

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

プロスタグランジン類の生理活性調節による神経変性疾患の治療

研究代表者 吉川 圭介（医学部 薬理学）

諸言

生体のリン脂質膜由来生理活性脂質であるプロスタグランジン (PG) は神経細胞死や神経保護の重要な因子として注目されている。本研究は興奮毒性と多発性硬化症 (MS) における PG 生理活性の解明とそれを基軸とした治療戦略の提唱を目的とした。

興奮毒性における PG 生理活性

脳虚血・てんかん・アルツハイマー病など種々の神経変性疾患に興奮毒性による神経細胞死が関与している。我々はこれまでに、グルタミン酸アゴニストで興奮毒性を引き起こすカイニン酸 (KA) を用い、ラット海馬における脂質メディエーター産生を LC-ESI-MS/MS を用いた網羅的解析により詳細にプロファイルした。脂質メディエーターの中で特に $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 PGE_2 、 PGD_2 の産生量が多く、すべてが KA 投与後 1 時間以内に産生の極大を示した¹⁾。さらに非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) を用いた PG 産生阻害試験により、KA 投与後 1 時間以内に産生される PG が 30 日以上も続く持続性神経細胞死に関与し、NSAID の PG 産生抑制により神経細胞死が抑制されることを見出した²⁾。しかし NSAID は速発酵素シクロオキシゲナーゼを阻害し、多種類の PG 産生を同時に抑制するため、各種 PG の種類別な生理活性はいまだ不明なままである。そこで本研究は主要な PG である $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 PGE_2 、 PGD_2 が持続性神経細胞死に与える影響を解析した。

多発性硬化症における PG 生理活性

MS は神経軸索を取り巻くミエリンが破壊される脱髄を特徴とした疾患であり、運動麻痺、視力障害、感覚障害などの神経症状が再発と寛解を繰り返す指定難病である。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ は分娩誘発、平滑筋収縮などの生理活性を持つが中枢神経系における役割は未だ不明な点が多い。我々は $\text{PGF}_{2\alpha}$ 産生酵素の脳内発現解析により、髄鞘における局在、ミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトにおける特異的発現を明らかとした³⁾。本研究は MS における $\text{PGF}_{2\alpha}$

生理活性の解明を目的として、FP ($\text{PGF}_{2\alpha}$ 受容体) の作動薬・拮抗薬を MS モデルマウスに投与し病態を解析した。

材料と方法

興奮毒性モデルラット

NS-398 は PG 産生の速発酵素 Cyclooxygenase-2 の阻害剤であり、ラット海馬における KA 誘導 PG 産生を阻害する¹⁾。3 週齢雄性ラットに NS-398 (10 mg/kg, 20% DMSO に溶解) を腹腔内投与し、30 分後に KA (10 mg/kg, 生理食塩水に溶解) を腹腔内投与した。さらに 30 分後に $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 PGE_2 、 PGD_2 を脳室内投与 (500 ng/5 μl を両側に投与、溶媒は 0.1% EtOH の生理食塩水) を行った。コントロールラットにはそれぞれ溶媒を腹腔内、脳室内に同様に投与した (Table 1)。30 日まで飼育後、4% パラホルムアルデヒド (PFA) で還流固定後、パラフィン切片 (6 μm) を作製し、HE 染色により海馬神経細胞死を観察した。

多発性硬化症モデルマウス

8 週齢雄 C57BL/6 マウスを 0.2% クプリゾン (CPZ) を含んだ餌で飼育し、オリゴデンドロサイト特異的細胞死による MS モデルマウスを作製した。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 受容体作動薬 (travoprost 脳室内投与, latanoprost 経口投与)、拮抗薬 (AL-8810 脳室内投与) を CPZ 投与開始から 3 週間後に単回投与し、最も顕著な脱髄が起こる 5 週間まで飼育した。マウスを 4% PFA で灌流固定、クライオスタットにより組織染色用切片を作製した。

Table 1. 興奮毒性ラットの投薬プロトコール

	0分	30分後	60分後
V+V+V	20%DMSO/Saline (i.p.)	Saline (i.p.)	0.1%EtOH/Saline (i.c.v.)
V+KA+V	20%DMSO/Saline (i.p.)	KA (i.p.)	0.1%EtOH/Saline (i.c.v.)
NS+KA+V	NS398 (i.p.)	KA (i.p.)	0.1%EtOH/Saline (i.c.v.)
NS+KA+PGE2	NS398 (i.p.)	KA (i.p.)	PGE2 (i.c.v.)
NS+KA+PGF2 α	NS398 (i.p.)	KA (i.p.)	PGF2 α (i.c.v.)
NS+KA+PGD2	NS398 (i.p.)	KA (i.p.)	PGD2 (i.c.v.)

ミエリン量はBlack Gold染色を用い染色の濃度により脱髄レベルを測定した⁴⁾。

結 果

PGF_{2α}, PGD₂が持続性神経細胞死に重要

KA投与によりラット海馬においてCA1, CA3において神経細胞死が引き起こされる (Fig. 1). 3週齢ラットにおいて特に神経細胞死が顕著なCA1に着目した。

KA投与の1, 3, 10, 30日後の海馬をHE染色により観察した (Fig. 2). 1日後は空胞変性を主体とした神経変性が見られ, その後の時間では核凝縮を起こした神経細胞死が見られた. KA単回投与後30日以上もCA1で神経細胞死が観察された (持続的神経細胞死)。

KA, NS398, 各種PG投薬30日後の海馬CA1をHE染色により観察した (Fig.3 A: V+V+V, B: V+KA+V, C: NS+KA+V, D: NS+KA+PGE₂, E: NS+KA+PGF_{2α}, F: NS+KA+PGD₂). 溶媒のみを投与した場合は神経細胞死が起こらず, 正常なCA1錐体細胞層が見られる (Fig. 3A). KA単回投与により30日後においても神経細胞死が見られた (Fig. 3B 黒矢印). NS398によりPG産生を抑制した場合は神経細胞死の抑制が見られた (Fig.3C). PGE₂脳室内投与は神経細胞死への影響は見られなかった (Fig. 3D). PGF_{2α}, PGD₂脳室内投与はKA単独投与と同レベルの神経細胞死が見られた (Fig. 3E, F).

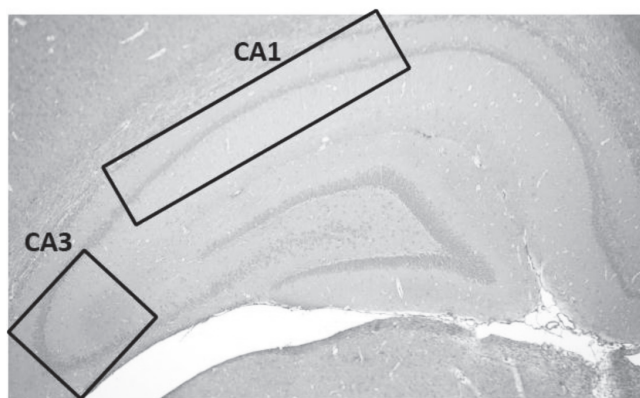


Fig. 1. ラット海馬のHA染色 (V+V+V).

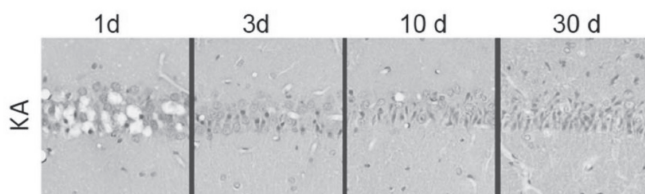


Fig. 2. KA投与後のCA1における神経細胞死.

FP拮抗薬が脱髄を抑制

FP拮抗薬AL8810の脳室内投与によりCPZ誘導脱髄を抑制した (Fig. 4, 5).

FP作動薬であるtravoprost, latanoprostは脱髄レベルに影響しなかった (Fig.6).

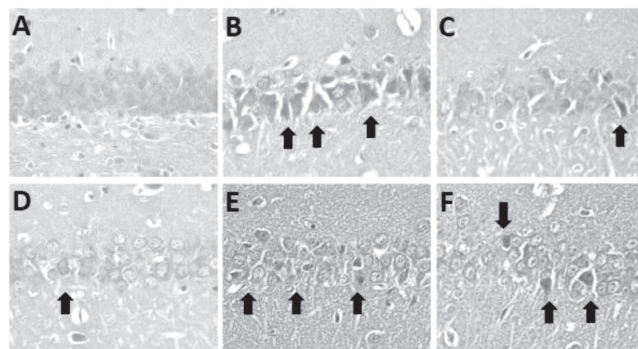


Fig. 3. 投薬30日後の海馬CA1 (HE染色).

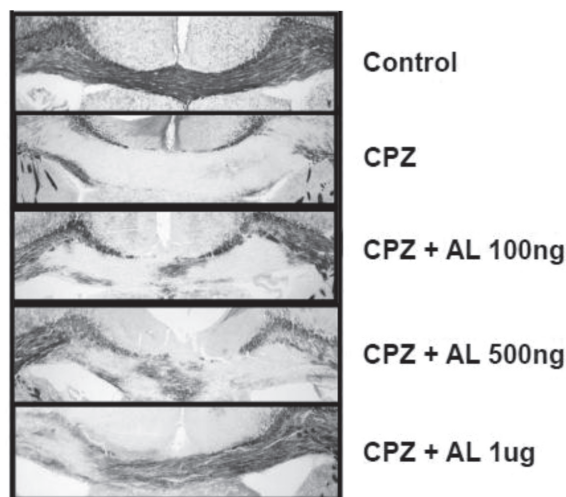


Fig. 4. FP拮抗薬投与後の脳梁のミエリン染色.

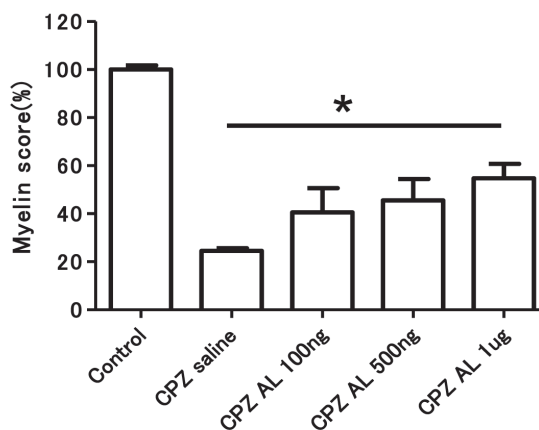


Fig. 5. FP拮抗薬投与後のミエリンレベル.

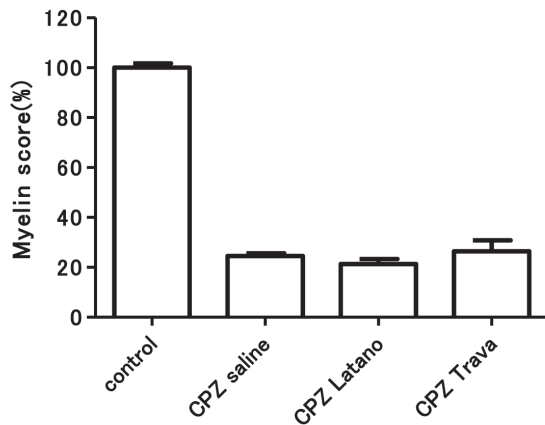


Fig. 6. FP作動薬投与後のミエリンレベル.

考 察

KA 投与後 30 日後のラット海馬における持続的神経細胞死において、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 PGD_2 が重要であることが示された。興奮毒性時に産生されるPGがミクログリアを長期間活性化させ持続的神経細胞死を引き起こし、NSAIDによりミクログリア活性化、持続的神経細胞死は抑制される²⁾。ミクログリアは神経毒性・神経保護の両面に働くことが知られているが、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 PGD_2 により活性化されたミクログリアが神経毒性的に働くと考えられる。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 PGD_2 生理活性抑制が興奮毒性誘発神経細胞死の治療に有効であることが示された。

$\text{PGF}_{2\alpha}$ 受容体の拮抗薬 AL8810 投与により CPZ 誘導 MS モデルマウスの脱髄を抑制した。詳細なメカニズムは不明であるが、オリゴデンドロサイトに発現している $\text{PGF}_{2\alpha}$ 合成酵素³⁾により過剰に産生された $\text{PGF}_{2\alpha}$ がオリゴデンドロサイト細胞死に働いていると

考えられる。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 生理活性抑制が MS 治療に有効である可能性が示された。

謝 辞

本研究の実験実施に協力いただきました薬理学教室の岩佐健介実験助手、特別協力研究員 高橋茉莉香博士、大学院生 山本梓司君に感謝いたします。実験動物管理にご尽力いただきました実験動物施設の皆様に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Yoshikawa K, Kita Y, Kishimoto K, Shimizu T. Profiling of eicosanoid production in the rat hippocampus during kainate-induced seizure: Dual-phase regulation and differential involvement of COX-1 and COX-2. *J Biol Chem* 2006;281:14663-9.
- 2) Yoshikawa K, Kita Y, Furukawa A, Kawamura N, Hasegawa-Ishii S, Chiba Y, et al. Excitotoxicity-induced immediate surge in hippocampal prostanoid production has latent effects that promote chronic progressive neuronal death. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2013;88:373-81.
- 3) Yoshikawa K, Takei S, Hasegawa-Ishii S, Chiba Y, Furukawa A, Kawamura N, et al. Preferential localization of prostamide/prostaglandin F synthase in myelin sheaths of the central nervous system. *Brain Res* 2011 Jan 7;1367:22-32.
- 4) Yoshikawa K, Palumbo S, Toscano CD, Bosetti F. Inhibition of 5-lipoxygenase activity in mice during cuprizone-induced demyelination attenuates neuroinflammation, motor dysfunction and axonal damage. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011;85(1):43-52.