

研究要旨 脳梗塞、脳虚血による脳細胞死の適切な抑制法は早急に確立すべきである。本研究は、「脳細胞内環境系」を基盤とした神経細胞の保護に関する脳内免疫系でのサイトカイン療法の確立、さらに、免疫抑制薬や免疫調整薬の脳保護効果を脳内移行性からの薬理効果の検索を目的とした。方法として共存するグリア細胞数を変動させた初代培養細胞や脳血液関門欠損マウスを用いて、新たなる脳神経保護法の確立を試み、新規脳機能調整薬の治療上における有効性と危険性について明確にした。

A. 研究目的

脳細胞死に対する保護作用を脳細胞環境系を考慮し、脳内免疫系に影響を及ぼす物質を中心にグリア細胞共存初代培養脳細胞、C57BL/6Jマウスの中大脳動脈梗塞モデル(MCAO)、ならびに、両側頸動脈結紮モデルを用いて検索を行なった。さらに、mdrl型P糖タンパク輸送系欠損マウスをMCAOとしてcyclosporinAの脳保護効果について解析をおこなった。

B. 研究方法

1) 小脳顆粒細胞の初代培養細胞を神経細胞が豊富な群、神経細胞とグリア細胞が共存した群、グリア細胞が豊富な群の三群とした。細胞死はカルセイン法で解析をおこなった。

2) Thyrotropin-releasing hormone (TRH) の新規化合物であるtaltirelin (T)、あるいは免疫抑制薬であるサイクロスポリン(CsA)をC57BL/6Jマウスの両側頸動脈を10分間結紮した後、再灌流し、直後あるいは5分後に静脈内投与した。

3) mdrl型P糖タンパク輸送系欠損マウスでMCAOモデルを作成し、検索をおこなった。すなわち、MCAOモデルは中大脳動脈に6-0シリコン製のフィラメントを30分間埋め込み、脳血流の完全な遮断を行なった。

C. 研究結果

1) LPSやアシドーシス下でグリア細胞からのTNF α の産生は経時的に著明であり、細胞障害と関連性を有していた。しかし、グルタミン酸誘発細胞障害は観察されたがTNF α の産生はグリア細胞が存在しても低値であった。抗TNF α 抗体はLPS誘発の細胞障害にのみ効果的であった。

2) 神経細胞の損傷は遅発性細胞死として虚血施行一週間後に海馬のCA1領域を中心に発現した。Tを投与した群では約75%以上の細胞が生き残っていた。Tを投与したマウスの脳内TRH受容体の変動を考察した。Tを静脈内投与60分後に断頭をして脳内のTRH受容体結合動

態を検索した。Vehicleを投与した群と比較するとTを投与した群はいずれもKd値の有意な増加が認められた。すなわち、これらの結果はTが脳内へ移行し脳保護効果を発現したものである。

3) 免疫抑制薬のCsAについて、上記と同様に2V0のC57BL/6Jマウスを用いて検索をおこなった。CsA投与量を増量させることにより、脳梗塞巣の減少が認められたが死亡する動物も増量した。すなわち、CsAは脳虚血の状態で脳への移行が可能となり、脳保護効果も発現されるが、むしろ、毒性発現が強く生じることが示唆された。そこで、CsAの「毒性」が中枢神経系においても発現するか否かを確認するため、mdrl欠損マウスでMCAOモデルを作成し、検索をおこなった。再灌流後、CsAを投与した。CsA1mg/kg投与群の脳梗塞巣は有意に減少していたが、10mg/kg投与群では明らかに脳梗塞巣の増強が認められた。

D. 考察

脳内グリア細胞を介す免疫系は明らかに、神経保護作用に関して強い影響を及ぼしているが、サイトカイン療法を施行する際には脳治療独自の療法を考案する必要がある。さらに、免疫調整薬の脳機能改善作用はBB欠損モデルでの成績を検討せねばならない。

E. 結論

脳内細胞環境系に影響をおよぼす物質は脳保護効果を有するものがある。しかし、脳内移行性が亢進することによる「中枢毒性」の発現も新たに考慮すべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) Urayama A, Yamada S, Kimura R, Zhang J, Watanabe Y. Neuroprotective effect and brain receptor binding of taltirelin, a novel thyrotropin-rele

asing hormone (TRH)analogue, in transient forebrain ischemia of C57BL/6J mice. Life Sci 2002 72: 601-7.

- 2) Yamada Y, Watanabe Y, Zhang J, Haraoka J, Ito H. Changes in cortical and cerebellar bcl-2 mRNA levels in the developing hydrocephalic rat (LEW-HYR) as measured by a real time quantified RT-PCR Neuroscience 2002 114, 165-71.
- 3) Hamano H, Noguchi M, Fukui H, Issiki A, Watanabe Y. Regulation of brain cell environment on neuronal protection: role of $TNF\alpha$ in glial cells. Life Sci 2002 72: 565-74,
- 4) Matsumoto S, Isshiki A, Watanabe Y, Wieloch T. Restricted clinical efficacy of cyclosporine A on rat transient middle cerebral artery occlusion. Life Sci 2002 72: 591-600.

別紙5

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻名	ページ	出版年
Y.Sugiyama, H.Kusuhara, H.Taniguchi, S.Ishikawa, Y.Nozaki, H.Aburatani	Functional characterization of rat brain specific organic anion transporter (Oatp 14) at the blood-brain barrier	J.Biol.Chem.		submitted	
D.Sugiyama, H.Kusuhara, YJ Lee, Y.Sugiyama	Involvement of Multidrug Resistance Associated Protein 1 (Mrp1) in the Efflux Transport 17 β Estradio-D-17 β -glucuronide (E217 β G) across the Blood-Brain Barrier	Pharm.Res.	20	1394-1400	2003
YJ Lee, H.Kusuhara, D.Sugiyama, Y.Sugiyama	Do Mrp proteins play any role in the elimination of organic anions across the blood-cerebrospinal fluid barrier?	J.Pharm. Sci.		in press	
R.Kikuchi, H.Kusuhara, D.Sugiyama, Y.sugiyama	Contribution of organic anion transporter 3 (Slc22a8) to the elimination of p-aminohippuric acid and benzylpenicillin across the blood-brain barrier	J Pharmacol Exp Ther	306	51-58	2003
H.Kusuhara, Zhonggui He, Y.Nagata, Y.Nozaki, T.Ito, H.Masuda, Peter J. Meier, T.Abe, Y.Sugiyama	Expression and Functional Involvement of Organic Anion Transporting Polypeptide Subtype 3 (Slc21a7) in Rat Choroid Plexus	Pharm. Res.	20	720-727	2003
M.Hasegawa, H.Kusuhara, H.Endo, Y.Sugiyama	Contribution of Organic Anion Transporters to the Renal Uptake of Anionic Compounds and Nucleoside Derivatives in Rat	J Pharmacol Exp Ther	305	1087-1097	2003
N.Mizuno, Y.Sugiyama	Drug Transporters: Their Role and Importance in the Selection and Development of New Drugs	Drug Metabol. Pharmacokin.	17	93-108	2002
A.Oda, S.Hirono,	The introduction of atom types and calculations of new parameters for charge equilibrium method	J.Comp.Chem.		in press	
M.Tanaka, T.Orii, T.Gomi, H.Kobayashi, M.Kanke, S.Hirono	Clinical Estimation of Vacomycin Measurement Method on Hemodialysis Patient	YAKUGAKU ZASSHI	122	269-275	2002
広野修一	Computer-Aided Structure-Based Drug Design 入門 -創薬におけるBioinformaticsの応用-	臨床病理	50	45-51	2002
M.Kano, K.Nishimura, S.Ishikawa, S.Tsutsumi, K.Hirota, M.Hirose, H.Aburatani	Expression Imbalance Map: A New Visualization Method for Detection of mRNA Expression Imbalance Regions	Physiol Genomics	13	31-46	2003
A.Higuchi, S.Shimmura, M.Ishii, H.Aburatani, K.Tsubota	Serum- and serum deprivation-induced transcriptional profiles of cultured conjunctival epithelial cells	Adv Exp Med Biol	506	673-676	2002
A.Nakajima, K.Wada, K.Katayama, Saubermann L., E.Osawa, H.Nagase, N.Ueno, N.Matsuhashi, H.Aburatani	Gene expression profile after peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligand administration in dextran sodium sulfate mice	J Gastroenterol	37	62-66	2002
Saubermann L, A.Nakajima, K.Wada, S.Zhao, Y.Terauchi, T.Kadowaki, H.Aburatani, N.Matsuhashi, R.Nagai, Blumberg R.	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis	INFLAMMATORY BOWEL DISEASES	8	330-339	2002
T.Ota, M.Fujii, T.Sugizaki, M.Ishii, K.Miyazawa, H.Aburatani, K.Miyazono	Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells	J Cell Physiol	193	299-318	2002
A.Saiura, T.Kohro, T.Yamamoto, A.Izumi, Y.Wada, H.Aburatani, Y.Sugiyama, T.Hamakubo, T.Taniguchi, M.Naito, T.Kodama, M.Makuuchi	Detection on an up-regulation of a group of chemokine genes in murine cardiac allograft in the absence of interferon-gamma by means of DNA microarray	Transplantation	73	1480-1486	2002
Hippo Y., H.Taniguchi, S.Tsutsumi, N.Machida, Chong J. M.Fukayama, T.Kodama, H.Aburatani	Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays	Cancer Research	62	233-240	2002
油谷浩幸	DNAチップの医療への応用	Medicina	39	444-448	2002

油谷浩幸	遺伝子発現プロファイリングによる癌の個性診断	医学のあゆみ	201	687-692	2002
油谷浩幸	癌の機能ゲノム解析	埼玉医科大学雑誌	29	85-91	2002
油谷浩幸	ヒトゲノムプロジェクトの現況と将来について	MEDICAL CORNER	111	4-7	2002
油谷浩幸	ヒトゲノムプロジェクトの現況と将来	総合臨床	51	2901-2902	2002
H.Aburatani	Understanding cancer through gene expression profiling	International Congress Series	1246	261-270	2002
N.Murakami, H.Ishibashi, S.Katsurabayashi, N.Akaike	Calcium channel subtypes on single GABAergic presynaptic terminal projecting to rat hippocampal neurons	Brain Res.	951	121-129	2002
Y.Watanabe, Wang ZM, Rhee JS, Lawlor GF, H.Ishibashi, N.Akaike	Inhibitory effects of 1, 4-DHP antagonists on synaptic GABA release modulated by BAY-K 8644 in mechanically dissociated rat substantia innominata	Life Sciences	71	1103-1113	2002
N.Matsumoto, S.Komiyama, N.Akaike	Pre- and postsynaptic ATP-sensitive potassium channels during metabolic inhibition of rat hippocampal CA1 neurons	J Physiol.	541	511-520	2002
Jang IS, Jeong HJ, S.Katsurabayashi, N.Akaike	Function roles of presynaptic GABA(A) receptors on glycinergic nerve terminals in the rat spinal cord	J Physiol.	541	423-434	2002
J.Nabekura, T.Ueno, A.Okabe, A.Furuta, T.Iwaki, C.Shimizu-Okabe, A.Fukuda, N.Akaike	Reduction of KCC2 expression and GABAA receptor-mediated excitation after in vivo axonal injury	J Neurosci.	22	4412-4417	2002
Y.Kanemoto, H.Ishibashi, S.Matsuo, Y.Oyama, N.Akaike	Modification of NMDA responses by tri-n-butyltin in rat brain neurons	Br J Pharmacol.	136	201-206	2002
A.Do, Y.Kakazu, N.Akaike	Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger in GABAergic presynaptic boutons of rat central neurons	J Neurophysiol.	87	1694-1702	2002
Y.Kanemoto, H.Ishibashi, A.Do, N.Akaike, Y.Ito	An electrophysiological study of muscarinic and nicotinic receptors of rat paratracheal ganglion neurons and their inhibition by Z-338	Br J Pharmacol.	135	1403-1414	2002
N.Akaike, N.Murakami, S.Katsurabayashi, Jin YH T.Imazawa	Focal stimulation of single GABAergic presynaptic boutons on the rat hippocampal neuron	Neurosci Res.	42	187-195	2002
T.Kanematsu, Jang IS, T.Yamaguchi, H.Nagahama, K.Yoshimura, K.Hidaka, M.Matsuda, H.Takeuchi, Y.Misumi, K.Nakayama, T.Yamamoto, N.Akaike, M.Hirata, K.Nakayama	Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p 130 in GABA(A) receptor function	EMBO J.	21	1004-1011	2002
H.Yamanaka, A.Do, H.Ishibashi, N.Akaike	Aconitine facilitates spontaneous transmitter release at rat ventromedial hypothalamic neurons	Br J Pharmacol.	135	816-822	2002
A.Do, H.Ishibashi, S.Jinno, T.Kosaka, N.Akaike	Presynaptic inhibition of GABAergic miniature currents by metabotropic glutamate receptor in the rat CNS	Neuroscience	109	299-311	2002
T.Ueno, A.Okabe, N.Akaike, A.Fukuda, J.Nabekura	Diversity of neuron-specific K ⁺ -Cl ⁻ -cotransporter expression and inhibitory postsynaptic potential depression in rat motoneurons	J Biol Chem.	277	4945-4950	2002
A.Urayama, S.Yamada, R.Kimura, J.Zhang, Y.Watanabe	Neuroprotective effect and brain receptor binding of taltirelin, a novel thyrotropin-releasing hormone (TRH) analogue, in transient forebrain ischemia of C57BL/6J mice	Life Sciences	72	601-607	2002

Y.Yamada, Y.Watanabe, J.Zhang, J.Haraoka, H.Ito	Changes in cortical and cerebellar bcl-2 mRNA levels in the developing hydrocephalic rat (LEW-HYR) as measured by a real time quantified RT-PCR	Neuroscience	114	165-171	2002
H.Hamano, M.Noguchi, H.Fukui, A.Isshiki, Y.Watanabe	Regulation of brain cell environment on neuronal protection : role of TNF α in glia cells	Life Sciences	72	565-574	2002
S.Matsumoto, A.Isshiki, Y.Watanabe, T.Wieloch	Restricted clinical efficacy of cyclosporin A on rat transient middle cerebral artery occlusion	Life Sciences	72	591-600	2002

20020918

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.21-P.23の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。