

論文の内容の要旨

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

(背景)

周産期の低酸素虚血侵襲は児に低酸素性虚血性脳症(Hypoxic-Ischemic Encephalopathy; HIE)を引き起こす。HIE は児死亡のみならず根本的な治療法がない脳性麻痺やてんかん、発達障害との関連が明らかになり、HIE の病態解明と治療法の開発が急務である。正期産児の HIE は、神経細胞やグリア細胞による脳回路構築が盛んな時期に侵襲に対する傷害機転と内因性保護機構の応答が関与する複雑な病態である。

低酸素虚血侵襲を受けた正期産児の脳脊髄液中の神経伝達物質ノルエピネフリン(Norepinephrine; 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。これまでの基礎研究により NE が脳保護作用を有する神経伝達物質である可能性が示唆されており、正期産児の脳において神経伝達物質 NE が低酸素虚血に対する内因性保護機構の一つとして機能している可能性が推測された。しかしながら、これまで正期産児 HIE における NE の役割について検討した報告はない。以上の背景より、私は脳内 NE 濃度を上昇・維持させる選択的 NE 再取り込み阻害剤アトモキセチン(Atomoxetine; Atx)を使用して、脳内 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、新生児ラットを用いて検討した。

正期産児 HIE は神経細胞死が中心的病態であるが、近年ミクログリアの HIE への関与が明らかになっている。ミクログリアは不要な細胞の貪食やシナプスを選択的に刈り込み、脳発達に寄与するグリア細胞である。一方、脳虚血下では Toll 様受容体(Toll-like receptors; TLRs)を発現し、炎症性サイトカインや活性酸素種・窒素種の産生、M1 極性化など HIE の病態を促進させる神経細胞傷害的な一面があることが報告されている。HIE に関与するミクログリアには神経伝達物質 NE に対する受容体が発現しており、治療標的になっ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を検討した。

(方法と結果)

HIE モデルは日齢 7 日目(P7)の新生児ラットに左頸動脈切断、8%酸素 2 時間を負荷して作製した。低酸素・虚血処置直後にラットを Atx 群と Vehicle 群の 2 群に分類し、Atx あるいは生理食塩水をそれぞれ 1 回腹腔内投与した。低酸素・虚血処置 7 日後の P14 にお

いて、神経細胞を特異的に検出する KB 染色で脳組織傷害を評価した。Atx 群は Vehicle 群と比較して神経組織構造が維持されていた。

正期産児 HIE はアポトーシスを中心とした神経細胞死が主病態である。従って、急性期に相当する低酸素・虚血処置 24 時間後の P8 において、Atx が神経細胞のアポトーシスを抑制して脳組織傷害を軽減したかどうか TUNEL 染色で組織学的に検討した。Atx 群は Vehicle 群と比較して TUNEL 陽性細胞数の減少が観察された。

発達期脳に内在する脳保護機構として、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。CREB の標的蛋白には成長因子、抗アポトーシス因子、抗酸化物質など脳保護にかかわる複数の蛋白がある。CREB リン酸化を促す上流因子の一つに NE があることから、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 phosphorylation CREB(pCREB)染色を施行して組織学的に検討した。Atx 群は Vehicle 群と比較して pCREB 発現が亢進していた。

Atx 投与により P14 で脳傷害が軽減し、急性期である P8 の時点で TUNEL 染色が陰性領域に pCREB 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低酸素虚血に対する脳組織傷害を軽減した可能性が考えられた。また、脳内在性 NE が発達期脳において虚血時に脳保護機構として応答している可能性が示唆された。

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。P8 において、Atx 群は Vehicle 群と比較してミクログリア数が維持されていた。形態に関して、Vehicle 群では amoeboid 型、Atx 群では ramified 型の比率が多い結果であった。両群間のミクログリアの数と形態の違いから、NE のミクログリアへの関与が示唆された。しかしながら、NE のミクログリアへの直接的な作用の有無ならびにミクログリアを介した脳組織傷害への影響は不明であり、初代培養細胞を用いて検討した。

正期産児 HIE において、ミクログリアの IL-1 β や M1 極性化が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、NE の IL-1 β と M1/M2 極性比への影響を調べた。培養細胞に低酸素刺激を行い、IL-1 β mRNA 発現量を測定した。ミクログリア IL-1 β mRNA 発現は、ミクログリア単培養では抑制され、トランスウェルを用いた神経細胞との共培養で増加を認めた。この結果から、低酸素自体はミクログリアの炎症性応答を誘導せず、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。ミクログリア IL-1 β 産生に対して NE が直接影響を及ぼすかどうか、神経細胞から放出された液性因子の代替物質として LPS で刺激したミクログリア単培養に NE を投与して IL-1 β 蛋白量を測定した。NE によりミクログリア IL-1 β 蛋白産生量の減少を認めた。NE のミクログリア M1/M2 比への影響を、M1 マーカーとして iNOS、M2 マーカーとして Arg1 を用いて検討した。低酸素群は常酸素群と比較して iNOS/Arg1 mRNA 発現比が低下した。低酸素に NE を加えると、iNOS/Arg1 mRNA 発現比の低下が亢進した。以上の培養実験から、NE がミクログリア IL-1 β 産生の抑制ならびにミクログ

リア M2 極性化の亢進を介して、低酸素虚血に対する脳傷害を軽減した可能性が考えられた。

ミクログリアの低酸素に対する機能を *in vivo* で検討するためにクロドロネートリポソームを使用した。その結果、白質内のミクログリアが一部除去されたクロドロネートリポソーム群では、コントロール群に比較して低酸素虚血に対する脳白質傷害の悪化を認め、ミクログリアは早期には脳保護的に作用する可能性が推測された。

(まとめ)

本実験では、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に対するミクログリア M2 極性化の亢進ならびにミクログリア IL-1 β 産生の抑制を介した作用により、脳傷害を軽減した可能性が示唆された。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への作用は今後の新生児 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。