

脳内出血病態形成におけるミクログリアの役割

大西正俊

The role of microglia in hemorrhagic brain injury

Masatoshi Ohnishi

ABSTRACT

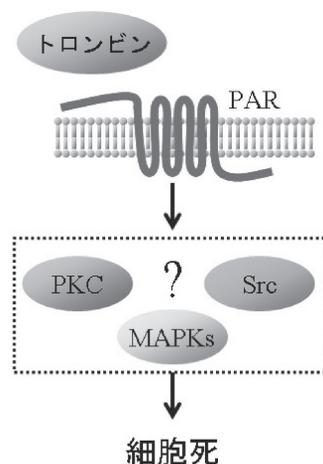
Intracerebral hemorrhage (ICH) represents stroke characterized by formation and expansion of hematoma within brain parenchyma. Blood-derived factors released from hematoma are considered to be involved in poor prognosis of this disorder. We previously reported that thrombin, a blood derived serine protease, induced cytotoxicity in the cerebral cortex and the striatum in organotypic slice cultures, which depended on activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways and recruitment of microglia. Here we investigated the mechanisms of tissue injury associated with ICH involved multiple actions of thrombin on cells within the brain parenchyma, including activation of microglia as well as direct cytotoxicity on neurons. Today I will review the following 3 findings that (1) thrombin and the activation of MAP kinases are involved in ICH-induced neuronal injury, and that neuroprotective effects of MAP kinases are in part mediated by arrestment of microglial activities, (2) p38 MAPK-dependent induction of heme oxygenase (HO)-1 supports survival of striatal microglia during thrombin insults, (3) nicotinic acetylcholine receptor stimulation exerts neuroprotective functions after long-term treatment.

1. 諸言 — Introduction —

脳内出血とは脳実質中へ出血した病態であり、主に被殻や視床で好発する。高血圧症が原因となる高血圧性脳内出血がほとんどを占めるが、その他にも、脳動静脈奇形のような先天的な脳血管の異常、白血病や再生不良性貧血など種々の出血性疾患、および脂質異常症（高脂血症）や糖尿病などに伴う慢性的な動脈硬化症などがその危険因子として挙げられる。高血圧治療の進歩により綿密な血圧管理が可能となった近年において、脳内出血の死亡者数は減少傾向にあるものの、脳梗塞などを合わせて定義される脳血管疾患の我が国における死亡者数は、悪性新生物、心疾患に次いで依然第3位であり、要介護となる原因としては現在もなお第1位を占める。血腫の部位や大きさによっては危険な状態に陥ることも多く、緊急時には外科的な血腫除去術の適応となることもあるが、原則として薬物を用いた内科的治療が中心となる。しかしながら現在のところ、脳浮腫を軽減するためのグリセリンやマンニトールのような高張輸液以外に臨床適応のある薬物療法はほぼ皆無である。したがって、出血性脳障害に対する新たな薬物治療法の開発は、脳内出血発症後の予後改善、つまり、患者のQOL (Quality of Life) の改善に繋がり、高齢化社会を迎える現代において重大なインパクトを持つ。

1-(1) 脳内出血時におけるトロンビンの陽と陰 — Thrombin Dilemma —

脳内出血発作時には、破綻した脳血管から血液と共に種々の血液内因子が脳実質中に漏出し、これらはいずれも脳組織障害の惹起に寄与することが示唆されている¹⁾⁻⁶⁾。血液凝固因子としても知られるトロンビンは、血小板の細胞膜上に発現している protease-activated receptor (PAR) を介して血小板の形態変化および凝集を引き起こし、これらの作用によって止血効果を発揮するという重要な役割を担っている一方で、この PAR は、中枢神経系においても広く分布していることが近年報告されており、トロンビンによる脳組織障害に深く関与していることが示唆されている⁷⁾⁻⁹⁾。トロンビンにより活性化された PAR は、protein kinase C (PKC)、

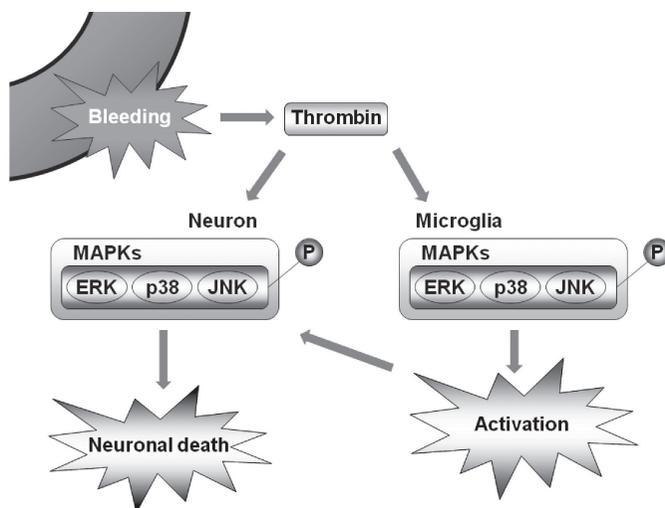


Src ファミリーチロシンキナーゼおよび mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ経路の活性化など、様々な細胞内シグナル伝達経路を駆動する¹⁰⁾⁻¹²⁾。そのうち MAP キナーゼファミリーには大きく分けて extracellular signal-regulated kinase (ERK)、p38 MAPK および c-Jun N-terminal kinase (JNK) の3種の主要なメンバーが含まれ、これらは細胞の分化・増殖あるいはアポトーシスなどに関与している。培養大脳皮質 - 線条体切片に対してトロンビンを用いた *in vitro* モ

デルにおいて、トロンビンによる線条体組織の萎縮がトロンビン阻害薬、タンパク質合成阻害薬および MAP キナーゼ阻害薬により抑制されることが明らかとなっており、トロンビンによる線条体組織障害には新規タンパク質合成を介したアポトーシス性の細胞死誘導や MAP キナーゼファミリーの活性化の関与が示唆される¹³⁾。

1-(2) トロンビンによるミクログリア活性化 — Double Trouble for Neurons —

PAR は、ニューロンだけでなくグリア細胞にも発現しており、トロンビンはミクログリアを活性化させることが知られている⁷⁾⁻⁹⁾。ミクログリアは脳内マクロファージとも呼ばれる免疫担当細胞であり、異物や死細胞の貪食を行う一方、炎症性サイトカインや活性酸素種を産生・遊離することによりニューロンを含む周辺組織に障害を与える。上述の *in vitro* モデルにおいて、ミクログリアの除去処置もまた、トロンビンによる線条体組織の萎縮を顕著に抑制することが明らかとなっており、トロンビンが、ニューロンに対して直接作用するのに加えて、ミクログリアの異常な活性化を介した間接作用もまた、ニューロン死の誘導に深く関与していることが示唆される¹³⁾。



そこで本稿では、出血性脳障害についてトロンビン毒性を中心にさらなる解析を進めた結果、得られた知見を概説する。

2. 出血性脳障害におけるトロンビンおよび MAP キナーゼ経路の関与

— Functions of MAP Kinases Thrombin Activates —

ラット線条体内にトロンビンを微量投与すると、投与直後にはネクロシス性、遅延性にはアポトーシス性のニューロン死が惹起された。また、トロンビンを投与した線条体内ではミクログリアの顕著な増殖および活性化が認められ、ミクログリアの活性化を抑制するミノサイクリンによってトロンビン毒性は有意に抑制された。さらに、トロンビン投与後にはミクログリアにおいて MAP キナーゼファミリーの活性化が観察され、各 MAP キナーゼファミリー阻害薬の適用によってトロンビン毒性は軽減された。これらの知見は、*in vitro* 大脳皮質-線条体切片培養系において駆動されるものと同様の機序が *in vivo* でのトロンビン神経毒性においても重要な役割を果たしていることを示している^{14),15)}。

線条体へのコラゲナーゼ微量投与により惹起した脳内出血においては、線条体の広範な領域において顕著なニューロンの脱落が観察された。トロンビン阻害薬であるアルガトロバンおよびタンパク合成阻害薬であるシクロヘキシミドの投与によって出血によるニューロン数の減少が抑制されたことから、血中トロンビンの脳実質への漏出がニューロンのアポトーシス性細胞死に関与していることが示された。また ERK、p38 MAPK および JNK の阻害薬 (PD98059、SB203580、SP600125) をそれぞれ投与すると、いずれの場合も出血によるニューロンの脱落が抑制された。そのうち ERK 活性化の阻害が最も顕著な神経保護作用をもたらしたので、ERK の活性化について詳細に検討したところ、出血後の線条体ではニューロンとミクログリアのいずれにおいても ERK の活性化が観察された (data not shown)。アポトーシスの指標の一つである TUNEL 陽性反応はニューロンにおいてのみ認められ、ミクログリアでは観察されなかったが、ERK、p38 MAPK あるいは JNK の阻害薬を投与した個体においては、ミクログリアでも TUNEL 陽性反応の出現が認められ、その後ミクログリア数が減少する傾向も確認された (Fig. 1)。以上の結果は、MAP キナーゼファミリーの活性化が、ニューロンに対して障害性に働くミクログリアの生存を維持する働きを介して出血後の線条体ニューロンの脱落に寄与している可能性を示しており、脳組織変性誘導時の MAP キナーゼの新たな役割を示唆する重要な知見である¹⁶⁾。

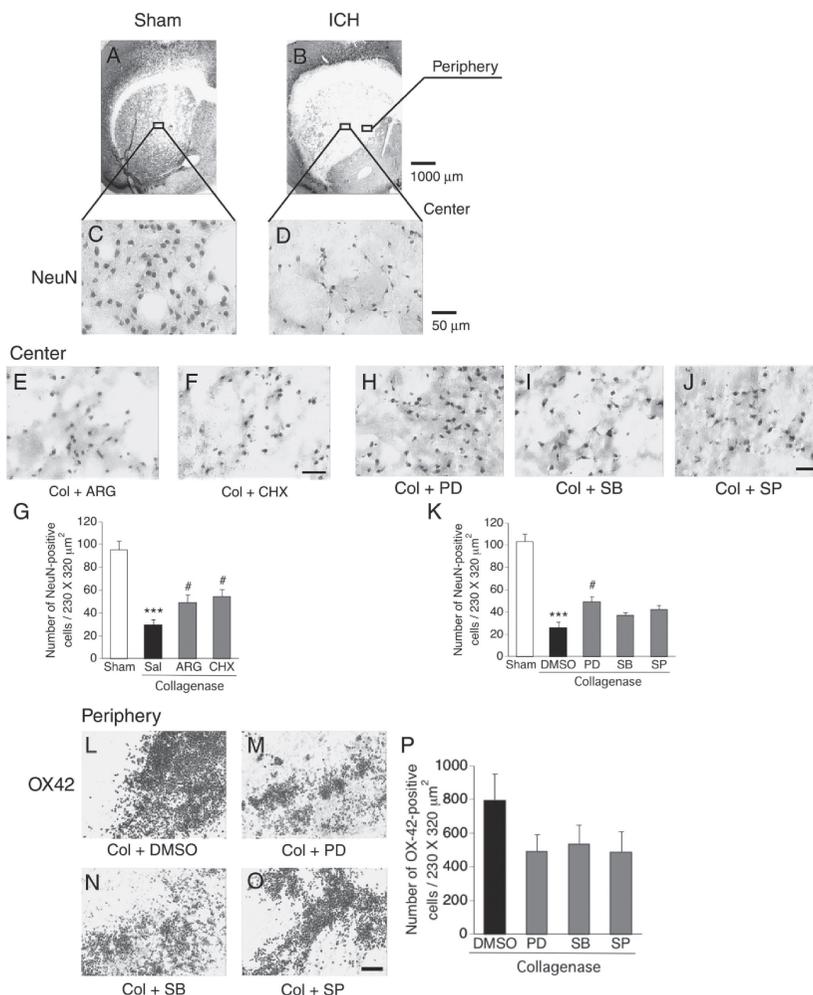


Fig.1 Involvement of thrombin and MAP kinase pathways in hemorrhagic injury. (A-D) Representative images of NeuN-immunostained coronal sections obtained 3 days after sham treatment (A and C) or 0.25 U collagenase injections (ICH; B and D). At low magnification (A and B), a decrease in NeuN immunoreactivity was evident at hematoma region in ICH group. Magnified views (C and D) reveal a substantial decrease in the number of NeuN-positive cells in the center of hematoma. (E, F, H-J) Shown are representative images of NeuN-immunostained coronal sections obtained 3 days after intrastriatal injection of collagenase (Col). The animals also received intracerebroventricular injections of vehicles, 2.5 μg argatroban (ARG; E), 10 nmol cycloheximide (CHX; F) or 5 nmol MAP kinase inhibitors (PD, SB, SP; H-J). Scale bar = 50 μm . (G, K) The number of neurons at center of hematoma. $n=5-8$ for each condition. *** $P < 0.001$ vs. sham group; # $P < 0.05$ vs. Col group. (L-O) OX42 immunohistochemistry was done on brain sections obtained 3 day after collagenase injection. Animals also received intracerebroventricular injection of vehicle (DMSO; L) or MAP kinase inhibitors (PD, SB, SP; M-O). Scale bar = 50 μm . (P) The number of microglia in the periphery region of hematoma at 3 days after collagenase injection. $n=7-8$ for each condition.

3. トロンピン誘発活性化ミクログリアにおける HO-1 の役割

— Microglial Survival and HO-1 —

コラゲナーゼ微量投与によって作成した *in vivo* 脳内出血モデルおよび培養脳切片にトロンピンを適用した *in vitro* モデルを用いた解析において、MAP キナーゼファミリー阻害薬は、線条体ミクログリアにおけるアポトーシス性細胞死を誘導し、それによって、ニューロンの脱落に寄与する活性化ミクログリア数が減少することが見出された^{16), 17)}。

一方、抗酸化酵素である heme oxygenase (HO)-1 の誘導機序として Nrf2-ARE 経路の他に MAP キナーゼ活性化が関与していることが報告されており、ミクログリア系 BV-2 細胞に HO-1 を発現させておくと、BV-2 細胞自身が種々の毒性因子（例えば、staurosporine, NO ドナーなど）に対して抵抗性を示すようになることや、出血後のマウス脳において血腫周辺領域のミクログリアに HO-1 の発現が観察されること、また、HO-1 欠損マウスにおいて脳内出血後のミクログリア数が野生型マウスのそれと比べて少なく、出血に起因する組織障害の程度も小さいことが報告されている¹⁸⁾⁻²⁰⁾。これらの知見から、MAP キナーゼの活性化がミクログリアに HO-1 の発現を誘導することによってミクログリア自身の生存を促進し、これが組織障害の拡大に寄与するのではないかと、この仮説が成り立つ。

In vitro 大脳皮質 - 線条体切片培養系において、トロンピンによる HO-1 の発現誘導はニューロンではなくグリア細胞において認められ、その発現は p38 MAPK 阻害薬によって有意に抑制された。また、トロンピンによる p38 MAPK の活性化は、線条体のニューロンおよびミクログリアにおいてのみ認められた。さらに、HO-1 阻害薬である ZnPP IX はミクログリアにアポトーシスを惹起し、トロンピン毒性を濃度依存的に軽減した。つまり、MAP キナーゼファミリーのうち p38 MAPK は、線条体ミクログリア特異的に HO-1 の発現を誘導することによってその生存を促進していることが示された (Fig. 2)²¹⁾。

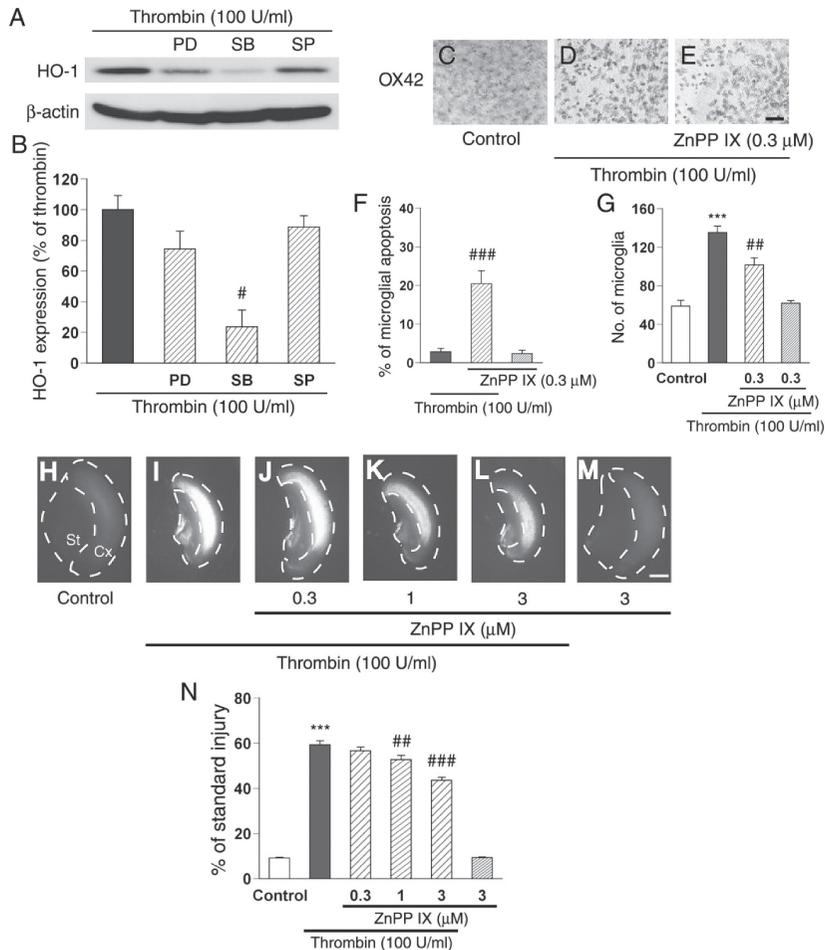


Fig.2 HO-1 contributes to pathology associated with thrombin-induced striatal and cortical injury in organotypic slice cultures. (A) Western blot analysis was performed on slice cultures that received 100 U/ml thrombin treatment with or without 100 μM MAP kinase inhibitors (PD, SB, SP) for 24 h. (B) Summary of the effects of MAP kinase inhibitors on HO-1 expression. $^{\#}P < 0.05$ vs. thrombin alone. $n=4$. (C-E) Representative images of OX42-immunostained slices after 72 h of treatment with 100 U/ml thrombin. Where indicated, 0.3 μM ZnPP IX was concomitantly applied for 72 h. Scale bar = 100 μm. (F) Summary of the effect of ZnPP IX combined with thrombin on appearance of apoptotic nuclei in striatal microglia. The number of slices examined for each condition ranged between 9 and 12. $^{###}P < 0.001$ vs. thrombin alone. (G) Summary of the effect of ZnPP IX on thrombin-induced increase in the number of OX42-positive cells in the striatal region. The number of slices examined for each condition ranged between 12 and 18. $^{***}P < 0.001$ vs. control; $^{##}P < 0.01$ vs. thrombin alone. (H-M) Representative images of propidium iodide fluorescence of whole slice cultures after 72 h of treatment with 100 U/ml thrombin in the absence and the presence of 0.3-3 μM ZnPP IX. Broken lines indicate areas of the cerebral cortex (Cx) and the striatum (St). Scale bar = 1 mm. (N) Summary of the effect of ZnPP IX on thrombin-induced shrinkage of the striatal tissue. The number of slices examined for each condition ranged between 36 and 48. $^{***}P < 0.001$ vs. control; $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$ vs. thrombin alone.

4. ニコチン性アセチルコリン受容体長期刺激によるトロンビン毒性の制御

— Suppression via Nicotinic Systems —

喫煙は脳内出血発症の危険因子であることがいくつかの疫学研究によって示されており、これにはおそらく脳血管やその他の循環系要素に及ぼす喫煙の悪影響が関与するものと推察される。ニコチン受容体はイオンチャネル型受容体であり、中枢神経系には主に $\alpha 7$ 受容体や $\alpha 4$ ($\alpha 4\beta 2$) 受容体が広く分布している²²⁾。ニコチン性アセチルコリン受容体は認知機能および運動機能の調節を含む様々な脳機能に関与する一方、その刺激はグルタミン酸やアミロイド β タンパクのような多種の障害からニューロンを保護することが報告されている²³⁾⁻²⁵⁾。さらに近年、ミクログリアの細胞障害性の機能がニコチン性アセチルコリン受容体の刺激によって抑制されるとの報告もなされており、出血性脳障害の病態形成を制御するニコチン性アセチルコリン系の新たな役割として期待される^{26), 27)}。

そこで、*in vitro* 培養大脳皮質 - 線条体切片においてニコチンおよびアンタゴニスト ($\alpha 7$; methyllycaconitine, $\alpha 4$; dihydro- β -erythroidine, non-selective; mecamylamine) を用いた解析を行い、ニコチン性アセチルコリン $\alpha 7$ および $\alpha 4$ 受容体サブタイプの長期刺激がトロンビンによるミクログリアの活性化を制御し、線条体組織障害を抑制することを明らかにした (Fig. 3)²⁸⁾。

なお、本研究の知見は、積極的な喫煙を推奨するものではない。

5. 総括 — Summary —

以上、出血に伴い脳実質中に漏出したトロンビンがMAPキナーゼ経路活性化を介してミクログリアの生存を維持しており、これが脳内出血後の線条体ニューロン死に密接に関係していることを初めて明らかにした。ここで述べた知見は、脳内出血後の病態形成におけるミクログリアおよびMAPキナーゼ経路の役割を解明したものであり、血液脳関門の破綻に関連した出血性脳障害に対する治療薬を開発する上で重要な基礎的知見を提供するものである。

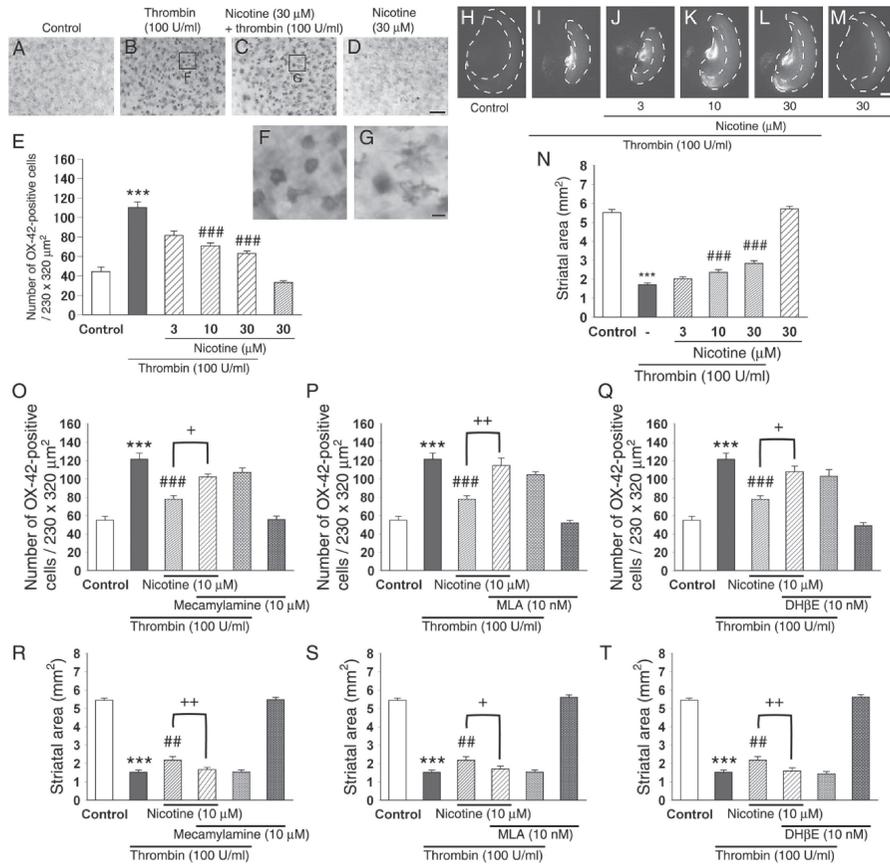


Fig.3 Long-term treatment with nicotine suppresses neurotoxicity of, and microglial activation by, thrombin in cortico-striatal slice cultures. (A-D) Represent images of OX42-immunostained slices after 72 h treatment with 100 U/ml thrombin. Where indicated, nicotine was applied for the entire period of culture of 15 days. Scale bar = 50 μm . (E) Summary of the effects of nicotine on thrombin-induced increase in the number of OX42-positive cells in the cortical region. Number of slices examined for each condition is 24-42. *** $P < 0.001$ vs. control; ### $P < 0.001$ vs. thrombin alone. (F, G) Images at a high magnification of the region indicated by the solid line in panel B and C, respectively. Scale bar = 10 μm . (H-M) Representative images of propidium iodide fluorescence of whole cultured slices after 72 h treatment with 100 U/ml thrombin. The slices also received treatment with nicotine at indicated concentrations (3-30 μM) for the entire period of culture of 15 days. Broken lines denote area of the cerebral cortex and the striatum. Scale bar = 1 mm. (N) Summary of the effect of nicotine on thrombin-induced cortical cell injury as assessed by the intensity of propidium iodide fluorescence. Number of slices examined for each condition is 24-42. *** $P < 0.001$ vs. control; ### $P < 0.001$ vs. thrombin alone. (O-Q) Effects of 10 μM mecamylamine (O), 10 nM methyllycaconitine (MLA; P) and 10 nM dihydro- β -erythroidine (DH β E; Q) on the effect of 10 μM nicotine against the increase of microglia in the cortical region induced by 72 h treatment with 100 U/ml thrombin. (R-T) Effects of 10 μM mecamylamine (R), MLA (S) and DH β E (T) on the protective effect of 10 μM nicotine against shrinkage of striatal tissue induced by 72 h treatment with 100 U/ml thrombin. Nicotine and nicotinic receptor antagonists were applied during the entire period of cultivation for 15 days. Number of slices examined for each condition is 24-41. *** $P < 0.001$ vs. control; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. thrombin alone; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$

6. 引用文献 — References —

- 1) Sinar, E.J., Mendelow, A.D., Graham, D.I., Teasdale, G.M., 1987. Experimental intracerebral hemorrhage: effects of a temporary mass lesion. *J. Neurosurg.* **66**, 568-576.
- 2) Lee, K.R., Colon, G.P., Betz, A.L., Keep, R.F., Kim, S., Hoff, J.T., 1996. Edema from intracerebral hemorrhage: the role of thrombin. *J. Neurosurg.* **84**, 91-96.
- 3) Huang, F.P., Xi, G., Keep, R.F., Hua, Y., Nemoianu, A., Hoff, J.T., 2002. Brain edema after experimental intracerebral hemorrhage: role of hemoglobin degradation products. *J. Neurosurg.* **96**, 287-293.
- 4) Sansing, L.H., Kaznatcheeva, E.A., Perkins, C.J., Komaroff, E., Gutman, F.B., Newman, G.C., 2003. Edema after intracerebral hemorrhage: correlations with coagulation parameters and treatment. *J. Neurosurg.* **98**, 985-992.
- 5) Gingrich, M.B., Traynelis, S.F., 2000. Serine proteases and brain damage - is there a link? *Trends Neurosci.* **23**, 399-407.
- 6) Xi, G., Reiser, G., Keep, R.F., 2003. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? *J. Neurochem.* **84**, 3-9.
- 7) Flynn, A.N., Buret, A.G., 2004. Proteinase-activated receptor 1 (PAR-1) and cell apoptosis. *Apoptosis* **9**, 729-737.
- 8) Striggow, F., Riek-Burchardt, M., Kiesel, A., Schmidt, W., Henrich-Noack, P., Breder, J., Krug, M., Reymann, K.G., Reiser, G., 2001. Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 595-608.
- 9) Noorbakhsh, F., Vergnolle, N., Hollenberg, M.D., Power, C., 2003. Proteinase-activated receptors in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 981-990.
- 10) Marinissen, M.J., Servitja, J.M., Offermanns, S., Simon, M.I., Gutkind, J.S., 2003. Thrombin protease-activated receptor-1 signals through Gq- and G13-initiated MAPK cascades regulating c-Jun expression to induce cell transformation. *J. Biol. Chem.* **278**, 46814-46825.
- 11) Suo, Z., Wu, M., Citron, B.A., Palazzo, R.E., Festoff, B.W., 2003. Rapid tau aggregation and delayed hippocampal neuronal death induced by persistent thrombin signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 37681-37689.
- 12) Wang, H., Ubl, J.J., Stricker, R., Reiser, G., 2002. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**, C1351-C1364.
- 13) Fujimoto, S., Katsuki, H., Kume, T., Akaike, A., 2006. Thrombin-induced delayed injury involves multiple and distinct signaling pathways in the cerebral cortex and the striatum in organotypic slice

- cultures. *Neurobiol. Dis.* **22**, 130-142.
- 14) Fujimoto, S., Katsuki, H., Ohnishi, M., Takagi, M., Kume, T., Akaike, A., 2007. Thrombin induces striatal neurotoxicity depending on mitogen-activated protein kinase pathways in vivo. *Neuroscience* **144**, 694-701.
 - 15) Fujimoto, S., Katsuki, H., Ohnishi, M., Takagi, M., Kume, T., Akaike, A., 2008. Plasminogen potentiates thrombin cytotoxicity and contributes to pathology of intracerebral hemorrhage in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **28**, 506-515.
 - 16) Ohnishi, M., Katsuki, H., Fujimoto, S., Takagi, M., Kume, T., Akaike, A., 2007. Involvement of thrombin and mitogen-activated protein kinase pathways in hemorrhagic brain injury. *Exp. Neurol.* **206**, 43-52.
 - 17) Ohnishi, M., Katsuki, H., Izumi, Y., Kume, T., Takada-Takatori, Y., Akaike, A., 2010. Mitogen-activated protein kinases support survival of activated microglia that mediate thrombin-induced striatal injury in organotypic slice culture. *J. Neurosci. Res.* **88**, 2155-2164.
 - 18) Ryter, S.W., Alam, J., Choi, A.M., 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev.* **86**, 583-650.
 - 19) Lee, S., Suk, K., 2007. Heme oxygenase-1 mediates cytoprotective effects of immunostimulation in microglia. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 723-729.
 - 20) Wang, J., Doré, S., 2007. Heme oxygenase-1 exacerbates early brain injury after intracerebral hemorrhage. *Brain* **130**, 1643-1652.
 - 21) Ohnishi, M., Katsuki, H., Izumi, Y., Kume, T., Takada-Takatori, Y., Akaike, A., 2010. Heme oxygenase-1 contributes to pathology associated with thrombin-induced striatal and cortical injury in organotypic slice culture. *Brain Res.* **1347**, 170-178.
 - 22) Hogg, R.C., Raggenbass, M., Bertrand, D., 2003. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **147**, 1-46.
 - 23) Kaneko, S., Maeda, T., Kume, T., Kochiyama, H., Akaike, A., Shimohama, S., Kimura, J., 1997. Nicotine protects cultured cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity via $\alpha 7$ -neuronal receptors and neuronal CNS receptors. *Brain Res.* **765**, 135-140.
 - 24) Kihara, T., Shimohama, S., Sawada, H., Honda, K., Nakamizo, T., Shibasaki, H., Kume, T., Akaike, A., 2001. $\alpha 7$ Nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block a β -amyloid-induced neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* **276**, 13541-13546.
 - 25) Mudo, G., Belluardo, N., Fuxe, K., 2007. Nicotinic receptor agonists as neuroprotective/neurotrophic drugs. Progress in molecular mechanisms. *J. Neural Transm.* **114**, 135-147.
 - 26) Shytle, R.D., Mori, T., Townsend, K., Vendrame, M., Sun, N., Zeng, J., Ehrhart, J., Silver, A.A., Sanberg, P.R., Tan, J., 2004. Cholinergic modulation of microglial activation by $\alpha 7$ nicotinic receptors. *J. Neurochem.* **89**, 337-343.

- 27) Suzuki, T., Hide, I., Matsubara, A., Hama, C., Harada, K., Miyano, K., Andrä, M., Matsubayashi, H., Sakai, N., Kohsaka, S., Inoue, K., Nakata, Y., 2006. Microglial $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *J. Neurosci. Res.* **83**, 1461-1470.
- 28) Ohnishi, M., Katsuki, H., Takagi, M., Kume, T., Akaike, A., 2009. Long-term treatment with nicotine suppresses neurotoxicity of, and microglial activation by, thrombin in cortico-striatal slice cultures. *Eur. J. Pharmacol.* **602**, 288-293.