

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	崎元 伸哉
論文題目	脳虚血傷害の病態形成におけるTRPM2チャネルの関与		
(論文内容の要旨)			
<p>脳梗塞を含む脳血管疾患は世界全体の死亡原因の第二位に挙げられ、一命を取り留めても身体障害や言語障害などの重篤な後遺障害を伴うことから医療経済学的にも重要な社会問題となっている。脳梗塞治療法の現状は、超急性期における血栓溶解療法や対処療法等に限られ、治療可能時間の拡大および病態解明が強く求められている。近年、脳血管疾患の亜急性期から慢性期にかけて神経細胞が変性する過程では、脳常在性ミクログリアの異常活性化や血液脳関門の破綻によるマクロファージや好中球の浸潤により過剰な炎症応答が惹起されることが示唆されているが、その機能制御につながる治療標的分子に関する情報が不足している。Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) はCa²⁺透過型の非選択的カチオンチャネルで、脳や免疫系の細胞に広く分布していることが知られており、TRPM2を介したCa²⁺流入がミクログリアやマクロファージにおける特定のケモカイン産生を促進し炎症応答増悪に関与する。本研究において著者は、TRPM2遺伝子欠損 (TRPM2-KO) マウスを用いて脳虚血傷害の形成におけるTRPM2の関与について研究を行った結果、以下の新知見を得た。</p>			
第1章 一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスにおける TRPM2 遺伝子欠損の影響			
<p>脳梗塞の好発部位である中大脳動脈の一過性閉塞モデルを作成し、野生型 (WT) およびTRPM2-KOマウスを用いて比較検討したところ、虚血中および再灌流後の局所脳血流量に差は無く、血液中の生理学的パラメータは血中グルコース濃度を除き有意差は認められなかった。再灌流14日後までの生存率を評価したところ、WTマウスでは4日後以降に生存率の顕著な低下が観察されたが、TRPM2-KOマウスでは生存率の有意な改善が認められた。さらに、WTマウスでは神経障害および梗塞巣の形成が経時的に悪化もしくは増大したのに対し、TRPM2-KOマウスでは再灌流1日後で有意差は認められなかったが、2日後から3日後にかけて有意に抑制された。以上の結果より、TRPM2は脳虚血の亜急性期において神経障害や梗塞巣の形成に関与することが示唆された。</p>			
第2章 ミクログリア/マクロファージに発現する TRPM2 の脳虚血傷害への関与			
<p>TRPM2遺伝子欠損による脳虚血傷害の神経保護作用の機序解明を目指し、TRPM2の機能的発現が報告されているミクログリア/マクロファージに着目して検討を行った。免疫細胞の浸潤や集積に対するTRPM2欠損の影響を免疫組織化学的に検討したところ、再灌流2日後と3日後において梗塞巣周囲のミクログリア/マクロファージと想定されるIba1陽性細胞数の増大と梗塞巣の好中球と想定されるGr1陽性細胞数の増大がTRPM2-KOマウスでは有意に抑制されていた。一方、ミクログリア/マクロファージの活性化抑制薬であるミノサイクリンの作用について検討した</p>			

ところ、WTマウスではミノサイクリン投与群において有意な神経障害の改善と梗塞巣形成の抑制が観察されたが、TRPM2-KOマウスではミノサイクリン投与による有意な変化は認められなかった。

次に、脳常在性のミクログリアと末梢より浸潤するマクロファージのどちらが脳虚血傷害に対して寄与するのか検討するために、GFP-WTあるいはGFP-TRPM2-KO由来の骨髄細胞 (bone marrow; BM)を骨髄破壊したレシピエントマウス (Rec) に移植し、骨髄キメラマウスを作製し脳虚血傷害を比較した。末梢骨髄由来細胞でTRPM2を欠損したTRPM2-BM⁻/Rec⁺マウス、中枢神経系ミクログリアでTRPM2を欠損したTRPM2-BM⁺/Rec⁻マウス、双方でTRPM2を欠損したTRPM2-BM⁻/Rec⁻マウスのいずれにおいても、TRPM2-BM⁺/Rec⁺マウスに比べ神経症状が有意に改善していた。この結果から、ミクログリアおよびマクロファージの双方に発現するTRPM2が脳虚血傷害に増悪的に働くことが示唆された。

第3章 ミクログリア/マクロファージに発現するTRPM2を介した脳虚血傷害の増悪機構の解明

続いて、一酸化窒素 (NO) に着目して、ミクログリア/マクロファージに発現するTRPM2がどのような経路を介して脳虚血傷害を増悪させるか検討した。脳虚血時にはミクログリア/マクロファージにおいて誘導型NO合成酵素 (iNOS) が発現し、過剰産生されるNOが細胞傷害的に働く事が報告されている。そこでiNOSの選択的阻害薬である1400Wの作用について検討したところ、WTマウスでは1400W投与により有意な神経障害の改善と梗塞巣体積の縮小が観察されたが、TRPM2-KOマウスでは1400W処置による有意な変化は認められなかった。

近年、脳虚血傷害時に組織傷害に伴い細胞外へと放出される損傷関連分子の一部がTLR4やTLR2の内因性リガンドとしてミクログリア及びマクロファージ等に作用し、惹起される炎症応答が遅発性の神経傷害を増悪させることが示唆されている。そこで、TLR4のアゴニストとしてlipopolysaccharide (LPS) を、TLR2のアゴニストとしてlipoteichoic acid (LTA) を用いて検討したところ、培養ミクログリアにおいてLPS/IFN γ およびLTA/IFN γ 活性化刺激後のNO産生がTRPM2-KO由来ミクログリアで顕著に抑制された。同様に、培養マクロファージを用いた検討において、LPSとLTAの双方の活性化刺激によるNO産生がTRPM2-KO由来マクロファージで顕著に抑制された。以上の結果より、ミクログリア/マクロファージにおいてiNOSを介したNO産生がTRPM2による脳虚血傷害の増悪に関与することが示された。

以上、著者は、一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスを用いて、TRPM2の遺伝子欠損が脳虚血傷害に対して保護作用を示すことを明らかにし、その機序として脳虚血後の活性化ミクログリア/マクロファージに発現するTRPM2を介したNOの過剰産生が関与することを示した。本研究の成果は、虚血性脳傷害および中枢性炎症応答に対する治療薬の開発に資する重要な基礎的知見を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

脳梗塞を含む脳血管疾患は世界全体の死亡原因の第二位に挙げられ、一命を取り留めても身体障害や言語障害などの重篤な後遺障害を伴うことから医療経済学的にも重要な社会問題となっている。脳梗塞治療法の現状は、超急性期における血栓溶解療法や対処療法等に限られ、治療可能時間の拡大および病態解明が強く求められている。近年、脳血管疾患の亜急性期から慢性期にかけて神経細胞が変性する過程では、脳常在性ミクログリアの異常活性化や血液脳関門の破綻によるマクロファージや好中球の浸潤により過剰な炎症応答が惹起されることが示唆されているが、その機能制御につながる治療標的分子に関する情報が不足している。Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) はCa²⁺透過型の非選択的カチオンチャンネルで、脳や免疫系の細胞に広く分布していることが知られており、TRPM2を介したCa²⁺流入がミクログリアやマクロファージにおける特定のケモカイン産生を促進し炎症応答増悪に関与する。本研究では、TRPM2遺伝子欠損 (TRPM2-KO) マウスを用いて脳虚血傷害の形成におけるTRPM2の関与について研究が行われた。

第3章 一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスにおける TRPM2 遺伝子欠損の影響

脳梗塞の好発部位である中大脳動脈の一過性閉塞モデルを作成し、野生型 (WT) およびTRPM2-KOマウスを用いて比較検討したところ、虚血中および再灌流後の局所脳血流量に差は無く、血液中の生理学的パラメータは血中グルコース濃度を除き有意差は認められなかった。再灌流14日後までの生存率を評価したところ、WTマウスでは4日後以降に生存率の顕著な低下が観察されたが、TRPM2-KOマウスでは生存率の有意な改善が認められた。さらに、WTマウスでは神経障害および梗塞巣の形成が経時的に悪化もしくは増大したのに対し、TRPM2-KOマウスでは再灌流1日後で有意差は認められなかったが、2日後から3日後にかけて有意に抑制された。以上の結果より、TRPM2は脳虚血の亜急性期において神経障害や梗塞巣の形成に関与することが示唆された。

第4章 ミクログリア/マクロファージに発現する TRPM2 の脳虚血傷害への関与

TRPM2遺伝子欠損による脳虚血傷害の神経保護の機序解明を目指し、TRPM2の機能的発現が報告されているミクログリア/マクロファージに着目して検討がなされた。免疫細胞の浸潤や集積に対するTRPM2欠損の影響を免疫組織化学的に検討したところ、再灌流2日後と3日後において梗塞巣周囲のミクログリア/マクロファージと想定されるIba1陽性細胞数の増大と梗塞巣の好中球と想定されるGr1陽性細胞数の増大がTRPM2-KOマウスでは有意に抑制されていた。一方、ミクログリア/マクロファージの活性化抑制薬であるミノサイクリンの作用について検討したところ、WTマウスではミノサイクリン投与群において有意な神経障害の改善と梗塞巣形成の抑制が観察されたが、TRPM2-KOマウスではミノサイクリン投与による有意な変化は認められなかった。

次に、脳常在性のミクログリアと末梢より浸潤するマクロファージのどちらが脳虚血傷害に対して寄与するのか検討するために、GFP-WTあるいはGFP-TRPM2-KO由来の骨髓細胞 (bone marrow; BM)を骨髓破壊したレシピエントマウス (Rec) に移植し、骨髓キメラマウスを作製し脳虚血傷害を比較した。末梢骨髓由来細胞でTRPM2を欠損したTRPM2-BM/Rec⁺マウス、中枢神経系ミクログリアでTRPM2を欠損したTRPM2-

BM⁺/Rec⁻マウス、双方でTRPM2を欠損したTRPM2-BM⁻/Rec⁻マウスのいずれにおいても、TRPM2-BM⁺/Rec⁺マウスに比べ神経症状が有意に改善していた。この結果から、ミクログリアおよびマクロファージの双方に発現するTRPM2が脳虚血傷害に増悪的に働くことが示唆された。

第3章 ミクログリア/マクロファージに発現するTRPM2を介した脳虚血傷害の増悪機構の解明

続いて、一酸化窒素 (NO) に着目して、ミクログリア/マクロファージに発現するTRPM2がどのような経路を介して脳虚血傷害を増悪させるか、誘導型NO合成酵素 (iNOS)に着目して検討がなされた。iNOSの選択的阻害薬である1400Wの作用について検討したところ、WTマウスでは1400W投与により有意な神経障害の改善と梗塞巣体積の縮小が観察されたが、TRPM2-KOマウスでは1400W処置による有意な変化は認められなかった。また近年、脳虚血傷害時に組織傷害に伴い細胞外へと放出される損傷関連分子の一部がTLR4やTLR2の内因性リガンドとしてミクログリア及びマクロファージ等に作用し、惹起される炎症応答が遅発性の神経傷害を増悪させることが示唆されている。そこで、TLR4のアゴニストとしてlipopolysaccharide (LPS) を、TLR2のアゴニストとしてlipoteichoic acid (LTA) を用いて検討したところ、培養ミクログリアにおいてLPS/IFN γ およびLTA/IFN γ 活性化刺激後のNO産生がTRPM2-KO由来ミクログリアで顕著に抑制された。同様に、培養マクロファージを用いた検討において、LPSとLTAの双方の活性化刺激によるNO産生がTRPM2-KO由来マクロファージで顕著に抑制された。以上の結果より、ミクログリア/マクロファージにおいてiNOSを介したNO産生がTRPM2による脳虚血傷害の増悪に関与することが示された。

以上、著者は、一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスを用いて、TRPM2の遺伝子欠損が脳虚血傷害に対して保護作用を示すことを明らかにし、その機序として脳虚血後の活性化ミクログリア/マクロファージに発現するTRPM2を介したNOの過剰産生が関与することを示した。本研究の成果は、虚血性脳傷害および中枢性炎症応答に対する治療薬の開発に資する重要な基礎的知見を提供するものである。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成26年2月24日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、（当分の間）当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降

