

平成22年5月17日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790052

研究課題名（和文） 脳細胞傷害時における細胞間情報伝達分子としての過酸化水素の役割

研究課題名（英文） Roles of hydrogen peroxide as intercellular signaling molecule after neural cell injury

研究代表者

片山 貴博（KATAYAMA TAKAHIRO）

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：90399957

研究成果の概要（和文）：ラット大脳皮質線条体領域から作製したスライス培養系において、過酸化水素はアストロサイトなどのグリア細胞において MCP-1 をはじめとした複数のサイトカイン/ケモカインの産生を惹起した。また、ラジカル除去薬であるエダラボンとジメチルチオウレアでは、過酸化水素による細胞傷害に対しては同様に抑制作用を発揮する一方で、サイトカイン/ケモカイン発現上昇に対しては部分的に異なる効果を示すことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In rat corticostriatal slice cultures, hydrogen peroxide exposure induced upregulation of various cytokines/chemokines such as MCP-1 and IL-6 in glial cells. The effects of two free radical scavengers edaravone and dimethylthiourea on hydrogen peroxide-induced cell injury and the production of cytokines/chemokines were examined. Hydrogen peroxide -induced cell injury was inhibited by both edaravone and dimethylthiourea. On the other hand, dimethylthiourea inhibited the increased expression of cytokines/chemokines by hydrogen peroxide, whereas edaravone did not alter the expression of these cytokines/chemokines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：過酸化水素、脳細胞傷害、脳スライス培養系、ケモカイン、サイトカイン、ラジカル除去薬、エダラボン

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系は、神経細胞の他にアストロサイトやミクログリアといったグリア細胞か

ら構成され、近年、これらの細胞間の情報伝達が様々な生理的あるいは病態生理的役割を担っていることが明らかになってきた。研

究代表者もこれまでに、神経細胞傷害時におけるアストロサイト活性化に着目し、脳内細胞構築をよく保持し細胞間相互作用の研究に適した実験系である脳スライス培養系を用いて、NMDAによる神経細胞の特異的傷害により、アストロサイトにおいて MCP-1 や CINC-1 などのケモカインが産生されることを明らかにしてきた。これらケモカイン類は白血球の脳実質への浸潤やグリア細胞の活性化を介して、主として細胞傷害の増悪をもたらす。さらに、MCP-1 による白血球の脳実質内浸潤亢進は、MCP-1 が直接血液脳関門の機能低下を引き起こすことがその一因であることも、最近相次いで報告されている。このような知見より、脳細胞傷害時に、ケモカイン産生などのアストロサイト活性化を制御することは、神経保護のための極めて有用な創薬ターゲットになると考えられた。

一方、活性酸素種の一つである過酸化水素 (H_2O_2) は、生理的条件下では、その生成と分解を調節する複数の酵素群によって細胞内外濃度が厳密に制御されているが、脳虚血などの病態時にはそのバランスが崩れることで細胞内濃度上昇が起こり、より強力な酸化力を有するヒドロキシルラジカル ($OH\cdot$) の生成を介して、脂質の過酸化や核酸傷害などを引き起こす。一方、 H_2O_2 自体も、タンパク質のシステイン残基の酸化等を介して様々な細胞内情報伝達に関与する。病態時における濃度上昇、ならびにその安定性や膜透過性、さらには種々のシグナル伝達に関与するというこれまでの多くの知見を考え合わせると、脳傷害時には、神経細胞やその他の細胞において生成された H_2O_2 が、アストロサイトをはじめとしたグリア細胞の活性化を誘導する細胞間情報伝達分子として機能する可能性が十分に考えられる。しかしながら今まで、特に中枢神経系においては、 H_2O_2 によるシグナル伝達に関する研究の大部分が細胞内情報伝達調節に限られたものであり、細胞間情報伝達のメディエーターとしての役割については、ほとんど検討がなされていないのが現状であった。

2. 研究の目的

上述のような研究背景を鑑み、脳傷害時における細胞間情報伝達のメディエーターとしての H_2O_2 の役割を解明するとともに、 H_2O_2 によるアストロサイトをはじめとしたグリア細胞の活性化が、病態時の脳内細胞間相互作用において果たす役割を明らかにすることを最終的な目的として、平成 20 年度はアストロサイト活性化の指標としてケモカイン MCP-1 に着目し、平成 21 年度はその他のサイトカイン/ケモカインに着目し、以下の検討を行った。

- (1) H_2O_2 による細胞傷害および MCP-1 産生に関する検討
- (2) H_2O_2 による細胞傷害および MCP-1 産生に対するラジカル除去薬の効果に関する検討
- (3) H_2O_2 による各種サイトカイン/ケモカイン産生およびそれらに対するラジカル除去薬の効果に関する検討

3. 研究の方法

(1) 脳スライス培養系の作製

生後 2-3 日齢の Wistar 系ラットから大脳皮質線条体領域を含有する冠状断スライス ($300\ \mu\text{m}$) を作製し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 環境下で 10-11 日間培養した。

(2) 薬物処置

培養 10-11 日目に、 H_2O_2 処置 ($0.3-3\ \mu\text{M}$ 、3 時間) を行った。ラジカル除去薬等の併用薬物は H_2O_2 処置 3 時間前から培地中に添加した。

(3) 細胞傷害の検出

細胞傷害は、細胞外への LDH 遊離あるいは propidium iodide (PI) の細胞内への取り込みを指標として評価した。PI ($5\ \mu\text{g/ml}$) は薬物処置 24 時間前から培地中に添加した。薬物処置前および 27 時間後に、大脳皮質内 $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$ の領域での蛍光強度を測定し、薬物処置前後の蛍光強度の差を算出した。LDH 遊離に関しては、 H_2O_2 処置 27 時間後における培地中の LDH 量を、市販の Cytotoxicity Detection Kit (Roche Diagnostics GmbH) を用いて測定した。

(4) 培地中 MCP-1 量の定量

H_2O_2 処置 27 時間後に培地を回収し、培地中に含まれる MCP-1 量を、市販の ELISA キット (Invitrogen) を用いて測定した。

(5) 各種サイトカイン/ケモカイン発現量の相対的定量

H_2O_2 処置 6 時間後における各種サイトカイン/ケモカイン mRNA の相対的定量はリアルタイム RT-PCR 法により行った。細胞からの total RNA の抽出には、ISOGEN (ニッポンジーン) を用いた。DNase 処理、逆転写反応後、SYBR GREEN を用いたリアルタイム PCR を行った。相対的定量には、GAPDH を対照遺伝子とした $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法を用い、データは対照群を 1 として相対的な発現量で表した。

(6) MCP-1 産生細胞の同定

MCP-1 産生細胞の同定は、抗 MCP-1 抗体と各種マーカータンパクに対する抗体を用いた免疫染色により行った。

(7) 統計学的処理

データは平均値 \pm 標準誤差で表した。統計処理は one-way ANOVA (Student - Neuman - Keuls' *post hoc* test) を用いた。全ての実験において、危険率 5% 未満の場合に統計学的に有意な差があると判定した。

4. 研究成果

脳スライス培養系において、 H_2O_2 による細胞傷害を処置 27 時間後における細胞核への PI 取り込みおよび培地中への LDH 遊離により検討した。いずれの検討方法においても、 H_2O_2 処置 (0.3-3 mM、3 時間) は、濃度依存的に細胞傷害を惹起し、1 mM 以上で有意な差が認められた。続いて、 H_2O_2 による MCP-1 産生を培地中 MCP-1 量を測定することで検討した。 H_2O_2 は、細胞傷害と同様、濃度依存的に MCP-1 の産生を亢進し、1 mM 以上で有意な差が認められた。また、 H_2O_2 による MCP-1 産生細胞種を同定するために、 H_2O_2 処置 9 時間後に免疫二重染色を行ったところ、主な MCP-1 陽性細胞は GFAP 陽性アストロサイトであった。

H_2O_2 から生成する $OH\cdot$ が H_2O_2 による細胞傷害および MCP-1 産生に関与するか否かを明らかにするため、高い $OH\cdot$ 除去能を有し、脳保護薬として臨床の場で使用されているラジカル除

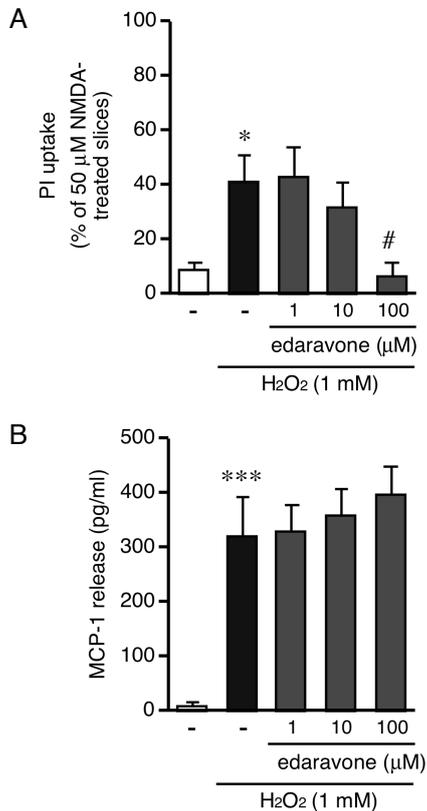


図1 H_2O_2 誘発細胞傷害および MCP-1 産生に対するエダラボンの効果

(A) H_2O_2 処置 (1 mM、3 時間) 27 時間後における PI 取り込みに対するエダラボンの効果。* $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs H_2O_2 alone

(B) H_2O_2 処置 (1 mM、3 時間) 27 時間後における培地中 MCP-1 量に対するエダラボンの効果。*** $P < 0.001$ vs control

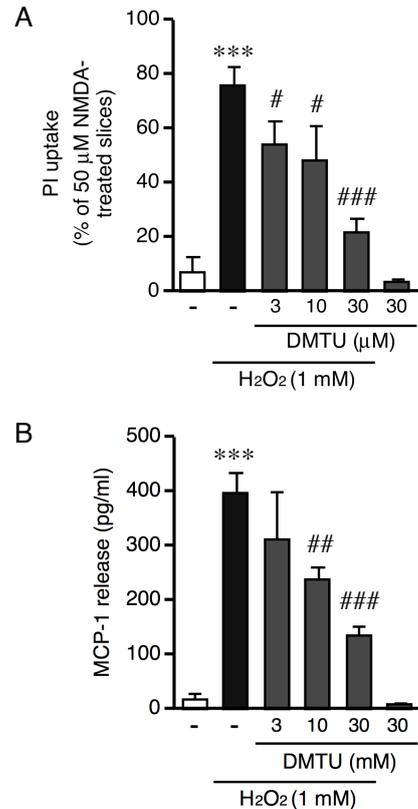


図2 H_2O_2 誘発細胞傷害および MCP-1 産生に対する DMTU の効果

(A) H_2O_2 処置 (1 mM、3 時間) 27 時間後における PI 取り込みに対する DMTU の効果。*** $P < 0.001$ vs control, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs H_2O_2 alone

(B) H_2O_2 処置 (1 mM、3 時間) 27 時間後における培地中 MCP-1 量に対する DMTU の効果。*** $P < 0.001$ vs control, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs H_2O_2 alone

去薬エダラボンの効果を検討した。その結果、エダラボン (100 μ M) は、 H_2O_2 による細胞傷害を完全に抑制した (図 1 A)。しかしながら、一方で、 H_2O_2 による MCP-1 産生に対してはエダラボンは抑制効果を示さなかった (図 1 B)。このことから、 H_2O_2 による細胞傷害が $OH\cdot$ の生成を介した作用であるのに対し、MCP-1 産生は $OH\cdot$ 生成を介さずに H_2O_2 自体の直接的な作用によって誘導されている可能性が考えられた。そこで次に、他のラジカル除去薬あるいはラジカル生成抑制薬でも同様の結果が得られるか否かを、ラジカル除去薬ジメチルチオウレア (DMTU) および Fe^{2+} キレート薬 2,2'-dipyridyl を用いて検討した。その結果、エダラボンとは異なり、DMTU は H_2O_2 による細胞傷害および MCP-1 産生の両方を濃度依存的に抑制し、その抑制効果はほぼ同程度であった (図 2)。また、 $OH\cdot$ 生成抑制を目的として、 H_2O_2

からのフェントン反応を介したOH \cdot 生成に必須であるFe $^{2+}$ のキレート薬2,2'-dipyridylについても同様に検討したところ、2,2'-dipyridylもH $_2$ O $_2$ による細胞傷害およびMCP-1産生の両方をほぼ完全に抑制した(図3)。以上のDMTUおよび2,2'-dipyridylを用いた実験結果から、細胞傷害だけでなくMCP-1産生に関しても、OH \cdot の生成を介したものであることが示唆された。

DMTUや2,2'-dipyridylと異なり、エダラボンがH $_2$ O $_2$ による細胞傷害を抑制する一方でMCP-1産生に影響を与えない理由は、現在のところ明らかではない。ラジカルを捕捉したエダラボンは、エダラボンラジカルやその過酸化体などの反応中間体を経て、最終的に2-oxo-3-(phenylhydrazono)-butanoic acidにまで代謝される。H $_2$ O $_2$ によるMCP-1産生がエダラボンで抑制されない可能性の一つとして、これらの代謝物のいずれかがMCP-1産

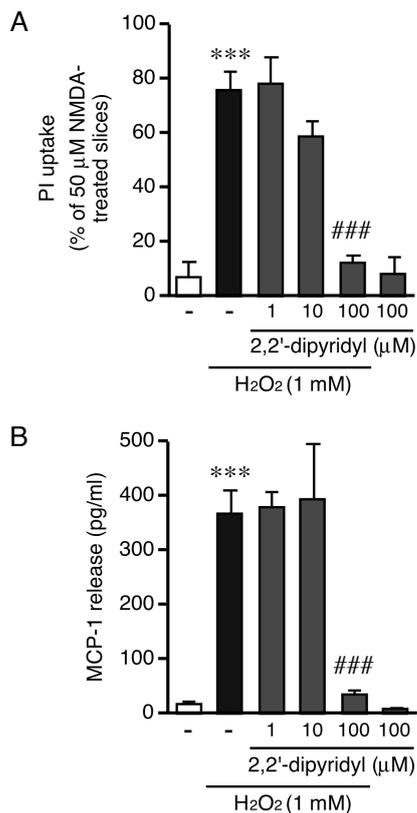


図3 H $_2$ O $_2$ 誘発細胞傷害および MCP-1 産生に対する 2,2'-dipyridyl の効果

(A) H $_2$ O $_2$ 処置 (1 mM 3 時間) 27 時間後における PI 取り込みに対する 2,2'-dipyridyl の効果。*** P < 0.001 vs control, #### P < 0.001 vs H $_2$ O $_2$ alone
(B) H $_2$ O $_2$ 処置 (1 mM 3 時間) 27 時間後における培地中 MCP-1 量に対する 2,2'-dipyridyl の効果。*** P < 0.001 vs control, #### P < 0.001 vs H $_2$ O $_2$ alone

生誘導能を有している可能性が考えられる。

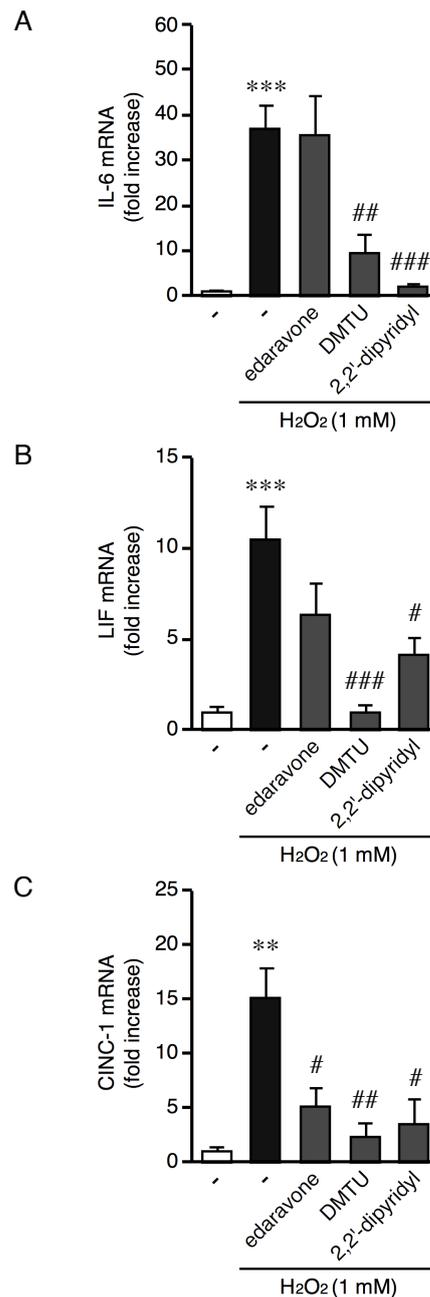


図4 H $_2$ O $_2$ 誘発サイトカイン/ケモカイン 産生に対するラジカル除去薬/ラジカル生成抑制薬の効果

H $_2$ O $_2$ 処置 (1 mM 3 時間) による IL-6 (A)、LIF (B)、CINC-1 (C) それぞれの mRNA 発現上昇に対するエダラボン (100 μM)、DMTU (30 μM)、2,2'-dipyridyl (100 μM) の効果。Total RNA は、H $_2$ O $_2$ 処置 6 時間後に回収し、リアルタイム RT-PCR 解析に用いた。** P < 0.01, *** P < 0.001 vs control, # P < 0.05, ## P < 0.01, #### P < 0.001 vs H $_2$ O $_2$ alone

OH・の生成と細胞傷害ならびに MCP-1 産生の関係をより詳細に検討するために、今後、他の酸化ストレス誘導剤による細胞傷害ならびに MCP-1 産生についても検討する必要がある。

これまでの検討から、エダラボンは、H₂O₂ による細胞傷害を抑制する一方で、脳内炎症に関わるケモカインの1つである MCP-1 の産生を抑制しないことが示された。そこで、MCP-1 以外のいくつかのサイトカイン/ケモカインについても H₂O₂ による産生誘導の有無ならびにそれらに対するラジカル除去薬の効果の差異をリアルタイム RT-PCR により検討した。検討の結果、H₂O₂ 処置により、CINC-1、IL-6、LIF などの mRNA 発現の一過性の上昇が認められた。そこで、これら3種のサイトカイン/ケモカインに着目し、その発現上昇に対するラジカル除去薬の効果を検討した。エダラボンは、MCP-1 同様、IL-6 および LIF の mRNA 発現上昇には影響を与えなかったが、CINC-1 mRNA 発現上昇に関しては有意に抑制した(図4)。また、ジメチルチオウレアおよび 2,2'-dipyridyl は、MCP-1 と同様に、H₂O₂ による IL-6、LIF、CINC-1 いずれの mRNA 発現上昇に対しても有意な抑制作用を示した(図4)。これらの結果から、H₂O₂ による酸化ストレスは、MCP-1 以外にも多くのサイトカイン/ケモカインの産生を誘導し、またその産生は OH・の生成を介したものであることが示唆された。

H₂O₂ による IL-6 や LIF の発現亢進は、DMTU によっては有意に抑制されたのに対し、エダラボンでは抑制されなかった。IL-6 や LIF は脳細胞傷害に対して保護的に働くとの報告が多数なされている。ラジカル除去による直接的な細胞傷害抑制効果に加え、これら保護的に働くサイトカインの産生を抑制しないことが、エダラボンと DMTU などの他のラジカル除去薬との間で認められる薬理作用の差異の一端を担っているのかもしれない。

ラット脳スライス培養系を用いた本研究において、H₂O₂ はアストロサイトなどのグリア細胞において MCP-1 をはじめとした複数のサイトカイン/ケモカインの産生を惹起することを明らかにした。また、エダラボンと DMTU などの他のラジカル除去薬が、H₂O₂ による細胞傷害に対しては同様に抑制効果を示す一方で、H₂O₂ によるサイトカイン/ケモカイン発現上昇に対しては、部分的に異なる効果を示すことを明らかにした。本研究で明らかとなったこれらの研究成果は、酸化ストレスを標的とした薬物治療ならびに新たな治療薬の創製のための基礎的知見の提供につながるものと期待される。

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3件)

- ① Katayama T., Sakaguchi E., Komatsu Y., Oguma T., Uehara T., Minami M. Sustained activation of ERK signaling in astrocytes is critical for neuronal injury-induced monocyte chemoattractant protein-1 production in rat corticostriatal slice cultures. *Eur. J. Neurosci.*, 31: 1359-1367 (2010) 査読有
- ② Katayama T., Ito M., Kaneko S., Satoh M., Uehara T., Minami M. Reciprocal regulation of ATPgammaS-induced monocyte chemoattractant protein-1 by ERK and p38 MAP kinases in rat corticostriatal slice cultures. *J. Neurosci. Res.*, 87: 1573-1581 (2009) 査読有
- ③ Katayama T., Tanaka H., Yoshida T., Uehara T., Minami M. Neuronal injury induces cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) production in astrocytes. *J. Pharmacol. Sci.*, 109: 88-93 (2009) 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① 小松陽介
神経細胞傷害時におけるアストロサイトでの MEK-ERK 系の持続的活性化とケモカイン MCP-1 産生亢進
第59回日本薬理学会北部会
2008年9月27日
仙台(仙台市情報・産業プラザ)
- ② 小松陽介
過酸化水素により誘発される細胞傷害およびケモカイン MCP-1 産生誘導に関する検討
第22回北海道薬物作用談話会
2008年7月26日
札幌(北海道大学薬学部)
- ③ 小松陽介
過酸化水素による細胞傷害およびケモカイン MCP-1 産生誘導に関する検討
日本薬学会北海道支部第130回例会
2008年5月10日
札幌(札幌コンベンションセンター)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 貴博 (KATAYAMA TAKAHIRO)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号: 90399957

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし