

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18362

研究課題名(和文)急性脳障害に対するエリスロポエチンの脳保護治療開発の基盤研究

研究課題名(英文)Basic research on neuroprotective erythropoietin treatment for acute brain disorders

研究代表者

田村 哲也(Tamura, Tetsuya)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師

研究者番号：90381889

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文): ミクログリア細胞株BV-2をLPSで刺激後、33.5℃の低温環境では炎症性サイトカイン、iNOSの発現、NF- κ B経路、の抑制や貪食能の低下がみられた。また、LPS刺激後BV-2細胞とニューロンの共培養では、低温環境でニューロンの傷害が抑制された。アストロサイトを低酸素・無糖状態にするとエリスロポエチン(EPO)遺伝子発現が亢進、低温状態ではEPOの発現が有意に上昇した。また、アストロサイトのEPO発現にはHIF2 α の寄与が大きかった。さらに、低酸素・無糖状態のニューロンに、低温状態のアストロサイトからのコンディショニングメディウムを添加するとニューロンのアポトーシスが抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミクログリア活性化調節に注目した脳保護の研究は少ない。今まで明らかにされていないEPOの神経保護効果のメカニズムを、ミクログリアに存在するEPORとの関係から明らかにすることが本研究の特色であり、非常に学術的独自性が高い。EPO製剤による神経保護は臨床応用へ安全に橋渡しができる。一方で、低温環境でのミクログリア活性抑制、アストロサイトからの内因性EPO増加を証明した。救急集中治療領域における脳低温療法の作用機序の解明、EPO治療との組み合わせという意味でも本研究の意義は大きい。

研究成果の概要(英文): After stimulating the microglial cell line BV-2 cells with LPS, the suppression of inflammatory cytokines, iNOS expression, and NF- κ B pathway were observed and phagocytosis was decreased in a low temperature environment of 33.5 °C. In addition, co-culture of BV-2 cells and neurons after LPS stimulation suppressed neuronal damage in a low temperature environment. EPO gene expression was enhanced when astrocytes were made hypoxic and sugar-free, and EPO expression was significantly increased at low temperatures. It was also suggested that HIF2 α contributed significantly to the expression of EPO in astrocyte. Furthermore, the addition of a condition medium from astrocytes in a low temperature environment to hypoxic and sugar-free neurons suppressed the apoptosis of the neurons.

研究分野：救急・集中治療

キーワード：エリスロポエチン ミクログリア 脳低温療法 脳保護 急性脳障害

1. 研究開始当初の背景

エリスロポエチン (EPO) は主に腎臓で産生される造血ホルモンである。貧血の治療薬として EPO 製剤が商品化され、広くそして比較的 safely に使用されている。近年、この EPO の受容体 (EPOR) が中枢神経で発現していることが明らかになり、EPO の神経保護作用が確認された (Juul et al. Pediatric Research 1998, Morishita et al. Neuroscience 1997)。また、中枢神経において EPO は主にグリアのひとつであるアストロサイトから分泌されることがわかっており、虚血低酸素状態における神経保護作用が注目されている。これまで申請者は、虚血低酸素状態からアストロサイトから分泌される EPO に注目し、EPO-EPOR シグナルの細胞保護作用を研究してきた。さらに、中枢神経系にミクログリアに EPOR の発現が多いことを世界に先駆けて発見した (Tamura et al. Brain Research 2017)。

ミクログリアは全グリアの 10-20% を占める免疫担当細胞である。刺激のない状況では、ミクログリアは正常組織の周囲に繊毛突起を出して絶えず移動して免疫を監視しているが、神経組織が炎症や変性などの障害を受けると活性化し、傷害の悪化に関与するタイプ (M1) と修復に関与するタイプ (M2) に変化する (Miron et al. Nat Neurosci 2013)。M1 型は主に炎症性サイトカインを産生し、M2 型は主に抗炎症性サイトカインを産生する。また、貪食にも 2 種類あり、傷害的な貪食と保護的な貪食があると言われている。明確な M1 タイプと M2 タイプへの活性制御機構は明らかになっていないが、申請者は、M1 型をすべて抑制することが良いということではなく、M1 と M2 のバランスが重要と考えている。

救急・集中治療領域において、外傷や脳血管障害や蘇生後低酸素による一次的脳障害はもちろん、頭蓋外疾患であっても低血圧や低酸素による二次的な脳障害を合併する症例は非常に多い。これらの脳傷害部位ではミクログリアが活性化している。傷害部位に集積したミクログリアは、死んだ細胞や異物を食作用により除去するという重要な機能を持つが、過剰に活性化したミクログリアは傷害的な貪食が亢進しており、また炎症性サイトカインを必要以上に放出し、逆に脳に傷害を与えることが多い。そこで、ミクログリアの活性化を適切なレベルに管理することができれば、急性期の脳障害を最小限にできると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、現在すでに貧血の治療薬として臨床的に安全に使用されている EPO の脳保護作用の新たな機序を解明し、最終的には脳保護治療薬として臨床応用することが目的である。申請者は、中枢神経系のミクログリアに EPOR の発現が多いことを発見しており、「EPO がミクログリアの活性化を調節し、神経保護作用を発揮する」という仮説の検証を行った。その結果、EPO によりミクログリアの産生する炎症性サイトカインが抑制され、ミクログリアの傷害的な貪食が抑制されることが明らかとなった (Tamura et al. Brain Research 2017)。

本研究では、さらなる EPO の脳保護作用機序の解明、そして救急・集中治療領域での EPO 製剤による新規の脳保護治療法を提示することを目的とする。

3. 研究の方法

ラット初代培養ミクログリアでの EPO の作用の確認

申請者はすでにミクログリア細胞株 BV-2 細胞を使用した *in vitro* の実験において、Lipopolysaccharide (LPS) 刺激で上昇した炎症性サイトカイン遺伝子は EPO により抑制され、LPS 刺激で亢進した貪食能が EPO によって抑制されることを確認した。本研究では、ラット初代培養ミクログリアで同様の実験を行い、この EPO 作用の再現を確認する。

蘇生後脳症に対する脳低温療法におけるミクログリアの役割の確認

ミクログリアの細胞株である BV-2 細胞を lipopolysaccharide (LPS) で刺激した後、37 の常温状態と 33.5 の低温状態にした。ミクログリアの活性化の指標として、炎症性サイトカイン、iNOS の発現、NF- κ B signal 経路、貪食能などを解析した。次に、LPS 刺激後の常温環境と低温環境にした BV-2 細胞とニューロンと共培養を行い、低温環境によってニューロンの傷害が抑制されるかどうかを解析した。

低温環境下におけるアストロサイトから分泌される内因性 EPO の検討

ラット大脳皮質由来アストロサイトおよびニューロン初代培養を用いて解析を行った。アストロサイトを低酸素・無糖状態にし、EPO 遺伝子発現を解析した。さらに低酸素・無糖状態にしたアストロサイトを、引き続き低温状態 (33.5) と常温状態 (37) で培養し比較した。

低温環境下におけるアストロサイトから分泌される内因性 EPO と hypoxia inducible factor (HIF)-1、HIF-2 の検討

低酸素・無糖状態にしたアストロサイトを、引き続き低温状態 (33.5) と常温状態 (37) で培養し、低温状態と常温状態で hypoxia inducible factor (HIF)-1、HIF-2 のタンパク増加

を検討した。

HIF-1a と HIF2a、どちらのサブタイプがアストロサイトの EPO 発現誘導により寄与しているかの解析

HIF-1a と HIF2a をそれぞれノックダウンしたアストロサイトを低酸素にさらすことでアストロサイトにおける EPO 発現誘導を確認した。

4 . 研究成果

前回、ラット初代培養ミクログリアの細胞は単離してしまうと増殖が悪かったため、他のグリア細胞と共培養をして増加させてからミクログリアを単離させたが、実験に必要な十分量の細胞を得ることができなかった。

低温環境では炎症性サイトカイン、inducible nitric oxide synthase (iNOS) の発現が抑制された。さらに低温環境では nuclear factor- B (NF- B) signal 経路の抑制や貪食能の低下がみられた。LPS 刺激後の常温環境と低温環境にした BV-2 細胞とニューロンと共培養を行い、低温環境ではニューロンの傷害が抑制された。低温環境でミクログリアの活性化が抑制され、ニューロンに保護的に働いたと考えられた。

アストロサイトを低酸素・無糖状態にすると EPO 遺伝子発現が亢進することを確認した。さらに低酸素・無糖状態にしたアストロサイトを、引き続き低温状態 (33.5) と常温状態 (37) で培養し比較した。低温状態では常温状態に比べて EPO の発現が有意に上昇していた。

低酸素・無糖状態にしたアストロサイトを、低温状態 (33.5) で培養すると hypoxia inducible factor (HIF)-1 、 HIF-2 のタンパク増加が起きた。

HIF-1a と HIF2a をそれぞれノックダウンしたアストロサイトを低酸素にさらすと、HIF2a をノックダウンしたアストロサイトにおいて EPO 発現誘導が抑制された。アストロサイトの EPO 発現においては HIF2a の寄与が大きいことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Toriuchi Kohki, Kakita Hiroki, Tamura Tetsuya, Takeshita Satoru, Yamada Yasumasa, Aoyama Mineyoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Prolonged astrocyte-derived erythropoietin expression attenuates neuronal damage under hypothermic conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12974-020-01831-3	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 Kimura Tomoka, Toriuchi Kohki, Kakita Hiroki, Tamura Tetsuya, Takeshita Satoru, Yamada Yasumasa, Aoyama Mineyoshi	4. 巻 41
2. 論文標題 Hypothermia Attenuates Neuronal Damage via Inhibition of Microglial Activation, Including Suppression of Microglial Cytokine Production and Phagocytosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 459 ~ 468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10571-020-00860-z	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田直哉、木村友香、鳥内阜暉、青木啓将、垣田博樹、田村哲也、竹下覚、山田恭聖、青山峰芳
2. 発表標題 低温培養はLPSによるミクログリアの神経傷害的な活性化を抑制する
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳥内阜暉、垣田博樹、青木啓将、田村哲也、竹下覚、山田恭聖、青山峰芳
2. 発表標題 低温培養はアストロサイトにおけるエリスロポエチン発現を持続させニューロンのアポトーシスを抑制する
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳥内臯暉、木村友香、垣田博樹、青木啓将、田村哲也、竹下覚、山田恭聖、青山峰芳
2. 発表標題 低温培養はミクログリアの過剰な炎症反応を鎮静し神経保護効果をもたらす
3. 学会等名 第138回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥内臯暉、木村友香、垣田博樹、青木啓将、田村哲也、竹下覚、山田恭聖、青山峰芳
2. 発表標題 低温培養はミクログリアの神経傷害的な活性化を抑制し神経保護効果をもたらす
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥内臯暉、木村友香、垣田博樹、青木啓将、田村哲也、竹下覚、山田恭聖、青山峰芳
2. 発表標題 低温培養はミクログリアの活性化を制御し神経細胞死を抑制する
3. 学会等名 第67回中部日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥内臯暉 垣田博樹 岩城壮一郎 田村哲也 山田恭聖 青山峰芳
2. 発表標題 低温培養によるアストロサイトのエリスロポエチン分泌亢進を介した神経保護効果
3. 学会等名 第13回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鳥内暉 垣田博樹 岩城壮一郎 田村哲也 山田恭聖 青山峰芳
2. 発表標題 低温培養はアストロサイト由来エリスロポエチンを増加させ神経細胞死を抑制する
3. 学会等名 第136回日本薬理学会近畿部会
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
研究協力者	青山 峰芳 (Aoyama Mineyoshi)		
研究協力者	祖父江 和哉 (Sobue Kazuya)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------