

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16138

研究課題名（和文）生理活性脂質の産生制御が脳内出血病態形成に与える作用の解析

研究課題名（英文）Effect of the regulation of bioactive lipid mediators production on the pathophysiology of intracerebral hemorrhage

研究代表者

脇岡 雅宣 (Hijioka, Masanori)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：50780061

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：脳内出血ではミクログリアの活性化や好中球の浸潤が病態形成を増悪する。生理活性脂質の一種であるロイコトリエンB4がそれらを制御することを過去に報告したため、本研究では脂質代謝に注目した。アラキドン酸生成を制御するモノアシルグリセロールリパーゼ、アラキドン酸やドコサヘキサエン酸等を代謝する12/15-リポキシゲナーゼの阻害薬を脳内出血モデルマウスに投与したところ病態に与える作用は見られず、病態形成における脂質代謝調節の意義は小さいことが示唆された。一方、アラキドン酸代謝物であり抗炎症作用を有するリポキシンA4の受容体作動薬が病態改善作用を示したことから、抗炎症性シグナルの動員が重要だと示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳内出血は脳実質内に血液が漏れ出すことで頭蓋内圧亢進や神経炎症を惹起し、不可逆的な神経変性を呈す疾患である。脳内出血の病態形成機構の詳細は未だ明らかでないことから有用な治療薬は開発されていない。本研究では出血惹起後早期の脂質代謝物の産生に注目しマウスモデルを用いた解析を実施したが、脂質代謝調節を狙った介入法では治療効果が得られなかった。一方でアラキドン酸から代謝された分子に注目し解析した結果、治療標的となりうる分子を見出した。これらの結果は、脳内出血発症後早期の脂質代謝物のシグナル伝達の調節が脳内出血の治療方策となりうることを示したものであり、今後の治療薬開発に寄与する知見だと考えている。

研究成果の概要（英文）：In intracerebral hemorrhage, microglial activation and infiltration of neutrophils exacerbate pathogenesis. Since we have previously reported that leukotriene B4 promoted them, we focused on lipid metabolism in this research. Intracerebral hemorrhage model mice received treatment with 12/15-lipoxygenase inhibitor or monoacylglycerol lipase inhibitor, but there were no changes to the pathological progression. These data suggest that contribution of lipid metabolism is small in acute phases of disease progression in intracerebral hemorrhage. On the other hand, we focused on lipoxin A4, an arachidonic acid metabolite that exerts anti-inflammatory effects. BML-111, a receptor agonist of lipoxin A4, improved motor dysfunctions after intracerebral hemorrhage. This result suggests that functional modification of anti-inflammation signaling may be effective.

研究分野：薬理学

キーワード：脳内出血 ミクログリア 好中球 lipoxin A4

## 1. 研究開始当初の背景

脳卒中(脳梗塞、脳内出血、くも膜下出血)のうち、脳内出血は血管壁が破れることにより脳実質内に血液が漏れ出す疾患であり、重篤な予後不良を示す。血液成分が漏出することにより脳組織傷害が惹起されるが、これに対して有効な治療法は現在のところ存在しない。研究代表者らの成果により、脳実質内へ浸潤する好中球が病態増悪に関わること、好中球の浸潤を促進する因子としてロイコトリエン B<sub>4</sub> (leukotriene B<sub>4</sub>: LTB<sub>4</sub>) が重要な役割を果たすことを報告してきた(Hijioka *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2017)。この中で LTB<sub>4</sub> 受容体欠損や遮断薬投与により病態改善作用が得られたものの、LTB<sub>4</sub> 産生の律速酵素を阻害した場合は病態改善作用が小さかった。LTB<sub>4</sub> 産生酵素は他の脂質代謝物の産生にも関わることが報告されているため、脳内出血時の脂質代謝バランスを適切に調節することが病態調節に重要だと考えられたが、どの酵素の活性阻害が病態形成に影響をもたらすか明らかでなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では過去の研究で調べた LTB<sub>4</sub> を含む脂質代謝物の産生を調節する酵素に注目し、それらの阻害薬を脳内出血モデルマウスに投与することで、脳内出血時の治療標的としての有用性を見出すことを目的とした。これまでに脳内出血時の脂質代謝バランスを制御するという観点での研究は稀であることから新たな治療コンセプトを提唱できると考え取り組んだ。

## 3. 研究の方法

(1) コラゲナーゼの投与によって惹起される脳内出血モデルマウスを用いて、脳内出血発症後の脳内における脂質の代謝変動を LC-MS/MS で経時的に調べた。過去の研究でアラキドン酸代謝物についての知見を得たが、本研究ではドコサヘキサエン酸およびエイコサペンタエン酸の代謝物に注視した。

(2) 脳内出血発症後の脳組織傷害に対する脂質代謝酵素の役割を調べるために、12/15-リポキシゲナーゼ (lipoxygenase: LOX) 阻害薬である 6,11-dihydro-[1]benzothiopyrano[4,3-b]indole (PD-146176) および、モノアシルグリセロールリパーゼ (monoacylglycerol lipase: MAGL) 阻害薬である 4-nitrophenyl-4-(dibenzo[d][1,3]dioxol-5-yl(hydroxy)methyl)piperidine-1-carboxylate (JZL184) を脳内出血モデルマウスに投与し、病態形成に変化をもたらすか調べた。

(3) 抗炎症性の脂質代謝物として報告されているリポキシン A<sub>4</sub> (lipoxin A<sub>4</sub>: LXA<sub>4</sub>) に注目し、脳内出血病態に与える作用を調べた。LXA<sub>4</sub> 受容体作動薬である (5S,6R)-Methyl 5,6,7-trihydroxyheptanoate (BML-111) を脳内出血モデルマウスに対して投与し病態改善効果およびメカニズムの探索を行った。

## 4. 研究成果

(1) 脳内出血惹起後に経時的に脳を摘出し(0, 6, 12, 24, 72 時間後) 血腫全体を含む 4 mm 幅の脳組織を LC-MS/MS で解析した結果、ドコサヘキサエン酸の代謝物が増加していることを見出した。これらは 12/15-LOX で代謝されることが報告されている分子であったため、脳内出血時には 12/15-LOX 経路が活性化していることが示唆された。12/15-LOX はドコサヘキサエン酸やエイコサペンタエン酸からレゾルピンやプロテクチン類を、アラキドン酸から LXA<sub>4</sub> を産生する経路を担う酵素である。

(2) LC-MS/MS の結果を受けて、脳内出血時の 12/15-LOX 機能を解析するために、PD-146176 をマウス脳内出血モデルに投与した。PD-146176 を出血惹起 30 分前、および 24、48 時間後に投与し、72 時間後に摘出した脳を解析した結果、ミクログリアの活性化や好中球の浸潤といった脳内の炎症に関わる細胞の動態に変化は与えず、血腫内に残存する神経細胞の数にも変化は与えなかった。一般的に 12/15-LOX により抗炎症性の脂質代謝物が産生されるため、脳内出血時の PD-146176 による 12/15-LOX の阻害は病態を増悪させると予想していたが、変化をもたらさなかったことから、少なくとも脳内出血病態形成初期における抗炎症性の脂質代謝物産生の寄与度は少ないと考えられた。

研究代表者の過去の成果によりアラキドン酸代謝物である LTB<sub>4</sub> が傷害性に働くことを報告してきた。さらに上述の結果で 12/15-LOX 系が動員されているものの、病態生理学的な寄与度が小さいことを考慮して、LTB<sub>4</sub> および LXA<sub>4</sub> の上流であるアラキドン酸の産生を抑制することを試みた。MAGL は 2-アラキドノイルグリセロールからアラキドン酸を生成する酵素であるため、MAGL 阻害により LTB<sub>4</sub> の産生が強力に抑制されると予想した。JZL184 をマウス脳内出血モデ

ルに投与したところ、PD-146176 同様にいずれの評価項目においても変化を示さなかった。上記の結果より、少なくとも本研究で注目した 12/15-LOX および MAGL は脳内出血惹起後 72 時間以内の病態形成には寄与しないことが示唆された。

(3) これまでの結果から、脂質代謝調節が脳内出血初期の病態形成に大きく関与しないことが示唆された。これは生理活性脂質の代謝が複雑に調節されていることに起因するものであると考えた。そこで、脂質代謝ではなく、脂質代謝物そのものの作用を増強することで治療効果が得られるか検証した。これまでに LXA<sub>4</sub> が *in vitro* 条件下で脳内出血病態の形成を抑制し得ること、LXA<sub>4</sub> 受容体作動薬が *in vivo* モデルにおいて病態改善作用を示すかもしれないという結果を得てきた。そこで、LXA<sub>4</sub> 受容体作動薬 BML-111 が脳内出血に対して本当に有効であるか、またそのメカニズムについて調べた。BML-111 (3 mg/kg) を出血惹起 20 分後、および 24、48 時間後に投与、72 時間後までの運動機能障害を経時的に観察した結果、BML-111 は運動機能障害を有意に抑制することを見出した。また、摘出した脳を解析したところ、ミクログリアの活性化をわずかに抑えるという結果が得られた。

総括すると、脳内出血時には 12/15-LOX によって産生される脂質代謝物が増加しているものの、脳内出血病態に対する寄与度は小さいことが示唆された。一方で、LXA<sub>4</sub> 受容体作動薬 BML-111 が奏功したことから、抑制性の生理活性脂質の作用を増強することは有用であることが示唆された。これまで得られた知見を交えて考えると、脳内出血発症後早期には LTB<sub>4</sub> 経路を抑制し、LXA<sub>4</sub> 経路を増強するような治療プロトコルにより、有用な治療効果が得られるかもしれない。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hijioka Masanori, Futokoro Risa, Ohto-Nakanishi Takayo, Nakanishi Hiroki, Katsuki Hiroshi, Kitamura Yoshihisa	4. 巻 85
2. 論文標題 Microglia-released leukotriene B4 promotes neutrophil infiltration and microglial activation following intracerebral hemorrhage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 106678 ~ 106678
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.intimp.2020.106678	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hijioka Masanori, Kitamura Kanori, Yanagisawa Daijiro, Nishimura Kaneyasu, Takata Kazuyuki, Inden Masatoshi, Kitamura Yoshihisa	4. 巻 144
2. 論文標題 Neuroprotective effects of 5-aminolevulinic acid against neurodegeneration in rat models of Parkinson's disease and stroke	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 183 ~ 187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2020.07.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hijioka Masanori, Ikemoto Yusuke, Fukao Kosuke, Inoue Takeshi, Kobayakawa Tatsuki, Nishimura Kaneyasu, Takata Kazuyuki, Agata Kiyokazu, Kitamura Yoshihisa	4. 巻 -
2. 論文標題 MEK/ERK Signaling Regulates Reconstitution of the Dopaminergic Nerve Circuit in the Planarian <i>Dugesia japonica</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-020-03226-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Futokoro Risa, Hijioka Masanori, Arata Moe, Kitamura Yoshihisa	4. 巻 12
2. 論文標題 Lipoxin A4 Receptor Stimulation Attenuates Neuroinflammation in a Mouse Model of Intracerebral Hemorrhage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 162 ~ 162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/brainsci12020162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Futokoro Risa, Hijioka Masanori, Kitamura Yoshihisa
2. 発表標題 Stimulation of LXA4 receptor attenuates pathological changes and ensuing motor dysfunction in intracerebral hemorrhage model mouse
3. 学会等名 第43回 日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 肱岡雅宣
2. 発表標題 ロイコトリエンB4およびその受容体を標的とした脳内出血治療薬の創薬研究
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 肱岡雅宣, 懷理紗, 荒田萌衣, 香月博志, 北村佳久
2. 発表標題 ロイコトリエンB4およびリポキシンA4産生系調節が脳内出血病態に与える作用
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------