

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590113

研究課題名(和文) 脊髄においてグルタミン酸作動性神経伝達の異常を惹起する因子の探索

研究課題名(英文) Study on the glutamate-induced spinal neurodysfunction.

研究代表者

鈴木 岳之 (SUZUKI, Takeshi)

慶應義塾大学・薬学部・准教授

研究者番号：90187740

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)：神経炎症を惹起する細胞として、ミクログリアに焦点を当てた。In vitro条件下でミクログリアを活性化処理し、そこから放出される内因性因子を解析した。その結果、活性化ミクログリアよりグルタミン酸が放出され、神経毒性を示すことを明らかにし、この過程にATPが関与することも示した。このグルタミン酸の放出作用はグルタミン酸トランスポーター機能変動を介する作用であることを明らかにした。また、疾病治療にリンクする知見として、抗うつ薬であるパロキセチンがミクログリアの活性化を抑制する知見を得た。これは、神経疾患に対する新たな治療アプローチを示すもので、今後の薬物治療戦略の確立に貢献できる研究成果である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated mechanisms underlying the dysfunction of glutamate transmission under the inflammatory condition in the spinal cord. We also examined effects of drugs acting on CNS functions. We made in vitro inflammation model using co-culture comprised of astrocytes, microglia and neurons obtained from newborn rat brains. Inflammation decreased glutamate transport by down-regulation of GLAST induced by high-concentration of extracellular glutamate released from activated microglia in this co-culture. Among centrally acting drugs including antidepressants we tested, only paroxetine inhibited the inflammation-induced glutamate release from activated microglia and prevented the decrease in the glutamate transport. We also demonstrated that ATP is one of the factor that made the neural inflammation worse.

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：薬理学 グルタミン酸 情報伝達 神経変性疾患 興奮毒性 神経炎症 ATP

1. 研究開始当初の背景

神経機能の異常、特に運動神経疾患や神経因性疼痛など脊髄レベルで神経機能の異常を生じる疾患は多く見られるが、その原因はほとんど明らかになっていなかった。われわれは神経炎症が神経機能の異常をもたらす原因の一つと考え、それを誘発する、あるいは増悪する因子を解析することが必要であると考えられた。神経炎症の発症過程には不明な点が多く、その中心的な役割を果たす可能性がある細胞であるミクログリアに関して、機能的に不明な点が多く存在している。また、そのような神経機能異常を改善する薬物に関してほとんど知られていなかったことから、その探索も急務であった。

2. 研究の目的

脊髄においてはグルタミン酸が主たる興奮性神経伝達物質として働いている。このグルタミン酸作動性神経伝達が過剰となることにより、機能障害・神経疾患が生じることが明らかとなってきている。本研究においてはこのような疾患を念頭において、脊髄におけるグルタミン酸作動性神経伝達による異常興奮が生じる原因をシナプス前、シナプス後およびシナプス間隙それぞれにおける調節因子異常という観点から検討することとした。そのため、in vitro で神経炎症を再現できるモデル系を確立することが必要である。我々は本研究において、まず有用な in vitro 実験系の確立を行うことを目的とした。そのような実験系確立の後、病態解析を行い、神経炎症発症原因および増悪因子を明らかにする。さらに、そのような異常を改善する候補薬物を探索し、新たな治療戦略を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

神経疾患時の神経炎症を検討するための in vitro 実験系の確立をまず行った。新生児ラットよりニューロン、アストロサイト、ミクログリアをそれぞれ採種し、単独および共培養を行った。

それら培養細胞系にリポポリサッカライド (LPS) を処理することにより、in vitro 実験的炎症系を確立した。

炎症の評価は、ミクログリアの活性化とニューロンの傷害により行った。

また、培養液中に放出されるグルタミン酸の測定および、細胞外グルタミン酸の取り込み測定によるグルタミン酸トランスポーター活性の測定を行った。さらに、グルタミン酸トランスポーターの遺伝子発現の変化を検討した。

神経炎症が生じる際に、各種細胞の形態変化、遺伝子発現の変化、放出される因子の検出などを行った。

また、抗うつ薬を始め各種中枢作用薬の、神

経炎症抑制効果に関して検討した。特に、グルタミン酸トランスポーターへの作用、炎症を増悪させる候補因子の一つである ATP 受容体への作用に関して薬理的に検討を行った。

4. 研究成果

ニューロン、アストロサイト、ミクログリアの共培養および単独培養系を用いた in vitro 条件下で人工的炎症を惹起する細胞培養系を確立し、方法で記述した各種解析を行った。

LPS 処理によりミクログリアの形態変化と、共培養条件下でのニューロンの傷害が観察された。このことから、in vitro 培養条件下で安定した神経炎症を惹起・観察できるモデル系であることが確認された。

ミクログリアの形態変化および遺伝子発現の変化から、LPS 処理によりミクログリアの活性化が生じていることが確認された。

さらに、この状態でグルタミン酸の放出が上昇し、細胞外のグルタミン酸濃度が増大していた。

この細胞外グルタミン酸濃度の上昇にはミクログリアからのグルタミン酸放出が強く関与していた。このグルタミン酸放出はグルタミン酸トランスポーターを介するもので、開口分泌の過程を経たものでは無いことが示唆された。

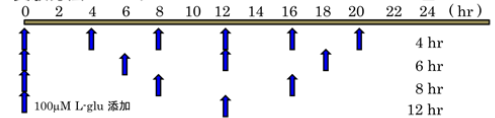
さらに、このような炎症惹起時に、グリアのグルタミン酸トランスポーター機能の低下が見られた。これは、グルタミン酸トランスポーターの遺伝子発現の低下によるものである。

さらに本研究において、細胞外グルタミン酸濃度の上昇がグルタミン酸トランスポーター機能を低下させることを見いだした。これらの結果から、神経炎症時にグルタミン酸の動態が変動し、炎症を増悪させる可能性が示された。(Fig. 1)

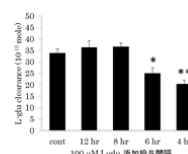
液性因子の関与

L-glu 負荷投与実験 (高濃度 L-glu 暴露実験) L-glu uptake assay

実験方法 (Astrocyte culture)



結果



・ 100 μM L-glu の 4 hr, 8 hr 間隔投与において、L-glu トランスポーターの機能は有意低下した。

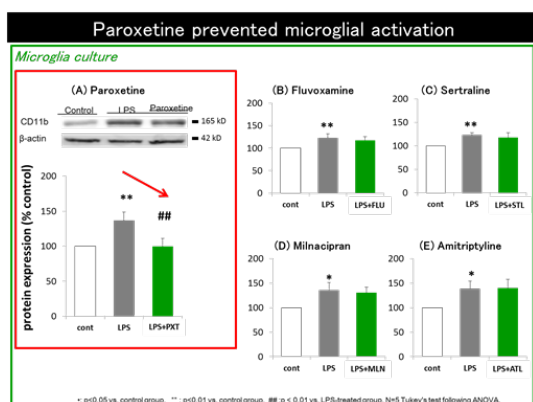
(*: p<0.05, **: p<0.01 vs the control group. N=5, Tukey's test following ANOVA.)

Fig. 1

さらに、ミクログリアなどから炎症時に放出される因子として ATP に注目した。ATP 受容体遮断薬によりミクログリア活性化の抑制が見られたことから、炎症時に細胞外濃度が増大する ATP により、この神経炎症が増悪する可能性を見いだした。さらに薬理的検討により、この ATP の作用は P2X4 受容体を介する可能性があることを明らかにした。

また、検討した各種中枢作用性薬物のうち、抗うつ薬の一つであるパロキセチンのみがこのような神経炎症増悪を抑制した。このパロキセチンの作用はセロトニンとは無関係のものであり、パロキセチンの新たな治療薬としての可能性を提示したものであると考えられる。(Fig. 2)

Fig.2



以上のように、神経炎症に強く関与する内因性因子として、グルタミン酸および ATP を明らかにし、さらに、炎症増悪に関連する機能タンパクとしてのグルタミン酸トランスポーターおよび ATP 受容体の存在も明らかにした。

また、神経疾患の新たな治療薬としてのパロキセチンの可能性を示した。

現在も、パロキセチンの作用機序の解明と、遺伝子導入を行った細胞を用いた神経炎症発症機序の解明の研究を進めている。

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 1 件)

Takaki J, Fujimori K, Miura M, Suzuki T, Sekino Y, Sato K. L-glutamate released from activated microglia downregulates

astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the 'collusion' hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation* doi:10.1186/1742-2094-9-275 (2013) (査読あり)

[学会発表](計 5 件)

笠原由佳, 三浦麻利衣, 最上由香里, 関野祐子, 佐藤薫, 鈴木岳之. 抗うつ薬と P2X4 受容体の相互作用の比較検討. 日本薬学会第 134 回年会 (2014/03 熊本)

Sato K, Fujimori K, Takaki J, Suzuki T, Sekino Y. P2X4 receptor-mediated acceleration of microglial activation is important for the L-glutamate release from activated microglia in the early stage of inflammation. *Neuro2013* (2013/05 京都)

Fujimori K, Takaki J, Sato K, Suzuki T. Paroxetine prevented the activation of microglia by suppressing P2X4 receptor activation. 第 86 回日本薬理学会年会 (2013/03 福岡)

Fujimori K, Takaki J, Sato K, Suzuki T. Paroxetine prevents the functional impairment of L-glutamate transporters in inflammation by modulating microglial glutamate release. 第 35 回日本神経科学大会 (2012/09 名古屋)

Fujimori K, Takaki J, Sato K, Suzuki T. Effect of antidepressants on the functional impairment of L-glu transporters under the inflammatory condition. 第 85 回日本薬理学会年会 (2012/03 京都)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
鈴木 岳之 (SUZUKI, Takeshi)

慶應義塾大学・薬学部・准教授
研究者番号：90187740

(2)研究分担者
郭 伸 (KWAK, Shin)

東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：40160981

佐藤 薫 (SATO, Kaoru)

国立医薬品食品研究所・薬理部・第一室長
研究者番号：10311391

(3)連携研究者
なし

()

研究者番号：