

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591139

研究課題名（和文） けいれん後の海馬神経細胞傷害の制御メカニズムにおけるミクログリアの役割

研究課題名（英文） The role of microglia under the mechanisms of neuronal damage after seizure in the hippocampus

## 研究代表者

竹宮 孝子（TAKEMIYA TAKAKO）

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70297547

## 研究成果の概要（和文）：

けいれん発作後の神経細胞傷害に対する細胞間制御メカニズムとして、血管内皮細胞におけるプロスタグランジン  $E_2$  ( $PGE_2$ ) 合成酵素 (mPGES-1) の発現機序、アストロサイトにおける  $PGE_2$  レセプター-EP3 の発現機序にはミクログリアで産生される Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) が関与し、特に EP3 については、IL-1 $\beta$  レセプター Type1 (IL-1R1) を介する可能性が示唆された。一方、IL-1 $\beta$  は、神経細胞、アストロサイト、血管の基本的な構造構築にも関与する可能性があり、さらに詳細な検討が必要であることがわかった。

## 研究成果の概要（英文）：

I found that Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) produced in microglia stimulated an induction of mPGES-1 in endothelial cells and EP3 receptor on astrocyte under the intercellular mechanisms of neuronal injury after seizure. In addition, IL-1 $\beta$  affected on IL-1 Receptor Type1 (IL-1R1) on the astrocyte to increase EP3 induction. On the other hand, IL-1 $\beta$  might regulate constructing a basic structure, suggesting a necessity to investigate the role of IL-1 $\beta$  in detail.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児神経学

## 1. 研究開始当初の背景

繰り返すけいれん発作は、脳内海馬の神経細胞傷害を引き起こし、記憶・学習などの高次機能の低下をもたらす。一方、発作後早

期（24 時間以内）の脳内各細胞の遺伝子発現・蛋白合成は、神経細胞傷害の細胞間制御メカニズムに深く関係することがわかってきた。このメカニズムの解明は神経細胞傷害、

高次機能障害の新たな治療戦略として位置づけることができる。

申請者らのこれまでの研究から、カイン酸 (KA) による痙攣発作後には炎症性物質であるプロスタグランジン (PG) 合成酵素のシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) と膜型 PGE<sub>2</sub> 合成酵素 (mPGES-1) が血管内皮細胞で誘導され、大量の PGE<sub>2</sub> 産生が引き起こされることがわかっている。さらに、血管に隣接するアストロサイトの endfoot では PGE<sub>2</sub> レセプターのサブタイプである EP3 が誘導され、血管内皮細胞で作られた PGE<sub>2</sub> は EP3 を介してアストロサイトを活性化し、グルタミン酸の放出を増加させることによって神経細胞傷害を増悪させることを発見した。しかし、KA 刺激後、血管内皮細胞で PGE<sub>2</sub> が合成されるメカニズムやアストロサイトで EP3 が誘導されるメカニズムについては、未だ不明である。一方、海馬のミクログリアは、KA 刺激後早期から活性化され、Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) の産生が増える。さらに、ミクログリアの増殖とともに IL-1 $\beta$  の受容体が増えることも知られており、隣接するミクログリア間では IL-1 $\beta$  を介して活性化と増殖が繰り返されていることがわかる。IL-1 $\beta$  受容体には 2 つのサブタイプ (IL-1Receptor Type1 : IL-1R1、Type2 : IL-1R2) が存在し、細胞内の情報伝達に関わるのは IL-1R1 であると考えられているが、その IL-1R1 は、ニューロン、アストロサイト、血管内皮細胞にも存在することがわかってきた。そのため、ミクログリアで産生された IL-1 $\beta$  はこれらの細胞にも影響を与えている可能性が考えられる。中でも、astrocytoma において IL-1 $\beta$  が EP3 の発現を誘導するという報告は、IL-1 $\beta$  が関与する脳病態とアストロサイトの EP3 発現の関連性を示唆する。また、血管内皮細胞の IL-1R1 ノックアウトマウスでは IL-1 $\beta$  刺激後も血管内皮細胞の COX-2 が誘導されないという報告は、血管内皮細胞における COX-2 誘導には

IL-1R1 の活性化が重要であることを示す。さらに、IL-1R1 ノックアウトマウスは脳虚血モデルにおいて脳保護作用を示し、IL-1 Receptor antagonist (IL-1RA) は IL-1R1 を介して抗痙攣作用を示すことも報告されている。これらの知見と申請者のこれまでの研究成果より、KA 刺激後にミクログリアで作られた IL-1 $\beta$  が、アストロサイトと血管内皮細胞の IL-1R1 を活性化し、それぞれ EP3 の発現、COX-2 と mPGES-1 の発現を誘導し、その結果として痙攣後の神経細胞傷害を悪化させるのではないかと考え、本研究で検証することとした。

## 2. 研究の目的

研究全体としては、けいれん発作後の神経細胞傷害に対する細胞間制御メカニズムの解明を目標とする。これまでに申請者は、血管内皮細胞由来の PGE<sub>2</sub> によるアストロサイトを介した神経細胞傷害の制御機構を発見した。本研究はそれを発展させ、血管内皮細胞における PGE<sub>2</sub> 合成酵素の発現機序、アストロサイトにおける PGE<sub>2</sub> レセプター-EP3 の発現機序および神経細胞傷害経路における、ミクログリア産生 IL-1 $\beta$  の役割を調べる。

## 3. 研究の方法

1 年次は、野生型マウス (WT) と IL-1R1 遺伝子欠損マウス (IL-1R1KO) の海馬スライス初期培養組織に KA 負荷を行い、KA がミクログリアを活性化して産生された IL-1 $\beta$  が血管内皮細胞の IL-1R1 を介して PGE<sub>2</sub> 合成亢進に関与するかどうかを検討する (下記の①~④)。また、血管内皮細胞の初期培養を用いて KA 刺激と IL-1 $\beta$  刺によって mPGES-1 の発現が誘導されるかどうか、増強されるかどうかを観察する。

① KA によるミクログリアの活性 : CD11b によるミクログリアの免疫染色により、海馬内の CA3 領域のミクログリアの膨大

や数の増加を共焦点顕微鏡で観察する。

- ② KAによる海馬内PGE<sub>2</sub>濃度を測定する。
- ③ KAによるmPGES-1の誘導部位と増強を確認する。
- ④ KAによるPGE<sub>2</sub>レセプターEP3の誘導と増強を確認する。

2年次は、けいれん及びけいれん後の神経細胞傷害におけるIL-1R1を介したIL-1βの修飾作用を検証するために、WTとIL-1R1KOを用い、マウスの海馬けいれんモデルを作成し、以下について両群を比較検討する。

- ① KA注入6時間以内の痙攣行動を定量比較する。
- ② KA注入48時間後の海馬神経細胞脱落を脳組織染色と細胞カウントのソフトを用いて定量し比較する。

3年次は、KA刺激後の細胞傷害とmPGES-1の発現に対するIL-1βの修飾作用を検証するために、WTとIL-1βKOの海馬スライス初期培養組織にKA負荷を行い、群間で比較検討する。

- ① 細胞傷害：Neu-Nの免疫染色とPropidium Iodide (PI)染色
- ② KAによるmPGES-1の誘導部位と増強を確認する。
- ③ KAによるPGE<sub>2</sub>レセプターEP3の誘導と増強を確認する。

以上の結果より、血管内皮細胞におけるmPGES-1の発現機序、アストロサイトにおけるPGE<sub>2</sub>レセプターEP3の発現機序、および神経細胞傷害におけるIL-1R1を介したIL-1βの役割を総合的に検討する。

#### 4. 研究成果

1年次は、まず、WT海馬スライス初期培養においては、KA刺激によってmPGES-1が血管内皮細胞だけで誘導され、スライス中のPGE<sub>2</sub>濃度の上昇が認められたことより、増加したPGE<sub>2</sub>の産生場所は血管内皮細胞であることがわかった。しかし、血管内皮細胞の初期培養を行ったところ、KA刺激によってmPGES-1の誘

導は増加しなかった。この結果から、KA刺激後の血管内皮細胞のmPGES-1の誘導はKAの直接作用ではなく、間接作用であることが明確となった。また、WTの海馬スライス初期培養ではKA刺激でアストロサイトのEP3は増加した。

一方、野性型海馬スライス初期培養のKA刺激によって、ミクログリアは非常に活性化されることが確認できた。ミクログリアの活性に伴いミクログリアではIL-1βが産生されることがわかっているため、血管内皮細胞の初期培養にIL-1β刺激を加えたところ、mPGES-1の誘導が増強された。これらの結果から、血管内皮細胞におけるmPGES-1の誘導にはIL-1βが関わる可能性が示唆された。

そこで、IL-1βが血管内皮細胞のIL-1R1を介してmPGES-1の誘導に関わるという予測のもと、IL-1R1KOの海馬スライス初期培養に対しKA刺激を加えたところ、予想に反してmPGES-1の誘導は増加した。ところが、同初期培養でアストロサイトにあるPGE<sub>2</sub>受容体EP3は増加しなかった。以上より、血管内皮細胞におけるmPGES-1の誘導には、IL-1β刺激が関わるがIL-1R1を介していない可能性とIL-1β以外の物質も関わっている可能性が示唆され、アストロサイトにおけるEP3の誘導にはIL-1R1を介したIL-1β刺激が強く関わる可能性が示唆された。これらの結果は、血管内皮細胞で産生されたPGE<sub>2</sub>が神経細胞傷害を増強するメカニズムとして重要な知見と考えられた。

2年次は、けいれん後の海馬神経細胞傷害におけるIL-1R1を介したIL-1βの修飾作用を検証するために、WTとIL-1R1KOを用いて、KA投与後の痙攣行動と海馬神経細胞脱落を比較した。

まず、WT(4匹)とIL-1R1KO(4匹)にKA 20mg/kgを腹腔内投与し、投与後4時間の痙攣行動を観察し、10分ごとに6段階に分類して評価した。続いて、別のWT(4匹)と

IL-1R1KO (4匹)にKA 30mg/kgを腹腔内投与し、同様に評価を行った。KA 20mg/kg、KA 30mg/kgのいずれにおいても、4時間以内に全身痙攣は認められず、それ以下の行動に関しても両群に有意な差は認められなかった。KA投与後のIL-1 $\beta$ の産生は24時間がピークと考えられているため、数時間以内の痙攣行動に差がないことは、妥当な結果と考えられた。

次に、WT (3匹)とIL-1R1KO (3匹)を用いて、KA 2 $\mu$ g/2 $\mu$ lを海馬内に微量注入し48時間後の脳組織をニッスル染色し、海馬の残存神経細胞数から神経細胞脱落を評価した。今回、両群に有意差は認められなかったが、個体数が少なかったことから結論を出すに至っていない。しかし、培養細胞の実験結果と合わせて検証すると、海馬神経細胞傷害にはIL-1R1を介さないIL-1 $\beta$ やIL-1 $\beta$ 以外の関与も考えられたため、今後多方面からさらに検証が必要と思われた。これらの結果は、血管(そこで産生されるPGE<sub>2</sub>)が神経細胞傷害を制御するメカニズムに対して重要な知見になると考えられた。

3年次は、IL-1 $\beta$ 遺伝子欠損マウス(IL-1 $\beta$  KO)とWTを用いて海馬スライス初期培養を行い、KA投与による神経細胞傷害をNeu-Nの免疫染色とpropidium iodide (PI)染色により比較したところ、WTの海馬では、コントロールに比べて、KAを投与したものはCA3領域を中心にPIの取り込みは強まり、Neu-Nの染色は弱まることが確認された。しかし、IL-1 $\beta$  KOの海馬では、コントロールですでにCA3領域のNeu-Nの染色はCA1領域の染色に比べ極端に弱く、またCA1領域の染色が通常以上に強まっていることがわかった。この傾向は、KAを投与した場合も変化は見られなかった。PIの取り込みはKAでやや強まる傾向を示したが、WTと比べるとその変化は小さかった。

このように、コントロールの状態、IL-1 $\beta$  KOとWTの神経細胞の分布形態に変化

が見られたことから、アストロサイトの分布や血管走行をGFAP、Tomato Lectinで染め分け観察した。その結果、IL-1 $\beta$  KOの海馬組織ではWTで見られるような構築を維持しておらず、ランダムなアストロサイトの増殖と血管構築の乱れが認められた。mPGES-1の発現は、WTではKAを投与した場合はコントロールに比べ、Tomato Lectin染色部分で染色の増強が認められたが、IL-1 $\beta$  KOでは、KAを投与による増強は観察されなかった。EP3の発現は、WTではKAを投与した場合はコントロールに比べ、GFAP染色部分で染色の増強が認められたが、IL-1 $\beta$  KOでは、コントロール、KA投与いずれにおいても染色されなかった。本研究結果は、IL-1 $\beta$ がmPGES-1とEP3の発現制御に関わる可能性を示唆したが、神経細胞、アストロサイト、血管の基本構造の構築にも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)

① Takeuchi C, Matsumoto Y, Kohyama K, Uematsu S, Akira S, Yamagata K and Takemiya T. Microsomal prostaglandin E synthase-1 aggravates inflammation and demyelination in a mouse model of multiple sclerosis. *Neurochem Int.* 査読有、Vol. 62、2013、271-280

② 竹宮 孝子、睡眠障害とプロスタグランジン、加齢研究、査読有、Vol. 3、2012、39-44

③ Takemiya T, Matsumura K, Sugiura H, Yasuda S, Uematsu S, Akira S, Yamagata K. Endothelial microsomal prostaglandin E synthase-1 facilitates neurotoxicity

by elevating astrocytic Ca<sup>2+</sup> levels.  
Neurochem Int. 査読有、Vol. 58、2011、  
489-496

④ Takemiya T. Prostaglandin E(2) produced  
by microsomal prostaglandin E  
synthase-1 regulates the onset and the  
maintenance of wakefulness. Neurochem  
Int. 査読有、Vol. 59、2011、922-924

⑤ 竹宮 孝子、文沢久美子、覚醒における膜  
型 PGE 合成酵素 (mPGES-1) の作用、不眠  
研究 2011、査読有、2011、61-64

⑥ Takemiya T., Matsumura K, Sugiura H,  
Maehara M, Yasuda S, Uematsu S, Akira S,  
Yamagata K. Endothelial microsomal  
prostaglandin E synthase-1 exacerbates  
neuronal loss induced by kainate. J.  
Neurosci. Res. 査読有、Vol. 88、2010、  
381-390

[学会発表] (計 5 件)

① 竹宮 孝子、竹内 千仙、山形 要人、多発  
性硬化症における膜型プロスタグランジ  
ン E 合成酵素 (mPGES-1) の関与、第 127  
回日本薬理学会関東部会、2012 年 10 月 20  
日、東京

② Takako Takemiya and Kumiko Fumizawa、  
Prostaglandin E(2) produced by  
microsomal prostaglandin E synthase-1  
regulates the onset and the  
maintenance of wakefulness. 第 35 回日  
本神経科学大会、2012 年 09 月 20 日、名古  
屋

③ Takako Takemiya, Kiyoshi Matsumura,  
Kanato Yamagata、Endothelial microsomal  
prostaglandin E synthase-1 facilitates

neurotoxicity by elevating astrocytic  
Ca<sup>2+</sup> levels. 第 34 回日本神経科学大会、  
2011 年 9 月 16 日、横浜

④ Takako Takemiya, Chisen Takeuchi, Yoh  
Matsumoto, Kuniko Kohyama, Satoshi  
Uematsu, Shizuo Akira, Kanato Yamagata,  
Kumiko Fumizawa. Modulatory effect of  
Microsomal prostaglandin E synthase-1  
on multiple sclerosis. 第 53 回日本神経  
化学学会大会、第 33 回日本神経科学大会、  
第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会、  
2010 年 9 月 2 日、神戸

⑤ Takako Takemiya, Kiyoshi Matsumura,  
Hiroko Sugiura, Shin Yasuda, Kanato  
Yamagata. Endothelial microsomal  
prostaglandin E synthase-1 exacerbates  
neuronal injury induced by kainate via  
astrocytes. The 29<sup>th</sup> NAITO CONFERENCE  
GLIA WORLD、2010 年 10 月 6 日、神奈川

[その他]

ホームページ等

総合研究所ホームページ内に研究成果発表  
<http://www.twmu.ac.jp/MRI/kenkyubu.html>

## 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・准教授  
研究者番号：70297547

### (3) 連携研究者

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  
(H22 連携研究者)