

博士論文

論文題目 低酸素性虚血性障害に対する神経伝達物質ノル
エピネフリンのミクログリアを介した脳保護効果

氏 名 利光 正岳

低酸素性虚血性障害に対する神経伝達物質ノルエピネフリン
のミクログリアを介した脳保護効果

東京大学大学院医学系研究科

生殖・発達・加齢医学専攻 周産期医学分野

指導教員：藤井 知行

利光 正岳

-目次-

要旨	-4-
序文	-5-
1. 方法	-12-
1-1 新生児低酸素性虚血性脳症モデルラットの作製	-12-
1-2 薬物処置	-13-
1-3 免疫組織化学と評価方法	-13-
1-4 ミクログリアの形態分類	-17-
1-5 ラット初代培養細胞の作製(ミクログリア、神経細胞)	-17-
1-6 免疫細胞化学	-19-
1-7 ミクログリアと神経細胞の共培養系の作製	-19-
1-8 低酸素刺激	-20-
1-9 細胞傷害活性測定	-20-
1-10 NE、LPS の培養ミクログリアへの添加	-21-
1-11 リアルタイム RT-PCR 法	-21-
1-12 IL-1 β ELISA	-22-
1-13 新生児ラットの右側脳室へのリポソーム投与	-24-
1-14 脳白質傷害モデルラットの作製	-25-

1-15 免疫組織化学と評価方法	-25-
1-16 統計解析	-28-
2. 結果	-29-
2-1 選択的 NE 再取り込み阻害剤アトモキセチンは HIE を軽減する	-29-
2-2 アトモキセチンは低酸素虚血によるアポトーシスを軽減する	-32-
2-3 アトモキセチンは低酸素虚血下で CREB リン酸化を亢進する	-34-
2-4 ミクログリアは低酸素虚血侵襲とアトモキセチンの影響を受ける	-36-
2-5 低酸素下の神経細胞がミクログリアの IL-1 β 産生に影響する	-38-
2-6 NE は低酸素下におけるミクログリアの抗炎症性応答を増強する	-41-
2-7 ミクログリアは低酸素虚血に対して白質保護的に作用する	-43-
3. 考察	-48-
3-1 HIE モデルラットにおけるアトモキセチンを用いた NE の脳保護効果	-48-
3-2 NE のミクログリア応答性への作用を介した脳保護効果	-49-
3-2-1 HIE へのミクログリアの関与	-50-
3-2-2 NE のミクログリアの応答性に対する直接作用	-51-
謝辞	-55-
参考文献	-56-

要旨

周産期脳障害における神経伝達物質ノルエピネフリン(NE)の役割について、低酸素性虚血性脳症(HIE)モデルの新生児ラットとミクログリア初代培養系を用いて検討した。 *In vivo* では選択的ノルエピネフリン再取り込み阻害剤アトモキセチンを使用して、転写因子 CREB のリン酸化亢進とアポトーシスの抑制を認め、組織学的に脳傷害が軽減した。 *In vitro* では NE が LPS によるミクログリア IL-1 β 蛋白産生を抑制し、低酸素によるミクログリア iNOS/Arg1 mRNA 発現比を低下させた。 NE は脳保護的に作用し、その機序として CREB を介した抗アポトーシス作用とミクログリアを介した作用が示唆された。

序文

周産期の低酸素虚血や子宮内感染により胎児脳が障害を受けると、出生した新生児に脳性麻痺、てんかん、自閉症、学習障害などの根本的な治療法のない神経学的後遺症や発達障害が続発することが明らかになり、大きな問題となっている [1,2]。周産期脳障害は脳の発達段階により受傷部位が異なり、早産児では子宮内感染をはじめとした炎症により脳室周囲白質軟化症(Periventricular leukomalacia; PVL)、正期産児では分娩中の低酸素虚血により大脳皮質層状壊死・基底核壊死を呈する [3,4]。近年の新生児管理の発展・普及により早産児脳障害である PVL の発症率は減少傾向にある [5]。一方、正期産児脳障害は合併症のない妊婦にも突発的に生じ、人員や設備が小規模な一次施設や夜間帯で発生した場合、児やその家族への負担に加えて周産期医療従事者の消耗など依然として臨床上大きな問題となっている [6,7]。正期産児脳障害は主に分娩中の低酸素虚血に起因し、低酸素性虚血性脳症(Hypoxic-ischemic encephalopathy; HIE)と呼称される。現在、正期産児 HIE に対して神経学的予後を改善する唯一の治療として、限定的な脳保護効果ではあるが生後 6 時間以内の児に限って施行される低体温療法が確立している [8,9]。しかしながら、臍帯脱出を含めた臍帯因子や常位胎盤早期剥離に代表される低酸素虚血侵襲の発生は突発的で予測困難であることに加え、HIE の診断ならびに低体温療法実

施可能施設への搬送までの時間経過により、低体温療法の恩恵を十分に受けることのできない事例も少なくない [9]。従って、正期産児 HIE への対策の一つとして、低酸素虚血侵襲を受けた HIE ハイリスク新生児に対して脳傷害カスケードがより早期である一次施設で取り扱いが可能な治療法の開発が望まれている。

脳は主に神経細胞と神経細胞を取り巻くグリア細胞で構成され、胎児期では神経細胞とグリア細胞が相互に影響し合い増殖、細胞死、分化して脳回路が構築されている [10] (図 1)。

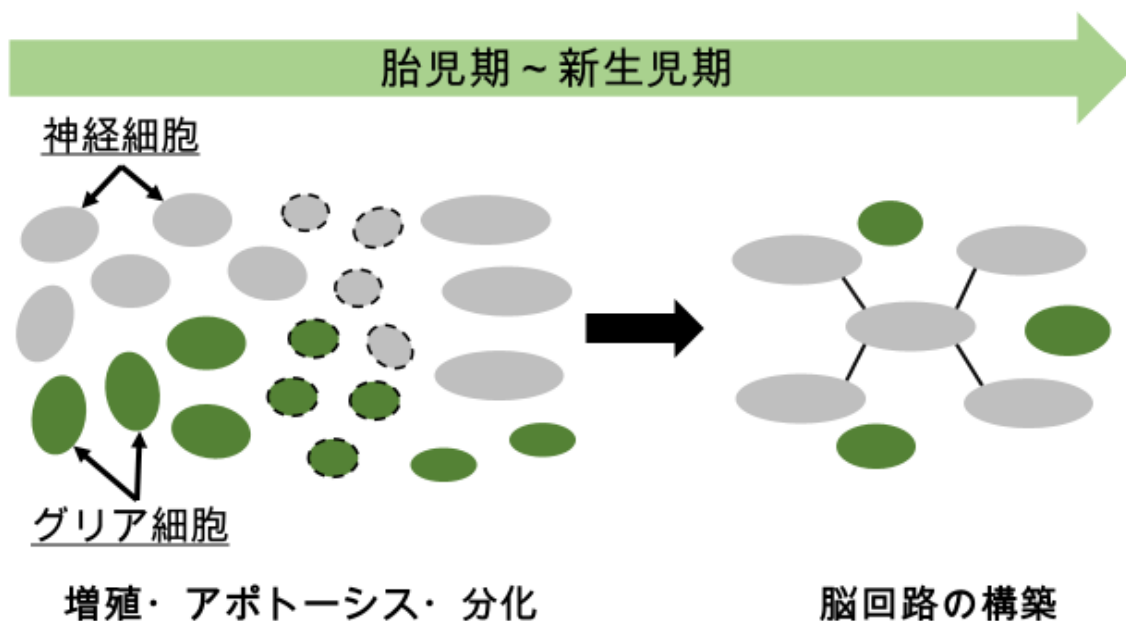


図 1 幼若脳における神経細胞とグリア細胞の相互発達
胎児期から新生児期において、神経細胞とグリア細胞が協調しながら増殖・アポトーシス・分化して脳回路が構築される。

正期産児 HIE は、神経細胞とグリア細胞による脳回路の構築が盛んな時期に侵襲による傷害機転と侵襲に対する内因性保護機構の応答が関与する複雑な病態であり、最終的に神経細胞がアポトーシスに至り発症する [11]。HIE に対する有効な治療法を開発する上で、神経伝達物質グルタミン酸興奮毒性をはじめとした傷害機転に焦点を置いた基礎研究が数多く行われているが [11,12]、ヒトが元来有する内因性の脳保護機構を同定し賦活化することで脳傷害を軽減できるかどうか検討することも重要である [11]。これまでに発達期脳の応答機構としてエリスロポエチン [13] やプロスタグランジン D₂ [14] などの内在性脳保護機構が明らかになっている。

低酸素虚血侵襲を受けたヒト正期産児の脳脊髄液を調べた研究において、神経伝達物質ノルエピネフリン(NE)の代謝が HIE の重症度と相関して亢進・消耗していることが報告されている [15]。NE はモノアミン系神経伝達物質のひとつであり、 α ・ β の各NE受容体を介して神経細胞、グリア細胞に作用する [16]。発達期において脳回路構築や可塑性に関与するが [16]、基礎研究により NE が脳保護作用を有する物質である可能性が示唆されている [17-19]。例えば、脳内 NE を除去した成獣ラットに低酸素虚血処置を加えると脳海馬傷害が悪化すること [17]や、NE が酸化ストレスを軽減して培養神経細胞を保護すること [18] が観察されている。また、NE は脳由来成長因子や抗アポトーシス因子である

Bcl-2、抗酸化物質チオレドキシニンなど脳保護にかかわる複数の蛋白を制御する転写因子 CREB の上流因子であることが知られている [19]。これらの報告を総合すると、発達期の脳において神経伝達物質 NE は低酸素虚血侵襲に対する内因性保護機構のひとつとして機能しているが、最終的に消耗して脳傷害が拡大している可能性が考えられる。しかしながら、正期産児 HIE における NE の機能について検討した報告はない。以上の背景より、神経伝達物質 NE の応答機構の亢進により、CREB を介して神経細胞死を抑制することで HIE を軽減できるかどうか新生児ラットを用いて組織学的に検討を行った。本実験では、NE が新生児ラットの脳血液関門を容易には通過しないため [20]、NE の末梢投与ではなく選択的 NE 再取り込み阻害剤アトモキセチン(Atomoxetine; Atx)を使用した。Atx は選択的に NE トランスポーターに結合して NE 再取り込みを阻害することにより、シナプス間隙中の NE 濃度を増加させる作用がある。Atx を成獣ラットに投与した場合、脳内 NE 濃度が投与後 4 時間まで上昇・維持することが観察されている [21]。

正期産児 HIE は神経細胞死が主病態であるが、ミクログリアの病態への関与が指摘されている [22-24]。ミクログリアはグリア細胞のひとつであり、活性酸素の産生を介した神経前駆細胞数の調整や発達の過程で不要になりアポトーシスした細胞の貪食、余剰なシナプスの刈り込みを行い、amoeboid 型から

ramified 型へ形態変化して脳発達に寄与している [25-28]。これらのミクログリアの生理的活動は周囲の神経細胞の膜型分子や神経伝達物質などの液性因子により制御されている [29]。一方、ミクログリアには Toll 様受容体(Toll like receptors; TLRs)やプリン受容体、サイトカイン受容体が発現しており、外部刺激によって神経傷害性に働く M1 極性や神経保護的に働く M2 極性を示すことが報告され、マクロファージに類似した機能をもつ脳内在性の免疫担当細胞として認識されている [30] (図 2)。

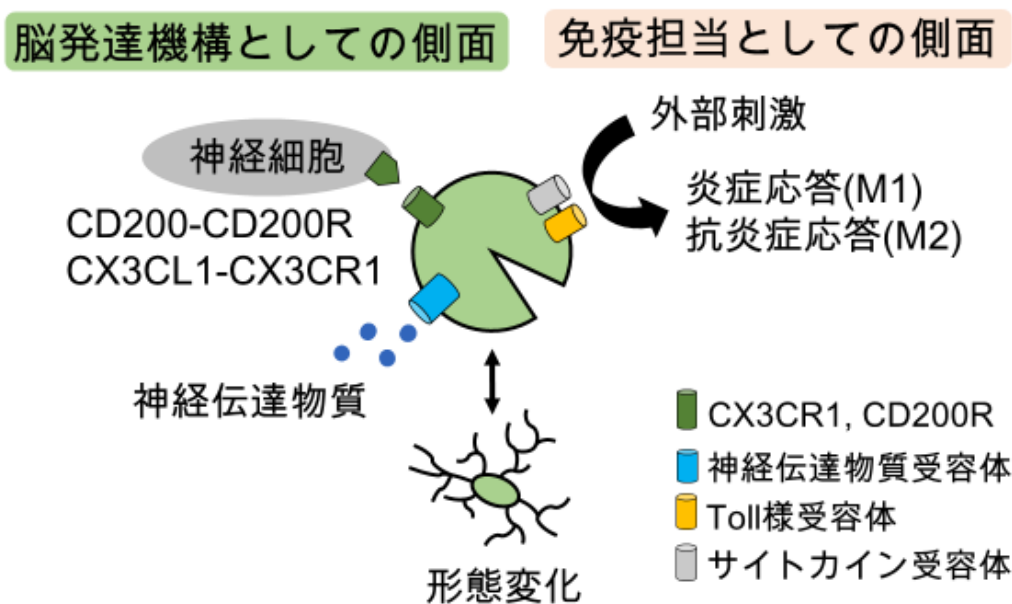


図 2 ミクログリアの多様な役割

ミクログリアの細胞表面には多様な受容体が発現し、神経細胞の膜型分子や神経伝達物質などの液性因子により制御され、神経細胞数の調整や貪食、シナプス刈り込みを行い脳発達に寄与する。一方、脳虚血や感染時には TLRs やプリン受容体を介して異物や DAMPs に反応し、脳内免疫担当細胞として応答する。

ミクログリアの脳内免疫・炎症細胞としての観点から、低酸素環境や DAMPs (damage-associated molecular patterns) と呼称される傷害を受けた神経細胞から放出される内因性の danger signal がミクログリアに直接作用して、IL-1 β や inducible NO synthase(iNOS)の発現や M1/M2 比の上昇を伴う炎症性応答を示すことが報告されている [31-33]。ミクログリアの炎症性応答は感染症においては重要な異物排除機構であるが、脳虚血においては病態の悪化に関与すると考えられ、正期産児 HIE においてミクログリアは神経細胞死を誘導する傷害的な細胞であると認識されている [24,33]。一方、ミクログリアには興奮毒性物質グルタミン酸の除去や抗炎症性サイトカイン、栄養因子を産生して状況によっては脳保護的に機能すると推測されており [34-36]、正期産児 HIE におけるミクログリアの動態については一定の見解を得るに至っていない [37,38] (図 3)。

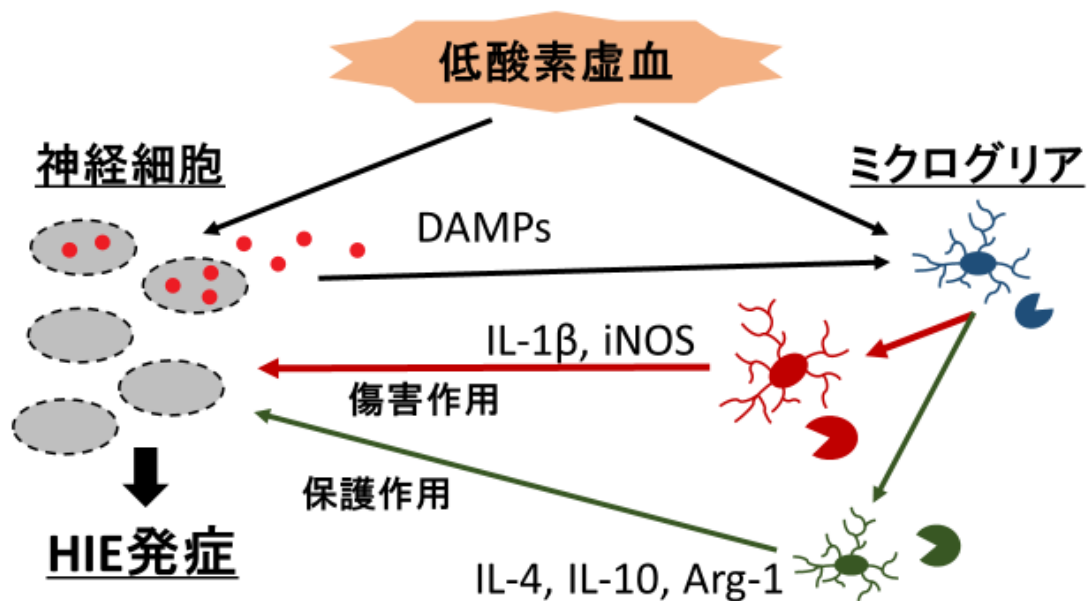


図3 低酸素性虚血性脳症(HIE)に対するミクログリアの関与

低酸素虚血により神経伝達物質グルタミン酸が興奮性神経細胞死を引き起こすことに加えて、低酸素環境やDAMPsがミクログリアの炎症性応答を惹起して炎症性サイトカインや活性酸素種・窒素種を産生し神経細胞死を促進する。一方、ミクログリアが保護的に作用する可能性も指摘されている。

ミクログリアにはNE受容体である $\alpha \cdot \beta$ 受容体が発現しており [16]、病態下ではミクログリアの $\alpha \cdot \beta$ 受容体の発現度が変化することや、 $\alpha \cdot \beta$ 受容体を介して運動性やサイトカイン、プロスタグランジン産生を修飾することが報告されている [39-41]。ヒト正期産児の脳脊髄液中NEがHIEの重症化に伴い消費していること [15] を併せると、NEの消費がミクログリアの機能に影響を及ぼして脳傷害に関与している可能性が推測されたため、ミクログリアに着目して作用機序の検討を行った。

1. 方法

1-1 新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)モデルラットの作製

東京大学動物実験倫理委員会の承認を得て動物実験を行った（承認番号：医-P12-137）。雄の Sprague-Dawley (SD) 新生児ラット(日本 SLC)を使用した。12 時間毎の明暗周期で室温調整された動物棟で母獣と共に飼育した。ラットが産まれた日を日齢 0 日目(P0)と定義した。脳の発達段階がヒト正期産児に相当する P7 ラットを用いて過去の報告を参考に HIE モデルを作製した [42]。イソフルラン吸入麻酔下で P7 ラットの頸部皮膚を縦切開し、実体顕微鏡を用いて左側総頸動脈を迷走神経から単離して 4-0 絹糸で 2 重結紮後に切断した。左側総頸動脈を離断後に、切開した皮膚を 3-0 絹糸で縫合して 36°C で管理した箱内に 2 時間置いた。次に、36°C で管理した 8%酸素チャンバー内で 2 時間低酸素負荷をかけた (図 4)。新生児ラットを用いた HIE モデル作製には、Willis 動脈輪の存在のため片側頸動脈の結紮・切断単独では患側脳組織を傷害できず、低酸素負荷との組み合わせによる 2 段階の処置が必要である [42]。検体間の脳組織傷害の不均一性に関して、私の実験では 8%酸素を 2 時間負荷することで安定した脳組織傷害を認めたことから、HIE モデルとして妥当であると判断した。

1-2 薬物処置

低酸素負荷終了後、新生児ラットを Atx 群と Vehicle 群の 2 群に分類した。Atx 群の新生児ラットには低酸素終了直後にアトモキセチン塩酸塩(0.3mg/kg, Wako)を溶解した生理食塩水 0.1ml を腹腔内へ単回投与した。Vehicle 群には生理食塩水のみ 0.1ml を単回腹腔内投与した。投与後、新生児ラットを母獣のもとに戻して解析に使用するまで飼育した (図 4)。腹腔内投与後、母獣のもとに戻してから 3 時間経過するまで、30 分毎に直腸プローベ(Physitemp Instruments)を新生児ラットの肛門に挿入して直腸温を測定した [43]。直腸温を測定した新生児ラットはプローベの繰り返しの挿入による出血などの侵襲があるため、他の実験評価には使用しなかった。

1-3 免疫組織化学と評価方法

低酸素虚血処置(Hypoxia-ischemia; HI)を加えた 24 時間後(P8)と 7 日後(P14)に新生児ラットをイソフルランで安楽死させ、開胸開腹して灌流固定を行った (図 4)。生理食塩水を左心室から灌流して脱血し、次に 4%パラホルムアルデヒド(PFA)で左心室から灌流して固定した。続いて、大脳を摘出して 4%PFA で一晩以上外固定した後、パラフィン包埋し、6.0 μ m 厚の冠状断のパラフィン切片を作製して組織染色に使用した。神経細胞を検出するために、P14 の検体に

Kluver-Barrera(KB)染色を行った。脳標本の全体像は Leica LAS Live Image Builder を用いて撮影した。脳組織傷害の程度を、ヒト正期産児 HIE への低温療法導入根拠となった新生児ラット実験で用いられた基準に従い [44]、大脳皮質・線条体・海馬・視床の 4 領域を 0 から 4 までの 5 段階で各検体の実験条件を知らない検者 2 名が評価を行った(表 1)。点数が高いほど傷害程度が強い。

TUNEL 染色は P8 の検体に ApopTag® Peroxidase Kit S7100 (Millipore)を製造者の推奨する手順で行った。 phosphorylation of the cAMP response element-binding protein (pCREB)免疫組織化学は P8 の検体に rabbit anti-pCREB antibody (1:1000, Millipore)を用いて一晩かけて 4°C で一次抗体反応させた。次に、goat-anti-rabbit antibody Envision+system-HRP labelled polymer(Dako)を用いて 30 分間室温で二次抗体反応させた後、3,3'-diaminobenzidine(DAB)で発色反応を行い、マイヤーヘマトキシリン溶液で核染色した。 ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) 免疫組織化学は P8 の検体に rabbit anti-Iba1 antibody (1:1000, Wako)を用いて一晩かけて 4°C で一次抗体反応させた。次に、goat-anti-rabbit antibody Envision+system-HRP labelled polymer を用いて 30 分間室温で二次抗体反応させた後、DAB で発色反応を行い、マイヤーヘマトキシリン溶液で核染色した。

TUNEL 陽性細胞、pCREB 陽性細胞、Iba1 陽性細胞の数については、光学顕

微鏡を用いて20倍視野(図10A,11A,12A)で計測した。1個体で隣接する2切片、1切片1視野で陽性細胞数を計測し、1視野あたりの平均陽性細胞数を算出して各個体の数値とした。海馬においては、私の実験ではHIによるCA1-3領域の組織脱落が著しかったため、細胞数計測部位として歯状回を選択した。

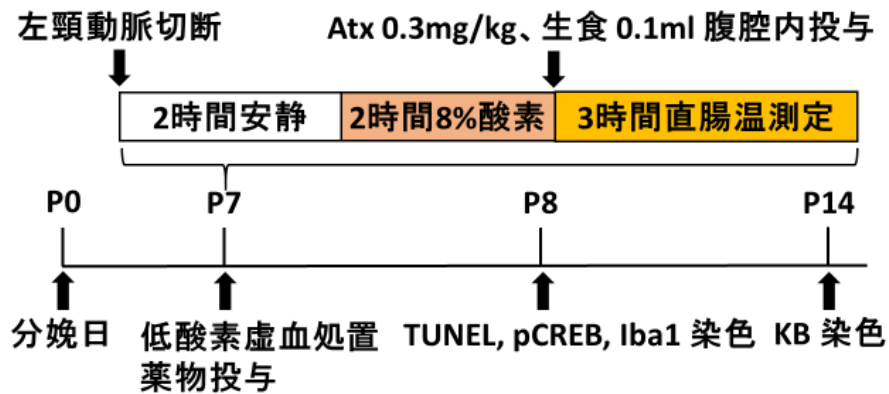


図 4 実験手順

日齢 7(P7)の SD ラットの左頸動脈を結紮・切断後に、低酸素(8%)を 2 時間負荷して HIE モデルを作製した。低酸素終了直後に Atx あるいは生食を腹腔内へ単回投与した。P8 と P14 に脳を摘出し免疫組織化学を行い解析した。

表 1 神経組織障害スケール [44]

脳領域	障害領域(%)	Grading
大脳皮質、線条体、視床	≤10	1
	20-30	2
	40-60	3
	>75	4
海馬	≤20	1
	50	2
	75	3
	100	4

Grade 0 : 組織学的に神経細胞の脱落なし。

1-4 ミクログリアの形態分類

*In vivo*における Iba1 陽性ミクログリアを ramified 型と amoeboid 型の 2 種類に形態分類した [45]。小さな細胞体で細かく分枝した突起を有する形態のミクログリアを ramified 型、大きな細胞体で突起が退縮した形態のミクログリアを amoeboid 型と定義した [45]。

1-5 ラット初代培養細胞の作製

ミクログリアの単離

過去の報告を参考に初代培養ミクログリアを作製した [46]。P1 SD ラットの全身を 70%エタノールで消毒後に断頭し、頭皮ならびに頭蓋骨を切開して大脳を摘出した。摘出した大脳から嗅葉ならびに小脳を除去した後に実体顕微鏡下で髄膜を除去し大脳皮質のみにした。摘出した大脳半球に Dispase (Roche) 0.5mg/mL と DNase I (Roche) 1mg/mL を加えて酵素分解処理し、MEM(Nissui) 培養液中でピペッティングにより懸濁した。懸濁液を 70 μ m 孔のセルストレイナー(REF352350, BD Falcon)で濾過し、4°C10 分間 1000 rpm で遠心した。上清を取り除き、10%Fetal Bovine Serum (FBS)を含む MEM で懸濁後、濃度 2.0×10^7 /15ml/flask になるよう 10%FBS を含む MEM 培養液を加えて poly-L-lysine(PLL)でコーティングした T-flask 75cm² (IWAKI, Tissue

Culture Flask with Vented Cap)に播種した。37°C 5% CO₂/95% 大気下で培養し、3日毎に培地交換した。10-14日間培養後、orbital shakerにて室温30分間150rpmで振盪して浮遊した細胞を回収した。この手順によりアストロサイトに接着しているミクログリアを単離した。剥がれたミクログリアをPLLでコーティングした6well dishに濃度 5×10^5 cell/wellで播種した。播種翌日に培地交換を行い、各実験に用いた。

神経細胞の単離

過去の報告を参考に初代培養神経細胞を作成した [47]。妊娠17日目のSDラットをイソフルラン麻酔下に開腹して子宮を摘出した。摘出子宮から胎児を取り出して大脳を摘出した。摘出した大脳から嗅葉ならびに小脳を除去した後、実体顕微鏡下で髄膜を除去し大脳皮質のみにした。摘出した大脳半球にDispase 0.5mg/mLとDNase I 1mg/mLを加えて酵素分解処理し、neurobasal medium (Life Technologies) に2% B27 (Gibco)、0.5 mM L-グルタミン、25 μM グルタミン酸を加えた培養液で懸濁し、PLLでコーティングした6well dishに濃度 2.0×10^5 /cm²で播種し、37°C 5% CO₂/95% 大気下で培養した。翌日、neurobasal medium に2% B27と0.5 mM L-グルタミンを加えた培養液へ培地交換した。4-5日間培養後に各実験に用いた。

1-6 免疫細胞化学

培養細胞を PBS で洗浄し、4%PFA を加え室温で 10 分間固定した。次に、PBS で洗浄し 10%ヤギ血清に調整した PBS を加え室温で 60 分間ブロッキングした後、一次抗体反応を以下の通りに行った。一次抗体反応終了後、PBS で洗浄し goat anti-rabbit antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 (1:800, Life Technologies)を用いて室温暗室で 1 時間二次抗体反応を行った。最後に PBS で洗浄し核染色封入剤 Dapi-Fluoromount-G (SouthernBiotec)で封入し、共焦点顕微鏡(Zeiss)で観察した。

一次抗体反応：

- ・ rabbit anti-Iba1 antibody (1:500, Wako) 室温 1 時間
- ・ Neuro-Chrom™ Pan Neuronal Marker (1:500, Millipore) 室温 2 時間
- ・ rabbit hypoxic inducible factor 1 α (HIF-1 α) antibody (1:250, Millipore) 4°C 一晚

1-7 ミクログリアと神経細胞の共培養系の作製

神経細胞のミクログリアへの影響を調べるために transwell を用いて共培養を行った。細胞の移動や接触を防ぎ、液性因子による細胞間相互作用を調べる共培養システムを作製するために 0.4 μ m 孔の transwell insert を使用して分離

培養を行った。ミクログリアを well に播種した翌日に neurobasal medium に 2% B27 と 0.5 mM L-グルタミンを加えた神経細胞用培養液に交換し、神経細胞を播種した insert を挿入して翌日に実験に使用した(図 5A)。

1-8 低酸素刺激

嫌気培養専用の角型ジャーに炭酸ガス発生剤アネロパックケンキ 5%(三菱ガス化学)、培養細胞が入った dish を入れて 37°C 5% CO₂/95% 大気下で 4 時間培養した。ジャー内の酸素濃度が 1 時間以内に 1.0%未満になっていることを低酸素指示薬の変色にて確認した。4 時間後に dish を角形ジャーから取り出した(図 5B)。コントロールは 37°C 5% CO₂/95% 大気下で培養した。

1-9 細胞傷害活性測定

培養神経細胞の傷害活性を LDH assay を用いて測定した(図 5B)。LDH 活性の測定は Cytotoxicity Detection Kit^{plus} (Roche Diagnostics)を用いて製造者の推奨する手順で行った。LDH 放出量(%) = (experimental value - culture medium background)/(target cell maximum LDH release - culture medium background) × 100。

1-10 NE、LPS の培養マイクログリアへの添加

L-(-)-Norepinephrine (+) bitartrate salt monohydrate(NE)粉末 (Sigma-Aldrich)を最終濃度が 10 μ M となるよう細胞培養液で調整して、マイクログリア単培養に添加した(図 5C)。 NE の投与濃度は過去の報告を参考にした [39]。 LPS 粉末 E coli 055:B5 (Sigma-Aldrich)を最終濃度が 1 μ g/ml となるよう細胞培養液で調整して、マイクログリア単培養に添加した(図 5C)。

1-11 リアルタイム RT-PCR 法

6well dish に播種したマイクログリアから RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて製造者の推奨する手順で RNA を抽出した。 抽出した RNA を ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo)を用いて製造者の推奨する手順で cDNA に逆転写した。 リアルタイム PCR は THUNDERBIRD™ SYBER® qPCR Mix(Toyobo)を用いて、Thermal Cycler Dice(Takara)により以下に示す条件で反応を行い測定した。 ラット HPRT1 遺伝子を内部遺伝子として、その相対量を算出した。 使用したプライマーの塩基配列は以下のとおりである。

リアルタイム PCR 条件：

初期変性 95°C 1分間；熱変性/アニーリング/伸長反応 40サイクル、95°C 10秒

、60°C 10秒、72°C 30秒; 融解曲線分析 95°C 15秒、60°C 30秒、95°C 15秒。

プライマー塩基配列:

hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)

Forward primer: TCCTCATGGACTGATTATGGACA

Reverse primer: TAATCCAGCAGGTCAGCAAAGA

IL-1 β

Forward primer: CTACCTATGTCTTGCCCGTGGAG

Reverse primer: GGGAACATCACACACTAGCAGGTC

iNOS

Forward primer: CAAACTGTGTGCCTGGAGGTTC

Reverse primer: AAGTAGGTGAGGGCTTGCTGA

arginase1(Arg1)

Forward primer: GCTGTGGTAGCAGAGACCCAGA

Reverse primer: CATCCACCCAAATGACGCATAG

1-12 IL-1 β ELISA

培養マイクログリアの上清 IL-1 β 蛋白量を Rat IL-1 β Assay Kit (Takara)を用いて製造者の推奨する手順で定量測定した(図 5C)。

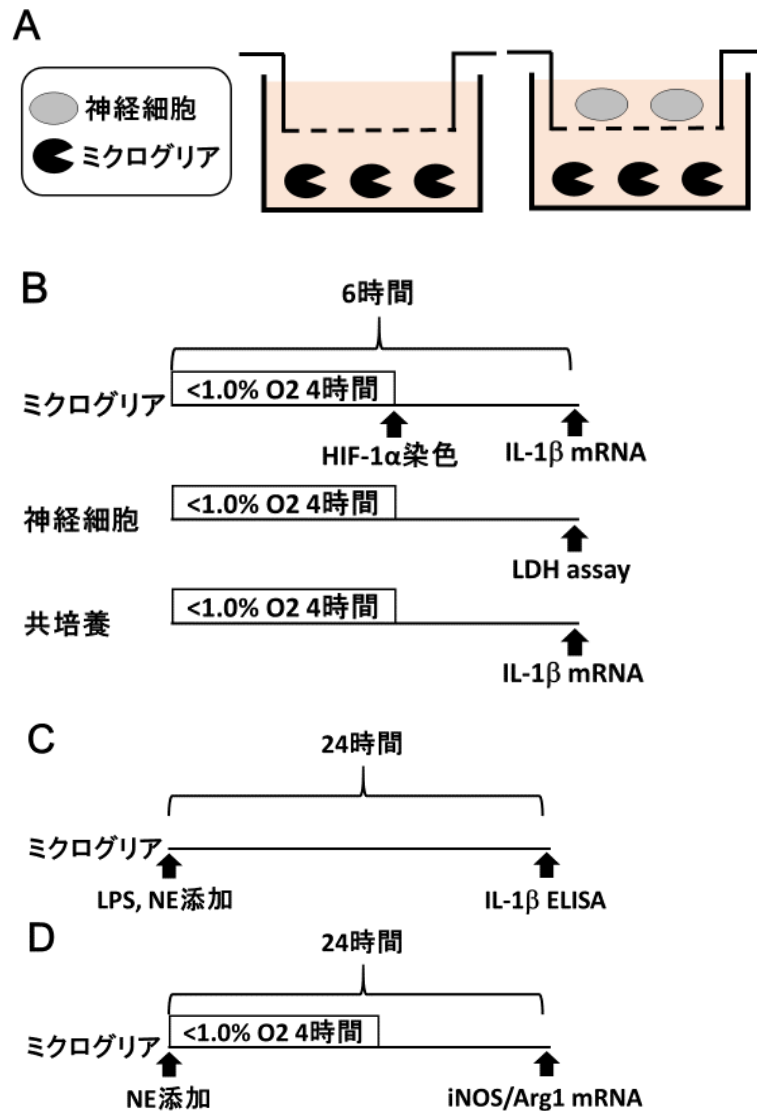


図5 ミクログリアを用いた培養実験

(A) P1 新生児ラット脳からミクログリア、妊娠 17 日目胎児ラット脳から神経細胞を単離。well にミクログリア、insert に神経細胞を播種して共培養を作製した。(B) ミクログリア単培養に低酸素(<math><1.0\% O_2</math> 4 時間)負荷し、終了直後に HIF-1 α の免疫細胞化学を施行した。神経細胞の単培養に低酸素開始 6 時間後に LDH assay を施行した。単培養と共培養に低酸素負荷し、低酸素開始 6 時間後にミクログリアの IL-1 β mRNA をリアルタイム PCR 法で測定した。(C) ミクログリア単培養に LPS \pm NE を投与し、24 時間後に ELISA で IL-1 β を測定した。(D) ミクログリア単培養に低酸素負荷し、低酸素開始 24 時間後にミクログリアの iNOS/Arg1 mRNA 比をリアルタイム PCR 法で測定した。

1-13 新生児ラットの右側脳室へのリポソーム投与

P4 SD ラットをイソフルラン吸入麻酔下で頭部皮膚を正中切開して Bregma を露出した。Bregma より 1.0mm 背側、1.0mm 右側方、頭蓋骨から深さ 2.0mm の部位に 32-gauge 針のマイクロシリンジ(伊藤製作所)を用いて clophosome-A 含有リポソーム(Clod-lip, 7mg/mL, フナコシ)を右側脳室内に 3 μ l/pup 投与した。コントロール群はPBS含有リポソーム(PBS-lip, フナコシ)を 3 μ l/pup 右側脳室内に投与した。脳室内注射後、3-0 絹糸で頭皮縫合し、母獣のもとに戻して解析に使用するまで飼育した(図 6)。clophosome-A は取り込んだ細胞の ATP 代謝を阻害してアポトーシスを引き起こすことで細胞を除去するビスフォスフォネート製剤のひとつであるが、細胞膜透過性が低いため細胞除去効率が悪いことが知られている。リポソームは脂質組成を有する人工的な小胞で薬物配達システムのひとつである。clophosome-A をリポソームで封入することにより細胞膜透過性が向上し、ミクログリアなどの貪食作用のある細胞に取り込まれやすくなる [48]。クロドロネートは血液脳関門を通過できず、末梢投与では脳内に存在するミクログリアを除去できないため、本実験では脳室内投与を選択した。

1-14 脳白質傷害モデルラットの作製

右側脳室内注射 2 日後(P6)、イソフルラン吸入麻酔下で P7 ラットを用いた HIE モデルと同様の手技で過去の報告を参考に脳白質傷害モデルを作製した [49]。左側総頸動脈を 4-0 絹糸で 2 重結紮・切断した後、36°C で管理した箱内に 1 時間置いた。次に、36°C で管理した 6%酸素チャンバー内で 30 分間低酸素負荷をかけた(図 6)。母獣のもとに戻して解析に使用するまで飼育した。

1-15 免疫組織化学と評価方法

脳室内注射 2 日後(P6)と 7 日後(P11)に新生児ラットをイソフルランで安楽死させ灌流固定を行い、パラフィン包埋後に 6.0 μ m 厚の冠状断の切片を作製して組織染色に使用した。Iba1 染色を P6 の検体に上述と同様の方法で免疫組織化学を行った。Iba1 陽性細胞の数については光学顕微鏡を用いて 20 倍視野で計測した。1 個体あたり 1 切片中の白質内 Iba1 陽性細胞数を計測し、各個体の数値とした。Myelin basic protein(MBP)免疫組織化学を P11 の検体に mice anti-MBP antibody (1:2000, SMI-99)を用いて一晩かけて 4°C で一次抗体反応させた。一次抗体反応終了後、PBS で洗浄し goat anti-mice antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 (1:800, Life Technologies)を用いて室温暗室で 1 時間二次抗体反応を行った。最後に PBS で洗浄し核染色封入剤

Dapi-Fluoromount-G で封入し、共焦点顕微鏡で観察した。MBP の脱落程度を、白質傷害研究で汎用されている基準に従い [49]、脱落を認めないスコア 0 から完全に脱落しているスコア 5 まで 6 段階で評価した(図 7)。

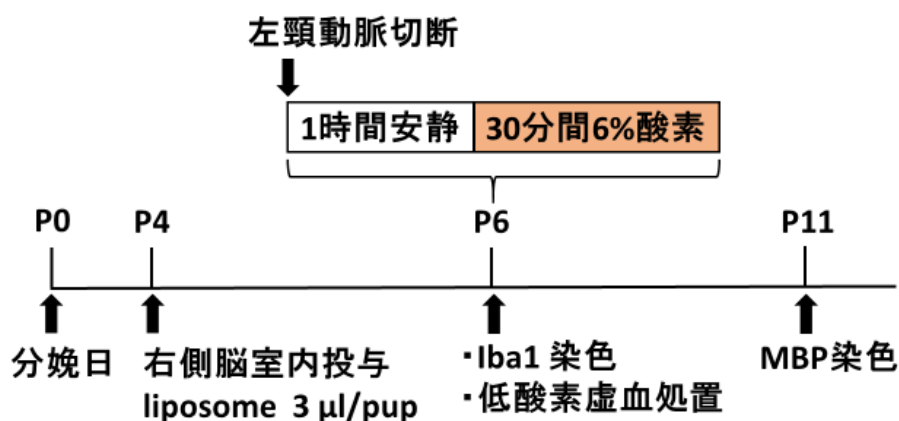


図 6 実験手順

P4 SD ラットにクロドロネートリポソームならびに PBS リポソームを右側脳室内へ注射し、48 時間後(P6)に左総頸動脈を結紮・切断して低酸素(6%)を 30 分間負荷した。P6 と P11 に脳を摘出し免疫組織化学を行った。

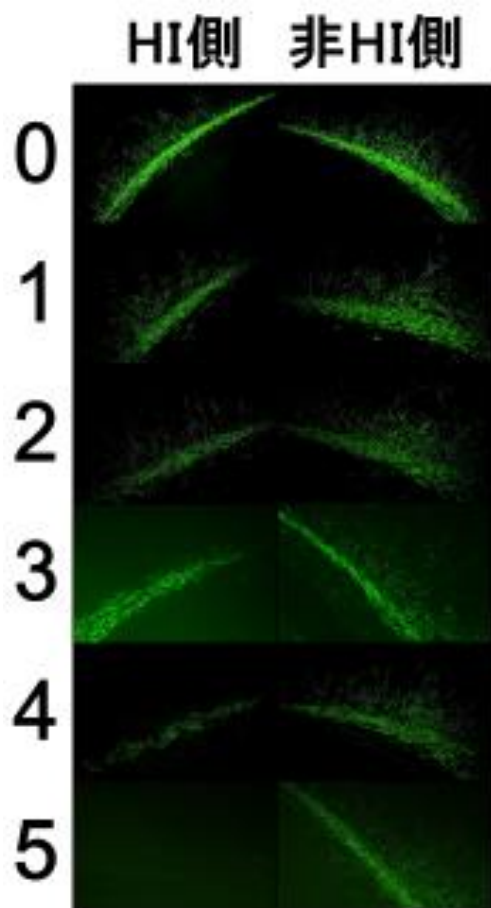


図 7 MBP 損傷スコア [49]

同一検体の HI 側(左側)と非 HI 側(右側)で比較して、突起と脳梁が完全に脱落している状態を 5、突起は脱落しているが脳梁が菲薄化でとどまっている状態を 4、突起は脱落しているが脳梁が保たれている状態を 3、突起のみが中等度に脱落している状態を 2、突起のみが軽度に脱落している状態を 1、左右差を認めない状態を 0 として判定した。

1-16 統計解析

実験データは平均±標準誤差で表示した。有意差検定は、Student's t-test
あるいは One-way ANOVA による分散分析後、Bonferroni post hoc test による
多重検定を行った。P<0.05 の場合、有意差ありとした。

2. 結果

2-1 選択的 NE 再取り込み阻害剤アトモキセチンは HIE を軽減する

P7 ラットに HI(左頸動脈切断、8%酸素 2 時間)を加えた直後に、Atx 群には Atx(0.3mg/kg)を、Vehicle 群には生理食塩水をそれぞれ腹腔内へ単回投与した(図 4)。7 日後(P14)に神経組織の脱落程度を KB 染色にて表 1 に従い比較した。Vehicle 群(n=10)では非 HI 側(右側)に比較して HI 側(左側)の脳皮質・線条体・海馬・視床の 4 領域において Nissl 染色の広範な脱落を認めた(図 8A)。一方、Atx 群(n=10)では HI 側は萎縮にとどまり、Vehicle 群と比較すると脳皮質・線条体・海馬・視床のいずれの領域においても神経組織は維持されていた(図 8A-C)。直腸温は両群(n=11/群)とも 33 から 34 °C を推移し、有意な差を認めなかった(図 9)。

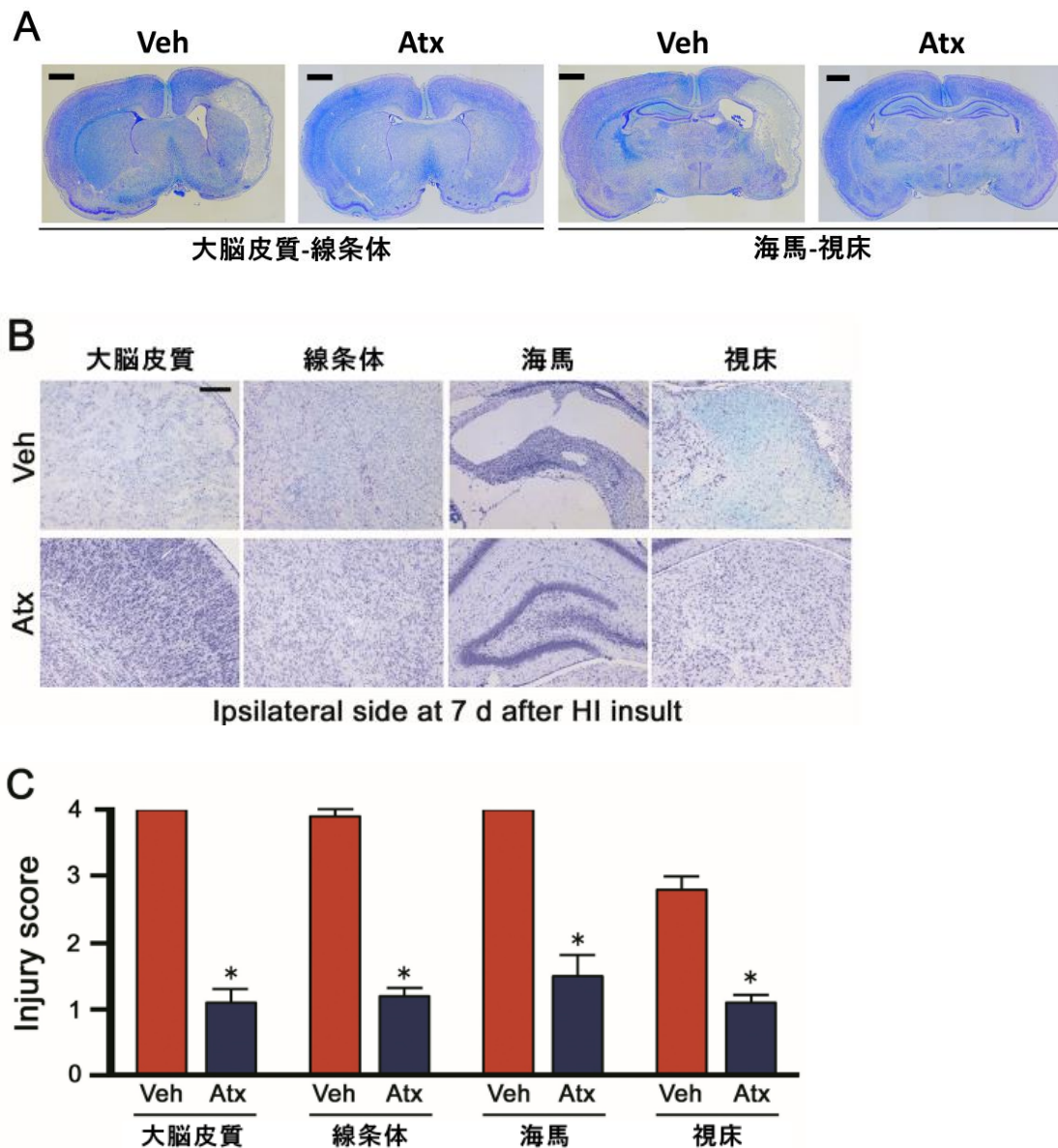


図 8 HIE モデルラットにおけるアトモキセチンの脳保護効果

P7 で左頸動脈切断、8%酸素 2 時間負荷し Atx あるいは生食を腹腔内へ単回投与した。7 日後(P14)に KB 染色で脳組織障害を評価した。(A) 脳全体像。Vehicle 群では非 HI 側に比較して HI 側の KB 染色の脱落と脳室拡大を認めた。Atx 群では HI 側の軽度萎縮を認めた。(B) 大脳皮質、線条体、海馬、視床の強拡大像。(C) Atx 群(n=10)では Vehicle 群(n=10)に比較して、大脳皮質・線条体・海馬・視床の 4 領域において神経組織障害の程度が有意に軽度であった(平均値 ± 標準誤差, * $P < 0.05$)。Scale bars: (A) 1 mm、(B) 200 μm 。Atx; アトモキセチン、Veh; Vehicle。

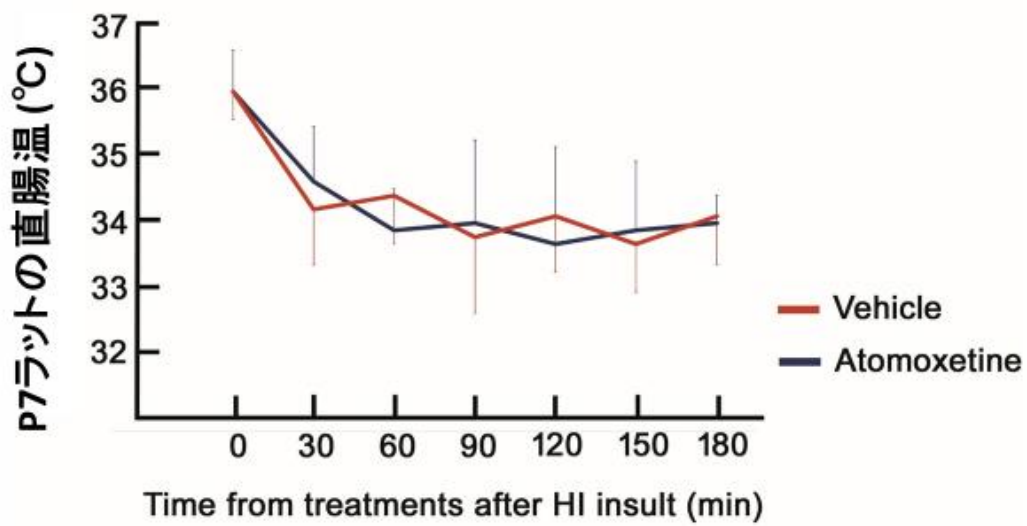


図 9 直腸温の推移

腹腔内投与直後から 3 時間経過するまで、Vehicle 群(n=11)と Atx 群(n=11)を 30 分毎に間欠的に直腸温を測定した。両群とも 33~34 °C で推移し、統計学的に有意な差は認めなかった。

2-2 アトモキセチンは低酸素虚血によるアポトーシスを軽減する

正期産児 HIE はアポトーシスを中心とした神経細胞死が引き起こされ発症する [11]。従って、Atx 群で HI に対して脳組織傷害が軽減した仕組みを調べるために、急性期である HI 24 時間後(P8)に神経細胞のアポトーシスを TUNEL 染色で組織学的に検討した。Vehicle 群(n=5)では多数の TUNEL 陽性細胞を認めた(図 10)。一方、Atx 群(n=5)では大脳皮質、線条体、海馬、視床のいずれの領域においても TUNEL 陽性細胞数の減少が観察された(図 10)。

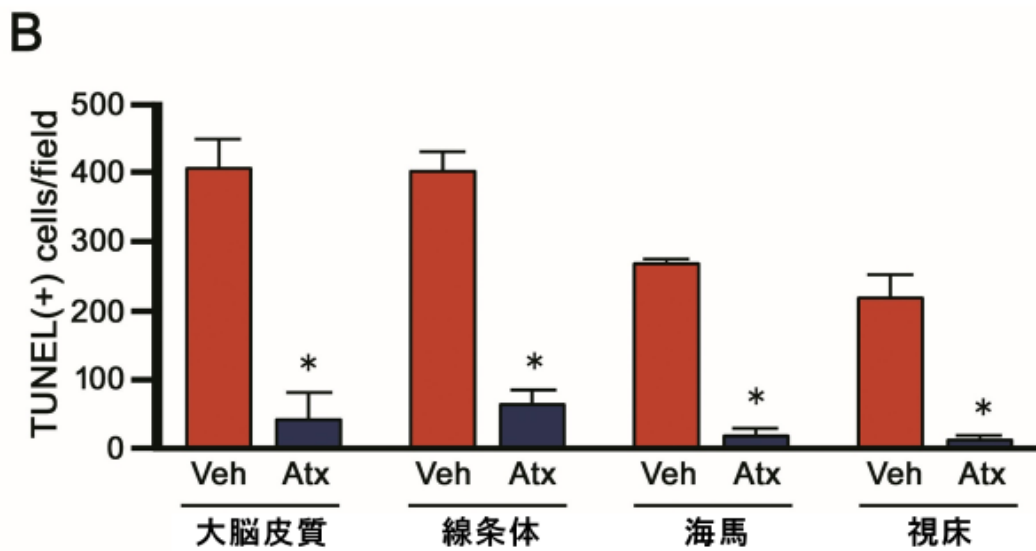
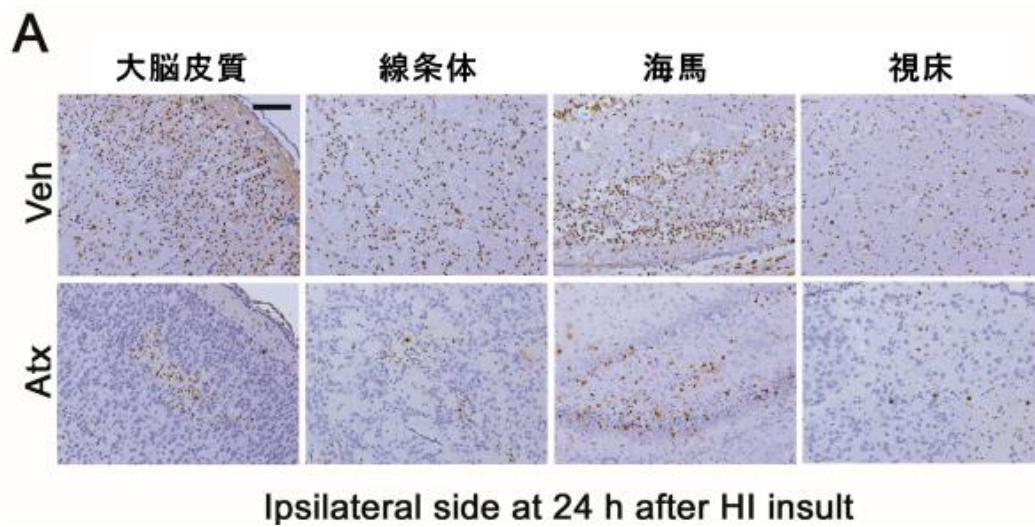


図 10 アトモキセチンによる神経細胞死の抑制

P7で左頸動脈切断、8%酸素2時間負荷しAtxあるいは生食を腹腔内へ単回投与した。24時間後(P8)にTUNEL染色(茶色)で評価した。(A)HI側のTUNEL染色像。Scale bar: 100 μ m。(B)Atx群(n=5)ではVehicle群(n=5)に比較してHI側のTUNEL陽性細胞数が有意に減少した(平均値 \pm 標準誤差, * P <0.05)。Atx; アトモキセチン、Veh; Vehicle。

2-3 アトモキセチンは低酸素虚血下で CREB リン酸化を亢進する

発達期脳に内在する脳保護機構の重要な分子経路として、転写因子 CREB のリン酸化を介する生存経路が報告されている [50]。CREB リン酸化を認めた神経細胞はアポトーシスに至らず、細胞死に至ったものは CREB リン酸化を認めなかったことが報告されている [51]。CREB のリン酸化を促す上流因子の一つに NE があることから [19]、神経細胞死を軽減した機序に CREB リン酸化が関与しているかどうか組織学的に検討した。TUNEL 染色を行った P8 の時期で pCREB 染色を施行した。無処置群(低酸素虚血処置なし、腹腔内投与なし; No HI)の P8 ラット(n=3)では、pCREB の発現をまばらに認めた(図 11)。Atx 群(n=5)では Vehicle 群(n=5)、No HI 群(n=3)とそれぞれ比較して pCREB の発現が亢進していた(図 11)。TUNEL 染色の結果と総合すると、Atx は CREB リン酸化を介した抗アポトーシス作用により神経細胞死を軽減した可能性が示唆された。

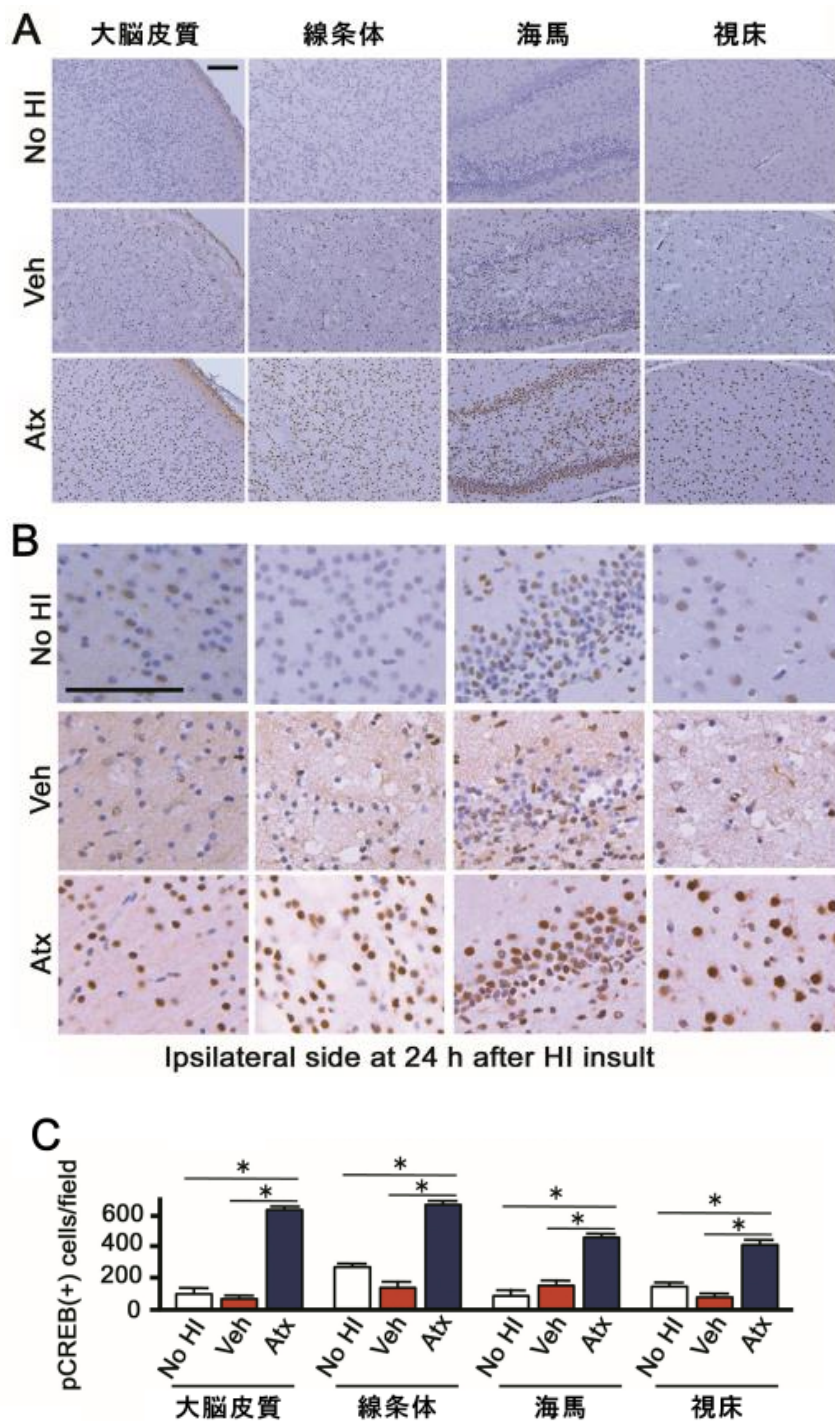


図 11 アトモキセチンによる CREB リン酸化の亢進

P7 で左頸動脈切断、8%酸素 2 時間負荷し Atx あるいは生食を腹腔内へ単回投与した。24 時間後(P8)に pCREB 染色(茶色)で評価した。(A) HI 側の pCREB 染色像。(B) (A)の強拡大像。(C) Atx 群(n=5)では Vehicle 群(n=5)、No HI 群(n=3)に比較して HI 側の pCREB 陽性細胞数が有意に増加していた(平均値±標準誤差, * $P < 0.05$)。Scale bars: 100 μ m。Atx; アトモキセチン、Veh; Vehicle。

2-4 ミクログリアは低酸素虚血侵襲とアトモキセチンの影響を受ける

ミクログリアには NE 受容体が発現しているため [16]、Atx の脳保護効果にミクログリアが関与しているかどうか、ミクログリアの数と形態に着目して検討した。ミクログリアのマーカーとして Iba1 を用いた。Iba1 はミクログリアの状態によらず発現しており、ミクログリア研究で汎用されているマーカーである [52]。HI 24 時間後(P8)において、Vehicle 群(n=5)では No HI 群(n=3)と比較して Iba1 陽性細胞数が減少していた(図 12)。一方、Atx 群(n=5)では Iba1 陽性細胞数が Vehicle 群(n=5)と比較すると維持されていた(図 12)。形態に関して、No HI 群(n=3)ではミクログリアは ramified 型で脳組織全体に分布していた(図 12)。Vehicle 群(n=5)では amoeboid 型に形態変化していたが、Atx 群(n=5)では ramified 型の Iba1 陽性細胞の比率が多かった(図 12)。これらのミクログリアの数と形態の違いから、ミクログリアの HIE への関与ならびに Atx の脳保護効果への関与が示唆された。しかし、TUNEL 染色の結果と統合すると、神経細胞のアポトーシスに先行したミクログリアの細胞数や形態の変化ではないため、神経細胞死に伴う反応性の変化か神経細胞死に直接影響する変化であるのか因果関係は不明であった。

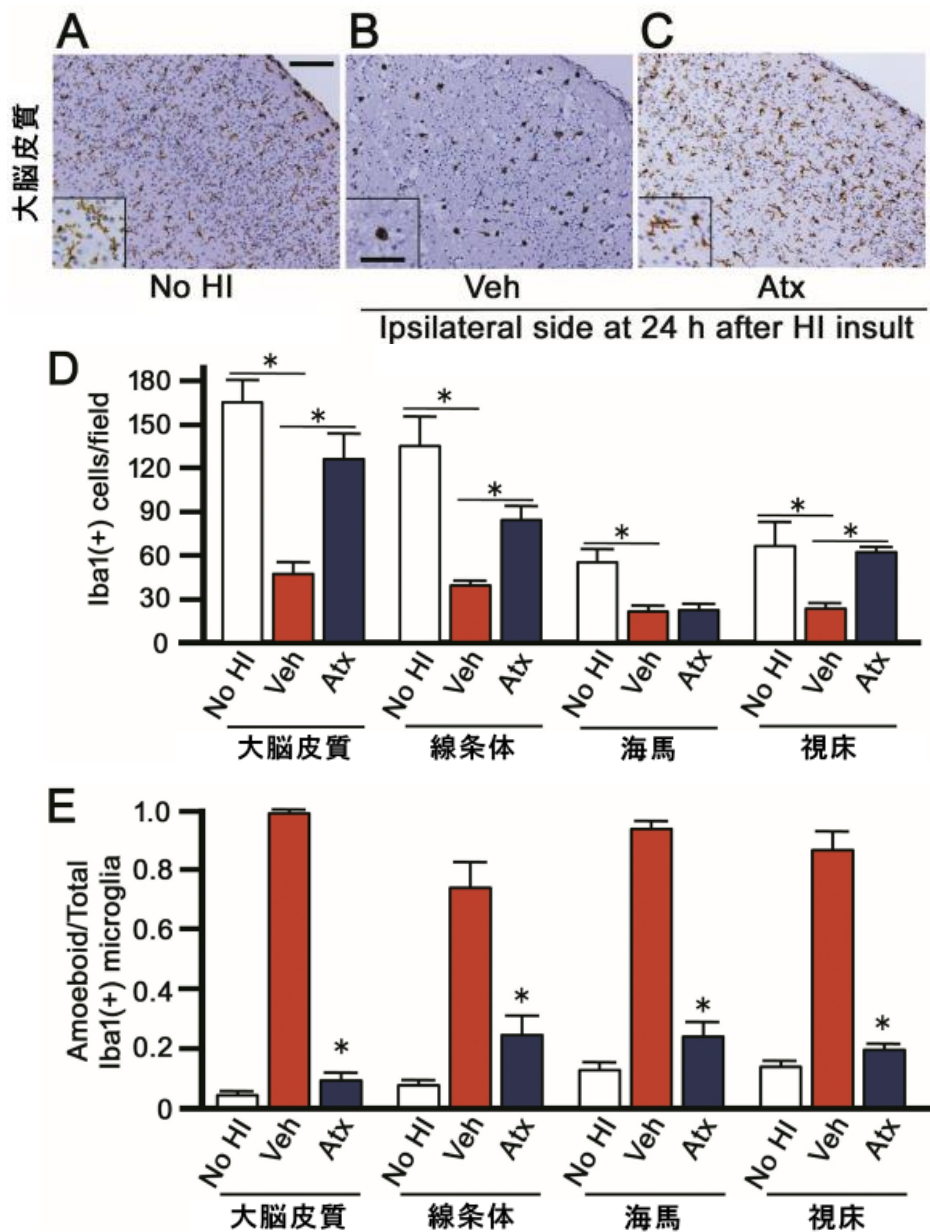


図 12 ミクログリアに対する低酸素虚血とアトモキセチンの影響

P7 で左頸動脈切断、8%酸素 2 時間負荷し Atx あるいは生食を腹腔内へ単回投与した。24 時間後(P8)に Iba1 染色(茶色)で評価した。(A) No HI 群では ramified 型が分布。(B) Vehicle 群では amoeboid 型に形態変化した。(C) Atx 群では ramified 型が分布。Scale bar: 100 μ m, inlet 50 μ m。(D) Vehicle 群 (n=5)では No HI 群(n=3) に比較して Iba1 陽性細胞数が有意に減少した(平均値 \pm 標準誤差, * $P < 0.05$)。Atx 群(n=5)では Vehicle 群(n=5)より Iba1 陽性細胞数が有意に増加した(平均値 \pm 標準誤差, * $P < 0.05$)。(E) Atx 群(n=5)では Vehicle 群(n=5)より ramified 型 Iba1 陽性細胞の割合が有意に高かった(平均値 \pm 標準誤差, * $P < 0.05$)。Atx; アトモキセチン、Veh; Vehicle。

2-5 低酸素下の神経細胞がミクログリアの IL-1 β 産生に影響する

In vivo 実験からは NE のミクログリアへの直接的な作用を明らかにできなかったため、初代培養細胞を用いて検討した(図 13A,B)。ミクログリア由来の IL-1 β が正期産児HIEにおいて神経細胞死を引き起こすことが報告されていることから [32]、IL-1 β をミクログリアの炎症性応答の指標とした。低酸素(<1.0% O₂ 4 時間)を負荷し、低酸素を開始して 6 時間後にミクログリア IL-1 β の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で測定した(図 5B)。最初に、<1.0% O₂ 4 時間の低酸素条件がミクログリアに低酸素刺激になっているかどうか HIF-1 α の発現を免疫細胞化学染色で調べた。HIF-1 α は酸素濃度依存的な分解を受けるため、低酸素下では蓄積し核へ移行して転写因子として機能する [53]。低酸素(<1.0% O₂ 4 時間)の終了直後に HIF-1 α の免疫細胞化学を行った(図 5B)。低酸素群 (n=3)では HIF-1 α の核への集積が観察された(図 13C)。同条件の低酸素は神経細胞(n=4)の上清 LDH の上昇をきたした(図 5B,13D)。低酸素に対するミクログリア IL-1 β mRNA の発現は、ミクログリア単培養(n=4)では抑制され、神経細胞との共培養(n=4)で増加を認めた(図 5B,13E)。この結果から、低酸素環境自体はミクログリアに炎症性応答を惹起せず、低酸素環境下の神経細胞から放出された液性因子がミクログリアの炎症性応答の起点となっている可能性が示唆された。

次に、ミクログリアの炎症性応答に対して NE が直接影響を及ぼすかどうか検討した。神経細胞との共培養への NE 添加では、NE の神経細胞への保護作用 [18] が影響する可能性がありミクログリアへの直接的な作用を調べることができないため、LPS を使用して NE のミクログリアの炎症性応答への作用を検討した。LPS ならびに NE をミクログリア単培養に投与して 24 時間後に IL-1 β 蛋白量を ELISA にて測定して比較した(図 5C)。1 μ g/ml LPS 群(n=3)では、コントロール群(n=3)に比較してミクログリアの IL-1 β 蛋白産生は増加した(図 13F)。1 μ g/ml LPS に 10 μ M NE を同時刺激(n=3)すると、LPS 群(n=3)に比較して IL-1 β 蛋白の産生が減少した(図 13F)。この結果から、NE がミクログリアの IL-1 β 産生を直接抑制する作用を持つことが示唆された。

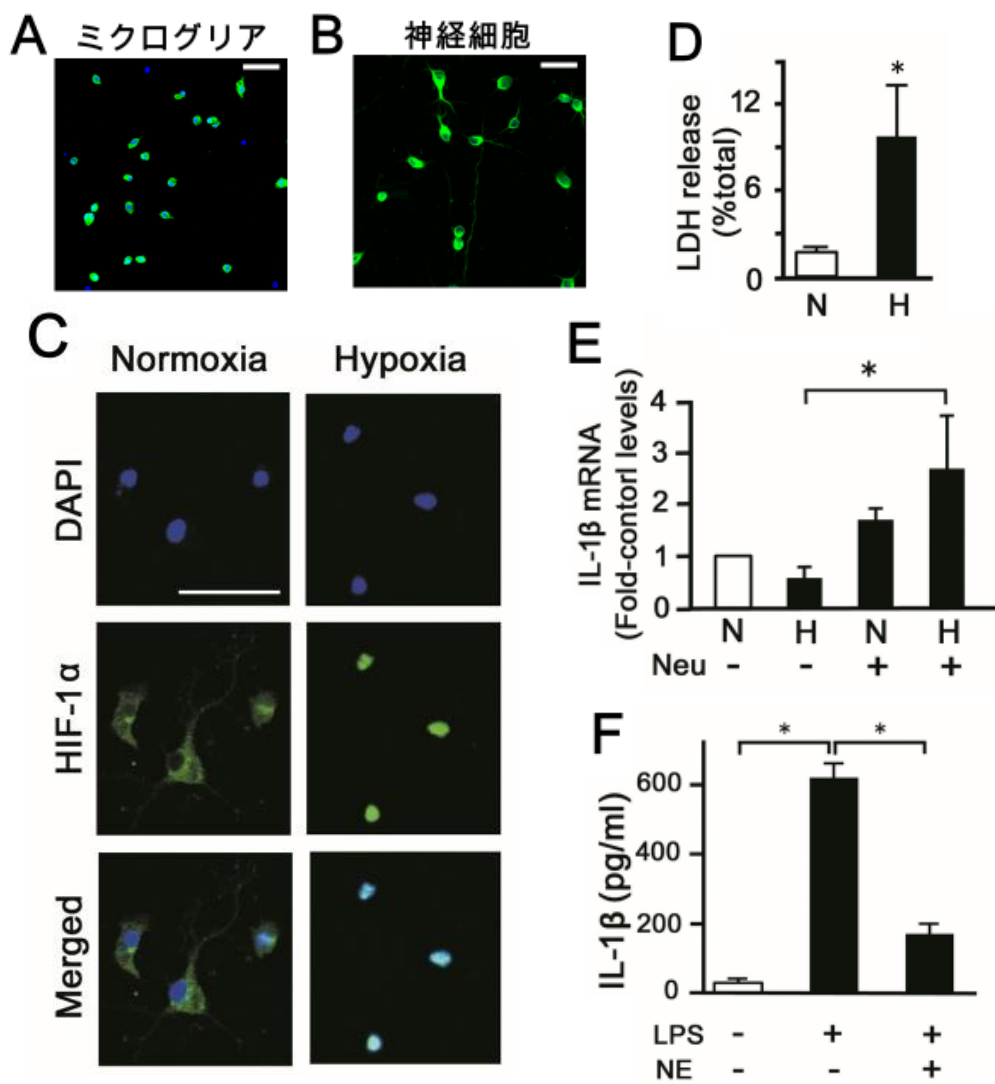


図 13 ミクログリアの IL-1 β 産生に対する低酸素下の神経細胞の影響

(A) 培養ミクログリア(緑色)。 (B) 培養神経細胞(緑色)。 (C) 低酸素(<1.0% O₂ 4 時間)直後に HIF-1 α の免疫細胞化学を行った。 低酸素により HIF-1 α がミクログリアの細胞質から核へ集積した(n=3)。 (D) 低酸素開始 6 時間後、神経細胞の上清中 LDH は常酸素群と比較して有意に上昇した(n=4/群, 平均値±標準誤差, **P* < 0.05)。 (E) ミクログリア単培養では低酸素により IL-1 β mRNA の発現は抑制され、共培養で有意な発現上昇を認めた(n=4/群, 平均値±標準誤差, **P* < 0.05)。 (F) 1 μ g/ml LPS 群では、コントロール群と比較してミクログリアの IL-1 β 蛋白は有意に増加した(n=3/群, 平均値±標準誤差, **P* < 0.05)。 10 μ M NE と 1 μ g/ml LPS 同時刺激群では、LPS 群と比較して IL-1 β 蛋白産生が有意に低下した(n=3/群, 平均値±標準誤差, **P* < 0.05)。 Scale bars: (A)、(B)、(C) 50 μ m。 DAPI(青色)。 N; 常酸素、H; 低酸素、Neu; 神経細胞。

2-6 NEは低酸素下におけるミクログリアの抗炎症性応答を増強する

正期産児 HIE において、M1 極性ミクログリアが病態の進展に関与し M1/M2 比を低下させることが病態の進行抑制に働くと想定されていることから [33,54,55]、低酸素下のミクログリア M1/M2 極性比に対する NE の影響を調べた。iNOS と Arg1 は L-アルギニンを共通の基質として競合的に作用することから、M1 マーカーとして iNOS、M2 マーカーとして Arg1 を用いてミクログリアの iNOS/Arg1 mRNA 発現比をリアルタイム PCR 法で調べた。ミクログリア単培養に低酸素を開始して 24 時間後に mRNA を回収した(図 5D)。低酸素群(n=6)では常酸素群(n=6)と比較して iNOS/Arg1 mRNA の発現比が低下した(図 14)。低酸素に 10 μ M NE を添加すると、iNOS/Arg1 mRNA の発現比の低下が亢進した(図 14)。これらの結果から、低酸素に対してミクログリアは M1/M2 比を低下させ、NE は低酸素下のミクログリアの M2 応答を助長することが示唆された。

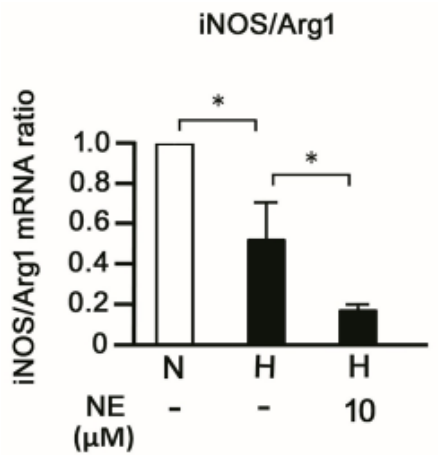


図 14 NE の低酸素下におけるミクログリア iNOS/Arg1 比の低下の増強
 単培養ミクログリアの iNOS/Arg1 mRNA 発現比をリアルタイム PCR 法で調べた。低酸素群では常酸素群と比較して iNOS/Arg1 mRNA の発現比は有意に低下した(n=6/群, 平均値±標準誤差, * $P < 0.05$)。低酸素に NE を加えると iNOS/Arg1 mRNA 発現比の低下が助長した(n=6/群, 平均値±標準誤差, * $P < 0.05$)。N; 常酸素、H; 低酸素。

2-7 ミクログリアは低酸素虚血に対して保護的に作用する

ミクログリア単培養の実験からは低酸素に対するミクログリアの炎症性応答を確認できなかったため、低酸素に対するミクログリアの機能をクロドロネートを用いて *in vivo* で再検討した。P4 ラットの右脳室に Clod-lip ならびに PBS-lip(コントロール) を 3 μ l/個体ずつ投与し、48 時間後(P6)に Iba1 染色を用いてミクログリア数を組織学的に比較した(図 6)。Clod-lip 群(n=27)では PBS-lip 群(n=9)に比較して左側白質内 Iba1 陽性細胞数の低下を認めた(図 15)。従って、脳白質という場を揃えるために P6 ラットを用いた脳白質傷害モデルでミクログリアの役割を検討した。

次に、ミクログリアの除去が脳白質の成熟化に影響を及ぼすかどうか組織学的に評価した。脳白質は神経細胞の跳躍伝導と軸索保護に関与する髄鞘が形成されて発達する。髄鞘を構成する主要な蛋白に MBP がある [49]。MBP 発現は白質の成熟度を反映し、白質が傷害を受けると MBP が脱落する [49]。従って、白質傷害の指標として MBP を用いた。脳室内投与 7 日後(P11)に MBP 染色で組織学的に検討した(図 6)。両群(n=8/群)とも、MBP の発現に左右差を認めなかった(図 16)。ミクログリアの一部除去では MBP 発現に影響を与えなかった。

右側脳室内注射(P4)した 48 時間後の P6 ラットに HI(左頸動脈切断、6%酸素

30 分間)を加え、5 日後(P11)に MBP 染色にて白質の傷害程度を図 7 に従い比較した。ミクログリアが減少している Clod-lip 群(n=10)では、PBS-lip 群(n=10)に比較して HI 側の MBP 染色の脱落が高度であった(図 17)。この結果から、ミクログリアは低酸素虚血に対して白質を保護する作用を持つことが示唆された。

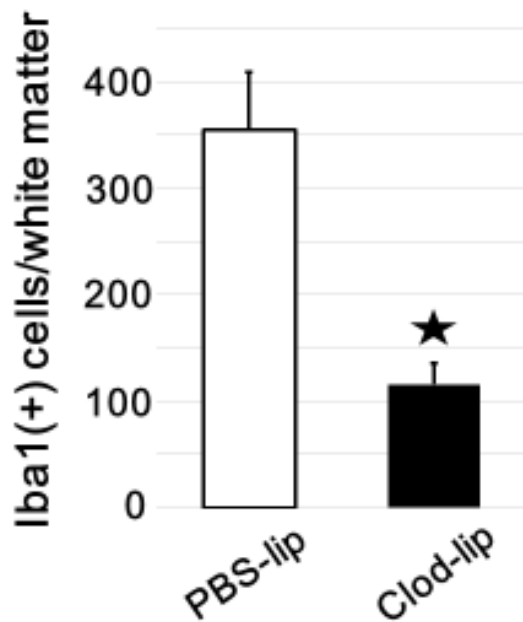
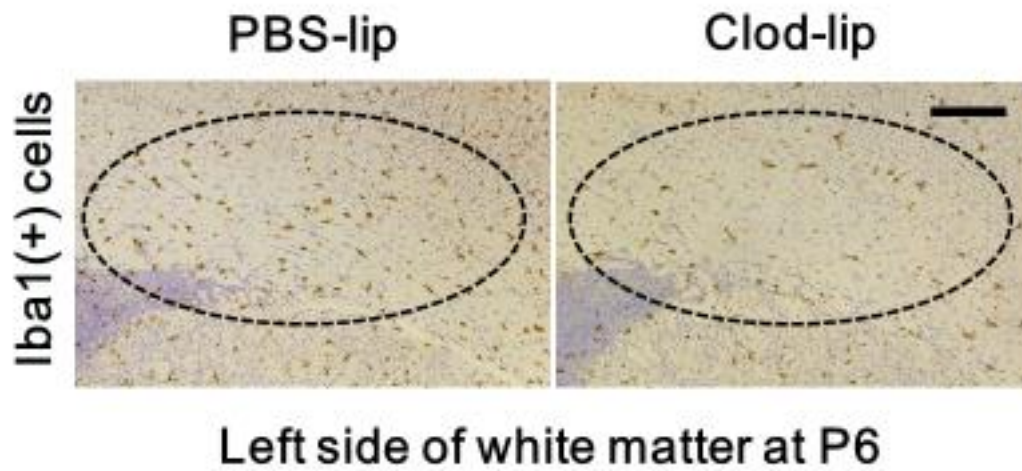


図 15 クロドロネートによるミクログリアの除去

P6 ラット左側白質の Iba1 染色。 P4 ラット右脳室内に Clod-lip あるいは PBS-lip を 3 μ l/個体ずつ投与した。 2 日後(P6)に Iba1 染色(茶色)で評価した。 Clod-lip 群(n=27)では PBS-lip 群(n=9) に比較して左側白質内の Iba1 陽性細胞数が有意に低下した(平均値 \pm 標準誤差, * P <0.05)。 Scale bar: 200 μ m。

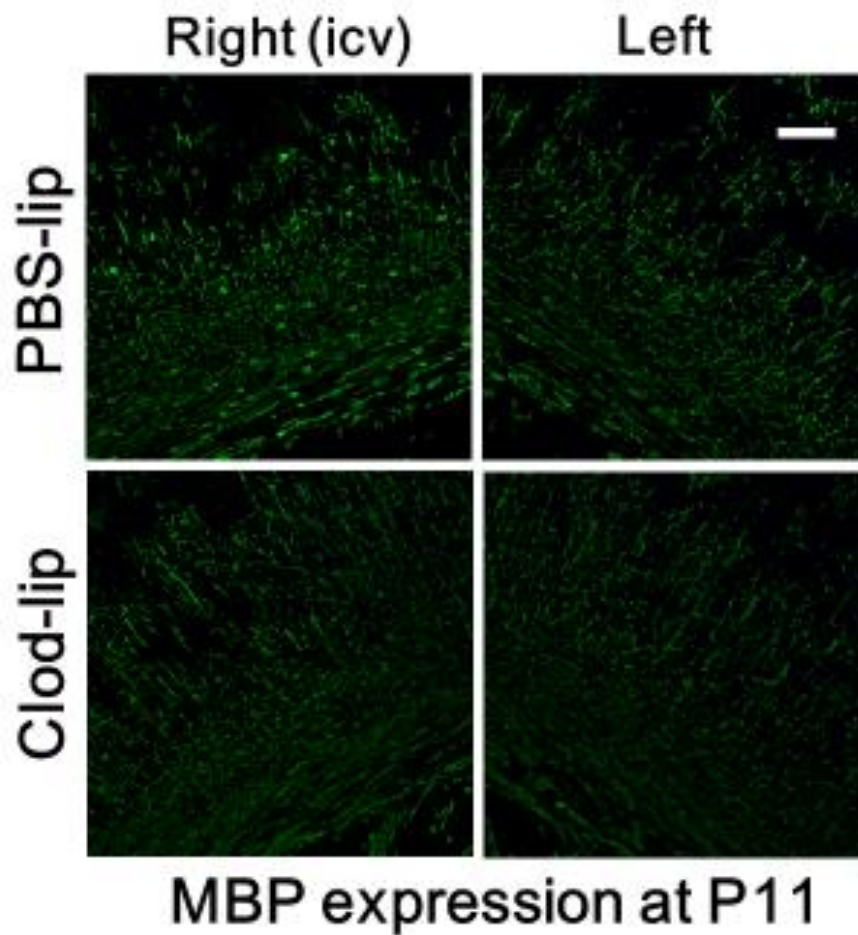


図 16 ミクログリア部分除去による MBP 発現への影響

P11 ラット両側白質の MBP 染色。 P4 ラット右脳室内に Clod-lip あるいは PBS-lip を $3\mu\text{l}$ /個体ずつ投与した。7 日後(P11)に MBP 染色(緑色)で評価した。 Clod-lip 群(n=8)、PBS-lip 群(n=8)ともに MBP 発現に左右差を認めなかった。 DAPI(青)。 Scale bar: $100\ \mu\text{m}$ 。 icv: 脳室内投与。

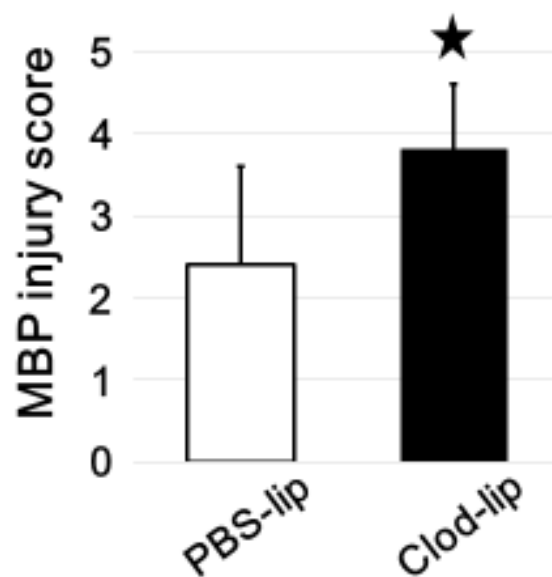
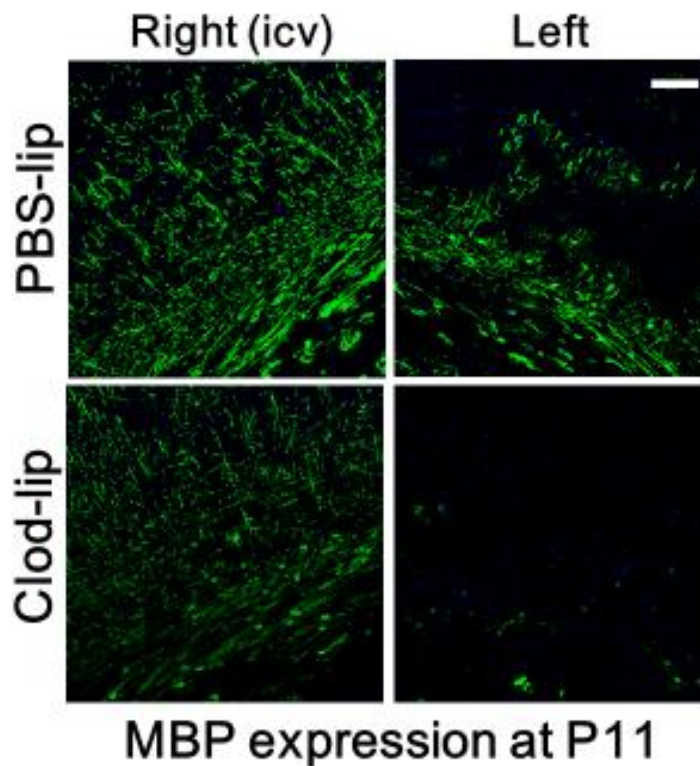


図 17 低酸素虚血に対するミクログリアの役割

P4 で右脳室内に Clod-lip あるいは PBS-lip を投与し、P6 で左頸動脈切断、6% 酸素 30 分間負荷して P11 に MBP 染色(緑色)で評価した。 Clod-lip 群(n=10) では PBS-lip 群(n=10) に比較して MBP 染色が有意に脱落した(平均値±標準誤差, * $P < 0.05$)。 DAPI(青色)。 Scale bar: 100 μ m。 icv: 脳室内投与。

3. 考察

3-1 HIE モデルラットにおけるアトモキセチンを用いた NE の脳保護効果

神経伝達物質は神経細胞間の情報伝達以外にもグリア細胞に作用して、生理的な環境下だけでなく病態下においても多様な機能を有している [16,56]。

本実験では、ラットの脳内 NE 濃度を上昇・維持させることが報告 [21] されている選択的 NE 再取り込み阻害剤アトモキセチンを使用して、神経伝達物質 NE の伝達経路を亢進することで脳組織傷害を軽減できるかどうか、脳発達がヒト正期産児に相当する日齢 7 日目の新生児ラットで検証した。Atx 投与により P14 の時点で低酸素性虚血性脳傷害の軽減を組織学的に認めた。急性期である P8 の時点で TUNEL 染色が陰性領域にリン酸化 CREB 染色の発現亢進を認めたことから、NE が抗アポトーシス作用を有して脳組織傷害を軽減した可能性が考えられた。また、脳内因性 NE が発達期脳において低酸素虚血に対して脳保護機構として応答している可能性が示唆された。一方、Atx は脳組織以外にも心血管系に作用して心拍数増加ならびに血圧上昇作用があることがヒトで確認されている [57]。本実験では新生児ラットの心拍数や血圧を測定していないため、全身の循環の変化により脳血流が維持され脳組織傷害が軽減した可能性がある。ただし、全身の循環の影響を受けない私のミクログリアを用いた *in vitro* 実験結果や脳スライス培養 [58] や神経細胞単培養 [18] を用いた

報告から、NE が脳組織に対して直接的な保護効果を少なからず有していると考えられた。Atx は選択的に NE トランスポーターに結合するが、脳の部位によっては NE トランスポーターからドパミンが非特異的に取り込まれるため、ドパミンの濃度も上昇することが報告されている [21]。また NE はグルタミン酸の放出に影響を与えることが観察されており [59,60]、NE 以外の神経伝達物質の動態が脳保護に寄与している可能性も考えられた。本実験で使用した Atx の投与量は外傷性脳障害モデルラットの認知機能の改善効果を示した過去の報告を参考にしたが [61]、Atx が低酸素虚血に対して脳保護的に作用することを初めて示した。

3-2 NE のミクログリア応答性への作用を介した脳保護効果

ミクログリアは低酸素虚血侵襲に応答して正期産児 HIE の病態形成に関与することから治療標的になりうるため、その役割を明らかにすることは重要である。しかしながら、ミクログリアの活動性が非常に盛んな発達期の脳において、ミクログリアが HIE にどのように関与しているのか全容解明されていない [37,38]。これまでの基礎研究から、低酸素環境に対してミクログリアが反応、集積して IL-1 β 産生や M1/M2 比上昇などの炎症性応答を示し、脳傷害を促進すると考えられている [31-33,54,55]。従って、NE がミクログリアの炎症性応答を

直接抑制することで脳保護に寄与しているかどうか検討した。

3-2-1 HIE へのミクログリアの関与

最初に、HIE へのミクログリアの関与について検討した。神経細胞傷害との関係についてミクログリアの数に着目した報告がある [62-66]。例えば、ミクログリアの増加により神経細胞死が増悪し、薬剤にてミクログリアの集積を抑制すると神経細胞死が改善したと報告されている [63,64]。一方、ミクログリアは神経細胞よりも早期あるいは同時に死滅するとの報告もある [65,66]。本実験では、神経細胞傷害が高度な Vehicle 群で定常状態よりもミクログリアの数が低下して、クロドロネートでミクログリアをあらかじめ一部除去した状態では低酸素虚血による白質傷害が悪化した。ミクログリアが HIE の全ての過程において傷害的に作用するならば少なくともクロドロネート処置で脳白質傷害が軽快すると考えられ、*in vivo* 実験結果からはミクログリアは HIE の早期には保護的に作用している可能性が推測された。ミクログリアの形態に着目した報告もある [67,68]。例えば、ramified 型ミクログリアはグルタミン酸興奮毒性に対して神経保護効果を示すことが観察されている [67]。一方、amoeboid 型ミクログリアに関しては炎症性サイトカイン産生を介した傷害作用があること [68] や細胞死にいたった神経細胞へ遊走・集積して貪食するための形態変化を表している [29] との報告がある。本実験ではミクログリアの形態からそ

の機能について推察することはできなかったが、No HI 群と Vehicle 群でミクログリアの数と形態に差が生じていたことより、これまでの報告と一致してミクログリアの HIE への関与が推測され、ミクログリアの機能をより明らかにするために培養細胞を用いて検討した。ミクログリア単培養では低酸素により IL-1 β mRNA 発現が抑制され、iNOS/Arg1 mRNA 比が常酸素状態よりも低下した。これは、*in vivo* でのミクログリアの保護的な一面を支持する結果であった。一方、より *vivo* を模倣した低酸素下での神経細胞との共培養では、ミクログリア IL-1 β mRNA が産生され炎症性応答を認めた。これは、神経細胞から放出された High mobility group box-1 やヒートショック蛋白などの DAMPs がミクログリアの TLRs を刺激して炎症性応答を誘導した可能性が考えられた。私の単培養と共培養の実験結果から、低酸素状況が進行して神経細胞が虚血壊死に至ると、神経細胞から放出された DAMPs などの液性因子がミクログリアの炎症性応答を惹起して脳組織傷害を拡大させていく病態が示唆された。ミクログリアは HIE の病態全過程を通して一つの性質ではなく、病態の進展状況に応じて性質が変化していく可能性が考えられた。

3-2-2 NE のミクログリアの応答性に対する作用

In vivo 実験において Atx 群と Vehicle 群でミクログリアの数と形態に差を認めたこと、ミクログリアは神経伝達物質 NE の受容体を有していること [16]

より、NEがミクログリアへ直接作用している可能性が推測された。従って、ミクログリアIL-1 β 産生とM1/M2極性に対してNEが影響しているかどうか検討した。LPSはDAMPs同様にTLRsのアゴニストであり、神経細胞との共培養を行わずにミクログリアのIL-1 β 産生を促すことができる。NEは培養神経細胞に直接作用して保護的に働く[18]。従って、NEがミクログリアに直接作用するかどうか神経細胞との共培養ではなく、DAMPsの代わりとしてLPSを用いてミクログリア単培養で検証した。NEはミクログリアIL-1 β 蛋白産生量を直接抑制し、これは過去の報告と一致するものであった[39]。しかしながら、HIEの病態はIL-1 β を含めた複数の炎症性サイトカインや活性酸素種・窒素種が複合的に作用して形成されるため、IL-1 β 以外の傷害因子へのNEの影響について更なる検討が必要である。近年、M1/M2極性を標的とした治療法の開発が検討されている。M1/M2比の意義については疾患ごとに議論されているが[69]、HIEにおいてはM1優位な状態が病態進展につながり、M1/M2の存在比を低下させることが重症化の抑制に働くと想定されている[33,54,55]。本実験でiNOSとArg1を用いたミクログリアのM1/M2比がNEにより一層低下したことは脳傷害軽減に寄与する作用と考えられた。ただし、M1/M2比が低下したミクログリアが神経細胞を保護する機序の同定までには至らず、今後解明していく必要がある。In vitro実験結果より、NEは外部刺激に対するミ

クログリアの応答性に作用して脳保護に寄与する可能性が示唆された。

In vivo と *in vitro* の結果から、(1) HIE においてミクログリアは保護的に作用する可能性と、傷害された神経細胞により炎症性応答を惹起して脳傷害を増悪させる可能性があること、(2) 神経伝達物質 NE は CREB 経路を介した抗アポトーシス作用と低酸素虚血侵襲に対してミクログリアの保護性質の増強あるいは炎症性応答の鎮静化を介して脳傷害の軽減に寄与している可能性が示唆された(図 18)。

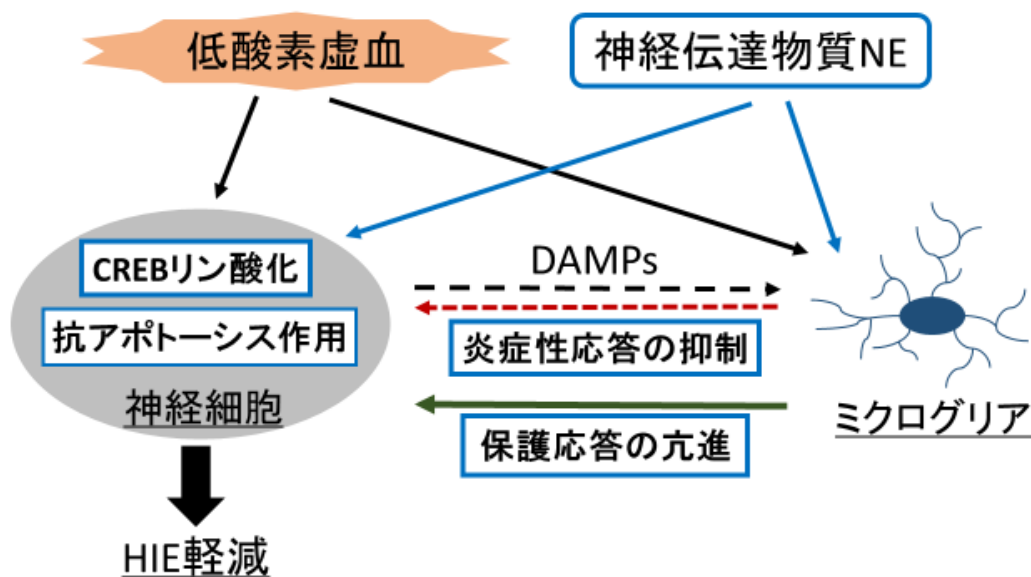


図 18 新生児低酸素性虚血性脳症におけるミクログリアの動態と NE の作用
低酸素虚血に対してミクログリアは M1/M2 比を低下させ神経細胞保護的に作用する。神経細胞が傷害されると、放出された DAMPs がミクログリアを刺激して炎症性応答が惹起され脳傷害が悪化する。神経伝達物質 NE は CREB を介した抗アポトーシス作用で神経細胞の虚血耐性を高めるだけでなく、ミクログリアに作用して脳傷害を軽減する。

今後は臨床への応用を考えて、アトモキセチンの新生児脳血液関門の通過性や脳内 NE 濃度の推移を測定して NE の therapeutic window を明らかにしていく予定である。NE の抗アポトーシス作用とミクログリアの炎症性応答の抑制作用というメカニズムから、早期投与でのみ治療効果を発揮すると考えられる。正期産児 HIE の臨床において、神経学的予後を改善できるかどうかは非常に重要な問題である。アトモキセチンが外傷性脳障害モデルラットの認知機能を改善することが示されているが [61]、本実験では組織学的な検討のみであり、2 週間以上の長期飼育したラットを用いてロータ・ロッド試験や T 字迷路試験による運動機能・認知機能の評価が今後必要になってくる。

結論として、アトモキセチンは NE-CREB 経路を介した抗アポトーシス作用により神経細胞死を軽減した。さらに、NE はミクログリアの M1/M2 極性比の低下あるいは IL-1 β 産生の抑制を介して脳組織傷害の軽減に寄与している可能性が推測された。本実験で明らかになった HIE に対する神経伝達物質 NE の内在性保護機構としての機能とミクログリアの役割は今後の正期産児 HIE のメカニズム解明と薬物治療の開発につながる有用な知見であると考えられる。

謝辞

本実験を行うにあたり、ご指導をいただきました東京大学医学部産婦人科 藤井知行教授、埼玉医科大学病院産婦人科 亀井良政教授に深甚なる謝意を表します。産婦人科学教室の多くの先生方、実験助手の皆様方には、本実験を遂行するにあたりご支援いただきましたことを心より御礼申し上げます。

参考文献

- 1 Vannucci RC, Perlman JM: Interventions for perinatal hypoxic—
ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 100:1004-14;1997.
- 2 Shatrov JG, Birch SC, Lam LT, Quinlivan JA, McIntyre S, Mendz GL:
Chorioamnionitis and cerebral palsy: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*
116:387-92;2010.
- 3 Volpe JJ, Kinney HC, Jensen FE, Rosenberg PA: The developing
oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature
infant. *Int J Dev Neurosci* 29:423-40;2011.
- 4 Ghei SK, Zan E, Nathan JE, Choudhri A, Tekes A, Huisman TA,
Izbudak I: MR imaging of hypoxic-ischemic injury in term neonates:
pearls and pitfalls. *Radiographics* 34:1047-61;2014.
- 5 Sugiura T, Goto T, Ueda H, Ito K, Kakita H, Nagasaki R, Mizuno K,
Suzuki S, Kato I, Togari H: Periventricular leukomalacia is decreasing
in Japan. *Pediatr Neurol* 47:35-9;2012.

- 6 Martinez-Biarge M, Diez-Sebastian J, Wusthoff CJ, Mercuri E, Cowan FM: Antepartum and intrapartum factors preceding neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 132:e952-9;2013.
- 7 Palsdottir K, Dagbjartsson A, Thorkelsson T, Hardardottir H: Birth asphyxia and hypoxic ischemic encephalopathy, incidence and obstetric risk factors. *Laeknabladid* 93:595-601;2007.
- 8 Edwards AD, Brocklehurst P, Gunn AJ, Halliday H, Juszczak E, Levene M, Strohm B, Thoresen M, Whitelaw A, Azzopardi D: Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data. *BMJ* 340:c363;2010.
- 9 Davidson JO, Wassink G, van den Heuij LG, Bennet L, Gunn AJ: Therapeutic Hypothermia for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy - Where to from Here? *Front Neurol* 6:198;2015.
- 10 Gregory Z Tau, Bradley S Peterson: Normal Development of Brain Circuits. *Neuropsychopharmacology* 35:147–168;2010.

- 11 Cerio FG, Lara-Celador I, Alvarez A, Hilario E: Neuroprotective therapies after perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Sci* 3:191-214;2013.
- 12 Tang XJ, Xing F: Calcium-permeable AMPA receptors in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Biomed Rep* 1:828-832;2013.
- 13 Rangarajan V, Juul SE: Erythropoietin: emerging role of erythropoietin in neonatal neuroprotection. *Pediatr Neurol* 51:481-8;2014.
- 14 Taniguchi H, Mohri I, Okabe-Arahoru H, Aritake K, Wada K, Kanekiyo T, Narumiya S, Nakayama M, Ozono K, Urade Y, Taniike M: Prostaglandin D2 protects neonatal mouse brain from hypoxic ischemic injury. *J Neurosci* 27:4303-12;2007.
- 15 Blenow M, Zeman J, Dahlin I, Lagercrantz H: Monoamine neurotransmitters and metabolites in the cerebrospinal fluid following perinatal asphyxia. *Biol Neonate* 67:407-13;1995.
- 16 O'Donnell J, Zeppenfeld D, McConnell E, Pena S, Nederqaard M: Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem Res*

37:2496-512;2012.

17 Blomqvist P, Lindvall O, Wieloch T: Lesions of the locus coeruleus system aggravate ischemic damage in the rat brain. *Neurosci Lett* 58:353-8;1985.

18 Troadec JD, Marien M, Darios F, Hartmann A, Ruberg M, Colpaert F, Michel PP: Noradrenaline provides long-term protection to dopaminergic neurons by reducing oxidative stress. *J Neurochem* 79:200-10;2001.

19 Tanaka K: Alteration of second messengers during acute cerebral ischemia - adenylate cyclase, cyclic AMP-dependent protein kinase, and cyclic AMP response element binding protein. *Prog Neurobiol* 65:173-207;2001.

20 Loizou LA: Uptake of monoamines into central neurones and the blood-brain barrier in the infant rat. *Br J Pharmacol* 40:800-13;1970.

21 Bymaster FP, Katner JS, Nelson DL, Hemrick-Luecke SK, Threlkeld PG, Heiligenstein JH, Morin SM, Gehlert DR, Perry KW: Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention

- deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology* 27:699-711;2002.
- 22 Esiri MM, al Izzi MS, Reading MC: Macrophages, microglial cells, and HLA-DR antigens in fetal and infant brain. *J Clin Pathol* 44:102-6;1991.
- 23 Del Bigio MR, Becker LE. Microglial aggregation in the dentate gyrus: a marker of mild hypoxic-ischaemic brain insult in human infants. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20:144-51;1994.
- 24 Bhalala US, Koehler RC, Kannan S: Neuroinflammation and neuroimmune dysregulation after acute hypoxic-ischemic injury of developing brain. *Front Pediatr* 2:144;2015.
- 25 Zusso M, Methot L, Lo R, Greenhalgh AD, David S, Stifani S: Regulation of postnatal forebrain amoeboid microglial cell proliferation and development by the transcription factor Runx1. *J Neurosci* 32:11285-98;2012.
- 26 Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross

- CT: Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333:1456-8;2011.
- 27 Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M: Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41:535-47;2004.
- 28 Rakic S, Zecevic N: Programmed cell death in the developing human telencephalon. *Eur J Neurosci* 12:2721-34;2000.
- 29 Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A: Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461-553;2011.
- 30 Eggen BJ, Raj D, Hanisch UK, Boddeke HW: Microglial phenotype and adaptation. *J Neuroimmune Pharmacol* 8:807-23;2013.
- 31 Park SY, Lee H, Hur J, Kim SY, Kim H, Park JH, Cha S, Kang SS, Cho GJ, Choi WS, Suk K: Hypoxia induces nitric oxide production in mouse microglia via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Brain Res Mol Brain Res* 107:9-16;2002.
- 32 Kaur C, Sivakumar V, Zou Z, Ling EA: Microglia-derived proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and

- interleukin-1beta induce Purkinje neuronal apoptosis via their receptors in hypoxic neonatal rat brain. *Brain Struct Funct* 219:151-70;2014.
- 33 Hu X, Leak RK, Shi Y, Suenaga J, Gao Y, Zheng P, Chen J: Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair. *Nat Rev Neurol* 11:56-64;2015.
- 34 Shaked I, Tchoresh D, Gersner R, Meiri G, Mordechai S, Xiao X, Hart RP, Schwartz M: Protective autoimmunity: interferon-gamma enables microglia to remove glutamate without evoking inflammatory mediators. *J Neurochem* 92:997-1009;2005.
- 35 Lehrmann E, Kiefer R, Christensen T, Toyka KV, Zimmer J, Diemer NH, Hartung HP, Finsen B: Microglia and macrophages are major sources of locally produced transforming growth factor-beta1 after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Glia* 24:437-48;1998.
- 36 Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, Yamashita T: Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci* 16:543-51;2013.
- 37 Biber K, Owens T, Boddeke E: What is microglia neurotoxicity (Not)?

Glia 62:841-54;2014.

38 Jeong HK, Ji K, Min K, Joe EH: Brain inflammation and microglia: facts and misconceptions. *Exp Neurobiol* 22:59-67;2013.

39 Dello Russo C, Boullerne AI, Gavriyuk V, Feinstein DL: Inhibition of microglial inflammatory responses by norepinephrine: effects on nitric oxide and interleukin-1beta production. *J Neuroinflammation* 1:9;2004.

40 Stefka Gyoneva, Stephen F. Traynelis: Norepinephrine Modulates the Motility of Resting and Activated Microglia via Different Adrenergic Receptors. *J Biol Chem* 288:15291–15302;2013.

41 Johannes CM Schlachetzki, Bernd L Fiebich, Elisabeth Haake, Antonio CP de Oliveira, Eduardo Candelario-Jalil, Michael T Heneka, Michael Hüll: Norepinephrine enhances the LPS-induced expression of COX-2 and secretion of PGE₂ in primary rat microglia. *J Neuroinflammation* 7:2;2010.

42 Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB: The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9:131-41;1981.

- 43 DeBow SB, Clark DL, MacLellan CL, Colbourne F: Incomplete assessment of experimental cytoprotectants in rodent ischemia studies. *Can J Neurol Sci* 30:368-74;2003.
- 44 Thoresen M, Bågenholm R, Løberg EM, Apricena F, Kjellmer I: Posthypoxic cooling of neonatal rats provides protection against brain injury. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 74:F3-9;1996.
- 45 Soltys Z, Orzyłowska-Sliwiska O, Zaremba M, Orłowski D, Piechota M, Fiedorowicz A, Janeczko K, Oderfeld-Nowak B: Quantitative morphological study of microglial cells in the ischemic rat brain using principal component analysis. *J Neurosci Methods* 146:50-60;2005.
- 46 Giulian D, Baker TJ: Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci* 6:2163-78;1986.
- 47 Brewer GJ: Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res* 42:674-83;1995.
- 48 Hiromi Kumamaru, Hirokazu Saiwai, Kazu Kobayakawa, Kensuke Kubota, Nico van Rooijen, Kazuhide Inoue, Yukihide Iwamoto, Seiji

- Okada: Liposomal clodronate selectively eliminates microglia from primary astrocyte cultures. *J Neuroinflammation* 9:116;2012.
- 49 Ichinose M, Kamei Y, Iriyama T, Imada S, Seyama T, Toshimitsu M, Asou H, Yamamoto M, Fujii T: Hypothermia attenuates apoptosis and protects contact between myelin basic protein-expressing oligodendroglial-lineage cells and neurons against hypoxia-ischemia. *J Neurosci Res* 92:1270-85;2014.
- 50 Lin WY, Chang YC, Lee HT, Huang CC: CREB activation in the rapid, intermediate, and delayed ischemic preconditioning against hypoxic-ischemia in neonatal rat. *J Neurochem* 108:847-59;2009.
- 51 Walton M, Sirimanne E, Williams C, Gluckman P, Dragunow M: The role of the cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) in hypoxic-ischemic brain damage and repair. *Brain Res Mol Brain Res* 43:21-9;1996.
- 52 Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* 57:1-9;1998.
- 53 Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole

- DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ: *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107:43-54;2001.
- 54 Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, Gao Y, Chen J: Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* 43:3063-70;2012.
- 55 Xia CY, Zhang S, Gao Y, Wang ZZ, Chen NH: Selective modulation of microglia polarization to M2 phenotype for stroke treatment. *Int Immunopharmacol* 25:377-82;2015.
- 56 Herlenius E, Lagercrantz H: Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp Neurol* 190:S8-21;2004.
- 57 Michael R. Kohn, Tracey W. Tsang, Simon D. Clarke: Efficacy and Safety of Atomoxetine in the Treatment of Children and Adolescents with Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Clin Med Insights Pediatr* 6:95–162;2012.

- 58 Markus T, Hansson SR, Cronberg T, Cilio C, Wieloch T, Ley D:
β-Adrenoceptor activation depresses brain inflammation and is
neuroprotective in lipopolysaccharide-induced sensitization to
oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slices. *J*
Neuroinflammation 7:94;2010.
- 59 Egli RE, Kash TL, Choo K, Savchenko V, Matthews RT, Blakely RD,
Winder DG: Norepinephrine modulates glutamatergic transmission in
the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuropsychopharmacology*
30:657-68;2005.
- 60 Travagli RA, Williams JT: Endogenous monoamines inhibit glutamate
transmission in the spinal trigeminal nucleus of the guinea-pig. *J*
Physiol 491:177-85;1996.
- 61 Reid WM, Hamm RJ: Post-injury atomoxetine treatment improves
cognition following experimental traumatic brain injury. *J*
Neurotrauma 25:248-56;2008.
- 62 Faustino JV, Wang X, Johnson CE, Klibanov A, Derugin N, Wendland
MF, Vexler ZS: Microglial cells contribute to endogenous brain

- defenses after acute neonatal focal stroke. *J Neurosci* 31:12992-3001;2011.
- 63 Furukawa S, Sameshima H, Yang L, Ikenoue T: Activation of acetylcholine receptors and microglia in hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Brain Dev* 35:607-13;2013.
- 64 Gelosa P, Lecca D, Fumagalli M, Wypych D, Pignieri A, Cimino M, Verderio C, Enerbäck M, Nikookhesal E, Tremoli E, Abbracchio MP, Sironi L: Microglia is a key player in the reduction of stroke damage promoted by the new antithrombotic agent ticagrelor. *J Cereb Blood Flow Metab* 34:979-88;2014.
- 65 Min KJ, Jeong HK, Kim B, Hwang DH, Shin HY, Nguyen AT, Kim JH, Jou I, Kim BG, Joe EH: Spatial and temporal correlation in progressive degeneration of neurons and astrocytes in contusion-induced spinal cord injury. *J Neuroinflammation* 9:100;2012.
- 66 Ji KA, Yang MS, Jeong HK, Min KJ, Kang SH, Jou I, Joe EH: Resident microglia die and infiltrated neutrophils and monocytes become major inflammatory cells in lipopolysaccharide-injected brain. *Glia* 55:1577-88;2007.

- 67 Vinet J, Weering HR, Heinrich A, Kälin RE, Wegner A, Brouwer N, Heppner FL, Rooijen Nv, Boddeke HW, Biber K: Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity. *J Neuroinflammation* 9:27;2012.
- 68 Falahati S, Breu M, Waickman AT, Phillips AW, Arauz EJ, Snyder S, Porambo M, Goeral K, Comi AM, Wilson MA, Johnston MV, Fatemi A: Ischemia-induced neuroinflammation is associated with disrupted development of oligodendrocyte progenitors in a model of periventricular leukomalacia. *Dev Neurosci* 35:182-96;2013.
- 69 Antonio Sica, Alberto Mantovani: Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122:787–795;2012.