

令和元年6月13日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10101

研究課題名(和文) 新生児期虚血低酸素時の脳内エリスロポエチンによるミクログリア活性化制御脳保護効果

研究課題名(英文) Neuroprotective effect of erythropoietin by attenuating the microglia activity

研究代表者

青山 峰芳 (Aoyama, Mineyoshi)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：70363918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳室周囲白質軟化症(PVL)は、早産児に特有で比較的軽度の虚血から脳室周囲白質の傷害を引き起こし、脳性麻痺の主な原因となる重篤な疾患である。申請者は造血作用ホルモンであるエリスロポエチン(EPO)の脳保護作用について研究を継続し、本研究ではEPOによるミクログリアの活性化調節作用に注目し解析した。細胞レベルの解析により、EPO投与によりミクログリア活性化が抑制されることを確認した。生体内での活性化ミクログリアに対するEPOによる効果も細胞レベルの解析と同様だった。以上の結果をまとめて、論文として報告した。引き続き、EPOによる脳保護効果についての詳細なメカニズムの解析を継続していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで脳内において細胞保護に作用すると考えられてきたEPOがミクログリア活性化を調節する効果について解析する研究である。EPOによる脳内環境整備を視野に入れた新たな治療戦略を明示できる。

PVLをはじめとする新生児期の虚血性中枢神経障害の発症予防および症状の軽減を実現化できれば、患者本人のみでなく、患者を介護する家族の肉体的・精神的な苦痛が軽減される。すなわち、小児疾患の治療は、我が国の将来を担う子供と、現在の社会を支える子育て世代の両方に多大な恩恵を与えることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Periventricular leukomalacia (PVL) is a white matter brain injury. PVL is specific for the premature infants with the greatest risk of the cerebral palsy. Erythropoietin (EPO), a hematopoietic hormonal cytokine induced in response to hypoxia, has neuroprotective effects. In our present study, we investigated whether EPO could attenuate the microglia activation, developing the neuroprotection. These data indicate that EPO treatment attenuates microglial activation including morphological change, phagocytosis, and the production of inflammatory cytokines in vitro and in vivo. Further investigation of EPO modulation of the microglial activation may contribute to the development of novel neuroprotective therapies.

研究分野：新生児学、神経科学

キーワード：エリスロポエチン グリア ミクログリア 神経保護 サイトカイン 脳室周囲白質軟化症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### 脳室周囲白質軟化症 (PVL) について

PVL は胎週数 34 週未満の早産児の 7~8%に見られる早産児特有の疾患である。比較的軽度の虚血により、選択的に脳室周囲の白質に障害を生じ、未熟児脳性麻痺の主な原因となっている。PVL に対する確実な治療法は未だに確立されていないのが現状である。障害部位の特異性として、解剖学および生理学的な未熟性のために容易に低灌流になりやすい点がある。さらに、脳室周囲白質にオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)が集積し、OPC の選択的な障害が病態に深く関与していると考えられている。PVL の病態の解明のために、これまでに申請者は、新生児期の低酸素虚血性白質障害マウスにおける OPC と病態の関係について解析した(Kako et al. Stem Cells 2012; Kato et al. J Neurosci Res 2011)。その研究の中で、低酸素刺激により OPC の細胞障害が生じ、低酸素後の再酸素化刺激により OPC への細胞障害がさらに亢進することを明らかにした。一方、母体内感染と PVL の病態との関与も指摘され、脳内の炎症に関与するミクログリアと細胞障害の関係も指摘されて注目されている。さらに、急性期回復後の晩期循環不全の関与も報告されている。現在のところ、危険因子を回避した周産期医療が行われているが、障害部位での脳内環境改善を意識した PVL 発症予防のための治療は確立していない。OPC と同様に脳室周囲白質に集積するミクログリアの活性化および周囲の細胞への影響を詳細に解析した研究はほとんどない。

### エリスロポエチン(EPO)の中樞神経作用について

エリスロポエチン(EPO)は主に腎臓で産生されるホルモンで造血作用を有している。貧血の治療薬として EPO 製剤が商品化され、多くの臨床の現場で使用されている。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 に神経保護作用があることが確認された。一方で、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明らかとなり、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 EPO による細胞保護効果については EPO 製剤を実験動物に投与して個体レベルで解析した報告がほとんどで、アストロサイトから分泌される EPO が、個々の細胞に直接与える影響についての解析はわずかである。そこで、申請者は、アストロサイトから分泌される EPO に注目して研究を続けてきた。その結果、低酸素刺激によってアストロサイトから分泌される EPO が EPOR を発現する OPC の低酸素による細胞障害を抑制することを明らかにした(Kato et al. J Neurosci Res 2011)。さらに、母体内感染時羊水中で上昇する炎症性サイトカイン TNF でアストロサイトを刺激すると、低酸素誘導因子 HIF2 タンパクの不安定化がおこり低酸素刺激による EPO の発現誘導が抑制され、神経保護効果が減弱することを明らかにした (Nagaya et al. Eur J Neurosci 2014)。この結果は、母体内感染を合併すると脳内で EPO の産生が抑制されている可能性を示唆した。さらに、新生児期の低酸素虚血性白質障害マウスに EPO 製剤を投与すると成熟オリゴデンドロサイトへの分化が亢進し、マウスの運動機能が改善することを明らかにした(Kako et al. Stem Cells 2012)。この結果は、EPO による神経再生医療の可能性を提示した。

### 脳内の免疫担当細胞であるミクログリアと脳内神経保護環境

ミクログリアは全グリアの 10-20%を占める脳内の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うけると活性化し、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. 2013)。しかし、現在のところ M1 タイプと M2 タイプへの詳細な活性制御機構は明らかになっていない。申請者はこれまでインフルエンザ脳症の病態におけるアストロサイトおよびミクログリアの異常活性化に注目してきた(Kakita and Aoyama et al. 2009 and 2013)。その解析の中で、形態変化や貪食能やサイトカイン産生能といった様々なミクログリア活性化の指標を評価してきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、発達段階での中枢神経において EPO によるミクログリアの活性化調節作用に注目した PVL に対する新規の脳保護効果について解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1-1.EPO 存在下での活性化ミクログリアへの影響

日齢 1 日のラット大脳皮質から初代培養細胞として、ニューロン、ミクログリア、アストロサイトを準備し、EPO の受容体である EPOR の発現を、定量的 RT-PCR で遺伝子発現を、細胞膜での発現を免疫細胞染色によって確認した。次に、ミクログリアの代表的な細胞株である BV2 に対して炎症を模した刺激としてリポポリサッカライド(LPS)刺激を行い、EPO 同時投与群と EPO 非投与群における、炎症性サイトカインの産生を定量的 RT-PCR により確認した。

### 1-2.EPO によるミクログリア細胞傷害的活性化 (M1 活性) および細胞保護的活性化 (M2 活性) の影響

ミクログリアに対して LPS 刺激を行い、細胞傷害関連遺伝子(M1 遺伝子)や細胞保護関連遺伝子(M2 遺伝子)の発現量を調べ、同時 EPO 投与による遺伝子発現量の変化を定量的 RT-PCR

を用いて観察する。さらに、ミクログリアの貪食能を評価するために蛍光標識したポリスチレンビーズの細胞内への取り込み率を共焦点顕微鏡によって定量的に評価した。

#### 4. 研究成果

日齢1日のラット大脳皮質から初代培養細胞として、ニューロン、ミクログリア、アストロサイトを準備し、EPOの受容体であるEPORの発現を、定量的RT-PCRで遺伝子発現を、細胞膜での発現を細胞染色によって確認した。その結果、ミクログリアでの発現が高いことを確認した。さらにミクログリア細胞株であるBV2においてもEPORの高発現を確認した。そこで、LPSによって活性化されたミクログリアの活性化調節をEPO投与によって行えるか確認したところ、炎症性サイトカインの発現が抑制されることを確認し、さらに貪食能を抑制していることを細胞レベルで確認した。さらに、ミクログリアの2つの異なる活性化型(M1とM2)のちがいを確認するため、M1遺伝子M2遺伝子の発現量の変化をEPO投与の有無によって比較したが、はっきりとしたちがいは確認できなかった。

LPSを腹腔内投与したマウス脳におけるEPOR発現の変化を確認したが、有意な変化はなかった。TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6の炎症性サイトカインの発現を確認したところ、LPS腹腔内投与により有意に上昇したが、EPOを追加投与することで発現は低下した。摘出した脳切片を用いてミクログリアの形態変化を観察した。LPS投与によって、ミクログリアは活性化型のアメーバ状に変化する細胞を多数観察したが、EPOの投与により、活性化型のミクログリアの比率は減少した。これらの結果から、*in vivo*においても、LPS刺激によって活性化したミクログリアがEPOによりその活性化を減弱することがあきらかになった。以上の結果をまとめて、論文として報告した(Tamura and Aoyama et al. 2017)。

これらの知見を踏まえ、EPOのミクログリアの活性化の調節機構に注目して解析をつづけた。予想されるシグナルとしてMAPK、p-39、NF- $\kappa$ Bシグナルを中心に、LPSの活性化に対する、EPOによるシグナル減弱作用を確認したが、変化は見られなかった。おそらく、既存のシグナルではなく、未知のシグナルによる変化の可能性があり、今後の課題として残った。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1. Fuji H, Ohmae S, Noma N, Takeiri M, Yasutomi H, Izumi K, Ito M, Toyomoto M, Iwaki S, Takemoto K, Seo S, Taura K, Hida S, Aoyama M, Ishihama Y, Hagiwara M, Takeda N, Hatano E, Iwaisako K, Uemoto S, Asagiri M. Necrostatin-7 suppresses RANK-NFATc1 signaling and attenuates macrophage to osteoclast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Sep 5;503(2):544-549. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.153. Epub 2018 Jul 7. PubMed PMID: 29800570. (査読有)
2. Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Oguri Y, Kobayashi M, Nozaki M, Asai K, Aoyama M, Otsuka T. The Janus kinase inhibitor tofacitinib inhibits TNF- $\alpha$ -induced gliostatin expression in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Clin Exp Rheumatol*. 2018 Jan 15. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29352846. (査読有)
3. Inagaki Y, Kubota E, Mori Y, Aoyama M, Kataoka H, Johnston RN, Joh T. Anti-tumor efficacy of oncolytic reovirus against gastrointestinal stromal tumor cells. *Oncotarget*. 2017 Dec 18;8(70):115632-115646. doi:10.18632/oncotarget.23361. eCollection 2017 Dec 29. PubMed PMID: 29383187; PubMed Central PMCID: PMC5777799. (査読有)
4. Tatematsu N, Waguri-Nagaya Y, Kawaguchi Y, Oguri Y, Ikuta K, Kobayashi M, Nozaki M, Asai K, Aoyama M, Otsuka T. Mithramycin has inhibitory effects on gliostatin and matrix metalloproteinase expression induced by gliostatin in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Mod Rheumatol*. 2018 May; 28(3):495-505 doi: 10.1080/14397595.2017.1350332. Epub 2017 Jul 25. PMID:28741989 (査読有)
5. Ohmae S, Noma N, Toyomoto M, Shinohara M, Takeiri M, Fuji H, Takemoto K, Iwaisako K, Fujita T, Takeda N, Kawatani M, Aoyama M, Hagiwara M, Ishihama Y, Asagiri M. Actin-binding protein coronin 1A controls osteoclastic bone resorption by regulating

lysosomal secretion of cathepsin K. Sci Rep. 2017 Mar 16;7:41710. doi: 10.1038/srep41710. PubMed PMID: 28300073; PubMed Central PMCID: PMC5353622. (査読有)

6. Tamura T, Aoyama M, Ukai S, Kakita H, Sobue K, Asai K. Neuroprotective erythropoietin attenuates microglial activation, including morphological changes, phagocytosis, and cytokine production. Brain Res. 2017 May 1;1662:65-74. doi: 10.1016/j.brainres.2017.02.023. Epub 2017 Mar 1. PubMed PMID: 28257780. (査読有)
7. Goto Y, Aoyama M, Sekiya T, Kakita H, Waguri-Nagaya Y, Miyazawa K, Asai K, Goto S. CXCR4(+) CD45(-) Cells are Niche Forming for Osteoclastogenesis via the SDF-1, CXCL7, and CX3CL1 Signaling Pathways in Bone Marrow. Stem Cells. 2016 Nov;34(11):2733-2743. doi: 10.1002/stem.2440. Epub 2016 Jul 8. PubMed PMID: 27339271. (査読有)

[学会発表](計 15 件)

1. 白川茉由、鳥内皐暉、垣田博樹、岩城壮一郎、朝霧成拳、青山峰芳  
低体温療法が神経幹細胞の分化に与える影響について  
第 65 回中部日本生理学会(名古屋) 2018/11/16
2. 大塚勇斗、後藤洋、関谷健夫、岩城壮一郎、朝霧成拳、宮澤健、後藤滋己、浅井清文、青山峰芳  
CXCR4<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>細胞は破骨細胞形成に重要な微小環境を構成し、破骨細胞を巨大化させる  
第 65 回中部日本生理学会(名古屋) 2018/11/16 (口演発表)
3. 鳥内皐暉、田村哲也、垣田博樹、岩城壮一郎、朝霧成拳、浅井清文、青山峰芳  
神経保護因子エリスロポエチンはミクログリアの過剰な活性化を抑制する  
第 65 回 中部日本生理学会(名古屋) 2018/11/16 (口演発表)
4. 鳥内皐暉、田村哲也、垣田博樹、岩城壮一郎、朝霧成拳、浅井清文、青山峰芳  
神経保護因子エリスロポエチンによるミクログリア活性化抑制作用  
第 64 回 日本薬学会東海支部大会(名古屋) 2018/6/30 (口演発表)
5. 大塚勇斗、後藤洋、岩城壮一郎、朝霧成拳、浅井清文、青山峰芳  
CXCR4<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>細胞は、SDF-1、CXCL7 および CX3CL1 シグナルを介して破骨細胞形成のための微小環境を構成し、破骨細胞を巨大化させる  
第 64 回日本薬学会東海支部大会(名古屋) 2018/6/30 (口演発表)
6. Ikuta K, Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Kobayashi M, Goto H, Nozaki M, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. The inhibitory effects of tacrolimus on gliostatin production in ra synoviocytes. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2017), 2017/6/14-17, IFEMA's Convention and Congress Centres (Madrid, Spain).
7. 大塚勇斗 後藤洋 関谷健夫 朝霧成拳 岩城壮一郎 宮澤健 後藤滋己 浅井清文 青山峰芳  
破骨細胞形成のための微小環境を構成する CXCR4<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>細胞は、SDF-1、CXCL7 および CX3CL1 シグナルを介して破骨細胞を巨大化する。  
第 131 回日本薬理学会近畿支部会(名古屋) 2017/6/30
8. 鳥内皐暉、田村哲也、青山峰芳、垣田博樹、祖父江和哉、浅井清文  
神経保護に働くエリスロポエチンはミクログリアの活性を沈静化する  
第 40 回日本神経科学大会(千葉) 2017/7/20-23
9. 大塚勇斗 後藤洋 関谷健夫 朝霧成拳 宮澤健 青山峰芳

CXCR4+CD45- Cells Enhance Osteoclastogenesis via the SDF-1, CXCL7, and CX3CL1 Signaling Pathways.

第 35 回日本骨代謝学会学術集会（福岡）2017/7/27-29

10. 鳥内皐暉、田村哲也、青山峰芳、垣田博樹、祖父江和哉、浅井清文  
神経保護因子エリスロポエチンがミクログリアの活性化に与える影響

第 60 回日本神経化学学会大会（仙台）2017/9/7-9

11. Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Kobayashi M, Goto H, Nozaki M, Ikuta K, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. The JAK inhibitor (Tofacitinib) inhibits TNF-induced gliostatin/thymidine phosphorylase expression in human fibroblast-like synoviocytes. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2016), 2016/6/8-11, ExCel London (London, United Kingdom)

12. Ikuta K, Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Kobayashi M, Goto H, Nozaki M, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. Sp1 interference prevents joint destruction of RA through inhibitory effects of gliostatin and matrix metalloproteinase-3. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2016), 2016/6/8-11, ExCel London (London, United Kingdom)

13. Tatematsu N, Waguri-Nagaya Y, Kawaguchi Y, Ikuta K, Kobayashi M, Goto H, Nozaki M, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. Sp1 inhibitor modulates the autocrine action of gliostatin/thymidine phosphorylase (GLS/TYMP) in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2016), 2016/6/8-11, ExCel London (London, United Kingdom)

14. 川口洋平, 永谷祐子, 立松 尚衛, 小林正明, 後藤英之, 野崎正浩, 青山峰芳, 浅井清文, 大塚隆信. グリオスタチン発現抑制はリウマチ滑膜細胞に対するJAK阻害剤の新規作用機序である.

第31回日本整形外科基礎学術集会（福岡）2016/10/13-14

15. 立松 尚衛, 永谷祐子, 川口洋平, 生田憲史, 小栗雄介, 小林正明, 野崎正浩, 青山峰芳, 浅井清文, 大塚隆信. 関節リウマチ線維芽細胞様滑膜細胞に置いてグリオスタチンによって誘導された MMPs は Sp 1 阻害剤によって抑制される.

第 31 回日本整形外科基礎学術集会（福岡）2016/10/13-14

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：山田恭聖

ローマ字氏名：YAMADA Yasumasa

所属研究機関名：愛知医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 60405165

研究分担者氏名：浅井清文

ローマ字氏名：ASAI Kiyofumi

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 70212462

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。