

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22813

研究課題名（和文）脳内炎症制御を基軸とする新たな脳卒中栄養学の確立

研究課題名（英文）Development of novel stroke-oriented nutrition science based on the regulation of neuroinflammation

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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：食事性に摂取されるビタミンおよびアミノ酸の代謝物等が脳内出血の病態に及ぼす影響について実験動物を用いて解析した結果、ビタミンA類の強化補給が脳内出血後の運動機能障害を軽減することを明らかにした。また、ビタミンAと関連する複数の化合物の神経保護効果および脳内炎症応答抑制効果のメカニズムの一端を明らかにした。さらに、アミノ酸であるトリプトファンの代謝物が脳内出血病態に対して治療効果を発揮することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、脳内炎症の制御に焦点を当てて食事由来成分の効果を明らかにすることで、脳疾患治療に最適化された栄養管理・強化補給法の確立に資することを目指した。脳内出血に対する食事性強化補給法の確立において重要となるビタミンおよびアミノ酸代謝物の効力の一端を明らかにしたことで、カロリー補給や体液平衡維持といった従来の栄養管理の枠組みを超えた新たな視点からの「脳卒中栄養学」の創出に寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：This study addressed the effects of metabolites of dietary vitamins and amino acids on the pathogenic events of intracerebral hemorrhage (ICH) in experimental animals. Results showed that supplementation of vitamin A ameliorated motor dysfunction associated with ICH. Mechanisms of neuroprotection and suppression of neuroinflammation by several vitamin A-related compounds were also revealed in this study. Additionally, a tryptophan metabolite was found to produce therapeutic effect on ICH.

研究分野：神経薬理学・健康科学

キーワード：脳神経疾患 ビタミンA レチノイド トリプトファン 神経保護 脳内炎症

### 1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患は本邦の死因の第3位に位置し、発症後に生存した場合も運動機能や認知機能などに後遺症の残る率の高い疾患群である。なかでも脳血管の破綻を引き金とする脳内出血は、高血圧治療の進歩に伴って患者数が1970年代以降減少してきたが、人口の高齢化とともに患者数は再び増加に転じており、適切な医療介入法の確立が望まれている。しかし、降圧薬の点滴静注（推奨グレードB）を除いて推奨される薬物療法の選択肢は存在しない（脳卒中治療ガイドライン）。そのため、新規治療薬の開発に向けた努力が必要であると同時に、非薬物療法の一層の充実化も急務である。非薬物療法については、理学・作業療法に基づくリハビリテーションが一定の効果をもたらす一方、長期的な予後改善を見据えた食事・栄養管理も重要と考えられる。しかし、従来の栄養管理は生命維持に直結する熱量補給や体液平衡維持のみを主眼としており、脳組織病理の積極的な改善を意識した検討はほとんど行われていない。

研究代表者はこれまで、脳内出血の病理形成機序の解明および脳内出血の治療薬候補化合物の探索に関する研究を展開し、以下のような知見を得てきた。

- ・血中に含まれるトロンビンの脳実質内への流入が脳内出血病理の誘導において中心的な役割を担っており、トロンピンを引き金とする脳内のミクログリア・浸潤マクロファージの炎症活性化が病巣拡大に大きく寄与する (①~③)。
- ・レチノイン酸受容体(RAR)やニコチン性アセチルコリン受容体の作動薬などの脳組織内炎症応答を抑制する薬物が脳内出血病態への治療効果を発揮する (④~⑥)。
- ・レチノイン酸受容体やビタミンD受容体等の核内受容体のリガンドは、ミクログリア系BV-2細胞の炎症性シグナル伝達を負に制御することによってサイトカイン・ケモカインの産生を抑制する (⑦⑧)。
- ・末梢血からの脳組織内への好中球の浸潤を抑制するCXCR1/2遮断薬やロイコトリエンB<sub>4</sub>受容体遮断薬等が、脳内出血に伴う脳組織炎症応答および運動機能障害を抑制する (⑨⑩)。

以上の検討を通じて、脳内の炎症応答を制御する脂溶性ビタミン関連の核内受容体リガンドが脳内出血予後改善に有効である可能性を明らかにした他、末梢血由来の細胞に起因する炎症関連応答の抑制も重要な治療戦略であることを見出したことにより、脳内炎症の制御に焦点を当てて経口的／経腸的に適用される機能性成分の効力を明らかにすることで、脳疾患治療に最適化された栄養管理・強化補給を確立し、新たな視点からの「脳卒中栄養学」を創出することができると考えた。

### 2. 研究の目的

脳内マクロファージ様細胞であるミクログリアは、健常時・病態時の脳組織の恒常性の制御において重要な役割を担う。また脳卒中時には、末梢血から脳内に浸潤する好中球、単球／マクロファージ、Tリンパ球も炎症応答に関与し、脳組織の損傷・修復過程を左右する。炎症応答は組織損傷拡大と組織修復促進の二面性を持ち、特定の遺伝子群の発現のON/OFFによるマクロファージ・ミクログリアの表現型の遷移や

好中球・Tリンパ球の分化調節の動向によって病理像が大きく変化する。本研究はこれらのごとを踏まえ、食事性成分あるいはその代謝物が、核内受容体ファミリーをはじめとするリガンド依存性転写因子の活性に影響を及ぼすことなどによって、脳内炎症応答に関わる細胞群の分化や機能発現を制御して脳内出血病態の改善に寄与する可能性を検証すること、およびそれらの検討を通じて脳卒中後の治療介入に資する新たな「脳卒中栄養学」の概念を確立することを目的とした(図1)。

### 3. 研究の方法

(1) In vivo 脳内出血モデルを用いた検討：8~10週齢雄性ICRマウス脳の内包領域に接する片側線条体にコラゲナーゼを微量投与することで出血を誘発し、改変limb-placing試験およびビーム歩行試験により運動機能障害を評価した。また7テスラMRIによるT2強調画像から血腫体積を定量した。出血後の脳組織については、RT-PCRによる炎症性サイトカイン・ケモカインのmRNA量の測定を行った他、免疫組織化学により血腫内の神経細胞数および好中球浸潤数、血腫周縁部の活性化型ミクログリア／マクロファージおよびアストロサイト数、芳香族炭化水素受容体(AhR)の発現分布等を評価した。薬物は、出血誘発3時間後から24時間おきに胃ゾンデを用いて計3回経腸投与した。

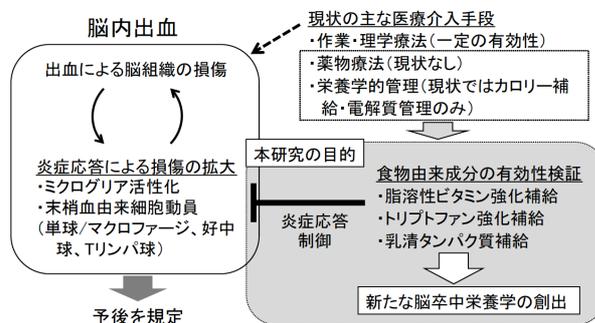


図1. 本研究の概要

(2) 培養脳組織切片を用いた検討: Wistar/ST 系ラット新生仔脳より大脳皮質と線条体を含む冠状切片を作成し、多孔質膜上に静置して 14 日間培養維持した後、血中プロテアーゼであるトロンビン(100 U/ml)を 72 時間処置した。被験化合物等は、トロンビン処置の 24 時間前に処置し、トロンビン処置開始 72 時間後に propidium iodide 染色により細胞死・組織傷害の程度を定量評価した。また、トロンビン処置開始 48 時間後の組織切片を用いて、蛍光免疫組織化学によりミクログリアの分布と活性化状態、NF- $\kappa$ B の核内移行の程度についての評価も行った。さらに、処置後の組織を回収して RT-PCR による脳由来神経栄養因子(BDNF)および TrkB の mRNA 発現量を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 脳内出血病態に対する脂溶性ビタミン強化補給の効果検証: 研究代表者は以前、レチノイン酸の経口投与が脳内出血病態を改善すること (11) や、活性型ビタミン D<sub>3</sub> が BV-2 細胞の活性化を抑制すること (7) を報告している。そこで、レチノイン酸の生合成材料であるビタミン A (パルミチン酸レチニル)、および活性型ビタミン D<sub>3</sub> の前駆体であるビタミン D<sub>3</sub> (コレカルシフェロール) の経腸補給の効果を検証した。各ビタミンの投与量は末梢組織での効果を評価した既報に基づき、ビタミン A については通常摂餌での摂取量の約 20 倍(25 mg/kg)、ビタミン D<sub>3</sub> については通常摂餌での摂取量の約 10 倍(0.1 mg/kg)に設定した。その結果、ビタミン A 補給群では 2 種類の運動機能評価試験において対照群と比較して有意な改善が認められた (図 2)。また、出血誘発 3 日後の脳組織の病理像を免疫組織化学により評価した結果、ビタミン A 補給は血腫周縁部におけるミクログリア/マクロファージやアストロサイトの形態学的活性化には著明な影響を与えなかったものの、血腫中心部における生存神経細胞数を有意に増加させることが明らかになった。さらに、同様の投与条件下でビタミン A 類縁化合物である直鎖型レチノイドの効果についても検証し、ビタミン A と同様の運動機能改善効果と神経細胞保護効果に加え、血腫周縁部における活性化型ミクログリアの増加抑制効果を認めた。一方でビタミン D<sub>3</sub> については、運動機能障害レベルや脳組織病理像 (ミクログリア/マクロファージ、アストロサイト、神経細胞) に対する有意な効果が認められなかった。

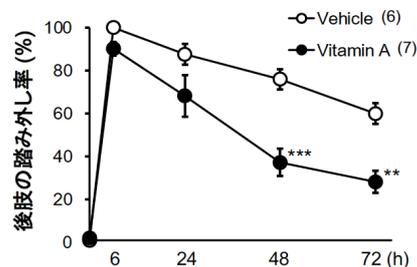


図 2. 脳出血に伴う運動機能障害に対するビタミン A の効果。グラフはビーム歩行試験における後肢の踏み外し率を示す。\*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 vs. vehicle (two-way ANOVA followed by Bonferroni test)。

(2) In vitro 実験系を用いたビタミン A 関連化合物の作用解析: トロンビンは、脳内出血後の脳組織の損傷や炎症応答を惹起する重要な因子として知られている (1)。上記の in vivo での結果を踏まえて、ビタミン A 関連化合物の脳組織保護効果を解析する目的で、培養脳組織切片におけるトロンビン毒性を指標とする検討を行った。新生仔ラット脳より作成した大脳皮質-線条体の培養組織切片にトロンビンを処置すると、大脳皮質領域における細胞死と線条体領域の著明な萎縮が誘導された。これらの病理変化は、RAR の内因性リガンドである全トランスレチノイン酸 (10 - 20  $\mu$ M) およびその前駆体であるビタミン A (レチノール; 20 - 50  $\mu$ M) によって抑制された (図 3)。同様の効果は、直鎖型レチノイドや RAR  $\alpha/\beta$  アゴニストである Am80 (1  $\mu$ M) にも認められた。細胞・組織保護作用の機序についてさらに解析を進めたところ、レチノイド化合物 (Am80 および直鎖型レチノイド) の大脳皮質細胞死抑制効果は、BDNF の受容体である TrkB だけでなく複数のセリンスレオニンキナーゼを広範に阻害する K252a の共処置によって消失した。ただし、これらのレチノイドによって BDNF および TrkB の mRNA 発現量は影響を受けなかったことから、K252a によって阻害される TrkB 以外のキナーゼがレチノイドの保護効果に寄与することが推察された。一方、NF- $\kappa$ B 阻害薬である Bay11-7082 はトロンビンにより誘発される線条体領域の萎縮を抑制したが、大脳皮質神経細胞死には影響を及ぼさなかった。また、トロンビン処置後に見られる線条体領域のミクログリアの活性化およびミクログリアにおける NF- $\kappa$ B の核内移行は、レチノイドおよび Bay11-7082 によって抑制された。これらの結果は、ビタミン A 関連化合物が脳部位毎に異なる作用機序を介して組織保護効果を発揮することを示唆している。

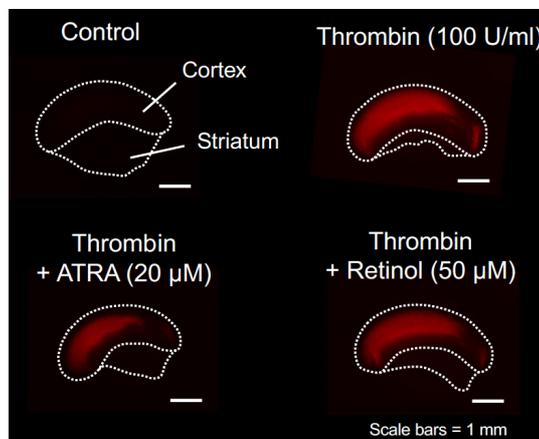


図 3. トロンビンによるラット培養脳組織切片の傷害に対する全トランスレチノイン酸(ATRA)およびレチノールの効果の典型例。大脳皮質(cortex)の傷害は propidium iodide の蛍光、線条体(striatum)の傷害は組織の萎縮によって示される。

(3) 脳内出血病態に対するトリプトファン代謝物の効果検証: 腸内細菌によって生成される複数のトリプトファン代謝物が、リガンド依存性転写因子である AhR に対する作動薬活性を有しており、肝臓の炎症応答を抑制することが近年報告されている(12)。一方で、AhR の発現は脳内のミクログリアやアストロサイトにも認められ、それらの細胞の炎症性活性化を抑制することなども知られている(13)。そこで、天然トリプトファン代謝物の一つであり AhR 作動薬活性を有する 3,3'-ジインドリルメタン(DIM)のマウス脳内出血病態モデルに対する効果について解析を行った。比較対象として、実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルに対して AhR 刺激効果を介して治療効果を発揮することが報告されている laquinimod(14)についても併せて効果の検証を行った。Laquinimod(25 mg/kg)と DIM(250 mg/kg)はいずれも出血誘発 24 時間後の血腫体積に影響を及ぼさなかったが、2 種類の運動機能評価試験において対照群と比較して有意な改善効果を示した。また、出血誘発 3 日後における血腫中心部の残存神経細胞数を有意に増加させる一方、血腫周縁部の活性化型ミクログリア/マクロファージ(図 4)および活性化型アストロサイト、血腫中心部の浸潤好中球をいずれも著明に減少させた。細胞種特異的マーカーとの二重免疫染色の結果、AhR が血腫周縁部の活性化型ミクログリア/マクロファージおよび血腫中心部の浸潤好中球に発現していることが確認された。さらに炎症性サイトカイン/ケモカインに関する RT-PCR の結果、DIM が出血誘発 6 時間後の IL-6 および CXCL1 の mRNA 発現を有意に抑制することが明らかになった。これらの結果は、AhR 作動薬としての特性を有するトリプトファン代謝物が脳内出血病態を改善し得ることを示している。

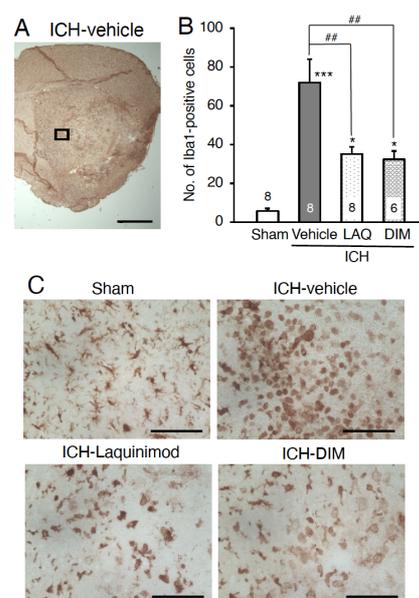


図 4. 脳内出血に伴うミクログリア/マクロファージ活性化に対する DIM および laquinimod(LAQ)の効果。(A) 出血誘発 3 日後の Iba1 免疫組織化学の典型例。細胞計数に用いたエリアを黒枠で示す。Scale bar = 1 mm. (B) 各処置群の Iba1 陽性細胞数の定量結果。\* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001 vs. vehicle; ## P < 0.01 (one-way ANOVA followed by Tukey test). (C) 各群の血腫周縁部の拡大像の典型例。Scale bar = 100 μm.

(4) まとめ: 食事性に摂取されるビタミン・アミノ酸の代謝物および類縁化合物が脳内出血病態に及ぼす影響について多角的に解析した。その結果、ビタミン A 類の強化補給が神経保護効果を伴って脳内出血後の運動機能改善効果をもたらすことを明らかにした。また、培養脳組織切片での検討により、ビタミン A の活性代謝物と推定される全トランスレチノイン酸およびそれと関連する RAR リガンドが神経保護効果および炎症応答抑制効果を発揮することを明らかにし、その作用機序の一端を明らかにした。アミノ酸関連化合物については、トリプトファン代謝物的一种である DIM が脳内出血病態に対する治療効果を発揮することを見出し、その効果の機序として AhR の刺激による脳内炎症応答の抑制が関わることを示唆する結果を得た。これらの知見は、出血性脳卒中治療に最適化された栄養管理・強化補給法の確立を目指す上で重要となる食事性成分の効力の一端を明らかにし、脳卒中後の治療介入に資する基礎情報をもたらすとともに、カロリー補給や体液平衡維持といった従来の栄養管理の枠組みを超えた新たな視点からの「脳卒中栄養学」の創出に寄与するものである。

#### <引用文献>

- ① Fujimoto S et al. Neurobiol Dis. 22:130-142, 2006
- ② Ohnishi M et al. Exp Neurol. 206:43-52, 2007
- ③ Ohnishi M et al. J Neurosci Res. 88:2155-2164, 2010
- ④ Matsushita H et al. J Cereb Blood Flow Metab. 31:222-234, 2011
- ⑤ Hijioka M et al. J Pharmacol Exp Ther. 338:741-749, 2011
- ⑥ Hijioka M et al. Neuroscience. 222:10-19, 2012
- ⑦ Dulla YA et al. Neurochem Res. 41:2848-2858, 2016
- ⑧ Takaoka Y et al. Int Immunopharmacol. 38:367-376, 2016
- ⑨ Anan J et al. J Neurosci Res. 92:1024-1034, 2014
- ⑩ Hijioka M et al. J Pharmacol Exp Ther. 360:399-408, 2017
- ⑪ Matsushita H et al. Eur J. Pharmacol. 683:125-131, 2012
- ⑫ Krishnan S et al. Cell Rep. 23:1099-1111, 2018
- ⑬ Lee YH et al. Glia 63:1138-1154, 2015
- ⑭ Kaye J et al. Proc Natl Acad Sci USA. 113:E6145-E6152, 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計21件（うち査読付論文 21件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Yoshimizu A, Kinoshita K, Ichihara Y, Kurauchi Y, Seki T, Katsuki H.	4. 巻 362
2. 論文標題 Hydroxychloroquine improves motor function and affords neuroprotection without inhibition of inflammation and autophagy in mice after intracerebral hemorrhage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Neuroimmunol.	6. 最初と最後の頁 577786
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jneuroim.2021.577786	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 Katsuki H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Nuclear receptors of NR1 and NR4 subfamilies in the regulation of microglial functions and pathology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacol Res Perspect.	6. 最初と最後の頁 e00766
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/prp2.766	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 Matsumoto K, Kinoshita K, Hijioka M, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Masuda T, Ohtsuki S, Katsuki H.	4. 巻 170
2. 論文標題 Nicotine promotes angiogenesis in mouse brain after intracerebral hemorrhage.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurosci Res.	6. 最初と最後の頁 284-294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2020.07.003	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 Hijioka M, Futokoro R, Ohto-Nakanishi T, Nakanishi H, Katsuki H, Kitamura Y.	4. 巻 85
2. 論文標題 Microglia-released leukotriene B4 promotes neutrophil infiltration and microglial activation following intracerebral hemorrhage.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int Immunopharmacol.	6. 最初と最後の頁 106678
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.intimp.2020.106678	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 Matsumoto K, Kinoshita K, Yoshimizu A, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Katsuki H.	4. 巻 342
2. 論文標題 Laquinimod and 3,3'-diindolylethane alleviate neuropathological events and neurological deficits in a mouse model of intracerebral hemorrhage.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neuroimmunol.	6. 最初と最後の頁 577195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2020.577195	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 Noda D, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Katsuki H.	4. 巻 142
2. 論文標題 Interactions between rat cortico-striatal slice cultures and neutrophil-like HL60 cells under thrombin challenge: Toward elucidation of pathological events in intracerebral hemorrhage.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci.	6. 最初と最後の頁 116-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.12.006	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 -

〔学会発表〕 計36件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 木下 慶大、吉水 文香、小谷 俊介、倉内 祐樹、関 貴弘、香月 博志
2. 発表標題 マウス脳内出血病態に対するNurr1リガンドの効果比較
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中西 咲乃、倉内 祐樹、関 貴弘、木村 泰之、鈴木 正昭、鈴木 恵一、古山 浩子、香月 博志
2. 発表標題 In vitro脳内出血病理モデルに対するレチノイドの組織保護効果
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉水 文香、木下 慶大、松本 倅政、倉内 祐樹、関 貴弘、香月 博志
2. 発表標題 マウス脳内出血病態に対するヒドロキシクロロキンの作用
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下 慶大、吉水 文香、小谷 俊介、倉内 祐樹、関 貴弘、香月 博志
2. 発表標題 マウス脳内出血病態に対するNurr1作動薬の作用比較
3. 学会等名 第73回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 香月博志、木下慶大、吉水文香、小谷俊介、倉内祐樹、関貴弘
2. 発表標題 マウス脳出血病態に対するNurr1リガンドの作用比較
3. 学会等名 日本レチノイド研究会第31回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田 祐太、松本 倅政、倉内 祐樹、関 貴弘、香月 博志
2. 発表標題 ミクログリア系BV-2細胞におけるサイトカイン・ケモカイン発現に対するトリプトファン代謝物の作用比較
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉水 文香、木下 慶大、松本 倅政、倉内 祐樹、関 貴弘、香月 博志
2. 発表標題 脳内出血モデルマウスに対するヒドロキシクロロキンの治療効果
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本倅政、木下慶大、吉水文香、倉内祐樹、関貴弘、香月博志
2. 発表標題 脳内出血モデルマウスに対するアリル炭化水素受容体リガンドの治療効果
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 香月 博志
2. 発表標題 中枢神経系の病態生理とレチノイドによる治療の可能性
3. 学会等名 日本レチノイド研究会第30回記念学術集会（招待講演）
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	関 貴弘  (Seki Takahiro)		

6. 研究組織（つづき）

	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	倉内 祐樹  (Kurauchi Yuki)		

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			
米国	Massachusetts General Hospital			