

平成22年 6月 11日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791077  
 研究課題名（和文） 低酸素誘発活性化マイクログリアによるニューロン障害の  
 温度依存的応答  
 研究課題名（英文） Temperature-dependent response in neuronal injury by hypoxia-induced  
 microglia

研究代表者  
 松井 智浩 (MATSUI TOMOHIRO)  
 山口大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：50314828

研究成果の概要（和文）：脳損傷時に活性化するマイクログリアは細胞傷害性因子を産生し、脳障害を引き起こす。よって、脳保護を目的とする脳低温療法はそれらの産生を軽減する可能性があり、その機序を活性化マイクログリアの培養系で調べた。その結果、細胞傷害性因子の TNF- $\alpha$ 、IL-6 および一酸化窒素(NO)は低温下で抑制され、脳低温療法による脳保護効果の一機序に、マイクログリアの細胞傷害性因子抑制が関与することが示唆された。また、高温下ではNO産生のみ増加した。このNO産生の温度依存性変化は、NOが低温下での脳保護効果および高温下での脳障害増悪において、病態把握のための重要なマーカーになりうることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：Pro-inflammatory cytokines and NO are considered responsible for exacerbating brain injury. Activated microglia produce these potentially cytotoxic factors during neuron destruction. Therefore, the beneficial effects of therapeutic hypothermia on neuroprotection are considered to be due, in part, to suppression of post-injury inflammatory factors by microglia. In this study, I examined whether altering culture temperature modifies production of cytokines and NO by microglia activated with ATP, a product leaked from injured neurons/cells after brain insults. Compared to normothermia, hypothermia decreased ATP-induced production of pro-inflammatory cytokines, TNF- $\alpha$  and IL-6, within 6 h of culture. NO production was reduced by hypothermia but augmented by hyperthermia at 6 h. In addition, activation of p38 MAPK was reduced in hypothermia at 1 min, compared to normothermia. In conclusion, hypothermia reduced the rapid activation of p38 MAPK and the following TNF- $\alpha$ , IL-6, and NO production in ATP-activated microglia, suggesting that the reduction of the early-phase inflammatory factors *via* suppression of p38 MAPK in microglia is one possible neuroprotective mechanism of therapeutic hypothermia. Hyperthermia specifically increased the early-phase NO production in these cells. These temperature-dependent changes in NO production may imply that NO in the early phase is useful as an important clinical marker in hypothermia-related neuronal protection and in hyperthermia-related neuronal injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経免疫学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：脳低温療法、マイクログリア、ATP、TNF- $\alpha$ 、IL-6、NO、p38 MAPK、高温培養

## 1. 研究開始当初の背景

重症頭部外傷や虚血・低酸素等の脳損傷により増加した炎症性サイトカインや一酸化窒素(NO)は二次的脳障害に関与する。マイクログリアは虚血や組織傷害時に増殖・活性化し、これらの細胞傷害性(炎症性)因子を放出し、ニューロン障害を引き起こす。よって、脳低温療法による脳(ニューロン)保護効果の一機序には、活性化マイクログリアからの炎症性因子抑制の関与が考えられる。しかし、その機序は未だ明らかでなく、特に抗炎症性サイトカインに対して低温が及ぼす影響は全く不明であった。

そこで研究代表者は、脳低温療法による脳保護効果の一機序解明を目指し、活性化培養マイクログリアの産生する炎症性(IL-6)および抗炎症性サイトカイン(IL-10)とNOが、温度変化(低温および高温)によりどのような影響を受けるのかを調べてきた。その結果、低温(33 $^{\circ}$ C)下では、Lipopolysaccharide(LPS)活性化マイクログリアからのIL-6、IL-10およびNO産生が低値を示すこと、また、高温(39 $^{\circ}$ C)下ではマイクログリアからのIL-10産生が特異的に増加することを見出し、脳低温療法による脳保護効果には、従来報告されてきた炎症性因子抑制のみでなく、抗炎症性因子抑制も関与する可能性並びに脳損傷後の高温下におけるニューロン障害増悪にはマイクログリアからのIL-10増加が関与する可能性を示してきた(Matsui T and Kakeda T, IL-10 production is reduced by hypothermia but augmented by hyperthermia in rat microglia. *J Neurotrauma*, 25:709-715, 2008)。

LPSはマイクログリア活性化によく用いられているが、本物質は非生理的(外因的)であるため、臨床により近い状態でマイクログリアを活性化させ、同様な研究を行うことが望まれていた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、(1)脳損傷時のニューロンやグリア細胞から遊離・放出される最近注目のマイクログリアの内因性刺激物質、アデノシン三リン酸(ATP)に着目し、ATP活性化マイクログリアからの炎症性および抗炎症性サイトカインとNO産生が低温や高温下でどのように影響を受けるのかを調べる。また、

それらの産生に関与するp38 mitogen-activated protein kinase(MAPK)活性化に温度変化が及ぼす影響も調べ、低温・高温下におけるサイトカインやNO産生のメカニズムの一端を明らかにする。

次に、(2)脳低温療法の適応となる脳損傷を引き起こす低酸素(虚血)状態を細胞培養系で構築し、以下の研究を行う。①低酸素誘発活性化マイクログリアからの炎症性および抗炎症性サイトカインとNO産生が低温や高温下でどのように影響を受けるのかを調べる。②その後、低酸素誘発活性化マイクログリアおよびそこから産生されるサイトカインやNOが如何にしてニューロン障害と関わっているのか、また、低温および高温下でそれらの反応が如何に影響を受けるのかを、マイクログリアとニューロンの共培養系(相互作用)実験により明らかにする。

## 3. 研究の方法

新生仔ラット(1-3日齢)脳よりマイクログリアを単離し、ATP(1mM)添加後、33 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、39 $^{\circ}$ C下で6時間まで培養した。培養上清中のサイトカイン(炎症性:TNF- $\alpha$ およびIL-6、抗炎症性:IL-10)産生量はELISAにて、NO $_2^-$ (NOの安定な代謝産物)産生量は比色法(Griess法)にて、また、細胞内活性化(リン酸化)p38 MAPKはFast Activated Cell-based ELISA(Active Motif)にて、各々測定した。

## 4. 研究成果

### (1)研究の主な成果

TNF- $\alpha$ 産生は、37 $^{\circ}$ Cに比べ33 $^{\circ}$ Cでは低値を示し、39 $^{\circ}$ Cでは差がなかった(培養3時間)(図1)。IL-6産生は、37 $^{\circ}$ Cに比べ33 $^{\circ}$ Cでは低値を示し、39 $^{\circ}$ Cでは差がなかった(培養6時間)(図2)。IL-10産生は、培養温度間で差がなかった(培養6時間)(図は示さない)。NO $_2^-$ 産生は、37 $^{\circ}$ Cに比べ33 $^{\circ}$ Cでは低値、39 $^{\circ}$ Cでは高値を示した(培養6時間)(図3)。また、活性化p38 MAPKは、37 $^{\circ}$ Cに比べ33 $^{\circ}$ Cでは低値を示し、39 $^{\circ}$ Cでは差がなかった(培養1時間)(図4)。

以上より、低温早期では、ATP活性化マイクログリアのTNF- $\alpha$ 、IL-6およびNO産生並びにp38 MAPK活性化が低下した。よって、脳低温療法による脳保護効果の一機序に、活性化マイクログリアのp38 MAPK活性化阻害

を介した早期での炎症性因子抑制が関与することが示唆された。また、高温早期では、マイクログリアの NO 産生のみ増加した。脳温はニューロンの生死決定に重要な因子であり、脳損傷後、脳低温はニューロン保護に、脳高温はニューロン障害増悪に作用する。よって、この NO 産生の温度依存性変化は、NO が低温早期でのニューロン保護効果および高温早期でのニューロン障害増悪において、病態把握のための重要なマーカーになりうることを示唆する。

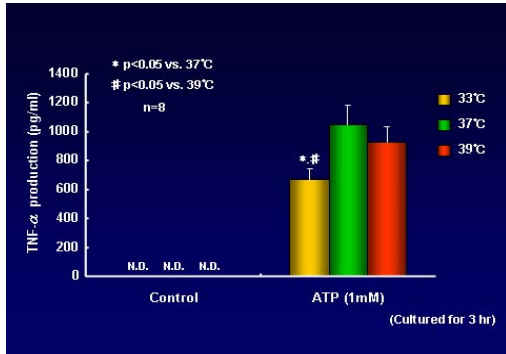


図 1. ATP 活性化マイクログリアからの TNF- $\alpha$  産生に及ぼす低温・高温培養の影響

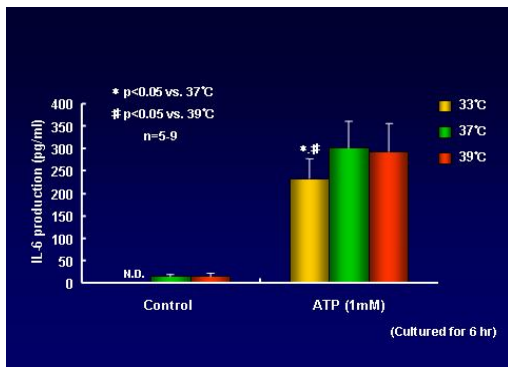


図 2. ATP 活性化マイクログリアからの IL-6 産生に及ぼす低温・高温培養の影響

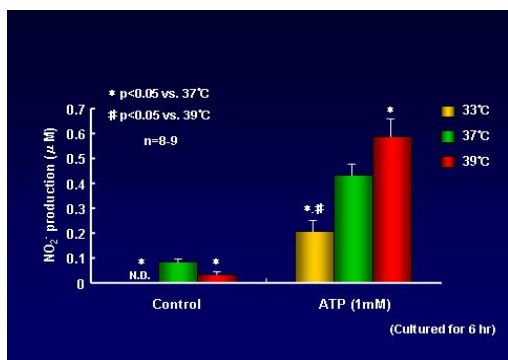


図 3. ATP 活性化マイクログリアからの NO 産生に及ぼす低温・高温培養の影響

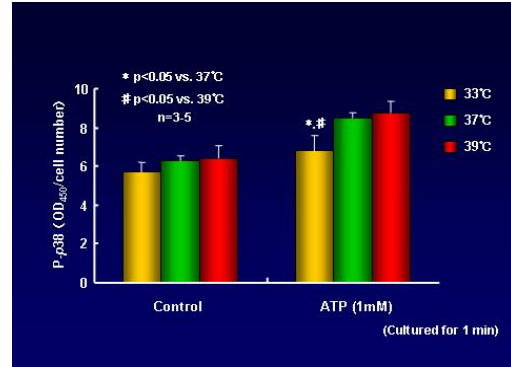


図 4. ATP 活性化マイクログリアの p38 MAPK 活性化(P-p38)に及ぼす低温・高温培養の影響

### (2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

脳低温療法の基礎研究の中で、虚血モデル動物のニューロン障害に対して脳保護効果をみた報告は多い。しかし、それらの多くはその脳保護機構を脳エネルギー代謝抑制や髄液中グルタミン酸放出抑制によるニューロン虚血応答の低下等からみたものであり、その周りに存在し、ニューロン死の過程に関与するグリアや血管内皮細胞に関してみた報告は少ない。重症頭部外傷や虚血・低酸素等による脳障害に対して脳低温療法がより有効な治療法として確立されていくためには、これらの細胞の低温応答を知ることが重要である。

本研究は、マイクログリアと脳損傷時のニューロンやグリア細胞から遊離・放出される ATP に着目し、ATP 活性化マイクログリアからの炎症性因子産生と細胞内 p38 MAPK 活性化の温度依存性変化を初めて報告したものである。脳低温療法による脳保護機構の一端を、損傷を受けた細胞間による生理的ネットワークの観点から明らかにしたことは、国内外の脳低温療法の研究に大きなインパクトを与えたと言える。

### (3) 今後の展望

脳低温療法の脳保護効果における活性化マイクログリアからのサイトカインや NO の関与をより詳細に調べるためには、サイトカインや NO 産生のみでなく、以上のように、それらの産生に関与する細胞内情報伝達因子や核内転写因子にも温度変化が及ぼす影響をみる必要がある。その際、マイクログリアを活性化させる“シグナル”はその性質を変える可能性があるため、用いる”シグナル”は重要である。脳障害を引き起こす低酸素刺激や脳損傷で増加する生体(細胞)由来の内因性 Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) リガンドとその受容体 (TLR) に注目したい。

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4件)

- ① 松井智浩、低温・高温下におけるマイクログリアのサイトカインおよび NO 産生動態、山口医学、査読無、59 巻、2010、17-21
- ② MATSUI T、Hypothermia reduces the release of inflammatory factors via suppression of p38 MAPK in ATP-activated rat microglia、ニュー・フロンティア・プロジェクト報告集、査読無、10 巻、2009、54-58
- ③ Matsui T and Kakeda T、IL-10 production is reduced by hypothermia but augmented by hyperthermia in rat microglia、J Neurotrauma、査読有、25 巻、2008、709-715
- ④ Kakeda T, Ito M, Matsui T, and Ishikawa T、The evidence for sweet substance-induced analgesia in adult human、Pain Research、査読有、23 巻、2008、159-166

[学会発表] (計2件)

- ① 松井智浩、低温・高温下におけるマイクログリアのサイトカインおよび NO 産生動態(山口大学医学会中村賞受賞者講演)、第113回山口大学医学会、2010年2月20日、宇部(山口県)
- ② Matsui T、Inflammatory factors produced by ATP-activated microglia are reduced by hypothermia、The 26th Annual National Neurotrauma Society Symposium、2008年7月29日、Orlando (FL, USA)

[図書] (計1件)

- ① 松井智浩、ほか、医歯薬出版株式会社、臨床検査学講座/免疫検査学 第2版、2010、1-410

[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

松井 智浩 (MATSUI TOMOHIRO)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50314828

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし