

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580408

研究課題名(和文) アストロサイト膨潤の分子基盤に基づいた新規脳浮腫治療薬の開発

研究課題名(英文) Exploring a novel therapeutic agent for the treatment of brain edema based on the function of astrocytes

研究代表者

森山 光章 (Moriyama, Mitsuaki)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：20275283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：脳浮腫は肝性脳症や頭部外傷時にみられ、アストロサイトが膨潤することにより生じる。我々はアストロサイト内への水の流入に関わるイオントランスポーターに着目し、その活性化阻害薬の効果について検討した。浮腫誘発要因である細胞外高アンモニア時にはMAPキナーゼ活性が増加し、Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体1(NKCC1)活性が上昇してアストロサイトが膨潤する。MAPキナーゼ阻害薬や抗酸化剤の同時添加はNKCC1活性化を阻害しアストロサイトの膨潤を抑制したことから、これら薬物が新規脳浮腫治療薬として有用であることを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Cerebral edema is an important complication of hepatic encephalopathy and traumatic brain injury and astrocyte swelling appears to be primarily responsible for the edema. We investigated the effects of inhibitors of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1 (NKCC1), an ion transporter responsible for cell volume regulation, on astrocyte swelling. Ammonia induced MAP kinase activation and increased NKCC1 activity, which resulted in astrocyte swelling. Inhibition of this activity by MAP kinase inhibitors or anti-oxidant diminished ammonia-induced astrocyte swelling. Our results in the present study suggest that MAP kinase inhibitor and anti-oxidant may be effective therapeutic agents for brain edema.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：アンモニア 浮腫 肝性脳症 アストロサイト 生理学 神経化学

1. 研究開始当初の背景

(1)脳浮腫とは「脳内の水分含量の正味の増加」を意味し、脳腫瘍、外傷、水頭症、感染症、脳虚血など頭蓋内の病変により、また、門脈大静脈シャントや肝機能障害など頭蓋外の病変に起因する。ひとたび浮腫が生じると、頭蓋内圧が亢進し脳ヘルニアが形成され、これにより嘔吐、痙攣、意識障害や麻痺など様々な症状が引き起こされて最終的に生体は死に至る。近年、人および動物の寿命が延びるなか、その症例数は増加の一途をたどっており、脳浮腫の発生を阻止または軽減させることが治療にとって重要である。

(2)現在まで行われている脳浮腫の薬物治療にはもっぱらグリセロールやマンニトールなどの高浸透圧薬が使用されてきた。これらの薬物は生体内で代謝されず細胞外液にのみ分布し、浸透圧により細胞内に貯留した水を減少させる。その性質上、大量投与が必要であり、またその浮腫抑制効果も十分とは言えない。さらに高 Na 血漿、低 K 血漿、溶血、心不全などの副作用をおこす恐れがある。そのため末梢組織での体液バランスには影響を与えないような新たな薬物の開発が望まれている。

(3)脳浮腫は細胞内水分が増加する cytotoxic edema と血液-脳関門が物理的に破綻し血管内から血漿成分等が流出することにより起こる vasogenic edema に分類される。浮腫の原因についての解明はこれまで充分ではなかったが、近年、oxidative stress の関与が注目されており、種々の浮腫モデルにおいてフリーラジカル産生が増加することが報告されている。我々はアストロサイト膨潤機構を解明する過程で、oxidative stress を誘発する過酸化水素(H₂O₂)の影響を検討したところ、H₂O₂ 添加後の細胞膨潤に呼応して細胞内への水の流入に関わるイオントランスポーターである Na⁺-K⁺-2Cl⁻ 共輸送体 (NKCC)活性が増加することを見いだした。このことから、NKCC 阻害剤の浮腫治療薬としての可能性が示唆された。

(4)Zinc はグルタミン酸作動性神経のシナプス小胞に存在する。浮腫などの中枢の病態時にはグルタミン酸と共に放出された zinc が細胞内に輸送され、oxidative stress 反応に関与する可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

(1)浮腫発生に関わる因子の阻害薬や抗酸化剤は新しい脳浮腫治療薬となりうるのかを、2通りのアストロサイト膨潤モデル(細胞外高アンモニアおよび fluid percussion による頭部外傷性脳損傷 (traumatic brain injury: TBI))を用いて検証することが目的である。

(2)浮腫などの中枢内の病態時に見られる細胞外高 zinc がアストロサイトの機能変化に与える影響を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1)アストロサイトの初代培養細胞は胎齢 20 日齢の Wistar ラット胎仔から調製した。CO₂ インキュベーター内で 3 週間培養後、実験に用いた。

(2)細胞外高アンモニアモデルアストロサイトの作成は、上記(1)で調製したものに NH₄Cl (5 mM)を処置することにより作成した。添加後、種々の時間に細胞を回収し、NKCC 活性、MAP kinase 発現の変化を測定した。さらに種々の阻害剤や抗酸化剤の影響を検討した。

(3)TBI モデルアストロサイトの作成は、上記(1)で調製したものに 5 atom の打撃を細胞に 2 回加える液体打撃法 (fluid percussion injury: FPI) により作成した。FPI 処置後、種々の時間に細胞を回収し、NKCC 活性、MAP kinase 発現の変化を測定した。

(4)肝性脳症モデルラットは雄 Wistar ラット (adult) にチオアセトアミド (TAA) を 300 mg/kg 体重、3 日間腹腔内投与し急性肝障害を誘発することにより作出した。

(5)上記(1)で調製したアストロサイトに LPS (0.1 ng-10 mg/ml)を添加し活性化させた。Zinc (125 μM)存在下での一酸化窒素 (NO)産生を定量し、炎症の指標とした。

4. 研究成果

(1)細胞外高アンモニア(cytotoxic edema)モデルを用いた細胞膨潤時のポリウム調節タンパクの活性および発現変化:アンモニア添加によるアストロサイト膨潤時には NKCC1 活性が増加し、この変化にはタンパクの発現増加が伴っていた。アンモニアにより生じた oxidative/nitrosative stress によりタンパクが修飾を受け、活性化することが明らかとなった。これらの変化は、MAP キナーゼの阻害剤、抗酸化剤であるカタラーゼ、NO 合成阻害剤である L-NAME やパーオキシナイトライト除去剤である尿酸の処置により抑制され、これらの薬物処置はアンモニアによる細胞膨潤も抑制した。これらの結果から、cytotoxic edema による細胞膨潤時には、ポリウム調節タンパクである NKCC1 が活性化すること、さらに、このタンパクの活性化を抑制すると細胞膨潤も抑制しうる可能性が示唆された。

(2)肝性脳症モデルラットを用いた細胞膨潤時のポリウム調節タンパクの活性および発現変化:肝性脳症モデルラットを作成し、生じる脳浮腫に対して各種阻害剤や抗酸化

剤が抑制効果をもつか検討した。作出したモデルである TAA ラットは高アンモニア血症と神経症状を呈し、肝性脳症モデルとして広く用いられている。TAA ラット脳の浮腫の程度を gravity method を用いて調べたところ、増大が認められ、このとき大脳皮質の NKCC1 タンパク発現および活性は、どちらも増加していた。これらの変化は、NKCC 阻害剤である bumetanide の前投与により抑制され、この薬物処置は TAA による脳浮腫も抑制した。これらの結果から、in vitro 実験から得られた結果より想定される細胞膨潤の発生機序が in vivo でも同様に当てはまることが明らかとなった。すなわち、in vivo 動物においても細胞ボリューム調節タンパクの変化を是正することにより、肝性脳症時に見られる脳浮腫を抑制しうる可能性が示唆された。

(3)TBI (vasogenic edema)モデルを用いた細胞膨潤時のボリューム調節タンパクの活性および発現変化：アストロサイトに TBI 刺激を加えたところ、NKCC1 の発現および活性の増加に伴って細胞の膨潤が認められた。このとき細胞膨潤に至る情報伝達系の一つである MAP kinas である p38-MAPK および JNK の活性化も同時に認められた。これらの結果から、vasogenic edema においても細胞ボリューム調節タンパクの変化を是正することにより、脳浮腫を抑制しうる可能性が示唆された。

(4)LPS 活性化アストロサイトに対する細胞外 zinc の効果：Zinc の添加により LPS 誘導性 NO 産生は有意に増加した(p<0.05, 図1)。

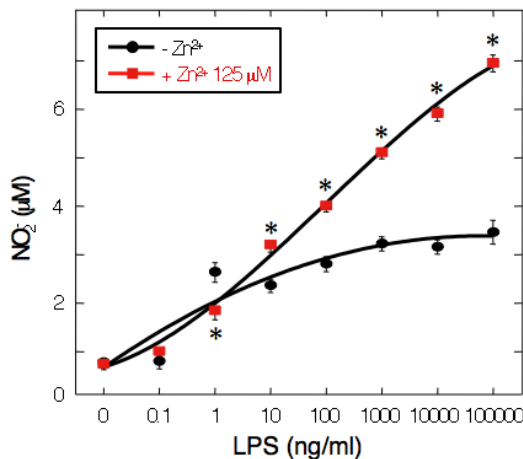


図1 LPS 誘導性 NO 産生に対する zinc の効果

この条件下で MAP kinas 活性を測定したところ Erk、JNK、p38 MAP kinase とも活性化が認められた。各種 MAP kinase 阻害剤の同時添加により NO 産生の増加は認められなくなったことから、アストロサイト活性化には MAP kinase シグナリングが関与している可能性が示唆された。

(5)研究成果の意義：2つの浮腫モデルを用い、細胞ボリューム調節に関わる NKCC の変化とその活性化阻害剤の影響を検討した今回の実験から、どちらのモデルにおいてもボリューム調節タンパクの活性化を抑制することにより、浮腫そのものを抑制しうる事が明らかとなった。すなわち cytotoxic edema、vasogenic edema のどちらも浮腫発生については共通のシグナルカスケードを介していると推察される。さらに、中枢の炎症時におけるアストロサイトの機能調節には zinc による調節も考慮に入れる必要があると考えられる。

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7件)

Ogawa M, Takano K, Kawabe K, Moriyama M, Ihara H, Nakamura Y. Theophylline potentiates lipopolysaccharide-induced NO production in cultured astrocytes. *Neurochemical Research* 査読有、39: 107-116, 2014. DOI: 10.1007/s11064-013-1195-9.

Motoyoshi-Yamashiro A, Tamura M, Moriyama M, Takano K, Kawabe K, Nakajima H, Katoh-Semba R, Furuichi T, Nakamura Y. Activation of cultured astrocytes by amphotericin B: Stimulation of NO and cytokines production and changes in neurotrophic factors production. *Neurochemistry International* 査読有、62: 93-100, 2013. DOI: 10.1016/j.neuint.2013.05.007.

Takano, K, Tanaka N, Kawabe K, Moriyama M, Nakamura Y. Extracellular superoxide dismutase induced by dopamine in cultures astrocytes. *Neurochemical Research* 査読有、38: 32-41, 2013. DOI: 10.1007/s11064-012-0882-2.

Takano K, Yamasaki H, Kawabe K, Moriyama M, Nakamura Y. Imipramine induces brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in cultured astrocytes. *Journal of Pharmacological Science* 査読有、120: 176-186, 2012. DOI: 10.1254/jphs.12039FP

Iitsuka I, Motoyoshi-Yamashiro A, Moriyama M, Kannan-Hayashi Y, Fujimoto Y, Takano K, Murakami K, Yoneda Y, Nakamura Y. Extracellular superoxide dismutase in cultured astrocytes: Decrease in cell-surface activity and increase in medium activity by lipopolysaccharide-

stimulation. *Neurochemical Research* 査読有、37: 2108-2116, 2012. DOI: 10.1007/s11064-012-0832-z.

Takano K, Sugita K, Moriyama M, Hashida K, Hibino S, Choshi T, Murakami R, Yamada M, Suzuki H, Hori O, Nakamura Y. A dibenzoylmethane derivative protects against hydrogen peroxide-induced cell death and inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in cultured rat astrocytes. *Journal of Neuroscience Research* 査読有、89: 955-965, 2011. DOI: 10.1002/jnr.22617.

Jayakumar AR, Panickar KS, Curtis KM, Tong XY, Moriyama M, Norenberg MD. Na-K-Cl cotransporter-1 in the mechanism of cell swelling in cultured astrocytes after fluid percussion injury. *Journal of Neurochemistry* 査読有、117: 437-448, 2011. DOI: 10.1002/jnr.22617.

〔学会発表〕(計6件)

Moriyama M, Ushikai M, Kuroda E, Inui A, Takano K, Nakamura Y, Saheki T. Increased hepatic glycerol synthesis in citrin deficiency model mouse. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) 2013年11月27日 Tokyo Bay Maihana Hotel Club Resort, Chiba.

Kawabe K, Takano K, Moriyama M, Nakamura Y. Blockade of transglutaminase activity by cystamine suppressed lipopolysaccharide-induced endocytosis in microglia. *Neuro 2013*, 2013年6月20日 Kyoto International Conference Center, Kyoto.

森山光章, 高野桂, 牛飼美晴, 黒田英志, 浅川明弘, 乾明夫, 中村洋一, 佐伯武頼 シトリン欠損症モデルマウスにおける脂肪酸代謝の検討. 第54回日本先天代謝異常学会、2012年11月16日 じゅうろくプラザ, 岐阜.

Kawabe K, Takano K, Moriyama M, Nakamura Y. Nicotine augments the expression of transglutaminase 2 in activated microglia. The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, 2012年9月20日 Kobe International Conference Center, Kobe.

Moriyama M, Ushikai M, Kuroda E, Takano K, Nakamura Y, Kobayashi K, Saheki T. Analysis of hepatic metabolism in CTLN2 model mouse by using perfusion system. The AASPP-International Symposium on Citrin

Deficiency in Matsumoto, 2011年10月6日 Hotel Buena Vista, Matsumoto.

森山光章, 藤塚俊輔, 高野桂, 中村洋一 亜鉛は培養アストロサイトにおける LPS 誘導性一酸化窒素産生を増強する. 第54回日本神経化学学会大会、2011年9月26日 山代温泉瑠璃光 石川.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森山 光章 (MORIYAMA Mitsuaki)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号: 20275283

(2) 研究分担者

中村 洋一 (NAKAMURA Yoichi)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号: 90180413

高野 桂 (TAKANO Katsura)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号: 50453139