



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1459号
学位記番号	第1045号
氏名	長屋 嘉顕
授与年月日	平成 27年 3月 25日
学位論文の題名	<p>Inflammatory cytokine tumor necrosis factor α suppresses neuroprotective endogenous erythropoietin from astrocytes mediated by hypoxia-inducible factor-2α</p> <p>(炎症性サイトカイン TNF-α は、HIF-2α を介してアストロサイトより分泌された内因性エリスロポエチンの神経保護効果を抑制する)</p> <p>European Journal of Neuroscience, Vol. 40, pp. 3620-3626, 2014</p>
論文審査担当者	主査： 浅井 清文 副査： 飛田 秀樹, 齋藤 伸治

論文内容の要旨

[研究目的]

エリスロポエチン (EPO) は、造血作用をもつサイトカインで、主に成人では腎臓、胎児では肝臓で産生される。近年、EPO 投与による種々の疾患モデル動物での神経保護効果が報告され注目されている。しかし、血液脳関門による EPO の脳への移行の制限や大量投与に伴う多血等の副作用が懸念されている。中枢神経系においては、アストロサイトで EPO が産生されることが明らかとなり、この内因性の EPO を誘導することが外因性の EPO 投与による副作用の解消につながるのではないかと期待されている。

EPO の発現には低酸素誘導因子 (HIF) が転写レベルに関わっていることが分かっている。HIF は α サブユニットと β サブユニットの二量体で形成されており、 α サブユニットには 3 種類存在することが知られている。そのうち、HIF-2 α がアストロサイトにおける EPO 発現に最も関与しているのではないかと報告がなされた。

TNF α は炎症性サイトカインとしてよく知られているが、中枢神経系において EPO の発現を抑制するという報告がある。この事象は中枢神経系での炎症性疾患の病態悪化を解明するうえで重要であり、EPO と TNF α との関連のメカニズムを解明し EPO の効果を十分に得られるようにすることが治療につながるのではないかと考えられている。

我々は、ラットの脳において低酸素に伴う EPO 発現と TNF α による影響を調べ、さらに培養アストロサイトを用いて低酸素状態での EPO 発現と TNF α による影響を検討した。

[方法]

1. *in vivo* の実験では、1 週齢 (幼体) と 8 週齢 (成体) の Wistar-rat を実験に用いた。
2. 低酸素の環境を作るため専用のチャンバーを用意し、酸素と窒素を混合させ酸素濃度 10% となるように調整した。TNF α は 50 μ g/kg を腹腔内投与した。
3. *in vitro* の実験では、1 日齢の Wistar-rat の大脳皮質よりアストロサイト、ニューロンを取出し、約 1 週間培養したのち実験に使用した。
4. 細胞刺激には、まず TNF α を必要量加え、30 分後に低酸素環境下 (酸素 1%、二酸化炭素 5%、窒素 94%) に置いた。
5. EPO 蛋白産生量の測定には R&D 社製の ELISA キットを用いたが、培養液中に産生される EPO 蛋白の量は非常に少ないため、Millipore 社製の Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Unit を用い培養液を濃縮して測定した。
6. EPO mRNA 発現量の定量は、回収した RNA から random primers を用いて cDNA を合成し、リアルタイム PCR で行った。 β -actin をコントロールとして、EPO/ β -actin 比を相対的な定量値として比較検討した。
7. HIF-1 α 、HIF-2 α 蛋白産生量の定量は、ウェスタンブロットにより行った。一次抗体に抗 HIF-1 α 、HIF-2 α 抗体を、二次抗体に HRP 標識した抗ウサギ IgG 抗体を使用した。Lamin C を核内蛋白のコントロールとした。
8. EPO シグナルの阻害実験には、抗 EPO 抗体 (1 μ g/ml) を用い、細胞刺激 30 分前から前処置を行った。
9. 免疫蛍光染色には、マウス抗 MAP2 抗体、ウサギ抗 cleaved caspase 3 抗体を一次抗体として用いた。二次抗体には Alexa Fluor 594 標識抗マウス IgG 抗体、Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体を使用した。核は DAPI で染色した。AX70 蛍光顕微鏡を用いて観察

した。

[結果]

1. 低酸素下でラットの脳・腎臓での EPO mRNA 発現が認められた。TNF α 投与により、EPO mRNA 発現は有意に抑制された。この現象は、幼体、成体いずれにおいても認められた。
2. 培養アストロサイトにおいて、低酸素下で EPO mRNA 発現が認められ、TNF α により発現は抑制された。そして、TNF α の濃度依存的に EPO mRNA の発現は強く抑制された。また、経時的に調べたところ、通常酸素下ではほぼ発現していなかった EPO mRNA は低酸素下において 3 時間で発現が誘導され 12 時間でピークに達した。TNF α による EPO mRNA 発現の抑制は少なくとも 24 時間は持続した。EPO 蛋白量も同様に TNF α により抑制された。
3. アストロサイトにおける HIF-1 α および HIF-2 α の mRNA 発現・蛋白量について調べた。HIF-1 α mRNA 発現は、TNF α 投与により増加したが、蛋白量は変化しなかった。HIF-2 α に関しては、mRNA 発現に変化は認めなかったが、蛋白量は TNF α 投与により減少した。
4. HIF-2 α と TNF α との関連のメカニズムを解明するために、TNF α のグナル伝達経路である extracellular signal-regulated kinase (ERK)、p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、NF- κ B の阻害剤を使用し実験を行った。その結果、NF- κ B の阻害薬である SN50 を投与したときに、TNF α により抑制されていた HIF-2 α 蛋白量が増加した。また、同じ阻害剤を用いた実験で EPO mRNA 発現も検討したところ、EPO mRNA 発現が有意に増加した。
5. アストロサイトにより産生された EPO を含む培養液をニューロンに加え、EPO の神経保護効果と TNF α 投与による影響について免疫染色を用いて調べた。アポトーシスの指標となる cleaved caspase 3 陽性細胞は低酸素環境下では増加した。そこに EPO を含む培養液を加えたところ、EPO の中和抗体を同時に投与した群、TNF α を投与した群、ともに caspase 3 陽性細胞の数は増加し、TNF α が EPO の細胞保護効果を抑制した。

[考案]

低酸素により誘導される EPO は、TNF α によって発現が抑制された。そして、アストロサイトにおいて、TNF α は HIF-2 α 蛋白の安定性を弱めることで EPO の転写を抑制することが示唆された。TNF α のシグナル伝達を阻害することで、EPO の神経保護効果を維持できると考えられ、中枢神経系の炎症性疾患の治療に繋がられるのではないかと考えた。

論文審査の結果の要旨

エリスロポエチン (EPO) は造血作用をもつサイトカインであるが、近年 EPO 投与による種々の疾患モデル動物での神経保護効果が報告され注目されている。しかし、血液脳関門による EPO の脳への移行の制限や大量投与に伴う多血等の副作用が懸念されている。中枢神経系において、EPO はアストロサイトで産生されることが明らかとなり、この内因性の EPO を誘導することが外因性の EPO 投与による副作用の解消につながるのではないかと期待されている。EPO の発現には低酸素誘導因子 (HIF) が関わっている。HIF は α サブユニットと β サブユニットの二量体で形成されており、 α サブユニットには 3 種類存在することが知られている。そのうち、HIF-2 α がアストロサイトにおける EPO 発現に最も関与しているのではないかと報告がなされた。TNF α は炎症性サイトカインとしてよく知られているが、中枢神経系において EPO の発現を抑制するという報告がある。この事象は中枢神経系での炎症性疾患の病態悪化を解明するうえで重要であり、EPO と TNF α との関連のメカニズムを解明し EPO の効果を十分に得られるようにすることが治療につながるのではないかと考えられている。そこで本研究では、ラットの脳において低酸素に伴う EPO 発現と TNF α による影響を調べ、さらに培養アストロサイトを用いて低酸素状態での EPO 発現と TNF α による影響を検討した。以下に結果の要点を示す。

*in vivo*の実験では、1 週齢 (幼体) と 8 週齢 (成体) の Wistar rat を実験に用いた。低酸素の環境を作るため専用のチャンバーを用意し、酸素と窒素を混合させ酸素濃度 10%となるように調整した。TNF α は 50 μ g/kg を腹腔内投与した。*in vitro*の実験では、1 日齢の Wistar rat の大脳皮質よりアストロサイト、ニューロンを取出し、約 1 週間培養したのち実験に使用した。細胞刺激には、まず TNF α を必要量加え、30 分後に低酸素環境下 (酸素 1%、二酸化炭素 5%、窒素 94%) に置いた。

低酸素下でラットの脳・腎臓での EPO mRNA 発現が認められた。TNF α 投与により、EPO mRNA 発現は有意に抑制された。この現象は、幼体、成体いずれにおいても認められた。

培養アストロサイトにおいて、低酸素下で EPO mRNA 発現が認められ、TNF α により発現は抑制された。そして、TNF α の濃度依存的に EPO mRNA の発現は強く抑制された。また、経時的には EPO mRNA は低酸素により 3 時間で発現が誘導され 12 時間でピークに達した。TNF α による EPO mRNA 発現の抑制は少なくとも 24 時間は持続した。EPO 蛋白量も同様に TNF α により抑制された。続いて、アストロサイトにおける HIF-1 α および HIF-2 α の mRNA 発現・蛋白量について調べたところ、HIF-1 α mRNA 発現は、TNF α 投与により増加したが、蛋白量は変化しなかった。HIF-2 α は、mRNA 発現に変化は認めなかったが、蛋白量は TNF α 投与により減少した。HIF-2 α と TNF α との関連のメカニズムを解明するために、TNF α のグナル伝達経路である extracellular signal-regulated kinase (ERK)、p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、NF- κ B の阻害剤を使用すると、NF- κ B の阻害剤である SN50 を投与したときに、TNF α により抑制されていた HIF-2 α 蛋白量が増加した。また、同じ阻害剤を用いた実験で EPO mRNA 発現も検討したところ、EPO mRNA 発現が有意に増加した。最後に、アストロサイトにより産生された EPO を含む培養液をニューロンに加え、EPO の神経保護効果と TNF α 投与による影響について免疫染色を用いて調べた。アポトーシスの指標となる cleaved caspase 3 陽性細胞は低酸素環境下では増加したが、そこに EPO を含む培養液を加えたところ cleaved caspase 3 陽性細胞数は減少した。しかし、EPO の中和抗体を同時に投与した群、TNF α を投与した群は、ともに caspase 3 陽性細胞の数は増加し、EPO の細胞保護効果が抑制されていると考えられた。

以上より、低酸素により誘導される EPO は、TNF α によって発現が抑制され、アストロサイトにおいては、TNF α は HIF-2 α 蛋白の安定性を弱めることで EPO の転写を抑制することが示唆された。TNF α のシグナル伝達を阻害することで、EPO の神経保護効果を維持できると考えられ、中枢神経系の炎症性疾患の治療につながる新たな知見を得られたことが評価された。

審査委員会では、主査 (浅井清文教授) から「実験目的やその背景」「PCR の原理やプライマーの選択」など論文とその方法に関する 10 項目の質問、次に、第 1 副査 (飛田秀樹教授) から「*in vivo*実験における脳での EPO 発現量の違い」など結果に関して 10 項目の質問があった。また、指導教授である第 2 副査 (齋藤伸治教授) から「低酸素性虚血性脳症について」など主科目を中心に 3 項目の質問を行った。いずれの質問に対しても十分な回答が得られ、本論文について十分に理解するとともに、専攻分野 (小児医学) に関する知識を習得しているものと判断された。よって本論文の著者には博士 (医学) の学位を授与するに値すると判断した。

論文審査担当者 主査 浅井 清文

副査 飛田 秀樹、齋藤 伸治