

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870677

研究課題名(和文) プロスタグランジン類の生理活性調節による低酸素性虚血性脳症の治療戦略

研究課題名(英文) Treatment strategy for hypoxic-ischemic encephalopathy by regulation of prostaglandins bioactivities

研究代表者

吉川 圭介 (Yoshikawa, Keisuke)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：10435860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素性虚血性脳症(HIE)は興奮毒性誘発神経細胞死により引き起こされる脳障害であり、新生児死亡、脳性麻痺、発達障害の原因となり、これらに有効な治療戦略を開発し小児・新生児を救うことは我々の社会的に重要な使命である。プロスタグランジン(PG)類が興奮毒性により脳内で産生が増加することが知られている。我々は複数存在するPGの中でPGD2およびPGF2alphaが、興奮毒性による神経細胞死に関わることを明らかとした。HIEをはじめとした興奮毒性を介した神経細胞死に対して、PGD2とPGF2alphaの産生抑制が特に神経細胞死の抑制に有効であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Hypoxic-ischemic encephalopathy(HIE) is a brain disorder caused by excitotoxicity induced neuronal death and is responsible for neonatal death, cerebral palsy and developmental disorder. Prostaglandins (PGs) are known to be upregulated in the excitotoxic insulted brain. We demonstrated that PGD2 and PGF2alpha are involved in the excitotoxicity induced neuronal death. An inhibitory treatment of PGD2 and PGF2alpha production is an important therapeutic strategy for brain damage induced by excitotoxic mechanisms such as HIE.

研究分野：中枢神経薬理学

キーワード：興奮毒性 プロスタグランジン

## 1. 研究開始当初の背景

低酸素性虚血性脳症 (HIE: Hypoxic-ischemic encephalopathy) は脳内グルタミン酸濃度上昇による興奮毒性誘発神経細胞死により引き起こされる脳障害であり、新生児死亡、脳性麻痺、発達障害の原因となり、これらに有効な治療戦略を開発し新生児を救うことは我々の社会的に重要な使命である。

生理活性脂質であるプロスタグランジン (PG) は神経細胞死や神経保護に重要な働きをすることが盛んに研究されているが、産生される PG の種類、脳の部位、時間変動などは不明な点が多かった。申請者は HIE の実験的モデルとしてグルタミン酸アゴニストで興奮毒性を引き起こすカイニン酸 (KA) を用い、ラット海馬における脂質メディエーター産生を LC-ESI-MS/MS を用いた網羅的解析により詳細にプロファイルした。産生される PG は、PGF<sub>2α</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub> の産生量が特に多く、すべてが KA 投与後 24 時間以内に二相性の産生を示した。さらに非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) を用いた PG 産生阻害試験、神経病理学的解析により、初期相・後期相で構成される二相性 PG がどちらも KA 単回投与後 30 日以上も続く持続性神経細胞死に関与し、NSAID の PG 産生抑制により神経細胞死が抑制されることを見出し、それらが新規な治療戦略となることを明らかにした。しかし NSAID は律速酵素シクロオキシゲナーゼ (COX) を阻害し、多種類の PG 産生を同時に抑制するため、各種 PG の種類別・時間依存的な生理活性はいまだ不明なままであった。

## 2. 研究の目的

本研究は、HIE モデルラットの脳内 PG の種類別・時間依存的な生理活性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

3 週齢雄性ウィスターラットを用い、KA 投与後 30 日後まで飼育した。KA (10mg/kg, Saline で溶解) と NS398 (10mg/kg, 20% DMSO を含む Saline で溶解) は腹腔内に投与し、各種 PG (500ng/5μl, 0.1% EtOH を含む Saline で溶解) は脳室内に投与した。30 日飼育後にラットを神経病理学的解析のために、4% パラホルムアルデヒドで灌流固定、パラフィンブロック、海馬病理切片を作製した。また生化学的解析のために海馬組織を採取した。各種 PG の遅発性神経細胞死の影響を調べるために、海馬パラフィン切片に HE 染色、Fluoro Jade C 染色を行った。神経炎症を誘発するグリア細胞のマーカーを用い、リアルタイム PCR・ウエスタンブロットおよび免疫染

色を用い解析を行った。

## 4. 研究成果

本研究により PGD<sub>2</sub> および PGF<sub>2α</sub> が興奮毒性誘発性の海馬における遅発性神経細胞死に寄与していることが明らかとなった。また PGD<sub>2</sub> が遅発性神経細胞死に関与するミクログリアの持続的な活性化を引き起こしていることも見出した。

PGD<sub>2</sub> は脳内で最も豊富に存在する PG の 1 つであり、睡眠、体温の調節、ホルモンの放出、痛覚を調節する。PGD<sub>2</sub> は cAMP 調節において反対の作用を持つ 2 つの G タンパク質共役受容体 DP1 および DP2 受容体 (CRTH2) を介してシグナル伝達する。DP1 受容体は海馬ニューロンに発現し、DP1 シグナルはアデニリルシクラーゼを活性化し、cAMP レベルを増加させ、虚血および脳卒中などの急性期の興奮毒性損傷からニューロンを保護することが知られている。しかし、我々の研究結果は PGD<sub>2</sub> がミクログリア活性化を促進し、KA 処置後 30 日間持続する慢性期における遅発性神経細胞死を引き起こした。DP1 受容体はニューロンだけでなくミクログリアにおいても発現し、ミクログリア PGD<sub>2</sub>-DP1 シグナルは、ミクログリア細胞増殖・活性化を介して神経毒性を媒介する。ミクログリアは、アルツハイマー病などの慢性期神経変性に PGD<sub>2</sub> に応答して細胞増殖シグナルを活性化し神経炎症に働く。これらの結果を合わせると、急性期における興奮毒性によって産生された PGD<sub>2</sub> は急性期には DP1 シグナルを介してニューロンを保護するが、慢性期においてはミクログリアの持続的活性化により神経炎症を増幅させ遅発性神経細胞死を誘導すると考えられる。

プロスタマイド/PGF 合成酵素はオリゴデンドロサイトに発現し PGH<sub>2</sub> を PGF<sub>2α</sub> へ変換する。PGF<sub>2α</sub>/PGF<sub>2α</sub> 受容体 (FP) シグナルは神経毒性作用を発揮し、PGF<sub>2α</sub>/FP シグナルの阻害は、虚血、中大脳動脈閉塞および脱髄モデルなどの神経障害からニューロンを保護することが知られている。本研究においても、PGF<sub>2α</sub>/FP シグナルは遅発性神経細胞死に関与することが示された。

本研究により、興奮毒性誘発 PGD<sub>2</sub> および PGF<sub>2α</sub> 産生の急増が遅発性神経細胞死を誘導することが示された。脳障害において PGD<sub>2</sub> および PGF<sub>2α</sub> の速やかな阻害治療戦略は、興奮毒性によって誘発される脳損傷を軽減するために重要な戦略であると考えられる。

## 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 5 件)

[1] Iwasa K, Yamamoto S, Yagishita S, Maruyama K, Yoshikawa K, Excitotoxicity-induced immediate prostaglandin

D2 production induces sustained microglial activation and delayed neuronal death in the hippocampus, *J. Lipid. Res.* 58, 649-55, 2017, 査読有, 10.1194/jlr.M070532

[2] Yagishita S, Suzuki S, Yoshikawa K, Iida K, Hirata A, Suzuki M, Takashima A, Maruyama K, Hirasawa A, Awaji T, Treatment of intermittent hypoxia increases phosphorylated tau in the hippocampus via biological processes common to aging, *Mol. Brain*, 10: 2, 2017, 査読有, 10.1186/s13042-016-0282-7

[3] Iwasa K, Yamamoto S, Takahashi M, Suzuki S, Yagishita S, Awaji T, Maruyama K, Yoshikawa K, Prostaglandin F2 $\alpha$  FP receptor inhibitor reduces demyelination and motor dysfunction in a cuprizone-induced multiple sclerosis mouse model, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 91, 175-182, 2014, 査読有, 10.1016/j.plefa.2014.08.004

[4] Yamamoto S, Gotoh M, Kawamura Y, Yamashina K, Yagishita S, Awaji T, Tanaka M, Maruyama K, Murakami-Murofushi K, Yoshikawa K, Cyclic phosphatidic acid treatment suppress cuprizone-induced demyelination and motor dysfunction in mice, *Eur. J. Pharmacol.*, 741C, 17-24, 2014, 査読有, 10.1016/j.ejphar.2014.07.040

[5] Yoshikawa K, Kita Y, Furukawa A, Kawamura N, Hasegawa-Ishii S, Chiba Y, Takei S, Maruyama K, Shimizu T, Shimada A, Excitotoxicity-induced immediate surge in hippocampal prostanoid production has latent effects that promote chronic progressive neuronal death, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 88, 373-81, 2013, 査読有, 10.1016/j.plefa.2013.02.007

〔学会発表〕(計 19 件)

[1] Yoshikawa K, Yamamoto S, Yamashina K, Iwasa K, Gotoh M, Suzuki M, Maruyama K, Murakami-Murofushi K, Cyclic phosphatidic acid derivative is a novel drug candidate for multiple sclerosis, 第 90 回日本薬理学会年会, 2017 年 3 月 15 日~17 日, 長崎ブリックホール (長崎県長崎市)

[2] 吉川圭介, 江口寧々, 岩佐健介, 山本梓司, 丸山敬, 平澤明, 食事性肥満の世代間伝達認知機能に及ぼす影響, 第 26 回神経行動薬理若手研究者の集い 2017 年 3 月 14 日, 福大メディカルホール (福岡県福岡市)

[3] 柳下聡介, 鈴木星也, 吉川圭介, 飯田桂子, 平田理子, 鈴木正彦, 高島明彦, 丸山敬, 平澤明, 淡路健雄, 内在性リン酸化タウ増加モデルのマイクロアレイ解析, 第 35 回日本

認知症学会, 2016 年 12 月 2 日, 東京国際フォーラム (東京),

[4] Keisuke Yoshikawa, Shinji Yamamoto, Mari Gotoh, Takabumi Shimizu, Miho Hashimoto, Kota Yamashina, Masahiko Suzuki, Kei Maruyama, Kimiko Murakami-Murofushi, Cyclic phosphatidic acid derivative is a novel drug candidate for multiple sclerosis, 14th Meeting of the Asian-Pacific Society for NEUROCHEMISTRY, 2016 年 8 月 27 日~30 日, Kuala Lumpur (Malaysia)

[5] 山本梓司, 清水嘉文, 後藤真理, 橋本真歩, 山科孝太, 岩佐健介, 丸山敬, 室伏きみ子, 吉川圭介, 多発性硬化症の新規治療薬候補・環状ホスファチジン酸誘導体, 第 58 回日本脂質生化学会 2016 年 6 月 9 日~10 日, にぎわい交流館 AU (秋田県秋田市)

[6] 山本梓司, 清水嘉文, 後藤真理, 丸山敬, 室伏きみ子, 吉川圭介, 多発性硬化症の新規治療薬候補-環状ホスファチジン酸誘導体, 第 89 回日本薬理学会年会 2016 年 3 月 10 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

[7] 吉川圭介, 山本梓司, 丸山敬, 岩佐健介, 興奮毒性誘発遅発性神経細胞死におけるプロスタグランジンの生理活性解析, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 11 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

[8] 岩佐健介, 山本梓司, 山科孝太, 丸山敬, 吉川圭介, 口腔内細菌の多発性硬化症への影響, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 10 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

[9] Yamamoto S, Gotoh M, Kawamura Y, Yagishita S, Awaji T, Tanaka M, Maruyama K, Murakami-Murofushi K, Yoshikawa K, Cyclic phosphatidic acid treatment suppress cuprizone-induced demyelination and motor dysfunction, European committee for treatment and research in Multiple sclerosis (ECTRIMS), 2015 年 10 月 7 日~10 日, Barcelona (Spain)

[10] Shinji Yamamoto, Yoshiyumi Shimizu, Mari Gotoh, Kei Maruyama, Kimiko Murakami-Murofushi, Keisuke Yoshikawa, 2-Carba-cyclic phosphatidic acid, a chemically synthesized cyclic phosphatidic acid derivative, is a novel drug candidate for multiple sclerosis, 第 57 回日本神経化学会大会, 2015 年 9 月 13 日, ソニックシティ (埼玉県さいたま市)

[11] 吉川圭介, 山本梓司, 山科孝太, 岩佐健介, 丸山敬, 田中求, 口腔内細菌の多発性硬化症への影響, 第 132 回日本薬理学会関東支部会, 2015 年 7 月 4 日, 明海大学 (千葉県浦安市)

[12] 岩佐健介, 山本梓司, 高橋茉莉香, 鈴木星也, 柳下聡介, 淡路健雄, 丸山敬, 吉川圭介, プロスタグランジン F2 FP レセプター阻害は多発性硬化症モデルマウスの神経脱髄と運動障害を改善する, 第 57 回日本脂質生化学会, 2015 年 5 月 28 日, 一橋大学(東京)

[13] 岩佐健介, 山本梓司, 高橋茉莉香, 鈴木星也, 柳下聡介, 淡路健雄, 丸山敬, 吉川圭介, Prostaglandin F2α FP receptor inhibitor reduce demyelination and motor dysfunction in a cuprizone-induced multiple sclerosis mouse model, 第 88 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 20 日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

[14] Iwasa K, Yamamoto S, Takahashi M, Suzuki S, Yagishita S, Awaji T, Maruyama K, Yoshikawa K, Prostaglandin F2α FP receptor inhibitor reduce demyelination and motor dysfunction in a cuprizone-induced multiple sclerosis mouse model, PLM2015, 2015 年 2 月 10 日~12 日, 京王プラザホテル(東京)

[15] Yamamoto S, Gotoh M, Kawamura Y, Yamashina K, Yagishita S, Awaji T, Tanaka M, Maruyama K, Murakami-Murofushi K, Yoshikawa K, Cyclic phosphatidic acid treatment suppress cuprizone-induced demyelination and motor dysfunction, PLM2015, 2015 年 2 月 10 日~12 日, 京王プラザホテル(東京)

[16] Yoshikawa K, Iwasa K, Yamamoto S, Maruyama K, Prostaglandin F2α FP receptor inhibitor reduce demyelination and motor dysfunction in a cuprizone-induced multiple sclerosis mouse model, Society for Neuroscience, 2014 年 11 月 15 日~19 日, Washington DC (U. S. A.)

[17] 岩佐健介, 譚慧, 緑川沙也華, 根本みく, 水嶋麻未, 吉川圭介, 清水邦義, 丸山敬, Effect of extract X for working memory performance and amyloid-β protein in mice, 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 19 日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

[18] 山本梓司, 吉川圭介, Sara Palumbo, Francesca Bosetti, 丸山敬, 脱髄疾患におけるアラキドン酸カスケードの関与, 平成 25 年度日本生化学会関東支部会, 2013 年 6 月 15 日, 山梨大学(山梨県甲府市)

[19] 吉川圭介, Sara Palumbo, 山本梓司, 高橋茉莉香, 丸山敬, Francesca Bosetti, 第 55 回日本脂質生化学会, 2013 年 6 月 7 日, ホテル松島大観荘(宮城県宮城郡松島町)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

[1] 名称: 脱髄疾患治療薬  
発明者: 室伏きみ子, 後藤真里, 丸山敬, 吉川圭介, 山本梓司  
権利者: 国立大学法人お茶の水女子大学・学校法人埼玉医科大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2013 - 012859  
出願年月日: 2013 年 1 月 28 日  
国内外の別: 国内・国際

[2] 名称: タウタンパク質のリン酸化が亢進された非ヒトモデル動物の製造方法  
発明者: 柳下聡介, 鈴木正彦, 淡路健雄, 吉川圭介, 丸山敬, 鈴木星也  
権利者: 学校法人埼玉医科大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2013-130358  
出願年月日: 2013 年 6 月 21 日  
国内外の別: 国内

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 圭介 (Keisuke Yoshikawa)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 60297546