

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591509

研究課題名(和文)小児期急性脳症の発症初期に生ずる血液脳関門破綻メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of blood-brain barrier breakdown in the early stage of acute encephalopathy

研究代表者

浅井 清文(Asai, Kiyofumi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70212462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザ脳症をはじめとするウイルス性脳症の病態を理解し、特にジクロフェナックナトリウムにより増悪メカニズムを解明するために本研究を企画した。培養アストロサイトおよびミクログリアを、IL-1、TNF-、IFN-にて刺激すると、アストロサイトでは、iNOS、AQP4が発現上昇し、NOの産生も高まった。ミクログリアでも、iNOSが誘導され、NOの産生が高まると共に、貪食作用も高まった。サイトカインによるこれらの誘導は、DCF存在下で強くなることから、これらの誘導が、脳症増悪メカニズムの一端を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To understand the pathophysiological mechanism of acute encephalopathy, and analyze the aggregative action of diclofenac sodium (DCF) on acute encephalopathy, we stimulated primary cultured rat astrocytes and microglia with IL-1beta, TNF-alpha and IFN-gamma. The expression of iNOS and AQP4 and the production of NO were upregulated in astrocytes and the expression of iNOS and the activities of phagocytosis were increased in microglia. The addition of DCF highly enhanced the expression of iNOS and AQP4, and the activities of phagocytosis. This enhancement may explain the significantly increased mortality rates in acute encephalopathy patients treated with DCF.

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：血液脳関門 急性脳症 グリア細胞 アストロサイト ミクログリア 血管内皮細胞 サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ脳症を始めとする小児期急性脳症においては、脳血管内皮傷害に伴う透過性の亢進（血液脳関門の破綻）と、それに伴い血管性浮腫（vasogenic edema）や細胞毒性浮腫（cytotoxic edema）を生じてくること、その急性期の病態として推測されている。このような状況において、血液から脳実質に流入したサイトカイン等が直接神経細胞に傷害を与えるだけでなく、アストロサイトなどのグリア細胞の機能異常や病的な活性化が二次的に神経細胞に傷害を与えることが推測される。そして、治療においては、これら初期の病態進展を防ぐことが重要な点であると思われ、治療法の開発には、細胞レベルでの詳細な病態を解明することが急務と考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究においては、1) 血液脳関門の透過性に関わる脳血管内皮細胞、2) 脳浮腫において細胞膨化の主体をなすアストロサイト、3) 脳損傷時にいち早く活性化するミクログリア、に焦点をあて、それぞれの細胞が、急性脳症等において上昇すると報告のあるサイトカインやケモカインに対し、分子レベル・細胞レベルでどのような反応を示すか詳細に検討する。これにより、急性脳症の発病初期に生じているであろう病態を解析する。さらには、これらに対し、各種薬剤や RNA interference (RNAi) による遺伝子発現抑制によって、その病態がどのように変化するかを調べ、治療法の開発につながる情報を得る。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養細胞の準備

アストロサイト及びミクログリアは、ラット大脳皮質 (Wistar Rat 日齢 1) から初代培養したものを用いた。大脳皮質をパインで処理し細胞を分散させた後、10%胎児牛血清 (FBS) を含むダルベッコ改イーグル培地 (DMEM) で培養し、おおよそ 10 日後、コンフルエントになった状態から、震盪法により、ミクログリア、オリゴデンドロサイト、アストロサイトを分離培養し、実験に用いた。脳血管内皮細胞は、初代培養で大量に得ることが困難なため、実験には、当研究室で樹立したウシ不活化脳毛細血管内皮細胞株 (tBEC-117) を用いた。

### (2) サイトカインによる刺激実験

これらの細胞培養系に、IL-1 $\beta$  (5ng/ml)、TNF- $\alpha$  (20ng/ml)、IFN- $\gamma$  (5ng/ml) を単独または組み合わせて作用させ、一定時間後、細胞から RNA やタンパク、培養上清を回収し、解析を行なった。

(3) mRNA 発現解析: サイトカインで刺激後、細胞を回収し TRIzol 試薬を用いて total RNA を抽出した。SYBR Green 法による Q-RT-PCR を用いて解析した。目的の遺伝子と  $\beta$ -actin の発現の比を求め、相対的な発現量にて比較検討した。

(4) 蛋白発現解析: サイトカインで刺激後、細胞を回収し、主に western blot 法を用いて解析した。また、免疫細胞染色法を用いても発現量を確認した。

(5) 培養液中の NO 産生量については、市販の測定キット (colorimetric reaction kit) を用いて測定した。

(6) 貪食能の検討: ミクログリアの培養系に、蛍光標識した latex beads (1 $\mu$ m particular carboxylate-modified yellow-green florescent) を添加し、一定時間を細胞内に取り込まれた bead 数を蛍光顕微鏡下でカウントした。

## 4. 研究成果

(1) 初代培養アストロサイトを、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  にて刺激した後、iNOS の発現を調べたところ、mRNA およびタンパクレベルで増加していることを確認した。ジクロフェナクナトリウム (以下、DCF) は、インフルエンザ脳症を悪化させ死亡率を上昇させることが臨床的に認められているが、これらサイトカインでの刺激と同時に DCF を添加したところ、iNOS はさらに上昇した。また、培養液中の NO 産生量も、iNOS の発現と同様に上昇した。また、免疫細胞染色においても、サイトカインと DCF で同時刺激すると、iNOS の発現が、強く誘導されることを確認した。さらに、各種阻害剤を用いた検討および、NF- $\kappa$ B p65 に対する siRNA を用いた検討により、これらの発現上昇には、NF- $\kappa$ B のシグナルが関わっていることが明らかになった。

(2) 脳浮腫の進展との関連が推測されている水チャネル AQP4 の発現についても、初代培養アストロサイトを用いて検討した。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  にて刺激すると、AQP4 の mRNA とタンパクの発現量が上昇し、さらに、DCF 存在下で一段と発現上昇することを確認した。また、NF- $\kappa$ B 阻害剤を用いた検討により、AQP4 の発現上昇には、NF- $\kappa$ B を介したシグナルが関与していることが明らかになった。

(3) 初代培養ミクログリアを、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  にて刺激した後、iNOS の発現を調べたところ、mRNA およびタンパクで増加していることを確認した。さらに同時に DCF を添加したところ、iNOS はさらに上昇した。また、同じ条件下で、ミクログリアの貪食作用を調べたところ、iNOS の誘導、NO の産生に伴い、貪食作用も強くなることを確認した。

(4) 以上より、炎症性サイトカインが、ア

ストロサイト、ミクログリアに作用すると、iNOS が誘導され、NO の産生が高まることが確認された。NO は、血管内皮細胞に作用し、血液能閉門の透過性を上昇させることが推測されており、急性脳症発症初期の病態進展に関わっている可能性がある。また、DCF 存在下で、iNOS は、さらに強く誘導され、NO の産生が高まることから、DCF によるインフルエンザ脳症の重症化に、これらの機構が関わっている可能性が示唆された。

また、急性脳症で時に急激に脳浮腫が進展する症例が報告されているが、アストロサイトにおける AQP4 の発現が、サイトカインにより誘導されることと脳浮腫の進展には何らかの関連があることが推測されており、さらなる検討が必要と考えられた。

ミクログリアにおいても、サイトカイン刺激により、iNOS の誘導と NO 産生増加、貪食能の上昇が観察され、そのいずれもが DCF でさらに強く誘導された。ミクログリアの活性化も、急性脳症の病態と深く関わっているものと思われ、さらなる検討が必要と考えられた。

#### 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 5 件)

Asai H, Kakita H, Aoyama M, Nagaya Y, Saitoh S, Asai K.  
Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced aquaporin-4 expression in cultured astrocyte.  
Cell Mol Neurobiol.  
2013 Apr;33(3):393-400.  
doi: 10.1007/s10571-013-9905-z.  
(査読有り)

Kakita H, Aoyama M, Nagaya Y, Asai H, Hussein MH, Suzuki M, Kato S, Saitoh S, Asai K.  
Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced phagocytosis of cultured microglia via nitric oxide production.  
Toxicol Appl Pharmacol.  
2013 Apr 15;268(2):99-105.  
doi: 10.1016/j.taap.2013.01.024.  
(査読有り)

Aoyama M, Kakita H, Kato S, Tomita M, Asai K.  
Region-specific expression of a water channel protein, aquaporin 4, on brain astrocytes.  
J Neurosci Res.  
2012 Dec;90(12):2272-80.

doi: 10.1002/jnr.23117.  
(査読有り)

Kato S, Aoyama M, Kakita H, Hida H, Kato I, Ito T, Goto T, Hussein MH, Sawamoto K, Togari H, Asai K.  
Endogenous erythropoietin from astrocyte protects the oligodendrocyte precursor cell against hypoxic and reoxygenation injury.  
J Neurosci Res.  
2011 Oct;89(10):1566-74.  
doi: 10.1002/jnr.22702.  
(査読有り)

#### 青山峰芳、浅井清文

「アストロサイト-その驚くべき多彩な機能」ウイルス性脳炎とアストロサイト  
Clinical Neuroscience  
29:11(2011)130-1302  
(査読無し)

[学会発表](計 10 件)

青山峰芳、加藤晋、垣田博樹、飛田秀樹、浅井清文  
アストロサイト由来エリスロポエチンによるオリゴデンドロサイト前駆細胞への細胞障害抑制効果  
第 60 回中部日本生理学会  
10.25-26, 2013 岐阜大学(岐阜)

長屋嘉顕、田村哲也、青山峰芳、浅井清文  
培養アストロサイトでのエリスロポエチン発現における炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  の効果  
第 18 回グリア研究会  
10.26, 2013 仙台国際センター(仙台)

青山峰芳、垣田博樹、長屋嘉顕、鈴木美恵子、浅井清文  
ジクロフェナックナトリウムがサイトカイン存在下でのミクログリア貪食能に及ぼす影響-インフルエンザ感染に伴う脳症悪化のメカニズムの解明-  
Neuro2013  
第 56 回日本神経化学学会大会  
6.20-23, 2013 国立京都国際会館(京都)

浅井清文  
水チャネル「アクアポリン」の発現と機能  
-整形外科疾患との関わりについて-  
第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会  
教育研修講演 5  
10.26-27, 2012 名古屋

青山峰芳、富田愛美、浅井清文、垣田博樹、加藤 晋、浅井隼人、長屋嘉顕  
脳内部位により異なるアストロサイトでのアクアポリン4の発現  
第17回グリア研究会  
10.2, 2012 神戸

Asai H, Kakita H, Aoyama M, Nagaya Y, Asai K  
Diclofenac enhances aquaporin4 expression in cultured astrocyte with proinflammatory cytokine treatment.  
The 11st Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry / 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry  
9.29 - 10.2 2012 Kobe

青山峰芳、加藤 晋、垣田博樹、浅井隼人、長屋嘉顕、浅井清文  
アストロサイト由来エリスロポエチンのオリゴデンドロサイト前駆細胞への細胞障害抑制効果  
第35回日本神経科学大会  
9.18-21, 2012 名古屋

垣田博樹、青山峰芳、加藤 晋、浅井隼人、長屋嘉顕、齋藤伸治、浅井清文  
ジクロフェナックがミクログリアのiNOS/NOx産生と活性化に及ぼす影響について  
第115回日本小児科学会学術集会  
4.20-22, 2012 福岡

青山峰芳、垣田博樹、長屋嘉顕、浅井隼人、鈴木美恵子、浅井清文  
ジクロフェナックナトリウムがミクログリアの食食能に及ぼす影響  
-インフルエンザ感染に伴う脳症悪化のメカニズム-  
第16回グリア研究会  
10.22, 2011 名古屋

青山峰芳、加藤晋、垣田博樹、浅井隼人、長屋嘉顕、浅井清文  
内在性エリスロポエチンのオリゴデンドロサイト前駆細胞への細胞保護効果  
第54回日本神経化学会大会  
9.26-28, 2011 加賀

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
特記すべきことなし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅井 清文 (ASAI KIYOFUMI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：70212462

### (2) 研究分担者

青山 峰芳 (AOYAMA MINEYOSHI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：70363918

垣田 博樹 (KAKITA HIROKI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号：40528949