

機関番号：17102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592174

研究課題名 (和文) 末梢炎症時の髄膜傷害因子としての IL-1 β とその
産生におけるカテプシン B の役割研究課題名 (英文) Roles of cathepsin B in the production of IL-1 β as a leptomenigeal
toxic factor during systemic inflammation

研究代表者

武 洲 (TAKE HIRO)

九州大学・大学院歯学研究院・准教授

研究者番号：10420598

研究成果の概要 (和文)：

本研究において、慢性の末梢炎症に対して髄膜-グリア連関は若齢ではニューロン保護的に、中年では逆にニューロン傷害的に作用し、髄膜バリア機能も破綻することが明らかとなった。中年ラットにおいて末梢炎症に伴って主にミクログリアに発現する IL-1 β は密着結合タンパク質 occludin の発現を有意に低下させることから、髄膜バリア機能も破綻において IL-1 β が中心的な役割を果たすことが強く示唆された。さらに、中高年においては髄膜バリア機能の破綻ならびに脳炎症反応において中心的な役割を担っているミクログリアからの IL-1 β の産生分泌においてカテプシン B が必須酵素として関与することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

Systemic inflammation causes the age-dependent differential glial responses, but little is known about how age influences the barrier function of leptomeninges during adjuvant arthritis (AA). Microglia expressed IL-1 β in the middle-aged AA rats but not in the young AA rats. In the cultured leptomeningeal cells, IL-1 β caused a marked loss of occludin. Furthermore, cathepsin B (CB), a typical lysosomal cysteine protease, was found to play a key role in the pro-IL-1 β maturation through the caspase-1 activation in chromogranin A-treated microglia. These findings establish that age strongly influences the barrier functions of the leptomeninges through CB-dependent production of IL-1 β by microglia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：IL-1 β 、カテプシン B、末梢炎症、髄膜、グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

中高年者における長期にわたる病者行動は中枢ニューロンの機能破綻を助長し、神経細胞の脱落や脳の老化を加速するものと予想されているが、なぜ中高年者において深刻な病者行動が誘発されるのかについては不明な点が多い。中年ラットでは末梢炎生時に髄膜細胞におけるZO-1の発現が激減することから、中高年ではIL-1 β が直接的に脳バリア機構に傷害を及ぼす可能性が考えられる。このことから、慢性感染や末梢炎症に伴うIL-1 β の発現は強い脳炎症を引き起こし、中高年者における病者行動の増悪の重要な要因になっているという着想に至った。

2. 研究の目的

IL-1 β の脳バリア機構、特に脳髄液-血液関門に対する影響、ならびにIL-1 β のプロセッシングならびに分泌機構におけるCBの役割を解明することを目的とする。さらに、CB欠損マウスならびに選択的CB阻害剤を用いCB酵素活性の阻害により脳炎症や病者行動を改善できるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

IL-1 β の脳炎症ならびに病者行動への関与の全容を解明するために、IL-1 β の脳バリア機構、特に脳髄液-血液関門の障害や白血球の脳内浸潤を誘導するメカニズムを解析した。具体的には、慢性炎症モデルであるラットアジュバント関節炎ならびにラットの初代培養髄膜細胞を用いて、加齢に伴う密着結合発現や白血球の脳内浸潤動態にIL-1 β の関与の詳細な解析を行った。さらに、IL-1 β のプロセッシングならびに分泌機構におけるCBの役割を解析する。具体的には野生型ならびにCB欠損マウスより調整した初代マイクログリアを用いて、LPSにより活性化に伴うIL-1 β の産生分泌についての詳細解析を行った。

4. 研究成果

(1) 慢性炎症モデルであるラットアジュバント関節炎(AA)ならびにラットの初代培養髄膜細胞を用いて、加齢に伴う密着結合タンパク質発現や白血球の脳内浸潤動態変化にIL-1 β の関与について解析を行った。その結果、AAを誘発した若年ラットの大脳皮質において、髄膜にIL-1 β ならびに誘導型プロスタグランジンE₂合成酵素(mPGES-1)の発現が認められた。脳実質内のグリア細胞には炎症性サイトカインのIL-10ならびにTGF- β 1の発現が認められた。一方、AAを誘発した中年ラットの大脳皮質では、IL-1 β ならびにmPGES-1の発現が髄膜に加えて脳実質内のグリア細胞にも認められた。また、IL-10なら

びにTGF- β 1の発現は低下していた。AAを誘発した中年ラットの大脳皮質では髄膜における密着結合タンパク質であるoccludinならびにZO-1の発現が低下しており、髄膜透過性の増大ならびに血球細胞の脳実質内への浸潤が認められた。次に初代培養髄膜細胞を用いてIL-1 β ならびにPGE₂の密着結合蛋白質に対する影響を解析した。その結果、IL-1 β ならびにPGE₂は各々occludinならびにZO-1の発現を有意に低下させた。一方、IL-10ならびにTGF- β 1はIL-1 β ならびにPGE₂の作用を抑制した。さらにリソソーム酵素であるCBのマイクログリアによるIL-1 β の産生分泌に対する役割を解析した。クロモグラニンAによる刺激を行ったところ野生型マウスより調整した初代マイクログリアではIL-1 β の培養液への分泌が認められたが、CB欠損マウスより調整したマイクログリアでは検出できなかった。以上の結果より、慢性の末梢炎症に対して髄膜-グリア連関は若齢ではニューロン保護的に、中年では逆にニューロン傷害的に作用し、髄膜バリア機能も破綻することが明らかとなった。このことから特に中高年者では慢性の末梢炎症が深刻な脳炎症を引き起こすことが示唆された。また、CBがIL-1 β の産生分泌に必須であることが強く示唆された。

(2) 野生型マウスより調整したマイクログリアではクロモグラニンA適用24時間後にプロ型IL-1 β は細胞内でプロセッシングを受けて成熟型に変換し、細胞外に分泌されることが明らかとなった。一方、CB欠損マウスより調整したマイクログリアではクロモグラニンA添加によりプロ型IL-1 β は増大したが、成熟型のIL-1 β の形成は48時間後においてもほとんど認められなかった。また、細胞外への成熟型IL-1 β の分泌も認められなかった。さらにCB阻害剤のCA074Meによりプロ型カスパーゼ-1の成熟型へのプロセッシングが抑制された。以上の結果より、CBはプロ型カスパーゼ-1の成熟型へのプロセッシングを行うことで、プロ型IL-1 β の成熟型へのプロセッシングに間接的に関与することが明らかとなった。

(3) ウェスタン解析の結果、CB欠損あるいはCA074MeによりクロモグラニンAで誘導されるプロIL-1 β の産生は影響されることなく成熟型へのプロセッシングならびに細胞外への分泌が抑制されることが明らかとなった。また、細胞内局在を調べた結果、クロモグラニンAで処理したマイクログリアにおいてもCBはリソソーム内局在を示唆する顆粒状の免疫反応を示していた。さらに、リソソーム指向性色素であるアクリジンオレンジならびにCB蛍光基質を用いた解析によってもCBの細胞質への漏出を示す証拠は得られなかった。通常の一次リソソームは直径1ミクロン

程度であるが、CB、カスパーゼ-1ならびに成熟型 IL-1 β は直径 4 ミクロン程度に膨化したリソソーム内に共存していた。興味深いことにクロモグラニン A は A β と同様にクラス A スカベンジャー受容体を介して取り込まれることでミクログリアに作用し、リソソーム系の再編を引き起こすと考えられる。これらの結果より、クロモグラニン A 刺激に伴って膨化したリソソーム内でカテプシン B によるプロカスパーゼ-1 の活性化、引き続いてカスパーゼ-1 によるプロ IL-1 β の成熟型への変換が生じることが示唆される。膨化したリソソームの内容物はエクソサイトーシスにより細胞外に放出され、脳炎症反応を惹起するものと考えられる。

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 11 件)

- (1) Wu Z, Nakanishi H, Phosphatidylserine-containing liposomes: potential pharmacological interventions against inflammatory and immune diseases through the production of prostaglandin E₂ after uptake by myeloid derived phagocytes, *Ach. Immunol. Therap. Exp.* 59, 196-201, 2011.
- (2) Wu Z, Ma HM, Kukita T, Nakanishi Y, Nakanishi H. Phosphatidylserine-containing liposomes inhibit the differentiation of osteoclasts and trabecular bone loss. *J Immunol.* 15;184(6):3191-3201, 2010.
- (3) Terada K, Yamada J, Hayashi Y, Wu Z, Uchiyama Y, Peters C, Nakanishi H. Involvement of cathepsin B in the processing and secretion of interleukin-1 β in chromogranin A-stimulated microglia. *Glia.* 58(1):114-124, 2010.
- (4) Zhang R, Sun L, Hayashi Y, Liu X, Koyama S, Wu Z, Nakanishi H. Acute p38-mediated inhibition of NMDA-induced outward currents in hippocampal CA1 neurons by interleukin-1 β . *Neurobiol Dis.* 38(1):68-77, 2010.
- (5) Sun L, Wu Z, Baba M, Peters C, Uchiyama Y, Nakanishi H. Cathepsin B-dependent motor neuron death after nerve injury in the adult mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* 399(3):391-395, 2010.

(6) Nakanishi H, Wu Z. Microglia-aging: Roles of microglial lysosome- and mitochondria-derived reactive oxygen species in brain aging. *Behav. Brain Res.*

(7) Wu Z, Tokuda Y, Zhang XW, Nakanishi H. Age-dependent responses of glial cells and leptomeninges during systemic inflammation. *Neurobiol. Disease* 32: 543-551, 2008.

(8) Hayashi Y, Yoshida M, Yamato M, Ide T, Wu Z, Ochi-Shindou M, Kanki T, Kang D, Sunagawa K, Tsutsui H, Nakanishi H. Reverse of brain aging by an overexpression of human mitochondrial transcription factor A in mice. *J. Neurosci.* 28: 8624-8634, 2008.

(9) Sakamoto M, Miyamoto KI, Wu Z, Nakanishi H. Possible involvement of cathepsin B released by microglia in methylmercury-induced cerebellar pathological changes in the adult rats. *Neurosci. Lett.* 442: 292-296, 2008.

(10) Zhang R, Yamada J, Hayashi Y, Wu Z, Koyama S, Nakanishi H. Inhibition of NMDA-induced outward currents by interleukin-1 β in hippocampal neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372: 816-820, 2008.

(11) Yamada J, Hayashi Y, Jinno S, Wu Z, Inoue K, Kohsaka S, Nakanishi H. Reduced synaptic activity precedes synaptic stripping in vagal motoneurons after axotomy. *Glia* 56: 1148-1462, 2008.

[学会発表] (計 46 件)

(1) Nakanishi H. Involvement of extracellular nucleotides in microglial synaptic stripping response. 第 81 回日本薬理学会年会、シンポジウム「細胞外ヌクレオチドによる脳機能制御-分子ダイナミクスと疾病への関与」2008 年 3 月 17 日 (横浜)

(2) Hayashi Y, Yoshida M, Yamamoto M, Ide T, Kang D, Nakanishi H. Novel therapeutic intervention with overexpression of TFAM against the age-dependent memory impairment. 第 81 回日本薬理学会年会、2008 年 3 月 17 日 (横浜)

(3) Wu Z, Tokuda Y, Zhang XW, Nakanishi H. Age-dependent differentiation of the barrier function of the leptomeninges in the cerebral cortex by activated glial cells during the systemic inflammation. 第 26 回 CINP、2008 年 7 月 13 日 (ミュンヘン)

(4) Wu Z, Nakanishi H. Age-dependent differential regulation of tight junction proteins in the leptomeninges by glial cells during systemic inflammation. Neuroscience 2008、2008 年 11 月 23 日 (ワシントン DC)

(5) Nakanishi H, Terada K, Yamada J, Hayashi Y, Wu Z. Involvement of cathepsin B in the processing and secretion of interleukin-1 β in chromogranin A-stimulated microglia. Neuroscience 2008、2008 年 11 月 23 日 ((ワシントン DC))

(6) Yamada J, Jinno S, Nakanishi H. Reduced synaptic activity mediated by extracellular nucleotides precedes synaptic stripping after an axotomy. Neuroscience 2008、2008 年 11 月 23 日 ((ワシントン DC))

(7) Hayashi Y, Yoshida M, Yamato M, Ide T, Wu Z, Nakanishi H. Overexpression of human TFAM prevents age-dependent memory impairment in mice by suppression of mitochondrial oxidative stress. Neuroscience 2008、2008 年 11 月 23 日 ((ワシントン DC))

(8) 武 洲、馬 紅梅、中西 博、破骨前駆細胞の貪食機能に着目した新たな骨破壊抑制法、第 50 基礎歯科医学会、2008 年 9 月 25 日 ((東京))

(9) 馬 紅梅、武 洲、中西 博、Phosphatidylserine-containing liposomes ameliorates the cytokine imbalance in the ankle joints of adjuvant arthritic rats. 第 50 基礎歯科医学会、2008 年 9 月 25 日 (東京)

(10) Zhang R, Wu Z, Nakanishi H. Inhibition of NMDA-induced outward currents by interleukin-1 β in hippocampal neurons. 第 50 基礎歯科医学会、2008 年 9 月 25 日 (東京)

(11) 徳田幸恵、張 馨文、武 洲、中西 博、中高年における慢性末梢炎症は深刻な脳炎

症を引き起こす、第 50 基礎歯科医学会、2008 年 9 月 25 日 (東京)

(12) 林 良憲、井手友美、中西 博、TFAM 過剰発現によるミクログリア内レドックス制御と老化に伴う脳機能低下の防止、第 13 回グリア研究会、2008 年 11 月 8 日 (東京)

(13) 山田 純、神野尚三、中西 博、細胞内標識法を用いたミクログリアならびにアストロサイト突起の微細構造の解析、第 13 回グリア研究会、2008 年 11 月 8 日 (東京)

(14) 中西 博、林 良憲、井手友美、武 洲、ミトコンドリア転写因子 A の過剰発現によるミトコンドリア内レドックス制御ならびに老化に伴う脳機能低下の制御、第 61 回日本薬理学会西南部会、2008 年 11 月 28 日 (米子)

(15) 武 洲、中西 博、末梢炎症に対する髄膜—グリア連関の汎脳性の老化に伴う変容、第 61 回日本薬理学会西南部会、2008 年 11 月 28 日 (米子)

(16) Zhang R, Nakanishi H. Involvement of p38 MAPK in interleukin-1 β -induced inhibition of NMDA-induced outward currents in hippocampal neurons. Berlin Brain Days, 2008 年 12 月 10 日 (ベルリン)

(17) Wu Z, Tokuda Y, Zhang XW, Nakanishi H. Age-dependent differential microglial and astrocytic responses through leptomeninges during systemic inflammation. 第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 16 日 (横浜)

(18) Nakanishi H, Terada K, Yamada J, Hayashi Y, Wu Z. Involvement of cathepsin B in the processing and secretion of interleukin-1 β in chromogranin A-stimulated microglia. 第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 (横浜)

(19) Nakanishi H. Microglia-aging: Roles of microglial lysosome-and mitochondria-derived reactive oxygen species in brain aging. 第 52 回日本神経化学会、シンポジウム「ミクログリアの機能と病態—最近の研究動向と将来の展望—」、2009 年 6 月 24 日 (群馬県伊香保)

(20) Nakanishi H, Yamada J. Extracellular nucleotide-mediated reduced synaptic activity

precedes microglial synaptic stripping after an axotomy. International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery, Fukuoka Purine 2009, 2009年7月24日(福岡)

(21) Wu Z, Nakanishi H. Age-dependent differential phenotypic changes of glial cells by systemic inflammation. 9th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease. 2009年9月10日(パリ)

(22) 中西 博、末梢炎症により惹起される脳炎症の老化による増悪：鍵を握る脳の免疫担当細胞ミクログリアの動態について、第52回秋期日本歯周病学会、シンポジウム「歯周組織の免疫応答から考える全身への影響」2009年10月11日(宮崎)

(23) 武 洲、劉 霞、中西 博、末梢炎症によるミクログリア活性化と脳老化の促進、第14回グリア研究会、2009年11月14日(大阪)

(24) 山田 純、神野尚三、中西 博、運動神経軸索切断後のアストロサイト形態・ミクログリアの形態の比較検討、第14回グリア研究会、2009年11月14日(大阪)

(25) 林 良憲、中西 博、ミクログリアのニューロン保護作用：NMDA誘発こうフィン毒性に対するミクログリア培養上清の保護メカニズムの解析、第62回日本薬理学会西南部会、2009年11月27日(愛媛)

(26) Zhang R、劉 霞、孫 麗、林 良憲、武洲、中西 博、インターロイキン-1 β のp38MAPキナーゼの活性化を介したNMDAにより惹起されるCa²⁺活性化K⁺電流の抑制作用、第62回日本薬理学会西南部会、2009年11月27日(愛媛)

(27) 中西 博、カテプシンB阻害による疼痛制御、第5回九大痛みの研究会、2010年2月19日(福岡)

(28) 中西 博、ミクログリアのリソソーム・ミトコンドリア系を標的としたグリア創薬に可能性、第130回日本薬学会年会、130回年会祈念融合型シンポジウム「グリア創薬の最前線と可能性」2010年3月29日(岡山)

(29) Hayashi Y, Fujita S, Odagaki Y, Shinagawa

R, Kagamiishi Y, Nakanishi H. Neuroprotection of microglia-conditioned medium on excitotoxic neuronal injury through inhibition of large cation conductance. 第83回日本薬理学会年会、2010年3月16日(大阪)

(30) Wu Z, Nakanishi H. Microglial cathepsin B: A strategic target for neuroprotective agents. BIT's Inaugural Symposium on Enzyme & Biocatalysis-2010. 2010年4月22日(上海)

(31) Wu Z, Liu X, Nakanishi H. Reverse of the rheumatoid arthritis-induced acceleration of brain aging in the middle age by minocycline. The 1st International Congress on Controversies in Longevity, Health and Aging. 2010年6月24日(バルセロナ)

(32) Hayashi Y, Fujita S, Odagaki Y, Shinagawa R, Kagamiishi Y, Nakanishi H. Protective effects of microglia-conditioned medium against NMDA-induced dendritic injury through an inhibition of non-selective cation conductance. Neuro2010, 2010年9月2日(神戸)

(33) Kawaji K, Hayashi Y, Koyano K, Yokoyama T, Nakanishi H. Preferential inhibitory effects of S-ketamine on both NMDA receptor currents and neuropathic pain. Neuro2010, 2010年9月2日(神戸)

(34) Yamada J, Jinno S, Nakanishi H. Differential involvement of astrocytes and microglia in neuronal survival after hypoglossal nerve injury. The 29th Naito Conference: Glia World. 2010年10月5日(湘南村)

(35) Hayashi Y, Kawaji K, Nakanishi H. Preferential inhibitory effects of S-ketamine on neuropathic pain through both the neuronal based and microglia related mechanisms. The 29th Naito Conference: Glia World. 2010年10月5日(湘南村)

(35) Sun L, Wu Z, Hayashi Y, Nakanishi H. A possible involvement of cathepsin B in nociceptive processing through the processing and secretion of interleukin-1 family from microglia. Neuroscience 2010, 2010年11月14日(サンジエゴ)

- (36) Hayashi Y, Zhang R, Sun L, Wu Z, Nakanishi H. Acute p38-mediated inhibition of K_{Ca} channels activated by Ca^{2+} influx through both NMDA receptor and voltage-gated Ca^{2+} channels by interleukin- 1β , Neuroscience 2010, 2010年11月14日 (サンジエゴ)
- (37) Kawaji K, Hayashi Y, Nakanishi H. S-ketamine preferentially inhibits neuropathic pain through the neuronal-based and microglia-related mechanisms. Neuroscience 2010, 2010年11月14日 (サンジエゴ)
- (38) 孫 麗、武 洲、中西 博、炎症性疼痛発症におけるミクログリアのカテプシンBの関与、第52回歯科基礎医学会学術大会 2010年9月20日 (東京)
- (39) 張 馨文、孫 麗、武 洲、中西 博、神経障害性疼痛におけるミクログリアのカテプシンSの関与、第52回歯科基礎医学会学術大会 2010年9月20日 (東京)
- (40) 劉 霞、武 洲、中西 博、慢性末梢炎症によるミクログリア活性化と海馬LTPの障害、第52回歯科基礎医学会学術大会 2010年9月20日 (東京)
- (41) 武 洲、馬 紅梅、久木田敏夫、中西 博、ホスファチジルセリンリポソームによる炎症性骨破壊抑制メカニズムの解析、第52回歯科基礎医学会学術大会 2010年9月20日 (東京)
- (42) 馬 紅梅、武 洲、李 銀姫、久木田敏夫、中西 博、ホスファチジルセリンリポソームによる骨形成の促進、第52回歯科基礎医学会学術大会 2010年9月20日 (東京)
- (43) 張 馨文、林 良憲、武 洲、中西 博、ミクログリアの産生するカテプシンSの神経障害性疼痛発症における役割、第15回グリア研究会、2010年10月23日 (福岡)
- (44) 孫 麗、武 洲、中西 博、ミクログリアの産生するカテプシンBの炎症性疼痛発症における役割、第15回グリア研究会、2010年10月23日 (福岡)
- (45) 武 洲、劉 霞、中西 博、中年ルイスラットにおけるアジュバント関節炎に伴うミクログリア活性化と海馬長期増強の障害、

第63回日本薬理学会西南部会、2010年11月26日 (鹿児島)

- (46) 林 良憲、河路広大、中西 博、S-ケタミンのNMDA電流ならびにミクログリア活性化の優位阻害による神経障害性疼痛に対する抑制作用、第63回日本薬理学会西南部会、2010年11月26日 (鹿児島)

[図書] (計 2件)

① Wu Z, Nakanishi H. Regulation of myeloid phagocytes by phosphatidylserine-containing liposomes: possible involvement of prostaglandin E_2 and the potential therapeutic application. In: Prostaglandins: Biochemistry, Functions, Types and Roles (Ed., GM Goodwin) Nova Science Publisher Inc., New York, p81-92, 2010.

② Nakanishi H, Wu Z. Cathepsin-dependent neuronal death pathways induced by methylmercury. In: Methylmercury: Formation, Sources and Health Effects (Ed. AP Clampet) Nova Science Publisher Inc., New York, in press

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武 洲 (TAKE HIRO)

九州大学・大学院歯学研究院・准教授
研究者番号：10420598

(2) 研究分担者

中西 博 (NAKANISHI HIROSHI)

九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号：20155774

(3) 連携研究者

なし