

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04673

研究課題名(和文) 脳出血病態形成における好中球-マクロファージ/ミクログリア表現型連関

研究課題名(英文) Phenotypic interactions between neutrophils and macrophages/microglia in the pathogenesis of intracerebral hemorrhage

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) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：脳出血発症に伴って脳内で産生されたロイコトリエンB4が、好中球の脳内浸潤を促すとともに脳内での炎症応答や軸索路損傷に関与することで脳出血の予後を規定することを明らかにした。また、Nurr1や芳香族炭化水素受容体などへの刺激が、好中球の浸潤あるいはミクログリア/マクロファージの動員を抑制することで脳出血病態を改善することを示した。さらに、新たな培養実験系を構築して脳出血病態における好中球の表現型の挙動に関する基礎知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

十分な治療法の確立されていない脳出血に対し、好中球の浸潤を起点とする脳内炎症応答を抑制することが有効な治療戦略となり得ることを示したのに加え、ロイコトリエンB4受容体、Nurr1、芳香族炭化水素受容体といった新たな治療標的候補分子を具体的に提示した意義は大きい。また、好中球の浸潤は脳出血に限らず多くの脳病態において認められるため、新規に構築した培養実験系は今後多様な疾患の成立機序を解析する上で有効な手段となり得る。

研究成果の概要(英文)：Leukotriene B4 generated within the brain in response to intracerebral hemorrhage (ICH) was found to determine the prognosis by promoting leukocyte infiltration and participating in inflammatory responses and axon tract damage in the brain. In addition, stimulation of ligand-dependent transcription factors such as Nurr1 and aryl hydrocarbon receptor was shown to alleviate pathological events in ICH by inhibiting leukocyte infiltration and/or microglia/macrophage recruitment. Moreover, a novel experimental system using brain slice cultures was developed to give rudimentary findings concerning the dynamics of neutrophil phenotypes associated with ICH.

研究分野：神経薬理学

キーワード：脳卒中 好中球 ミクログリア ロイコトリエン 核内受容体 トロンピン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳出血(脳内出血)は、脳実質内を走行する血管が破綻し、漏出した血液成分が脳組織に傷害を与える疾患である。好発部位は被殻(線条体)や視床であり、発症後の致死率や予後不良となる率は極めて高い。脳組織傷害を軽減できる有効性の高い内科的治療法は存在しないため、真に有効な治療法の開拓・治療薬創製の実現に向けた病理形成機序の解明が急務となっている。

研究代表者は、ラット/マウスの線条体出血モデルおよびラット培養脳組織切片を用いて、脳出血の病理形成機序の解析と神経保護を基盤とする治療薬候補化合物の探索を進めてきた。その過程で、組織傷害性のミクログリア/マクロファージ(MG/MΦ)が出血に伴う線条体ニューロン死の誘導において重要な役割を担うこと(①)、またレチノイン酸受容体作動薬等が線条体組織傷害に対する軽減効果や線条体出血に伴う運動機能障害に対する改善効果を示すことなどを見出してきた(②)。

一方、ヒト脳出血患者では、出血が被殻に隣接する内包領域(皮質脊髄路を含む大脳皮質からの下行性投射路および大脳皮質への上行性投射路の軸索線維束群が密集する白質領域)に及ぶと予後が著しく不良になることが知られている。実際研究代表者は、マウスにおいても血腫による内包領域の侵襲が運動機能障害を著明に増悪することを確認した(③)。加えて、レチノイン酸受容体作動薬が内包出血に伴う重篤な運動機能障害に対しても治療効果を発揮すること、さらにその治療効果には好中球走化因子であるケモカイン CXCL2 の発現抑制が密接に関わることを見出した(④)。このような一連の観察から、「脳組織内の MG/MΦ の動員」に加えて「神経軸索線維束の損傷」「脳組織内への好中球の浸潤」といった複数の事象が、脳出血の予後を決定する鍵となる要因であることが示唆された。そこで研究代表者は、脳出血の最終的な予後不良の重篤度と密接に関連する神経軸索束の損傷および修復過程において、脳組織内の炎症応答を司る好中球と MG/MΦ が相互作用しながら果たす役割を明らかにすることが必須であると考えた(図1)。

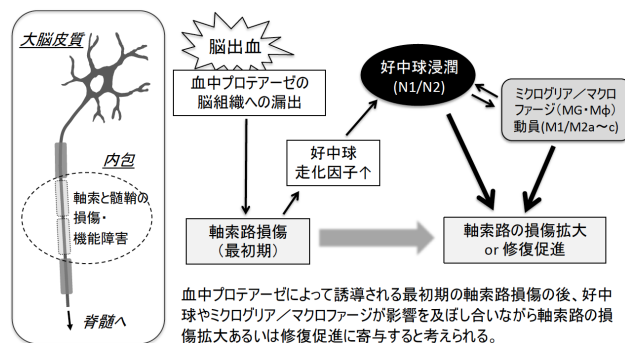


図1 脳出血の病理形成機序 (仮説)

### 2. 研究の目的

大脳白質傷害すなわち中枢神経軸索線維束の傷害は、十分な治療法の確立されていない脳出血病態において予後不良の重篤度を規定する主要因であることが示唆されている。本研究課題は、脳出血発症後に進行する内包領域の軸索路損傷・修復過程を大きく左右すると推定される浸潤好中球の病態生理学的役割に焦点を当てた。脳出血後に脳組織内で産生される好中球走化因子の役割の解明や、好中球によって動員される MG/MΦ の病態への関与の解析、ならびに MG/MΦ による浸潤好中球の制御に関する解析に加え、浸潤好中球および MG/MΦ のフェノタイプの制御が脳出血の病理・病態に及ぼす影響の解析等を行うことにより、好中球関連事象を標的とした新たな脳出血薬物治療戦略の提唱を目指した。

### 3. 研究の方法

In vivo 実験では、内包出血あるいは皮質下出血のモデルを用いた。内包出血モデルでは、8~10 週齢雄性マウス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 強調画像もしくは脳組織連続切片の Nissl 染色像から血腫体積を定量した他、出血後の脳組織について ELISA によるロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 含量の測定、RT-PCR による LTB<sub>4</sub> 関連分子や炎症性サイトカイン・ケモカインの mRNA 量の測定、脳水分含量の測定を行った。さらに、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 MG/MΦ およびアストロサイト数、内包領域の軸索損傷の程度、Nurr1 および芳香族炭化水素受容体 (AhR) の発現分布等を評価した。皮質下出血モデルでは、8~10 週齢雄性マウスの頭頂皮質にコラゲナーゼを微量投与することで出血を誘発し、MRI あるいは Nissl 染色による血腫体積の定量、免疫組織化学による病理像の評価、およびビーム歩行試験による運動機能障害の評価を行った。薬物は、出血誘発 3 時間後から 24 時間おきに計 3 回静脈内、腹腔内または経口で投与した。

In vitro 実験系では、ヒト白血病細胞株 HL60 細胞と培養脳組織切片を用いた。HL60 細胞は常法に従って 1.3%ジメチルスルホキシドを 5 日間処置し、好中球様に分化させた。一方、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培養維持した。HL60 細胞の単独培養系、あるいは HL60 細胞と脳組織切片との共培養系にトロンピン等の薬物を処置し、細胞および組織を回収して RT-PCR による炎症性サイトカイン等の mRNA 発現量を測定した。加えて、propidium iodide (PI) 蛍光の強度により脳組織中の細胞死の程度を定量化した。

#### 4. 研究成果

(1) 脳出血病態における好中球走化因子 LTB<sub>4</sub> の役割解析：強力な好中球走化因子として知られる LTB<sub>4</sub> (5) に焦点を当て、LTB<sub>4</sub> 合成経路・LTB<sub>4</sub> シグナル伝達経路が治療標的となる可能性を検証した。内包出血を惹起したマウス脳では、12 時間後をピークとする LTB<sub>4</sub> 含量の増加が観察された。LTB<sub>4</sub> 合成の律速酵素である 5-リポキシゲナーゼ (5-LOX) の mRNA 発現量は出血惹起 18~72 時間後に増大しており、5-LOX の活性を調節する FLAP の mRNA は 24 時間後以降に著明な増加を呈した。ミエロペルオキシダーゼに対する免疫組織化学により好中球の脳内浸潤を調べたところ、出血誘発 6 時間後にはわずかな数の好中球が認められる程度であったが、24~72 時間後においては血腫内において好中球の著明な増加が観察された。

次に、5-LOX の特異的阻害薬である zileuton 静脈内投与の効果について検討したところ、zileuton (3 - 10 mg/kg) は出血誘発 24 時間後の脳組織内 LTB<sub>4</sub> 含量の増加をほぼ完全に抑制し、脳組織内への好中球の浸潤も有意に抑制した。Zileuton は出血 72 時間後の血腫体積や、脳組織水分含量の増加には有意な影響を及ぼさなかったが、脳出血後に認められるマウスの運動機能障害を抑制する傾向を示し、改変 limb-placing 試験においては有意な改善効果が認められた。

脳出血病態への LTB<sub>4</sub> の関与の確証を得るため、野生型マウスと BLT1 (LTB<sub>4</sub> の受容体) 欠損マウスに内包出血を誘発したところ、72 時間後の血腫体積は同等であったが、BLT1 欠損マウスでは浸潤好中球数が著明に減少していた。運動機能障害の程度も BLT1 欠損マウスでは野生型マウスと比較して軽度に留まった。さらに、BLT1 特異的遮断薬である ONO-4057 経口投与の効果について検討したところ、ONO-4057 (30 - 100 mg/kg) は血腫体積に影響を及ぼすことなく血腫内への好中球の浸潤を抑制するとともに、脳出血に伴う運動機能障害を著明に抑制した。さらに、ONO-4057 は血腫周縁部の MG/MΦ の活性化や脳組織内の TNF-α mRNA 増大を抑制した他、内包領域の軸索損傷を用量依存的に抑制した (図 2)。これらの結果は、脳内で産生された LTB<sub>4</sub> の作用によって浸潤した好中球が、脳内での MG/MΦ の炎症性活性化および軸索損傷の拡大に寄与することを示しており、脳出血治療標的としての LTB<sub>4</sub> シグナルの可能性を提起するものである。

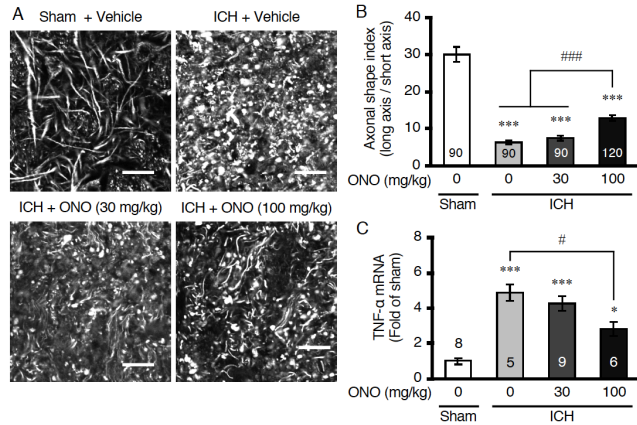


図 2 脳出血(ICH)誘発 72 時間後の内包軸索線維束の損傷 (A, B)および脳内 TNF-α mRNA 発現(C)に対する ONO-4057 の効果。\* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001 vs. sham; # P < 0.05, ### P < 0.001.

(2) 脳出血病態に対する Nurr1 作動薬および AhR リガンドの作用解析：核内受容体 Nurr1 (NR4A2) は中脳ドパミンニューロンの分化誘導に関わる転写因子として知られるが、成体脳においても発現が見られ、病態時において脳内炎症応答を制御する可能性が指摘されている (6)。そこで、Nurr1 作動薬活性を有することが報告されている抗マラリア薬のアモジアキンを用いて、そのマウス脳出血モデルに対する作用を検討した。まず、脳出血誘発後の血腫周縁部に集積する MG/MΦ およびアストロサイトにおいて Nurr1 の発現亢進が認められた。アモジアキン (40 mg/kg) の腹腔内投与は、血腫周縁部 MG/MΦ およびアストロサイトの集積を減少させ (図 3)、脳内 IL-1β, CCL2, CXCL2 の mRNA 発現増大も著明に抑制した。また、アモジアキンは改変 limb-placing 試験およびビーム歩行試験で評価した運動機能も有意に改善した。一方で、線条体における血腫中心部の残存ニューロン数に対してアモジアキンは有意な効果を示さなかった。

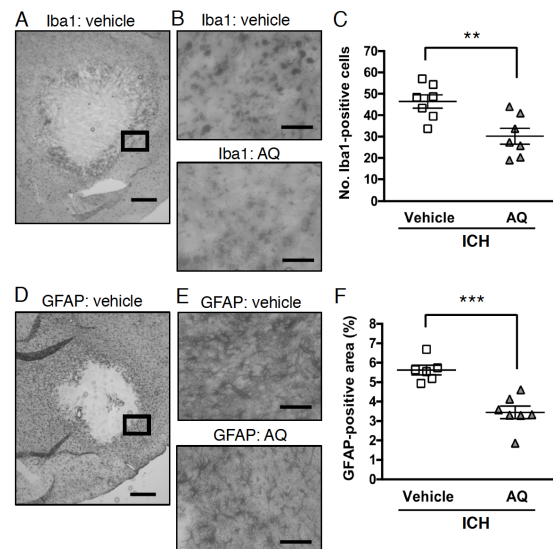


図 3 脳出血誘発 72 時間後の血腫周縁部 MG/MΦ (A-C)およびアストロサイト(D-F)の活性化・集積に対するアモジアキン(AQ)の効果。\*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001.

次に、核内受容体スーパーファミリーとは異なる系統のリガンド依存性転写因子である AhR に着目し、AhR に結合することが報告されているラキニモドおよび 3',3'-ジインドリルメタンを経口投与した時の脳出血病態改善効果について検討した。両薬物とも 24 時間後における血腫サイズには影響を及ぼさなかったが、血腫中心部の残存ニューロン数を軽度ではあるものの有意に増加させた。また血腫内への好中球の浸潤を著明に抑制するとともに、血腫周縁部での MG/MΦ



およびアストロサイトの活性化も強く抑制した。脳出血誘発後の脳内において AhR の発現は主に血腫周縁部の MG/MΦ と血腫内に浸潤した好中球に認められたことから、AhR リガンドはこれらの細胞に直接作用することが示唆された。以上の結果は、浸潤好中球や MG/MΦ の関与する脳内炎症応答の抑制が脳出血治療戦略として有望であることを裏付ける知見と言える。

(3) 皮質下出血病態に対するニコチンの作用解析：脳葉領域に生じる皮質下出血は、被殻(線条体)出血や視床出血に次ぐ頻度で見られるが、非高血圧性に発症するものが過半数を占めており、発症後の治療戦略の確立が一層必要とされる。そこで、皮質下出血に伴う病理・病態を解析するためのマウス病態モデルの確立を行った。C57BL/6 マウスの大脳皮質内に種々の用量で VII 型コラゲナーゼ溶液を投与し、出血の誘発確率、出血の拡大範囲、および神経症状の程度について検討した結果、出血誘発部位を適切に設定すると皮質下出血後に著明な運動機能障害が誘発されることが確認された。

研究代表者らは以前に、被殻出血のマウスモデルにニコチンを反復投与すると運動機能障害が改善されること、またこの時併せて好中球の脳内浸潤の抑制とともに神経細胞死および MG/MΦ 活性化の抑制が見られることを見出している(7)。そこで、皮質下出血病態においてもニコチンに同様の効果が見られるか検討した。ニコチン(1 or 2 mg/kg)を腹腔内投与すると、ビーム歩行試験において運動機能改善効果が用量依存的に認められた。また、Iba1 免疫反応陽性細胞として同定される MG/MΦ は、出血誘発 3 日後において血腫の周縁領域で増加していたが、ニコチン投与群ではそのような MG/MΦ の増加が用量依存的かつ有意に抑制された(図 4)。以上のことから、ニコチンは MG/MΦ の炎症性活性化を抑制することにより、皮質下出血においても病態改善効果を発揮し得ることが明らかになった。

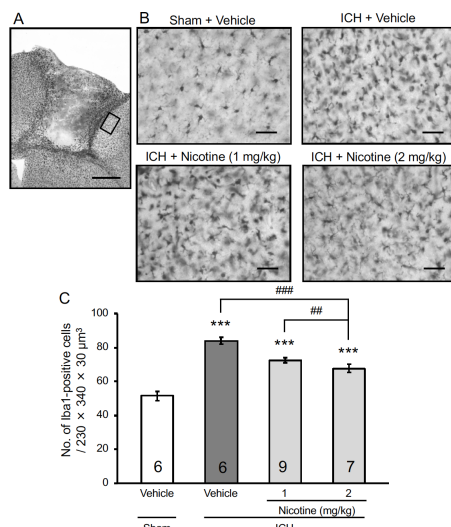


図 4 皮質下出血誘発 72 時間後の血腫周縁部 MG/MΦ の活性化・集積に対するニコチンの効果。\*\*\* P < 0.001 vs. sham; ## P < 0.01, ### P < 0.001.

(4) 好中球-脳組織間相互作用の in vitro 解析：好中球様に分化させた HL60 細胞をラット大脳皮質-線条体培養組織切片と共培養し、脳出血病態を模した条件として血中プロテアーゼであるトロンピンを処置した後の HL60 細胞でのサイトカイン発現変化と組織傷害との関係について検証した。PI 蛍光を指標とした培養脳組織切片内の細胞死は、トロンピン処置 24~72 時間後において進行性に増加した。好中球様 HL60 細胞の共存下では、トロンピンによって誘発される培養脳組織切片内の細胞死が有意に抑制された。一方、同条件下において HL60 細胞における IL-1β (N1 型サイトカイン) mRNA の発現は、HL60 細胞の単独培養にトロンピンを処置した場合と比較して有意に増大した。対照的に、IL-10 (N2 型サイトカイン) mRNA の発現は HL60 細胞単独培養に比べて脳組織切片と共培養した条件において有意に低下した(図 5)。さらに、脳組織切片共存下での HL60 細胞における IL-1β mRNA の発現増強は、TLR4 阻害薬の TAK-242 を適用することによって消失した。したがって、トロンピンによる出血性の傷害を受けた培養脳組織切片より遊離した何らかの因子が HL60 細胞上の Toll 様受容体 (TLR) 4 を刺激することにより IL-1β mRNA の発現を増強することが示唆された。なお、TLR4 アゴニストであるリポ多糖がトロンピンと相乗的に HL60 細胞の IL-1β mRNA 発現を増強することも確認された。これらの知見は、好中球のフェノタイプ分化が病態時の脳組織との相互作用によって影響されることを明らかにするとともに、脳出血病態における好中球の役割を解析するための新規 in vitro 実験系を提案するものである。

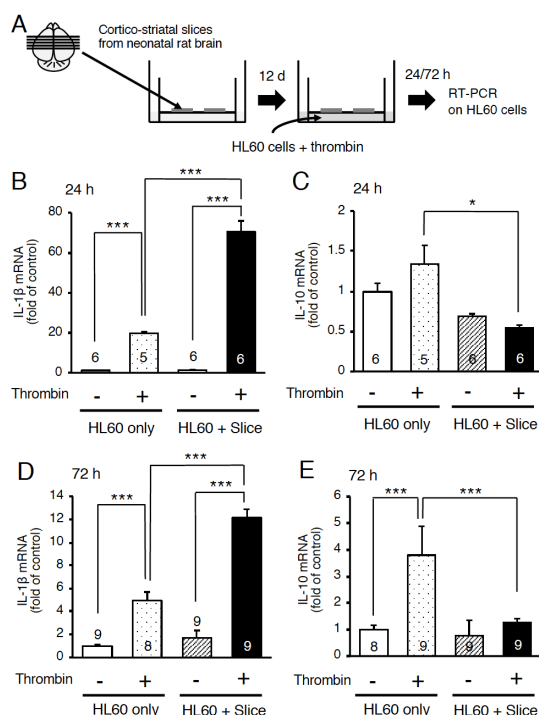


図 5 (A) 好中球-脳組織間相互作用解析実験系の概略。(B-E) 好中球様 HL60 細胞におけるトロンピン処置 24 時間後(B-C)および 72 時間後(D-E)の IL-1β mRNA (B, D)および IL-10 mRNA (C, E)発現量に対する脳組織切片共存の影響。\* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001.

(5)まとめ：脳出血の発症に伴って脳内で産生された好中球走化因子、特に  $LTB_4$  が  $MG/M\Phi$  活性化を伴う脳内炎症応答や軸索路損傷の進展に深く関与することで脳出血の予後を規定する要因となっていることを初めて明らかにした。また、Nurr1、AhR、ニコチン受容体といった多様な薬物標的分子に対するリガンド刺激が、脳内への好中球の浸潤、血腫周縁部の  $MG/M\Phi$  活性化、脳内の炎症性サイトカイン・ケモカイン産生等を負に制御することによって脳出血病態を改善することを示した。さらに、新規 *in vitro* 実験系を構築して脳出血病態における好中球フェノタイプの挙動に関する基礎知見を得た。これらはいずれも脳出血の病理形成機序の理解を深め、新たな治療戦略を策定していく上で有用な基礎知見と言える。

<引用文献>

- ① Ohnishi M et al., *Exp Neurol*. 206:43-52, 2007.
- ② Matsushita H et al., *J Cereb Blood Flow Metab*. 31:222-234, 2011.
- ③ Matsushita H et al., *PLoS One*. 8:e67691, 2013.
- ④ Matsushita H et al., *J Neurosci Res*. 92:1024-1034, 2014.
- ⑤ Yokomizo T et al., *Nature* 387:620-624, 1997.
- ⑥ Saijo K et al., *Cell* 137:47-59, 2009.
- ⑦ Hijioka M et al., *J Pharmacol Exp Ther*. 338:741-749, 2011.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計29件（うち査読付論文 29件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 11件）

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 in press
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 -
1. 著者名 Kinoshita K, Matsumoto K, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Katsuki H.	4. 巻 330
2. 論文標題 A Nurr1 agonist amodiaquine attenuates inflammatory events and neurological deficits in a mouse model of intracerebral hemorrhage.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neuroimmunol.	6. 最初と最後の頁 48-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2019.02.010	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 Anan J, Hijioka M, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Katsuki H.	4. 巻 95
2. 論文標題 Cortical hemorrhage-associated neurological deficits and tissue damage in mice are ameliorated by therapeutic treatment with nicotine	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 1838-1849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jnr.24016	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, Hijioka M.	4. 巻 40
2. 論文標題 Intracerebral Hemorrhage as an Axonal Tract Injury Disorder with Inflammatory Reactions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 564-568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b16-01013	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 Hijioka M, Anan J, Ishibashi H, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Koga T, Yokomizo T, Shimizu T, Katsuki H.	4. 巻 360
2. 論文標題 Inhibition of leukotriene B4 action mitigates intracerebral hemorrhage-associated pathological events in mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 399-408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.116.238824	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105件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 15件)

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

1. 発表者名 木下慶大、松本倅政、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、香月博志
2. 発表標題 Nurr1 リガンド amodiaquine のマウス脳内出血病態に対する作用
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Kinoshita, K. Matsumoto, Y. Kurauchi, A. Hisatsune, T. Seki, H. Katsuki
2. 発表標題 A Nurr1 ligand amodiaquine alleviates symptoms and pathological events in intracerebral hemorrhage in mice
3. 学会等名 ASCB/EMBO 2018 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 脇岡雅章、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、古賀友紹、北村佳久、横溝岳彦、清水孝雄、香月博志
2. 発表標題 Leukotriene B4-BLT1 axis exacerbates neutrophil invasion and motor dysfunction after intracerebral hemorrhage in mice
3. 学会等名 第18回国際薬理学・臨床薬理学会議 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野田大介、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、香月博志
2. 発表標題 培養脳組織との相互作用による好中球のフェノタイプ変換：in vitroでの検討
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 阿南純平、脇岡雅宣、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、香月博志
2. 発表標題 皮質下出血に伴う神経障害とニコチンの治療効果
3. 学会等名 第90回日本薬理学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1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)		
研究協力者	倉内 祐樹  (Kurauchi Yuki)		