

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19591224  
 研究課題名（和文）てんかん重積発作後の神経細胞障害におけるアストロサイトを介した制御機構  
 研究課題名（英文）The regulatory mechanisms via astrocytes on neuronal injury after status epileptics  
 研究代表者  
 竹宮 孝子（TAKEMIYA TAKAKO）  
 東京女子医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：70297547

## 研究成果の概要（和文）：

カイニン酸（KA）は痙攣とともに脳内海馬の神経細胞傷害を引き起こす。本研究では、KA が血管内皮細胞に膜型プロスタグランジン E（PGE）合成酵素（mPGES-1）とアストロサイトに PGE<sub>2</sub> レセプター EP3 を誘導することを発見した。そして、合成された PGE<sub>2</sub> はアストロサイトの EP3 を活性化し、アストロサイト内の Ca<sup>2+</sup> を上昇させグルタミン酸の流出を増やし、神経細胞傷害を悪化させることがわかった。これは血管内皮細胞による新たな神経細胞傷害制御メカニズムである。

## 研究成果の概要（英文）：

Kainic acid (KA) causes seizures and hippocampal neuron damage in the brain. In this study we found that KA also induces endothelial microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) receptor EP3 on astrocytes. The PGE<sub>2</sub> produced by mPGES-1 stimulates the activation of EP3 on astrocytes, therefore causes the increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> in astrocytes and glutamate release, leading to the neuronal injury.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学 1

キーワード：小児神経学、てんかん、プロスタグランジン E<sub>2</sub>、血管内皮細胞、アストロサイト、神経細胞傷害

## 1. 研究開始当初の背景

てんかん重積発作を繰り返すと、脳内、

特に海馬の神経細胞が脱落し、海馬硬化を引き起こす。この重積発作後の神経細胞死メカ

ニズムを解明することは、発作後の治療に結びつき臨床的意義も大きい。一方、てんかん病態におけるグリア - ニューロン回路網の重要性が明らかになりつつあり、近年「てんかん発作における異常なグルタミン酸 (glu.) の放出源はアストロサイト (astro.) である」と報告された (Tian GF et al., Nat Med. 11(9):973-81. 2005)。この astro. からのカルシウム ( $Ca^{2+}$ ) 依存性 glu. 放出はニューロンのシナプス後スパインの glu. 受容体を活性化して  $Ca^{2+}$  流入を増やすため、その作用が持続的で強くなると神経細胞障害をきたす可能性がある。申請者は、重積発作後の神経細胞死のメカニズムにおいても、このグリアからの  $Ca^{2+}$  依存性 glu. 放出が重要な役割を持つと考えている。

一方、astro. の endfoot は血管内皮細胞を取り囲むように存在している。これは血管内皮細胞と astro. 間に何らかの相互作用が存在する可能性を示唆している。これまでに申請者は、興奮性アミノ酸であるカイニン酸 (KA) を海馬内に微量注入し重積モデルを作成すると、遅発性に大量の  $PGE_2$  が産生され、その合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ - 2 (COX-2) とその下流のプロスタグランジン E ( $PGE$ ) 合成酵素 (mPGES-1) が血管内皮細胞で誘導されることを見出した (Takemiya T et al., Neurosci Res. 56(1):103-10. 2006)。また過去には、海馬培養組織において外因性  $PGE_2$  が astro. からの glu. 遊離を促進したという知見もある (Bezzi P et al., Nature. 391(6664) :281-5. 1998)。これらの結果は、血管内皮細胞で作られる  $PGE_2$  が astro. の endfoot に作用し、astro. からの glu. 遊離に対し促進的に働いている可能性を示唆する。

そこで本研究では、血管内皮細胞由来  $PGE_2$  の astro. への作用に着目し、てんかん後の海馬神経細胞死におけるその役割と細胞間メカニズムを解明することとした。これまでに申請者は COX-2 遺伝子欠損マウス (COX-2<sup>-/-</sup>) と COX-2 選択的阻害薬が神経保護作用を示すことを見出していたため (Takemiya T et al., Neurosci Res. 56(1):103-10. 2006)、本研究は、COX-2 の下流酵素の mPGES-1 について、mPGES-1 ノックアウトマウス (mPGES-1<sup>-/-</sup>) も神経保護を示すかどうかを検証し、続いてそのメカニズムについてマウス海馬スライス培養を用いて検

討した。研究前のスライス実験の準備として、mPGES-1<sup>-/-</sup> の繁殖は進んでおり、マウスの海馬スライス培養の条件検討は終了し、野生型マウスのスライス組織における培養液中の  $PGE_2$  濃度、glu. 量測定、マウススライス組織中の astro. の  $Ca^{2+}$  輝度変化観察、および神経細胞障害の評価方法は確立し、mPGES-1<sup>-/-</sup> を用いた実験が速やかに進められる段階であった。また、EP ( $PGE_2$  の受容体) の agonist, antagonist については使用可能であり、研究遂行に必要な技術はほぼそろい、実験プロトコールも十分な検証を終えていた。

## 2. 研究の目的

mPGES-1<sup>-/-</sup> と野生型マウス (WT) の *in vivo* の神経細胞障害を比較後、海馬スライス培養を用いて刺激後の astro. 内  $Ca^{2+}$  変化と glu. 放出、 $PGE_2$  産生、神経細胞障害を比較し、mPGES-1 の作用を明らかにした。また、mPGES-1<sup>-/-</sup> への  $PGE_2$  追加実験と WT への  $Ca^{2+}$  キレート追加実験から  $PGE_2$  関与と  $Ca^{2+}$  依存性 glu. 放出を確認した。又、astro. の各 EP レセプターの発現を調べた後、mPGES-1<sup>-/-</sup> に各 EP agonist を作用させた時と WT に各 EP antagonist を作用させた時の  $Ca^{2+}$  変化、glu. 放出、神経細胞障害を調べ、特異的 EP を介して  $PGE_2$  が astro. の  $Ca^{2+}$  依存性 glu. 放出を促進させ神経細胞障害を促進するかどうかを総合的に検討した。また、ラットの KA 微量注入による痙攣後の神経細胞死モデルにおける、上記の EP サブタイプの海馬内細胞分布を調べた。さらに最終年は、他の難治性神経疾患として、多発性硬化症における細胞傷害に対しても類似のメカニズムがないかどうかを検証した。

## 3. 研究の方法

19 年度の前半は mPGES-1<sup>-/-</sup> を用いて KA を海馬内に微量注入するてんかん痙攣重積動物モデルを作成し、神経細胞障害を WT と比較する。WT では KA によって血管内皮細胞における  $PGE_2$  産生が促進した状態だが、mPGES-1<sup>-/-</sup> は mPGES-1 が無いため、KA を加えても血管内皮細胞で  $PGE_2$  が産生されないため、神経細胞障害における mPGES-1 の作用を明確にできると考えられた。19 年度の後半から mPGES-1<sup>-/-</sup> と WT の海馬スライス培養を用い、両スライスにおいて次の項目を比較検討し、神経細胞障害における血管内皮細胞の

mPGES-1由来 PGE<sub>2</sub>による astro. を介した制御メカニズムを解明した。まず、共焦点レーザー顕微鏡を用いて astro. 内の Ca<sup>2+</sup>輝度を WT、mPGES-1<sup>-/-</sup>間で比較し、mPGES-1由来の PGE<sub>2</sub>が astro. の Ca<sup>2+</sup>を上昇させるかどうかを調べた。astro. は SR101 によって標識し、Ca<sup>2+</sup>は Fluo-4 を用いて可視化した。その次に、KA 刺激後の培養液中の glu. 量を WT と mPGES-1<sup>-/-</sup>間で比較し、mPGES-1 から産生される PGE<sub>2</sub>が astro. からの glu. 放出を増加させるかどうかを調べた。さらに、培養海馬スライスを用いて、細胞障害のマーカーとして頻用されている propidium iodide (PI) 染色を行い、PI 取り込み率を画像解析から求め、細胞障害の程度を mPGES-1<sup>-/-</sup>と WT で比較した。

20年度は昨年度同様、mPGES-1<sup>-/-</sup>と WT の海馬スライス培養を作成し、昨年度までの結果をふまえて、mPGES-1<sup>-/-</sup>海馬スライス中の astro. の細胞内 Ca<sup>2+</sup>輝度低下が PGE<sub>2</sub>によるものであるかどうかを PGE<sub>2</sub> 添加によって検証した。具体的には、mPGES-1<sup>-/-</sup>海馬スライス培養にカイン酸と PGE<sub>2</sub> を添加することで Ca<sup>2+</sup>輝度が上昇し glu. 放出が増加するかどうかを調べた。さらに WT における細胞内 Ca<sup>2+</sup>輝度上昇と glu. 放出の関係を調べるために、Ca<sup>2+</sup>キレート剤 (BAPTA) で処理し、WT にカイン酸を添加した時に見られた Ca<sup>2+</sup>輝度上昇および glu. 放出量増加がどのように変化するかを調べた。SR101 によって標識された astro. と Fluo-4 で可視化された細胞内 Ca<sup>2+</sup>を共焦点レーザー顕微鏡で観察、記録した。また、これらの両実験において、細胞障害の変化については PI 染色を行い、PI 取り込み率を画像解析から求め細胞障害の程度を定量化し各コントロール群と比較した。さらに KA による WT の Ca<sup>2+</sup>輝度上昇を 1 点でとらえるのではなく、経時的に観察、記録し、Ca<sup>2+</sup>オシレーションが存在するかどうかを調べた。

21年度は、まず、astro. の細胞内 Ca<sup>2+</sup>輝度上昇を引き起こす EP のサブタイプを決定するため、mPGES-1<sup>-/-</sup>と WT の海馬スライス培養を作成し、mPGES-1<sup>-/-</sup>の海馬スライス培養に、KA と同時に各 EP agonist を作用させ、astro. の Ca<sup>2+</sup>輝度変化から astro. に作用する agonist を同定する。続いて、WT の海馬スライス培養に、各 EP antagonist を作用させ、同様に astro. に作用する特異的な antagonist を決定する。その後、ラットの海馬に KA を微量注入し、神経細胞死を引き起

こす動物モデルを作成し、その脳標本を用いて、上記の EP サブタイプの海馬内細胞分布を免疫染色法によって調べた。さらに、WT と mPGES-1<sup>-/-</sup>を用いて、多発性硬化症モデル (EAE) を作成し、両群の運動障害の発症時期、重症度、症状の持続期間などを比較検討した。

#### 4. 研究成果

mPGES-1<sup>-/-</sup>と WT の海馬内に KA を微量注入するてんかん痙攣重積動物モデルを作成し、経時的な海馬内 PGE<sub>2</sub>量、直腸温の変化および 48 時間後の海馬 CA3 領域の残存神経細胞数を比較した。WT は mPGES-1<sup>-/-</sup>に比べ 24 時間後 PGE<sub>2</sub>量は約 3 倍であり、残存神経細胞数が有意に少ないことがわかった。直腸温には有意な差はなかった。以上の結果より、KA 投与後に海馬血管内皮細胞で誘導される mPGES-1 は PGE<sub>2</sub> 産生を増やし神経細胞障害を促進することがわかったが、その PGE<sub>2</sub> は体温上昇を介さず局所的に作用していることもわかった。

続いて、mPGES-1<sup>-/-</sup>と WT の海馬組織培養を用いて、KA 刺激後の astro. 内 Ca<sup>2+</sup>変化と glu. 放出、PGE<sub>2</sub> 産生、神経細胞障害を比較し、神経細胞障害における血管内皮細胞 mPGES-1 由来 PGE<sub>2</sub> による astro. を介した制御メカニズムを明らかにした。培養液中に KA を添加し、17 時間後の海馬組織培養を用いて実験を行った。WT の組織内 PGE<sub>2</sub>量は KA 無添加群に比べ有意に上昇していた。Ca<sup>2+</sup>は Fluo-4 を用いて可視化し、astro. は SR101 によって標識し、astro. 内 Ca<sup>2+</sup>輝度変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、WT に比べ mPGES-1<sup>-/-</sup>では astro. 内 Ca<sup>2+</sup>輝度が低く、一定時間観察内の輝度変化も軽度であることがわかった。次に、培養液中に放出される glu. の量を比較したところ、mPGES-1<sup>-/-</sup>群が有意に少ないことがわかった。また、神経細胞障害のマーカーとして頻用されている PI 染色を行い、PI 取り込み率を求め細胞障害の程度を mPGES-1<sup>-/-</sup>と WT で比較したところ、mPGES-1<sup>-/-</sup>群において PI 取り込み率が有意に低いことがわかった。以上の結果から、血管内皮細胞 mPGES-1 から合成される PGE<sub>2</sub> は astro. からの Ca<sup>2+</sup>依存性 glu. 放出を促進し、それが神経細胞障害の増強を引き起こしていると考えられた。

さらに、この WT における Ca<sup>2+</sup>輝度上昇は

BAPTA によって抑制され、それに伴って glu. の量も PI 取り込み率も低下した。以上の結果から、神経細胞傷害は  $Ca^{2+}$  依存性 glu. 放出によると考えられた。また、mPGES-1<sup>-/-</sup> の海馬培養組織に KA と共に PGE<sub>2</sub> を添加すると、WT 同様の astro. 内の  $Ca^{2+}$  輝度上昇、培養液中 glu. 濃度上昇、PI 取り込み率の上昇が観察された。この結果も、血管内皮細胞 mPGES-1 から合成される PGE<sub>2</sub> は astro. からの  $Ca^{2+}$  依存性 glu. 放出を促進し、それが神経細胞障害の増強を引き起こすことを裏づけた。

最後に、astro. の細胞内  $Ca^{2+}$  輝度上昇を引き起こす EP のサブタイプを決定するため、mPGES-1<sup>-/-</sup> と WT の海馬スライス培養を作成し、mPGES-1<sup>-/-</sup> の海馬スライス培養に KA と各 EP agonist を作用させたところ、EP3 agonist のみが astro. の  $Ca^{2+}$  輝度を上昇させた。また、WT の海馬スライス培養に各 EP antagonist を作用させたところ、EP3 antagonist のみが astro. の  $Ca^{2+}$  輝度上昇を抑制した。さらに、ラットの海馬に KA を微量注入し、神経細胞死を引き起こす動物モデルを作成し、その脳標本を用いて EP3 レセプターの海馬内細胞分布を免疫染色法によって調べたところ、KA 投与群はコントロール群に比べ、血管を取り巻く astro. の endfoot に発現が強化されることがわかった。endfoot は血管内皮細胞を取り囲むように存在するため、血管内皮細胞で産生された PGE<sub>2</sub> が直接 astro. の endfoot に作用している可能性が強く示唆された。以上の結果から、KA 刺激によって血管内皮細胞で産生された PGE<sub>2</sub> は astro. の endfoot の EP3 レセプターを活性化して astro. の細胞内  $Ca^{2+}$  輝度上昇を引き起こすと考えられた。

さらに、WT と mPGES-1<sup>-/-</sup> を用いて EAE を作成し、両群の運動障害の発症時期、重症度、症状の持続期間などを比較検討した結果、EAE の発症時期に有意差は認められなかったが、mPGES-1<sup>-/-</sup> は WT に比べて、症状は軽症でありその持続期間も短いことがわかった。これより、mPGES-1 が合成する PGE<sub>2</sub> は多発性硬化症の重症化、遷延化に関与することが示唆された。

## 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6件)

Takemiya T, Matsumura K, Sugiura H, (他

5 名, 1 番目), Endothelial microsomal prostaglandin E synthase-1 exacerbates neuronal loss induced by kainate, *Journal of Neuroscience Research*, 88, 381-390, 2010, 査読有

Sugiura H, Tanaka H, Yasuda S, Takemiya T, Yamagata K. (4 番目), Transducing neuronal activity into dendritic spine morphology: new roles for p38 MAP kinase and N-cadherin, *Neuroscientist*, 15(1), 90-104, 2009, 査読有

矢吹恭子、土谷健、竹宮孝子、山形要人、新田孝作. (3 番目), mPGES-1 ノックアウトマウスを用いた鉄代謝蛋白 hepcidin の調節機能の検討, *東京女子医科大学雑誌*, 79 巻 12 号, 499-504, 2009, 査読有  
Takemiya T and Yamagata K (1 番目), Effect of COX-2 Inhibitors on Brain Diseases, *Brain research Journal*, 1, 135-164, 2008, 査読無

Takemiya T, Matsumura K, Yamagata K (1 番目), Roles of prostaglandin synthesis in excitotoxic brain diseases, *Neurochem Int.*, 51, 112-20, 2007, 査読有

Yasuda S, Tanaka H, Sugiura H, Okamura K, Sakaguchi T, Tran U, Takemiya T, (他 5 名, 7 番目), Activity-Induced Protocadherin Arcadlin Regulates Dendritic Spine Number by Triggering N-Cadherin Endocytosis via TA02beta and p38 MAP Kinases, 56, 456-71, 2007, 査読有

[学会発表](計10件)

竹宮孝子, 他7名, 血管内皮細胞 mPGES-1 産生 PGE<sub>2</sub> は EP3 レセプターを介してアストロサイトを活性化する, 第 83 回日本薬理学会年会, 2010.3.17, 大阪

竹内千仙, 竹宮孝子, 他5名, 多発性硬化症における誘導型プロスタグランジン E 合成酵素の役割, 第 52 回日本神経化学学会大会, 2009.6.23, 伊香保

Takemiya T, Matsumura K, Sugiura H, Yasuda S, Uematsu S, Akira S, Yamagata K, Endothelial mPGES-1 regulates  $Ca^{2+}$ -dependent glutamate release from astrocyte via EP3, 第 51 回日本神経化学学会大会, 2008.9.11, 富山

Sugiura H, Takigami S., Yasuda S, Yoshimura Y, Takemiya T, Yamauchi T, Hino O, Yamagata K, Mechanism of dendritic spine abnormality in tuberous sclerosis, 第 51 回日本神経化学会大会, 2008.9.11, 富山

Yasuda S, Sugiura H, Maeno-Hikichi, Y, Takemiya T, Tanaka H, Yamagata K, The role of two Arcadlin splicing variants in synaptic remodeling, 第 31 回日本神経科学大会, 2008.7.11, 東京

Takemiya T, Matsumura K, Sugiura H, Maehara M, Yasuda S, Uematsu S, Akira S, Yamagata K, The regulatory mechanism of neuronal damage by endothelial PGE<sub>2</sub> via astrocytes, 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会合同大会, 2007.9.10, 横浜

竹宮孝子, 松村潔, 前原通代, 杉浦弘子, 安田新, 植松智, 審良静男, 山形要人, 血管内皮細胞によるアストロサイトを介した神経細胞障害の制御, 第 80 回日本薬理学会年会, 2007.3.15, 名古屋

Yasuda S, Sugiura H, Maeno Y, Takemiya T, Tanaka H, Yamagata K, The role of Arcadlin isoforms in synaptic remodeling, 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会合同大会, 2007.9.10, 横浜

杉浦弘子, 安田新, 吉村好之, 竹宮孝子, 山内卓, 山形要人, TSC2-Rheb-mTOR 経路はスパインの形態を制御する, 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会合同大会, 2007.9.12, 横浜

安田新, 杉浦弘子, 前野-引地愉香, 竹宮孝子, 田中秀和, 山形要人, 神経活動依存的に発現する接着分子 Arcadlin とその splice variant によるスパイン密度の制御, 第 16 回海馬と高次機能学会, 2007.11.24, 奈良

[ 図書 ] (計 1 件)

Takemiya T, Yamagata K, New York: Nova science publishers, Chapter 4. Effects of COX-2 Inhibitors on Brain Diseases. In Trends in COX-2 inhibitor Research, 2007, p 47-75

[ 産業財産権 ]  
出願状況 (計 0 件)  
取得状況 (計 0 件)

[ その他 ] (計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

竹宮 孝子 (TAKEMIYA TAKAKO)  
東京女子医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 70297547

### (2) 研究分担者

杉浦 弘子 (SUGIURA HIROKO)  
(財) 東京都医学研究機構・東京都神経科学  
総合研究所・研究員  
研究者番号 : 40162870

### (3) 連携研究者

前原 通代 (MAEHARA MICHIO)  
東京女子医科大学・大学病院・主任検査技師  
研究者番号 : 90398800

竹内 千仙 (TAKEUCHI CHISEN)  
東京女子医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号 : 70333094