

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462334

研究課題名(和文) 血液-脳関門の機能維持からみた中枢神経保護の分子解析

研究課題名(英文) neuroprotection by the maintenance of blood brain barrier

研究代表者

田辺 久美子 (Tanabe, Kumiko)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30402209

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)：interleukin (IL)-1 はラットグリオーマ由来細胞株(C6細胞)からIL-6の産生・遊離を促進し、adenylyl cyclase-cAMP経路の活性化がIL-1 によるIL-6の産生・遊離を増強することはこれまでに報告されている。今回、その機序の詳細を検討した。その結果、adenylyl cyclase/cAMP/PKA経路はJAK2/STAT3経路の活性化を介してIL-1 によるIL-6遊離を促進することが明らかとなった。また、静脈麻酔薬 dexmedetomidineがIL-1 受容体と転写因子の間に作用しIL-1 によるIL-6産生・遊離を抑制すると推測された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that interleukin (IL)-1 induces IL-6 synthesis in rat glioma cell line, C6 cells and that cAMP enhances IL-1 -induced IL-6 synthesis. We investigated the details behind enhancement of IL-1 -induced IL-6 synthesis by cAMP. In conclusion, adenylyl cyclase/cAMP/PKA pathway upregulates IL-1 -induced IL-6 synthesis through enhancement of the JAK2/STAT3 pathway. In addition, dexmedetomidine, intravenous anesthetic agent, inhibits IL-1 -induced IL-6 synthesis independently of the adenylyl cyclase/cAMP pathway through its receptor ( 2 adrenoceptor).

研究分野：麻酔学・疼痛治療

キーワード：中枢神経保護 サイトカイン 細胞内情報伝達

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢神経機能を維持するためには、神経細胞のみならず、その他の中枢神経を構成する細胞(アストロサイト、ミクログリア)との神経伝達物質、または電気生理学的活動を介したネットワークが重要である。さらに、これらの細胞に加えて、脳血管との相互作用が中枢神経の機能維持に不可欠であることから、2001年にアメリカ NIH Stroke Progress Review Group から「Neurovascular Unit」という概念が提唱された。現在、Neurovascular Unitの構成細胞は、神経細胞、脳血管内皮細胞、アストロサイトに加え、ミクログリア、ペリサイト、オリゴデンドロサイトが含まれており、その他に血管平滑筋細胞も重要な役割を担っていると指摘されている。神経細胞の大部分は血管とは直接接しておらず、アストロサイトを介して血管とコミュニケーションをしている。アストロサイトと血管内皮細胞のクロストークは脳血流の調節、血液-脳関門(BBB)の機能維持に深く関与している。

(2) 細胞間のクロストークは電気生理学的活動、神経伝達物質を介する以外に、神経栄養因子、サイトカインのような液性因子を介して行われることが多い。中枢神経系が障害を受けると活性化アストロサイト、ミクログリアが変性神経細胞を貪食・処理すると同時に、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ などのサイトカイン、NO、フリーラジカル、興奮性アミノ酸など神経障害因子を産生する。それにより神経細胞が障害されると同時に、IL-2、IL-3、IL-6、GM-CSF等の神経栄養作用を持つサイトカインや、GDNF、BDNFなど神経栄養因子、神経成長因子(NGF)の産生を誘導するIL-1、IL-4、IL-5、TGF- $\beta$ などのサイトカインの産生が促進され、神経細胞の障害を軽減させる方向に働く。産生・遊離された神経栄養因子・障害因子は神経細胞に直接作用する以外に、血管内皮細胞にも作用し、BBBの透過性に影響を与える。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 等のサイトカイン、NO、VEGF、aquaporin-4などが、アストロサイトの浮腫・tight junctionの拡大・細胞自体の透過性亢進を惹起し、BBBの透過性を亢進する。一方、GDNF、BDNF、bFGFなどはBBBの透過性亢進を防ぐと報告されている。しかし、これらの因子の作用は二相性であり、脳障害の急性期に障害を増強する因子が、回復期には中枢神経系の組織・機能の修復に寄与する。これら神経栄養因子・神経障害因子が産生・遊離される機序や、細胞外の環境(障害の急性期か回復期か)薬剤がそれに及ぼす影響、血管内皮細胞に及ぼす影響などを検討することは、BBB機能の維持、補助を介する神経細胞保護を解明する上で重要である。

### 2. 研究の目的

(1) 中枢神経障害時にアストロサイトから産生される神経障害因子、神経栄養因子の産生機序を明らかにする。

(2) アストロサイトと血管内皮細胞あるは血管平滑筋細胞を共培養し、アストロサイトからの神経障害因子、神経栄養因子の遊離がこれらの細胞に与える影響を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 神経障害因子として知られ、BBBの透過性を亢進するサイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ など) NO、フリーラジカル、興奮性アミノ酸などの培養アストロサイトからの産生・遊離の機序をimmunoblot法、PCR法、ELISA法により検討する。さらに、その細胞内情報伝達機構を解明する。

(2) 神経栄養因子として知られ、BBBの透過性亢進を防ぐとされているGDNF、BDNF、bFGFの産生・遊離の機序を培養アストロサイトを用いて検討する。

(3) 血管透過性物質として知られているVEGF、aquaporin-4が血管内皮細胞の透過性亢進に与える影響をデキストラン透過量の測定によって検討する。

### 4. 研究成果

(1) 1、ラットグリオーマ由来細胞株(C6)に $\alpha_{2A}$ アドレナリン受容体が発現していることを確認した。2、 $\alpha_{2A}$ 受容体作動薬で静脈麻酔薬であるdexmedetomidineは同細胞からのIL-1 $\beta$ によるIL-6のmRNAの発現およびIL-6遊離を抑制した。3、IL-1 $\beta$ 単独ではcAMPの産生に影響を与えなかった。4、8-brom-cAMPはIL-1 $\beta$ によるIL-6の産生・遊離を促進した。5、一方8-brom-cGMPはIL-1 $\beta$ によるIL-6遊離には影響しなかった。6、dexmedetomidineはIL-1 $\beta$ 存在下でもcAMPの産生に影響を与えなかった。7、dexmedetomidineはforskolinによるcAMPの産生にも影響を与えなかった。以上よりdexmedetomidineはadenylyl cyclase-cAMP経路を介してIL-1 $\beta$ 惹起性IL-6産生の抑制を行っているのではないと推測された。

8、 $\alpha_2$ 受容体拮抗薬であるyohimbineはdexmedetomidineによるIL-1 $\beta$ 惹起性IL-6遊離促進に影響を与えなかった。このことから、dexmedetomidineは $\alpha_2$ 受容体を介してIL-1 $\beta$ 惹起性IL-6産生の抑制を行っているのではないと推測された。

9、Protein kinase Cの活性化物質であるTPAは単独でIL-6遊離を促進し、IL-1 $\beta$ 惹起性IL-6遊離を促進した。10、dexmedetomidineはIL-1 $\beta$ による

mitogen-activated protein kinase superfamily、NFκB、IκB のリン酸化には影響しなかった。以上より、dexmedetomidine は IL-1β 受容体と転写因子の間に作用することによって IL-1β による IL-6 産生・遊離を抑制すると推測された。

(2) ラットグリオーマ由来細胞株(C6)において内因性の cAMP 活性化物質である PGE<sub>2</sub> は IL-1β による IL-6 遊離を促進した。2、8-brom-cAMP は IL-1β による mitogen-activated protein kinase superfamily、IκB のリン酸化には影響しなかった。3、forskolin は IL-1β による STAT3 のリン酸化を増強した。4、JAK inhibitor I は 8-brom-cAMP による IL-1β 惹起性 IL-6 遊離の増強を抑制した。5、IL-1β は JAK2 のリン酸化を促進したが、JAK1 のリン酸化には影響しなかった。6、JAK2 siRNA は IL-1β による IL-6 遊離には影響しなかったが、JAK2 の特異的阻害剤である FLLL32 は IL-1β による IL-6 遊離を抑制した。7、PKA の阻害剤である 4-cyano-3-methylisoquinoline は IL-1β による STAT3 のリン酸化には影響しなかったが、8-brom-cAMP による IL-1β 惹起性 STAT3 リン酸化の増強を抑制した。8、8-brom-cAMP は単独で JAK2 のリン酸化を促進したが、JAK1 のリン酸化には影響しなかった。9、PKA siRNA は 8-brom-cAMP による IL-1β 惹起性 IL-6 遊離増強を抑制した。10、EPAC siRNA も同様に 8-brom-cAMP による IL-1β 惹起性 IL-6 遊離増強を抑制した。以上より、adenylyl cyclase/cAMP/PKA 経路は JAK2/STAT3 経路の活性化を介して IL-1β による IL-6 遊離を促進することが推測された。

(3)1、マウス初代培養アストロ細胞株(C8D1A 細胞)を用いて Transforming growth factor (TGF)β が IL-6 の遊離を促進することを確認した。2、smad2 の阻害剤である SIS3 が TGFβ による IL-6 遊離を抑制することを確認した。3、rho-kinase 阻害剤である fasudil、Y27632 はともに TGFβ による IL-6 遊離を促進した。4、rac の阻害剤である NSC23766 が TGFβ による IL-6 遊離を促進した。今後、これらの経路の関係を検討予定である。

#### 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 2 件)

- (1) Tanabe K, Kozawa O, Iida H: cAMP/PKA enhances interleukin-1β-induced interleukin-6

synthesis through STAT3 in glial cells. Cell Signal. 査読有 28, 19-24, 2016

- (2) Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki, Kozawa O, Iida H: Dexmedetomidine suppresses interleukin-1β-induced interleukin-6 synthesis in rat glial cells. Int J Mol Med. 査読有 34, 1023-1038. 2014

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 田辺久美子、飯田宏樹: Basic fibroblast growth factor によるグリア細胞からの神経栄養因子(GDNF)遊離機序. 第 20 回日本神経麻酔集中治療学会(札幌)7月16日2016
- (2) 田辺久美子、小澤修、飯田宏樹: 脳の中の heat shock protein. 日本麻酔科学会第 62 回学術集会(神戸)シンポジウム5月29日2015
- (3) 田辺久美子、飯田宏樹: Dexmedetomidine の interleukin-1β によるグリア細胞からの interleukin-6 遊離抑制. 第 18 回日本神経麻酔・集中治療研究会(沖縄)4月19日2014

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 田辺久美子、飯田宏樹. 実験的治療-カルシウム拮抗薬, グルタミン酸受容体拮抗薬, フリーラディカルスカベンジャー, β ブロッカーなど-: 虚血性中枢神経障害の基礎と臨床. p56-77 2016 分担. 牛島一男編真興交易

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田辺 久美子 (TANABE, KUMIKO)  
岐阜大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：30402209

(2) 研究分担者

小澤 修 (KOZAWA, OSAMU)  
岐阜大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：90225417

(3) 連携研究者

( )  
研究者番号：

(4) 研究協力者

( )