

機関番号：83902
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791051
 研究課題名（和文） 脳室周囲白質病変のミクログリア活性化動態と炎症メディエーター抑制に基づく病態制御
 研究課題名（英文） Development of therapeutic strategies for periventricular leukomalacia based on the activation of microglia and the inhibition of inflammatory mediator.
 研究代表者 武井 史郎 (TAKEI SHIRO)
 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 病理学部 リサーチレジデント
 研究者番号：60398576

研究成果の概要（和文）：

脳室周囲白質軟化症(PVL)は未熟児で頻発する病態であるが、明確な予防法や治療法は明らかではない。本研究はモデル動物を用い、ミクログリアが関与するPVLの発症メカニズムを追究した。プロスタグランジンD₂とE₂を合成する酵素が胎内感染後および低酸素/虚血後に、白質のグリア細胞で発現亢進した。そのためこれらプロスタグランジンがミクログリアの活性化を介し、PVL発症のリスクを高めていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Although periventricular leukomalacia (PVL) is one of the most common brain injuries in premature infants, there has been no effective treatment. We investigated the mechanism of PVL in relationship to microglia. We found that hematopoietic prostaglandin D synthase and microsomal prostaglandin E synthase were upregulated in glial cytoplasm in white matter of infant brains during hypoxic/ischemic (H/I) insults following maternal infection. We suggest that these prostaglandins may elevated the risk of PVL via microglial activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：組織細胞化学

科研費の分科・細目：胎児・新生児医学

キーワード：脳室周囲白質軟化症、プロスタグランジン、ミクログリア、脂質メディエーター

1. 研究開始当初の背景

脳室周囲白質軟化症(PVL)は早期産児、特に体重1500g未満の極低出生体重児において最も主要となる脳傷害である。極低出生体重児の約10%でPVLが発症し、脳性麻痺や認知・行動障害といった神経学的異常を引き起こす。PVLは診断確定後では治療は極めて困難であり、早産予防を除いて有効な予防法も

無い。わが国では、早期出産や早期出産児の救命率の増加によって極低出生体重児の割合が増加傾向にあることを反映して、PVLの発症が増加している。以上より、周産期および新生児医療の中でPVLは最重要項目の一つとなっている。

PVLの原因は未熟脳における脳室周囲血管網や血圧調節能の異常による低酸素/虚血と

母胎・胎児感染（絨毛膜羊膜炎など）による炎症反応があげられ、これら2大病因から興奮毒性や酸化ストレスが発生し、脳室周囲白質の未熟オリゴデンドロサイトが死に至る。近年、ヒトと実験動物の研究からPVL病変部位でのミクログリア/マクロファージとサイトカインの増加が確認され、PVL発症にはミクログリアが大きく関わると考えられるようになった。PVLにおけるミクログリアの活性化は興奮毒性や酸化ストレスを産生することが示唆されているが、その活性化メカニズムと活性化を抑制する有効な手段は見つかっていない。

プロスタグランジンは様々な種類と生理作用を持つ脂質メディエーターである。免疫細胞や炎症反応におけるプロスタグランジン類の動態はよく研究されてきており、その合成を阻害する非ステロイド性抗炎症薬は解熱剤、鎮痛剤などとして広く使われている。PVL発症とプロスタグランジン類の関わりについてはこれまでに述べられていないが、ミクログリアは骨髄造血系に由来する一種の免疫担当細胞であるため、PVL発症時のミクログリア活性化にプロスタグランジン類が関わると十分に考えられる。そのため、プロスタグランジン類を介したミクログリアの活性化メカニズムの解明が新たなPVL治療に結びつくことと研究代表者は考えた。

2. 研究の目的

本研究はPVLにおけるミクログリア活性化動態を主軸におき、活性化のメディエーターとなり得るプロスタグランジン類の動態を解析することを目的とした。

本研究では実験動物（ラット）を用いて、よりヒトPVL病態に忠実なモデル作製を試みた。臨床の現場ではPVLの2大病因である細菌感染と低酸素/虚血の合併は頻繁であるが、実験的研究では、細菌感染モデルと低酸素/虚血モデルを組み合わせた報告はほとんど無い。本研究では細菌感染モデルとしての負荷と低酸素/虚血の負荷を組み合わせ、病理学的によりヒトの病態に忠実なPVLモデルの作出を行った。

本研究ではまた、PVLの発症に関与するプロスタグランジンの探索を行った。ヒトを含む哺乳類の脳において、プロスタグランジン D_2 、 E_2 、 $F_{2\alpha}$ （以下 PGD_2 、 PGE_2 、 $PGF_{2\alpha}$ ）が最も主要であり、PVL以外の脳疾患では、オリゴデンドロサイトの細胞死やミクログリアの活性化に関与することが知られている。先に作製したPVLモデルを用い、これら3種のプロスタグランジンの合成酵素、および受容体を発現を解析を試みた。さらに本研究ではプロスタグランジンそのものの組織内動態の解析も試みた。これら解析により、PVLの治療標的となり得るプロスタグランジンを同

定を目指した。

3. 研究の方法

(1) PVLモデル動物の作製

以下の手順で細菌感染に対応するLPSモデル、および低酸素/虚血モデルに対応するH/Iモデルを作製した。LPSモデルは妊娠17日齢のWistarラットへ細菌毒であるLPS（65 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）を腹腔内投与し、作製した。H/Iモデルは生後3日齢仔ラットを用い、右総頸動脈を結紮した後の低酸素処理（6% O_2 、33°C）により作製した。本研究ではLPSモデルとH/Iモデル、これらを組み合わせるLPS+H/Iモデルをそれぞれ作製した。

各負荷処理48時間後に4%パラフォルムアルデヒド(PFA)による灌流固定を行い、パラフィン包埋および凍結包埋の後にヘマトキシリン-エオジン染色(HE染色)標本作製した。各標本は各モデル間の比較解析により、病理学的によりヒトPVLに近いモデルの作製条件を決定した。

(2) グリア細胞の動態解析

グリア細胞マーカーによる免疫染色によりグリア細胞の動態解析を行った。各種グリア細胞マーカーとしてIba1（ミクログリア）、GFAP（アストロサイト）、Olig2（オリゴデンドロサイト）、に対する各抗体を用い、酵素抗体法による免疫染色を行った。先に作製した各モデル間での比較解析により、各負荷におけるグリア細胞、特にミクログリアの動態を解析した。

(3) プロスタグランジンの組織内動態解析

プロスタグランジンの脳組織内における動態を解析するため、3種の主要プロスタグランジンを産生する合成酵素の発現解析を行った。本研究では PGD_2 産生酵素2種類（HPGDS、LPGDS）、 PGE_2 産生酵素3種類（cPGES、mPGES-1、mPGES-2）、 $PGF_{2\alpha}$ 産生酵素1種類（PM/PGFS）を対象とし、各酵素に対する抗体を用いた免疫染色による動態解析を行った。さらにプロスタグランジンそのものを免疫組織学的に検出するため、新規染色法を開発した。組織内のプロスタグランジンを近傍タンパク質に固定しうる、水溶性カルボジイミド(WSC)を主成分とした固定液を用いた組織標本作製した。3種の主要プロスタグランジンに対する特異的抗体も同時に作製し、これらを用いた免疫染色によって、各モデルにおける脳組織内のプロスタグランジンの動態を解析した。

4. 研究成果

(1) PVLモデル動物の作製とグリア細胞動態

3種のモデルにおける病理学的解析を行った結果、LPSモデルとH/Iモデルでは細胞死

や梗塞巣は観察されなかった。一方、2種の負荷を組み合わせた LPS+H/I モデルでは白質を中心とした梗塞巣が観察され(図 1)、この組織像はヒト PVL をよく似た像であった。LPS+H/I モデルにおける梗塞巣は約 50%の個体で観察された。LPS+H/I モデルの梗塞巣内ではマクローファージ様ミクログリアと肥大アストロサイトの数が極端に増加している一方で、オリゴデンドロサイトの数が極端に減少していた。加えて、ミクログリアとアストロサイトの増加は LPS モデルにおいても観察された。よって LPS 負荷はミクログリアとアストロサイトを活性化させ、後に続けて起こる低酸素/虚血負荷による白質内オリゴデンドロサイトの細胞死に対するリスクを高めたことが明らかになった。本モデルはヒト PVL に極めて近似したモデルであり、PVL 病態解析に有用であると考えられた。

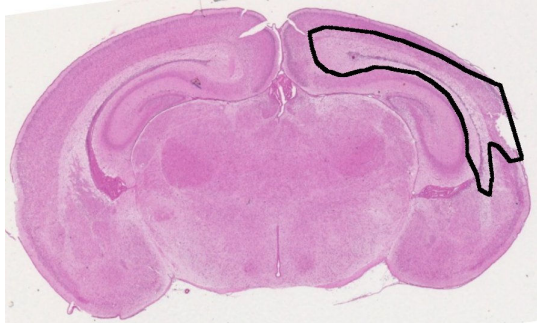


図 1 LPS+H/I モデルにおける脳冠状断観察
黒線で囲まれた部分が梗塞巣を示す。

(2) プロスタグランジン合成酵素の解析

各モデルにおける生後 5 日齢での脳組織を用い、各プロスタグランジン合成酵素の発現を免疫組織化学的に調べた。本研究で対象とした 6 種の合成酵素のうち、HPGDS と mPGES-2 において、顕著な発現亢進が観察された。

HPGDS は健常脳組織も含めて、いずれのモデルにおいても一部のミクログリアに局在し、各モデルにおける細胞内の HPGDS 発現は顕著な差を示さなかった(図 2)。しかし、LPS 負荷や LPS+H/I 負荷によるミクログリアの増加に従い、HPGDS 陽性のミクログリア数が増加していた(図 2)。

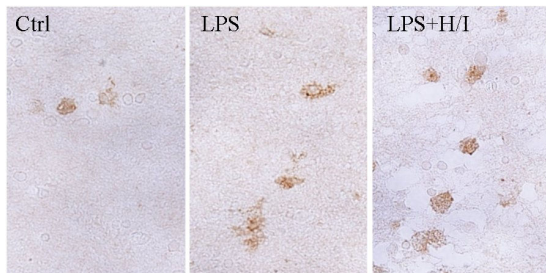


図 2 各モデルにおける HPGDS の発現

mPGES-2 の免疫組織学的比較を図 3 に示す。

mPGES-2 は健常組織では、神経細胞でわずかに発現するのみであったが、LPS 負荷によって顕著な陽性反応を示すアストロサイト様の細胞が増加していた(図 3)。さらに LPS+H/I モデルでは梗塞巣内で陽性細胞が多数存在した(図 3)。

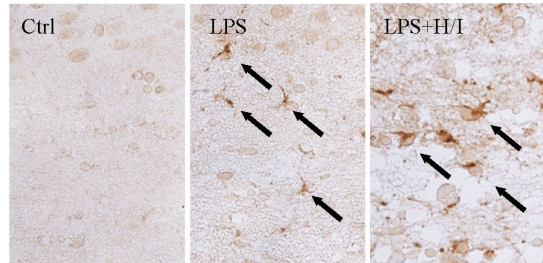


図 3 各モデルにおける mPGES-2 の発現
矢印は負荷処理によって発現亢進したアストロサイト様陽性細胞を示す。

これらの免疫組織学的解析から、LPS 負荷によるミクログリアとアストロサイトの活性化、およびこれらの活性化に起因する白質オリゴデンドロサイトの細胞死には HPGDS と mPGES-2 によって産生される PGD₂、PGE₂ が関与すると考えられた。

(3) プロスタグランジンの解析

プロスタグランジンは極めて急速に代謝されるため、特異的な組織染色は難しいとされてきた。本研究では WSC による固定と特異的 PGD₂、PGE₂、PGF_{2α} の各抗体を用いた新規免疫染色法を開発した。既に海馬特異的に急性発現上昇を示すことが報告されているカイニン酸投与モデル用い、免疫染色の特異性を確認した(図 4)。

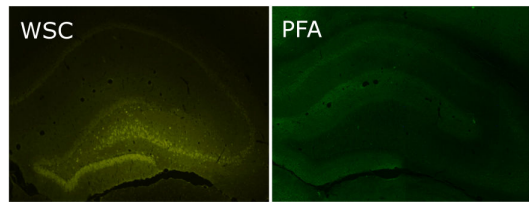


図 4 新規免疫染色法による PGF_{2α} 免疫染色
WSC 固定標本(左)では陽性反応を示すが、PFA 固定標本(右)は陰性である。

各モデルを用い、新規免疫染色法による 3 種のプロスタグランジンの組織内分布を解析したところ、予想に反して、全てのモデルにおいて 3 種のプロスタグランジンに対する陽性反応はほとんど検出できなかった。この結果の理由として、以下のことが考えられた。病態形成におけるプロスタグランジンの急激な産生、代謝は極めて早い。本研究で用いたモデルは低酸素/虚血負荷 48 時間後であるため、PVL 発症の直接的な引き金となる急激に産生されたプロスタグランジンを観察す

るにはタイミングが遅すぎたと考えられた。今後はより早い時間での解析を行い、直接的なPVL発症に関わるプロスタグランジンを決定したい。

(4) 今後の展望

本研究により、PGD₂、PGE₂がPVL発症、そしてLPS負荷によるPVL発症リスクの増加に関わる因子あると考えられた。PGD₂とPGE₂特異的受容体に対する拮抗薬は既に市販されているため、今後はこれら薬剤を用いたPVLモデルの治療実験を行っていく予定である。LPS負荷後、およびそれに続く低酸素/虚血負荷後の各時点での投与により、PGD₂とPGE₂拮抗剤の有効な時期を検討していきたい。

プロスタグランジン制御に関連した創薬は現在盛んに進められており、PVLの治療標的となり得るプロスタグランジンが同定出来た際には、速やかな臨床応用が可能なPVL治療薬の開発が期待できる。さらに本研究の将来的発展性として、ミクログリアの活性化動態の制御が実現すれば、PVL以外にもミクログリア活性化が関与するであろう多くの脳病態の予防・治療への応用が期待できる研究代表者は考える。

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5件)

- ① Yoshikawa K**, Takei S**, Hasegawa-Ishii S, Chiba Y, Furukawa A, Kawamura N, Hosokawa M, Woodward DF, Watanabe K, and Shimada A (**同列筆頭著者)
Preferential localization of prostamide/prostaglandin F synthase in myelin sheaths of the central nervous system.
Brain Research, 査読有, 1367, 2011, 22-32.
- ② Hasegawa-Ishii S, Takei S, Inaba M, Umegaki H, Chiba Y, Furukawa A, Kawamura N, Hosokawa M, and Shimada A
Defects in cytokine-mediated neuroprotective glial responses to excitotoxic hippocampal injury in senescence-accelerated mouse.
Brain Behavior and Immunity, 査読有, 25, 2011, 83-100
- ③ Hasegawa-Ishii S, Takei S, Chiba Y, Furukawa A, Umegaki H, Iguchi A, Kawamura N, Yoshikawa K, Hosokawa M, and Shimada A
Morphological impairments in microglia precede age-related neuronal

degeneration in senescence-accelerated mice.

Neuropathology, 査読有, 31, 2011, 20-28

- ④ Takei S, Tokuhira Y, Shimada A, Hosokawa M, Fukuoka S
Eosin-shadow method: a selective enhancement of light-microscopic visualization of pancreatic zymogen granules on hematoxylin-eosin sections.
Anatomical Science International, 査読有, 85, 2010, 245-250
- ⑤ Furukawa A, Oikawa S, Hasegawa-Ishii S, Chiba Y, Kawamura N, Takei S, Yoshikawa K, Hosokawa M, Kawanishi S, and Shimada A
Proteomic analysis of aging brain in SAMPI0 mouse: a model of age-related cerebral degeneration.
Mechanical Ageing and Development, 査読有, 131, 2010, 379-388

[学会発表] (計16件)

- ① Takei S, Hasegawa-Ishii S, Furukawa A, Chiba Y, Kawamura N, Hosokawa M, Woodward DF, and Watanabe K, Shimada A
Immunohistochemical demonstration of enhanced prostaglandin F₂alpha production following kainic acid-induced seizures in rat hippocampus.
第116回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2011年3月30日, 横浜
- ② Shimada A, Yoshikawa K, Takei S, Hasegawa-Ishii S, Chiba Y, Furukawa A, Kawamura N, Woodward DF, and Watanabe K
The distribution of prostamide/prostaglandin F synthase in the developing and adult mouse central nervous system.
第83回日本生化学会大会、2010年12月10日、神戸
- ③ 千葉陽一、島田厚良、吉川圭介、武井史郎、石井さなえ、古川絢子、河村則子、Woodward DF、渡部紀久子
Prostamide/prostaglandin F synthaseのマウス中枢神経系および培養オリゴデンドロサイトにおける分布
第33回日本神経科学大会、2010年9月3日、神戸市
- ④ Ishii S, Inaba M, Takei S, Furukawa A, Chiba Y, Kawamura N, Hosokawa M, Ikehara S and Shimada A
Microglia as a potential target for age-related neurodegeneration in

- SAMP10 mice.
第 33 回日本基礎老化学会、2010 年 6 月 17 日、名古屋
- ⑤ Shimada A, Yoshikawa K, Takei S, Hasegawa-Ishii S, Chiba Y, Furukawa A, Kawamura N, Woodward DF, and Watanabe K
The distribution of prostamide/prostaglandin F synthase in the developing and adult mouse central nervous system.
Keystone symposia、2010 年 6 月 9 日、京都
- ⑥ 古川絢子、島田厚良、河村則子、武井史郎、千葉陽一、石井さなえ、細川昌則
興奮毒性による海馬損傷における酸化損傷タンパク質の生成
第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会、2010 年 4 月 23 日、東京
- ⑦ 千葉陽一、島田厚良、武井史郎、河村則子、石井さなえ、古川絢子、佐々木健介、岩城徹、細川昌則
Glial cytoplamic inclusions は aggresome としての性格を有する
第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 18 日、名古屋
- ⑧ 古川絢子、島田厚良、河村則子、武井史郎、千葉陽一、石井さなえ、細川昌則
興奮毒性による海馬損傷における酸化損傷タンパク質の生成
第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 18 日、名古屋
- ⑨ 島田厚良、石井さなえ、武井史郎、河村則子、古川絢子、千葉陽一、細川昌則
老化促進モデルマウスにおけるミクログリアの異常と神経変性
第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 16 日、名古屋
- ⑩ Takei S, Shimada A, Hosokawa M, Inaga S
The usefulness of oolong tea extract in an electron staining with platinum blue 6th ISEM09、2009 年 9 月 16 日、神戸
- ⑪ 石井さなえ、島田厚良、千葉陽一、古川絢子、河村則子、武井史郎、細川昌則
SAMP10 にみられるミクログリアの形態異常と興奮毒性に対する応答異常
第 24 回老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会、2009 年 7 月 9 日、松本
- ⑫ 島田厚良、石井さなえ、稲葉宗夫、河村則子、武井史郎、古川絢子、千葉陽一、細川昌則、池原進
SAMP10 への骨髄内骨髄移植によるミクログリア再生を介した神経変性の制御
第 24 回老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会、2009 年 7 月 9 日、松本
- ⑬ 千葉陽一、島田厚良、武井史郎、河村則子、石井さなえ、古川絢子、細川昌則
加齢性神経変性疾患における封入体形成への aggresome の関与
日本基礎老化学会第 32 回大会、2009 年 6 月 20 日、横浜
- ⑭ 千葉陽一、島田厚良、武井史郎、河村則子、石井さなえ、古川絢子、佐々木健介、岩城徹、細川昌則
Glial cytoplamic inclusions は aggresome としての側面を有する
第 50 回日本神経病理学会、2009 年 6 月 20 日、高松
- ⑮ 石井さなえ、島田厚良、千葉陽一、古川絢子、河村則子、武井史郎、細川昌則
老化促進モデルマウスにみられるミクログリアの形態異常と興奮毒性に対する応答異常
第 50 回日本神経病理学会、2009 年 6 月 5 日、高松
- ⑯ 古川絢子、島田厚良、及川伸二、千葉陽一、石井さなえ、河村則子、武井史郎、細川昌則
SAMP10 の加齢性神経変性に伴うタンパク質発現変化に関するプロテオミクス解析
第 50 回日本神経病理学会、2009 年 6 月 5 日、高松
- [その他]
ホームページ等
<http://www.inst-hsc.jp/d-pathology/index.html>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
武井 史郎 (TAKEI SHIRO)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・病理学部・リサーチレジデント
研究者番号：60398576
- (2) 協力研究者
島田厚良 (SHIMADA ATSUYOSHI)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・病理学部・室長
研究者番号：50311444

千葉陽一(CHIBA YOICHI)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究
所・病理学部・主任研究員
研究者番号：30372113

清水孝雄(SHIMIZU TAKAO)
東京大学・医学部・教授
研究者番号：80127092