

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670036

研究課題名(和文) 転写調節因子を指標としたミクログリア制御薬探索法の確立

研究課題名(英文) Establishment of assay system for drugs that regulate microglia via transcription factors

研究代表者

香月 博志 (KATSUKI, Hiroshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授

研究者番号：40240733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：リガンド制御型転写調節因子として機能する核内受容体ファミリーメンバーに焦点を当て、PPAR $\alpha$  アゴニストである天然化合物のマセリグナンがミクログリアのM2型活性化の促進を介して中脳組織内のドパミンニューロンに対する保護効果を発揮することを見出した。一方で、VDRおよびRXRのアゴニストがMAPキナーゼ依存的に、またRARアゴニストがMAPキナーゼ非依存的に、転写因子NF- $\kappa$ Bの動員を妨げることでミクログリアのM1型活性化を抑制することを示した。

研究成果の概要(英文)：The present study focused on several members of nuclear receptor family that acted as ligand-regulated transcription factors, and found that a natural compound macelignan with PPAR $\alpha$  agonist activity protected dopaminergic neurons in midbrain tissues via promotion of M2 activation of microglia. On the other hand, the present study also demonstrated that agonists at VDR / RXR and an agonist at RAR suppressed M1 activation of microglia via inhibition of recruitment of another transcription factor NF- $\kappa$ B, in a MAP kinase-dependent manner and a MAP kinase-independent manner, respectively.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ミクログリア 核内受容体 神経保護 一酸化窒素合成酵素 サイトカイン アルギナーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

脳内のミクログリアは、末梢組織のマクログリアと同様に、複数の異なる活性化状態を取りうる。主な活性化状態として古典的(M1型)活性化とオルタナティブ(M2型)活性化とが知られており、一般に前者は細胞・組織傷害性に、後者は細胞・組織修復性に働くとされている。そこで、このような脳内ミクログリアの二面性のバランスを適切に制御することができれば、中枢神経細胞の変性を伴う種々の疾患に対して新たな概念に基づく治療・予防法が確立できる可能性がある。

研究代表者は、ミクログリア系細胞株 BV-2 細胞を用いて、M1 型活性化と M2 型活性化との間の相互作用に関わるシグナル伝達系について解析を進めてきた。その結果、リポ多糖 (LPS) によって誘導される古典的活性化に関わる細胞内シグナルと、インターロイキン (IL)-4 によって誘導される M2 型活性化に関わる細胞内シグナルとが互いに干渉・相殺することを確認した。加えて、転写調節因子の一種である interferon-regulatory factor-4 (IRF-4) が M2 型活性化誘導の鍵となる分子であり、IRF-4 の発現亢進の有無が M1 型活性化と M2 型活性化のスイッチング機構において中心的役割を担う可能性を見出した。

### 2. 研究の目的

脳内ミクログリアの異なる活性化状態の間のスイッチング機構において重要な役割を担うと目される転写調節因子群の挙動に着目し、IRF-4 をはじめとする転写調節因子発現増大・活性亢進作用を指標として、ミクログリアの活性化方向を制御する化合物のスクリーニング法を確立する。また、IRF や関連する転写調節因子群の機能解析、ならびにスクリーニングにより見出した化合物の IRF-4 発現制御機序の解析と構造展開を行うことにより、新規の作用機序に基づく神経疾患予防・治療薬候補を見出すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、主として培養脳組織切片および細胞株を用いて実験を行った。中脳は他の脳部位と比較してミクログリアを多数含んでおり、またパーキンソン病に関連する中脳黒質ドパミンニューロンの変性がミクログリアの M1 型活性化によって誘導される。そこで、LPS の適用によりミクログリアの M1 型活性化を誘導し、これに伴う種々の病理学的・生化学的指標の変動に対する薬物の作用を評価した。また細胞株についてはマウスミクログリア系細胞である BV-2 細胞を用い、LPS 処置によって誘導される炎症性サイトカイン等の M1 型マーカー群の発現に対する薬物の作用を評価するとともに、その作用を媒介するシグナル伝達機序についても解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) ミクログリアの M2 型活性化を促進する低分子量化合物の神経保護効果の解析：ラット新生仔より調製した培養中脳組織切片に対し、インターフェロン (IFN)- $\gamma$  (50 ng/ml) を 24 時間、その後 LPS (10  $\mu$ g/ml) を 72 時間処置することによって、著明なドパミンニューロン変性が誘導される。このドパミンニューロン変性はミクログリアの M1 型活性化に伴う誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 発現亢進と NO 過剰産生によって誘導されていることが我々の以前の研究により示されている (Shibata et al. J Neurochem 2003)。この実験系を用いて、IRF-4、iNOS (M1 型ミクログリア活性化マーカー) およびアルギナーゼ-1 (M2 型ミクログリア活性化マーカー) の発現変動、ならびにドパミンニューロン保護効果を指標として 8 種の化合物の薬理作用を検証した。その結果、ナツメグに含まれる天然化合物であるマセリグナンがミクログリアの活性化フェノタイプを部分的に制御するとともに、ドパミンニューロン保護効果を発揮することを見出した。具体的には、マセリグナンは 3~30  $\mu$ M の濃度で LPS と同時に適用した時に、IFN- $\gamma$  / LPS により引き起こされるドパミンニューロンの減少を著明に抑制した (図 1)。一方でマセリグナン (10  $\mu$ M) は、IFN- $\gamma$  / LPS 処置により誘導される NO 産生量の増加に対して全く影響を及ぼさなかった。また免疫組織化学により同定される iNOS 発現は、LPS 処置後の中脳組織内において一部のミクログリアに局在しており、その発現量はマセリグナンによって抑制されなかった。

一方で、マセリグナン処置下の培養中脳組織切片では、一部のミクログリアにアルギナーゼ-1 の発現が誘導されることを見出した。

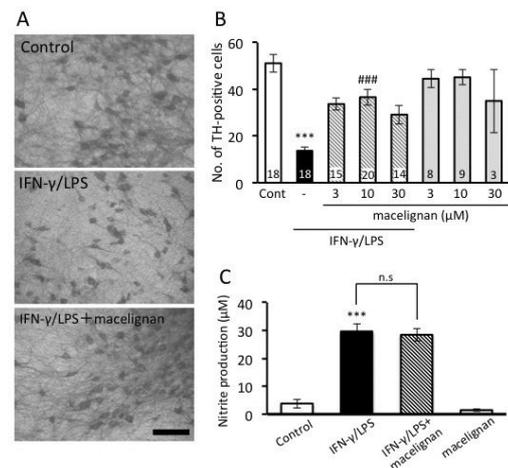


図 1. (A) 培養中脳組織切片の TH 免疫組織化学の典型例。IFN- $\gamma$ /LPS によるドパミンニューロンの減少、およびマセリグナン (10  $\mu$ M) の神経保護効果を示す。(B) TH 陽性細胞 (ドパミンニューロン) の計数結果。(C) NO 産生量の指標としての培地中の亜硝酸濃度の定量結果。\*\*\* P < 0.001 vs. control; ### P < 0.001 vs. IFN- $\gamma$ /LPS.

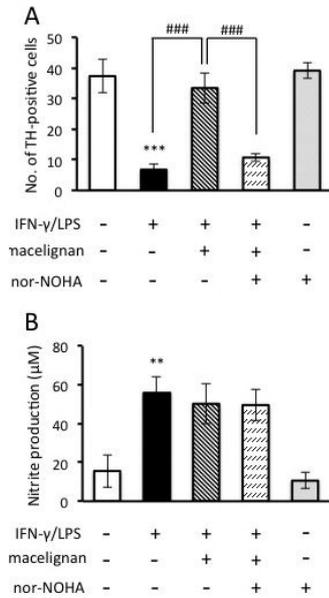


図 2. (A) 培養中脳組織切片におけるマセリグナン (10  $\mu$ M) のドパミンニューロン保護効果に対するアルギナーゼ阻害薬 nor-NOHA (100  $\mu$ M) の拮抗作用。(B) 培地中の亜硝酸濃度の定量結果。\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs. control; ###  $P < 0.001$ .

iNOS とアルギナーゼ-1 との二重免疫蛍光染色の結果、これら 2 種の酵素はほとんどが組織内の異なる集団のミクログリアに発現しており、両者を共に発現している細胞はごくわずかであることが分かった。そこで次に、アルギナーゼ-1 の発現誘導とマセリグナンのドパミンニューロン保護効果との関係を明らかにするため、アルギナーゼの特異的阻害薬として知られる nor-NOHA を用いた。Nor-NOHA (100  $\mu$ M) をマセリグナン (10  $\mu$ M) と共処置すると、マセリグナンのドパミンニューロン保護効果は消失した。またこの時、IFN- $\gamma$ /LPS 処置による NO 産生量の増大は nor-NOHA によって影響を受けなかった (図 2)。アルギナーゼ-1 と iNOS はアルギニンを共通の基質として利用するため、一般にアルギナーゼの発現増大は NO の過剰産生を抑制すると考えられている。一方で本研究の知見においては、LPS により iNOS を発現する細胞とマセリグナンによりアルギナーゼ-1 を発現する細胞が異なるため、細胞内での基質利用の競合が起こらないものと考えられた。

続いて、過去の報告においてマセリグナンが核内受容体型転写因子として機能する PPAR $\gamma$  に対してアゴニスト活性を有することが示唆されていることから、PPAR の関与について検討を加えた。PPAR アンタゴニストである GW9662 (2  $\mu$ M) を共処置することによって、マセリグナン (10  $\mu$ M) のドパミンニューロン保護効果は消失した。

以上の結果をまとめると、マセリグナンは核内受容体 PPAR $\gamma$  の刺激を介して中脳組織内の一部のミクログリアに M2 型活性化 (アルギナーゼ-1 の発現) を誘導し、これによってドパミンニューロンに対する保護効果を発

揮することが示された。マセリグナンが LPS によるミクログリアの M1 型活性化 (NO 産生や iNOS 発現) に何ら影響を与えることなくこのような効果を発揮しうことは特筆すべき知見であり、ミクログリアの活性化における M1 型/M2 型間のスイッチングは必ずしも互いに排他的なものではないことを示唆するものである。詳細なメカニズムに関しては今後なお検討を要する。

(2) 核内受容体 VDR および RXR による M1 型ミクログリア活性化制御効果の解析：前項の結果より、転写因子として機能する核内受容体 PPAR $\gamma$  がミクログリアの活性化制御において重要なターゲットとなることが示唆されたことから、核内受容体ファミリーの他のメンバーについても検証を行うこととした。特に、ビタミン D 受容体 (VDR) は免疫系を担う種々の細胞に発現しており、その活性化が単球やマクロファージにおけるサイトカイン類の発現を調節するとの報告もなされているが、脳内ミクログリアにおける機能についてはまだ十分に解明されていない。そこで VDR アゴニストの活性型ビタミン D3 (VD3)、および VDR と二量体を形成して遺伝子転写を制御することが知られる核内受容体 RXR のアゴニストである HX630 を用いて検討した。

ミクログリア系細胞株 BV-2 細胞に LPS を処置して M1 型活性化を誘導すると、iNOS の他、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の mRNA 発現量が著明に増加した。LPS の 24 時間処置に 30 分先行して VD3 (1  $\mu$ M) および HX630 (1  $\mu$ M) を処置すると、iNOS および IL-6 の発現増大に対して両薬物はいずれも抑制効果を示し、VD3 と HX630 を共処置した場合は相加的に抑制効果が得られた。一方、IL-1 $\beta$  の発現に対しては VD3 のみが抑制効果を示し、TNF $\alpha$  発現に対し

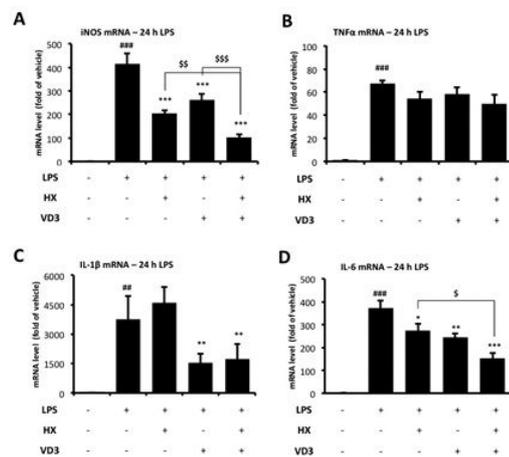


図 3. LPS (100 ng/ml) 刺激 24 時間後の BV-2 細胞における iNOS mRNA (A)、TNF $\alpha$  mRNA (B)、IL-1 $\beta$  mRNA (C)、IL-6 mRNA (D) 発現増大に対する VD3 および HX630 の効果。VD3 と HX630 はそれぞれ 1  $\mu$ M の濃度で LPS 処置 30 分前より適用した。###  $P < 0.001$  vs. no treatment; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs. LPS alone; \$  $P < 0.05$ , \$\$  $P < 0.01$ , \$\$\$  $P < 0.001$ .

てはいずれの薬物も抑制効果を示さなかった(図3)。VD3とHX630の相加的效果は、NO産生量、iNOSタンパク質発現量およびIL-6タンパク質産生量に対する抑制においても確認された。

次に、VD3およびHX630の作用を媒介する細胞内シグナル伝達系について解析したところ、LPS刺激によって誘導されるERKの活性化を両薬物が抑制することが判明した。加えて、ERKの活性化を阻害するPD98059(20 μM)が、LPSにより誘導されるiNOSおよびIL-6 mRNA発現増大を著明に抑制し、IL-1β mRNA発現増大に対しても程度は弱いものの有意な抑制効果を示すことが明らかになった。さらに、LPS刺激開始30分後に見られる転写因子NF-κBの核内移行は、VD3、HX630およびPD98059によって有意に抑制された。これらの結果から、VDRおよびRXRはBV-2細胞において転写因子としての古典的な遺伝子発現調節機構を介するだけでなく、ERKの媒介する細胞内シグナル伝達経路と干渉することによってM1型活性化に伴ういくつかの炎症性因子の発現を抑制しうることが示唆された(図4)。

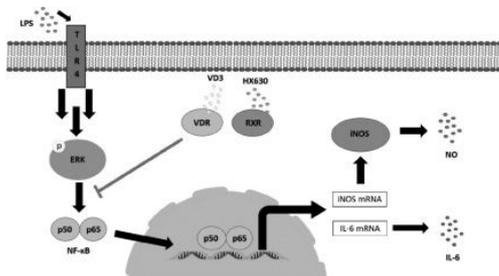


図4. BV-2細胞における炎症性因子発現に対するVDRおよびRXRアゴニストの抑制作用機序

(3) 核内受容体RARによるM1型ミクログリア活性化制御効果の解析：研究代表者は脳出血を対象として実施してきたこれまでの研究において、レチノイン酸受容体(RAR)アゴニストのAm80が脳出血に伴う脳内ミクログリアのM1型活性化を抑制すること、また脳出血に伴う脳内ケモカインCXCL2の発現の抑制がAm80の治療効果に寄与することを示してきた(Matsushita et al. JCBFM 2011, J Neurosci Res 2014)。そこで本研究では、BV-2細胞を用いてAm80のCXCL2発現抑制効果を媒介するシグナル伝達機序について詳細に解析を進めた。

LPS(10 ng/ml)処置によって誘導される著明なCXCL2 mRNA発現増大は、Am80(0.3 - 3 μM)の12時間前処置によって著明に抑制された。一方で、Am80はLPSの誘導するp38 MAPKやERKといったMAPキナーゼファミリーの活性化に対して何ら抑制効果を示さず、前項に示したVDRやRXRのアゴニストとは異なる作用プロファイルを持つことが明らかとなった。そこでNF-κBシグナルに対する作用について検証したところ、Am80はNF-κBの転写活

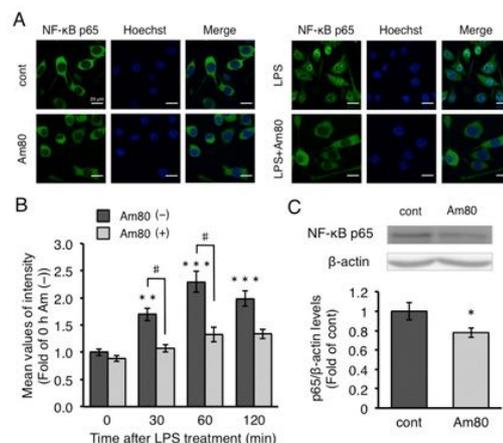


図5. NF-κBシグナル動員に対するAm80の効果。(A) BV-2細胞をLPS(10 ng/ml)で60分間刺激した後のNF-κB p65サブユニットの細胞内局在。Hoechst染色は核の位置を示す。Am80(0.3 μM)はLPS処置の12時間前よりBV-2細胞に処置した。(B) (A)の実験における核内に移行したp65サブユニットの定量解析の結果。\*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 vs. time 0; # P < 0.05。(C) Am80(0.3 μM)12時間処置の細胞内p65サブユニットタンパク質量に対する作用。\* P < 0.05 vs. control。

性サブユニットであるp65タンパク質の細胞内発現量を低下させること、p65の抑制因子であるIκB-αタンパク質の発現量も低下させるとともに、LPS刺激に伴って生じるIκB-αタンパク質の分解を抑制することが判明した。併せて、Am80はLPS刺激により誘導されるBV-2細胞の核内へのp65の移行を著明に抑制した(図5)。さらに、LPS受容体であるTLR4がLPSなどのリガンドを認識する際に必須の共同受容体として機能するCD14の発現量は、BV-2細胞にLPSを処置することによって増加したが、Am80の前処置はこの増加を著明に抑制した。以上の結果から、RARアゴニストはTLR4シグナル伝達機構のうちNF-κBおよびCD14の動員を妨げることによってBV-2細胞のM1型活性化を抑制しうることが示唆された。

(4) まとめ：ミクログリアの異なる活性化型の間のスイッチングを担う因子として、転写因子の働きに着目して検討を行った。当初IRF-4の発現増大を指標としたスクリーニングを企図していたが、種々の検討で得られた結果から、転写因子群のなかでも核内受容体として機能するいくつかの分子が薬物の標的としても適しているとの考えに帰着し、特にPPARγ、VDR、RXR、RARに関する知見の集積に注力した。本研究の成果により、これら核内受容体はそれぞれ異なった様式でミクログリアのM1型活性化の抑制あるいはM2型活性化の亢進に至る細胞内シグナル伝達系を駆動しうることが明らかとなった。これらの成果は、核内受容体ファミリーメンバーを標的とする新たな神経疾患の予防・治療薬の開発の契機となる基礎資料を提供するもので

ある。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 11 件)

Takahashi S, Hisatsune A, Kurauchi Y, Seki T, Katsuki H. Insulin-like growth factor 1 specifically up-regulates expression of modifier subunit of glutamate-cysteine ligase and enhances glutathione synthesis in SH-SY5Y cells. *Eur J Pharmacol.* 771:99-106, 2016. 査読有 doi: 10.1016/j.ejphar.2015.12.013.

Fujibayashi T, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Shudo K, Katsuki H. Mitogen-activated protein kinases regulate expression of neuronal nitric oxide synthase and neurite outgrowth via non-classical retinoic acid receptor signaling in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Pharmacol Sci.* 129:119-126, 2015. 査読有 doi: 10.1016/j.jphs.2015.09.001.

Kiyofuji K, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Mishima S, Katsuki H. A natural compound macelignan protects midbrain dopaminergic neurons from inflammatory degeneration via microglial arginase-1 expression. *Eur J Pharmacol.* 760:129-35, 2015. 査読有 doi: 10.1016/j.ejphar.2015.04.021.

Nobunaga M, Obukuro K, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Tsutsui M, Katsuki H. High fat diet induces specific pathological changes in hypothalamic orexin neurons in mice. *Neurochem Int.* 78:61-66, 2014. 査読有 doi: 10.1016/j.neuint.2014.09.002.

Matsushita H, Hijioka M, Ishibashi H, Anan J, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Shudo K, Katsuki H. Suppression of CXCL2 upregulation underlies the therapeutic effect of the retinoid Am80 on intracerebral hemorrhage in mice. *J Neurosci Res.* 92:1024-1034, 2014. 査読有 doi: 10.1002/jnr.23379.

### 〔学会発表〕(計 4 1 件)

脇岡雅宣、阿南純平、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、古賀友紹、横溝岳彦、清水孝雄、香月博志. マウス脳内出血病態進行過程におけるロイコトリエン B<sub>4</sub> の産生および機能解析. 第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 10 日、パシフィコ横浜 (横浜市)

香月博志、脇岡雅宣、石橋勇人、阿南純平、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘. マウス脳内出血病態へのロイコトリエン B<sub>4</sub> 産生系の関与. 第 27 回日本脳循環代謝学会

総会、2015 年 10 月 30 日～31 日、富山国際会議場 (富山市)

Katsuki H, Takaoka Y, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T. Am80, an RAR agonist, suppresses lipopolysaccharide-induced expression of a chemokine CXCL2 in microglial BV-2 cells. The 3rd international conference on retinoids, 2015 年 10 月 21～23 日、岐阜グランドホテル (岐阜市)

高岡侑一郎、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、香月博志. ミクログリア細胞株 BV-2 における LPS 誘導性 CXCL2 発現に対するレチノイド化合物 Am80 の抑制作用. 日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、デザイン・クリエイティブセンター神戸 (神戸市)

清藤花菜、倉内祐樹、久恒昭哲、三島敏、香月博志. マセリゲナンはラット中脳組織培養系においてミクログリアの alternative activation を介してドパミンニューロン保護作用を示す. 第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 19 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)

高岡侑一郎、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、香月博志. ミクログリア細胞株 BV-2 における CXCL2 発現に対するレチノイド化合物 Am80 の抑制作用. 第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 18 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)

### 〔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

<http://square.umin.ac.jp/kmyakuri/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

香月 博志 (KATSUKI, Hiroshi)

熊本大学大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 4 0 2 4 0 7 3 3

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

関 貴弘 (SEKI, Takahiro)

熊本大学大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号: 5 0 3 3 5 6 5 0

大塚 雅巳 (Otsuka, Masami)

熊本大学大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 4 0 1 2 6 0 0 8