

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月13日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790083

研究課題名（和文）

脳梗塞部位にて好中球が発現するプロスタグランジンE合成酵素の役割の解析

研究課題名（英文）

The role of neutrophilic prostaglandin E synthase in stroke injury

研究代表者

松尾 由理（Ikeda-Matsuo Yuri）

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：10306657

研究成果の概要（和文）：

我々はこれまでに膜結合型プロスタグランジンE合成酵素-1（mPGES-1）が脳梗塞障害の増悪因子であることを見出してきた。脳梗塞部位において、浸潤した好中球にて mPGES-1 が強く発現していた。mPGES-1 欠損マウスでは、梗塞障害が軽いだけでなく、梗塞部位での浸潤好中球数が減少した。また、培養好中球細胞にて、走化性と神経毒性は mPGES-1 欠損好中球では、野生型好中球に比べ、減少していた。従って、好中球 mPGES-1 は好中球の梗塞部位への浸潤・集積と、梗塞部位での神経細胞死に寄与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Recently, we have found that microsomal PGE synthase (mPGES)-1 plays a crucial role in ischemic brain injury. mPGES-1 was expressed not only in neurons and microglia, but also in infiltrated neutrophils. Thus, we examined the role of neutrophilic mPGES-1 in exaggeration of brain ischemia. The number of infiltrated neutrophils observed in infarct region of mPGES-1 KO mice was significantly less than that of WT mice. In thioglycollate-induced peritoneal neutrophils, the migrations induced by fMLP and IL-8 in mPGES-1 KO neutrophils were significantly lower than those in WT neutrophils. The neurotoxicity induced by glutamate was enhanced by co-culture with WT neutrophils, but not with mPGES-1 KO neutrophils. These results suggest that neutrophilic mPGES-1 contributes to ischemic brain injury by enhancing neutrophilic migration and neuronal excitotoxicity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：神経生物学・脳虚血

1. 研究開始当初の背景

脳は虚血に極めて脆弱な組織であり、虚血により生じる脳機能障害は深刻な臨床的問

題となっている。より有効な薬物治療のためには、発症後期の脳梗塞巢形成・拡大因子を同定する必要がある。

近年、脳炎症が脳梗塞後期の障害拡大に寄与することが示されつつある研究動向の中で、申請者は脳虚血時に産生される炎症性メディエーターの一つであるプロスタグランジン (PG) E₂ に着目し、特にその合成酵素 (mPGES-1、図 1) が脳梗塞障害増悪因子であることを、世界に先駆けて報告した (*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103(31): 11790-11795, 2006, IF:9.38)。本結果は世界的に注目され、「創薬ターゲットとしての mPGES-1」と題された総説にも 1 章 (脳梗塞の章) に渡り取り上げられた (*Pharmacol Rev.* 59: 207-224, 2007, IF:21.94)。

我々はその後、上流酵素である COX-2 の神経細胞毒性発現に mPGES-1 が必須であること、mPGES-1 の脳梗塞障害増悪には EP₃ 受容体が寄与することも見出している。さらにヒト急性脳梗塞患者についても検討を行い、脳梗塞部位に浸潤した好中球が mPGES-1 を強く発現するという結果を得ている (未発表: 秋田脳研宮田元氏との共同研究)。そこで本研究は、脳梗塞障害における好中球 mPGES-1 の役割を明らかにすることを目的とした。本研究は、好中球 mPGES-1 をターゲットとした新たな脳梗塞治療の基礎となるものと位置づけられる。

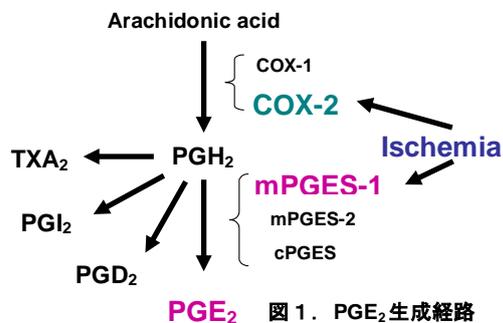


図 1. PGE₂ 生成経路

2. 研究の目的

本研究では、脳梗塞障害拡大機序の解明、及び、有効な治療薬ターゲット分子の同定を最終目標として、好中球が発現する mPGES-1 の脳梗塞障害での役割の解明を試みた。

まず、*in vivo* マウス脳虚血モデルを用い mPGES-1 の発現細胞の同定と好中球浸潤への役割を検討する。次に、*in vitro* 培養脳切片、神経細胞と好中球との共培養により好中球 mPGES-1 の役割とその機序の詳細な解析を行った。さらに、*in vivo* マウス脳虚血モデルにおいて、mPGES-1 欠損型好中球と野生型好中球を骨髄移植し、脳虚血障害に及ぼす影響を検討した。これらの多角的な検討結果は、

好中球 mPGES-1 をターゲットとした新たな脳梗塞治療の基礎となるものと期待される。mPGES-1 は PGE₂ 産生の最終酵素であり、誘導型酵素であるため、副作用の少ない、病態特異的な治療ターゲットとなることと期待される。

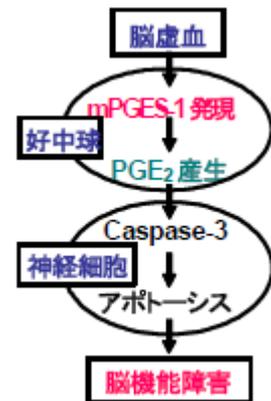
3. 研究の方法

本研究は右に示す作業仮説に基づき、

① 臨床病態に近い *in vivo* 中大脳動脈閉塞-再灌流モデルと、

② 詳細な解析が可能な *in vitro* 培養海馬切片

または培養大脳皮質神経細胞と好中球との共培養系の虚血性刺激モデルを用いて、



脳虚血における好中球 mPGES-1 の発現とその役割を以下方法で解析した。

中大脳動脈閉塞モデル

麻酔下、mPGES-1 欠損型または野生型マウスの中大脳動脈をナイロンフィラメントにて 2 時間閉塞・再灌流し、24 時間後に実験に用いた。

mPGES-1 発現細胞の同定

脳の凍結切片を作成し、好中球の浸潤と mPGES-1 の誘導を、好中球のマーカー蛋白質抗体との二重免疫染色にて共焦点顕微鏡を用いて検出した。

梗塞部位への浸潤好中球の測定

脳の凍結切片を作成し、好中球のマーカー蛋白質抗体にて免疫染色し、陽性細胞数を Scion image (無料解析ソフト) にて計数した。

脳血管透過性亢進の測定

虚血 1 日後に 2% Evans Blue を尾静脈内投与し、その 1 日後に全身還流にて血液を除去した後、脳を摘出し、脳内 Evans Blue 量を吸光度計にて測定した。

梗塞巣の測定

虚血再灌流後の脳を取り出し、2 mm 切片を作成し脳梗塞巣を TTC (2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride) 染色により検出した。得られた染色像より Scion image (無料解析ソフト) にて、梗塞体積、浮腫率を測定した。

行動評価

虚血による行動障害をスコア表により数値化し(0, 正常, 1, 片麻痺, 2, 左右力差, 3, 回転歩行, 4, 無動)、また、1分間の運動量を測定した。

腹腔好中球の培養

マウス腹腔内に4% チオグリコレートを投与し、4時間後に無菌的に腹腔内浸潤細胞を採取した。ギムザ染色による観察から、約97%以上が好中球であることを確認した。

好中球走化性の解析

培養プレート上にケモタキセル(KURABO)を挿入し、その膜状に腹腔好中球を播種した。fMLP、IL-8はケモタキセルの下に添加し、1時間後にセルを取り出し、膜の穴を通過して移動した好中球数を、共焦点レーザー顕微鏡にて撮影後、計数した。

神経細胞—好中球共培養による毒性解析

胎生14日齢のマウス大脳皮質より神経細胞を採取し、poly-lysine コーティングしたカバーガラス上に初代培養した。培養7日後に、腹腔好中球を加えると共に各種薬物を添加し、1日後に細胞を固定し、抗MAP-2抗体、抗PMN抗体にて染色し、生存神経細胞数を計数した。

PGE₂ 産生量測定

脳或いは、培養上清中のPGE₂産生量をEIAキット(Cayman)にて測定した。

mPGES-1 誘導の解析

脳或いは好中球より蛋白質を抽出し、mPGES-1等のタンパク質をWestern blot法にて解析した。

4. 研究成果

I) *In vivo* マウス脳虚血モデルを用いた好中球 mPGES-1 発現の解析

まず始めに、MCAOにより梗塞部位に浸潤した好中球における mPGES-1 の発現を、免疫染色法にて確認した (Fig. 1)。

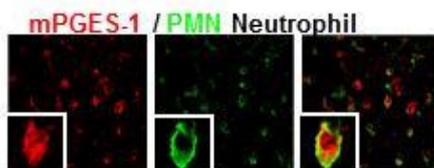


Fig. 1 The mPGES-1 induction occurred in infiltrated neutrophils in the ischemic core region.

この様に、好中球マーカーPMN と mPGES-1 が共染色されたことから、梗塞部位への浸潤好中球が mPGES-1 を発現することが示された。我々は既に秋田脳研との共同研究にて、脳梗塞患者での mPGES-1 発現が主に好中球で認められるという基礎的結果を得ており、本結果と一致している。

II) *In vivo* ラット脳虚血モデルを用いた好中球 mPGES-1 の役割の解析 i

そこで、mPGES-1 の好中球に及ぼす役割を検討するため、mPGES-1 欠損型マウスを用いて検討を行った。抗ミエロペルオキシダーゼ抗体、抗多核球抗体にて好中球を染色し、梗塞部位への浸潤好中球数を、野生型マウスと mPGES-1 欠損型マウスとで比較した。その結果、野生型マウスに比べ、mPGES-1 欠損型マウスでは有意かつ顕著に浸潤好中球数が減少していた (Fig. 2)。また、このときの血管透過性の亢進を梗塞部位への Evans Blue の漏出により検討したところ、mPGES-1 欠損型マウスでは、野生型マウスに比べ、色素の漏出が抑制されていた (Fig. 2)。従って、mPGES-1 は脳虚血後の血液脳関門の崩壊と、それに伴う好中球の浸潤に寄与することが示唆された。

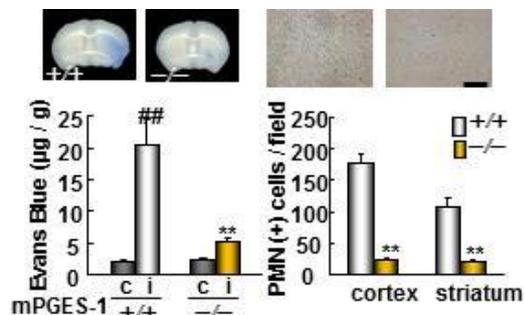


Fig. 2 The damage of BBB at 2 days after ischemia was severe in WT mice compared to mPGES-1 KO mice. The infiltration of neutrophils at 1 day after ischemia was less in mPGES-1 KO mice compared to WT mice in both cortex and striatum. Bar: 100 µm.

III) *In vitro* 培養好中球を用いた好中球走化性への mPGES-1 の役割の解析

そこで、チオグリコレート誘導マウス腹腔好中球を採取し、*in vitro* の系で、好中球における mPGES-1 の役割の解析を行った。野生型マウスでも、mPGES-1 欠損型マウスでも、チオグリコレートによる腹腔内への浸潤好中球数に大きな違いはなかった。チオグリコレート誘導好中球においても mPGES-1 を発現していたが、mPGES-1 欠損マウスでは消失していた。他の PGE₂ 合成系に関わる酵素群の

発現に、両遺伝子型好中球間で大きな違いはなかった。また、培養上清中の各種プロスタノイドを測定したところ、PGE₂量は野生型に比べ、mPGES-1欠損型では顕著に減少していたが、PGI₂ (6-keto PGF_{1α})、TXB₂量は、両遺伝子型好中球間で大きな違いはなかった。そこでこれらの好中球を用いて、遊走活性を検討したところ、野生型マウスに比べmPGES-1欠損型マウスでは、fMLP及びIL-8による好中球遊走活性が有意に低下していた (Fig. 3)。

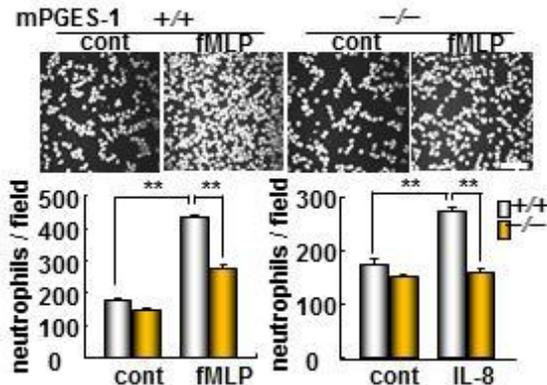


Fig. 3 fMLP and IL-8-induced chemotaxis of neutrophils were reduced by deletion of mPGES-1. Bar: 50 μm.

IV) *In vitro* 培養好中球・神経細胞を用いた mPGES-1 の神経毒性機序の解析

最後に好中球が神経細胞の興奮毒性に及ぼす役割を神経-好中球共培養系にて解析した。海馬切片培養系においては、興奮毒性がmPGES-1欠損型マウスで軽減したが、好中球との共培養は成功しなかった。そこで、分散培養神経細胞を用いて腹腔好中球との共培養を行った。

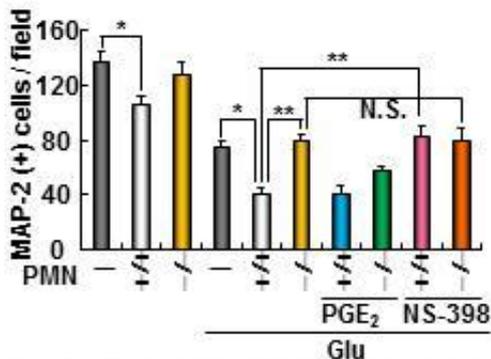
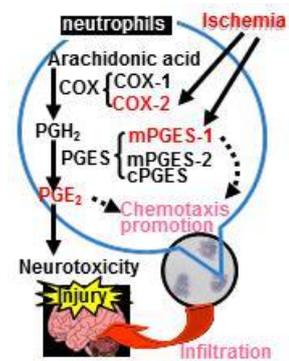


Fig. 4 Glutamate (Glu)-induced neuronal excitotoxicity was enhanced by co-culture with neutrophils from WT, but not mPGES-1 KO. Adding PGE₂ enhanced excitotoxicity in neurons co-culture with neutrophils from mPGES-1 KO, but not WT. Furthermore, NS-398, a COX-2 inhibitor, inhibited WT neutrophils-induced exaggeration of excitotoxicity.

野生型好中球を共培養すると神経細胞の生存が減少したが、mPGES-1欠損型好中球ではこの様な毒性作用は認められなかった (Fig. 4)。さらに、この系でグルタミン酸による興奮毒性を検討したところ、野生型好中球の共培養で認められた毒性は、mPGES-1欠損型好中球では顕著に抑制された。また、野生型好中球による毒性促進作用はCOX-2阻害薬によりmPGES-1欠損型と同程度まで抑制されたのに対し、mPGES-1欠損型好中球ではCOX-2阻害薬の作用は全く見られなかった。さらに、mPGES-1欠損型好中球にPGE₂を添加したところ、野生型と同程度の神経毒性が認められた (Fig. 4)。

本研究より、好中球mPGES-1は脳虚血時の好中球の遊走を活性化し、梗塞部位への浸潤に寄与するだけでなく、PGE₂産生を介して神経細胞死を促進することで、脳虚血障害を増悪する可能性が示唆された。従って、好中球のmPGES-1は脳梗塞治療の有効なターゲットになり得るものと期待される。



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5件)

- ① Ikeda-Matsuo Y, Tanji H, Narumiya S, Sasaki Y. Inhibition of prostaglandin E₂ EP₃ receptors improves stroke injury via anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms. **J. Neuroimmunol.**, 238(1-2):34-43 (2011). 査読有り <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.06.014>
- ② Ikeda-Matsuo Y, Tanji H, Ota A, Hirayama Y, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. Microsomal prostaglandin E synthase-1 contributes to ischaemic excitotoxicity through prostaglandin EP₃ receptors. **Br. J. Pharmacol.**, 160: 847-859 (2010). 査読有り doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00711.x
- ③ Ikeda-Matsuo Y, Hirayama Y, Ota A, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. Microsomal

prostaglandin E synthase-1 and cyclooxygenase-2 are both required for ischaemic excitotoxicity. **Br. J. Pharmacol.**, 159: 1174–1186 (2010) 査読有り
doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00595.x

- ④ 佐々木泰治、松尾由理 病態生理からアプローチした薬物療法：炎症性疾患の病態生理 保険薬剤師さんのための実用情報誌 ファーマシストぶらす, No.10, p.4-9 編集：日経メディカル、発行：第一三共株式会社 2010年9月1日発行 査読無し
- ⑤ Ikeda-Matsuo Y. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is involved in the brain ischemic injury. *Inflammation and Regeneration*, 30(1): 26-33 (2010) 査読無し
http://www.jsir.gr.jp/past_journal/3001/0026-0033.pdf

[学会発表] (計 6 件)

- ① 松尾由理、平山友里、植松智、審良静男、田辺光男、佐々木泰治 脳虚血障害における好中球 mPGES-1 の役割 第 85 回 日本薬理学会年会 (京都) 2012. 3.14 [J. Pharmacol. Sci. vol. 118, Supplement 1, p.149, 2012. 2]
- ② 平山友里、松尾由理、小泉修一 虚血耐性獲得とアストロサイトの活性化—マウス MCAO モデルによる解析— 第 85 回 日本薬理学会年会 (京都) 2012. 3.14 [J. Pharmacol. Sci. vol. 118, Supplement 1, p.149, 2012. 2]
- ③ 松尾由理、内藤康仁、田辺敦弘、佐々木泰治、田辺光男 脳炎症における膜結合型 PGE 合成酵素の役割 第 29 白金シンポジウム (東京) 2012.1.18 (要旨集 p.16)
- ④ Ikeda-Matsuo Y, Kamoi M, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. Microglial induction of microsomal prostaglandin E synthase-1 contributes to dopaminergic neuronal death in the mouse MPTP model of Parkinson's disease. The 29th Naito Conference; Glia World (Kanagawa) 2010. 10. 7 [The 29th Naito Conference on Glia World, p. 101-102, 2010. 9]
- ⑤ 松尾由理、溝口智子、植松智、審良静男、佐々木泰治 膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素の誘導はマウス及びラット

培養中脳神経細胞の 6-ヒドロキシドパミンによるドパミン神経細胞死に寄与する 第 53 回日本神経化学会大会 (Neuro2010, 神戸) 2010. 9. 3 (神経化学 49 (2,3) 2010 合同大会抄録号 p. 668)

- ⑥ Ikeda-Matsuo Y, Tanji H, Hirayama Y, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. Microsomal prostaglandin E synthase-1 and COX-2 are coordinately contribute to ischemic excitotoxicity through EP₃ receptors. *WorldPharma2010 (IUPHAR World Congress of Pharmacology, Copenhagen) 2010. 7. 19* [WorldPharma2010 Final Program, p. 185, 2010. 7]

[その他]
ホームページ等
<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/pharmacology/index.html>

6. 研究組織

- (1)研究代表者
松尾 由理 (Ikeda-Matsuo Yuri)
北里大学・薬学部・講師
研究者番号：10306657
- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
なし