

氏 名	たか み しん や 高 見 新 也
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 465 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	虚血性脳細胞傷害におけるケモカインの役割に関する薬理学的研究

論文調査委員 (主 査) 教授 佐藤 公道 教授 市川 厚 教授 赤池 昭紀

論 文 内 容 の 要 旨

白血球走化活性化因子ケモカインは炎症部位において産生され、血液中から組織実質内への好中球やマクロファージなどの免疫担当細胞の浸潤に関与するサイトカインである。脳梗塞のような虚血性疾患においても傷害部位に炎症様の反応が起こることが知られており、血管内から浸潤した細胞や脳内のグリア細胞はその細胞自身または細胞が産生する一酸化窒素(NO)や活性酸素などの因子を介して組織に対して傷害性に働くと考えられている。よってこれら組織傷害性を示す細胞の活性化や損傷部位への遊走、集積を抑制することは虚血傷害から脳を保護することにつながる可能性がある。本研究で著者は、ケモカインが虚血性脳細胞傷害において果たす役割について明らかにする目的で中大脳動脈閉塞脳虚血モデルを用いて研究を行ない、以下の新知見を得た。

第一章 中大脳動脈閉塞による虚血負荷脳内における CC ケモカイン MCP-1 および MIP-1 α mRNA の発現誘導

ラットに2時間の中大脳動脈(MCA)閉塞の後再灌流を行なう一過性局所脳虚血を負荷したところ虚血辺縁部において CC ケモカイン monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) および macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) の mRNA の発現が観察された。しかし発現のピーク時間および発現部位はこれら2つのケモカイン遺伝子の間で違いが見られた。また再灌流を行なわない永久閉塞虚血モデルを用いた検討も行なったが、ケモカイン遺伝子の発現パターンは一過性虚血モデルの場合とほぼ同様であった。さらにこれらケモカイン mRNA の虚血脳内における発現細胞について検討を行なったところ、MCP-1 mRNA はアストロサイトとミクログリアの両方において発現していたのに対して、MIP-1 α mRNA はミクログリアにおいてのみ発現が観察された。これらの結果より、ケモカイン遺伝子は虚血負荷後2時間以内の早い段階において発現が誘導され、その脳内における発現細胞はグリア細胞であることが明らかとなった。

第二章 虚血性脳細胞傷害に対するケモカイン受容体拮抗物質 vMIP-II の保護効果の検討

複数のケモカイン受容体に対して拮抗作用を示すことが知られているヘルペスウイルス由来ペプチド viral macrophage inflammatory protein-II (vMIP-II) 0.01-1 μ g をマウス側脳室内に虚血1時間前と再灌流1時間後の計2回投与したところ、1時間虚血再灌流48時間後における梗塞巣の体積が用量依存的に減少した。この vMIP-II の効果は皮質領域よりも皮質下領域においてより顕著であった。さらに虚血再灌流2週間後において脳組織の萎縮度を指標にして vMIP-II の効果を検討したところ、vMIP-II の側脳室内投与により脳萎縮が有意に抑制された。これに対して、内在性のケモカインのうち vMIP-II に最も相同性の高い MIP-1 α を同様に側脳室内に投与したところ、皮質領域に含まれる梗塞巣の体積が有意に増加した。また、48時間の永久閉塞虚血モデルを用いて検討したところ、vMIP-II 1 μ g を虚血負荷1時間前と2時間後の2回側脳室内に投与することにより梗塞巣の体積を有意に抑制した。vMIP-II および MIP-1 α の投与により体温、血圧などのパラメータは変化しなかった。これらの結果は、虚血脳内において産生されるケモカインが脳梗塞の病態増悪に関与し、ケモカイン受容体を阻害することにより虚血性脳細胞傷害を抑制しうることを示すものである。

第三章 vMIP-II による虚血性脳細胞傷害抑制作用の機序

vMIP-II および MIP-1 α を投与した虚血負荷マウスの脳切片を用いて免疫染色を行ない、脳梗塞巣内のミクログリア／マクロファージおよび好中球、さらに梗塞巣辺縁部におけるアストロサイトの細胞数を計数したところ、ミクログリア／マクロファージ数は PBS 投与群に比べて vMIP-II 投与により減少し、MIP-1 α 投与により増加した。好中球およびアストロサイトの細胞数には影響を与えなかった。また、M-CSF 処置初代培養ミクログリアおよびチオグリコール酸培地刺激による腹腔滲出細胞においてケモカイン受容体の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて検討したところ、CXCR1, 2, 4 はミクログリアにおいて、CCR1, 2, 5 はミクログリアと腹腔滲出細胞の両方において発現が確認された。さらに CCR5 受容体に選択的な拮抗薬を虚血負荷10分前に側脳室内投与あるいは再灌流10分前に静脈内投与することにより vehicle 投与群に比べて梗塞巣体積が有意に減少した。以上の結果より、vMIP-II の脳細胞傷害抑制効果の少なくとも一部は、CCR5 受容体を発現するミクログリア／マクロファージの遊走や活性化を抑制することによりもたらされる可能性が示唆される。

以上、著者は、虚血負荷により脳内においてケモカインの遺伝子発現が誘導されること、さらに脳内で発現したケモカインが虚血による脳細胞傷害の進展に関与するとともに、ケモカイン受容体を阻害することにより虚血性脳細胞傷害を抑制することが可能であることを明らかにした。本研究の成果は、ケモカインあるいはケモカイン受容体が、脳梗塞治療薬を開発していく上で新しい標的となりうることを示す基礎的知見であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

サイトカインの一種である白血球走化活性化因子ケモカインは、炎症部位で産生され、血液中から組織内への白血球の浸潤や活性化に関与することが知られている。脳虚血後の脳内では、数種のケモカインの発現誘導や炎症反応様の現象が惹起され、血液中から脳内への白血球浸潤やグリア細胞の活性化・集積が起こることが明らかにされつつあり、ケモカインが虚血脳内においても白血球の走化やグリア細胞の活性化に関与することが推定される。これらの細胞からは、神経細胞に保護的な神経栄養因子のみならず傷害的な酸化窒素や活性酸素が産生・放出されるので、ケモカインが虚血性脳細胞傷害に対して保護的か、傷害的かを即断できない。この点を明らかにするため著者は中大脳動脈閉塞脳虚血モデルを用いて研究を行い、以下の新知見を得た。

第一章 中大脳動脈閉塞による虚血負荷脳内における CC ケモカイン MCP-1 および MIP-1 α mRNA の発現誘導

ラット脳虚血負荷により、虚血開始後2時間以内の早期において、MCP-1 および MIP-1 α の mRNA 発現が誘導されたが、両ケモカインの mRNA 発現の分布および時間経過は異なっていた。さらに、MCP-1 mRNA はアストロサイトおよびミクログリアで、MIP-1 α mRNA はミクログリアで、それぞれ発現していることを明らかにした。

第二章 虚血性脳細胞傷害に対するケモカイン受容体拮抗物質 vMIP-II の保護効果の検討

vMIP-II (0.01-1 μ g) をマウス側脳室内に虚血1時間前と再灌流1時間後の計2回投与すると、1時間虚血再灌流2日後における梗塞巣の体積は用量依存的に減少し、この効果は皮質領域よりも皮質下領域においてより顕著であった。また、vMIP-II は単に脳細胞傷害を遅延させるのみならず、虚血再灌流14日後でも脳萎縮を有意に抑制するという脳細胞傷害抑制作用も認められた。一方、内在性ケモカインのうち vMIP-II と最も相溶性の高い MIP-1 α の側脳室内投与により、皮質領域の梗塞巣の体積が有意に増大した。これらの結果から、虚血脳内で産生されるケモカインが虚血性脳細胞傷害の増悪に関与している可能性を指摘した。

第三章 vMIP-II による虚血性脳傷害抑制作用の機序

vMIP-II をマウス側脳室内投与した虚血負荷脳内では、vehicle 投与群よりも Mac-1 α 陽性細胞（ミクログリア／マクロファージ）数が有意に減少したが、GFAP 陽性細胞（アストロサイト）および MPO 陽性細胞（好中球）の細胞数変化は認められなかった。また、諸種ケモカイン受容体遺伝子発現を RT-PCR 法で調べ、ミクログリア／マクロファージには vMIP-II が拮抗作用を示す受容体のうち CCR1, 2, 5 が発現していることを明らかにした。さらに、CCR5 受容体に比較的高い選択性の高い拮抗薬（TAK-779）のマウス側脳室内または静脈内投与により、脳虚血負荷による梗塞巣の体積が減少することも示した。これらの結果は、vMIP-II の虚血性脳細胞傷害抑制作用の少なくとも一部が CCR5 受容体を発現するミクログリア／マクロファージの活性化および脳実質内への浸潤による可能性を示唆している。

以上著者は、虚血脳内において発現誘導されるケモカインが虚血性脳細胞傷害に関与することを明らかにし、ケモカイン

受容体が新規脳梗塞治療薬の標的となる可能性を示した。

よって、本論文を博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成13年2月26日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。