

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 4 月 5 日現在

機関番号：23903  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22790993  
 研究課題名（和文）インフルエンザ脳症発症時にグリア細胞の機能異常が脳障害増悪に及ぼす影響  
 研究課題名（英文）Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced phagocytosis through nitric oxide production in cultured microglia  
 研究代表者  
 垣田 博樹（KAKITA HIROKI）  
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
 研究者番号：40528949

研究成果の概要（和文）：ジクロフェナックナトリウムと炎症性サイトカインの同時刺激がミクログリアにおいて iNOS mRNA、iNOS タンパクの発現をサイトカイン単独刺激に比べてさらに強く誘導することを見出した。この iNOS の誘導は NF-κB のシグナルを介して起こり、さらに誘導された iNOS により、ミクログリアが活性化し、その貪食能が増強することを見出した。

研究成果の概要（英文）：this study demonstrates that iNOS and NO are induced in microglia cultures by proinflammatory cytokines. The addition of DCF further augments NO production. This effect is mediated via NF-κB signaling and induced microglia activity and phagocytosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
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：小児科学・小児神経学

キーワード：インフルエンザ脳症、グリア細胞、ジクロフェナック、一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ脳症は5歳以下の小児において重篤な神経学的後遺症を残し、死亡率は27-44%と極めて予後不良の疾患群である。インフルエンザ脳症の発症メカニズムとしてはウイルスの直接浸潤ではなく、血中サイトカインの異常増加、いわゆる「サイトカイン

ストーム」が中心的役割を担っていると考えられている。しかし「サイトカインストーム」がどのように神経細胞障害を引き起こすのかは、解明されていない。「サイトカインストーム」によるインフルエンザ脳症の発症、増悪には以下の可能性が指摘できる。(1) 「サイトカインストーム」による神経細胞の直接障害関与、(2) 「サイトカインストーム」

に伴う血液脳関門の破たん、(3)炎症に誘導され高濃度で細胞毒性を呈する窒素化合物 (NOx) の関与、(4) 神経細胞の興奮性を制御するアストロサイトの機能障害、(5) ミクログリアの異常活性による神経細胞障害、(6) ジクロフェナック (DCF) に代表される解熱鎮痛剤の関与。しかしながらそれぞれの可能性がどの程度関与しているかについては、ほとんど分かっていない。発症機序、治療法、さらに他の解熱鎮痛剤の影響についてはまだ十分に解明されていない。

インフルエンザ脳症で亡くなった剖検例では脳内でグリア細胞が異常に増殖していることから、申請者らはこれまでインフルエンザ脳症発症メカニズムにおけるグリア細胞の役割に注目して、解析を行ってきた。DCF と炎症性サイトカインの同時刺激をラットの培養アストロサイトに対して行うと、サイトカイン単独刺激に比べて誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の mRNA、タンパクの発現を誘導し、その結果、NOx 産生を増強し、細胞障害を引き起こすことを明らかにした。さらにそれらの作用は NF $\kappa$ B を介した細胞内シグナルが関与していることを明らかにし、インフルエンザ脳症増悪の *in vitro* のモデルとして解析を進めてきた

## 2. 研究の目的

インフルエンザ脳症における脳障害メカニズムを解明するために、神経細胞を取り巻く微小環境の維持および神経伝達の調節に関与するグリア細胞の機能異常が病態に与える影響に注目し、細胞培養および疑似ウイルス感染モデルラットを用いて機序を明らかにすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

(1) ミクログリアにおける NOx、iNOS の発現  
ラットのミクログリアを用いジクロフェ

ナックナトリウムと炎症性サイトカインの同時刺激が NOx、iNOS の産生を増強し細胞障害を引き起こすか否かを確認する。NOx の測定は Griess 反応を用いて培養液中の NOx 量を測定する。iNOS 発現については、mRNA の発現を定量的 RT-PCR によって検討し、タンパク発現をウェスタンブロットおよび細胞染色を用いて検討する。細胞障害性については DAPI 染色による核の断片化や凝集化の有無によって検出するとともに、LDH 放出による細胞障害性の評価も行う。

## (2) アクアポリンの発現

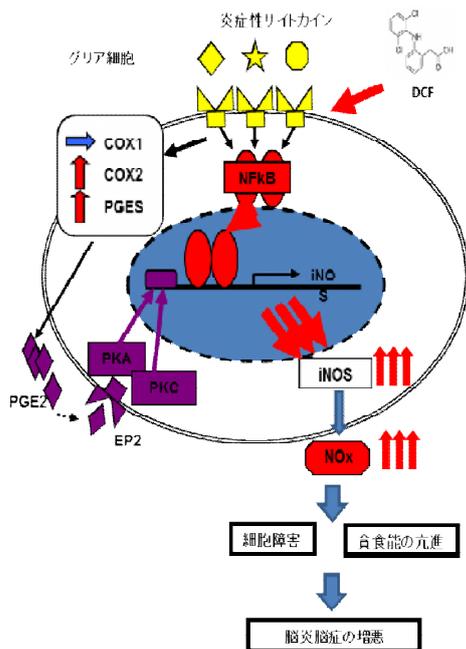
アストロサイトでは主にアクアポリン 4 の発現がみられ、血液脳関門の維持および脳損傷時における脳浮腫の進展に関与していることが知られている。アストロサイト、ミクログリアの培養系でジクロフェナックナトリウムと炎症性サイトカインがアクアポリン 4 の発現に与える影響について、遺伝子、蛋白レベルで検討する。mRNA の発現を定量的 RT-PCR によって検討する。タンパク発現をウェスタンブロットおよび細胞染色を用いて検討する。特にウェスタンブロットではリン酸化した活性化アクアポリン 4 の存在を確認し、細胞染色においてはタンパクの細胞内局在も明らかにすることを計画している。発現変化したアクアポリン 4 によって実際、水の流入および流出にどのような影響があるのか、細胞体の腫脹の有無について検討する。

## 4. 研究成果

(1) 哺乳 1 日齢のラットのアストロサイトを使用しジクロフェナックナトリウムと炎症性サイトカインの同時刺激がアクアポリン 4 の mRNA、タンパクの発現を誘導することを見出した。またこれらのアクアポリン 4 の発現誘導は主に NF $\kappa$ B のシグナルを介しておこることを明らかにした。またアクアポリン 4 の

発現上昇に伴い、アストロサイトの形態変化が起こることを明らかにした。このアクアポリン4の発現誘導がインフルエンザ脳症の病態増悪因子である脳浮腫に関係があることが示唆された。

(2) 哺乳1日齢のラットから培養したミクログリアを使用し、アストロサイトと同様にジクロフェナクナトリウムと炎症性サイトカインの同時刺激が、iNOS mRNA、iNOSタンパクの発現を誘導することを見出した。さらに誘導された iNOS により、ミクログリアが活性化し、その食能が増強することを見出した。このミクログリアの活性化はイブプロフェンやインドメタシンなどの他の解熱鎮痛剤ではみられなかった。またこれらの iNOS mRNA、iNOS タンパクの発現誘導は NF $\kappa$ B のシグナルを介しておこなうことを明らかにした。インフルエンザ脳症患者へのジクロフェナクナトリウムがその死亡率を上げることは、これまでに報告されているが、その理由については明らかになっていない。本研究により、現在もなお予後不良疾患であるインフルエンザ脳症の病因、治療法の開発に貢献できるものとする。



## 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 2 件)

- ① Yamada Y, Yoshida F, Hemmi H, Ito M, Kakita H, Yoshikawa T, Hishida M, Iguchi T, Seo T, Nakanishi K. Atypical social development in NICU survivors at 12 months. *Pediatr Int.* in press (査読あり)
- ② Kato S, Aoyama M, Kakita H, Hida H, Kato I, Ito T, Goto T, Hussein M, Sawamoto K, Togari H, Asai K., Endogenous erythropoietin from astrocyte protects the oligodendrocyte precursor cell against hypoxic and reoxygenation injury. *J Neurosci Res.* 2011;89:1566-74 (査読あり)  
DOI: 10.1002/jnr.22702

[学会発表] (計 1 件)

- ① 垣田博樹, 他. アストロサイト由来エリスロポエチンがオリゴデンドロサイト前駆細胞に与える影響. 第 47 回日本周産期新生児学会, 2011 年 7 月 10~12 日, 札幌コンベンションセンター

[その他]

ホームページ等

[www.med.nagoya-cu.ac.jp/w3med/research/reports/results/002.html](http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/w3med/research/reports/results/002.html)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

垣田 博樹 (KAKITA HIROKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 40528949

(2) 研究分担者 該当者なし

(3) 連携研究者 該当者なし