

脳虚血傷害の病態形成における
TRPM2 チャンネルの関与

2013

崎元 伸哉

謹呈

様

拙書ではございますが、御一読頂ければ幸いに存じます。
今後とも御指導、御鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

平成 26 年 3 月 24 日

崎元 伸哉

脳虚血傷害の病態形成における
TRPM2 チャンネルの関与

2013

崎元 伸哉

目次

緒言	1
第一章 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	3
実験方法	5
実験結果	8
考察	13
第二章 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	15
実験方法	16
実験結果	19
考察	26
第三章 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	28
実験方法	29
実験結果	32
考察	39
総括および結論	42
謝辞	43
発表論文目録	44
参考文献	45

緒言

脳梗塞を含む脳血管疾患は先進国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い、我が国においても総患者数は 130 万人以上におよぶ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、組織プラスミノゲン活性化因子の発症 4.5 時間以内の投与という超急性期における血栓溶解療法や脳浮腫改善を目的とした対処療法等に限られ、脳梗塞に対する有効な神経保護治療薬がほとんど無い。従って、脳梗塞の病態解明と新たな治療標的の探索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炎症性サイトカインや細胞傷害性因子の産生を介した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) は活性酸素感受性 Ca^{2+} 透過型陽イオンチャネルで、脳や免疫系の細胞に広く分布していることが知られている。近年、TRPM2 を介した Ca^{2+} 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免疫／炎症応答に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。著者が所属する研究室において、炎症性疼痛や神経障害性疼痛モデルマウスにおいて、ミクログリアやマクロファージに発現する TRPM2 がサイトカイン産生に関与することを明らかとしてきた。著者は過剰な炎症応答に伴う神経傷害が生じる脳虚血傷害の病態においても TRPM2 が関わりと想定した。そこで、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。

第一章では、一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスにおいて TRPM2 が脳虚血後の神経障害や梗塞巣の形成に関与することを示した。

第二章では、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、ミノサイクリン／マクロファージ活性化抑制薬や骨髄キメラマウスを用いた検討より、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 が脳虚血傷害の増悪に関与することを示した。

第三章では、TRPM2 を介した脳虚血傷害の増悪機構として iNOS を提示し、ミクログリア／マクロファージに発現する iNOS の過剰発現による NO の過剰産生が、TRPM2 を介した脳虚血傷害の増悪に関与することを示した。これらの研究成果について、以下に論述する。

なお、本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ADPR:	adenosinediphosphate ribose
BM:	bone marrow
cADPR:	cyclic adenosinediphosphate ribose
CXCL2:	CXC chemokine ligand 2
CXCR2:	CXC chemokine receptor 2
DAMPs:	damage-associated molecular pattern molecules
GFP:	green fluorescent protein
HMGB1:	high mobility group box 1
HPRT:	hypoxanthine phosphoribosyltransferase
IFN γ :	interferon γ
IL:	interleukin
iNOS:	inducible nitric oxide synthase
JNK:	c-jun <i>N</i> -terminal kinase
LPS:	lipopolysaccharide
LTA:	lipoteichoic acid
NDS:	neurological deficit score
NMDA:	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
NO:	nitric oxide
OGD:	oxygen-glucose deprivation
PARP:	poly (ADP-ribose) polymerase
PBS:	phosphate buffered saline
PFA:	paraformaldehyde
PID:	peri-infarct depolarization
Pyk2:	proline-rich tyrosine kinase 2
Prx:	peroxiredoxin
rCBF:	regional cerebral blood flow
Rec:	recipient
S100A:	S100 calcium binding protein A
TBS:	tris buffered saline
TNF α :	tumor necrosis factor α
TLR:	toll-like receptor
TRPM2:	transient receptor potential melastatin 2
TTC:	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride

第一章 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

脳梗塞を含む脳血管疾患は先進国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呈する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 (1)。特に脳卒中による死亡の半数以上を占める脳梗塞治療法の現状は、組織プラスミノゲン活性化因子の発症 4.5 時間以内の投与という超急性期における血栓溶解療法や高張グリセロールによる脳浮腫軽減を目的とした対処療法などに限られており、脳梗塞に対する有効な神経保護治療薬がほとんど無い (2,3)。従って、脳梗塞の病態解明と新たな治療標的の探索が強く求められている。脳虚血は、脳血流が供給する動脈が狭窄あるいは閉塞することによりその血管の支配領域が虚血状態に陥り、神経細胞やグリア細胞、血管内皮細胞などにより構成されている脳組織全体に障害が生じる疾患である。脳虚血において、虚血中心 (コア) とその周辺に虚血周辺領域 (ペナンプラ) が存在する (4)。コアでは顕著な血流の低下により細胞は不可逆的な損傷を受ける。一方ペナンプラでは血流の低下の程度が緩徐であるため不可逆的な損傷は受けておらず、脳虚血数日後のペナンプラにおいて遅発性の神経細胞死が惹起されるため救済可能であると考えられている (5-7)。虚血に伴うグルタミン酸の過剰遊離 (8,9) や再灌流時に過剰産生される活性酸素種 (8-10) などが神経細胞死を惹起する因子として考えられており、現在までにこれらの因子を標的とした創薬研究も行われてきたが、有効性や副作用の問題により臨床応用に至った薬剤は我が国において使用されているエダラボンのみである。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炎症性サイトカインや細胞傷害性因子の産生を介して惹起される過剰な炎症応答が示唆されているが (11,12)、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。著者はこれらの免疫細胞に発現が報告されている transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) チャンネルに着目した。

TRPM2 は過酸化水素を含む活性酸素感受性や温度感受性を有しているポリマーダルな Ca^{2+} 透過性陽イオンチャンネルであり、C 末端の細胞内ドメインに ADP-ribose (ADPR) を分解するピロホスファターゼ活性をもつ Nudix モチーフを有している。TRPM2 は細胞内 ADPR によって活性化することが明らかとなっ

ており、この活性化には Nudix モチーフが関与している (13-18)。TRPM2 は脳内で海馬や線条体、大脳皮質の神経細胞、ミクログリアにおける発現が報告されている他、多くの組織に発現している (19,20)。単球／マクロファージ (14)、好中球 (21)、T 細胞 (22) などの免疫細胞にも発現しており、近年これらの免疫細胞に発現する TRPM2 の病態生理学役割に着目した研究が報告されている。LPS 活性化刺激後の単球／マクロファージにおいて TRPM2 発現や ADPR 誘発 TRPM2 様電流が増大し (23)、潰瘍性大腸炎モデルマウスにおいて TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入が単球の炎症性サイトカイン産生を促進させる (24)。また著者の所属する研究室では、神経障害性疼痛モデルマウスにおいて、TRPM2 がミクログリアおよびマクロファージのサイトカイン産生に関与し、炎症応答を媒介することを報告している (25)。これらの報告より、著者は過剰な炎症応答に伴う神経傷害が生じる脳虚血傷害の病態においても TRPM2 が関わると想定した。そこで本章では、TRPM2 遺伝子欠損マウス (TRPM2-KO マウス) を用いて、一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスを作成し、TRPM2 遺伝子欠損の影響を検討した。

実験方法

使用動物

実験には雄性 C57BL6/J 系マウス (体重 20-30 g、8-12 週齢 ;日本 SLC、静岡) を使用した。TRPM2-KO マウスは京都大学工学研究科 森泰生先生より供与していただいた。TRPM2-KO マウスはバックグラウンド系統である C57BL/6J 系マウスに 10 世代戻し交配させた。全ての動物は室温が $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、明暗周期が 12 時間の室内で飼育し、餌および水は自由に摂取させた。実験は全て、京都大学動物実験委員会による審査・承認を受け、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行われた。

試薬

本研究に用いた試薬を以下に示す。

フローセンは、武田薬品工業 (大阪) より購入した。エスカインは、マイラン製薬 (大阪) より購入した。本章において用いたその他の試薬の購入元は、試薬名の後ろに括弧書きで記した。その他記載のない試薬は、ナカライテスク (京都) より購入した。

マウス中大脳動脈一過性閉塞モデルの作製

実験動物用吸入麻酔気化器 (TK-4, TK-7, バイオマシナリー、千葉) を用いてフローセン (ハロタン) またはエスカイン (イソフルラン) によりマウスを麻酔し、濃度 3%で麻酔導入を行い、手術中は濃度 1%で麻酔を維持した。マウスをうつ伏せにした状態で heating pad system で直腸温を測定し、 $37.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に維持した。正中線に沿って頸部を切開し、左総頸動脈を露出し迷走神経を慎重に剥離した。心臓側の総頸動脈、外頸動脈を順に縫合糸 (滅菌済み絹製縫合糸 No.7、アルフレッサファーマ株式会社 大阪) で二重に結紮した。内頸動脈は一度結紮し、内頸動脈からの血流を遮断し、総頸動脈には補助用の縫合糸を一つかけ、総頸動脈上の結紮部位と補助糸用縫合糸の間に切れ込みを入れ、その切れ込みより内頸動脈に向かってナイロン栓子 (ナイロン糸 (滅菌済ナイロン縫合糸 No.8、秋山製作所、埼玉) の先端 5 mm に $180\text{-}200\ \mu\text{m}$ の太さにてシリコン (JMシリコン、MORITA、大阪) をコーティングしたもの) を挿入した。ナイロン栓子の先が中大脳動脈の起始部に到達し、ナイロン栓子を掴んでいるピンセットに軽い抵抗が生じた状態で内頸動脈および総頸動脈の補助糸を結紮した。虚血中は濃度 1%で麻酔を維持し、虚血処置 60 分後において、ナイロン栓子を引き抜くことにより中大脳動脈の血流を再開通させた。切開創部を縫合糸 (滅菌済ブレードシルク

No.5、秋山製作所、埼玉) にて丁寧に縫合し、heating pad system 上に仰向けにした状態で麻酔から醒めるのを待ち、麻酔より覚醒した後に飼育ケージに移動させ手術前と同条件にて飼育した。

局所脳血流量 (rCBF; regional cerebral blood flow) の測定

フローセンまたはエスカイン麻酔下で、左頭皮を切開し、左側頭筋を剥離した後、bregma より左外側に 6 mm、尾側に 2 mm の位置に GJ プローブ (オメガウェーブ 東京) をアロンアルファ (東亜合成、東京) と硬化促進剤 (1796、スリーボンド、東京) を用いて接着した。GJ プローブを laser-Doppler flowmetry (FLO-C1 または FLO-N1、オメガウェーブ) に接続し血流量 (ml/min/100 g) を測定した。虚血開始前の血流量を 100%とし、虚血 5 分後より再灌流 25 分後まで 10 分毎に測定を行い、虚血中の血流が 25%以下かつ再灌流後に血流が 60%以上に回復した個体のみを実験に使用した。

生理学的パラメータの測定

エスカインによりマウスを麻酔し、下肢大腿部を大腿骨に沿って切開し、左大腿動脈を露出し迷走神経ならびに大腿静脈を慎重に剥離した。剥離した動脈の両端を縫合糸で結紮した。大腿動脈に切れ込みをいれ、その切れ込みより心臓側へ管内を生理食塩水 (大塚製薬、東京) で満たしたポリエチレン製カテーテル (M-FAC/FVC、株式会社ニューロサイエンス、東京) を挿入し補助用の縫合糸でゆるく結んだ後、心臓側の縫合糸の結紮を一度ほどき、さらにカテーテルを心臓側へと挿入し心臓側の縫合糸および補助用の縫合糸をきつく結んだ。ポリエチレンチューブの先は生理食塩水で満たしたテルモシリンジ (2.5ml SS02LZ、テルモ、東京) を接続しており、採血の際にテルモシリンジ (1 ml ツベルクリン用 SS-01T、テルモ、東京) に切り替えた。脳虚血の直前、30分後および再灌流の30分後において100 μ l 採血し、i-STAT 300F (扶桑薬品、大阪) とカートリッジ (CG8+、扶桑薬品) を用いて以下の項目を測定した。pH、pCO₂ (二酸化炭素分圧)、pO₂ (酸素分圧)、Beecf (塩基過剰)、TCO₂ (総CO₂濃度)、sO₂ (酸素飽和度)、iCa (血漿中イオン化カルシウム)、Na (ナトリウム濃度)、K (カリウム濃度)、Glc (グルコース濃度)、Hct (ヘマトクリット)、Hb (ヘモグロビン)

神経症状の評価

再灌流後24、48、72時間後の神経症状をマウスの行動観察から右の表の通りに0-5の6段階で評価した。

Neurological deficit scores (NDS)

- | | |
|---|---------------|
| 0 | 正常 |
| 1 | 右前肢および体躯の屈曲 |
| 2 | 回転運動 |
| 3 | 左にもたれかかるような姿勢 |
| 4 | 正向反射の消失 |
| 5 | 無動 |
-

梗塞巣体積の評価

再灌流24、48、72時間後に頸椎脱臼により安楽死させ、断頭した。頭蓋をセッシで順に剥離することにより全脳を露出し、アクリル製ブレインスライサー (ブレインサイエンス・イデア 大阪) とカミソリ (フェザー安全剪刀、大阪) にて吻側より1 mm厚の冠状切片を8枚作製した。12穴プレートに2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 溶液を2 ml注ぎ、切片の尾側を下面にして20分間37°Cにて溶液中に静置した。その後、12穴プレートに10%ホルマリン溶液を2 ml注ぎ、冠状切片をTTC溶液からホルマリン溶液へと移し、2日間4°Cにて静置した。スワン滅菌シャーレ上に8枚の切片の尾側を下面にして静置した。カラーイメージスキャナー (GT7600U、EPSON、長野) を用いて、撮像した。TTC染色により染色されていない白色の部分梗塞巣として判定し、Image J (National Institutes for Health, Bethesda, MD, USA) を用いて面積を測定し、各脳切片の尾側面の梗塞巣面積を計測することで評価した。

統計解析

値は全て、平均値±標準誤差で表記した。二群間の差は Student's t-test により、三群以上の差は、one-way あるいは two-way ANOVA および Bonferroni *post hoc* test を用いて、Prism 5 software (GraphPad) により解析した。生存率については long-rank test を用いた。危険率 5%未満の場合には統計学的に有意な差があると判定した。

実験結果

TRPM2 遺伝子欠損の生存率に及ぼす影響

マウスに虚血-再灌流処置した後、経時的に 14 日までの生存率を確認した (図 1-1A)。野生型では 4 日後以降に生存率の顕著な低下が観察され、14 日後においては 9%まで低下した。一方、TRPM2-KO マウスでは 14 日後の生存率が 63% となり、野生型マウスと比較して 14 日後の生存率は有意に改善した。この結果から、TRPM2 遺伝子欠損は脳虚血後の長期生存率を増大させることが示唆される。

TRPM2 遺伝子欠損の神経症状に対する影響

脳虚血 24、48、72 時間後において、虚血-再灌流により惹起される神経症状を 0-5 の 6 段階の神経学的スコアを用いて評価した。その結果、野生型マウスでは脳虚血 24 時間後から 72 時間後にかけて継続した重篤な神経症状が観察されたが、TRPM2-KO マウスでは 48 時間、72 時間後において有意に低いスコアを示した (図 1-1B)。この結果より、TRPM2 遺伝子欠損は脳虚血傷害後の神経症状を改善することが示された。

TRPM2 遺伝子欠損の梗塞巣体積に対する影響

脳虚血 24、48、72 時間後において、TTC 染色で赤色に染色されない白色部分で表される梗塞巣の形成を確認した (図 1-1C)。野生型マウスでは 24 時間後以降、時間依存的に梗塞巣が増大し、広範な梗塞巣の形成が認められた。一方、TRPM2-KO マウスでは 24 時間後以降の梗塞巣の増大が認められなかった。24 時間後における梗塞巣体積は野生型マウスに比較して有意な差は観察されなかったが、48 時間後および 72 時間後においては梗塞巣体積の有意な減少が認められた (図 1-1D)。これまでの結果より、TRPM2 は脳虚血 24 時間以降から 72 時間後という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る。

TRPM2 遺伝子欠損の局所脳血流量 (rCBF) に対する影響

脳虚血および再灌流における脳血流量は障害の程度に大きく影響を与える因子の一つである (26)。そこで、TRPM2 遺伝子欠損により脳血流量に影響するのか検討するために、虚血開始 5 分後から再灌流 25 分後までの rCBF を 10 分毎に測定した。野生型マウスに比較して TRPM2-KO マウスではいずれの時間においても rCBF に差はなかった (図 1-2)。この結果から、TRPM2 は脳虚血傷害後

の脳血流量に影響を与えず、TRPM2-KO マウスの保護作用は脳血流量の変化によるものではないことが示唆される。

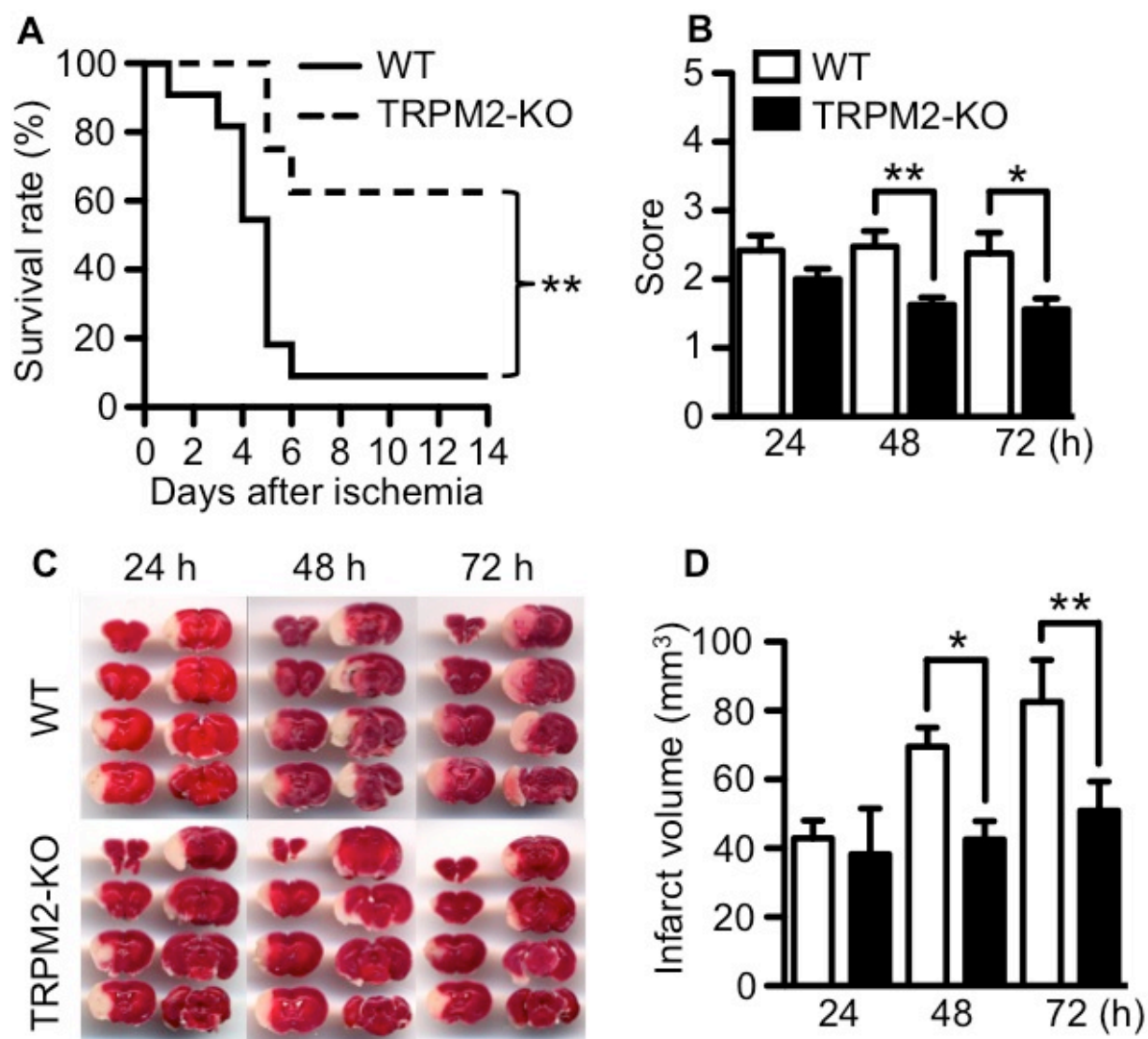


図 1-1 TRPM2 遺伝子欠損により脳虚血傷害の進展が抑制された。

(A) 虚血-再灌流処置 14 日後までの生存率。 ** $P < 0.01$. $n = 8-11$. (B) 虚血-再灌流処置 24、48、72 時間後において、野生型マウスおよび TRPM2-KO マウスの神経学的スコアを評価した。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n = 16-27$. (C) 一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスにおける TTC 染色画像の典型例。上段が野生型マウス、下段が TRPM2-KO マウス。 (D) 虚血-再灌流処置 24、48、72 時間後における野生型マウスおよび TRPM2-KO マウスの梗塞巣体積。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n = 4-14$.

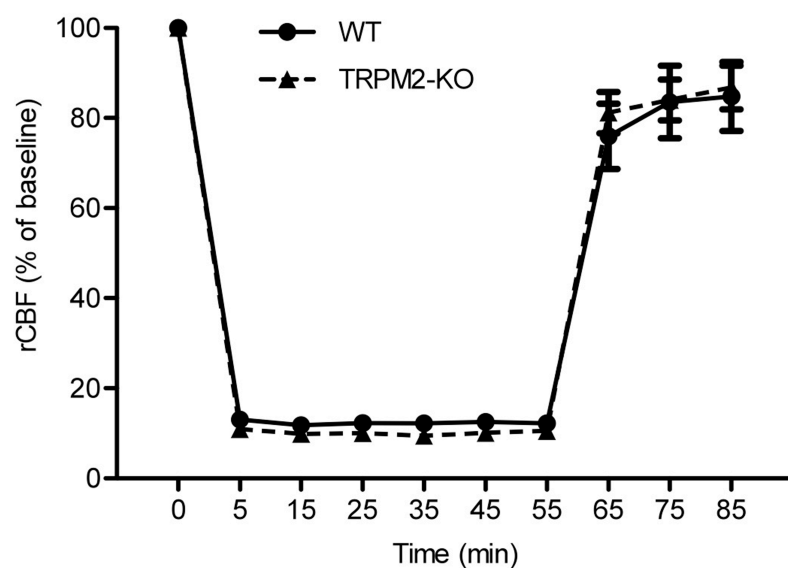


図 1-2 虚血および再灌流時の局所脳血流量に対する TRPM2 遺伝子欠損の影響 レーザードップラー血流系計を用いて中大脳動脈の支配領域の局所脳血流量を測定した。虚血直前を 100%としている。n = 6.

TRPM2 遺伝子欠損の生理学的パラメータに対する影響

血液中の pH、酸素分圧、二酸化炭素分圧などの生理学的パラメータは脳虚血傷害の程度に関与する因子である (27)。そこで、TRPM2 遺伝子欠損が生理学的パラメータに影響を与えるか検討するために、虚血直前、虚血 30 分後、再灌流 30 分後に生理学的パラメータを測定した。野生型マウスに比較して TRPM2-KO マウスでは、グルコース濃度に関しては再灌流 30 分後において有意に上昇していたものの、その他のパラメータに関してはいずれの時間においても差はなかった (表 1-1)。この結果から、TRPM2 が虚血-再灌流処置後の生理学的パラメータの変化に与える影響はほとんど無いことが示唆される。

表 1-1 生理学的パラメータに対する TRPM2 遺伝子欠損の影響

		Before MCAO	30 min after MCAO	30 min after reperfusion
pH	WT	7.21 ± 0.02	7.22 ± 0.02	7.21 ± 0.01
	TRPM2-KO	7.27 ± 0.02	7.28 ± 0.04	7.27 ± 0.02
pCO ₂ (mmHg)	WT	53.6 ± 3.6	61.6 ± 4.8	56 ± 2.7
	TRPM2-KO	49.2 ± 1.7	57.8 ± 5.5	51.2 ± 3.8
pO ₂ (mmHg)	WT	173 ± 7	142 ± 10	159 ± 8
	TRPM2-KO	163 ± 7	143 ± 14	152 ± 14
BE _{ecf} (mmol/L)	WT	-6.33 ± 1.75	-2.83 ± 0.75	-5.67 ± 0.49
	TRPM2-KO	-3.83 ± 1.74	-0.33 ± 0.76	-3.5 ± 1.46
HCO ₃ (mmol/L)	WT	21.6 ± 1.5	25 ± 0.9	22.3 ± 0.6
	TRPM2-KO	22.9 ± 1.4	26.4 ± 0.6	23.5 ± 1.4
TCO ₂ (mmol/L)	WT	23 ± 1.6	26.7 ± 1	23.8 ± 0.6
	TRPM2-KO	24.3 ± 1.5	28.1 ± 0.7	25 ± 1.5
sO ₂ (%)	WT	98.8 ± 0.2	98.3 ± 0.7	98.8 ± 0.2
	TRPM2-KO	99 ± 0	98.2 ± 0.7	98.3 ± 0.7
Na (mmol/L)	WT	146 ± 2	144 ± 1	144 ± 1
	TRPM2-KO	146 ± 1	144 ± 0	145 ± 1
K (mmol/L)	WT	4.02 ± 0.44	5.5 ± 0.26	6.63 ± 0.27
	TRPM2-KO	3.82 ± 0.43	5.43 ± 0.27	5.92 ± 0.32
iCa (mmol/L)	WT	1.32 ± 0.06	1.42 ± 0.04	1.3 ± 0.06
	TRPM2-KO	1.24 ± 0.02	1.34 ± 0.02	1.28 ± 0.04
Glc (mg/dL)	WT	193 ± 17	214 ± 15	209 ± 7
	TRPM2-KO	184 ± 14	244 ± 13	**282 ± 16
Hct (%PCV)	WT	44.5 ± 1.4	43.2 ± 0.5	38.2 ± 1
	TRPM2-KO	44.8 ± 0.9	42.8 ± 0.6	37.2 ± 0.6
Hb (g/dL)	WT	15.1 ± 0.5	14.7 ± 0.2	13 ± 0.4
	TRPM2-KO	15.2 ± 0.3	14.6 ± 0.2	12.6 ± 0.2

虚血直前、虚血 30 分後、再灌流 30 分後より採血し測定した。 ** $P < 0.01$. n = 6.

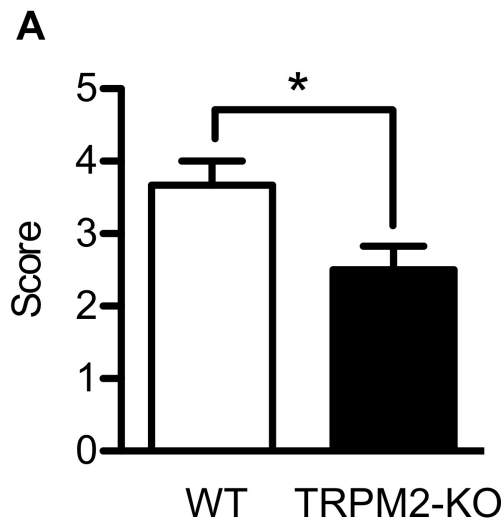
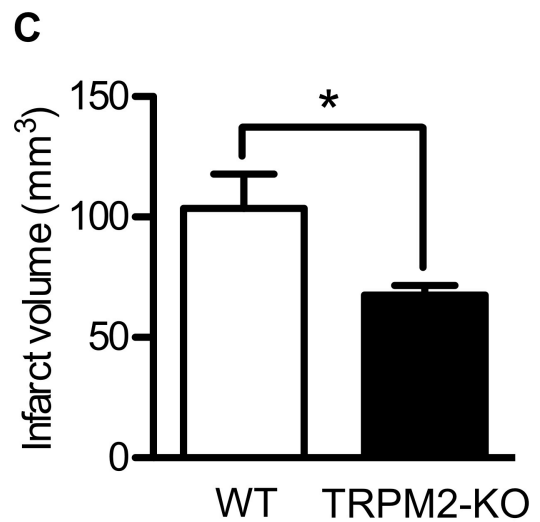
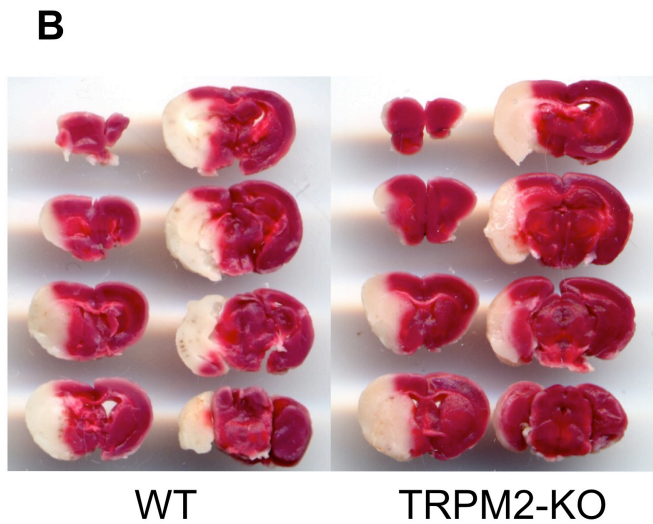


図 1-補足 永久梗塞モデルマウスにおける TRPM2 欠損の影響

(A) 中大脳動脈永久閉塞 24 時間後における野生型マウスおよび TRPM2-KO マウスの神経学的スコアを評価した。* $P < 0.05$. $n = 6-8$.

(B) 中大脳動脈永久閉塞 24 時間後の TTC 染色画像の典型例。

(C) 中大脳動脈永久梗塞 24 時間後における野生型マウスおよび TRPM2-KO マウスの梗塞巣体積。* $P < 0.05$. $n = 6-8$.



考察

本章において著者は、野生型マウスと TRPM2-KO マウスを比較検討した際、虚血-再灌流処置 24 時間後という脳虚血の急性期において神経症状や梗塞巣の形成は野生型マウスと同程度であった一方、虚血-再灌流処置 48 および 72 時間後という脳虚血の亜急性期において神経症状が改善し、梗塞巣体積の増大が抑制されることを明らかにした。

神経細胞に発現する TRPM2 が脳虚血後の神経細胞死に重要であると報告している研究では (28-30)、TRPM2 による脳虚血傷害メカニズムとしては虚血-再灌流処置後に生じる過酸化水素などの活性酸素種の過剰産生による酸化的バーストは関係せず、低酸素低グルコース (oxygen-glucose deprivation: OGD) 負荷自体が神経細胞に発現する TRPM2 を開口して細胞死を惹起すると考えられている。著者の所属する研究室においてラット大脳皮質神経細胞死を用いた検討により過酸化水素誘発の神経細胞死に TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入が関与することを報告しており (31)、著者も神経細胞の TRPM2 が脳虚血傷害の形成に重要であると想定して検討を進めたが、TRPM2-KO マウスを用いて検討した結果、梗塞巣体積は脳虚血 24 時間後では差はなく、48 時間および 72 時間後において梗塞巣体積の増大が抑制された。神経細胞に特異的に発現する NMDA 受容体に対する選択的阻害薬である NMDA 受容体グリシン部位拮抗薬の MRZ2/576 や NMDA 受容体 NR2B サブユニット阻害薬 conantokin-G を投与した際には、虚血後 24 時間後において有意な保護作用が報告されている (32,33)。さらに、神経細胞死惹起につながる神経細胞の虚血周辺部の脱分極 (peri-infarct depolarization: PID) は脳虚血 24 時間以内にピークを迎え、神経細胞死につながる神経細胞の過剰興奮は 24 時間以内に起こるという報告 (33) を鑑みると、神経細胞に発現する TRPM2 が脳虚血傷害に重要な役割を果たすと仮定した場合、脳虚血 24 時間後の時点において梗塞巣の形成抑制が観察されないという今回の我々の結果は腑に落ちない。脳虚血 24 時間後から 72 時間後という脳虚血の亜急性期には、梗塞巣周囲のペナンプラ領域において脳常在性の免疫担当細胞であるミクログリアの増殖や集積、末梢血からの免疫細胞の浸潤による過剰な炎症応答が惹起され遅発性神経傷害の進展に関与することが示唆されていることから (11,12)、著者はグリア細胞や免疫細胞に発現する TRPM2 がより脳虚血傷害の形成に重要な因子なのではないかと考えるに至った。その場合、虚血-再灌流直後の酸化的バーストではなく脳虚血数日後において TRPM2 が活性化されることが考えられるが、酸化的バーストが関与しない中大脳動脈永久梗塞モデルマウスの実験において TRPM2 遺伝子欠損により保護作用が認められたこと

からもこの考えは支持される (図 1-補足)。しかしながら、神経細胞に発現する TRPM2 が何らかの役割を担っていることを完全に否定することは不可能であるため、神経細胞特異的な TRPM2 コンディショナルノックアウトマウスを作成し、神経細胞に発現する TRPM2 の脳虚血傷害の寄与について、今後精査していく必要があると考えられる。

脳虚血時のストレス応答の初期において血中グルコース濃度は上昇し、脳虚血後の高血糖は神経傷害を増悪させることが知られており (34)、脳虚血処置後の糖尿病モデルマウスに対してインスリン療法を行うと神経細胞死を抑制すること (35) や抗糖尿病治療薬メトホルミン全身投与により脳虚血傷害が抑制されることが報告されている (36)。今回、再灌流 30 分後の血中グルコース濃度が野生型マウスに比べ、TRPM2-KO マウスで上昇していたが、脳虚血傷害は TRPM2-KO マウスでは減少していた。膵 β 細胞に発現する TRPM2 がインスリン分泌に関与することが知られているので (37)、この現象は膵 β 細胞の TRPM2 欠損によるインスリン分泌不全によるものと考えられる。従って、TRPM2-KO マウスで観察された血中グルコース濃度の上昇を抑制することで TRPM2 欠損による脳虚血傷害の保護作用はより増強されることが考えられる。

以上、本章において著者は、TRPM2-KO マウスを用いて一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスを作成し、TRPM2 遺伝子欠損が脳虚血傷害の病態形成に及ぼす影響について検討し、TRPM2 が脳虚血の亜急性期において神経傷害や梗塞巣の形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

第二章 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

第一章において著者は、TRPM2 が脳虚血の亜急性期において神経傷害や梗塞巣の形成に重要な役割を果たしていることを示した。そこで第二章では、TRPM2 遺伝子欠損による脳虚血傷害の保護メカニズムの解明を目指した。

脳虚血数日後の虚血領域やペナンプラ領域においては、常在性のミクログリア、末梢血より浸潤するマクロファージ、好中球など多種多様な免疫細胞の数が増大することが報告されている (11,12)。脳虚血後数時間以内に常在性ミクログリアは活性化し炎症性サイトカインを産生する (38)。脳虚血 1 日後にはマクロファージが集積し始め、脳虚血 2、3 日後には浸潤数はピークを迎える。その後、脳虚血 3 日後から 7 日後にかけて好中球や T 細胞、B 細胞、樹状細胞が浸潤数のピークを迎える (39)。近年、これらの細胞が惹起する脳虚血後の過剰な炎症応答が遅発性神経傷害に対して増悪的に働くことが示唆されている。例えば主に免疫細胞に発現して免疫反応の誘導に必要とされる TLR4 の遺伝子欠損マウスは、脳虚血傷害が改善されている (40)。さらに、末梢血リンパ球の脳内への浸潤の大部分を抑制する薬剤として知られている FTY720 は、その効力ゆえ多発性硬化症の画期的な新薬として世界中で広く使われているが、この薬剤は脳虚血傷害を顕著に抑制することが報告されている (41,42)。従って、脳虚血後のペナンプラに集積する免疫細胞による過剰な炎症応答に伴う脳虚血傷害の進展を抑制することが脳虚血傷害治療において重要であると考えられる。TRPM2 はこれらの免疫細胞やグリア細胞などに幅広く発現しているだけでなく、神経細胞にも発現していることが知られているため (19-22)、どの細胞に発現する TRPM2 が脳虚血傷害に対して重要な働きをしているのか正確に特定することは困難である。

そこで本章では、脳虚血の亜急性期に浸潤の増大が認められるミクログリア、マクロファージ、好中球に着目し、浸潤や集積における TRPM2 の関与を免疫組織化学的に検討した。また、薬理学的な細胞選択的阻害薬としてミクログリア／マクロファージの活性化抑制薬であるミノサイクリンを、常在性の細胞および骨髄由来細胞を識別する手法として骨髄キメラマウスを用いて、ミクログリアおよびマクロファージに発現する TRPM2 の脳虚血傷害への寄与を検討した。

実験方法

使用動物

GFP トランスジェニックマウスは C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) C14-Y01-FM131OSb (Riken BioResource Center, 茨城) を用いた。
その他については、第一章実験方法に同じ。

試薬

本研究に用いた試薬を以下に示す。
ミノサイクリン塩酸塩は Sigma (St. Louis, MO) より購入した。
その他については、第一章実験方法に同じ。

薬物の調整と投与

ミノサイクリン (50 mg/kg) は 0.1 M PBS 溶液 (pH7.4) を用いて投与量が 10 μ l/g となるように調整した。テルモシリンジ (1 ml ツベルクリン用 SS-01T、テルモ、東京) とテルモ注射針 (26G NN-2613S、テルモ、東京) を接続したものをを用い、虚血 30 分前および再灌流後に 1 日 2 回腹腔内投与した。

マウス中大脳動脈一過性閉塞モデルの作製

第一章実験方法に同じ。

局所脳血流量 (rCBF; regional cerebral blood flow) の測定

第一章実験方法に同じ。

神経症状の評価

第一章実験方法に同じ。

梗塞巣体積の評価

第一章実験方法に同じ。

免疫染色法

○ 経心灌流固定および冠状切片作製

マウスをネンブタールまたはソムノペンチル (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下にて開胸し、0.1 M PBS (pH7.4) を 20 ml 経心灌流することで脱血した後、4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 10 ml で経心灌流し、全身を固定した。そ

の後全脳を摘出し、4%PFA溶液で4℃にて3時間、後固定を行った。次に4℃にて15% sucrose in 0.1 M phosphate bufferに一晩静置し、粉碎したドライアイス（中川産業、京都）にて脳組織を凍結し冠状切片作製まで-80℃にて保存した。次に、ミクロトーム刃（LEICA819; Leica, Nussloch, Germany）を装着した凍結ミクロトーム（LEICA3000; Leica）を用いて厚さ20 μmの凍結切片を作製し、MASコート付スライドガラス（松浪硝子工業、大阪）に接着した。切片作製の前に組織サンプルはミクロトーム内で30分以上静置し、ミクロトーム内の温度（-17から-20℃）まで組織サンプルの温度が上昇してから切片作製を開始した。

○ 蛍光抗体法

脳切片を0.1%Triton-X100を含むPBSにて透過処理を施した後、0.3%BSAを含むPBS（抗体希釈液）にてブロッッキングした。一次抗体として rabbit polyclonal anti-Iba1 antibody (1:500, WAKO)、rat monoclonal anti-Gr-1 (Ly-6G) antibody (1:100, R&D Systems, Minneapolis, MN)、mouse monoclonal anti-iNOS antibody (1:1000, BD Transduction Laboratories, San Jose, CA)を用いて4℃で一晩静置し、PBSによる洗浄後、適切な蛍光標識二次抗体（1:200; Molecular Probes, Eugene, OR）と室温遮光条件で1時間反応させた。PBSによる洗浄後、Vectashild (Vector, Burlingame, CA)によりスライドガラス上に封入した。乾燥後、共焦点顕微鏡（Fluoview FV10i、オリンパス、東京）により画像を取得した。

○ 酵素抗体法

Iba1の組織染色に関して、一次抗体として rabbit polyclonal anti-Iba1 antibody (1:500)を用いて4℃で一晩静置し、PBSによる洗浄後、biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:200, Vector, Burlingame, USA)と室温で90分間反応させた。PBSによる洗浄後、ABC Elite reagent (1:200, Vector, Burlingame, USA)と室温で60分間反応させた。Tris buffered saline (TBS)で洗浄後、ペルオキシダーゼ活性はdiaminobenzidine (Dojindo) および H₂O₂で可視化した。70%、90%、100%、エタノール溶液で脱水し、切片上にENTELLAN®neu (MERCK)を滴下し、カバーガラス（松浪硝子工業、大阪）にて封入した。蛍光バイオ顕微鏡（BZ8100）により画像を取得した。

骨髄キメラマウスの作製

骨髄由来細胞（BM; bone marrow）ドナーマウスとして雄性TRPM2-KO (TRPM2^{-/-}) マウスと雌性GFPトランスジェニックマウス (GFP-TRPM2^{+/+}) を交配させ、さらに得られたGFP陽性TRPM2^{+/+}を交配させることで、GFP陽性野生型マウスおよびGFP陽性TRPM2-KOマウスを用意した。レシピエントマウスは6週齢の雄性マウスを用い、BM移植の5日前に滅菌済PBSで調整した5-FU（協和発酵キリン、東京）を150 mg/kg腹腔内投与し、移植前日の夕方より絶食させた。レ

レシピエントマウスは10分かけて10 Gyの γ 線を照射した。BMドナーマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、ヒビテン®溶液 (大日本住友製薬、大阪) に浸して消毒し、大腿骨および脛骨を単離し、テルモ注射針 (26G NN-2613S) の針先を骨髓内に刺し、1 mlの冷PBSを注入し骨髓細胞を回収した。2000 rpmで10分遠心後、PBSで懸濁させた。 γ 線照射の3-5時間後、骨髓細胞をレシピエントマウスに 2.0×10^7 cells/ 200 μ lで静脈内投与した。作製後、レシピエントマウスはフィルター付きケージ内で飼育し、10日間は25 mg/ml カナマイシン (Meiji Seikaファルマ、東京) を飲用水で投与し、6週間飼育後に実験に用いた (43)。本論中の表記に関して、野生型のレシピエントマウスにGFP陽性野生型マウス由来のBMを移植したものをTRPM2^{BM+/Rec+}、野生型のレシピエントマウスにGFP陽性TRPM2-KOマウス由来のBMを移植したものをTRPM2^{BM-/Rec+}、TRPM2-KOマウスのレシピエントマウスにGFP陽性野生型マウス由来のBMを移植したものをTRPM2^{BM+/Rec-}、TRPM2-KOマウスのレシピエントマウスにGFP陽性TRPM2-KOマウス由来のBMを移植したものをTRPM2^{BM-/Rec-}と記述した。

フローサイトメトリー解析

骨髓移植後の血中GFP陽性細胞の純度を測定するためにフローサイトメトリー解析を行った。骨髓移植6週間後の骨髓キメラマウスより末梢血100 μ lを尾静脈より採血した。血液に3倍希釈した生理食塩水を300 μ l加え10秒反応させ溶血させた。速やかに生理食塩水を1 ml加え、2000 gで5分間遠心した。同様に生理食塩水1 mlで洗浄後、2000 gで5分間遠心し、0.02 M ethylenediaminetetraacetic acid および0.01% bovine serum albuminを含むPBS溶液500 μ l に懸濁させた。フローサイトメーター (Gallios, Beckman Coulter, Brea, California, USA) を用いてGFPの純度を測定した。ネガティブコントロールとしては野生型マウスを、ポジティブコントロールとしてはGFPトランスジェニックマウスの血液を用いた。

統計解析

値は全て、平均値 $\pm$ 標準誤差で表記した。二群間の差は Student's t-test により、三群以上の差は、one-way あるいは two-way ANOVA および Bonferroni *post hoc* test を用いて、Prism 5 software (GraphPad) により解析した。危険率 5%未満の場合には統計学的に有意な差があると判定した。

実験結果

TRPM2 遺伝子欠損のミクログリアおよびマクロファージの集積に対する影響

第一章で明らかにした 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、虚血脳において活性化が惹起され (44)、TRPM2 の機能的発現が報告されているミクログリアおよびマクロファージに着目して検討を行った (20,24)。はじめに、虚血-再灌流処置後のマウス脳内におけるミクログリアおよびマクロファージの梗塞巣周囲への集積をミクログリアおよびマクロファージのマーカー Iba1 の免疫組織化学により検出した。野生型マウスでは、梗塞巣領域と非梗塞領域の境界部における Iba1 陽性細胞数が 24 時間から 72 時間後にかけて時間依存的に増大したが、TRPM2-KO マウスでは Iba1 陽性細胞数の増大が認められなかった (図 2-1A)。脳虚血 48 時間後および 72 時間後において、野生型マウスと比較して TRPM2-KO マウスでは Iba1 陽性細胞数の増大が有意に抑制された (図 2-1B)。

TRPM2 遺伝子欠損のミノサイクリン処置による神経保護作用への影響

テトラサイクリン系抗生物質であるミノサイクリンは、神経細胞やアストロサイトに影響を与えることなくミクログリア／マクロファージの活性化を抑制し、脳虚血傷害に対して神経保護作用を示すことが報告されている (45,46)。脳虚血後のミクログリアおよびマクロファージの活性化における TRPM2 の関与を明らかにするため、ミノサイクリンによる神経保護作用について比較検討した。野生型マウスではミノサイクリン投与群において有意な神経症状の改善が認められたが、TRPM2-KO マウスでは vehicle 投与群と比較してミノサイクリン投与群は神経症状に有意な差はなかった (図 2-2A)。また野生型マウスではミノサイクリン投与群において梗塞巣体積の有意な縮小が認められたが、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 (図 2-2B,2C)。この結果より、ミクログリアおよびマクロファージに発現する TRPM2 が、神経障害や梗塞巣の形成に関与することが示唆される。

TRPM2 遺伝子欠損の好中球の浸潤に対する影響

TRPM2 の機能的発現が報告されている好中球に着目して検討を行った (21)。脳虚血後のマウス脳内における好中球の浸潤を好中球のマーカー Gr1 の免疫組織化学により検出した。野生型マウスおよび TRPM2-KO マウスの双方において、梗塞巣領域の Gr1 陽性細胞数が 24 時間から 72 時間後にかけて時間依存的に増

大したが (図 2-3A)、野生型マウスと比較して TRPM2-KO マウスでは増大の程度が低く、脳虚血 48 時間後および 72 時間後において Gr1 陽性細胞数の増大が有意に抑制された (図 2-3B)。

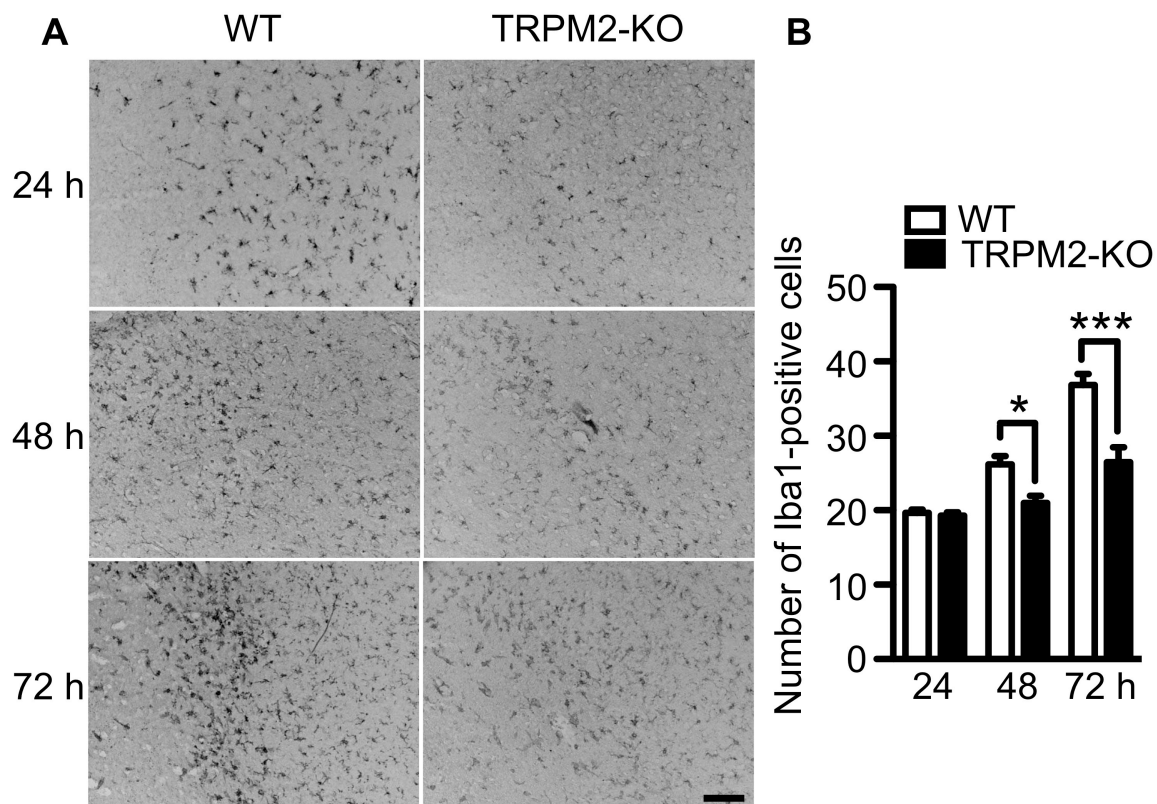


図 2-1 TRPM2 遺伝子欠損による梗塞巣周囲におけるミクログリア／マクロファージの集積抑制作用

- (A) 虚血-再灌流処置 24、48、72 時間後の梗塞巣周囲における Iba1 (ミクログリア／マクロファージのマーカー) の免疫染色画像。スケールバーは 200 μm である。
- (B) 虚血-再灌流処置 24、48、72 時間後の梗塞巣の境界領域における Iba1 陽性細胞の計数結果。1 枚の切片につき 4 視野 (200 μm x 200 μm) の Iba1 陽性細胞数を計数し平均値を算出した。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. n = 4-7.

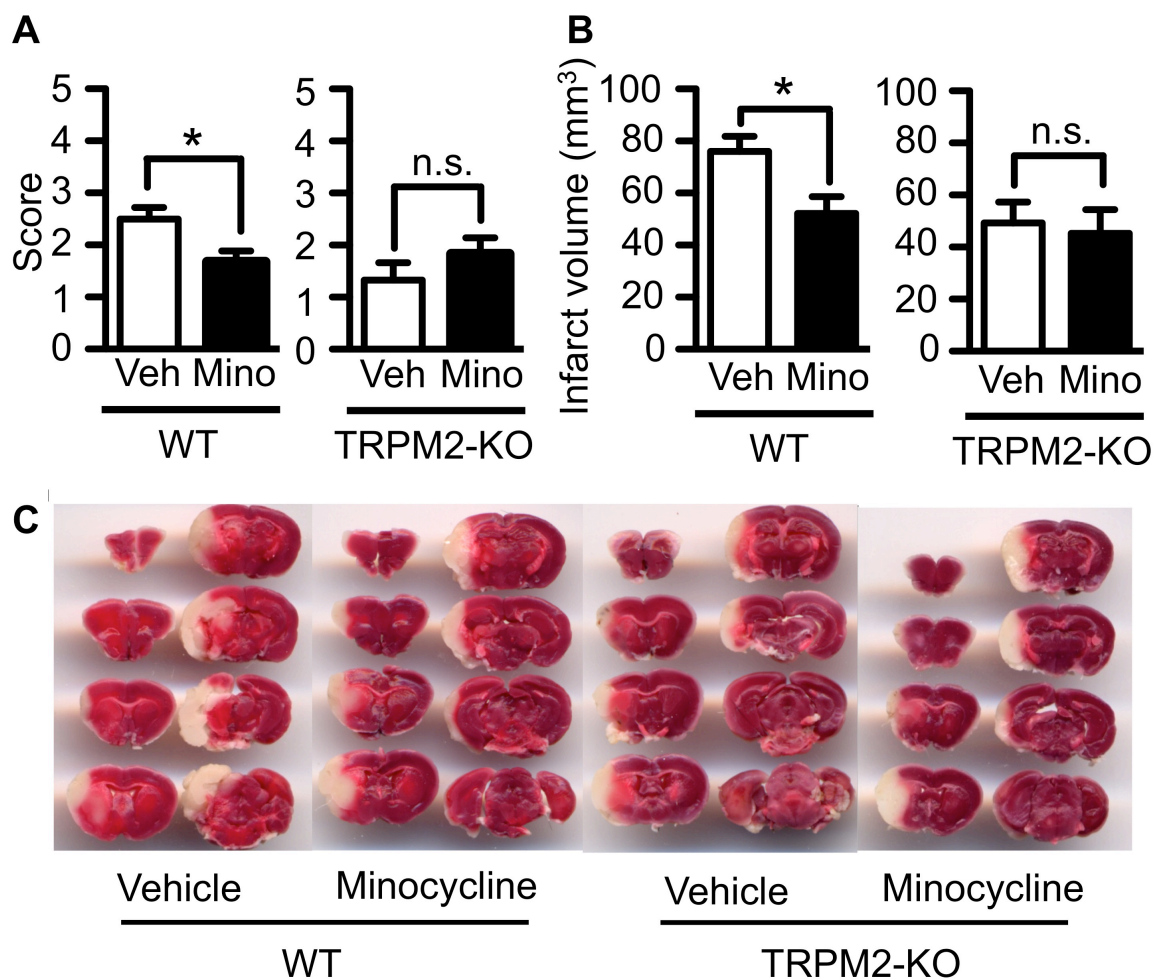


図 2-2 ミノサイクリンの脳虚血傷害に対する神経保護作用

- (A) 虚血-再灌流 48 時間後の神経症状に対するミノサイクリン(50 mg/kg) の作用。* $P < 0.05$. $n = 6$. n.s.: not significant.
- (B) 虚血-再灌流 48 時間後の梗塞巣体積に対するミノサイクリン(50 mg/kg) の作用。* $P < 0.05$. n.s.: not significant.
- (C) 虚血-再灌流 48 時間後の vehicle 投与群およびミノサイクリン投与群における TTC 染色画像の典型例。

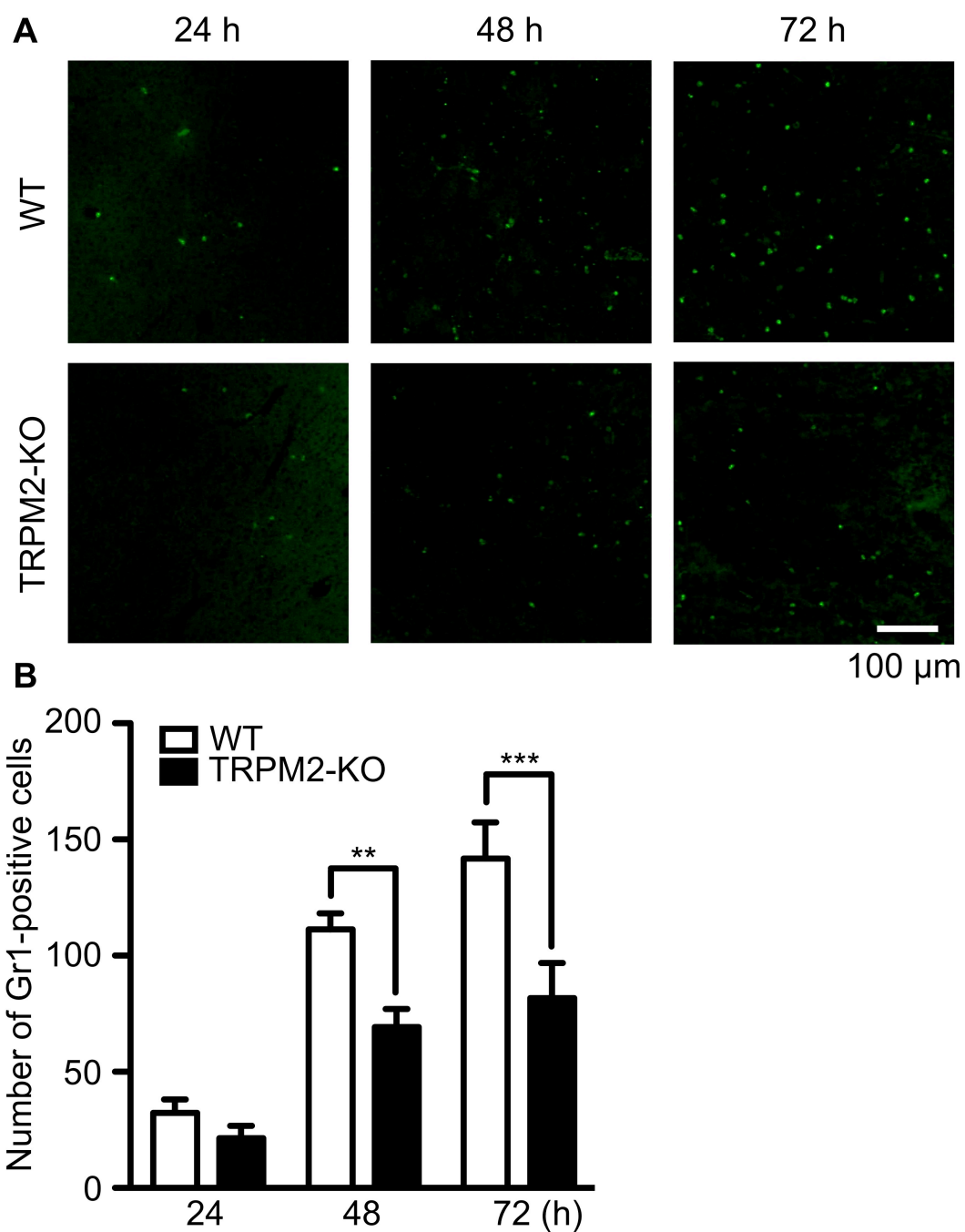


図 2-3 TRPM2 遺伝子欠損による好中球の浸潤抑制作用

(A) 虚血-再灌流処置 24、48、72 時間後の梗塞巣における Gr1 (好中球のマーカー) の免疫染色画像。スケールバーは 200 μ m である。

(B) 虚血-再灌流処置 24、48、72 時間後の梗塞巣における Gr1 陽性細胞数の計数結果。1 枚の切片につき 4 視野 (1 mm x 1 mm) の Gr1 陽性細胞数を計数し平均値を算出した。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 5-8$ 。

骨髄キメラマウスを用いた検討

常在性ミクログリアと末梢血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明らかにするために、GFP 陽性野生型マウスあるいはGFP 陽性TRPM2-KOマウス由来の骨髄由来細胞 (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検討に用いた。フローサイトメトリー解析より、骨髄移植 6 週間後には末梢血中の骨髄由来細胞の 90%以上が GFP 陽性細胞であることを確認し、末梢血のほとんどがドナーマウス由来の骨髄由来細胞に置換されていることが示唆された (図 2-補足)。脳虚血 72 時間後の神経症状を評価したところ (図 2-4A,4B)、中枢神経系および末梢骨髄由来細胞の双方に TRPM2 を有しているキメラマウス (TRPM2-BM⁺/Rec⁺) に比べ、中枢神経系および骨髄由来細胞の双方で TRPM2 を欠損したキメラマウス (TRPM2-BM⁻/Rec⁻) は神経症状が有意に改善した。また末梢骨髄由来細胞でのみ TRPM2 を欠損させたキメラマウス (TRPM2-BM⁻/Rec⁺) や中枢神経系でのみ TRPM2 を欠損したキメラマウス (TRPM2-BM⁺/Rec⁻) において、TRPM2-BM⁻/Rec⁻と同程度にまで神経症状が有意に改善した。この結果より、脳常在性の細胞および骨髄由来細胞の双方に発現する TRPM2 が神経障害の増悪に関与することが示唆される。

続いて、骨髄キメラマウスを用いて梗塞巣周囲のミクログリアおよびマクロファージの局在を検討した (図 2-4C)。Iba1 の免疫組織化学および GFP 陽性の骨髄由来細胞から、Iba 陽性/GFP 陰性細胞をミクログリア、Iba1 陽性/GFP 陽性細胞をマクロファージとした。Merge 画像より、梗塞巣周囲にはミクログリアおよびマクロファージの双方が局在することが認められた。この結果から、図 2-1 で観られた Iba1 陽性細胞数の増大にはミクログリアおよびマクロファージの双方が関与し、常在性ミクログリアおよび末梢由来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。

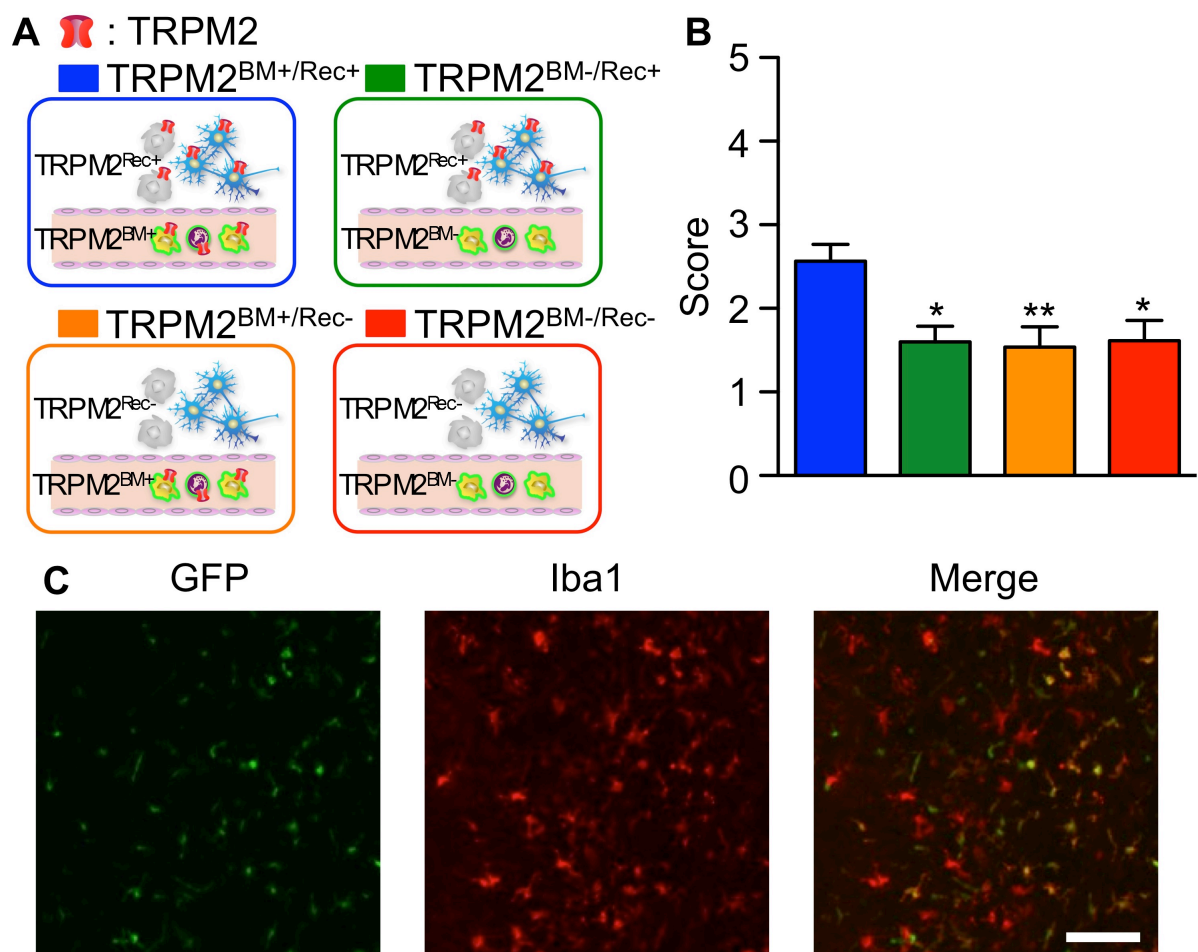


図 2-4 骨髄キメラマウスを用いた検討

- (A) 4 種類の骨髄キメラマウスを作成した (TRPM2^{BM+/Rec+}, TRPM2^{BM-/Rec+}, TRPM2^{BM+/Rec-}, TRPM2^{BM-/Rec-})。
- (B) 虚血-再灌流処置 72 時間後において、骨髄キメラマウスの神経学的スコアを評価した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. TRPM2^{BM+/Rec+}. $n = 5-11$.
- (C) 虚血-再灌流 72 時間後の梗塞巣周囲における GFP 蛍光 (左) と Iba1 の免疫染色像 (中)、Merge 画像 (右)。スケールバーは 100 μm である。

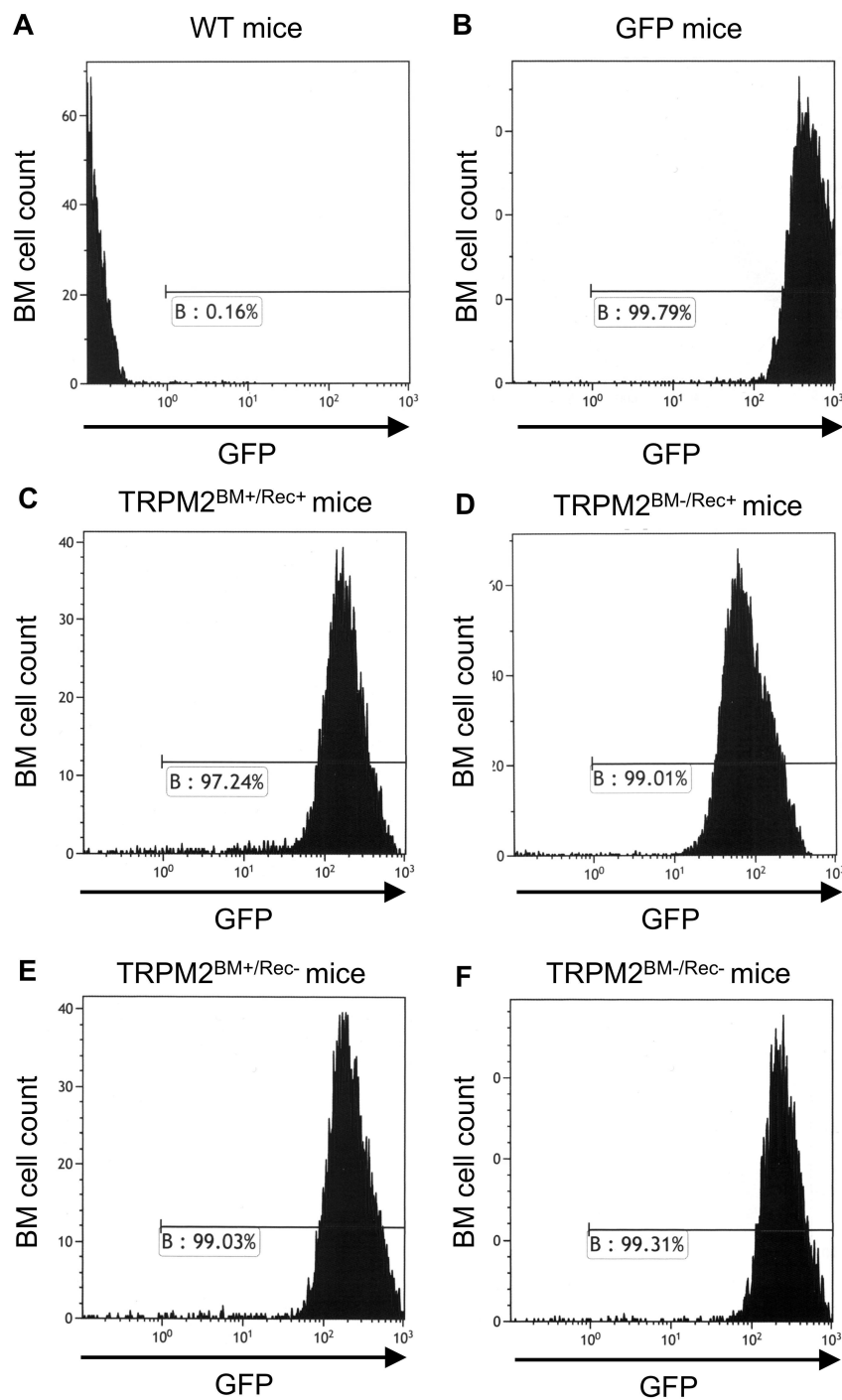


図 2-補足

TRPM2 欠損 GFP
キメラマウスの
フローサイトメ
トリー解析
フローサイトメ
トリーにより、移
植前に GFP 陰性
であった骨髄細胞 (A) が、移植
後には GFP トラ
ンスジェニック
マウス (B) と同
程度に、GFP 陽性
を示すことを確
認した (C-F)。

考察

本章において著者は、TRPM2-KO マウスでは脳虚血 48 時間および 72 時間後の梗塞巣周囲における Iba1 陽性細胞数の増大が抑制されること、またミクログリア／マクロファージ活性化抑制薬であるミノサイクリン投与により野生型マウスで観察された保護作用が TRPM2-KO マウスでは消失していることを示し、骨髄キメラマウスを用いた検討より、常在性ミクログリアあるいは骨髄由来マクロファージのどちらか片方でも TRPM2 を欠損することで神経症状が改善されることを示した。

梗塞巣周囲の Iba1 陽性細胞の浸潤に関しては、虚血-再灌流後の虚血領域において脳虚血 2、3 日後をピークとしてミクログリアやマクロファージの集積数が増大するという既報に一致する (39)。近年、これらの細胞の異常活性化により惹起される脳虚血後の過剰な炎症応答が遅発性神経傷害に対して増悪的に働くことが示唆されている。傷害を受けた細胞より漏出される細胞障害関連分子パターン (damage-associated molecular pattern molecules: DAMPs) が脳虚血 24 時間後の浸潤マクロファージを活性化し、その結果産生され、放出される IL23 が IL17 産生 T 細胞を誘導し、亜急性期以降の炎症応答を増悪させるという報告や (41,47)、ミクログリアに特異的に発現するイオンチャネルの機能抑制が脳虚血傷害の抑制につながるという報告 (48) を考慮すると、ミクログリアやマクロファージが深く関与する脳内炎症が脳虚血傷害の進展に対して増悪的に働くことが示されていると考えられる。第一章において、脳虚血 24 時間後では同程度であった神経症状や梗塞巣形成が、脳虚血 48 時間および 72 時間後においては野生型マウスで観察された病態の増悪が TRPM2 欠損により有意に抑制されていた。また、Iba1 陽性細胞数に関しても、脳虚血 24 時間後では同程度であったが、脳虚血 48 時間および 72 時間後においては、野生型マウスで観察された Iba1 陽性細胞数の増大が顕著に抑制されていた。この結果は日数の経過とともに病態が増悪するという脳内炎症仮説に沿う結果であり、TRPM2 欠損により脳内炎症が抑制されることにより最終的な保護作用が観察されたのではないかと推測できる。さらに、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を適用すると、野生型マウスでは保護作用が観察されたのに対して、TRPM2-KO マウスではそれ以上の緩解作用は観察されなかった。ペナンプラ領域におけるミクログリア／マクロファージは、細胞傷害性因子やケモカイン／サイトカインなどの炎症促進性因子を産生し脳内炎症を増悪させるという報告 (49) を考慮すると、ミクログリアまたはマクロファージに発現する TRPM2 の欠損が、TRPM2 欠損マウスにおける保護作用において重要であると考えられる。ミノサイクリンや Iba1 の免疫組織化学的検討ではミクログリアとマクロファ-

ジの判別が困難であるため、著者は骨髄キメラマウスを用いて中枢神経系および骨髄細胞のどちらに発現する TRPM2 が脳虚血傷害に対して寄与するのか検討を行った。意外にも、中枢神経系および骨髄由来細胞のどちらか片方の TRPM2 が欠損することで神経症状が改善した。この結果から、ミクログリア及びマクロファージの双方に発現する TRPM2 が脳虚血傷害の増悪に複合的に加担することが示唆される。

一方、脳虚血 48 時間および 72 時間後の時点において TRPM2 欠損により梗塞巣領域の Gr1 陽性細胞数の増大が抑制されていた。TRPM2 が好中球に発現していることや (21)、TRPM2 欠損により好中球の遊走能や接着因子の発現量が低下し、結果として心筋虚血再灌流傷害に対して保護作用を示すことが近年報告されていることを踏まえると (50)、TRPM2 欠損は好中球の機能抑制を介して、脳虚血傷害を抑制していることが想定される。しかしながら、脳虚血傷害では心筋虚血再灌流傷害とは異なり、好中球の浸潤は病態に影響を与えないという報告があり (51,52)、ミクログリア／マクロファージのケモカインおよびサイトカイン遊離抑制が引き続き惹起される好中球の浸潤抑制につながることから、好中球の浸潤抑制はミクログリア／マクロファージの細胞機能抑制の後に起こる事象とも考えられる。本章においてミノサイクリンによる保護作用が TRPM2-KO マウスにおいて消失していたことから、好中球の浸潤抑制は TRPM2 による脳虚血傷害には影響しないと考えられる。

以上、本章において著者は、TRPM2 による脳虚血傷害の病態形成過程では、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 が関与することを明らかにした。

第三章 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

第二章において著者は、脳虚血の亜急性期に集積が認められる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 が脳虚血傷害の形成に関与することを明らかにした。そこで第三章では、ミクログリア／マクロファージに発現する TRPM2 がどのような機序により脳虚血傷害を増悪させるか検討した。近年、脳虚血傷害時に組織傷害に伴い細胞外へと漏出される DAMPs の一部が toll like receptor (TLR) 4 や TLR2 の内因性リガンドとしてミクログリアおよびマクロファージなどの免疫細胞に作用し、惹起される炎症応答が遅発性神経傷害を増悪させることが示唆されているが、神経傷害を増悪させるメカニズムやその機能制御につながる標的分子はほとんど解明されていない。著者の所属する研究室では以前、TRPM2 欠損ミクログリアでは、LPS/IFN γ 刺激後の誘導型一酸化窒素合成酵素 iNOS mRNA 発現量増大や NO 遊離が抑制されていることを報告している (25)。

脳虚血傷害後には、ミクログリアおよびマクロファージなどの免疫細胞において iNOS が de novo 合成される (53)。iNOS の薬理的阻害薬は脳虚血傷害に対して神経保護作用を示すことや (54)、iNOS の遺伝子欠損マウスでは脳虚血傷害が改善することが報告されており (55)、iNOS により過剰産生される NO が酸化的ストレスや DNA 損傷などを介して細胞傷害的に働くことが示唆されている (56)。

そこで本章において著者は、一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスにおいても、TRPM2 が iNOS 発現誘導に関与するのかりアルタイム RT-PCR および免疫組織化学的手法を用いて検討した。続いて、iNOS の選択的阻害薬である 1400W を用いて、TRPM2 による脳虚血傷害の増悪機構として iNOS が関与するのかが検討した。さらに、培養ミクログリアおよび培養マクロファージを用いて、TLR4 および TLR2 アゴニストによる活性化刺激後の NO 遊離に対する TRPM2 の関与を検討した。

実験方法

使用動物

第一章実験方法に同じ。

試薬

本研究に用いた試薬を以下に示す。

1400W は Cayman (Ann Arbor, MI, USA) より購入した。LPS は Sigma (St. Louis, MO, USA) より購入した。LTA は Invivogen (San Diego, CA, USA) より購入した。Interferon (IFN) - γ は Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA) より購入した。その他については、第一章実験方法に同じ。

薬物の調整と投与

1400W (20 mg/kg) は生理食塩水を用いて投与量が 10 μ l/g となるように調整した。テルモシリンジ (1 ml ツベルクリン用 SS-01T、テルモ、東京) とテルモ注射針 (26G NN-2613S、テルモ、東京) を接続したものをを用い、再灌流 18 時間後より 8 時間毎に皮内投与した。

マウス中大脳動脈一過性閉塞モデルの作製

第一章実験方法に同じ。

局所脳血流量 (rCBF; regional cerebral blood flow) の測定

第一章実験方法に同じ。

神経症状の評価

第一章実験方法に同じ。

梗塞巣体積の評価

第一章実験方法に同じ。

免疫染色法

第一章実験方法に同じ。

リアルタイムRT-PCR法

摘出した虚血脳組織は液体窒素を用いて急速冷却し、使用するまで -80°C で保存

した。マウス脳からの全RNAの抽出はISOGEN® (Nippon Gene, Tokyo) を用いて、仕様書に基づいて行った (57) 。ReverTra Ace® (Toyobo, Osaka) を用いて全RNAをcDNAに逆転写し、全RNA 1 µg分に相当するcDNAをTHUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (Toyobo, Osaka) を用いて全量20 µlにて定量的リアルタイムRT-PCRを行った。反応は、StepOne™ real-time PCR system (Applied Biosystems) を用い、95°Cで10分、その後95°Cで10秒、60°Cで60秒を40サイクルのプログラムで行った。解析にはStepOne™ software (Applied Biosystems) を用いた。PCR産物の確認は、融解曲線により行った。各mRNAの発現量は、標準曲線法を用いて計算し、内部標準として測定したHPRT1のmRNA発現量との相対的な値として表現した。用いたマウス用のプライマーは以下の通りである。

TRPM2 (Fw: 5'-ACA GAC AAT GCC TGG ATC G-3' , Rv: 5'-TGG ATC ATG AGT GTG CAG GT-3') , iNOS (Fw: 5'-AGA AGG GGA CGA ACT CAG TG-3' , Rv: 5'-GCT TCG GAC ATC AAA GGT CT-3') , CXCL2 (Fw: 5'-AAA ATCA TCC AAA AGA TAC TGA ACA A-3' , Rv: 5'-CTT TGG TTC TTC CGT TGA GG-3') , TNFα (Fw: 5'-TGC CTA TGT CTC AGC CTC TTC-3' , Rv: 5'-GAG GCC ATT TGG GAA CTT CT-3') , HPRT1 (Fw: 5'-GTT AAG CAG TAC AGC CCC AAA ATG-3' , Rv: 5'-AAA TCC AAC AAA GTC TGG CCT GTA-3')

マウス新生仔由来培養ミクログリアの調製

培養ミクログリアは、C57BL6/J マウス新生仔 (0-1 day ; 日本 SLC) の全脳より単離培養した。氷冷麻酔を行ったマウス新生仔より全脳を摘出し、0.25% trypsin 及び 0.1 mg/ml bovine pancreatic DNase (Sigma, St. Louis, MO, USA) を含有する Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, D5796, Invitrogen) を用いて、15 分間 37°C で処理した。1700rpm で 5 分遠心後、培養液は 10%非働化ウシ血清 (FBS, JRH Biosciences) 、5 µg/ml インスリン (Sigma) 、1% antibiotic-antimycotic solution (ナカライテスク) を含む DMEM 培地に再懸濁し、75 cm² の培養フラスコに播種し、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。2 日後に培地を交換した後、以降 3-4 日毎に培地を交換した。2-3 週間後、培養フラスコを 150 rpm で 90 分振盪後、上清を回収しペトリ皿 (BD Falcon, #351029) に播種した。

腹腔マクロファージの調製

7-9 週齢の C57BL/6J マウスに超純水で調整した 4%チオグリコレート (Difco Laboratories) を 1 ml 腹腔内投与した。投与 3 日後にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、腹側の皮膚を剥離し腹膜を露出させた。滅菌処理した冷 PBS 4 ml を腹腔内に注入し、針を抜き手指で腹部をよく揉み込んだ後、再度針を刺して細胞を回収した。2000 rpm で 10 分遠心後、10%非働化ウシ血清 (FBS, JRH

Biosciences) 、1% Penicillin-Streptomycin を含む RPMI-1640 培地 (Sigma) に再懸濁し、ペトリ皿 (RepCell™, cellSeed, Tokyo) に $0.5-1.0 \times 10^6$ cells/ml の細胞密度で播種し、37°C、5% CO₂ インキュベーターで2時間培養した。RPMI-1640 培地 (37°C) で洗浄し、RPMI-1640 培地 (室温) を加えて室温で30分静置した後、細胞回収した。

NO 蓄積量の測定

1% sulphanilamide (Sigma) 、2.5% phosphoric acid (Sigma) 、0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride (Sigma) を超純水に溶解させ、Griess 試薬を調整した。細胞上清を Griess 試薬と 1 : 1 で混合し、10 分間室温で反応させ、microplate reader を使用して 540 nm の吸光度を測定した。

統計解析

値は全て、平均値±標準誤差で表記した。二群間の差は Student's t-test により、三群以上の差は、one-way あるいは two-way ANOVA および Bonferroni *post hoc* test を用いて、Prism 5 software (GraphPad) により解析した。危険率 5%未満の場合には統計学的に有意な差があると判定した。

実験結果

脳虚血再灌流後の炎症関連遺伝子の mRNA 発現量変化

ミクログリア／マクロファージに発現する TRPM2 がどのような機序により脳虚血傷害を増悪させるか検討した。はじめに、脳虚血傷害時に発現上昇し神経傷害や炎症応答を惹起させる iNOS、CXCL2、TNF α について梗塞巣周囲における mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR を用いて検討した。その結果、野生型マウスと比較して TRPM2-KO マウスでは脳虚血 72 時間後での iNOS mRNA 発現量の上昇が有意に抑制されていたが、CXCL2 および TNF α mRNA 発現量には有意な差は認められなかった (図 3-1)。この結果より、iNOS および iNOS を介して産生される NO に着目して検討を進めた。

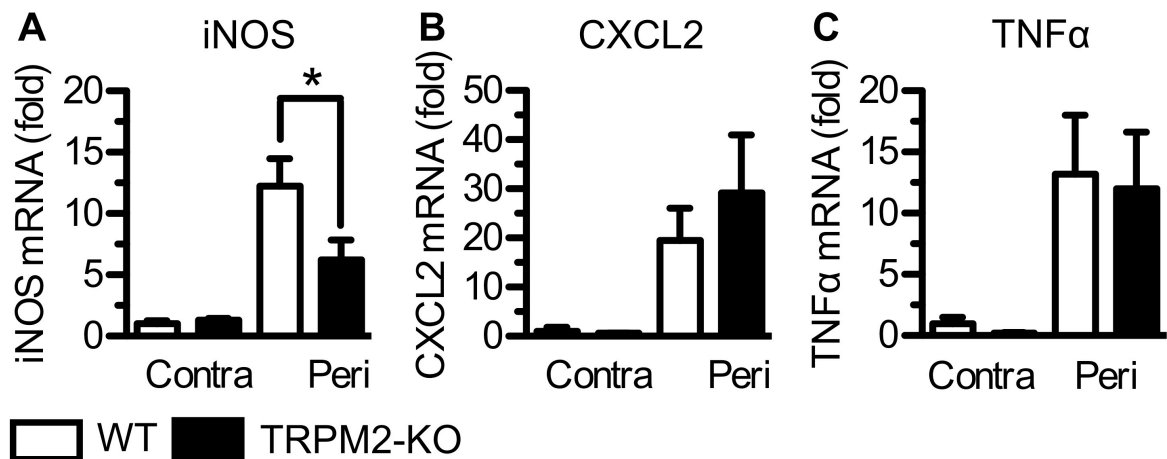


図 3-1 虚血-再灌流処置 72 時間後の iNOS (A)、CXCL2 (B)、TNF α (C) の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法にて検出した。内部標準として HPRT1 を用い、野生型マウスのコントロール群の平均値を 1 とした相対的な値を示した。
* $P < 0.05$. $n = 3-9$. Contra: contralateral, Peri: peri-infarct area.

TRPM2 遺伝子欠損の iNOS 選択的阻害薬 1400W による神経保護作用への影響

脳虚血時にはミクログリア／マクロファージにおいて 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 (52,54)。また、iNOS 遺伝子欠損マウスや iNOS 阻害薬は脳虚血傷害に対して神経保護作用があることが報告されている (53,54)。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、野生型マウスでは 1400W 投与群において有意な神経症状の改善と梗塞巣体積の縮小が認められたが、TRPM2-KO マウスでは vehicle 投与群と比較して 1400W 投与群は神経症状や梗塞巣体積に有意な差はなかった。

(図 3-2)。この結果より、TRPM2 を介した iNOS の発現が、神経障害や梗塞巣の形成に関与することが示唆された。

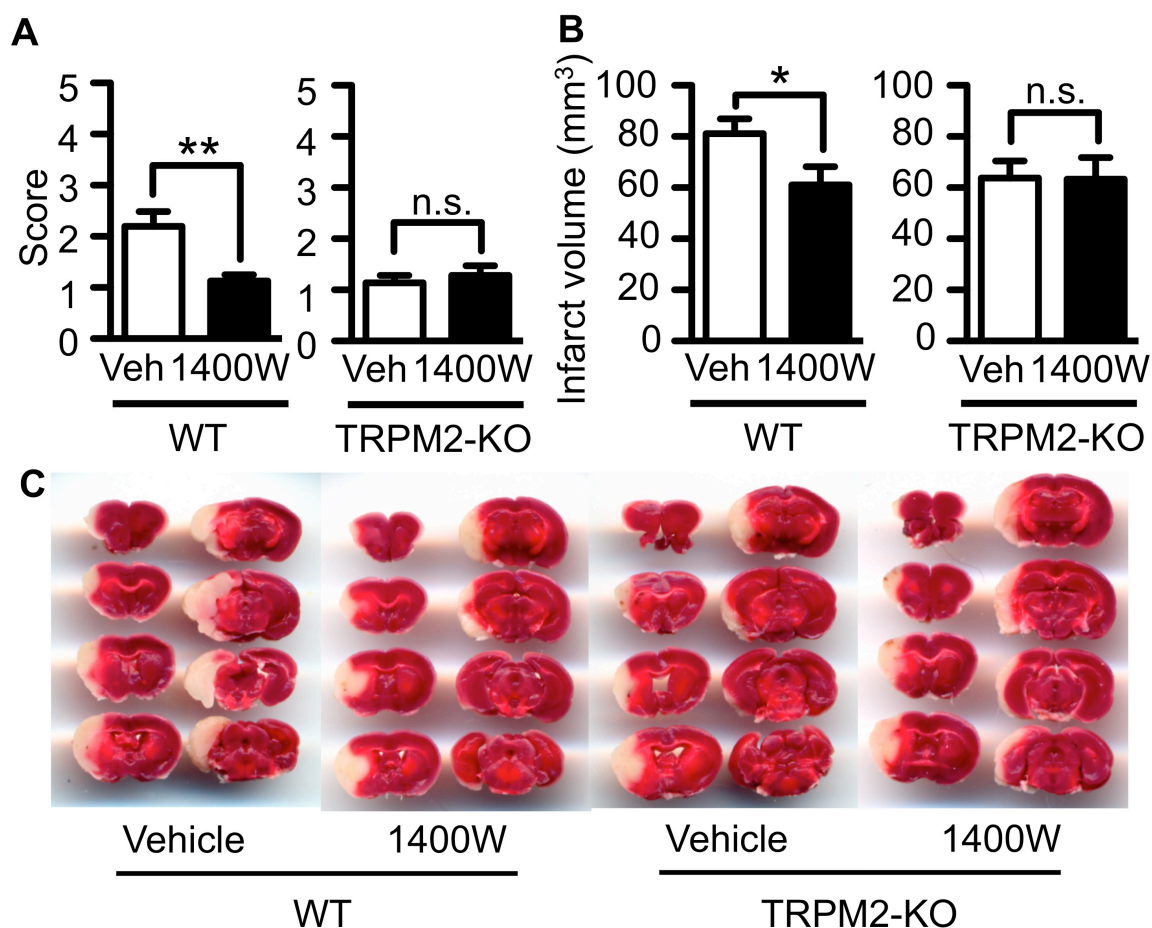


図 3-2 1400W の脳虚血傷害に対する神経保護作用

- (A) 虚血-再灌流 72 時間後の神経症状に対する 1400W (20 mg/kg) の作用。 $**P < 0.01$, $n = 6-10$. n.s.: not significant.
- (B) 虚血-再灌流 72 時間後の梗塞巣体積に対する 1400W (20 mg/kg) の作用。 $*P < 0.05$. n.s.: not significant.
- (C) 虚血-再灌流 72 時間後の vehicle 投与群および 1400W 投与群における TTC 染色画像の典型例。

TRPM2 遺伝子欠損の梗塞巣周囲における iNOS 発現量に対する影響

続いて、梗塞巣周囲の iNOS の局在と発現量に対する TRPM2 の影響を iNOS の免疫組織化学により検討した。その結果、脳虚血 72 時間後の虚血側では iNOS の顕著な発現増大が認められ、反対側では発現は観られなかった (図 3-3A, 3B)。iNOS および Iba の二重染色像より、iNOS は Iba1 陽性細胞に局在することが確認された (図 3-3A)。さらに、梗塞巣周囲の iNOS 発現量を蛍光強度より定量したところ、野生型マウスに比較して TRPM2-KO マウスでは iNOS の蛍光強度が有意に低下していた (図 3-3B, 3C)。これらの結果より、TRPM2 遺伝子欠損により梗塞巣周囲のミクログリアおよびマクロファージの iNOS 発現量増大が抑制されていることが示唆された。

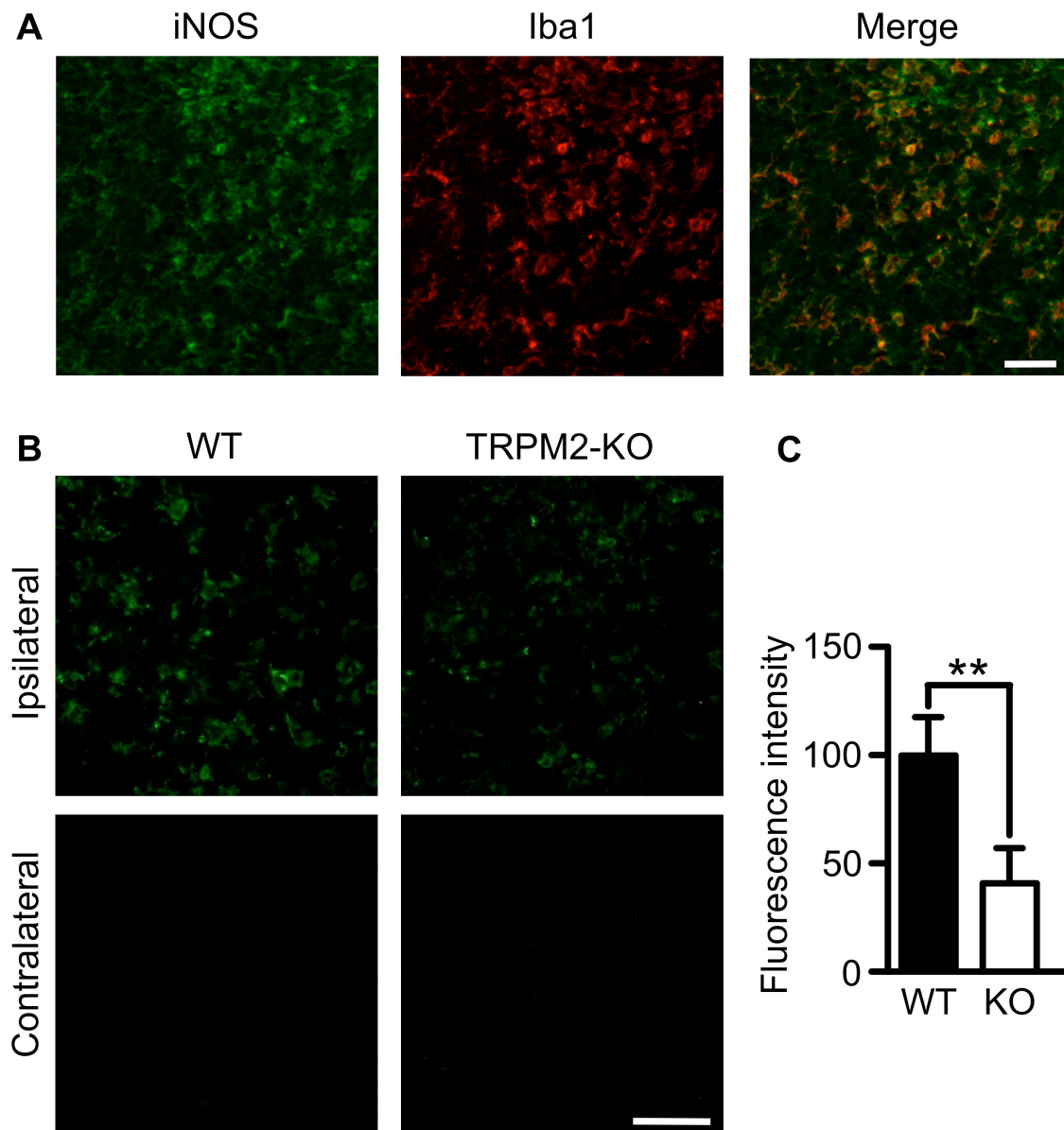


図 3-3 梗塞巣周囲の iNOS の局在および発現量に関する免疫組織化学的検討

- (A) 虚血-再灌流 72 時間後の梗塞巣周囲における iNOS (緑) および Iba1 (赤) の免疫染色画像。スケールバーは 100 μm である。
- (B) 梗塞巣周囲における iNOS の蛍光強度を測定した。 $**P < 0.01$. $n = 4-6$.

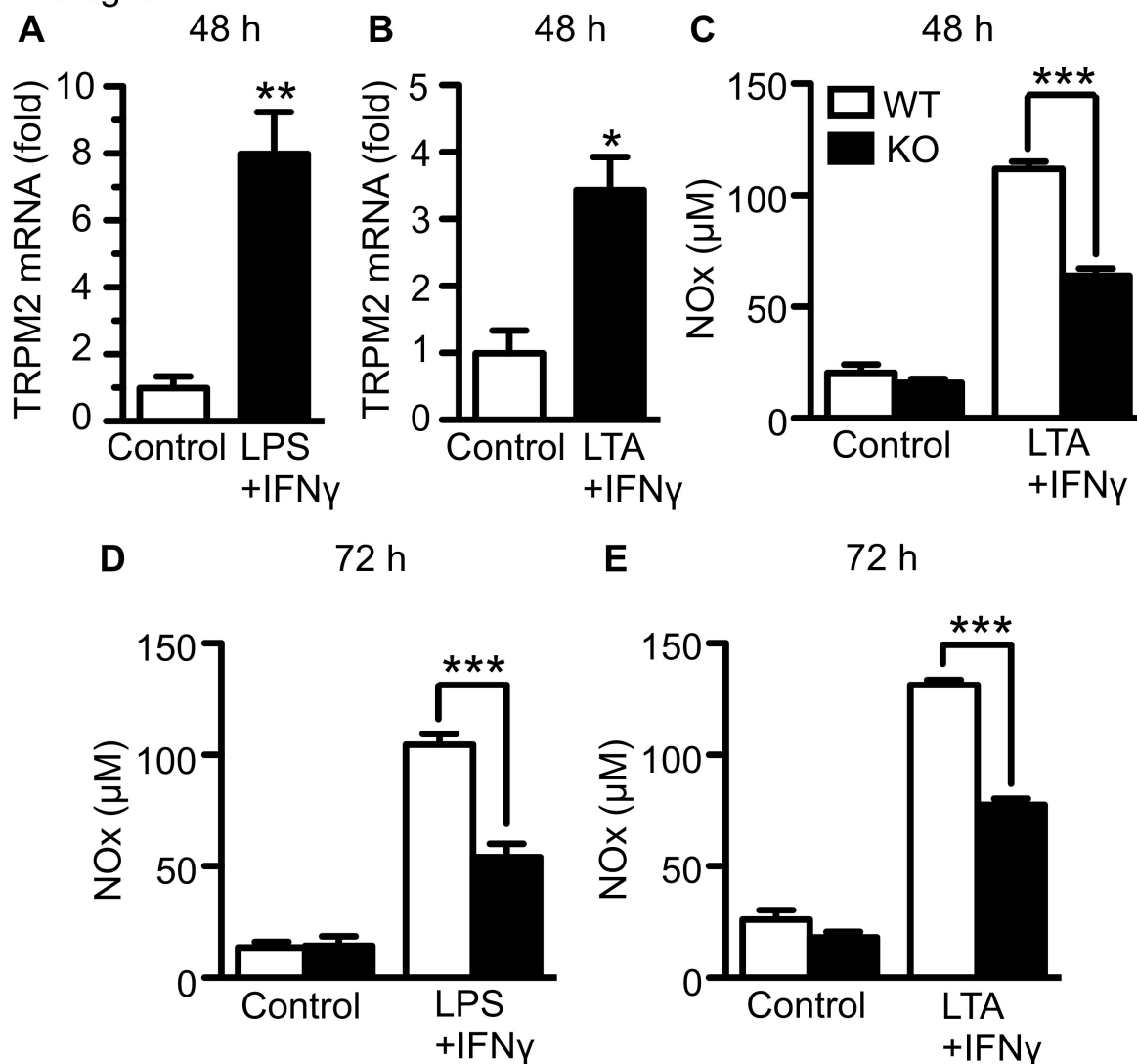
LPS および LTA 活性化刺激後の NO 産生に対する TRPM2 欠損の影響

ミクログリアおよびマクロファージに発現する TRPM2 が直接的に NO の過剰産生に関与しているのか検討するために、培養ミクログリアおよび培養マクロファージを用いて活性化刺激後の上清の NO 蓄積量を測定した。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 (47)。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。はじめに、培養ミクログリアおよび培養マクロファージにおいて LPS/IFN γ および LTA/IFN γ 活性化刺激 48 時間後の TRPM2 mRNA 発現量が有意に増大していることをリアルタイム RT-PCR により確認した (図 3-4A, 4B, 図 3-5A, 5B)。著者が所属する研究室では、LPS および IFN γ の共処置により野生型マウス由来ミクログリアにおいて活性化刺激 48 時間後の iNOS mRNA の発現増大と NO 蓄積量の増大が認められ、TRPM2-KO マウス由来ミクログリアでは有意に抑制されることを明らかにした (25)。同様に、TRPM2-KO マウス由来培養マクロファージでは LPS/IFN γ 共処置により活性化刺激 48 時間後の NO 蓄積量が有意に抑制された (図 3-5C)。さらに、活性化刺激 72 時間後では培養ミクログリアおよび培養マクロファージのいずれにおいても TRPM2-KO 由来細胞での NO 蓄積量がより顕著に抑制された (図 3-4D, 図 3-5E)。一方、LTA/IFN γ の共処置により野生型マウス由来培養ミクログリアおよびマクロファージにおいて NO 蓄積量が増大し、TRPM2-KO マウス由来ミクログリアおよびマクロファージでは NO 蓄積量の増大が有意に抑制された (図 3-4C, 4E, 図 3-5D, 5F)。これまでの結果より、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唆される。

図 3-4 ミクログリアにおける LPS/IFN γ および LTA/IFN γ 誘発 NO 産生に対する TRPM2 欠損の影響

TRPM2 の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法にて定量した (A,B) 。内部標準として HPRT1 を用い、野生型マウスのコントロール群の平均値を 1 とした相対的な値を示した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control. $n = 3-6$. LPS/IFN γ (D) および LTA/IFN γ (C,E) 活性化刺激後の NO 産生を検討した。細胞上清の NO 蓄積量は Griess 試薬を用いて検出した。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. $n = 4-5$.

Microglia



Macrophage

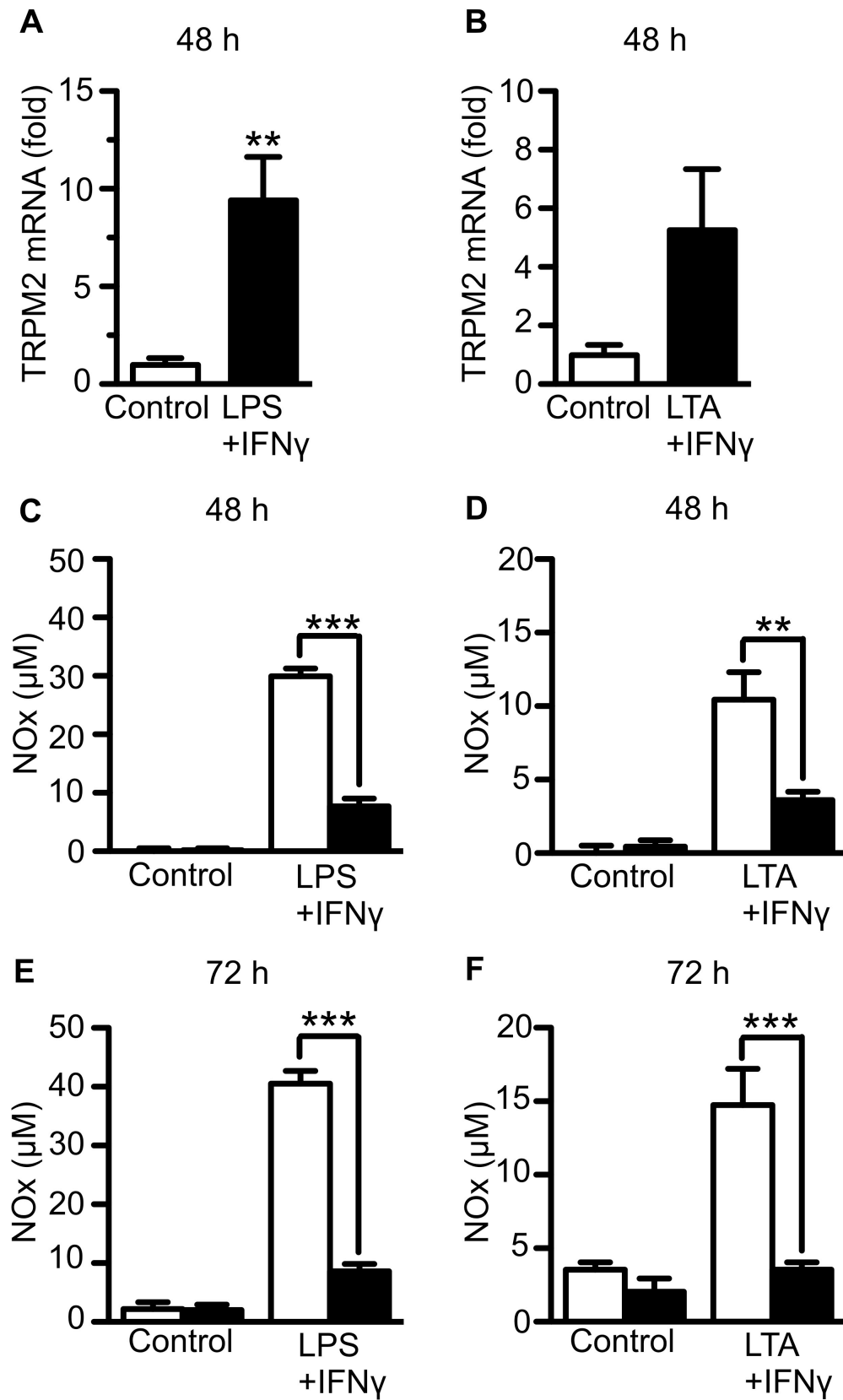


図 3-5 マクロファージにおける LPS/IFN γ および LTA/IFN γ 誘発 NO 産生に対する TRPM2 欠損の影響

TRPM2 の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法にて定量した (A,B) 。内部標準として HPRT1 を用い、野生型マウスのコントロール群の平均値を 1 とした相対的な値を示した。 ** $P < 0.01$ vs. control. $n = 4$. LPS/IFN γ (C,E) および LTA/IFN γ (D,F) 活性化刺激後の NO 産生を検討した。細胞上清の NO 蓄積量は Griess 試薬を用いて検出した。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. $n = 5-9$.

考察

本章において著者は、梗塞巣周囲のiNOSのmRNA発現量および蛍光強度がTRPM2欠損により減少していることを見出し、iNOS選択的阻害薬投与により野生型マウスで観察された保護作用がTRPM2-KOマウスでは消失していることを示した。またTRPM2欠損ミクログリア／マクロファージにおいてTLR4およびTLR2のアゴニスト刺激後のNO産生が減弱していることを示した。これらの結果から、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として、TLR2/TLR4刺激の下流でTRPM2が活性化し、iNOS発現によるNOの過剰産生という経路が重要であると考えた。iNOS遺伝子欠損マウスや、iNOS阻害薬は脳虚血傷害に対して保護的に働くことが知られている (54)。本章においてもiNOS選択的阻害薬1400W投与により野生型マウスでは既報と一致して神経傷害や梗塞巣形成が抑制されたが、TRPM2KOマウスでは1400Wの保護作用が消失していたことから、iNOS抑制がTRPM2-KOマウスにおける緩解作用のメカニズムとなることが強く示唆される。一方、TLR2遺伝子欠損マウス (58-60) およびTLR4遺伝子欠損マウス (40,60,61) は脳虚血傷害に対して保護作用を示すことが知られており、脳虚血時に遊離されるPxr5/Pxr6、HMGB1、S100A8/S100A9などのTLR2/TLR4の内因性アゴニストが傷害シグナルとしてグリア細胞や免疫細胞を活性化し、遅発性神経傷害に対して増悪的に働くことが報告されている (47,62,63)。それゆえ、著者はミクログリアおよびマクロファージに発現しているTLR2/TLR4が脳虚血傷害の病態において過剰に刺激されていると想定した。著者が所属する研究室では以前、TRPM2欠損ミクログリアでは、LPS/IFN γ 刺激後のiNOS mRNA発現量増大やNO産生が顕著に抑制されていることを見出している (25)。今回新たに、LTA/IFN γ 刺激後のTLR2を介したNO産生もTRPM2欠損で顕著に抑制されることを見出した。時間を延長させて72時間で観察するとより強いNO産生抑制が観察されたことや、生体内でのiNOS発現細胞の大部分はミクログリア／マクロファージであるという報告 (64)、ミクログリアのTLR2刺激がiNOS過剰発現を介して海馬神経細胞死を惹起するという報告 (65) を考慮すると、ミクログリア／マクロファージのTRPM2欠損により細胞傷害性のNO過剰産生が顕著に抑制され、TRPM2-KOマウスにおける脳虚血傷害の保護作用に至っていると強く推察される。

ミクログリア／マクロファージのTLR2/TLR4刺激下でiNOSが発現する際に、TRPM2はどのような経路を介して開口し、iNOS発現増大に関与しているのだろうか。TLR2/TLR4刺激の下流ではNADPH oxidase (NOX) が活性化し、NOXを介して産生される過酸化水素がTRPM2を開口してCa²⁺流入を惹起していることが報告されている (66)。また、ミクログリア／マクロファージに強く発現す

る NADPH oxidase 2 (NOX2) の遺伝子欠損マウスでは脳虚血傷害が緩解されることが報告されていることは大変興味深い (67,68)。著者の所属する研究室では、ミクログリアにおける TLR4 刺激の下流において NOX が活性化し、その結果 TRPM2 が活性化し、Ca²⁺感受性キナーゼである Pyk2 の活性化およびその後の JNK、p38 の活性化を介して遺伝子発現が上昇し、iNOS 発現および NO 過剰産生に至ることを明らかにした (69)。このような経路がミクログリア／マクロファージの TLR2/TLR 4 刺激の下流で iNOS が発現する過程に共通して存在しているのではないかと強く推認する。一方 TLR2/TLR 4 刺激の下流では、PKA や PKC の活性化を介した CD38 の活性化や、PARP1 の活性化も報告されており (70,71)、CD38 や PARP1 の活性化により、TRPM2 の内因性アゴニストである cADPR や ADPR が産生されることはよく知られている (17)。さらに、CD38 遺伝子欠損マウス (72) や PARP1 遺伝子欠損マウス (73) は脳虚血傷害を抑制することが報告されていることから、TRPM2 活性化の上流でこれらの分子が活性化していることが十分想定できる。

TRPM2 の脳虚血傷害には性差があることが知られている (28)。興味深いことに、PARP1 遺伝子欠損マウス、iNOS 遺伝子欠損マウスおよびミノサイクリンの脳虚血傷害に対する保護作用にも性差があり (46,73,74)、これらの脳虚血傷害の保護作用は雄にしか観察されないと報告されている。NOX 活性化の下流に PARP1 活性化があることが報告されていることも考慮すると (75)、ミクログリア／マクロファージの TLR2/TLR 4 刺激の下流で TRPM2 活性化に至る経路には、NOX2 や CD38、PARP1 が複合的に絡んでいると推測されるが、今後の更なる研究が必要であると考えられる。

著者が所属する研究室や共同研究先において TRPM2-KO 由来マクロファージでは CXCL2 の遊離が抑制されることが報告されている (24,25)。CXCL2 は好中球の浸潤を増大させ、炎症応答の維持および増悪に関与するとされている (76)。本章において脳虚血後の CXCL2 mRNA 発現量について検討したところ、野生型マウスおよび TRPM2-KO マウスの双方において、mRNA 発現量が同程度にまで増大した。マクロファージやミクログリアから CXCL2 が TRPM2 依存的に遊離されることを以前示したが、今回の結果では差がなかったという矛盾については明らかではない。しかしながら、脳虚血傷害の病態において顕著に産生遊離される CXCL2 はアストロサイトや血管内皮細胞由来であることが報告されているため (76)、今回観察された CXCL2 mRNA 量増大は TRPM2 非依存的にこれらの細胞より産生されたと考えるのが妥当である。また CXCL2 や CXCR2 のシグナリングは、脳虚血傷害に対して神経傷害的あるいは神経保護的に働くのかについては議論の余地があり、解明されていないことも踏まえると (76)、TRPM2 欠損による脳虚血傷害の保護作用には CXCL2 のシグナリングは関係な

いと推測される。TNF α mRNA 発現にも TRPM2 欠損は影響を与えなかったことも考慮すると、TRPM2 欠損による iNOS 発現抑制がミクログリア／マクロファージの細胞傷害作用の制御に重要であると考えられる。

以上、本章において著者は、自然免疫系の細菌感染時の炎症性サイトカイン産生に関与し免疫応答を媒介する TRPM2 が (77)、脳虚血の病態ではミクログリア／マクロファージにおいて iNOS を介した NO 産生による脳虚血傷害の増悪に関与することを明らかにした。

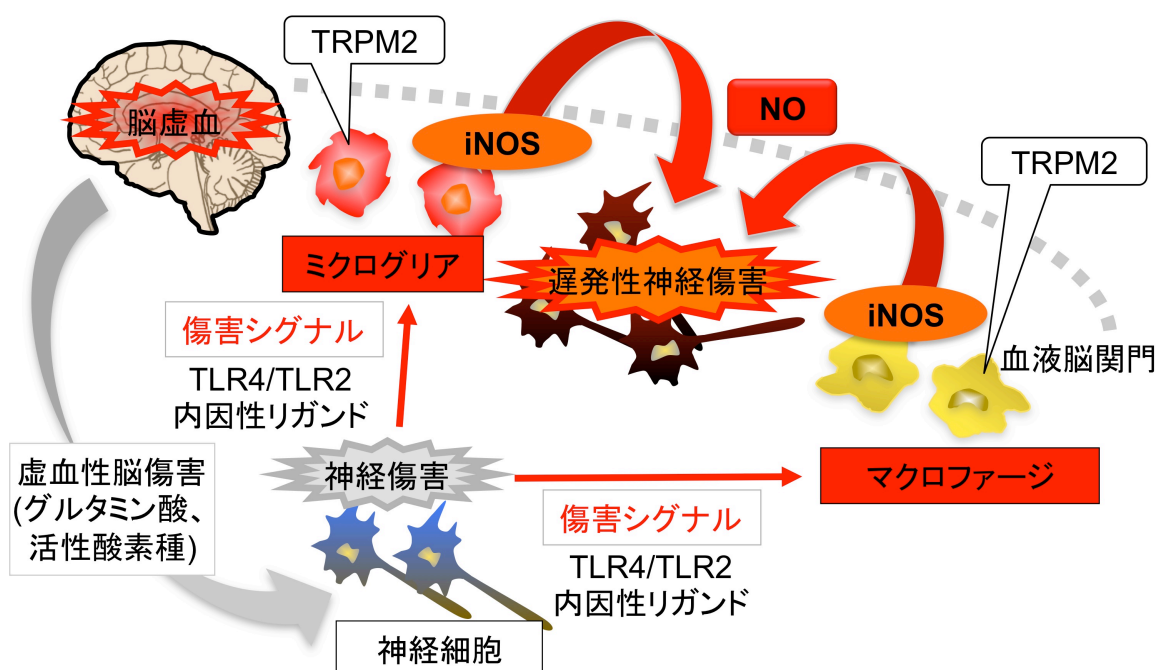


図 3-6 TRPM2 を介した脳虚血傷害の増悪機構

脳虚血後に傷害を受けた細胞より放出される傷害シグナルによりミクログリアおよびマクロファージが活性化され、ミクログリア／マクロファージの 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。

総括および結論

本研究において著者は、脳虚血傷害後の病態形成における TRPM2 に関する検討を行い、以下の新規知見を得た。

TRPM2 遺伝子欠損により神経症状や梗塞巣体積は脳虚血 24 時間後の急性期では変化がなく、48 時間および 72 時間後では神経症状の改善と梗塞巣体積の増大抑制が観察された。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し、4 日目以降の生存率の低下へとつながることを明らかとした。

TRPM2 遺伝子欠損により脳虚血 48 時間および 72 時間後の梗塞巣周囲における Iba-1 陽性細胞数の増大が抑制された。またミクログリア／マクロファージの活性化抑制薬ミノサイクリン投与により野生型マウスで観察された保護作用が TRPM2-KO マウスでは全く観察されなかった。さらに、骨髄キメラマウスを用いた検討より、常在性ミクログリアあるいは骨髄由来マクロファージのどちらか片方でも TRPM2 を欠損することで神経症状が改善した。以上の結果より、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 が脳虚血傷害に対して増悪的に働くことを明らかとした。

iNOS の選択的阻害薬 1400W 投与により野生型マウスで観察された保護作用が TRPM2-KO マウスでは全く観察されなかった。TRPM2 遺伝子欠損により、梗塞巣周囲の iNOS mRNA 発現量が減少し、梗塞巣周囲のミクログリアおよびマクロファージの iNOS 発現が減少した。さらに、TLR4 および TLR2 活性化刺激後の NO 過剰産生が TRPM2-KO マウス由来ミクログリアおよびマクロファージで抑制された。以上の結果より、ミクログリア／マクロファージに発現する TRPM2 を介した iNOS の過剰発現による NO の過剰産生が、脳虚血傷害の増悪に関与することを明らかとした。

以上、著者は、TRPM2 が脳虚血の亜急性期において脳虚血傷害の病態を増悪させることを明らかにし、その機序として脳虚血後のミクログリア／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、TRPM2 がミクログリア／マクロファージによる過剰な炎症応答に重要な役割を果たすことを示唆するものであり、脳虚血傷害に伴う遅発性神経傷害の新たな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。

謝辞

本研究に際しまして、終始懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 金子周司 教授に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、多くの有益な御助言を頂きました京都大学大学院薬学研究科 白川久志 助教並びに中川貴之 准教授 (京都大学医学部附属病院薬剤部副薬剤部長) に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言を頂きました名古屋大学大学院創薬科学研究科 赤池昭紀 教授、京都大学大学院薬学研究科 久米利明 准教授、泉安彦 助教、エーザイ株式会社 新留徹広 博士 (元京都大学大学院薬学研究科准教授) に深く感謝いたします。本研究の遂行に当たり、TRPM2 遺伝子欠損マウスを提供下さいました京都大学大学院工学研究科 森泰生 教授、実験機材および実験設備を提供下さいました京都大学大学院医学研究科 高木康志 准教授に深く感謝いたします。研究生活を始めるにあたり御指導、御助言をいただきました前田早苗 博士、金野真和 博士、永安一樹 博士、三平和明 修士、をはじめ諸先輩方に心から感謝いたします。本研究にご協力いただきました宗像将也 修士、三宅崇仁 学士、朝倉佳代子 さん、宮之原遵 学士、筒井真人 君に心から感謝いたします。そして、日々の研究生活において互いに切磋琢磨し合えた京都大学大学院生体機能解析学分野 趙萌 修士、草野綾香 修士、桑原一樹 修士、更田宏史 修士、宗可奈子 学士、土岸広治 学士、勇昂一 学士、西谷直也 君、景山慶子 さん、勝本るみ さん、長島卓也 君、有益な御助言を頂きました持田製薬株式会社 原口佳代 修士、ならびに、互いに切磋琢磨し合えた京都大学大学院生体機能解析学分野、京都大学大学院薬品作用解析学分野の諸氏に深く感謝いたします。

著者の良き理解者であり研究活動に専念出来るように終始支えて下さった父 健一、母 秀子、姉 美紗、姉 由佳、叔父 清原誠一に心から感謝いたします。

発表論文目録

- 1) TRPM2-mediated induction of iNOS in microglia/macrophage is involved in the progression of cerebral ischemic injury in mice

(ミクログリア/マクロファージにおける TRPM2 を介した iNOS の誘導が脳虚血傷害の病態を悪化させる)

(Shinya Sakimoto, Hisashi Shirakawa, Takahito Miyake, Jun Miyanohara, Masakazu Konno, Takayuki Nakagawa, Yasuo Mori, Shuji Kaneko)

論文改訂中

参考文献

1. Donnan G-A, Fisher M, Macleod M, Davis S-M. (2008) Stroke. *Lancet* 371(9624):1612-1623.
2. Khaja A-M, Grotta J-C. (2007) Established treatments for acute ischaemic stroke. *Lancet*. 369(9558):319-330.
3. Reeves M-J, et al. (2006) The Paul Coverdell National Acute Stroke Registry: initial results from four prototypes. *Am J Prev Med*. 31(6 Suppl 2):S202-209.
4. Astrup J, Siesjö B-K, Symon L. (1981) Thresholds in cerebral ischemia – the ischemic penumbra. *Stroke*. 12:723-725.
5. Tamura A, Asano T, Sano K. (1980) Correlation between rCBF and histological changes following temporary middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 11:487-493.
6. Jones TH, et al. (1981) Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J Neurosurg*. 54:773-782.
7. Kaplan B, et al. (1991) Temporal thresholds for neocortical infarction in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia. *Stroke*. 22:1032-1039.
8. Mehta S-L, Manhas N, Raghubir R. (2007) Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev*. 54: 34-66.
9. Nakka V-P, Gusain A, Mehta S-L, Raghubir R. (2008) Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities. *Mol Neurobiol*. 37:7-38.
10. Peters O, et al. (1998) Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 18:196-205.
11. Macrez R, et al. (2011) Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. *Lancet Neurol*. 10(5):471-480.
12. Iadecola C, Anrather J. (2011) The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*. 17(7):796-808.
13. Nagamine K, et al. (1998) Molecular cloning of a novel putative Ca^{2+} channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics*. 54(1):124-131.
14. Perraud A-L, et al. (2001) ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*. 411(6837):595-599.
15. Fleig A, Penner R. (2004) The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends Pharmacol Sci*. 25(12):633-639.
16. Hara Y, et al. (2002) LTRPC2 Ca^{2+} -permeable channel activated by changes in

- redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell*. 9(1):163-173.
17. Buelow B, Song Y, Scharenberg A-M. (2008) The Poly(ADP-ribose) polymerase PARP-1 is required for oxidative stress-induced TRPM2 activation in lymphocytes. *J Biol Chem*. 283(36):24571-24583.
 18. Kashio M, et al. (2012) Redox signal-mediated sensitization of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(17):6745-6750.
 19. Hill K, et al. (2006) Characterisation of recombinant rat TRPM2 and a TRPM2-like conductance in cultured rat striatal neurons. *Neuropharmacology*. 50(1):89-97.
 20. Kraft R, et al. (2004) Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol*. 286(1):C129-137.
 21. Carter RN, et al. (2006) Molecular and electrophysiological characterization of transient receptor potential ion channels in the primary murine megakaryocyte. *J Physiol*. 576(Pt 1):151-162.
 22. Melzer N, Hicking G, Gobel K, Wiendl H. (2012) TRPM2 cation channels modulate T cell effector functions and contribute to autoimmune CNS inflammation. *PLoS One*. 7(10): e47617.
 23. Wehrhahn J, Kraft R, Harteneck C, Hauschildt S. (2010) Transient receptor potential melastatin 2 is required for lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes. *J Immunol*. 184(5):2386-2393.
 24. Yamamoto S, et al. (2008) TRPM2-mediated Ca^{2+} influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat Med*. 14(7):738-747.
 25. Haraguchi K, et al. (2012) TRPM2 contributes to inflammatory and neuropathic pain through the aggravation of pronociceptive inflammatory responses in mice. *J Neurosci*. 32(11):3931-3941.
 26. Renic M, et al. (2009) Effect of 20-HETE inhibition on infarct volume and cerebral blood flow after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 29:629-639.
 27. Ruta TS, Drummond J-C, Cole D-J. (1993) The effect of acute hypocapnia on local cerebral blood flow during middle cerebral artery occlusion in isoflurane anesthetized rats. *Anesthesiology*. 78:134-140.
 28. Jia J, et al. (2011) Sex differences in neuroprotection provided by inhibition of TRPM2 channels following experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 31(11):2160-2168.

29. Verma S, et al. (2012) TRPM2 channel activation following in vitro ischemia contributes to male hippocampal cell death. *Neurosci Lett* 530(1):41-46.
30. Alim I, et al. (2013) Modulation of NMDAR subunit expression by TRPM2 channels regulates neuronal vulnerability to ischemic cell death. *J Neurosci.* 33(44):17264-17277.
31. Kaneko S, et al. (2006) A critical role of TRPM2 in neuronal cell death by hydrogen peroxide. *J Pharmacol Sci.* 101(1):66-76.
32. Sopala M, et al. (2002) Neuroprotective activity of a nanoparticulate formulation of the glycineB site antagonist MRZ 2/576 in transient focal ischaemia in rats. *Arzneimittelforschung.* 52(3):168-174.
33. Hartings J-A, Rolli M-L, Lu X-C, Tortella F-C. (2003) Delayed secondary phase of peri-infarct depolarizations after focal cerebral ischemia: relation to infarct growth and neuroprotection. *J Neurosci.* 23(37):11602-11610.
34. Harada S, Fujita-Hamabe W, Tokuyama S. (2012) Ischemic stroke and glucose intolerance: a review of the evidence and exploration of novel therapeutic targets. *J Pharmacol Sci.* 118(1):1-13.
35. Rizk N-N, Rafols J-A, Dunbar J-C. (2006) Cerebral ischemia-induced apoptosis and necrosis in normal and diabetic rats: effects of insulin and C-peptide. *Brain Res.* 1096(1):204-212.
36. Harada S, Fujita-Hamabe W, Tokuyama S. (2010) The importance of regulation of blood glucose levels through activation of peripheral 5'-AMP-activated protein kinase on ischemic neuronal damage. *Brain Res.* 1351:254-263.
37. Uchida K, et al. (2011) Lack of TRPM2 impaired insulin secretion and glucose metabolisms in mice. *Diabetes.* 60(1):119-126.
38. Huang J, Upadhyay U-M, Tamargo R-J. (2006) Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol.* 66(3):232-245.
39. Gelderblom M, et al. (2009) Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke.* 40(5):1849-1857.
40. Caso J-R, et al. (2007) Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation.* 115(12):1599-1608.
41. Shichita T, et al. (2009) Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med.* 15(8):946-950.
42. Hasegawa Y, Suzuki H, Sozen T, Rolland W, Zhang J-H. (2010) Activation of sphingosine 1-phosphate receptor-1 by FTY720 is neuroprotective after ischemic stroke in rats. *Stroke.* 41(2):368-374.

43. Isami K, et al. (2013) Involvement of TRPM2 in peripheral nerve injury-induced infiltration of peripheral immune cells into the spinal cord in mouse neuropathic pain model. *PLoS One*. 8(7):e66410.
44. Ladeby R, et al. (2005) Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*. 48(2):196-206.
45. Yrjanheikki J, et al. (1999) A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(23):13496-13500.
46. Li J, McCullough L-D. (2009) Sex differences in minocycline-induced neuroprotection after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 29(4):670-674.
47. Shichita T, et al. (2012) Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med*. 18(6):911-917.
48. Wu L-J, et al. (2012) The voltage-gated proton channel Hv1 enhances brain damage from ischemic stroke. *Nat Neurosci*. 15(4):565-573.
49. Wang Q, Tang X-N, Yenari M-A. (2007) The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*. 184(1-2):53-68.
50. Hiroi T, et al. (2013) Neutrophil TRPM2 channels are implicated in the exacerbation of myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 97(2):271-281.
51. Yilmaz G, Arumugam T-V, Stokes K-Y, Granger D-N. (2006) Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation*. 113(17):2105-2112.
52. Beray-Berthaut V, Palmier B, Plotkine M, Margaill I. (2003) Neutrophils do not contribute to infarction, oxidative stress, and NO synthase activity in severe brain ischemia. *Exp Neurol*. 182(2):446-454.
53. Galea E, et al. (1998) Cerebellar stimulation reduces inducible nitric oxide synthase expression and protects brain from ischemia. *Am J Physiol*. 274(6 Pt 2):H2035-2045.
54. Parmentier S, et al. (1999) Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents ischaemic brain injury. *Br J Pharmacol*. 127(2):546-552.
55. Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross M-E. (1997) Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci*. 17(23):9157-9164.
56. Keynes R-G, Garthwaite J. (2004) Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury. *Curr Mol Med*. 4(2):179-191.

57. Homan T, et al. (2013) A novel mouse model of chronic inflammatory and overactive bladder by a single intravesical injection of hydrogen peroxide. *J Pharmacol Sci.* 121(4):327-337.
58. Lehnardt S, et al. (2007) Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia. *J Neuroimmunol.* 190(1-2):28-33.
59. Abe T, et al. (2010) Key role of CD36 in Toll-like receptor 2 signaling in cerebral ischemia. *Stroke.* 41(5): 898-904.
60. Brea D, et al. (2011) Toll-like receptors 2 and 4 in ischemic stroke: outcome and therapeutic values. *J Cereb Blood Flow Metab.* 31(6):1424-1431.
61. Cao C-X, et al. (2007) Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 353(2):509-514.
62. Liu K, et al. (2007) Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *Faseb J.* 21(14):3904-3916.
63. Ziegler G, et al. (2009) Mrp-8 and -14 mediate CNS injury in focal cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta.* 1792(12):1198-1204.
64. Pannu R, Singh I. (2006) Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase: neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms. *Neurochem Int.* 49(2):170-182.
65. Hong J, et al. (2010) Microglial Toll-like receptor 2 contributes to kainic acid-induced glial activation and hippocampal neuronal cell death. *J Biol Chem.* 285(50):39447-39457.
66. Di A, et al. (2011) The redox-sensitive cation channel TRPM2 modulates phagocyte ROS production and inflammation. *Nat Immunol.* 13(1):29-34.
67. Walder C-E, et al. (1997) Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase. *Stroke.* 28(11):2252-2258.
68. Chen H, Song Y-S, Chan P-H. (2009) Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29(7):1262-1272.
69. Miyake T, et al. (2014) TRPM2 contributes to LPS/IFN γ -induced production of nitric oxide via the p38/JNK pathway in microglia. *Biochem Biophys Res Commun.* in press.
70. Mayo L, et al. (2008) Dual role of CD38 in microglial activation and activation-induced cell death. *J Immunol.* 181(1):92-103.
71. Nakajima H, et al. (2004) Critical role of the automodification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in nuclear factor-kappaB-dependent gene expression in primary

- cultured mouse glial cells. *J Biol Chem.* 279(41):42774-42786.
72. Choe C-U, et al. (2011) CD38 exacerbates focal cytokine production, postischemic inflammation and brain injury after focal cerebral ischemia. *PLoS One.* 6(5):e19046.
 73. Yuan M, et al. (2009) Sex differences in the response to activation of the poly (ADP-ribose) polymerase pathway after experimental stroke. *Exp Neurol.* 217(1):210-218.
 74. Park E-M, et al. (2006) Inducible nitric oxide synthase contributes to gender differences in ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26(3):392-401.
 75. Impellizzeri D, et al. (2011) Effect of apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, on acute lung inflammation. *Biochem Pharmacol.* 81(5):636-648.
 76. Semple B-D, Kossmann T, Morganti-Kossmann M-C. (2010) Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *J Cereb Blood Flow Metab.* 30(3):459-473.
 77. Knowles H, Heizer JW, Li Y, Chapman K, Ogden CA, et al. (2011) Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) ion channel is required for innate immunity against *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:11578–11583.