

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461651

研究課題名(和文) 新生児期の虚血低酸素時に脳内エリスロポエチンがニューロンとグリアにもたらす効果

研究課題名(英文) Effect of brain erythropoietin on neuron and glia in the hypoxic and ischemic damage of neonatal brain

研究代表者

青山 峰芳 (Aoyama, Mineyoshi)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70363918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：エリスロポエチン(EPO)は主に腎臓で産生される造血作用ホルモンである。近年、EPO受容体(EPOR)が中枢神経で発現し、EPORを介したシグナルが神経保護効果を有することが報告された。申請者は、EPOによるミクログリア活性化調節機構に注目して解析を行った。その結果、EPOは神経保護効果のみならず、ミクログリアの炎症性サイトカインの産生、貪食能、形態変化をはじめとする細胞活性化調節作用も有することをあきらかにした。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been demonstrated that erythropoietin (EPO), a hematopoietic hormone, has a neuroprotective effect and EPO receptor (EPOR) is expressed in the central nervous system (CNS). In our previous study, brain immune cells microglia had higher expressions of EPOR than astrocytes and neurons. In vitro, we assessed the effect of EPO using microglial cell line BV-2 activated by lipopolysaccharide(LPS). LPS increased the gene expressions of cytokines in BV-2, but these increases were significantly suppressed by EPO. Next, LPS treatment increased the phagocytosis in BV-2 compared with untreated BV-2, but this increase was significantly suppressed by EPO. In vivo, LPS induced microglia to be activated types, but EPO alleviated the active morphological change. These data indicated that LPS made microglia activated and cytotoxic, but EPO-EPOR signal might attenuate LPS-induced microglial cytotoxic activation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：エリスロポエチン ミクログリア 神経保護 細胞活性

1. 研究開始当初の背景

エリスロポエチン(EPO)は主に腎臓で産生されるホルモンで造血作用を有している。貧血の治療薬として EPO 製剤が商品化され、多くの臨床の現場で使用されている。近年、この EPO の受容体(EPOR)が中枢神経で発現していることが明らかになり、EPO に神経保護作用があることが確認された。一方で、中枢神経において EPO は主にグリアのひとつであるアストロサイトから分泌されることが明らかとなり、虚血低酸素状態における神経保護作用が注目されている。これまで EPO による細胞保護効果については EPO 製剤を実験動物に投与して個体レベルで解析した報告がほとんどで、アストロサイトから分泌される EPO が、個々の細胞に直接与える影響についての解析はわずかである。そこで、申請者は、アストロサイトから分泌される EPO に注目して研究を続けてきた。その結果、低酸素刺激によってアストロサイトから分泌される EPO が EPOR を発現するオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)の低酸素による細胞障害を抑制することを明らかにした(Kato et al. J Neurosci Res 2011)。その研究の中で、母体内感染時羊水中で上昇する炎症性サイトカイン TNF α 、IL-1 β でアストロサイトを刺激すると、低酸素刺激による EPO の発現誘導が抑制されることを確認した(未発表)。この結果は、母体内感染時には胎児脳内で EPO の産生が抑制されている可能性を示唆した。さらに、新生児期の低酸素虚血性白質障害マウスに EPO 製剤を投与すると成熟オリゴデンドロサイトへの分化が亢進し、マウスの運動機能が改善することを明らかにした(Kako et al. Stem Cells 2012)。この結果は、EPO による神経再生医療の可能性を提示した。

脳室周囲白質軟化症(PVL)は在胎週数 34 週未満の早産児の 7~8%に見られる早産児特有の疾患である。比較的軽度の虚血により、選択的に脳室周囲の白質に障害を生じ、未熟児脳性麻痺の主な原因となっている。障害部位の特異性として、解剖学的および生理学的な未熟性のために容易に低灌流になりやすい点がある。さらに、脳室周囲白質に OPC が集積し、OPC の選択的な障害が病態に深く関与していると考えられている。一方、母体内感染と病態との関与も指摘され、脳内の炎症に関与するミクログリアと細胞障害の関係も指摘されている。さらなる、PVL の病態の解明のために、これまでに申請者は、新生児期の低酸素虚血性白質障害マウスにおける OPC と病態の関係について解析した(Kako et al. Stem Cells 2012)。その研究の中で、白質障害後に脳室下帯で OPC の産生が亢進する一方で分化が抑制されることを明らかにした。さらに、低酸素下での OPC の細胞障害性についても細胞レベルでの解

析を行った(Kato et al. J Neurosci Res 2011)。その研究の中で、低酸素刺激により OPC の細胞障害が生じ、低酸素再酸素化刺激により OPC への細胞障害がさらに亢進することを明らかにした。現在のところ、危険因子を回避した周産期医療が行われているが、障害部位での脳内環境改善を意識した PVL 発症予防のための治療は確立していない。

2. 研究の目的

ニューロンおよびグリアの細胞分化レベルに依存した EPO に対する反応性の違いを明らかにし、効果的な EPO による脳内微小環境改善を利用した治療の可能性を提示することを目標とする。

1. 分化レベルの異なるマウス初代培養細胞における EPO-EPOR シグナルの解析

マウス神経幹細胞・ニューロン・オリゴデンドロサイト・ミクログリアを培養し、分化レベルの異なる細胞を準備する。アストロサイト由来 EPO による、細胞増殖および細胞分化の変化を確認する。さらに、低酸素および低栄養状態、炎症を模したサイトカイン存在下での、細胞保護効果および細胞分化の変化を確認する。ミクログリアについては活性化の変化についても解析する。

2. ヒト iPS 細胞由来神経系細胞を用いたヒト細胞における EPO-EPOR シグナルの解析

ヒト iPS 細胞から神経幹細胞・ニューロン・アストロサイト・オリゴデンドロサイトを作製し、分化レベルの異なる細胞を準備する。ヒト iPS 細胞由来細胞を用いた *in vitro* の解析を行い、マウス初代培養細胞で得られた知見と比較検討する。

3. 新生児期および若年期の虚血マウスモデルを用いた EPO-EPOR シグナルの解析

脳内部位特異的に EPOR の発現を抑制したマウスを用いて、虚血マウスモデルでの年齢および脳内部位特異的な EPO の効果について個体レベルの解析を行う。さらに、母体内感染を合併した虚血モデルマウスでの EPO-EPOR シグナルの変化を解析する。

3. 研究の方法

1. マウス神経幹細胞・ニューロン・オリゴデンドロサイト・ミクログリアの培養

マウス神経幹細胞については胎生 13 日の海馬・脳室下帯から採取した初代培養細胞とマウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞から分化誘導した神経幹細胞を用いる。

マウスニューロンについては胎生 15 日の大脳皮質から採取した初代培養と、上記の神経幹細胞から分化誘導して得られるニューロンを用いる。いずれも、移動性を持つ幼若なニューロンである doublecortin(DCX)陽性細胞、分化が進むにつれて tubulin MAP2

NeuNと特異的細胞マーカーを発現しながら成熟ニューロンへと分化することを確認する。

オリゴデンドロサイトについては日齢1日の大脳皮質から採取した初代培養細胞を培養する。震盪によって、他のグリアと分離した後、さらにPDGFおよびFGF2の存在下で培養することで、純度の高いO4陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞を作製でき、CNTFおよびT3を添加することで、2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNase) myelin basic protein (MBP)陽性のミエリン形成を行う成熟オリゴデンドロサイトとなることを確認する。

ミクログリアについては日齢1日の大脳皮質から採取した初代培養細胞を用いる。短時間の震盪によって、他のグリアから分離した後、純度の高いIba-1陽性のミクログリアを用いる。

多彩な細胞を準備する必要があるため研究分担者とともに進行。

2. 分化レベルの異なるマウス初代培養細胞を用いたEPO-EPORシグナルの解析

ニューロンおよびグリアにおける様々な細胞分化レベルによる、EPO-EPORシグナルの応答性の違いを明らかにすることを目標とする。

マウス初代培養細胞から、アストロサイトを作製し、低酸素刺激によりEPOを培養液中に分泌することを確認する。神経幹細胞・ニューロン・オリゴデンドロサイト・ミクログリアを培養し、様々な分化レベルの細胞を準備する。アストロサイト由来のEPOによる、細胞増殖および細胞分化の変化を確認し、低酸素および低栄養状態、炎症を模したサイトカイン存在下での、細胞保護効果および細胞分化の変化を確認する(図1)。ニューロン・オリゴデンドロサイトの分化成熟過程でのEPORの発現を確認したあと、細胞保護効果についてはMTTアッセイ、LDHアッセイ、細胞染色により核の凝集化、形態の変化を観察する。細胞分化の変化については特異的細胞マーカーの発現を細胞染色により確認する。また、ミクログリアについては活性化の変化について解析する。具体的には、RT-PCRおよびELISAを用いて炎症性サイトカインの産生を解析し、マイクロビーズを用いて貪食能の変化について解析する。

3. ヒトiPS細胞由来ニューロンおよびグリアの作製

研究代表者は文部科学省再生医療実現化プロジェクトに参加し、慶應大学の岡野らが確立したヒトiPS細胞由来神経幹細胞を作製する技術を習得し、培養系を確立した。本研究では、iPS細胞由来の神経幹細胞をニューロスフェアの状態に継代培養を繰り返して、*in vitro*で神経発生過程を再現する。

特定の栄養因子(塩基性線維芽細胞増殖因子FGF2および白血病抑制因子LIF)を除去することによって分化誘導を行う。その結果、継代数によるニューロンおよびグリアへの分化能の違いを解析し、ニューロンのみで分化する段階(発生初期)、グリアを含むようになる(発生後期)、グリアを豊富に含むようになる(出生後)神経幹細胞を順次作製する(図2)。分化誘導によって得られた、ヒトiPS細胞由来ニューロンおよびグリアを用いて解析を行う。

多彩な細胞を準備する必要があるため研究分担者とともに進行。

4. ヒトiPS細胞由来神経系細胞を用いたヒト細胞におけるEPO-EPORシグナルの検証

ヒトiPS細胞から神経幹細胞・ニューロン・アストロサイト・オリゴデンドロサイトを作製し、様々な分化レベルの細胞を準備する。マウス初代培養細胞で行った実験を、ヒトiPS細胞由来の細胞でも行い、マウス初代培養細胞で得られた知見と比較検討する。

4. 研究成果

2013年度において、日齢1のラットからニューロン、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトを初代培養細胞として準備し、ニューロンおよびグリアにおけるEPOおよびEPORの発現を確認した。さらに、アストロサイトが低酸素刺激によりEPOを培養液中に分泌することを確認した。ミクログリアについては、マウス細胞株であるBV2を用いて、EPO投与によるサイトカイン遺伝子発現の変化をRT-PCRを用いて解析した。同時に、EPO投与によるミクログリアにおける貪食能の変化をマイクロビーズを用いて解析した。2014年度は、2013年度に引き続きマウス細胞株であるBV2を用いて解析を行った。その結果、LPS刺激により、M1ミクログリアマーカーである炎症性サイトカインの発現誘導が確認され、同時にEPOを投与することで発現が抑制されることを確認した。さらに、蛍光ビーズの取り込み率を解析したところ、LPS刺激により取り込み率が上昇し、同時にEPOを投与することで低下することを確認した。さらに、6週齢の成体マウスの腹腔内にEPO製剤を投与し、LPS刺激によって活性化した脳内ミクログリアに与える影響について解析した。免疫組織染色をおこない、ミクログリアの細胞マーカーであるIba1を蛍光染色することで形態変化を観察した。LPS刺激により脳内のミクログリアが静止型の形態から活性化型の形態に変化することを認めた。EPOを腹腔内に投与することで、活性化型の形態をしたミクログリアが減少したことを確認した。2015年度は、2014年度にひきつづきEPOによるミクログリアの活性化調節について解析を行った。結論として、EPOはミクログリアのサイトカイン分泌、貪

食能、および形態変化に影響を与えることを明らかにした。マウス ES 細胞およびヒト iPS 細胞由来のニューロンおよびグリアの作成を開始し、マウス ES 細胞由来の神経幹細胞の作成は安定に行うことができた。神経幹細胞からニューロンおよびグリアへの分化については、ニューロンへの分化はできる一方、アストロサイトやオリゴデンドロサイトへの分化はごく限られた細胞だった。今後、EPO の効果を評価する上でより安定したグリアへの分化を検討する必要がある。

研究期間全体において、これまでに報告のあった EPO の神経保護効果のみならず、ミクログリアをはじめとした細胞の機能調節機能の可能性を *in vitro* および *in vivo* であきらかにすることができた。これまでの成果をまとめて現在論文投稿中である。

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 6 件)

Hamano S, Mori Y, Aoyama M, Kataoka H, Tanaka M, Ebi M, Kubota E, Mizoshita T, Tanida S, Johnston RN, Asai K, Joh T. Oncolytic reovirus combined with trastuzumab enhances antitumor efficacy through TRAIL signaling in human HER2-positive gastric cancer cells. *Cancer Lett.* 2015 Jan 28;356(2 Pt B):846-54. doi: 10.1016/j.canlet.2014.10.046. Epub 2014 Nov 17. PubMed PMID: 25444894. (査読有)

Nagaya Y, Aoyama M, Tamura T, Kakita H, Kato S, Hida H, Saitoh S, Asai K. Inflammatory cytokine tumor necrosis factor suppresses neuroprotective endogenous erythropoietin from astrocytes mediated by hypoxia-inducible factor-2. *Eur J Neurosci.* 2014 Dec;40(11):3620-6. doi: 10.1111/ejn.12747. Epub 2014 Oct 4. PubMed PMID: 25283246. (査読有)

Xia H, Yamada S, Aoyama M, Sato F, Masaki A, Ge Y, Ri M, Ishida T, Ueda R, Utsunomiya A, Asai K, Inagaki H. Prognostic impact of microRNA-145 down-regulation in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Hum Pathol.* 2014 Jun;45(6):1192-8. doi: 10.1016/j.humpath.2014.01.017. Epub 2014 Feb 6. PubMed PMID: 24745613. (査読有)

Nomura T, Aoyama M, Waguri-Nagaya Y, Goto Y, Suzuki M, Miyazawa K, Asai K, Goto S. Tumor necrosis factor stimulates osteoclastogenesis from human bone marrow cells under hypoxic conditions. *Exp Cell Res.* 2014 Feb 15;321(2):167-77. doi:

10.1016/j.yexcr.2013.11.020. Epub 2013 Dec 17. PubMed PMID: 24360989. (査読有)

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. Epub 2013 Feb 5. PubMed PMID: 23395999. (査読有)

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. Epub 2013 Jan 16. PubMed PMID: 23322320. (査読有)

[学会発表](計 20 件)

Tamura T, Aoyama M, Kakita H, Ukai S, Asai K, Sobue K. Erythropoietin Attenuated the Microglial Cytotoxicity. Neuroscience 2015, the Society for Neuroscience Annual Meeting 2015, 2015.10.17 Chicago, IL, U.S.A.

Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Ikuta K, Tatematsu N, Kobayashi M, Goto H, Nozaki M, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. The inhibitory effect of synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs and steroids on gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor production in human fibroblast-like synoviocytes. The european league against rheumatism 2015, 2015.6.10 Roma, Italy

Ikuta K, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Kawaguchi Y, Terazawa T, Kobayashi M, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. A role of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) in gliostatin production in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. The european league against rheumatism 2015, 2015.6.10 Roma, Italy

Aoyama M, Nagaya Y, Asai K. Neuroprotective erythropoietin (EPO) from astrocyte was suppressed by inflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF) 第 89 回日本薬理学会年会 2016.3.9 横浜

後藤洋、野村隆之、青山峰芳、関谷健夫、永谷祐子、宮澤健、浅井清文、後藤滋巳

低酸素負荷による微小環境の変化は、TNF 刺激で誘導されるヒト骨髄細胞由来破骨細胞形成を促進する 第 74 回日本矯正歯科学会大会 2015.11.18 福岡

Aoyama M, Kato S, Kakita H, Hida H, Sawamoto K, Asai K. Astrocyte-derived erythropoietin protects the oligodendrocyte precursor cell against hypoxic and reoxygenation injury. Neuroscience 2014, the Society for Neuroscience Annual Meeting 2014, 2014.11.15 Washington, DC, U.S.A.

Tamura T, Nagaya Y, Aoyama M, Kakita H, Kato S, Hida H, Asai K. The hypoxic induction of endogenous erythropoietin (EPO) from astrocyte was suppressed by inflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF). Neuroscience 2014, the Society for Neuroscience Annual Meeting 2014, 2014.11.15 Washington, DC, U.S.A.

Kataoka H, Hamano S, Aoyama M, Mori Y, Tanaka M, Hayashi N, Kubota E, Johnston R, Joh T. Enhanced antitumor effects of oncolytic reovirus and trastuzumab combination therapy in human HER2-positive gastric cancer. 23rd Biennial Congress of the European association for cancer research 2014, 2014.7.5 Munich, Germany

Ikuta K, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Kawaguchi Y, Kobayashi M, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. The importance of gliostatin as an indicator of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. The european league against rheumatism 2014, 2014.6.11 Paris, France

Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Kobayashi M, Goto H, Nozaki M, Ikuta K, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. Gliostatin regulates vascular endothelial growth-factor production in human fibroblast-like synoviocytes. The european league against rheumatism 2014, 2014.6.11 Paris, France

青山峰芳, 垣田博樹, 浅井清文 インフルエンザウイルス脳症においてジクロフェナックナトリウムがミクログリアの機能に与える影響 第 88 回日本薬理学会年会 2015.3.18 名古屋

青山峰芳, 長屋嘉顕, 垣田博樹, 田村哲也, 浅井清文 炎症性サイトカイン TNF によるアストロサイトから分泌される神経保護因子エリスロポエチンの産生抑制メカニズムの解明 第 19 回グリア研究会 2014.12.6 東京

垣田博樹, 青山峰芳, 浅井清文 ジクロフェナックがアストロサイトとミクログリアの iNOS/NOx 産生および活性化に及ぼす影響 第 61 回中部日本生理学会 2014.11.7 名古屋

青山峰芳, 長屋嘉顕, 田村哲也, 垣田博樹, 加藤晋, 飛田秀樹, 浅井清文 炎症性サイトカイン TNF によるアストロサイト由来エリスロポエチン発現の抑制 第 57 回日本神経化学学会大会 2014.9.29 奈良

Aoyama M, Kato S, Nagaya Y, Tamura T, Kakita H, Hida H, Asai K. Erythropoietin released from astrocyte protects the oligodendrocyte precursor cell against hypoxic and reoxygenation injury. 第 9 1 回日本生理学会大会 2014.3.16 鹿児島

田村哲也, 青山峰芳, 小宮良輔, 富田麻衣子, 藤掛数馬, 吉澤佐也, 播磨恵, 太田晴子, 藤田義人, 祖父江和哉 エリスロポエチンによる脳保護効果の発現機序解明 第 41 回日本集中治療学会学術集会 2014.2.27 京都

Ikuta K, Waguri-Nagaya Y, Terazawa T, Aoyama M, Asai K, Kobayashi M, Otsuka T. The sp1 transcription factor is essential for the expression of gliostatin/thymidine phosphorylase in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. The european league against rheumatism 2013, Madrid, Spain

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- の効果 第 18 回グリア研究会 2013.10.26 仙台

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 2013.10.25 岐阜

Aoyama M, Kakita H, Nagaya Y, Suzuki M, Asai K. Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced phagocytosis of cultured microglia via nitric oxide production Neuro2013 2013.6.20 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2)研究分担者

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