化する。もし、EPO の抗酸化作用が確認されれば、その機序として EPO による抗酸化酵素活性の増強を調べる。これは(5)の PI3K-Akt を介した抗酸化機序の証明の一部である。抗酸化酵素である SOD1、SOD2、catalase などに注目し、ウエスタンブロットや抗酸化酵素 assay を行い、EPO による抗酸化酵素活性の変化を確認する。

4. 研究成果

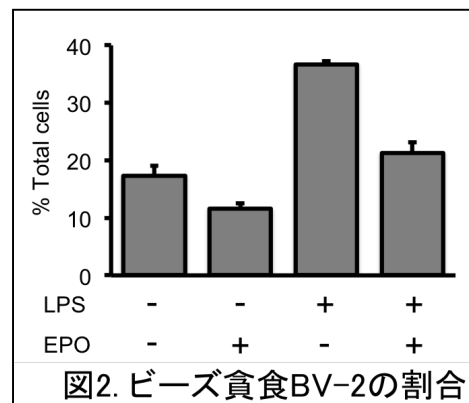
(1)ラット初代培養細胞、BV-2 細胞（ミクログリアセルライン）における EPOR の確認

初代培養細胞からのニューロン、ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、また BV-2 細胞において、RT-PCR と免疫組織染色により EPOR の発現が確認された（図 1）。初代培養細胞の中で、ミクログリアの EPOR 発現レベルが最も高いことがわかった。この事実より、申請者らは EPO とミクログリアの関係に注目した。



(2)BV-2 細胞の LPS による活性化と EPO による LPS 活性抑制効果の確認

BV-2 細胞に LPS 投与を行ったところ、TNF- α 、IL-1、IL-6 などの細胞傷害関連遺伝子の発現量が増加し、BV-2 が傷害的な M1 型になったことを確認した。LPS 投与により iNOS 発現も同様に増加した。また、EPO 追加投与によりサイトカインや iNOS 発現が低下した。Griess 試薬を用いた ELISA による NO 産生量測定においては、感度以下で NO は検知できなかった。貪食能に関しては、LPS 投与により貪食している BV-2 細胞の割合は有意に増加し、EPO 追加投与により有意に減少した（図 2）。この貪食は M1 型による傷害的な貪食と考えられる。



これらの結果より、*In vitro* において LPS 刺激により傷害的に活性化したミクログリアの活性を EPO が抑制していると考えられた。

(3)初代培養ミクログリアにおける LPS 刺激と EPO の効果確認

ラット初代培養細胞から分離した primary ミクログリア細胞は、単離してしまうとそれ以降の増殖が悪く、細胞数が十分に得られなかったため、BV-2 と同様の LPS 刺激実験を行うことができなかった。

(4) LPS 投与マウス脳におけるミクログリアの活性化と EPO 追加投与の効果の確認

LPS を腹腔内投与したマウス脳における EPOR の遺伝子発現を確認できた。LPS による EPOR の発現変化はなかった。また、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 などの遺伝子発現は LPS 投与により有意に増加したが、EPO 追加投与により低下した。摘出した脳の凍結切片におけるミクログリアの形態変化においては、LPS 刺激によりミクログリアは活性化形態となった割合が上昇したが、EPO 追加投与により活性化形態の割合が有意に低下した。これらの結果は、*in vivo* においても LPS 刺激により傷害的に活性化したミクログリアの活性を EPO が抑制していることを示唆する。

(5) EPO によるミクログリア活性化抑制機序の解明

BV-2 に対する LPS 刺激により、リン酸化 MAPK (ERK, JNK, p-38)、リン酸化 NFkB は刺激後 30 分～60 分で活性が最大になることを確認した。しかし、EPO による有意な変化は未だ確認できていない。ただ、LPS によって活性が上昇したリン酸化 JNK は EPO により抑制される傾向があった。EPO が JNK を抑制することにより抗炎症作用や抗酸化作用を示し、結果的に神経保護作用を示す可能性が考えられた。また、EPO によるリン酸化 Akt の有意な変化はなく、PI3K-Akt を介した抗酸化機序は証明できなかった。

(6) EPO の抗酸化作用の確認とその機序解明

蛍光色素を使用した実験では、LPS により BV-2 における活性酸素量は増加し、EPO により活性酸素量が抑制される傾向にあった。抗酸化酵素である SOD1、SOD2、catalase は LPS 刺激により発現上昇し、EPO によりさらなる上昇傾向があったが、有意ではなかった。また、蛍光色素による染色実験を繰り返したが、LPS 刺激をしていない control の状況でも染色が強い、つまり control でも活性酸素量が多いことがあり再現性に乏しかった。

EPO には抗酸化作用が見られるという報告もあるが、今回の研究では証明することはできなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- (1) Tamura T, Otulakowski G, Kavanagh B.
Could nanotechnology make vitamin E therapeutically effective?
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2019;316:L1-L5.
doi:10.1152/ajplung.00430.2018. 査読有
- (2) Kasahara R, Yamamoto N, Suzuki K, Sobue K
The α_1 receptor regulates accumulation of GM1 ganglioside-enriched autophagosomes in astrocytes.
Neuroscience. 2017;340:176-87
doi:10.1016/j.neuroscience.2016.10.058. 査読有
- (3) Tamura T, Aoyama M, Ukai S, Kakita H, Sobue K, Asai K.
Neuroprotective erythropoietin attenuates microglial activation, including morphological changes, phagocytosis, and cytokine production.
Brain Res. 2017;1662:65-74
doi:10.1016/j.brainres.2017.02.023. 査読有
- (4) Yamamoto N, Shibata M, Ishikuro R, Tanida M, Taniguchi Y, Ikeda-Matsuo Y, Sobue K.
Epigallocatechin gallate induces extracellular degradation of amyloid β -protein by increasing neprilysin secretion from astrocytes through activation of ERK and PI3K pathways. Neuroscience. 2017;362:70-7
doi:10.1016/j.neuroscience.2017.08.03. 査読有
- (5) Yamamoto N, Fujii Y, Kasahara R, Tanida M, Ohora K, Ono Y, Suzuki K, Sobue K.
Simvastatin and atorvastatin facilitates amyloid β -protein degradation in extracellular spaces by increasing neprilysin secretion from astrocytes through activation of MAPK/Erk1/2 pathways.
Glia. 2016;64:952-62 doi:10.1002/glia.22974. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 鳥内阜暉、田村哲也、垣田博樹、岩城壮一郎、朝霧成拳、浅井清文、青山峰芳

神経保護因子エリスロポエチンによるミクログリア活性化抑制作用
第 64 回日本薬学会東海支部大会 2018 年

(2) 鳥内 皐暉、田村 哲也、垣田博樹、岩城壮一郎、朝霧成拳、浅井清文、青山峰芳
神経保護因子エリスロポエチンはミクログリアの過剰な活性化を抑制する
第 65 回中部日本生理学会 2018 年

(3) 田村 哲也、藤掛数馬、太田晴子、平手博之、杉浦健之、祖父江和哉
エリスロポエチンによるミクログリア活性抑制と脳保護効果。
日本麻酔科学会第 63 回学術集会 2016 年

[図書] (計 1 件)

(1) 田村 哲也、祖父江和哉 (編集 : 内野博之、川口昌彦)
「神経麻酔」 . 脳障害と血液脳関門
克誠堂出版 p23-26 2016 年

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 祖父江 和哉
ローマ字氏名 : SOBUE Kazuya
所属研究機関名 : 名古屋市立大学
部局名 : 大学院医学研究科
職名 : 教授
研究者番号 (8 桁) : 90264738

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : 青山 峰芳
ローマ字氏名 : AOYAMA Mineyoshi

研究協力者氏名 : 浅井 清文
ローマ字氏名 : ASAI Kiyofumi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。