

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15034

研究課題名(和文) 生理活性脂質の作用制御に基づく脳内出血治療標的の探索

研究課題名(英文) Research for therapeutic targets for intracerebral hemorrhage based on the regulation of bioactive lipid mediators

研究代表者

脇岡 雅宣 (Masanori, HIJIOKA)

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号：50780061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳内出血時には血液が漏れ出すことで、血液成分や浸潤した免疫細胞によって脳組織傷害が引き起こされる。なかでも好中球の浸潤が病態を悪化させることが明らかであるため、好中球の浸潤制御に関わる生理活性脂質に注目した。その結果、脳内出血発症後にロイコトリエンB4の量が一過性に増加し、脳内出血病態の形成(ミクログリアの活性化、および好中球の浸潤)に関与することを見出した。また、アラキドン酸から代謝される生理活性脂質の一つであるリポキシンA4に注目した結果、リポキシンA4の受容体刺激によって脳内出血モデルマウスにおけるミクログリアの活性化や好中球の浸潤、および運動機能障害の発症を軽減させることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳内出血は脳血管が破れることで脳内に血液が漏れ出し、血液成分や浸潤した免疫細胞によって脳組織傷害が引き起こされる。発症後に傷害組織が修復されることはなく、一度発症すると永続的な予後不良を呈するため、著しいQOLの低下が問題となっている。現在のところ、脳組織傷害を緩和/修復させるような治療法は皆無であることから新規治療標的が必要である。本研究結果は、生理活性脂質の産生制御および作用制御が脳内出血発症後の組織傷害を軽減させ得ることを示しており、今後の治療方策の開発につながる重要な知見であると考えている。

研究成果の概要(英文)：We focused on the bioactive lipid mediators that regulate neutrophil migration activity, because leakage of blood constituents and immune cells, especially neutrophils worsen the severity of tissue damages in intracerebral hemorrhage (ICH) brain. We revealed that leukotriene B4 (LTB4) transiently increased, and LTB4 were involved in pathomechanisms of ICH such as microglial activation, and neutrophil migration. Furthermore, we focused on lipoxin A4 (LXA4), a bioactive lipid mediator that biosynthesis by 5-lipoxygenase as same as LTB4. LXA4 and its receptor agonist attenuated microglial activation, neutrophil infiltration, and motor deficits in ICH mice.

研究分野：薬理学、神経科学

キーワード：脳内出血 ロイコトリエンB4 リポキシンA4 ミクログリア 好中球

## 1. 研究開始当初の背景

脳内出血は脳実質内に血液が漏れ出す疾患であり、永続的かつ重篤な予後不良をもたらす。その病態形成過程においては血液の漏出に伴うリンパ球・マクロファージの浸潤、アストロサイトやミクログリアの活性化が起こり、最終的に神経細胞死が起こることが見出されている。過去の研究において、免疫抑制剤やミクログリアの活性化を抑制するミノサイクリン等様々な薬物が試されているものの、どれも実用に至っていないことから、これまでとは異なる治療戦略の創出が必要である。脳内出血に関する近年の基礎的知見として、好中球や単球に注目した研究成果が数々と報告されており、治療標的として期待されている。申請者の過去の研究において、好中球の浸潤を促す生理活性脂質であるロイコトリエン B<sub>4</sub> (leukotriene B<sub>4</sub>: LTB<sub>4</sub>) が脳内出血時に増加することや、LTB<sub>4</sub> 産生酵素阻害薬や LTB<sub>4</sub> 受容体遮断薬が好中球の浸潤を抑制し、病態軽減作用を示すことを明らかにしてきた (Hijioka M. *et al.*, 2017)。しかしながら、抗炎症作用をもつ生理活性脂質が脳内出血病態形成にどのように関与するかは未だ不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では LTB<sub>4</sub> をはじめとして種々の生理活性脂質およびその産生酵素・受容体に焦点をあて、脳内出血病態形成に対する関与を明らかにし、治療標的としての有効性を示すことを目標とした。なかでも、アラキドン酸をもとに生合成される生理活性脂質に着目し研究に着手した。脳内出血に関する基礎研究は以前と比較して多く目にするようになってきたが、世界的に見ると未だ研究者人口は少ない。さらに生理活性脂質との関連性という観点で見ると、研究代表者が注目する抗炎症性の生理活性脂質 (リポキシンやレゾルビン等) に注目した研究は皆無である。よって、本研究課題の成果により、脳内出血を、脂質代謝異常を伴う急性炎症性疾患として位置付けることで、新たな治療コンセプトの提供が可能になると考えた。

## 3. 研究の方法

(1) コラゲナーゼの投与によって惹起される脳内出血モデルマウスを用いて、脳内出血発症後の脳内におけるアラキドン酸の代謝変動を LC-MS/MS で経時的に調べた。

(2) 脳内出血発症後の組織傷害を誘導するメカニズムにおける LTB<sub>4</sub> の役割を調べた。研究代表者の過去の研究において LTB<sub>4</sub> が脳内出血病態を重篤化させることを見出した (Hijioka M. *et al.*, 2017)。しかしながら、病態を重篤化させる詳細なメカニズムは未解明であったため、LTB<sub>4</sub> の作用メカニズムの解明に取り組んだ。マウスミクログリア細胞株 BV-2 細胞に対して血液成分の一種であるトロンピンを処置し、ミクログリアの活性化状態および LTB<sub>4</sub> の産生に対する作用を調べた。続いてミクログリアの培養上清由来の走化性因子に対する好中球の反応を調べた。ヒト前骨髄性白血病 HL-60 細胞は *all-trans* retinoic acid (ATRA) 存在下で培養すると好中球様に分化する (differentiated HL-60 細胞: dHL-60 細胞)。この細胞に対して、トロンピンを処置した BV-2 ミクログリアの培養上清を処置することで、ミクログリア由来の因子が好中球の走化性に関与するか調べた。

(3) 抗炎症性生理活性脂質であるリポキシン A<sub>4</sub> (lipoxin A<sub>4</sub>: LXA<sub>4</sub>) およびその受容体アゴニストによる治療効果を調べた。BV-2 ミクログリアおよび dHL-60 細胞に対して LXA<sub>4</sub> を処置し、ミクログリアの活性化および dHL-60 細胞の走化性に与える作用を調べた。また、*in vivo* マウス脳内出血モデルに対して LXA<sub>4</sub> 受容体アゴニストである BML-111 [(5S,6R)-Methyl 5,6,7-trihydroxyheptanoate] を投与することで脳内出血モデルマウスの病態形成が緩和されるか調べた。

## 4. 研究成果

(1) 脳内出血惹起 0, 6, 12, 24, 72 時間後に脳を摘出し、血腫全体を含む 4 mm 幅の脳組織を LC-MS/MS に供した。その結果、出血惹起 6 時間後の早期において、シクロオキシゲナーゼによって生合成されるアラキドン酸代謝物が、一過性に減少した。一方で 5-リポキシゲナーゼによって生合成される LTB<sub>4</sub> は脳内出血惹起 12 時間後をピークとして著明な増加を示した。ELISA によって確認をした結果、LTB<sub>4</sub> は確かに 12 時間後をピークとして顕著な増加をすることが分かった。

(2) マウスミクログリア細胞株 BV-2 細胞に対してトロンピンを処置したところ、傷害性ミクログリアのマーカーである inducible nitric oxide synthase (iNOS) の mRNA およびタンパク質量が顕著に増加し、トロンピンによってミクログリアの活性化が誘導されることが示された。このとき培養上清中に放出された LTB<sub>4</sub> 量を測定したところ、トロンピン (30 U/mL) により LTB<sub>4</sub> の放出が増加することが分かった。このとき放出された LTB<sub>4</sub> がミクログリア自身の活性化状態に影響するか調べるために、LTB<sub>4</sub> 受容体である BLT1 の選択的アンタゴニストである U-75302 を共処置し、各種サイトカインの mRNA 発現量を調べた。その結果、トロンピンによって誘導さ

れる炎症性サイトカインの mRNA 量増加が U-75302 ( 10, 100 nM ) の共処置で抑制された。続いてミクログリアから放出された LTB<sub>4</sub> が好中球の遊走に關与するか、Transwell を用いて調べた。ATRA で好中球様に分化させた dHL-60 細胞を 3 μm 径の孔をもつメンブレンの上層に播種し、下層に BV-2 ミクログリアの培養上清を添加した。その結果、トロンピン ( 30 U/mL ) を処置したミクログリアの培養上清を下層に処置することで dHL-60 細胞の下層への遊走が促進された。このとき、U-75302 ( 100, 1,000 nM ) を下層に共処置すると dHL-60 細胞の下層への遊走が有意に抑制されたことから、ミクログリアが放出する LTB<sub>4</sub> が好中球の遊走を促すことが示された。

( 3 ) トロンピンによって活性化したミクログリアに対する LXA<sub>4</sub> の作用を調べた結果、トロンピンによって誘導される炎症性サイトカインの mRNA 量増加は LXA<sub>4</sub> の処置により抑制された。トロンピンによる炎症性サイトカインの産生亢進は nuclear factor-κB ( NF- B ) 経路を介するため、NF- B の核内移行に關する LXA<sub>4</sub> の作用を免疫染色によって調べた結果、LXA<sub>4</sub> はトロンピンによって誘導される NF- B p65 subunit の核内移行を抑制した。さらに、好中球の遊走に対する LXA<sub>4</sub> の作用についても調べた。dHL-60 細胞を Transwell の上層に播種し、下層にトロンピンで刺激した BV-2 ミクログリアの培養上清および LXA<sub>4</sub> を添加した。その結果、トロンピンを処置した BV-2 ミクログリアの培養上清で誘導される dHL-60 細胞の下層への遊走を LXA<sub>4</sub> ( 1-1,000 nM ) は処置濃度依存的かつ有意に抑制した。マウス脳内出血モデルに対する LXA<sub>4</sub> シグナルの作用を明らかにするため LXA<sub>4</sub> 受容体のアゴニストである BML-111 を連日投与した。その結果、BML-111 ( 1 mg/kg, i.v. ) は脳内出血時のミクログリアの活性化および好中球の浸潤を抑制し、脳内出血発症後に生じる運動機能障害を緩和するという結果を得た。

上記の結果を総括すると、( 1 ) 脳内出血時には 5-リポキシゲナーゼによって産生が制御される LTB<sub>4</sub> が著明に増加すること、( 2 ) 脳内出血時にはミクログリアから放出される LTB<sub>4</sub> がミクログリア自身の活性化を増強し、かつ好中球の遊走を促進することで病態を悪化させること、( 3 ) LTB<sub>4</sub> と同様に 5-リポキシゲナーゼを介して産生される抗炎症性生理活性脂質である LXA<sub>4</sub> により脳内出血の病態形成が緩和されること、を見出した。このことから 5-リポキシゲナーゼを介したアラキドン酸代謝物の産生を制御することが脳内出血病態を軽減させることが示唆され、脳内出血に対する新規治療標的として有用となる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>脇岡雅直, 懷理紗, 倉内祐樹, 久恒昭哲, 関貴弘, 古賀友紹, 横溝岳彦, 清水孝雄, 北村佳久, 香月博志. |
| 2. 発表標題<br>生理活性脂質の代謝制御に注目した脳内出血病態の解析                                 |
| 3. 学会等名<br>次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2018                                   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Futokoro R., Hijioka M. and Kitamura Y.   |
| 2. 発表標題<br>Effect of lipoxin A4 for pathology of intracerebral hemorrhage mediated by microglial activation. |
| 3. 学会等名<br>第92回 日本薬理学会年会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hijioka M., Futokoro R. and Kitamura Y.  |
| 2. 発表標題<br>Leukotriene B4 secreted by microglia promotes neutrophil invasion into hematoma of mice with intracerebral hemorrhage. |
| 3. 学会等名<br>第92回 日本薬理学会年会  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hijioka M., Futokoro R. and Kitamura Y.  |
| 2. 発表標題<br>Analysis of the functions of leukotriene B4 and lipoxin A4 to the neutrophil invasion into hematoma in vitro model of intracerebral hemorrhage |
| 3. 学会等名<br>Neuro2019 第42回 日本神経科学大会  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Hijioka M., Kurauchi Y., Hisatsune A., Seki T., Koga T., Kitamura Y., Yokomizo T., Shimizu T. and Katsuki H.          |
| 2. 発表標題<br>Leukotriene B4-BLT1 axis exacerbates neutrophil invasion and motor dysfunction after intracerebral hemorrhage in mice |
| 3. 学会等名<br>18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>脇岡雅宣, 懐理紗, 香月博志, 北村佳久.       |
| 2. 発表標題<br>脳内出血病態形成過程におけるロイコトリエンB4の機能解析 |
| 3. 学会等名<br>第135回日本薬理学会近畿部会              |
| 4. 発表年<br>2019年                         |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>懐理紗, 脇岡雅宣, 北村佳久.                       |
| 2. 発表標題<br>ミクログリアの活性化を介した脳内出血病態形成に対するリポキシンA4の作用解析 |
| 3. 学会等名<br>第69回日本薬学会関西支部大会                        |
| 4. 発表年<br>2019年                                   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>脇岡雅宣, 懐理紗, 香月博志, 北村佳久.              |
| 2. 発表標題<br>ロイコトリエンB4およびその受容体を標的とした脳内出血治療薬の創薬研究 |
| 3. 学会等名<br>第69回日本薬学会関西支部大会                     |
| 4. 発表年<br>2019年                                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Futokoro R, Hijioka M and Kitamura Y.   |
| 2. 発表標題<br>Stimulation of LXA4 receptor alleviates motor dysfunction in intracerebral hemorrhage model mice. |
| 3. 学会等名<br>第93回 日本薬理学会年会   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>懐理紗, 脇岡雅宣, 北村佳久.                 |
| 2. 発表標題<br>LXA4受容体刺激は脳内出血モデルマウスの運動機能障害を軽減する |
| 3. 学会等名<br>第93回 日本薬理学会年会                    |
| 4. 発表年<br>2020年                             |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>懐理紗, 脇岡雅宣, 北村佳久.                        |
| 2. 発表標題<br>抗炎症性生理活性脂質リポキシンA4の受容体刺激による脳内出血病態軽減作用の解析 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会 第140年会                            |
| 4. 発表年<br>2020年                                    |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

|         |                           |                       |    |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|