

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08127

研究課題名(和文) 外傷性脳損傷におけるインフラマソームの役割の解明とその制御に基づいた治療薬の開発

研究課題名(英文) Exploring the role of inflammasome on traumatic brain injury

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：外傷性脳損傷時には物理的衝撃によって神経が損傷するとともに本来神経保護の役割を担うグリア細胞が過度に活性化し炎症性変化が起こる結果、脳浮腫が生じる。我々は炎症反応の惹起および維持にインフラマソームが関与することに着目し、外傷性脳損傷への関与を検討した。外傷性脳損傷時にはグリア細胞のインフラマソーム活性化が認められ炎症性反応が増悪することが示された。さらに外傷性脳損傷時の新規神経保護・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ところ短鎖脂肪酸である酢酸と中鎖脂肪酸であるラウリン酸が候補となりうることを明らかにした。その作用点としてインフラマソーム活性化阻害を介して働くことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TBI後みられる脳浮腫に対する治療薬の開発は喫緊の課題である。TBI後の脳浮腫にはインフラマソームの活性化が関与することを新たに見出した。さらにこの活性化を抑制することにより、TBI後にみられる種々の炎症性反応が抑えられ浮腫を軽減出来ることを明らかにした。この作用をもつ候補として、食を介して摂取可能な短鎖および中鎖脂肪酸の可能性を提示した。

研究成果の概要(英文)：Cerebral brain edema is an important complication of traumatic brain injury (TBI). Glial activation, namely astrocyte swelling is responsible for the edema. We investigated the effect of inflammasome on the activation of glial cells such as microglia and astrocytes and its role in TBI. We found that the activation of inflammasome augmented inflammatory responses such as nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) production and IL-1 beta excretion after TBI and that pre-treatment of acetate or lauric acid reduced these responses. The results obtained potentiate the possibility that short- and medium-chain fatty acids are effective therapeutic drug for brain edema after TBI.

研究分野：農学

キーワード：外傷性脳損傷 脳浮腫 インフラマソーム ミクログリア 神経化学

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 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、国内では交通事故やスポーツ外傷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激しく動かされる。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。従来、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ことにより炎症性反応が増大すると考えられてきた。

(3) 申請者らは培養細胞に 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 後に起こるグリア細胞 (アストロサイトやミクログリア) の変化を検討したところ、2 次性脳損傷の過程でグリア細胞が活性化し、アストロサイト内への水の流入に関わるタンパクである  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  共輸送体 (NKCC) 活性が増加する結果として細胞が膨化することを明らかにした [1]。さらにこの膨化のメカニズムとして酸化ストレスを介する調節を見出した [2]。この調節機序が *in vivo* TBI モデル動物にも当てはまるか否かを種々の抗酸化剤を用いて確認したところ、TBI 後に起こる脳浮腫の一部を抑制することができたものの、治療薬としての効果は十分ではなかった [3]。従って、浮腫治療薬の開発には酸化ストレスやボリューム調節タンパク以外の治療戦略を考える必要がある。

(4) 近年、免疫学の分野においてインフラマソームと呼ばれるシグナル分子複合体が細胞の炎症反応の最も初期の段階で重要な役割を果たしていることが発見された。何らかの危険シグナルが細胞内に入ると Nod-like receptor (NLR) がそれを認識してアダプター分子の Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) を介してカスパーゼ 1 前駆体を会合させ、インフラマソームと呼ばれる複合体が形成される。カスパーゼ 1 の活性化により IL-1 $\beta$  や IL-18 の産生・分泌が誘導され、炎症反応が惹起される。神経変性疾患ではアルツハイマー病においてアミロイド  $\beta$  タンパクの凝集が危険シグナルとなり NLRP3 インフラマソームが活性化され炎症反応が悪化することが報告されている [4]。しかしながら、TBI 時のインフラマソームの変化はこれまで明らかになっていない。TBI 時には物理的損傷で ATP が細胞間隙に漏れ出すことが知られており、細胞外 ATP は危険シグナルとして既に同定されていることから、TBI 時にインフラマソームが活性化し、さらなる炎症反応の増大に繋がる可能性が示唆される。さらに活性化していた場合、グリア細胞におけるその活性化阻害薬は新しい浮腫治療薬となりうるのではないかと考えるに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、TBI 刺激を与える方法として Fluid percussion モデルを用い、作業仮説「TBI 後のグリア細胞においてインフラマソームが活性化し IL-1 $\beta$  の産生が増加して炎症反応が増大する。脳内の炎症反応の増大はアストロサイト膨潤と脳浮腫に繋がる。」を検証する。すなわち TBI 時のインフラマソームの変化について、アストロサイトとミクログリアの個々の動態を明らかにする。さらに細胞のエネルギー代謝を賦活化する物質である短鎖および中鎖飽和脂肪酸がグリア細胞のインフラマソーム活性化を抑制しうるかについて検討する。最後に大脳皮質に直接 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、脳浮腫治療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  $\text{CO}_2$  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を実験に用いた。

(2) 上記 (1) で調製したミクログリアまたは BV-2 細胞にリポポリサッカライド (LPS; 10 ng/ml)、アストロサイトには LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加しグリア細胞を活性化させた。一定時間反応後、培養液中の一酸化窒素 (NO) およびサイトカイン産生を測定した。細胞を回収し、生細胞数、活性酸素種 (ROS) 濃度変化を測定した。さらに MAP kinase (MAPKs) 活性およびインフラマソーム活性化の指標である nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat, pyrin domain containing 3 (NLRP3) タンパク発現変化を western blotting により解析した。ミクログリアおよび BV-2 細胞

については食能も評価した。

さらに、酢酸、オクタン酸およびラウリン酸存在下で上記項目に対する検討を加えた。

(3) 細胞への TBI 刺激は、fluid percussion モデルを用いた。すなわち、上記(1)で調製した細胞に 5 atom の打撃を 2 回加える液体打撃法 (fluid percussion injury: FPI) を用いて刺激した。FPI 処置 4 時間後に細胞を回収し、(2)に示す各種測定を行った。

(4) *in vivo* TBI モデルラットは雄 Wistar ラット (adult) に三種混合麻酔下で 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 3 日間グリセリン三酢酸 (GTA) 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) インフラマソームを活性化させる危険シグナルである LPS を用い、ミクログリアと株化細胞である BV-2 細胞に対して検討を加えた。BV-2 細胞に LPS を添加するとインフラマソーム活性化の指標である NLRP3 タンパク発現が増加し、培養液中への IL-1 $\beta$ 放出が増加した (図 1)。LPS 添加 24 時間後の生細胞数には変化がなく、NO 産生増加、ROS 産生増加、MAPKs 活性化および食能の亢進がみられた。上記の結果は初代培養ミクログリアにおいても確認された (図 2 および図 3)。

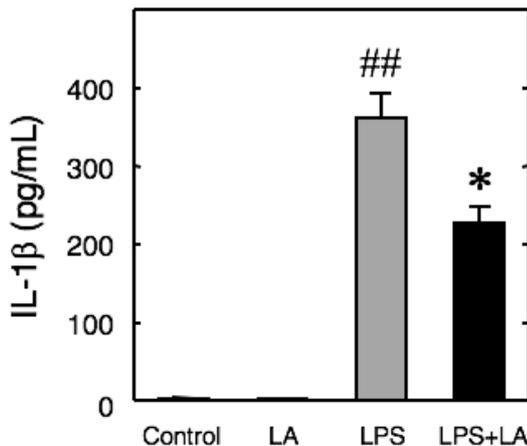


図 1 IL-1 $\beta$ 放出に対するラウリン酸の効果  
<sup>##</sup>p<0.01 vs control, <sup>\*</sup>p< 0.05 vs LPS.

(2) これまでの検討から酢酸 (10 mM) 添加が LPS による炎症性変化を抑えることを明らかにしているため、本研究では中鎖脂肪酸であるオクタン酸とラウリン酸について検討を加えた。BV-2 細胞において LPS による炎症性変化 (NLRP3 タンパク発現増加、NO 産生増加、ROS 産生増加、IL-1 $\beta$ 増加、MAPKs 活性化および食能の亢進) はすべてラウリン酸 (200  $\mu$ M) の存在下で緩和された (図 1)。これらの変化は初代培養ミクログリアにおいても確認できた (図 2 および図 3)。BV-2 細胞において、NO 産生と ROS 産生の抑制はオクタン酸 (2 mM) でも確認出来た。またラウリン酸による抑制効果はラウリン酸の細胞膜受容体である G protein-coupled receptor (GPR) 40 の拮抗薬によって解消された。

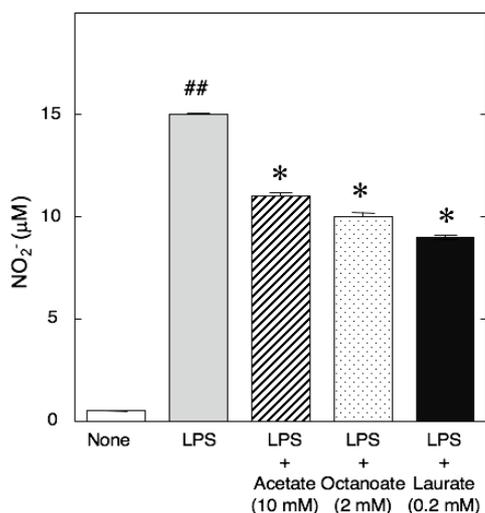


図 2 NO 産生に対する脂肪酸の効果  
<sup>##</sup>p<0.01 vs none, <sup>\*</sup>p< 0.05 vs LPS.

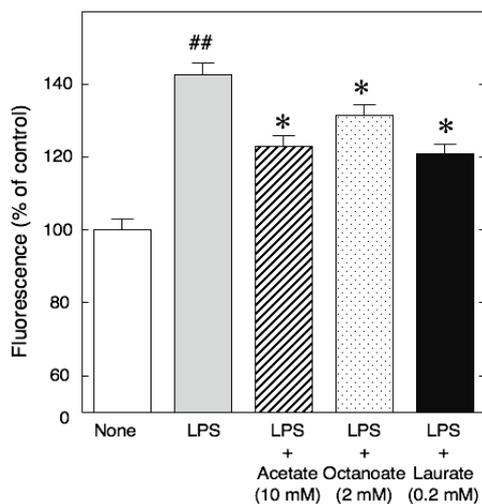


図 3 ROS 産生に対する脂肪酸の効果  
<sup>##</sup>p<0.01 vs none, <sup>\*</sup>p< 0.05 vs LPS.

(3) BV-2 細胞に FPI 刺激を施し 4 時間後に得られる細胞の NLRP3 タンパク発現は増加が認められた。さらに培養液中に放出された IL-1 $\beta$ 濃度も増加がみられ、インフラマソーム活性化が確認された。この活性化は酢酸 (10 mM) の前添加で抑えられた。

(4) 麻酔下で TBI を施したラットの大脳皮質を回収したところ、浮腫に加えて NLRP3 タンパク発現の増加がみられ、インフラマソーム活性化を確認した。予め GTA を経口投与することにより

脳内の酢酸濃度を上昇させた後、ラットに TBI を施したところ、NLRP3 タンパク発現の増加が抑制され浮腫も軽減された。

(5) もう一つのグリア細胞であるアストロサイトをを用い、結果 (1) に示す実験と同様の検討を加えた。LPS 添加後には NLRP3 タンパク発現増加、NO 産生増加、ROS 産生増加、IL-1 $\beta$ 増加および MAPKs 活性化がみられ、ミクログリア同様インフラマソームが活性化し炎症性反応の亢進が考えられた。しかしながら、ラウリン酸の添加により、これら炎症性反応は抑制されなかった。

(6) TBI 後にみられる脳浮腫にはグリア細胞のインフラマソームの活性化が関与することが明らかとなった。さらに酢酸などの短鎖脂肪酸によりこの活性化を抑えることが脳浮腫の軽減に繋がることが考えられた。しかしながら、ラウリン酸においてはミクログリアとアストロサイトでどちらも炎症を増悪させる方向に働く結果が得られており、中鎖脂肪酸についてはさらなる検討が必要と考えられる。

#### <引用文献>

- [1] Jayakumar AR, Panickar KS, Curtis KM, Tong XY, Moriyama M, Norenberg MD. Na-K-Cl cotransporter-1 in the mechanism of cell swelling in cultured astrocytes after fluid percussion injury. *J. Neurochem.*, 117: 437-448 (2011)
- [2] Moriyama M, Tong XY, Jayakumar AR, Norenberg MD. Roles of mitogen-activated protein kinases in the mechanism of oxidant-induced cell swelling in cultured astrocytes. *J. Neurosci. Res.*, 88: 2450-2458 (2010)
- [3] Jayakumar AR, Tong XY, Ruiz-Cordero R, Bregy A, Bethea JR, Bramlett HM, Norenberg MD. Activation of NF- $\kappa$ B mediates astrocyte swelling and brain edema in traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, 31: 1249-1257 (2014)
- [4] Heneka MT, et al., NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*, 493: 674-678 (2013)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nishimura Y, Moriyama M, Kawabe K, Satoh H, Takano K, Nakamura Y	4. 巻 43
2. 論文標題 Lauric acid alleviates neuroinflammatory responses by activated microglia: involvement of the GPR40-dependent pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 1723-1735
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-018-2587-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Moriyama M, Hashimoto A, Satoh H, Kawabe K, Ogawa M, Takano K, Nakamura Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 S-Equol, a major isoflavone from soybean, inhibits nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated rat astrocytes partially via the GPR30-mediated pathway.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Inflammation	6. 最初と最後の頁 8496973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2018/8496973	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Moriyama M, Fujitsuka S, Kawabe K, Takano K, Nakamura Y.	4. 巻 43
2. 論文標題 Zinc potentiates lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in cultured primary rat astrocytes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 363-374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-017-2431-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Moriyama M, Minamihata T, Jayakumar AR, Norenberg MD.	4. 巻 113
2. 論文標題 Acetate attenuates the astrocyte swelling and brain edema in severe liver failure.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 S37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14309/01.ajg.0000582268.34309.60	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takano K, Koarashi K, Kawabe K, Itakura M, Nakajima H, Moriyama M, Nakamura Y.	4. 巻 119
2. 論文標題 Insulin expression in cultured astrocytes and the decrease by amyloid beta.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 171-177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2017.10.017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takano K, Ogawa M, Kawabe K, Moriyama M, Nakamura Y.	4. 巻 43
2. 論文標題 Inhibition of gap junction elevates glutamate uptake in cultured astrocytes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 50-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-017-2316-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawabe K, Takano K, Moriyama M, Nakamura Y.	4. 巻 43
2. 論文標題 Microglia endocytose amyloid through the binding of transglutaminase 2 and milk fat globule EGF factor 8 protein.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 32-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-017-2284-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takano K, Ishida N, Kawabe K, Moriyama M, Hibino S, Choshi T, Hori O, Nakamura Y.	4. 巻 119
2. 論文標題 A dibenzoylmethane derivative inhibits lipopolysaccharide-induced NO production in mouse microglial cell line BV-2.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 126-131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2017.04.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takano K, Komada Y, Kawabe K, Moriyama M, Nakamura Y.	4. 巻 2 (5)
2. 論文標題 Exendin-4 increases extracellular superoxide dismutase expression in cultured astrocytes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Glob. Drugs Therap.	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15761/GDT.1000S1001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawabe K, Takano K, Moriyama M, Nakamura Y.	4. 巻 42
2. 論文標題 Amphotericin B increases transglutaminase 2 expression associated with upregulation of endocytotic activity in mouse microglial cell line BV-2.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 1488-1495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-017-2205-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawabe K, Takano K, Moriyama M, Nakamura Y.	4. 巻 42
2. 論文標題 Transglutaminases derived from astrocytes accelerate amyloid aggregation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2384-2391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-017-2258-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Moriyama M, Nishimura Y, Kurebayashi R, Minamihata T, Kawabe K, Takano K, Nakamura Y.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Acetate suppresses lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in primary rat microglia but not in BV-2 microglia cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1874467213666200420101048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Nishimura Y, Moriyama M, Kawabe K, Takano K, Nakamura Y.
2. 発表標題 Medium chain fatty acid attenuates lipopolysaccharide-induced NO production in cultured microglia.
3. 学会等名 第60回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西村恭徳、森山光章、高野桂、中村洋一
2. 発表標題 ココナッツ油主成分ラウリン酸によるミクログリア活性化の抑制
3. 学会等名 第160回日本獣医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakamura Y, Nishimura Y, Takano K, Moriyama M.
2. 発表標題 Medium-chain fatty acids attenuate neuroinflammatory responses by activated microglia.
3. 学会等名 XIV European meeting on glial cells in health and disease (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Moriyama M, Satoh H, Minamihata T, Takano K, Nakamura Y.
2. 発表標題 Butyrate augments nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated rat astrocytes.
3. 学会等名 Neuro2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Moriyama M, Minamihata T, Jayakumar AR, Norenberg MD.
2. 発表標題 Acetate attenuates the astrocyte swelling and brain edema in severe liver failure.
3. 学会等名 The 18th ISHEN meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高野 桂  (Takano Katsura)  (50453139)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授   (24403)	
研究分担者	中村 洋一  (Nakamura Yoichi)  (90180413)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・客員研究員   (24403)	