

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790269

研究課題名(和文)活性化マイクログリアにおけるCOX-1の機能に関する検討

研究課題名(英文)The roles of cyclooxygenase-1 in microglial activation

研究代表者

宿里 充穂 (Shukuri, Miho)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・脳病態統合イメージングセンター・流動研究員

研究者番号：20525571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、cyclooxygenase-1(COX-1)の役割を明らかにすることを目的として、脳虚血障害時の神経炎症の過程においてCOX-1がどのように変化するかをPET等のin vivoイメージング技術を活用して解析することとした。また、COX-1とCOX-2の遺伝子改変マウスを用い、神経炎症モデルおよび一過性脳虚血モデルを作製し、それぞれのCOX阻害による影響について検討した。結果、COX-1はマイクログリアの活性化の誘導に関与しており、さらにCOX-1遺伝子欠損マウスにおいては虚血障害が悪化したことから、COX-1はマイクログリアの神経保護的な役割に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previously, we reported that ¹¹C-labeled ketoprofen-methyl ester (KTP-Me), a derivative of COX-1 selective inhibitor, could visualize the activation of microglia in rat model of neuroinflammation. In order to assess the hypothesis that COX-1 may play a crucial role in neuroinflammation, we evaluated the involvement of COX-1 in neuronal damages after transient middle cerebral artery occlusion (t-MCAO) in mice and rats. PET images with [¹¹C]KTP-Me were well correlated with the time-dependent changes of activated microglia in ischemic region after t-MCAO. The studies using COX-1 knockout mice revealed that the deficiency of COX-1 reduced neuroinflammation but exacerbated neurotoxicity induced by t-MCAO. These results raise the possibility that COX-1 may be involved in the neuroprotective functions after focal cerebral ischemia.

研究分野：薬理学一般

科研費の分科・細目：若手研究(B)

キーワード：シクロオキシゲナーゼ PET 神経炎症 神経障害

1. 研究開始当初の背景

炎症メディエーターであるプロスタグランジン(PG)の合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ(COX)は、炎症の発現・調節において重要な役割を担う蛋白である。近年、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患、脳梗塞をはじめとする脳血管障害において、COX 阻害剤による神経保護作用について報告されるなど、治療・診断のターゲットとして高い関心を集めている。しかしながら、神経変性疾患の発症に具体的に COX がどのように関わるかについては未だ詳しく分かっていない。特定分子の機能と局在を *in vivo* で非侵襲的に計測することができる Positron Emission Tomography (PET)を用いた分子イメージング技術は、複雑な生体システムにおける COX の機能や病態メカニズムとの関連を解明する上で有用な技術であると考えられ、これまでも、COX 選択的阻害剤のポジトロン核種標識化に関する研究は国内外の多くの機関で行われていたが、炎症特異的な *in vivo* イメージングに成功した例はなかった。COX のアイソザイムとしては主に、恒常的発現型 COX-1 と誘導的発現型 COX-2 が同定されており、炎症では特に、刺激によって誘導される COX-2 の機能が重要であると考えられてきた。しかし最近、申請者らは、COX-1 選択的阻害剤をリード化合物とする PET プローブ (^{11}C)Ketoprofen-methyl ester; KTP-Me)を用いて脳内炎症の特異的イメージングに成功したことを報告している。また、COX-1 は脳内炎症時に活性化されるマイクログリアに発現することも確認された。

2. 研究の目的

本研究では、神経細胞死の過程で活性化されるマイクログリアにおける COX-1 の寄与を明らかにすることを目的として、脳虚血モデルラット等における脳内 COX-1 の変化について ^{11}C KTP-Me PETによる *in vivo* イメージング解析、ならびに COX-1 阻害による虚血障害の変化について検討することにした。

3. 研究の方法

COX-1, COX-2 の遺伝子欠損によるマイクログリアの活性化への影響

COX-1 遺伝子欠損マウス (COX-1^{-/-})、COX-2 遺伝子欠損マウス (COX-2^{-/-}) およびそれぞれの野生型マウスの脳内・線条体領域に 30G マイクロシリッジを用いてリポポリサッカライド (LPS, 0.5 μg) を微量注入し、脳内炎症モデルを作製した。LPS 注入 1 日後に 4%PFA による灌流固定を行い、摘出脳サンプルから厚さ 20μm の凍結切片を作成し、マイクログリアのマーカである Iba-1 抗体を用いた免疫染色を実施した。

一過性脳虚血ラット脳におけるマイクロ

グリア細胞と COX-1 の変化

中大脳動脈閉塞再灌流による一過性脳虚血障害ラットを作製し、COX-1 イメージング用プローブである ^{11}C KTP-Me による PET イメージングを実施した。また、*ex vivo* オートラジオグラフィ (ARG) 法により脳内局所の ^{11}C KTP-Me 集積についても検討をおこない、TTC 染色で描出される神経細胞死の領域との比較を行った。さらに、凍結脳切片をもちいて、COX-1 発現と活性化マイクログリアのマーカ (OX-42) の免疫染色を実施し、PET 画像と比較することで *in vivo* と *in vitro* の両側面から虚血障害時の脳内 COX-1 の変化について解析を行った。

COX-1 阻害による脳虚血障害への影響

COX-1 遺伝子欠損マウス (COX-1^{-/-}) および COX-2 遺伝子欠損マウス (COX-2^{-/-}) を用いて、一過性脳虚血障害モデルを作製し、障害の程度の違いについて野生型マウスとの比較を行った。

脳虚血障害時に COX-1 が関与するプロスタグランジン合成

マイクログリアに発現する COX-1 が産生するプロスタグランジン(PG)類について考察する目的で、ラット一過性脳虚血障害モデルの凍結脳切片を用いて、PGE 合成酵素および PGD 合成酵素の発現について免疫染色を実施した。

4. 研究成果

COX-1, COX-2 の遺伝子欠損によるマイクログリアの活性化への影響

野生型マウスである COX-1^{+/+} および COX-2^{+/+} では LPS 注入領域において Iba-1 陽性のマイクログリアが反対側の正常領域と比べて増加しており、その形態からこの時のマイクログリアは活性化されていることが確認された。COX-1^{-/-} においても Iba-1 陽性細胞は確認されるものの、COX-1^{+/+} と比べてその活性化の程度は抑制されていることが明らかとなった (図 1)。一方、COX-2^{-/-} においては Iba-1 陽性細胞の量、形態的变化に COX-2^{+/+} と差異がないことが判った。従って、LPS により誘発される脳内炎症モデル動

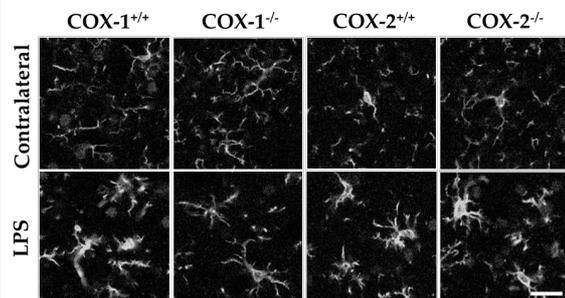


図 1. COX-1, COX-2 遺伝子欠損マウスにおける LPS 線条体内投与 1 日後の Iba-1 陽性活性化マイクログリアの免疫染色結果 Scale=50 μm

物においては、COX-1がマイクログリアの活性化を誘導することに関与している可能性が示唆された。

一過性脳虚血ラット脳におけるマイクログリア細胞とCOX-1の変化
 中大脳動脈閉塞再灌流 3 日後のラットの PET 撮像の結果より、 $[^{11}\text{C}]\text{KTP-Me}$ は TTC 染色により神経細胞死が顕著な梗塞巣コアの部分に高い集積を示すことが判った(図 2)。

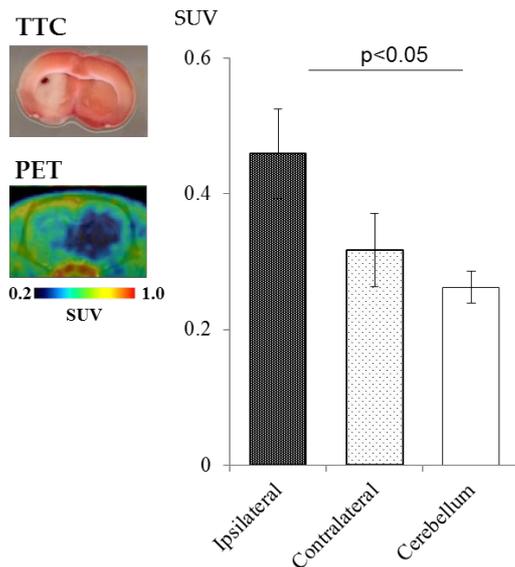


図 2. 一過性脳虚血ラットの $[^{11}\text{C}]\text{KTP-Me}$ PET 撮像結果と定量解析結果(n=3)

さらに、中大脳動脈閉塞再灌流後の経時的な変化を ex vivo ARG 法により観察した結果、5 時間から 1 日後の虚血初期の段階では $[^{11}\text{C}]\text{KTP-Me}$ 集積は梗塞巣の周辺部分に認められた。その後、3 から 7 日後においては梗塞巣の中心部分に集積の分布が変化していることが明らかとなった(図 3)。免疫染色の結果では、 $[^{11}\text{C}]\text{KTP-Me}$ 集積が最も高い値を示す 3 日後において、梗塞巣中心部に OX42 陽性の活性化マイクログリアが顕著に認められ、且つ活性化の変化には COX-1 の発現を伴っていることが確認された。この COX-1 発現活性化マイクログリアの経時的

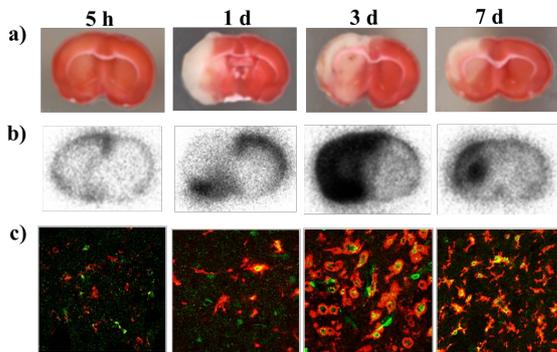


図 3. 中大脳動脈閉塞再灌流後の各時点における TTC 染色(a)、 $[^{11}\text{C}]\text{KTP-Me}$ ex vivo ARG 画像(b)、COX-1(緑)と OX-42(赤)の二重免疫染色像(c)

な脳内分布の変化は、ex vivo ARG 画像で描出された $[^{11}\text{C}]\text{KTP-Me}$ の集積分布の変化とほぼ一致していた。

COX-1 阻害による脳虚血障害への影響

COX-1^{-/-}マウスを用いて中大脳動脈閉塞再灌流による脳虚血モデルを作製し、観察を行った結果、手術 1 日から 3 日後の間に野生型マウスと比べて症状が増大した。サンプルを採取する予定であった 3 日後にはほぼ全ての COX-1^{-/-}マウスが重篤な状態となったため、サンプル採取を中断し、TTC 染色および免疫染色による解析は不可であった。一方、COX-2^{-/-}マウスでは、行動・生理状態ともに野生型マウスと差異は認められず、TTC 染色の結果でも虚血障害の程度に変化を認めなかった。

脳虚血障害時に COX-1 が関与するプロスタグランジン合成

中大脳動脈閉塞再灌流 3 日後のラット脳サンプルを用いて免疫染色を実施した結果、COX-1 を発現するマイクログリアには PGD₂ 合成酵素が共発現しており、一方で PGE 合成酵素の発現は認められなかった(図 4)。この結果から、脳虚血障害時に活性化される COX-1 は PGD₂ の産生に関与する可能性が示唆された。

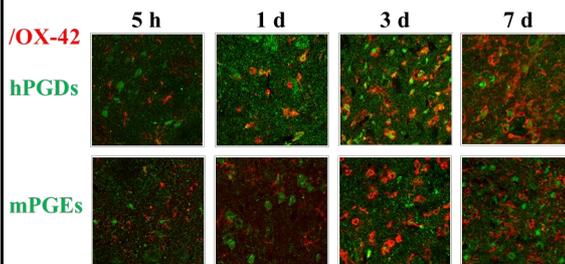


図 4. 一過性脳虚血ラットの梗塞巣における活性化マイクログリア(赤)と PGD₂ 合成酵素または PGE 合成酵素(緑)との二重免疫染色像

以上の結果から、COX-1 はマイクログリアの活性化を誘導することに関与していることが示唆された。また、COX-1 の遺伝子欠損マウスでは脳虚血障害が重篤化したことから、COX-1 が寄与するマイクログリアの活性化は脳虚血障害時には神経保護的な機能に関与する可能性があると考えられた。

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)

- Ohnishi A, Senda M, Yamane T, Sasaki M, Mikami T, Nishio T, Ikari Y, Nishida H, Shukuri M, Takashima T, Mawatari A, Doi H, Watanabe Y, Onoe H. Human whole-body biodistribution and dosimetry of a new PET tracer,

- [¹¹C]ketoprofen methyl ester, for imagings of neuroinflammation. *in press*. 査読あり
doi: 10.1016/j.nucmedbio.2014.04.008.
2. 宿里充穂、尾上浩隆. 神経炎症におけるシクロオキシゲナーゼのPET分子イメージング 医学のあゆみ 248 907-911, 2014 査読なし
 3. 宿里充穂、尾上浩隆. アルツハイマー病の治療薬、イメージング剤としてのNSAIDsの可能性 PET ジャーナル 21 10-12, 2013 査読なし
 4. Ji B, Kumata K, Onoe H, Kaneko H, Zhang MR, Seki C, Ono M, Shukuri M, Tokunaga M, Minamihisamatsu T, Suhara T, Higuchi M. Assessment of radioligands for PET imaging of cyclooxygenase-2 in an ischemic neuronal injury model. *Brain Res.* 1533:152-62, 2013. 査読あり
doi: 10.1016/j.brainres.2013.08.026.
 5. Asakawa T, Sugiyama K, Akamine S, Yokoyama C, Shukuri M, Mizuma H, Tsukada H, Onoe H, Namba H. The food reaching test: a sensitive test of behavioral improvements by deep brain stimulation in MPTP-treated monkey. *Neurosci Res.* 74(2):122-8, 2012. 査読あり
doi: 10.1016/j.neures.2012.07.006.

〔学会発表〕(計5件)

1. Shukuri M., Novel PET probe targeting cyclooxygenase for imaging microglial activation. The 6th CJK Conference on Nuclear Medicine 2013年11月15日~17日 (Haevichi Hotel, Jeju Korea) 招待講演
2. 宿里充穂. 神経炎症の分子イメージング PETサマーセミナー 2013年8月23日~25日 (ホテル日航金沢、石川県) 招待講演
3. 宿里充穂, 高島忠之, 馬渡彩, 山中創, 片山由美子, 川崎章弘, 土居久志, 鈴木正昭, 渡辺恭良, 千田道雄, 尾上浩隆 げっ歯類および霊長類サルを用いた [¹¹C]Ketoprofen-methyl ester の特性評価 第52回日本核医学会学術総会 2012年10月11日~13日 (ロイトン札幌、北海道)
4. 宿里充穂, 馬渡彩, 大野正裕, 高島好聖, 土居久志, 鈴木正昭, 渡辺恭良, 尾上浩隆 脳虚血再灌流モデルにおける [¹¹C]Ketoprofen-methyl ester による COX-1 イメージング 第52回日本核医学会学術総会 2012年10月11日~13日 (ロイトン札幌、北海道)
5. Shukuri M, Takashima T, Takashima-Hirano M, Mawatari A, Yamanaka H, Katayama Y, Doi H, Suzuki M, Watanabe

Y, Onoe H. Evaluation of ¹¹C-ketoprofen-methyl ester as a potent PET probe for cyclooxygenase imaging. 2012年10月27日~31日 (Milano Congressi, Milano Italy)

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宿里 充穂 (SHUKURI MIHO)
独立行政法人国立精神・神経医療研究センター、脳病態統合イメージングセンター、流動研究員
研究者番号: 20525571

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: