

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 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790827

研究課題名（和文）

脳虚血における分泌型白血球ペプチダーゼ阻害物質(SLPI)の役割

研究課題名（英文）

The role of secretory leukoprotease inhibitor(SLPI) in cerebral ischemia

研究代表者

安部 貴人 (ABE TAKATO)

慶應義塾大学・医学部・講師（非常勤）

研究者番号：30365233

研究成果の概要（和文）:

まず In vitro において、脳虚血時に脳内のグルコース代謝動態がどのように変化するか検討した。低酸素負荷はアストログリアにおいて Bip 発現を誘導せず Nrf2 核移行と pentose phosphate pathway の活性化を惹起することが明らかとなった。さらに、アストログリア、ニューロンの虚血再灌流傷害に対する secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) の効果を検討した。アストログリアでは低酸素/無グルコース負荷中に SLPI を添加しても cell viability に変化を認めなかったが、ニューロンでは SLPI の添加により Alamar Blue (AB) 還元の上昇を認めた。脳虚血時の SLPI に対する反応はニューロンとアストログリアで異なる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）:

First, we investigated glucose metabolism in astroglia during hypoxia. Hypoxia without glucoprivation induced pentose phosphate pathway (PPP) activation in astroglia. PPP activation by hypoxia was accompanied by Nrf2 translocation to the nucleus but not by Bip expression in the ER. Next, we investigated the effects of secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) on the cell damage during ischemic-reperfusion injury. Alamar Blue reduction increased by SLPI during oxygen glucose deprivation in neurons, while SLPI did not affect astroglial cell viability. The effects of SLPI in cerebral ischemia might be different between astrocytes and neurons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：脳虚血、アストロサイト、分泌型白血球ペプチダーゼ阻害物質

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は我が国では依然として死因の第三位にランクされ、生前においても多くの患者に運動障害や痴呆などの後遺症をのこし、医療費全体に占める割合も大きい。そのためその正確な病態解明と治療法の開発は現代

医療の急務といえる。

近年、脳血管障害発症後、数時間という超急性期に血栓を除去し再灌流することにより、虚血傷害を軽減しようという治療法(血栓溶解術、血管内脳外科手術)が行われている。しかし再灌流が得られたことによりむしろ

炎症(post ischemic inflammation)が惹起され、虚血/再灌流障害(ischemia/reperfusion injury)が生じる可能性が指摘されており、脳梗塞病巣の増悪過程における炎症性シグナルの重要性が注目されている。

そして、therapeutic time window の観点からも、これらの炎症シグナルは脳梗塞において良い治療標的となると考えられている。しかし、NF- κ B 活性を効率的に制御し、post ischemic inflammation を抑制する治療法はまだ開発されていない。

2. 研究の目的

分泌型白血球ペプチダーゼ阻害物質(secretory leukoprotease inhibitor: SLPI)は約 12kD のセリンプロテアーゼで、気道のほか、子宮頸管、精囊、唾液腺などで局所的に生産・分泌され、炎症時に放出される好中球エラスターゼの活性を制御する。近年の報告では、SLPI は単なるセリンプロテアーゼ以上の機能を持ち、マクロファージ、好中球、B cell 等による炎症反応を抑制するといわれている。さらに、マウス肝阻血再灌流モデルにおいて、SLPI の投与により、NF- κ B の活性化、好中球集積が抑制され、肝障害が軽減されたとの報告がある(G.I. Research 12, 4, 92-93, 2004)。SLPI はMCAOモデルにおいて、24あるいは72時間後の虚血境界部に主としてアストロサイトに発現する事が報告されている(Molecular pharmacology 64, 4 833-840)。アストロサイトはニューロン(シナプス)と微小血管の間で両者を橋渡しするように存在し、シナプス形成の促進、血液脳関門の形成、神経栄養因子の産生などニューロンをサポートするさまざまな役割を果たしている。脳虚血時にも、アストロサイトが SLPI 放出によりこの post ischemic inflammation を抑制し、神経保護的に働いている可能性が十分に考えられる。

本研究では、マウス脳虚血モデルにて SLPI の NF- κ B 活性、炎症性サイトカイン発現に対する効果を検討し、新たな脳梗塞治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1)細胞外グルコース濃度と細胞内グルコース代謝の関係

まず、invitro脳虚血モデルにおいて正常脳細胞、脳組織がどのような影響をうけるかについての基礎実験を行った。培養液中のグルコース濃度の変化がSDラットの新生仔大脳皮質由来アストログリア、E16ラット皮質線状体由来ニューロンのエネルギー代謝に与える影響を検討した。SDラット新生仔大脳皮質由来のアストログリアを22 mMグルコース含有DMEM(10%FBS)にて初代培養し約10

日後に継代、培地グルコース濃度を5、22 mMとし、さらに約2週間培養の後アッセイに供した。一部の細胞については急性グルコース濃度変化の影響をみるためアッセイ24時間前に培地グルコース濃度を5、22 mMとした。

oxidative metabolism 評価のため [14 C] lactate (L) を含む 2 mM 乳酸/重炭酸緩衝液中、 [14 C] acetate (A) を含む 2 mM 酢酸 Na/重炭酸緩衝液中で放出された 14 CO $_2$ 量を測定した。

(2)低酸素負荷がアストログリアにおける ROS 産生と細胞内グルコース代謝に与える影響

SDラットの新生仔大脳皮質よりアストログリアを調整し、培養21日目に低O $_2$ /無Glc負荷後のpentose phosphate pathway (PPP) 活性 [1 14 C]および[6 14 C]Glcの代謝差、ROS産生率(H2DCFDAの蛍光強度)を測定した。ERストレスはBip発現、Nrf2核移行について免疫組織学的に検討した。低O $_2$ チャンバー(1%O $_2$, 7%CO $_2$)内の培養メディウムPO $_2$ は、3h後に140から約50Torrまで低下、12h、24h後にPPP、ROSアッセイ、免疫染色を行った。1)sham群、2)24h低O $_2$ (12.5mM Glc)群、3)12h低O $_2$ (12.5mM Glc)群、4)12h低O $_2$ (12.5mM Glc)+12h正常O $_2$ (12.5mM Glc)群、5)12h低O $_2$ (0mM Glc)+12h正常O $_2$ (12.5mM Glc)群において、各々、n=4のフラスコあるいはウェルにて検討した。

(3)マウス中大脳動脈閉塞再灌流モデルの in vivo 脳微小循環動態

次に、脳虚血再灌流障害時の微小循環動態の変化を in vivo にて検討した。イソフルレン麻酔下、C57BL/6Jマウス(n=10)の頭部を定位固定装置に固定し、左頭頂側頭葉上に頭窓を作成(JCBFM 25: 858-867, 2005.)、硬膜は留置した。尾静脈にカテーテルを挿入し、FITCラベル赤血球を全身投与後、約50 μ mの深さにおける頭窓を通した脳局所微小循環を蛍光生体顕微鏡(30 frames/s)を用いて観察、ビデオカメラに連続記録した。Laser Doppler flowmeterにより脳表CBFをモニターしながらSuture法により30分MCAを閉塞、その後再灌流し in vivo 脳微小循環動態を観察した。

(4)虚血再灌流傷害に対する分泌型白血球ペプチダーゼ阻害物質(SLPI)の効果

低酸素/無グルコース負荷中の培養液にSLPIを添加し cell viability に対する効果を検討した。ニューロンについては2時間、アストログリアについては6時間低酸素/無グルコース負荷を行い、その後培養液を通常のメディウムに交換、通常のインキュベーターに静置し再灌流を行った。

再灌流後ニューロンは6時間、アストログリアは24時間後に viability 評価のための Alamar Blue(AB)アッセイを行った。

4. 研究成果

(1)細胞外グルコース濃度と細胞内グルコース代謝の関係

5 および 22 mM グルコース 2 週間培養群 (各 n=8) の $[^{14}\text{C}]$ L 酸化率 (pmol lactate/ μg protein/60 min) は 5 mM 群 4.79 ± 0.41 (mean \pm SD, n=4) と、22 mM 群 2.34 ± 0.52 (n=4) に比して有意 ($p < 0.001$) に高値であった (表 1)。また、 $[^{14}\text{C}]$ A の酸化率はアストログリアでは 5 mM 培養群において 22 mM 培養群に比して有意に高値であったが、ニューロンにおいては両培養群間で有意差は認めなかった (図 1)。アッセイ 24 時間前にグルコース濃度を 5 22 mM と変化させた際、 $[^{14}\text{C}]$ L 酸化率は 5 22 mM の高グルコース短期暴露群において 2.89 ± 0.48 (n=4) と、5 5 mM 群の 4.79 ± 0.41 (n=4) に比して有意 ($p < 0.001$) に低値であった (図 2)。上記より、急性、慢性高グルコース環境暴露は、アストログリアの解糖系最終代謝産物である乳酸の酸化代謝を抑制する可能性を示した。

表 1. high - (22 mM) or low - (5 mM) glucose medium で培養したアストログリアとニューロンにおける $[^{14}\text{C}]$ lactate の $^{14}\text{CO}_2$ への酸化率

	High-glucose medium	Low-glucose medium
Astroglia	2.3 ± 0.5^a (n=4)	4.8 ± 0.4 (n=4)
Neurons	10.7 ± 1.6^{bc} (n=4)	12.3 ± 1.5^c (n=4)

Values are the mean \pm SD of number (n) of experiments carried out under the same conditions. ^a $P < 0.01$ vs. astroglia cultured in low-glucose medium (grouped *t*-test). ^bNot significant vs. neurons cultured in low-glucose medium (grouped *t*-test). ^c $P < 0.01$ vs. astroglia cultured in high- or low-glucose medium (grouped *t*-test).

図 1. high - (22 mM) or low - (5 mM) glucose medium で培養したアストログリアとニューロンにおける $[^{14}\text{C}]$ acetate の $^{14}\text{CO}_2$ への酸化率 (* $p < 0.01$)

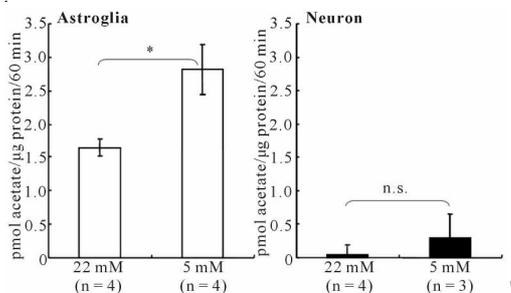
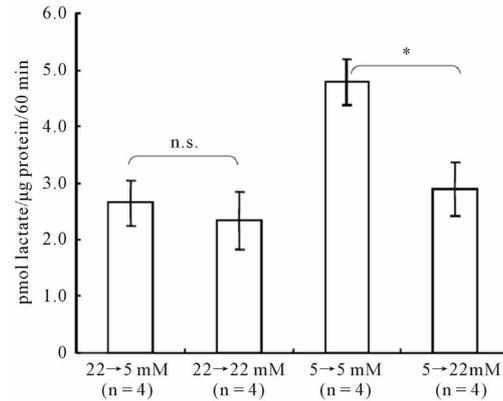


図 2. 急速な細胞外グルコース濃度の変化が $[^{14}\text{C}]$ lactate の $^{14}\text{CO}_2$ への酸化率に与える影響



(2) 低酸素負荷がアストログリアにおける ROS 産生と細胞内グルコース代謝に与える影響

低酸素負荷によりいずれのアストログリアにも有意な形態変化は観察されなかった。PPP 活性は、1) sham 群 100% に比して、2) 177%、3) 126%、4) 125%、5) 98%、ROS 産生率は、1) sham 群 100% に比して、2) 102%、3) 105%、4) 89%、5) 74% であった。いずれも Bip 発現は変化せず、2)3) において Nrf2 の核移行を認めた。低 O₂ 負荷直後の PPP 活性は亢進し、再 O₂ 後 12h 後まで持続、ROS 発生率は sham 群以下に低下した。低 O₂+無 Glc 負荷 / 再 O₂+Glc 後に PPP 活性化は観察されなかった。PO₂ 変化が、Bip 発現を誘導せず Nrf2 核移行と PPP 活性化を惹起したことは、脳虚血再灌流時には高 Glc 環境とは異なる PPP 活性制御メカニズムが存在する可能性を示唆した。

(3) マウス中大脳動脈閉塞再灌流モデルの in vivo 脳微小循環動態の検討

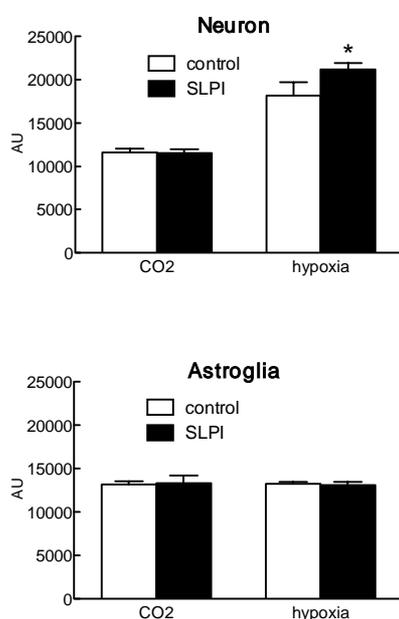
脳虚血前、FITC ラベル赤血球が微小血管内を一定方向に流れている様子が明瞭に観察された。MCA 閉塞直後には血管内を流れる赤血球の数が著明に減少し、しばしば血管内で停滞し、前大脳動脈からの逆流も認めた。総頸動脈における結さつの解除により一部順向性の血流が回復し、さらに suture の解除によりほぼ完全な血流の再開通が確認された。その翌日には、脳血流はやや減少し、再還流障害が示唆された。

(4) 虚血再灌流傷害に対する分泌型白血球ペプチダーゼ阻害物質 (SLPI) の効果

アストログリアでは低酸素 / 無グルコース負荷中に SLPI を添加しても cell viability に変化を認めなかったが、ニューロンでは SLPI の添加により有意に AB 還元の上昇を認めた ($p < 0.05$)。脳虚血時の SLPI に対する反応は二

ニューロンとアストロサイトで異なる可能性が示唆された(図3)。

図3 . 培養ニューロン、アストロサイトにおける虚血再灌流傷害に対する SLPI の効果 (*p<0.05)



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1件)

Takahashi S, Abe T, Izawa Y, Suzuki Y. Effects of fluctuating glucose concentrations on oxidative metabolism of glucose in cultured neurons and astroglia. Journal of Diabetes Mellitus. 査読有, 2, 2012, 19-26.

〔学会発表〕(計5件)

Takahashi S, Izawa Y, Abe T, Suzuki N. Necessity of glucose for the activation of pentose phosphate pathway in astroglia under hypoxic conditions. Neuroscience Meeting 2011, Nov 12, 2011 Washington DC, USA

伊澤良兼、高橋慎一、安部貴人、鈴木則宏 . P02 変化に伴う培養アストログリアのペントースリン酸経路活性調節と脳虚血再灌流障害に対する神経保護機構. 第36回脳卒中学会、2011年7月30日、京都府

富田裕、安部貴人、畝川美悠紀、鳥海春樹、正本和人、菅野巖、鈴木則宏 . マウス中大脳

動脈・永久閉塞モデルと虚血再灌流モデルの in vivo 脳微小循環動態の比較. 第22回日本脳循環代謝学会総会、2010年11月27日、大阪府

Tomita Y, Abe T, Unekawa M, Toriumi H, Masamoto K, Kanno I, Suzuki N. In vivo visualization of mouse cerebral microcirculation during middle cerebral artery occlusion induced by the suture method. 7th World Stroke Congress October 14th, 2010 Seoul, Korea.

Tomita Y, Abe T, Unekawa M, Toriumi H, Masamoto K, Kanno I, Suzuki N. Long-term in vivo investigation of mouse cerebral microcirculation after middle cerebral artery ischemia-reperfusion induced by the suture method. 9th World congress for microcirculation. September 28th, 2010, Paris, France

〔図書〕(計0件)

〔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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安部貴人 (ABE TAKATO)
慶應義塾大学・医学部・講師(非常勤)
研究者番号: 30365233