

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15204

研究課題名(和文)好中球フェノタイプの制御に基づく神経保護薬創製のための新規薬理評価系

研究課題名(英文) Novel system of pharmacological evaluation for the development of neuroprotective drugs based on the regulation of neutrophil phenotypes

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：HL-60細胞とラット培養脳組織切片を用いて好中球-脳組織間相互作用を解析する実験系を構築し、出血性脳組織傷害に伴って好中球の表現型が炎症促進性にシフトすることを見出した。また、ロイコトリエンB4の産生抑制や作用遮断が好中球の浸潤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、被殻出血において好中球浸潤を抑制するニコチンが皮質下出血においても神経保護効果と抗炎症効果をもたらすことから、好中球の制御が異なるタイプの脳出血病態に対して有効な治療戦略となる可能性を提起した。

研究成果の概要(英文)：The present study established an experimental system to analyze interactions between neutrophils and brain tissues by utilizing HL-60 cells and organotypic rat brain tissue cultures. In this experimental system, neutrophils were found to exhibit pro-inflammatory phenotypes in response to hemorrhagic brain tissue injury. The present study also revealed that inhibition of the production or the actions of leukotriene B4 mitigated pathogenic events associated with intracerebral hemorrhage. Moreover, nicotine, which inhibited neutrophil infiltration in response to putaminal hemorrhage, was found to exert neuroprotective and anti-inflammatory effects on a mouse model of subcortical hemorrhage, suggesting that neutrophil regulation could be a versatile therapeutic strategy for hemorrhagic brain injury.

研究分野：神経薬理学

キーワード：好中球 脳卒中 神経保護 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

近年、中枢神経系の細胞死を伴う種々の疾患の病態形成において、末梢血から脳実質組織に浸潤する細胞群が重要な役割を果たすものと考えられるようになってきた。特に、白血球の中で多数を占める好中球は、多発性硬化症や脳卒中をはじめとする脳内炎症を伴う種々の疾患において脳実質内に浸潤することが分かっているが、その病態形成における役割については統一見解が得られておらず、神経変性に対して促進的に機能するとの報告と神経保護的に機能するとの報告が混在している状況である。研究代表者らは近年、好中球刺激作用を有するケモカイン CXCL2 の発現抑制や作用遮断がマウス脳出血モデルにおいて著明な運動機能改善効果をもたらすことを見出した。しかし予想外なことに、CXCL2 の作用遮断は脳出血に伴う好中球の脳内浸潤を抑制しなかった。したがって、脳組織内の好中球の絶対数よりもむしろ好中球の性質の変化が病態改善に関係している可能性が推察された。

一方で、がん組織を対象とした研究から、好中球は N1 型 (細胞傷害性) と N2 型 (細胞保護性) の異なるフェノタイプを呈しうるとの概念が提出されている。したがって、中枢神経疾患の病理形成過程についても好中球のフェノタイプの相違を理解し、これを制御する手段を導き出すことができれば、従来とは一線を画する新たな疾患治療戦略が確立できるものと期待できる。その足がかりとして、中枢神経系の病態を模した条件下で、好中球フェノタイプを制御する薬物の効果を評価するための実験系を構築する必要があった。

2. 研究の目的

本研究は、がん病態において提唱されている好中球の基本フェノタイプを手がかりとして、異なる好中球フェノタイプによる脳卒中病理制御効果を *in vitro* で評価する実験系を構築し、好中球フェノタイプ極性化の制御を介して脳卒中病理を抑制する化合物を見出すこと、および当該化合物の効果を *in vivo* 脳卒中病態モデルで検証し、新規の薬理特性を有する神経保護薬開発のための戦略を確立することを目指した。具体的には、

- ・好中球のフェノタイプ依存的な脳病理制御効果を *in vitro* で評価する実験系を構築する：培養脳組織切片を用いた脳出血/脳虚血病理モデルに対して、N1 あるいは N2 フェノタイプを誘導した好中球系細胞を添加する実験系を確立し、各フェノタイプの脳病理制御効果を解析する。

- ・好中球のフェノタイプ極性化の制御を介して脳卒中病理抑制効果を発揮する化合物を探索する：前項目で構築した *in vitro* 実験系を応用して、種々の化合物を処置した好中球系細胞を培養脳組織切片の脳出血/脳虚血病理モデルに添加することで薬効を評価し、神経保護効果・病理抑制効果を発揮する低分子量化合物を 1 種以上見出す。

- ・前項目で見出した化合物の薬理効果を *in vivo* 脳卒中 (脳出血/脳虚血) 病態モデルを用いて検証し、好中球フェノタイプ制御による中枢神経疾患治療戦略の妥当性を検証する。

3. 研究の方法

In vitro 実験系では、ヒト白血病細胞株 HL-60 細胞と培養脳組織切片を用いた。HL-60 細胞は常法に従って 1.3% ジメチルスルホキシド (DMSO) 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。HL-60 細胞の単独培養系、あるいは HL-60 細胞と脳組織切片との共培養系にトロンビ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。また propidium iodide (PI) 染色により脳組織中の細胞死の程度を定量化した (図 1)。

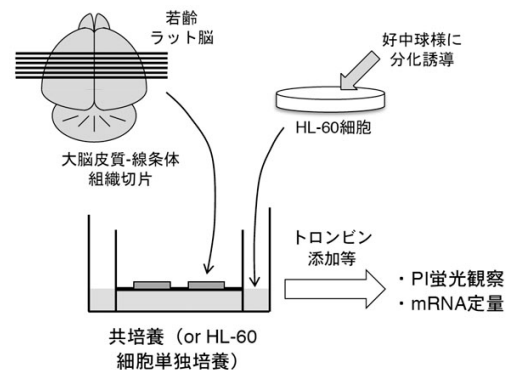


図 1. HL-60 細胞と培養脳組織切片を用いた好中球-脳組織間相互作用解析実験系の概略

In vivo 実験では、内包出血および皮質下出血のモデルを用いた。内包出血実験では、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た。一定時間後の脳組織について ELISA によるロイコトリエン B₄ (LTB₄) 含量の測定、RT-PCR による LTB₄ 生合成関連因子の mRNA 量の測定、脳水分含量の測定を行った。また、免疫組織化学により好中球浸潤数等を評価した。さらに 7 テスラ MRI により得た T2 強調画像から血腫体積を定量化した他、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。皮質下出血実験では、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、免疫組織化学による病理像評価と運動機能障害の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 好中球フェノタイプ変換および好中球-脳組織間相互作用を解析するための新規 *in vitro* 評価系の構築：まず、好中球-脳組織間相互作用の評価系構築に向けた基礎検討を行った。DMSO 刺激により好中球様に分化させた HL-60 細胞にリポ多糖 (LPS) を処置すると、IL-

IL-1 β や IL-6 等の炎症性 (N1 型) サイトカイン mRNA の発現が増大することを確認した。また、脳組織由来の脂質性生理活性物質である 2-アラキドノイルグリセロールが、HL-60 細胞におけるこれら N1 型サイトカイン mRNA 発現に対して抑制的に作用することを見出した。

次に、好中球様に分化させた HL-60 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 HL-60 細胞および脳組織でのサイトカイン発現変化と組織傷害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 HL-60 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、同条件下において好中球様 HL-60 細胞における IL-1 β (N1 型サイトカイン) mRNA の発現は、HL-60 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 HL-60 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。さらに、脳組織切片共存下での HL-60 細胞における IL-1 β 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。これらのことから、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 HL-60 細胞上の TLR4 を刺激することにより IL-1 β mRNA の発現を増強することが示唆された。なお、HL-60 細胞を好中球様に分化させると TLR4 の発現が増大すること、TLR4 アゴニストである LPS がトロンピンと相乗的に HL-60 細胞の IL-1 β mRNA 発現を増強することも確認された。

(2) In vivo 脳出血病態における好中球走化因子 LTB₄ の役割解析：好中球走化因子である LTB₄ に焦点を当て、LTB₄ 生合成経路・LTB₄ 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 LTB₄ 含量の増加が観察された。LTB₄ 生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示した。また免疫組織化学により、健常脳組織においては 5-LOX が主として神経細胞に発現していることが確認された。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顕著な増加が観察された。

次に、5-LOX の特異的阻害薬である zileuton の効果について検討した。Zileuton は出血に伴う 5-LOX mRNA の発現増加には影響を与えなかったが、出血誘発 24 時間後の脳

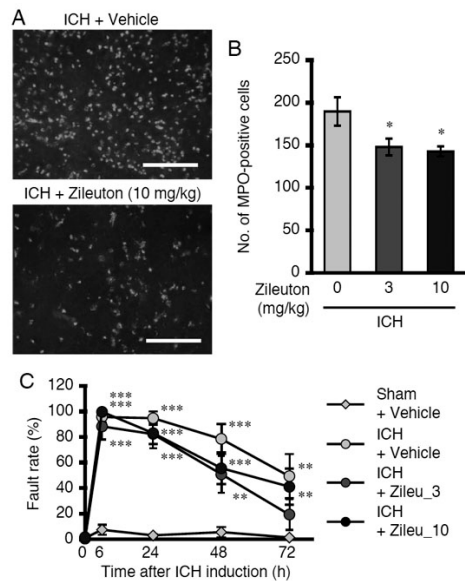


図 2. (A, B) 内包出血 72 時間後の好中球浸潤に対する zileuton の効果. Bar = 100 μ m. * $P < 0.05$ vs. 0 mg/kg. (C) ビーム歩行試験により評価した運動機能障害に対する zileuton の効果. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. sham + vehicle.

組織内 LTB₄ 含量の増加をほぼ完全に抑制した。また、脳組織内への好中球の浸潤は zileuton によって有意に抑制された (図 2A, B)。

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対しては有意な影響を及ぼさなかったが、脳出血後に見られる運

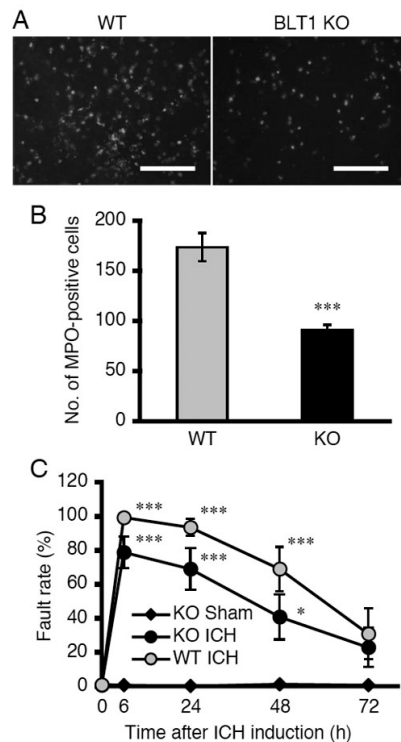


図 3 (A, B) 野生型 (WT) マウスと BLT1 欠損 (KO) マウスにおける内包出血 72 時間後の好中球浸潤の比較. Bar = 100 μ m. *** $P < 0.001$ vs. WT. (C) ビーム歩行試験により評価した運動機能障害の比較. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. KO sham.

動機能障害を抑制する傾向を示し(図 2C)、特に改変 limb-placing 試験においては有意な改善効果を発揮した。

脳出血病態へのLTB₄の関与の確証を得るため、LTB₄受容体について検討した。内包出血18~72時間後の脳組織内ではBLT1およびBLT2のmRNAが増加していた。野生型マウスとBLT1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(図3A, B)。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(図3C)。

(3)皮質下出血病態モデルの作成およびニコチンの作用解析：脳葉(大脳皮質)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、他の脳部位の出血とは異なり非高血圧性に発症するものが過半数を占めており、発症後の治療の戦略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試みた。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。運動機能障害の程度は、出血体積や脳室穿波の有無と関連していた。

研究代表者らは以前に、被殻出血(線条体

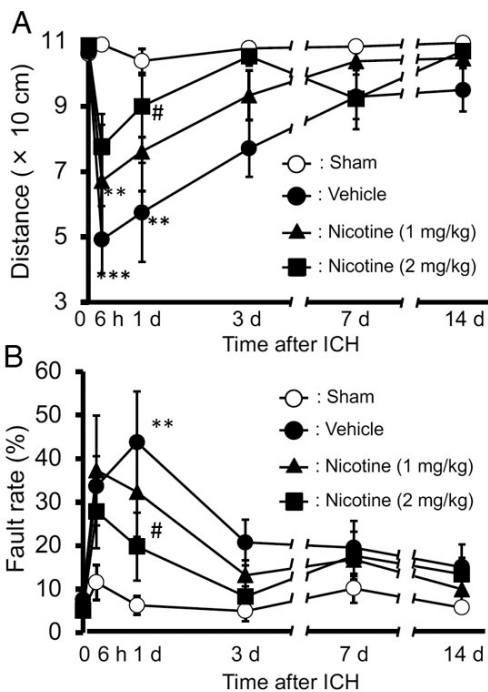


図 4. マウス皮質下出血モデルの運動機能障害に対するニコチンの効果。ビーム歩行試験における歩行距離(A)と後肢踏み外し率(B)を示す。ニコチンは示した用量で出血誘発3時間後に初回投与を行い、以降24時間おきに計3回投与した。n = 6 - 10. ** P < 0.001, *** P < 0.001 vs. Sham; # P < 0.05 vs. Vehicle.

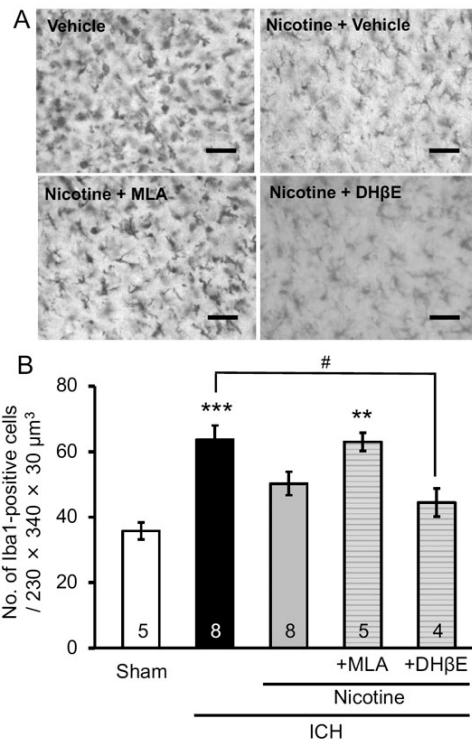


図 5. マウス皮質下出血モデルにおけるニコチンのミクログリア/マクロファージ活性化抑制効果に対するサブタイプ選択的ニコチン受容体遮断薬の作用。(A) 出血誘発3日後のIba1免疫組織化学の典型例。スケールバー=50 μm。ニコチン(2 mg/kg, i.p.)は出血誘発3時間後に初回投与を行い、以降24時間おきに計3回投与した。ニコチン受容体サブタイプ選択的遮断薬(MLAおよびDHβE)は、ニコチン投与10分前に腹腔内投与した。(B) 単位面積あたりのIba1陽性細胞の計数結果。カラム内の数字は各群の例数を示す。** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. Sham; # P < 0.05.

出血)のマウスモデルにおいて、出血誘発後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ミクログリア活性化の抑制が見られることを報告した。そこで、皮質下出血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, i.p.)を出血誘発3時間後から24時間おきに計3回投与すると、ビーム歩行試験において運動機能障害に対する改善効果が用量依存的に認められた(図4)。改変型limb placing試験においてはニコチンの効果は統計学的に有意なものではなかったが、非投与群に比べて運動機能を改善する傾向は出血誘発14日後に至るまで認められた。

NeuN免疫陽性反応により同定されるニューロンの数は、出血誘発3日後の大脳皮質の血腫内領域において著しく減少していたが、ニコチンを3日間連日投与したマウスの血腫内領域では残存ニューロン数が用量依存的に増加した。2 mg/kgニコチン投与群では、非投与群に比べて有意な残存ニューロン数の増加が認められた。また、Iba1免疫反応陽性細胞として同定されるミクログリア/マクロファ-

ジは、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。ニコチン投与群では、そのようなミクログリア/マクロファージの増加が部分的ではあるものの用量依存的かつ有意に抑制された。クログリア/マクロファージに対するニコチンの作用は、 $\alpha 7$ 型ニコチン受容体サブタイプ選択的な遮断薬である methyllycaconitine (MLA) を投与した条件下では全く認められなかった (図 5)。

(4) まとめ：本研究の主目的の一つである *in vitro* での好中球-脳組織間相互作用評価系については、HL-60 細胞と培養脳組織切片の共培養を用いて基本的な系の構築に至った。すなわち、脳出血を模倣する刺激としてトロンビンを用いると、脳組織由来の因子によって好中球 (分化 HL-60 細胞) のフェノタイプのバランスが N1 型へシフトすることが見出された。今後、当該実験系を活用することによって、好中球フェノタイプの制御を介して脳組織保護作用を発揮する薬物の探索・評価を推進していくことが可能と考えられる。

また本研究により、脳出血病態と好中球総化性因子である LTB₄ の脳内での産生との関係が初めて明らかになった。Zileuton が好中球の浸潤や運動機能障害に対して有意な効果をもたらしたことから、5-LOX 系により生成する LTB₄ が内包出血病態に関与するとの仮説が支持された。実際、LTB₄ に対する好中球の化学走化性を媒介する BLT1 を欠損したマウスでは、野生型マウスと比較して好中球浸潤の顕著な減少と運動機能障害の軽減が観察された。これらの結果と一致して、ONO-4057 を出血誘発後から投与した場合にも著明な病態改善効果が認められたことから、BLT1 が新たな脳出血治療薬の標的となる可能性が支持された。BLT1 遮断薬は末梢血中で作用し、好中球の脳内浸潤を抑制することで効果を発揮すると考えられるため、従来の脳保護薬とは全く異なるアプローチで脳組織傷害を防ぐ薬物として期待される。

さらに本研究では、人口の高齢化とともに発症件数が近年増加している皮質下出血に着目し、そのマウス病態モデルを作出した。その上で、最も一般的な脳出血病態である被殻出血において好中球浸潤を抑制することが示されているニコチンが、皮質下出血モデルにおいても神経保護効果および抗炎症効果をもたらすことを明らかにし、好中球の制御が異なるタイプの脳出血病態に対しても有効な治療戦略となる可能性を提起した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Katsuki H, Hijioka M. Intracerebral hemorrhage as an axonal tract injury disorder with inflammatory reactions. *Biol Pharm Bull.* 40:564-568, 2017. doi: 10.1248/bpb.b16-01013. 査読有

- ② Anan J, Hijioka M, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Katsuki H. Cortical hemorrhage-associated neurological deficits and tissue damage in mice are ameliorated by therapeutic treatment with nicotine. *J Neurosci Res.* 95:1838-1849, 2017. doi: 10.1002/jnr.24016. 査読有
- ③ Hijioka M, Anan J, Ishibashi H, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Koga T, Yokomizo T, Shimizu T, Katsuki H. Inhibition of leukotriene B₄ action mitigates intracerebral hemorrhage-associated pathological events in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 360: 399-408, 2017. doi: 10.1124/jpet.116.238824. 査読有
- ④ Takaoka Y, Takahashi M, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Shudo K, Katsuki H. Retinoic acid receptor agonist Am80 inhibits CXCL2 production from microglial BV-2 cells via attenuation of NF- κ B signaling. *Int Immunopharmacol.* 38:367-376, 2016. doi: 10.1016/j.intimp.2016.06.025. 査読有
- ⑤ Hijioka M, Anan J, Matsushita H, Ishibashi H, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Katsuki H. Axonal dysfunction in internal capsule is closely associated with early motor deficits after intracerebral hemorrhage in mice. *Neurosci Res.* 106:38-46, 2016. doi: 10.1016/j.neures.2015.10.006. 査読有

[学会発表] (計 55 件)

- ① 野田大介、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、香月博志。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。日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 26 日、もてなしドーム (金沢市)
- ② 松本倅政、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、香月博志。脳内出血モデルマウスにおける血管新生に対するニコチンの効果。日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 26 日、もてなしドーム (金沢市)
- ③ 高橋萌香、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、香月博志。ミクログリア BV-2 細胞における炎症関連因子発現に対する DNA メチル基転移酵素阻害薬の作用。2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年 12 月 7 日、神戸国際会議場 (神戸市)
- ④ 阿南純平、脇岡雅宣、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、香月博志。皮質下出血に伴う神経障害とニコチンの治療効果。第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日、長崎ブリックホール (長崎市)
- ⑤ 香月博志、松下英明、脇岡雅宣、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、首藤紘一。マウス脳出

血病態における内因性レチノイドの役割
に関する検討. 日本レチノイド研究会第
27回学術集会、2016年10月23日、昭和
薬科大学（町田市）

6. 研究組織

(1) 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・教授
研究者番号：40240733

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

関 貴弘 (SEKI, Takahiro)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：50335650