

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450447

研究課題名(和文) 外傷性脳損傷時のグリア細胞の役割 - グリア細胞をターゲットとした神経保護薬の探索 -

研究課題名(英文) Exploring a novel therapeutic agent for the treatment of traumatic brain injury based on the function of glial cells

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳浮腫は頭部外傷性能損傷時にみられ、アストロサイトが膨潤することにより生じる。我々はこの膨潤にアストロサイトやミクログリアなどグリア細胞の活性化が関与することに着目し、新規神経保護・治療薬を開発することを目的として、その阻害薬を探索した。検討したなかで酢酸がグリア細胞の活性化を抑制し、浮腫を軽減することを見出した。作用機構として酸化ストレスを軽減することがわかった。得られた結果は、酢酸の外傷性能損傷治療薬としての可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Cerebral edema is an important complication of traumatic brain injury (TBI) and astrocyte swelling appears to be primarily responsible for the edema. We focused on the activation of glial cells such as astrocytes and microglia in this swelling and searched for inhibitors for the purpose of exploring novel neuroprotective / therapeutic agents. We found that acetate suppressed glial cell activation and reduced edema. Acetate may offer these effects through an anti-oxidative mechanism. The obtained results suggest the possibility of acetate as an effective therapeutic agent for brain edema after TBI.

研究分野：農学

キーワード：外傷性能損傷 アストロサイト 浮腫 ミクログリア グリア活性化 生理学 神経化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 外傷性脳損傷 (traumatic brain injury: TBI) とは頭部に物理的な衝撃が加わり起こる急性の脳損傷のことで、国内では交通事故、労災事故、スポーツ外傷、転倒、転落事故、暴行、家庭内暴力、乳児揺さぶり虐待など頭部に直接的な衝撃を受けて起きることが多い。全世界における TBI の年間患者発生数は 1,000 万人を超え、その発生頻度はパーキンソン病、多発性硬化症、ギラン・バレー症候群、重症筋無力症を合計した数値に匹敵し、TBI は世界的に注目すべき疾患と考えられている。にもかかわらず、日本での認知度は非常に低い。TBI を受けると通常、頭部の急激な動きの間に脳が頭蓋骨の内側に跳ね返りながら前後に動かされることにより、衝撃を受けた時点で外見上健常人と何ら違いがなくとも、後日、TBI により脳細胞が深刻な障害を受けていたことが判明し、記憶障害やてんかんなどの難治性後遺症に悩まされる場合も多い。日本では認知度が低いせいもあり、適切な治療がなされていない場合が多いのが現状である。

(2) TBI 後の障害には直接外力による神経障害・損傷 (1 次性脳損傷) とその後の生体内の反応により徐々に進行する神経障害 (2 次性脳損傷) に分けられる。2 次性脳損傷では TBI 後急速に細胞内外のイオン環境が変化し、細胞損傷が進行する。細胞にダメージを与えるフリーラジカルや炎症性サイトカイン産生が増加する一方で、細胞修復に関わる種々の神経栄養因子産生も増加する。従来、これらの知見は種々の方法により動物の脳に直接 TBI を加え、得られる脳組織標本を解析し、領域別の遺伝子発現やタンパク発現を明らかにすることにより得られてきた。しかしながらこの方法では脳内の細胞別の動態、すなわち神経細胞とグリア細胞 (アストロサイトやミクログリア) の個々の動態がわからない。

(3) 我々は培養細胞に TBI 刺激を加えることの出来る *in vitro* TBI チャンバーを独自に改良し、TBI 後に起こるアストロサイトの変化を検討したところ、2 次性脳損傷の過程でアストロサイトの細胞修復機能が作動し、結果としてアストロサイトが活性化・膨潤することを明らかにした。さらにこの膨潤のメカニズムとして酸化ストレスを介した Na^+ - K^+ - 2Cl^- 共輸送体の活性化が関与することを見出した。

(4) TBI に起こるアストロサイトの膨化により脳浮腫が生じ、頭蓋内圧が亢進して脳ヘルニアが生じる。この状態になると神経細胞のさらなる変性をもたらされ、この変化は不可逆的であることから、TBI 治療薬の開発は急務である。さらに、TBI が生じた後にも有効な保護薬も求められている。

2. 研究の目的

(1) TBI 時の活性化グリア細胞個々の役割、すなわちアストロサイトとミクログリアの役割を明らかにする。

(2) 細胞のエネルギー代謝を賦活化する生体物質である酢酸やケトン体、クレアチンがグリア細胞の活性化を抑制しうるかについて検討する。さらに、TBI 後のグリア細胞の活性化抑制に有効か否かを明らかにする。

(3) *in vivo* 動物を用い、脳組織に直接 TBI 刺激を与えたラットを作成し、*in vitro* で得られた結果が *in vivo* でもあてはまるかどうか検証し、神経保護薬の開発につなげる。

3. 研究の方法

(1) アストロサイトとミクログリアの初代培養細胞はそれぞれ胎齢 20 日齢と 21 日齢の Wistar ラット胎仔から調製した。また、一部の実験ではミクログリアの株化細胞である BV-2 細胞を用いた。初代培養細胞は CO_2 インキュベーター内で 3 週間培養後、また BV-2 細胞は 60% から 70% コンフルエントの状態 で実験に用いた。

(2) 上記 (1) で調製した細胞に LPS (10-1,000 ng/ml) を添加しグリア細胞を活性化させた。酢酸またはクレアチン、ケトン体の存在下で一酸化窒素 (NO) 産生を測定し、活性化・炎症の指標とした。また、生細胞数、活性酸素種 (ROS)、グルタチオン (GSH) 濃度変化を測定した。

(3) アストロサイトへの TBI 刺激は、fluid percussion モデルを用いた。すなわち、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) により行った。FPI 処置 4 時間後に細胞を回収し、各種測定を行った。

(4) *in vivo* TBI モデルラットは雄 Wistar ラット (adult) に FPI 刺激を加えることにより作成した。ラットへの酢酸の投与はあらかじめグリセリン三酢酸を経口投与 (6 g/kg 体重) することにより行った。浮腫の程度の判定は gravity method を用いた。

4. 研究成果

(1) 既に酢酸がアストロサイトの iNOS タンパク発現および NO 産生を抑制する効果をもつ結果が得られていたので、他の生体物質 (クレアチンおよびケトン体) の効果を検討した。LPS 添加によるアストロサイトの NO 産生はクレアチンまたは β -ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸の同時添加により有意に抑制されなかった。このとき生細胞数の変化もみられなかった。これらの結果により、アストロサイトの活性化および炎症性反応の抑制には検討した 3 種の生体物質のなかでは酢酸が最

も効果的であることが明らかとなった。

(2) 初代培養ミクログリアに LPS を添加し、活性化および炎症性変化をもたらしたところ、酢酸の添加により iNOS 発現および NO 産生が有意に抑制された。生細胞数には影響はなかった。このとき ROS 産生も有意に抑制された。LPS による GSH 産生の低下は酢酸の同時添加により回復した。この結果は、アストロサイトと同様の反応であると考えられた。しかし、ミクログリア株化細胞である BV-2 細胞を用いた検討では、上記のような変化は認められなかった。したがって、初代培養ミクログリアでは酢酸は活性化および炎症性反応を抑制するが、株化細胞である BV-2 細胞では抑制効果はみられないことが明らかとなった。このような違いがみられた原因として、抗酸化力の差が起因すると考えられる。

(3) FPI 刺激 4 時間後にみられるアストロサイト膨潤は酢酸 (10 mM) の前添加で有意に抑制された (図 1)。一方、FPI 刺激 2 時間後に酢酸を後から添加したところ、細胞膨潤抑制効果は見られなかった。これらの結果から、酢酸は TBI 初期の段階で活性化および炎症性反応を抑制する効果を発揮すると考えられる。

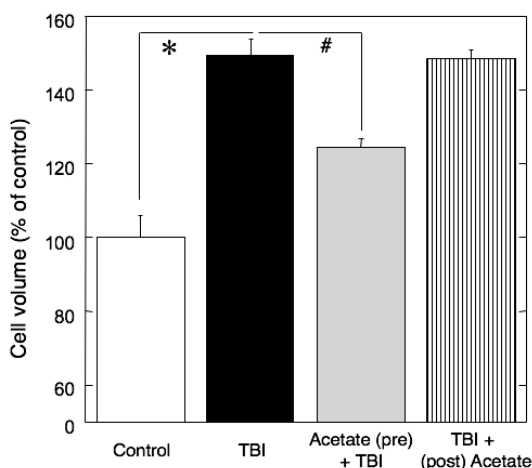


図 1 FPI 後にみられるアストロサイト膨潤に対する酢酸の効果

(4) 初代培養ミクログリアに FPI 刺激を施し、得られる培養上清を FPI 刺激を加えていないアストロサイトに添加したところ、細胞の膨潤が観察された。この結果からアストロサイト膨潤にはミクログリアから放出される何らかの因子が関与すると考えられた。FPI 刺激後のミクログリア細胞上清を解析したところ、TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカイン量の増加が確認された。これらの結果から、TBI 後の反応にはアストロサイトとミクログリアが密接に関連していると考えられる。

(5) あらかじめグリセリン三酢酸を経口投与することにより脳内の酢酸濃度を増加さ

せた後、ラットに TBI を施したところ、TBI による脳浮腫の程度が軽減されることを見出した。この結果から、酢酸の投与は脳内炎症や TBI による浮腫に対して抗酸化能を發揮することで抑制できる可能性が考えられた。

(6) 研究成果の意義

TBI 後には 2 種のグリア細胞、すなわちアストロサイトとミクログリアが密接にかかわり、グリア細胞が活性化して炎症性反応が起きることにより、浮腫の要因であるアストロサイト膨潤が引き起こされることが明らかとなった。今回得られた結果から、グリア細胞の活性化および炎症性変化の抑制に酢酸は有効であることが示された。しかしながら、酢酸の作用機序はまだ十分に明らかになっておらず、今後、さらなる研究を進める必要がある。

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 6 件)

Saheki T, Inoue K, Ono Y, Fujimoto Y, Furuie S, Yamamura K-I, Kuroda E, Ushikai M, Asakawa A, Inui A, Horiuchi M, Eto K, Kadowaki T, Moriyama M, Sinasac DS, Yamamoto T, Furukawa T, Kobayashi K. Oral aversion to dietary sugar, ethanol and glycerol correlates with alterations in specific hepatic metabolites in a mouse model of human citrin deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 査読有、120: 306-316, 2017. DOI: 10.1016/j.ymgme.2017.02.004.

Moriyama M, Kurebayashi R, Kawabe K, Takano K, Nakamura Y. Acetate attenuates lipopolysaccharide-induced nitric oxide production through an anti-oxidative mechanism in cultured primary rat astrocytes. *Neurochemical Research* 査読有、41: 3138-3146, 2016. DOI: 10.1007/s11064-016-2038-2

Moriyama M, Fujimoto Y, Rikimaru S, Ushikai M, Kuroda E, Kawabe K, Takano K, Asakawa A, Inui A, Eto K, Kadowaki T, Sinasac D. S., Okano Y, Yazaki M, Ikeda S-I, Zhang C, Song Y-Z, Sakamoto O, Kure S, Mitsubuchi H, Endo F, Horiuchi M, Nakamura Y, Yamamura K-I, Saheki T. Mechanism for increased hepatic glycerol synthesis in the citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double-knockout mouse: Urine glycerol and glycerol 3-phosphate as potential diagnostic markers of human citrin deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta* 査読有、

1852: 1787-1795, 2015. DOI: 10.1016/j.bbadis.2015.04.023.

Kawabe K, Takano K, Moriyama M, Nakamura Y. Lipopolysaccharide-stimulated transglutaminase 2 expression enhances endocytosis activity in the mouse microglial cell line BV-2. Neuroimmunomodulation 査読有、22: 243-249, 2015. DOI: 10.1159/000365484.

Motoyoshi-Yamashiro A, Takano K, Kawabe K, Izawa T, Nakajima H, Moriyama M, Nakamura Y. Amphotericin B induces glial cell line-derived neurotrophic factor in rat brain. Journal of Veterinary Medical Sciences 査読有、76: 1353-1358, 2014. DOI: 10.1292/jvms.14-0160.

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/s11064-13-1195-9.

〔学会発表〕(計5件)

Moriyama M, Kawabe K, Hashimoto A, Nishimura Y, Matoba K, Takano K, Nakamura Y. Effects of acetate on LPS-induced nitric oxide production in primary rat microglia and BV-2 cell line. 第59回日本神経化学会 2016年9月8日 福岡国際会議場・博多

河邊憲司、高野桂、森山光章、中村洋一
ミクログリアの組織型トランスグルタミナーゼ発現とエンドサイトーシスに対するアンホテリシンBの効果 BMB2015 2015年12月4日 神戸ポートアイランド・神戸

Moriyama M, Kurebayashi R, Kawabe K, Hashimoto A, Takano K, Nakamura Y. Acetate attenuates LPS-induced nitric oxide production in cultured astrocytes. 第58回日本神経化学会 2015年9月12日 大宮ソニックシティ・埼玉

森山光章、藤本侑希、牛飼美晴、高野桂、堀内正久、中村洋一、佐伯武頼 第56回日本先天代謝異常学会 2014年11月15日 東北大学・仙台

呉林亮祐、森山光章、河邊憲司、高野桂、中村洋一 アストロサイトにおけるLPS誘導性NO産生に対する酢酸の抑制効果 第158回日本獣医学会 2014年9月10日 北海道大学・札幌

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・准教授
研究者番号：50453139