

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19752

研究課題名(和文)アルツハイマー病に対するプロスタグランジン受容体阻害薬を用いた治療の検討

研究課題名(英文)A study of the effect of EP receptor inhibitors on Alzheimer's disease

研究代表者

長野 貴之(Nagano, Takayuki)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：10368516

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): Prostaglandin E2 (PGE2)はミクログリアのinterferon- γ (IFN- γ)による一酸化窒素の遊離を増強した。またPGE2の受容体のアゴニストとアンタゴニストを用いた検討から、PGE2のミクログリアのIFN- γ による一酸化窒素遊離増強作用はEP2受容体を介しているものであった。PGE2はミクログリアの貪食なども抑制していることから、PGE2シグナルはアルツハイマー病を悪化させている可能性がある。したがって、PGE2シグナルを抑制することはアルツハイマー病の改善につながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文): Prostaglandin E2 (PGE2) potentiated interferon- γ (IFN- γ)-induced nitric oxide production in cultured rat microglia. Instead of PGE2, EP2 agonist, butaprost, enhanced IFN- γ -induced nitric oxide production, and EP2 antagonist, TG4-155, reversed the effect of PGE2 on IFN- γ -induced nitric oxide production. These results suggest that PGE2 activates EP2 receptor, which potentiates IFN- γ -induced nitric oxide production. PGE2 is also reported to reduce phagocytosis of amyloid- β in microglia, indicating that Alzheimer's disease is exacerbated by PGE2 signaling. It is, therefore, suggested that the inhibition of PGE2 signaling is a potential strategy for the treatment of Alzheimer's disease.

研究分野：神経科学

キーワード：ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

ミクログリア

ミクログリアはアストロサイトや神経細胞などと共に脳を構成する細胞の1つである。ミクログリアは脳内における免疫担当細胞として知られ、遊走 (migration)、貪食 (phagocytosis)、増殖 (proliferation)、サイトカイン遊離 (cytokine release) などの細胞機能 (microglial function) を持つ (*J. Biochem. (Tokyo)*, **130**, 169-175, 2001; *Glia*, **53**, 67-73, 2006)。

ミクログリアとアルツハイマー病

アルツハイマー病アミロイドタンパクの沈着と、それに伴う神経細胞死によっておこる認知症である (*Science*, **297**, 353-356, 2002)。アミロイドタンパク沈着の周辺にはミクログリアの集積が確認されており、このミクログリアはアミロイドタンパクを貪食し、除去していると考えられている (*Brain Res. Rev.*, **48**, 234-239, 2005)。また、ミクログリアの遊走が阻害されると、ミクログリアのアミロイドタンパクへの集積がなくなり、アミロイドタンパク沈着が増加すると報告されている (*Nat. Med.*, **13**, 432-438, 2007)。一方、アミロイドタンパクによりミクログリアは腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) や一酸化窒素 (nitric oxide, NO) といった細胞障害性因子を産生するようになり、このことが神経細胞を死に至らしめるとも考えられている (*J. Neurosci.*, **25**, 2566-2575, 2005; *J. Neurosci.*, **27**, 5394-5404, 2007)。したがって、ミクログリアのアミロイドタンパク貪食や遊走を亢進させ、細胞障害性因子の遊離を抑制すると、アルツハイマー病を治療できる可能性がある。

アルツハイマー病と prostaglandin E₂ (PGE₂)

ヒトのアルツハイマー病患者の脳脊髄液中の PGE₂ 量は健常者に比べて多く (*Neurology*, **53**, 1495-1498, 1999)、PGE₂ 合成に関わる COX-2、mPGES-1 の発現量も上昇している (*Neuroscience*, **87**, 319-324, 1998; *Alzheimers Dement.*, **4**, 6-13, 2008)。アルツハイマー病のモデル動物である APP トランスジェニックマウスにおいては、PGE₂ 受容体の一つである EP2 の発現量が上昇している (*Ann. Neurol.*, **64**, 304-314, 2008)。また、COX 阻害薬である ibuprofen はアミロイドタンパクの沈着を抑制し (*J. Neurosci.*, **23**, 7504-7509, 2003)、EP2 ノックアウトによってもアミロイドタンパクの沈着が抑制されている (*J. Neurosci.*, **25**, 10180-10187, 2005)。これらの報告から、アルツハイマー病に PGE₂ が関与している可能性は高いと考えられる。

2. 研究の目的

PGE₂ は EP2 を介して培養ミクログリアのアミロイドタンパク貪食を減少させた (*Brain Res.*, **1323**, 11-17, 2010)。また、PGE₂ は EP2 を介して培養ミクログリアの ATP による遊走も減少させた (*Brain Res.*, **1221**, 1-5, 2008)。これらの研究成果から、PGE₂ は EP2 を介してミクログリアに作用し、アルツハイマー病を悪化させている可能性があると考えられる。したがって、アルツハイマー病の症状を改善するためには、PGE₂ のミクログリアに対する作用を阻害することが必要である。そのため、EP2 阻害薬の使用が有効である可能性がある。アルツハイマー病と PGE₂ とミクログリアとの関係をさらに調べるために、PGE₂ のミクログリアの一酸化窒素遊離に対する効果の検討を行った。

3. 研究の方法

2-3 日齢のラット大脳皮質よりグリア細胞を調製し、14-28 日間の培養後、ミクログリアを単離培養した。培養ミクログリアに interferon- γ (IFN- γ) や lipopolysaccharide (LPS) を処置した後、PGE₂ などを 24 時間処置した。薬物処置後の細胞培地に含まれる亜硝酸量を Griess 法で測定した。亜硝酸を細胞が遊離した一酸化窒素由来のものと考えた。また細胞のタンパクも回収し、誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) の発現量をウエスタンブロットで検出した。GAPDH の発現量も検討し、その発現量を内部標準として利用して定量化した。

4. 研究成果

PGE₂ はミクログリアの IFN- γ による一酸化窒素遊離を増強する

PGE₂ のミクログリアの一酸化窒素遊離に対する影響について検討した。ミクログリアの一酸化窒素の遊離は、IFN- γ を 24 時間処置することにより誘導された。この IFN- γ による一酸化窒素の遊離は PGE₂ により用量依存的に増強され、 10^{-6} M 以上の濃度で統計的な差が見られた (図 1A-B)。PGE₂ 自身は 10^{-5} M までミクログリアの一酸化窒素の遊離に影響を与えなかった。また IFN- γ は iNOS の発現も誘導したが、この IFN- γ による iNOS 発現誘導も PGE₂ により用量依存的に増強された (図 1E-H)。一方 IFN- γ のかわりに LPS もミクログリアの一酸化窒素遊離を誘導したが、この LPS による一酸化窒素の遊離には PGE₂ は影響を与えなかった (図 1C-D)。以上の結果から、IFN- γ は iNOS 発現を誘導することで一酸化窒素遊離を増加させること、また、この IFN- γ による一酸化窒素の遊離は PGE₂

により増強されることが示唆された。

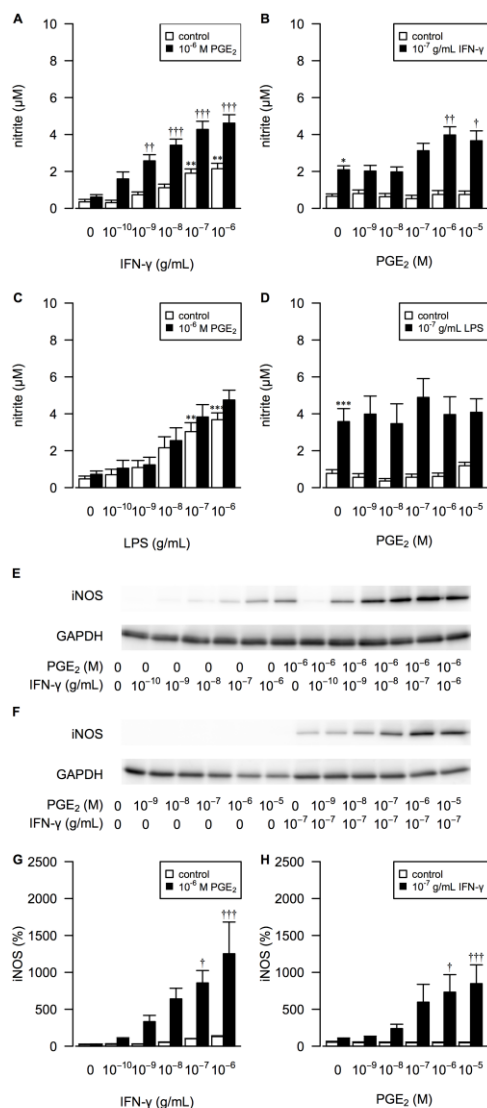


図1 PGE₂のミクログリアの一酸化窒素遊離に対する影響

PGE₂のIFN-γによる一酸化窒素遊離に対する増強作用はEP2受容体を介する

PGE₂のIFN-γによる一酸化窒素遊離に対する増強作用がどの受容体を介しているのかについて検討するため、EP受容体のアゴニスト、アンタゴニストのIFN-γによる一酸化窒素遊離の増加に対する作用について検討した。EP受容体のアゴニスト、アンタゴニストは10⁻⁶Mで検討した。アゴニストを用いた検討においては、EP2アゴニストのbutaprostはIFN-γによる一酸化窒素遊離の増加を増強したが、EP1アゴニストの17-phenyl trinor PGE₂、EP3アゴニストのsulprostone、EP4アゴニストのL-902,688は影響を与えなかった。アンタゴニストを用いた検討においては、EP2アンタゴニストのTG4-155はPGE₂のIFN-γによる一酸化窒素遊離に対する増強作用を抑制したが、EP1アンタゴニストのSC-51322、

EP3アンタゴニストのL-798,106、EP4アンタゴニストのGW627368XはPGE₂のIFN-γによる一酸化窒素遊離に対する増強作用に影響を与えなかった。以上の結果から、PGE₂はEP2受容体を活性化することで、IFN-γによる一酸化窒素遊離の増強作用を誘導することが示唆された。

PGE₂はIFN-γによるsignal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)のリン酸化に対して影響を与えない

IFN-γはSTAT1のTyr701をリン酸化するが、LPSはリン酸化しない。またこのSTAT1のリン酸化は一酸化窒素の遊離に関連があることがこれまでに報告されている。そこでIFN-γによるSTAT1のリン酸化促進作用にPGE₂が影響を与えるかどうかをウエスタンブロッティングにて検討した。IFN-γをミクログリアに1時間処置すると、Tyr701がリン酸化されたSTAT1が検出されたが、このリン酸化STAT1の発現量はPGE₂による影響を受けなかった。したがって、PGE₂はIFN-γによるSTAT1のリン酸化に影響を与えないことが示唆された。

プロスタノイド受容体アゴニストのうちPGE₂のみがミクログリアのIFN-γによる一酸化窒素遊離を増強する

PGE₂以外のプロスタノイド受容体アゴニストのIFN-γによる一酸化窒素遊離の増加に対する作用について検討した。他のプロスタノイド受容体アゴニストは10⁻⁶Mで使用した。PGD₂、PGF_{2α}、iloprost、U-46119はいずれもIFN-γによる一酸化窒素遊離の増加に対して影響を与えなかった。したがって、IFN-γによる一酸化窒素の遊離はプロスタノイド受容体アゴニストの中ではPGE₂のみにより増強されることが示唆された。

今回の結果から、アルツハイマー病においてもミクログリアの一酸化窒素遊離はPGE₂により調節されている可能性が考えられる。PGE₂はミクログリアの食食なども抑制していることから、PGE₂シグナルはアルツハイマー病を悪化させている可能性がある。したがって、PGE₂シグナルを抑制することはアルツハイマー病の改善につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1件)

- ① Takayuki Nagano, Ryo Nishiyama, Ayaka Sanada, Yukiko Mutaguchi, Anna Ioku, Hirohisa Umeki, Satoshi Kishimoto, Daisuke Yamanaka, Shinya H. Kimura, and Motohiko Takemura, Prostaglandin E₂

potentiates interferon- γ -induced nitric oxide production in cultured rat microglia. *J. Neurochem.*, **140**, 605-612, 2017 (doi: 10.1111/jnc.13926) 査読有

〔学会発表〕(計 1件)

- ① 西山遼、長野貴之、眞田彩加、牟田口由紀子、井奥杏奈、榎木博久、岸本聖、山中大輔、木村信也、竹村基彦 ミクログリアの誘導型一酸化窒素合成酵素発現に対する PGE₂ 受容体アゴニストとアンタゴニストの影響 第130回日本薬理学会近畿部会 2016年11月19日 京都大学百周年時計台記念館(京都府)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

長野 貴之 (NAGANO, Takayuki)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：10368516

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()