

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659118

研究課題名(和文) ミクログリアにオルタナティブ活性化を指向させる低分子量化合物

研究課題名(英文) Low molecular weight compounds that direct microglia toward alternative activation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：転写調節因子の一つとして知られる IRF4 が、脳内の免疫担当細胞であるミクログリアを組織保護・修復性のモードである「オルタナティブ活性化」状態に導く上で重要なシグナル因子であることを見出した。また、ミクログリアの活性化制御を指標として探索的薬効評価を行った結果、複数の低分子量化合物にオルタナティブ活性化促進効果を認め、うち天然由来の 1 化合物についてはパーキンソン病に関連するドパミンニューロンに対する神経保護効果を新たに見出した。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that a transcription factor IRF4 plays a key role in mediating intracellular signals in microglial cells leading to induction of alternative activation state, the tissue preservative/repairative mode of this immune cell population in the brain. In addition, explorative pharmacological evaluation, based on regulation of microglial activation, demonstrated stimulatory effects of several low molecular weight compounds on alternative activation. One of the compounds, which has natural origin, was newly found to possess neuroprotective properties on dopamine neurons whose degeneration is closely associated with Parkinson disease.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：ミクログリア インターロイキン-4 アルギナーゼ GABA

### 1. 研究開始当初の背景

脳内のマクローファージ様細胞であるミクログリアは、パーキンソン病や脳卒中などの神経変性を伴う疾患時にいわゆる「活性化状態」となり、神経組織の病理形成過程に関与することが知られている。末梢組織のマクローファージについては組織・細胞傷害性に働く「古典的活性化」と、組織の修復・再生に働く「オルタナティブ活性化」と呼ばれる2つの異なる活性化状態の存在が知られるが、脳内ミクログリアについても同様に複数の活性化状態が存在しており、それらは特徴的なマーカータンパク質の発現の有無によって区別できる。実際研究代表者は、脳出血病態時において損傷した脳領域には、活性化状態の異なるミクログリアが混在することを確認している。このようなミクログリアの二面性を適切に制御できれば、疾患に伴う神経細胞の変性・脱落を阻止すること、また残存する神経細胞の軸索再生や神経組織の修復を促すことができるものと考えられた。しかし、ミクログリアのオルタナティブ活性化の制御機構や、古典的活性化とオルタナティブ活性化の間のスイッチング機構などについては十分に明らかになっておらず、オルタナティブ活性化を促進する化合物も報告されていない状況であった。

### 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では病態時の脳において神経細胞の変性を抑制し、また組織損傷からの回復を促す手段としての「ミクログリアの多方向性活性化の薬物による制御」の可能性について検証することを目的とし、以下の点を明らかにすることを目指した。

- ・古典的活性化とオルタナティブ活性化に関わる細胞内シグナル伝達経路間の相互干渉・スイッチングの機序を明らかにし、キーとなるシグナル分子を同定する。
- ・病態脳組織において、ミクログリアのオルタナティブ活性化の誘導に関わる細胞内外のシグナル伝達機序を明らかにする。
- ・上記2項目より得た知見を勘案しつつ、病態脳組織においてミクログリアの活性化状態を組織修復性に指向させる低分子量化合物を探索・同定し、その作用機序を明らかにする。

### 3. 研究の方法

ミクログリア系細胞株を用いて、オルタナティブ活性化に対する古典的活性化刺激の干渉・阻害効果の機序を解析した。また、細胞株より得られた知見、および末梢マクローファージに関する従来の知見等を背景として、ミクログリアのオルタナティブ活性化を誘導/促進する低分子量化合物の探索を行った。ミクログリア系細胞株において有効性の認められた化合物については、その作用機序を解析するとともに、培養脳組織切片の病理モデルや *in vivo* 疾患モデルにおけるミクログ

リアの活性化状態に及ぼす影響、ならびに神経組織保護効果の検証を試みた。

### 4. 研究成果

(1) 古典的活性化とオルタナティブ活性化の干渉作用の機序：マウスミクログリア系細胞株 BV-2 細胞に既知のオルタナティブ活性化誘導因子である IL-4 (20 ng/ml) を処置すると、活性化マーカーであるアルギナーゼ-1 や Ym-1, Fizz-1 の発現が亢進し、これらの発現は JAK 阻害薬の JAK inhibitor 1 (1  $\mu$ M) により顕著に抑制された。また、翻訳阻害薬であるシクロヘキシミドによって IL-4 による諸種活性化マーカーの発現は阻害されたことより、IL-4 はタンパク質の *de novo* 合成を介してシグナルを伝達することが示唆された。この IL-4 シグナル伝達を媒介する分子の実体を探索した結果、転写因子である IRF4 を同定した。実際、IL-4 の適用により IRF4 の発現は増大し、この増大は JAK inhibitor 1 (1  $\mu$ M) やプロテインキナーゼ A (PKA) 阻害薬 H89 (5  $\mu$ M) の共処置により抑制され、アデニル酸シクラーゼ活性化薬 forskolin (100  $\mu$ M) の共処置で増強された。また、siRNA を BV-2 細胞に導入することによって IRF-4 タンパク質の発現を抑制すると、IL-4 処置によって増大するアルギナーゼ-1 タンパク質の発現が著明に抑制される一方で、リポ多糖(LPS; 100 ng/ml) 処置によって誘導される iNOS mRNA の発現が増強されることが明らかになった (図1)。これらのことから、IL-4 によるオルタナティブ活性化の誘導には JAK/STAT 経路を介した IRF4 の発現および PKA が関与することが明らかとなった。

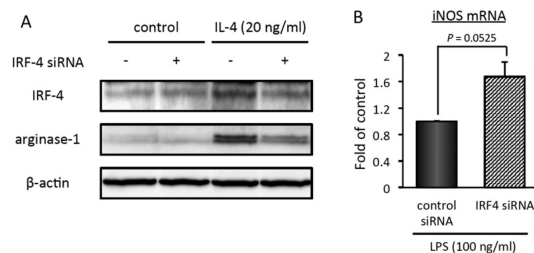


図1. (A) IRF-4 siRNA の導入は、BV-2 細胞における IRF-4 タンパク質の発現量を低下させるとともに、IL-4 により誘導されるアルギナーゼ-1 タンパク質発現亢進を抑制した。(B) IRF-4 siRNA 導入は、BV-2 細胞における LPS 誘導性の iNOS mRNA 発現亢進を増強した。

次に、BV-2 細胞に IL-4 と古典的活性化誘導因子である LPS (100 ng/ml) とを共処置すると、各活性化マーカーの発現が単独処置時に比べて有意に低下した。この時、IL-4 による IRF4 の発現も低下したことから、ミクログリア活性化の方向性の制御に IRF4 の発現調節が重要な役割を担うことが示唆された。

また非受容体型チロシンキナーゼである Src の阻害薬 PP2 (10  $\mu$ M) は、IL-4 によるオルタナティブ活性化マーカーの発現を亢進

し、LPS による古典的活性化マーカーの発現を抑制した。さらに、IL-4 および LPS を処置した BV-2 細胞では、Src を介して発現する転写因子 ATF3 の発現が亢進した。ATF3 は転写抑制および転写促進の 2 つの機能を有することが知られており、ミクログリア活性化の方向性の制御に Src/ATF3 経路も関与することが示唆された。

(2) オルタナティブ活性化を促進する低分子量化合物の探索: BV-2 細胞に対して GABA (1 mM) を IL-4 (20 ng/ml) と共処置すると、24 時間後におけるアルギナーゼ-1 mRNA の発現増大が IL-4 単独処置の場合と比べて有意に増強された (図 2A)。同様の効果は、GABA<sub>B</sub> 受容体特異的アゴニストであるバクロフェンにも認められた。逆に、LPS (100 ng/ml) の 24 時間処置によって誘導される iNOS mRNA の発現は、GABA あるいはバクロフェンの適用によって有意に抑制された (図 2B)。一方で、LPS により誘導される TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  の mRNA 発現亢進は GABA によって有意な影響を受けなかったことから、GABA によるミクログリアの活性化方向の制御は単純な二元論 (古典的かオルタナティブか) では説明できないことが示唆された。

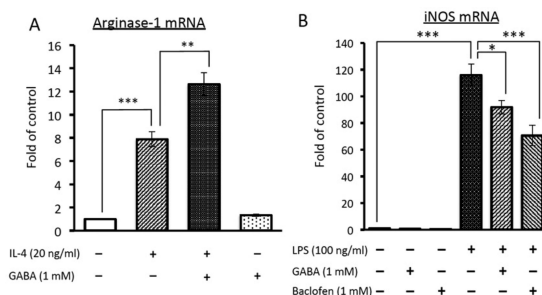


図 2. (A) GABA は、BV-2 細胞において IL-4 により誘導されるアルギナーゼ-1 mRNA 発現亢進を増強した。(B) GABA およびバクロフェンは、BV-2 細胞において LPS により誘導される iNOS mRNA 発現亢進を抑制した。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

次に、後述するペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR $\gamma$ ) に関する知見などから、種々の核内受容体ファミリーによる転写調節がミクログリアの活性化方向の制御に関わる可能性が考えられたため、代表的な核内受容体リガンドの作用について検討を行った。その結果、レチノイド X 受容体アゴニストである HX630 (3  $\mu$ M)、レチノイン酸受容体アゴニストである全トランスレチノイン酸 (1~3  $\mu$ M) および Am80 (0.3~3  $\mu$ M) を単独で BV-2 細胞に処置することによって、アルギナーゼ-1 mRNA の発現が促進されることが明らかになった (図 3)。一方、ビタミン D 受容体アゴニストである活性型ビタミン D<sub>3</sub> (100 nM) は、逆にアルギナーゼ-1 の発現を抑制した。

(3) オルタナティブ活性化を促進する低分子

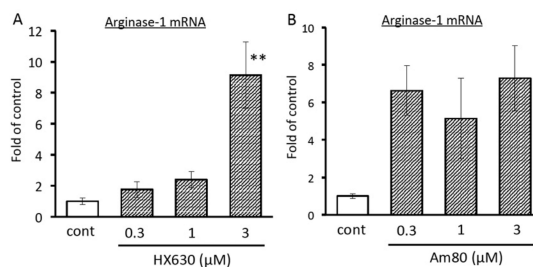


図 3. BV-2 細胞におけるアルギナーゼ-1 mRNA 発現レベルに対する HX630 (A) および Am80 (B) の効果。薬物は示した濃度で 24 時間処置した。\*\*  $P < 0.01$  vs. control (cont).

量化合物の神経保護効果: ラット新生仔より調製した培養中脳組織切片に対し、IFN- $\gamma$  (50 ng/ml) を 24 時間、その後 LPS (10  $\mu$ g/ml) を 72 時間処置することによって、著明なドパミンニューロン変性が誘導された。我々の既報において、このドパミンニューロン変性はミクログリアの古典的活性化に伴う iNOS 発現亢進と NO 過剰産生によって誘導されていることが示されている (Shibata et al. J Neurochem 2003)。この実験系を用いて化合物の作用の検証を行った結果、ナツメグに含まれる天然化合物であるマセリグナンのドパミンニューロン保護効果を新たに見出した。すなわち、マセリグナンは 3~10  $\mu$ M の濃度で LPS と同時に適用した時に、IFN- $\gamma$  / LPS により引き起こされるドパミンニューロンの減少を濃度依存的に抑制した。マセリグナンはこれまでの研究で、PPAR $\gamma$  に対するアゴニスト活性を有することが示唆されており、また PPAR $\gamma$  アゴニスト活性を有する薬物がマクロファージのオルタナティブ活性化を促すことも報告されている。そこで、オルタナティブ活性化のマーカーであるアルギナーゼ-1 の発現を免疫組織化学により調べたところ、マセリグナン (10  $\mu$ M) は IFN- $\gamma$  / LPS 処置の有無に係らず培養中脳組織切片内のミクログリアと見られる細胞においてアルギナーゼ-1 の発現を誘導することが確認された。また、IFN- $\gamma$  / LPS 処置により誘導される iNOS の発現は、マセリグナンの処置によって抑制される傾向が認められた。ただし、培地中の亜硝酸濃度の測定により評価した NO 産生量については、マセリグナンは IFN- $\gamma$  / LPS 処置による増大にほとんど影響を及ぼさなかった。アルギナーゼ-1 は iNOS と同じくアルギニンを基質として利用することから、アルギナーゼの発現増大は NO の過剰産生を抑制することで細胞保護効果を発揮するといった機序が一般に想定されているが、上記の知見はこの見解と相容れないものとなった。

そこで、アルギナーゼ-1 の発現誘導が実際にマセリグナンのドパミンニューロン保護効果に寄与しているか否かを明らかにするため、アルギナーゼの特異的阻害薬として知られる nor-NOHA を用いた。Nor-NOHA (100  $\mu$ M) をマセリグナン (10  $\mu$ M) と共処置すると、マセリグナンのドパミンニューロン保護効

果は消失した。またこの時、IFN- $\gamma$  / LPS 処置による NO 産生量の増大は nor-NOHA の共処置によって影響を受けなかった。したがって、マセリグナンによるミクログリアのオルタナティブ活性化促進に伴うアルギナーゼ-1 の発現誘導は、中脳ドパミンニューロンに対して明確な細胞保護効果をもたらすこと、またこの効果は従来認識されている NO 産生の調節とは無関係の機序を介して発揮されていることが示唆された。

(4) まとめ：転写因子 IRF4 がミクログリアの古典的活性化 / オルタナティブ活性化のスイッチングに関わる重要なシグナル分子であることが同定された。また複数の低分子量化合物についてオルタナティブ活性化促進作用や神経保護効果が見出された。これらの知見は、従来とは異なる概念に基づく神経疾患予防・治療薬の開発に資するものである。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 12 件)

Obukuro K, Nobunaga M, Takigawa M, Morioka H, Hisatsune A, Isohama Y, Shimokawa H, Tsutsui M, Katsuki H. Nitric oxide mediates selective degeneration of hypothalamic orexin neurons through dysfunction of protein disulfide isomerase. *J Neurosci*. 33:12557-12568, 2013. 査読有  
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0595-13.2013

Matsushita H, Hijioka M, Hisatsune A, Isohama Y, Iwamoto S, Terasawa H, Katsuki H. MRI-based analysis of intracerebral hemorrhage in mice reveals relationship between hematoma expansion and the severity of symptoms. *PLoS One*. 8: e67691, 2013. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0067691

Kurauchi Y, Hisatsune A, Isohama Y, Sawa T, Akaike T, Katsuki H. Nitric oxide/soluble guanylyl cyclase signaling mediates depolarization-induced protection of rat mesencephalic dopaminergic neurons from MPP<sup>+</sup> cytotoxicity. *Neuroscience*. 231: 206-215, 2013. 査読有  
DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.11.044

Hijioka M, Matsushita H, Ishibashi H, Hisatsune A, Isohama Y, Katsuki H. 7 Nicotinic acetylcholine receptor agonist attenuates neuropathological changes associated with intracerebral hemorrhage in mice. *Neuroscience*. 222:10-19, 2012. 査読有  
DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.07.024

Kurauchi Y, Hisatsune A, Isohama Y, Mishima S, Katsuki H. Caffeic acid phenethyl ester protects nigral dopaminergic neurons via dual mechanisms involving haem oxygenase-1 and brain-derived neurotrophic factor. *Br J Pharmacol*. 166:1151-1168, 2012.

査読有

DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.01833.x

### 〔学会発表〕(計 26 件)

延永瑞希、小袋加奈絵、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、筒井正人、香月博志. 高脂肪食は視床下部オレキシンニューロンにおける病理学的変化を誘導する. 第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日、仙台国際センター(仙台市)

香月博志、松下英明、脇岡雅宣. 脳出血の薬物療法の開拓：動物モデルの有用性と限界. 第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日、仙台国際センター(仙台市)

上松哲大、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、香月博志. マウス炎症性ドパミンニューロン変性モデルにおけるフェルラ酸の神経保護効果の解析. 第 66 回日本薬理学会西南部会、2013 年 11 月 16 日、福岡大学薬学部(福岡市)

香月博志、藤林達也、倉内祐樹、久恒昭哲、首藤紘一. 中脳ドパミンニューロン保護における NO を介するレチノイドシグナル. 第 17 回活性アミンに関するワークショップ、2013 年 8 月 24 日、AOSSA 福井(福井市)

高岡侑一郎、久恒昭哲、小道由木子、倉内祐樹、関貴弘、香月博志. GABA によるミクログリア活性調節に関する研究. 第 8 回トランスポーター研究会年会、2013 年 6 月 15 日、熊本大学薬学部(熊本市)

脇岡雅宣、松下英明、石橋勇人、久恒昭哲、磯濱洋一郎、香月博志. 内包領域での軸索傷害を焦点とした脳内出血病態進行メカニズムの解析. 日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜(横浜市)

松下英明、脇岡雅宣、石橋勇人、久恒昭哲、磯濱洋一郎、首藤紘一、香月博志. 脳内出血モデルマウスにおける急性炎症に対するデキサメタゾンおよびレチノイド受容体作動薬 Am80 の作用. 第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 22 日、福岡国際会議場(福岡市)

### 〔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〕

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

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