

機関番号：17401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390026

研究課題名 (和文) ミクログリアの働きから見た脳内出血の病理およびその防御に関する研究

研究課題名 (英文) Research on pathology and protection of intracerebral hemorrhage with special reference to microglial functions

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

研究成果の概要 (和文) : 有効な薬物治療法が未だ存在しない脳内出血について、実験動物モデル等を用いてその病理メカニズムを解析した。併せて、脳内の免疫細胞であるミクログリアの働きを薬物によって制御することで治療効果が得られるかについて研究を展開した。その結果、過剰に活性化されたミクログリアが出血後の脳組織の損傷に寄与することが明らかになるとともに、合成レチノイドなどの低分子量化合物が脳内出血に対して治療効果をもたらす得ることが示された。

研究成果の概要 (英文) : Pathogenic mechanisms of intracerebral hemorrhage, a neurological disorder for which no effective drug therapies are available, were investigated in experimental animal models. Potential therapeutic effects of drugs that regulate functions of microglia, brain-resident immune cell population were also investigated. Obtained results have revealed that excessively activated microglia contribute to brain tissue damage following intracerebral hemorrhage, and that several low-molecular-weight compounds such as synthetic retinoids can produce therapeutic effects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：神経薬理学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：脳卒中、トロンビン、ニコチン、レチノイド

1. 研究開始当初の背景

脳卒中と総称される疾患のうち、脳梗塞を代表とする虚血性脳卒中については多くの基礎および臨床研究が活発に行われており、本邦では既に神経保護を基盤とした治療薬(エダラボン)も臨床適用されている。一方で、脳内出血を代表とする出血性脳卒中については研究の進展が著しく遅れており、病理形成機序についてもほとんど明らかになっていない。薬物治療という点においても、脳浮腫を軽減させるためのマンニトールやグ

リセリン等の浸透圧調節薬が臨床適用されているのみである。欧米では最近、血液凝固系VII因子が新規脳内出血治療薬の候補として臨床試験段階に入っているが、これは主として出血量の減少による有効性を期待するものであり、神経保護の観点から出血に伴う脳組織変性を妨げる薬物は見出されていない。

研究代表者はこれまで中枢神経変性疾患に関する一連の研究を展開する過程で、活性化型ミクログリアがパーキンソン病に関連

する中脳黒質ドーパミンニューロンの選択的変性の誘導において重要な役割を担うことを明らかにしてきた。また近年、血中プロテアーゼであるトロンビンの *in vitro* および *in vivo* における神経毒性の機序を解析するとともに、脳内出血に伴う神経変性の誘導における血中トロンビンの関与についての検討を進めてきた。その結果、培養大脳皮質-線条体組織切片において観察されるトロンビン毒性に関与する機序と、*in vivo* 脳内出血モデルにおいて組織障害に関与する機序が多く一致することを明らかにしてきた。具体的には、線条体組織に対するトロンビンの *in vitro* および *in vivo* 毒性、ならびに脳内出血による *in vivo* 線条体組織障害がいずれも MAP キナーゼファミリーの動員を伴うミクログリアの活性化に依存することを見出している。これらの結果を踏まえ、活性化型ミクログリアの神経細胞障害性をもたらす分子基盤、およびそれに対する防御手段の探索を目的とする本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

脳内出血は、血管壁の変性を基盤とする脳内微小動脈瘤の破裂などにより発症する疾患で、線条体や視床などの特定の脳部位において好発する。発症後は、生存可能であった場合でも後遺症により介護が必要となる場合が多く、その予後改善は重要な社会的課題となっている。しかし現在、脳内出血に対する有効な薬物療法は皆無に近い状況である。出血に伴って生じる脳組織の損傷、特に神経細胞の脱落が誘導される機序を解明することは、脳内出血治療薬開発のための新たなターゲット候補を見出す上で極めて重要なステップである。

本研究は出血後の脳組織内で過剰に活性化されるミクログリアの病態生理学的役割に焦点を当て、ミクログリアの活性化の誘導および活性化状態の維持における MAP キナーゼファミリーなどの細胞内シグナル伝達分子の役割の解析、ミクログリアの産生する細胞障害性因子としての一酸化窒素 (NO)、ポリアミン類、サイトカイン/ケモカイン類の挙動の解析、レチノイド受容体リガンド等、ミクログリアの活性化を抑制して神経保護をもたらす可能性のある薬物の探索、の3点について検討を進め、ミクログリアをターゲットとした脳内出血治療という新たな戦略の提唱を目指した。

3. 研究の方法

本研究は、培養脳組織切片を用いた *in vitro* 実験系、および脳内出血モデル動物を用いた *in vivo* 実験系において検討を進めた。

In vitro 実験系については、新生仔ラット

脳より作成した大脳皮質-線条体切片を培養維持し、これにトロンビンを作用させることによって生じる種々の病理変化を観察した。種々の薬物の効果は、それらを培地に添加することによって調べた。トロンビン処置後の病理変化は、以下に挙げる指標の定量的（一部は定性的）変化として評価した。

- ・組織障害の程度：Propidium iodide の取込みによる蛍光強度の増大を指標とした死細胞数の評価、線条体組織面積の変化（萎縮）の計測、および TUNEL 染色によるアポトーシス様細胞の出現の観察。さらに、細胞種特異的マーカータンパクに対する免疫組織化学に基づく組織内の神経細胞、アストロサイト、ミクログリアの状態の観察。

- ・シグナル伝達経路の挙動：ERK, p38 MAPK および JNK のリン酸化・活性化レベルのウェスタンブロットによる定量、ならびに蛍光二重免疫染色法による細胞種ごとの各 MAP キナーゼのリン酸化レベルの変化の観察を行った。また、各 MAP キナーゼと関連するシグナル分子群の活性化あるいは細胞下分布の変化についても検討した。

- ・細胞障害性因子の挙動：誘導型 NO 合成酵素 (iNOS)、ならびにポリアミン合成に関わるアルギナーゼとオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) のタンパクおよび mRNA の発現レベルをそれぞれウェスタンブロットおよび RT-PCR 法により定量。組織内での細胞種ごとの iNOS、アルギナーゼおよび ODC の発現状態については、免疫組織化学により検討した。また、培地中の亜硝酸濃度の定量により NO 産生量を評価する他、HPLC により組織のポリアミン含量を測定した。さらに、ELISA 法を用いてサイトカイン/ケモカイン類の産生量の変化を調べた。

In vivo 実験系については、片側線条体内にコラゲナーゼ溶液を微量投与して出血を誘発した成体ラットあるいはマウスを用いた。薬物はコラゲナーゼと同時に脳実質内に投与するか、側脳室内あるいは全身性に頻回投与を行った。出血誘発の1~14日後に、以下の項目について検討した。

- ・組織障害の程度：神経細胞特異的マーカー (NeuN) に対する免疫組織化学による生存神経細胞の同定と計数、TUNEL 染色によるアポトーシス様細胞の出現の観察、ならびに血腫のサイズおよび脳浮腫の程度（脳水分含量の増加）の計測を行った。

- ・シグナル伝達経路の挙動：*In vitro* 実験系と同様の項目について検討した。

- ・細胞障害性因子の挙動：*In vitro* 実験系と同様の項目について検討した。NO 産生量については、組織内のニトロ化修飾タンパクをイムノブロット法にて定量することによって評価した。

- ・行動学的変化：脳内出血誘発後の動物の全

般的運動機能をスコア化して評価した他、アポモルヒネ投与により誘発される回転運動や、接着テープ除去テスト、beam walking テスト、modified limb placing テストといった片側性障害評価法を用いて経日的に神経学的症状をモニターし、薬物の効果を調べた。

4. 研究成果

(1) 培養大脳皮質-線条体組織切片を用いて、トロンビンによる線条体組織傷害とミクログリア活性化、およびそれらを媒介する細胞内外シグナル分子の挙動について解析した。トロンビン処置によって線条体ニューロンにアポトーシスが誘導された。カスパーゼ-3 阻害薬によるアポトーシスの抑制や、サイトカラシン D 等によるミクログリアの食能の抑制は、トロンビンによる線条体組織萎縮を有意に抑制した。一方で、トロンビンは MAP キナーゼ阻害薬の存在下においてのみ、線条体組織内のミクログリアにカスパーゼ-3 非依存的なアポトーシス様細胞死を誘導した。また、トロンビンは培養組織切片に腫瘍壊死因子(TNF)- α の産生を誘導し、これは各種 MAP キナーゼ阻害薬によって抑制された。さらに、トロンビンによる線条体ニューロンのアポトーシスは、TNF- α の中和抗体によって著明に抑制された。これらの結果は、MAP キナーゼ群が活性化ミクログリアの生存を維持することによって線条体組織傷害の進行に寄与すること、また活性化ミクログリアがその食能に加え、TNF- α の産生遊離を介して組織傷害をもたらすことを示唆するものである。

さらに、同様の実験系を用いて、トロンビン誘発脳組織傷害におけるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の役割について検討した。HO-1 を阻害する ZnPPiX は、トロンビンにより誘発される大脳皮質ニューロン死を抑制し、線条体組織萎縮に対しても抑制する傾向を示した。トロンビンによる HO-1 の発現誘導は、主としてミクログリアとアストロサイトに認められた。この HO-1 発現誘導は p38 MAP キナーゼの阻害によって顕著に抑制され、また p38 MAP キナーゼの初期の活性化は線条体のミクログリアにおいて認められた。興味深いことに、ZnPPiX 存在下でトロンビンを処置すると、線条体ミクログリアにアポトーシス様の細胞死が誘導され、ミクログリアの数が有意に減少した。一方、ヘム分解産物の一つである一酸化炭素(CO)を遊離する薬物は、トロンビン毒性に対する ZnPPiX の保護効果に拮抗した。これらの結果から、p38 MAP キナーゼ依存的な HO-1 の発現が線条体ミクログリアの生存維持に働くことで組織傷害の拡大に寄与すること、また大脳皮質ニューロン死も HO-1 の発現誘導とそれによる CO 産生を介して制御されることが示唆された。

(2) 神経保護作用およびミクログリア活性化抑制作用を期待して、培養脳組織切片を用いた in vitro 脳内出血病理モデルにおけるニコチン受容体刺激の効果について検討した。組織切片の培養開始時よりニコチンを長期的に適用すると、培養 12 日目に処置したトロンビンにより誘発される大脳皮質ニューロン死および線条体組織萎縮が有意に抑制された。またニコチンの長期処置はトロンビンの誘発するミクログリアの活性化を著明に抑制した。ニコチンの線条体組織萎縮抑制効果およびミクログリア活性化抑制効果は、 $\alpha 7$ 型ニコチン受容体選択的拮抗薬および $\beta 2$ 含有型ニコチン受容体選択的拮抗薬のいずれによっても遮断された。これらの結果から、長期処置した時にのみ発現するニコチンの新たな神経保護作用が明らかとなった。

続いて、コラゲナーゼ微量注入によるマウス脳内出血モデルを用いて、ニコチンの作用を検討した。脳内出血誘発の 3 時間後より 1 日 1 回、ニコチン(2 mg/kg)を腹腔内投与すると、3 日後における血腫中心部の残存ニューロン数が有意に増加した。また、ニコチンは抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2 の脳内での相対的発現量を増加させた。加えてニコチンは出血に伴う血腫周縁部のミクログリアの活性化や酸化ストレスの増大、および血腫内への好中球の浸潤を抑制した。さらに、ニコチンを投与したマウスには、感覚運動機能障害および個体生存率において顕著な改善が見られた。これらの結果から、ニコチン性アセチルコリン受容体が脳内出血治療の新たなターゲットとなりうることを示唆された。

(3) 出血性脳障害の病理形成におけるポリアミン代謝の関与について検討した。コラゲナーゼ微量注入により脳内出血を惹起したラット線条体では、ポリアミン類の生合成に関与するアルギナーゼおよびオルニチン脱炭酸酵素(ODC)の著明な増加が、主としてミクログリアにおいて認められた。アルギナーゼ阻害薬である nor-NOHA を出血惹起直後から 3 日間脳室内に投与すると、血腫中心部位におけるニューロン数の減少は有意に抑制された。また、脳内出血惹起 1 日後において線条体組織のプトレシン含量が一過性に増加する傾向が認められ、この増加は nor-NOHA の投与によって消失した。逆に、脳内出血惹起 7 日後において、nor-NOHA 投与群ではスペルミン含量の有意な増加が見られた。nor-NOHA は、出血後の血腫のサイズや脳水分含量の増大には影響しなかった。以上の結果から、アルギナーゼおよび ODC の発現増大に伴うポリアミン代謝の変動が脳内出血の病理形成に寄与することが示唆された。

(4) コラゲナーゼ微量注入によるマウス脳内出血モデルを用いて、レチノイド受容体作

動薬 Am80 の作用を検討した。Am80 の連日経口投与を出血惹起の前日から、あるいは出血惹起の 6 時間後までに開始すると、3 日後における血腫内残存ニューロン数が有意に増加した。Am80 は出血量や脳浮腫の程度には影響を及ぼさなかった。レチノイド受容体 RAR α の発現は活性化ミクログリア・マクローファージに認められ、また Am80 を投与したマウスでは血腫周縁部における活性化ミクログリア・マクローファージの増加が有意に抑制されていた。さらに、Am80 は出血後のマウスの神経症状および運動障害からの回復を有意に促進した。これらの結果から、レチノイド受容体がミクログリアの制御を介する脳内出血治療薬ターゲットとして有望であることが示された。

以上の研究結果から、脳内出血の病理形成における活性化ミクログリアの役割、およびそれと関連した細胞内・細胞間シグナル伝達機序の一端が明らかとなった。加えて、ミクログリアの活性化制御作用やミクログリア由来の障害性因子の抑制作用を有する複数の低分子量化合物が脳内出血の病理を改善することが示された。これらの知見は、未だ十分な治療法の存在しない脳内出血に対する有効な治療薬を開発する上で重要な基礎的資料を与えるものである。

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 28 件)

- ① Matsushita H, Hijioka M, Hisatsune A, Isohama Y, Shudo K, Katsuki H. A retinoic acid receptor agonist Am80 rescues neurons, attenuates inflammatory reactions, and improves behavioral recovery after intracerebral hemorrhage in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011 Jan;31(1):222-234. 査読有
- ② Katsuki H. Exploring neuroprotective drug therapies for intracerebral hemorrhage. *J Pharmacol Sci.* 2010;114(4):366-378. 査読有
- ③ Ohnishi M, Katsuki H, Unemura K, Izumi Y, Kume T, Takada-Takatori Y, Akaike A. Heme oxygenase-1 contributes to pathology associated with thrombin-induced striatal and cortical injury in organotypic slice culture. *Brain Res.* 2010 Aug 6;1347:170-178. 査読有
- ④ Ohnishi M, Katsuki H, Izumi Y, Kume T, Takada-Takatori Y, Akaike A. Mitogen-activated protein kinases support survival of activated microglia

that mediate thrombin-induced striatal injury in organotypic slice culture. *J Neurosci Res.* 2010 Aug 1;88(10):2155-2164. 査読有

- ⑤ Ohnishi M, Katsuki H, Takagi M, Kume T, Akaike A. Long-term treatment with nicotine suppresses neurotoxicity of, and microglial activation by, thrombin in cortico-striatal slice cultures. *Eur J Pharmacol.* 2009 Jan 14;602(2-3):288-293. 査読有

[学会発表] (計 62 件)

- ① 大西正俊 他、培養大脳皮質-線条体切片におけるトロンビン誘発障害と heme oxygenase-1 の関与. 第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月 23 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ② 脇岡雅宣他、出血性脳障害に対するニコチンの効果. 第 63 回日本薬理学会西南部会、2010 年 11 月 26 日、かごしま県民交流センター (鹿児島市)
- ③ Matsushita H et al. Neuroprotective effect of Am80, a retinoic acid receptor agonist, against hemorrhagic brain injury in mice. 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2010 年 11 月 17 日, San Diego Convention Center (San Diego, CA, USA)
- ④ 香月博志 他、脳内出血の薬物治療は可能か? 生体機能と創薬シンポジウム 2010 京都 (招待講演)、2010 年 9 月 9 日、ホテルグランヴィア京都 (京都市)
- ⑤ 松下英明 他、出血に伴う脳組織障害におけるレチノイド受容体作動薬 Am80 の効果. 第 62 回日本薬理学会西南部会、2009 年 11 月 27 日、リジェール松山 (松山市)
- ⑥ 香月博志 他、脳内出血時の病理形成へのポリアミンの関与. 第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 16 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)
- ⑦ 大西正俊 他、ニコチン受容体長期刺激は大脳皮質-線条体切片培養系におけるトロンビン誘発神経障害およびミクログリアの活性化を制御する. 第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 16 日、パシフィコ横浜 (横浜市)

[その他]

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/kmyakuri/>

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

磯濱 洋一郎 (ISOHAMA YOICHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：10240920

久恒 昭哲 (HISATSUNE AKINORI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：50347001