

外傷性脳損傷モデルラットにおける ドーパミンD1様受容体作動薬 SKF-81297の治療効果

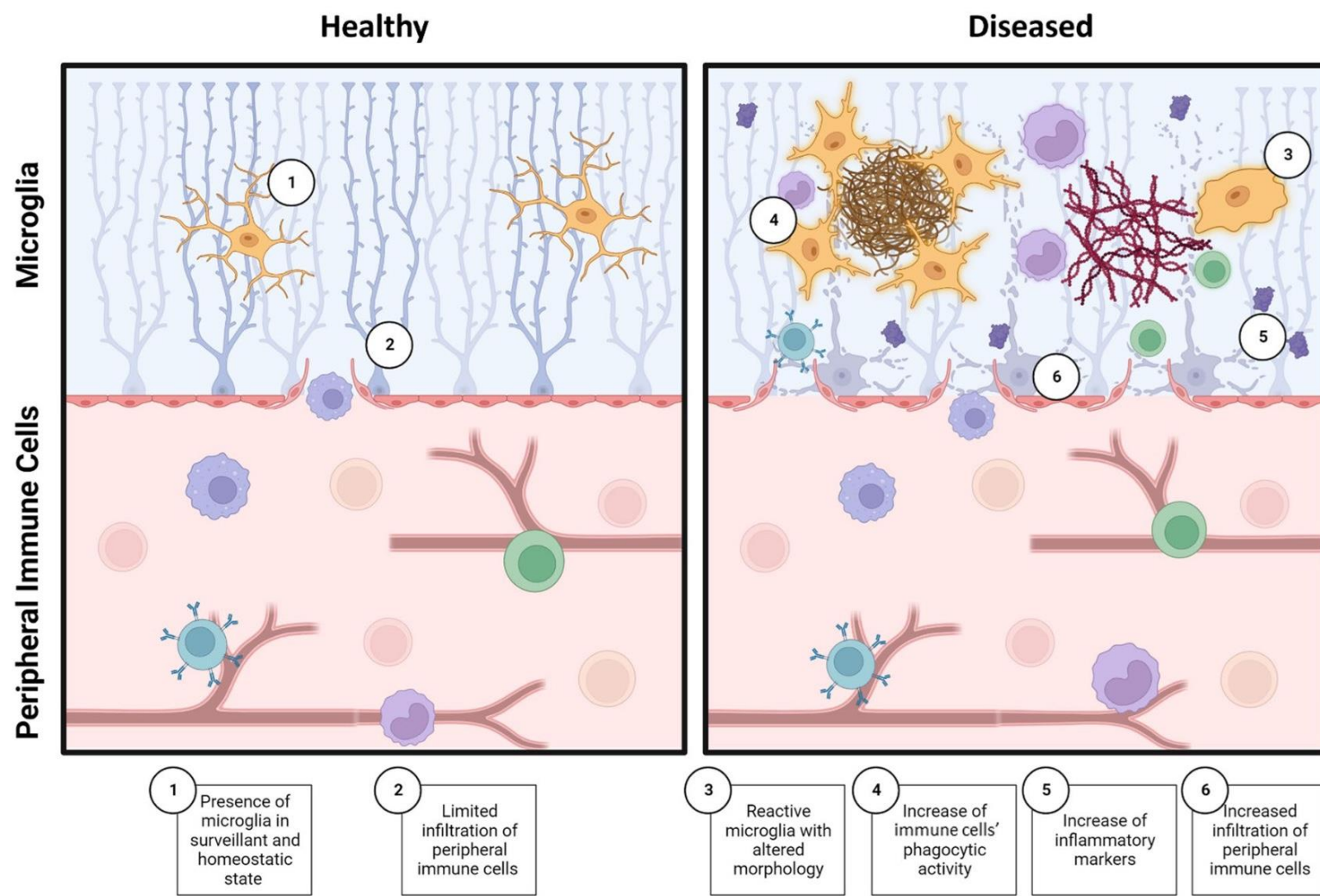
竹永絢音^{1,2}、ME. Choudhury²、宮上紀之¹、
阿部尚紀³、永井将弘¹、西原佑³、田中潤也²

¹愛媛大学大学院医学系研究科臨床薬理学

²愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学

³愛媛大学医学系研究科麻酔・周術期学

研究背景

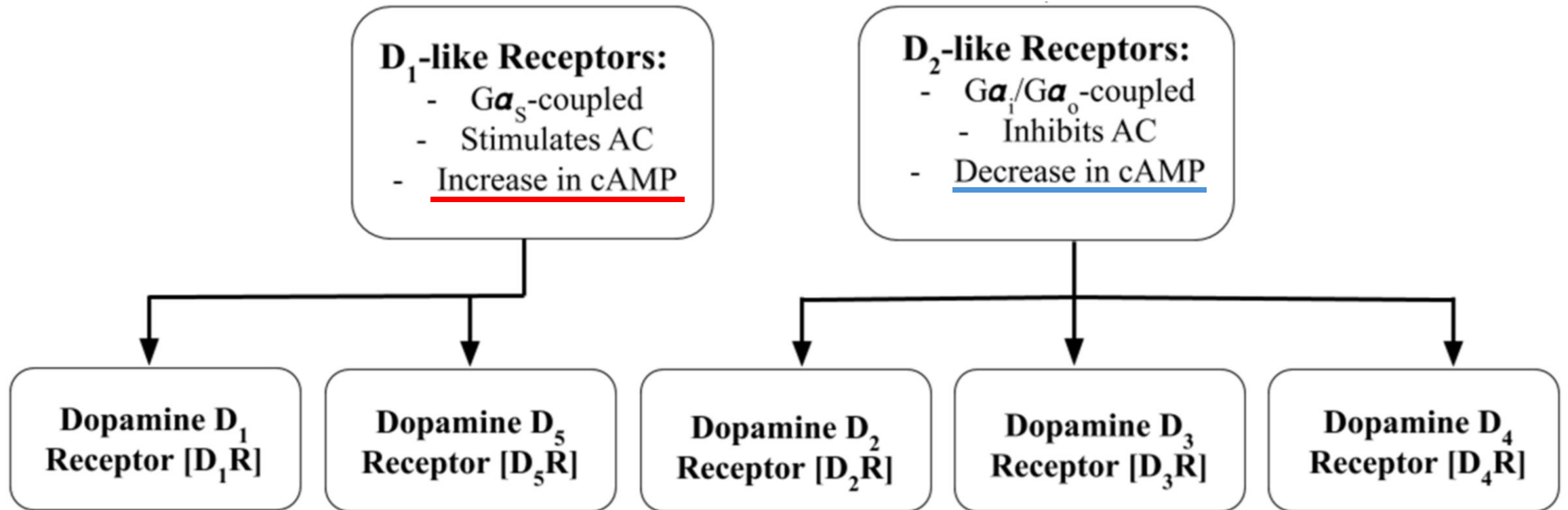


病的な状態の脳では、

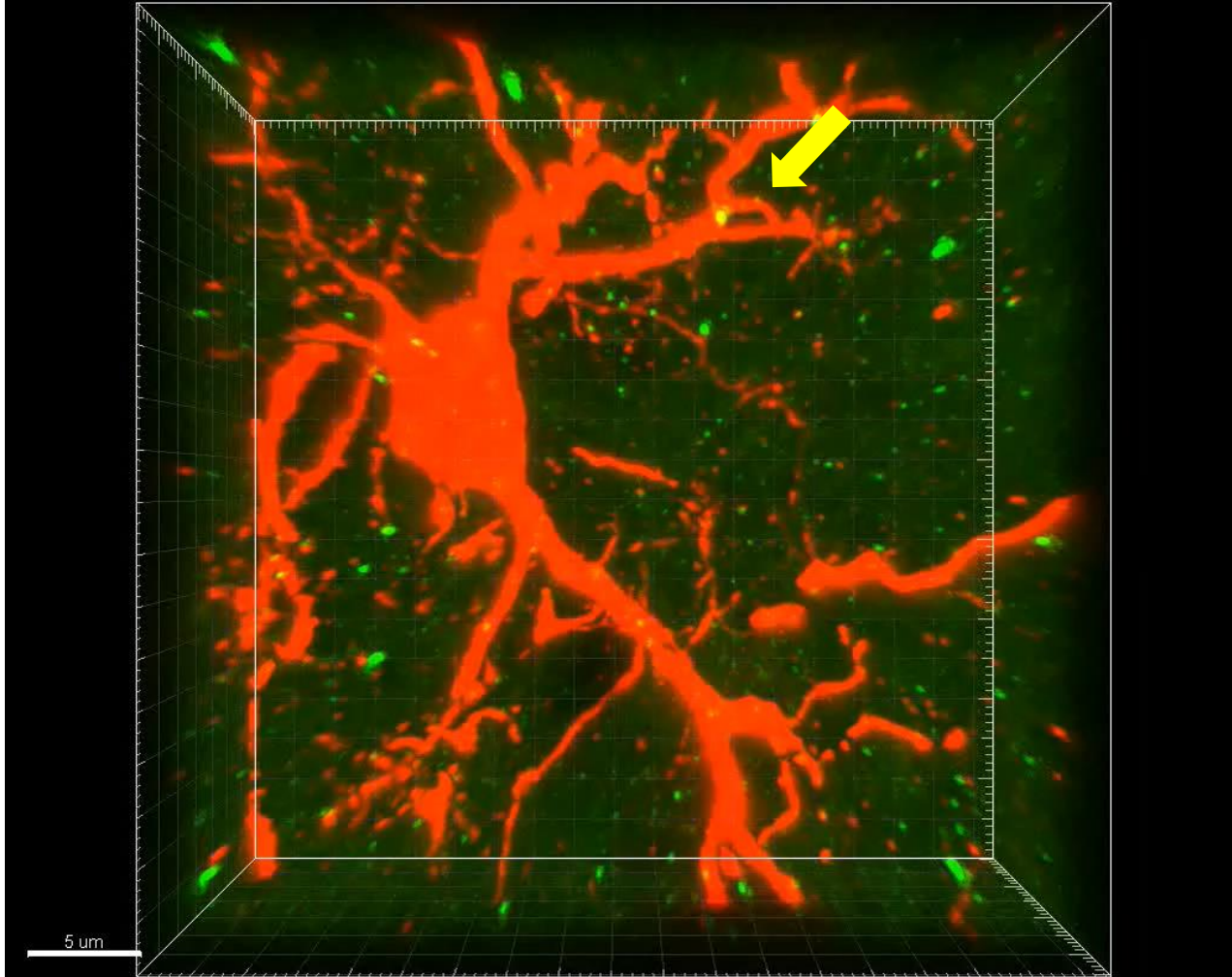
- ミクログリアの過剰な活性化
- ミクログリアの食作用の増強
- 末梢免疫細胞、
特にマクロファージの浸潤
などが見られる。

研究背景

➤ ドーパミン受容体



ミクログリアにおけるD1受容体の発現



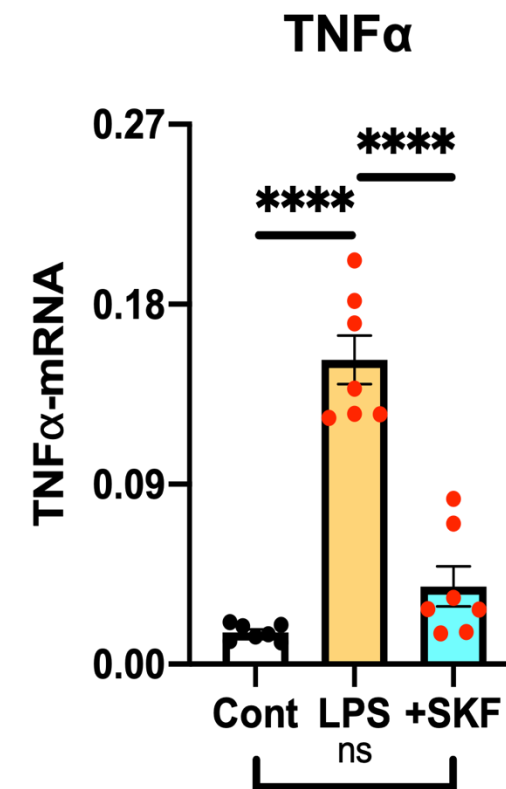
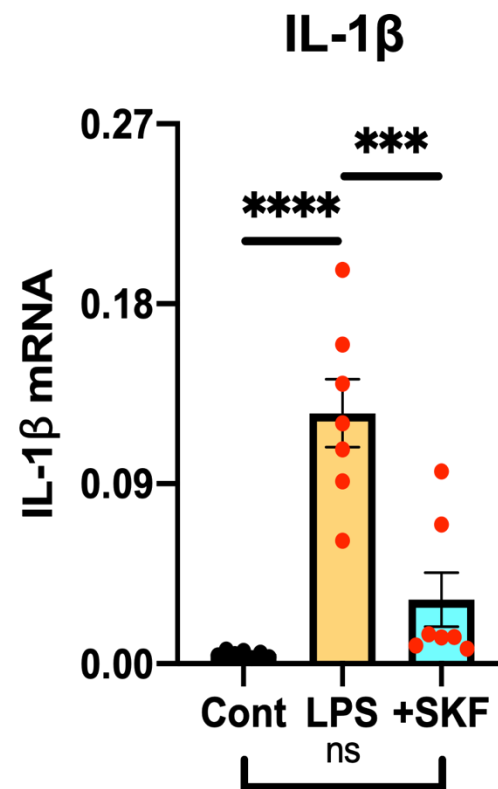
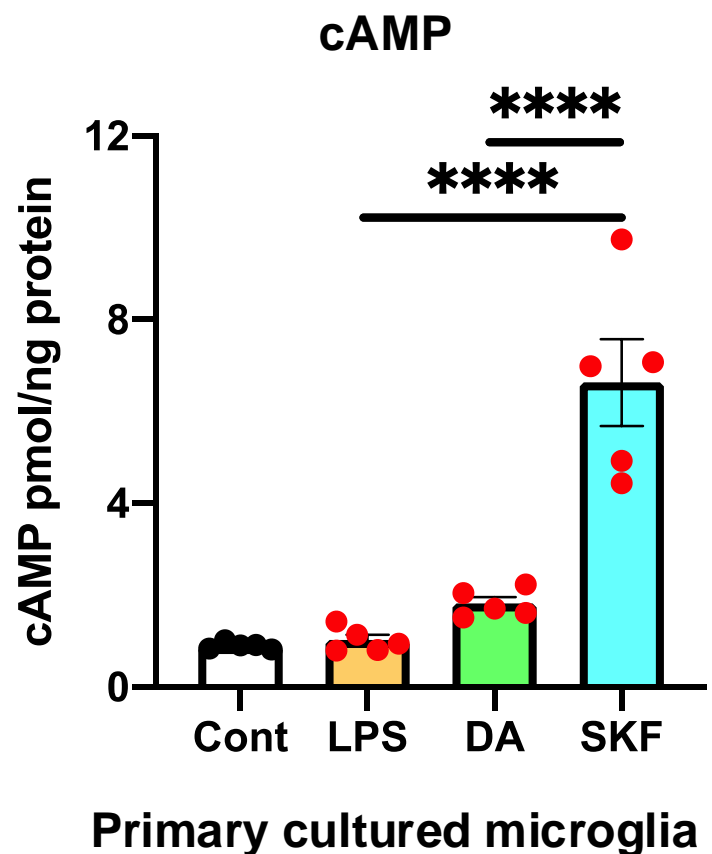
赤：ミクログリア（ミクログリア特異的マーカーIba1を染色）

緑：D1受容体（D1R）

ミクログリア上にD1Rが発現しており、黄色を呈していることがわかる。

ミクログリアの細胞内cAMPレベルと起炎症性活性化抑制

SKF : SKF-81297 [ドーパミンD1様受容体作動薬 (アゴニスト)]



ns $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

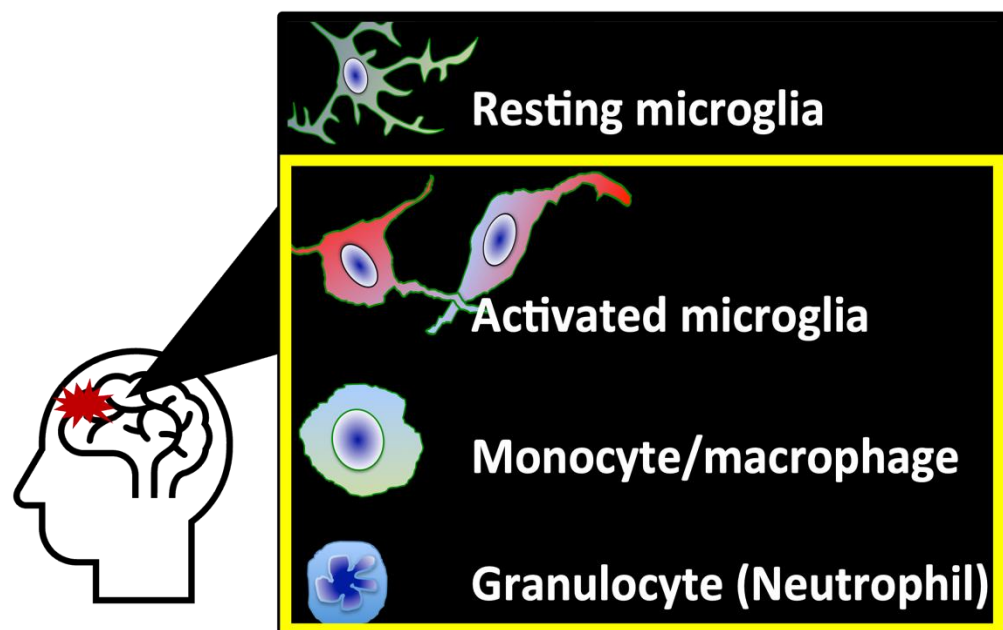
Nishikawa, Choudhury et al, 2023; Neurochem. Int.

研究目的

外傷性脳損傷 (TBI, Traumatic brain injury)

頭部に物理的な衝撃が加わり、脳組織が傷つくことで起こる病態。

物理的な一次損傷によって脳浮腫を生じ、また、頭蓋内圧を上昇させ、虚血状態に至る。虚血や浮腫といった状態は、炎症性サイトカインの放出やフリーラジカルの産生を招き、神経炎症を引き起こす。



これらの細胞による持続的な神経炎症は神経変性疾患の原因となる

研究方法

TBIモデルラット



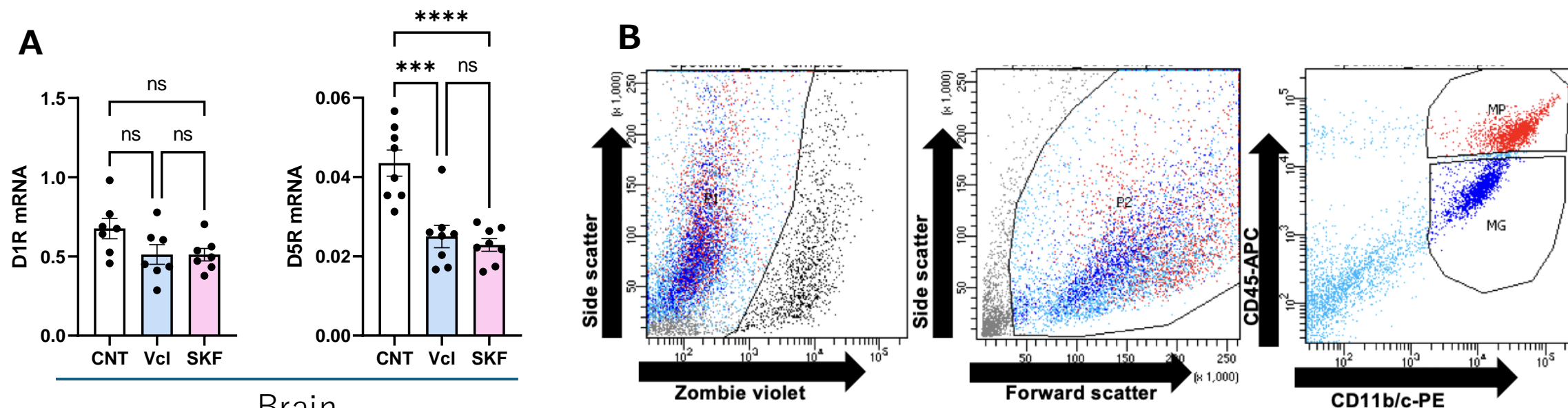
- 麻酔下で、皮膚を縦方向に15mm切開し、頭蓋骨を露出させる。
- 矢状縫合から後方1mm、冠状縫合から右2.5mm、4mmの2ヶ所に、26ゲージの針を深さ7mmまで刺し、正中線と平行に扇状に動かす。
- 皮膚の切開部を瞬間接着剤で閉じる。



6時間後、
または24時間後

qPCR, FCM and ELISA

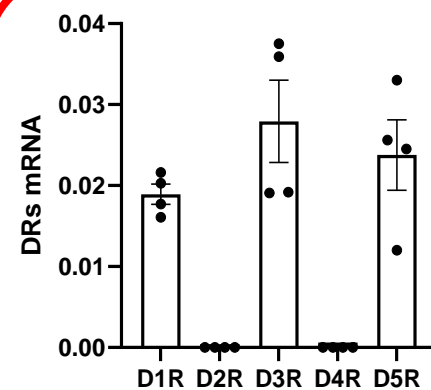
TBIの脳におけるドーパミン受容体の発現



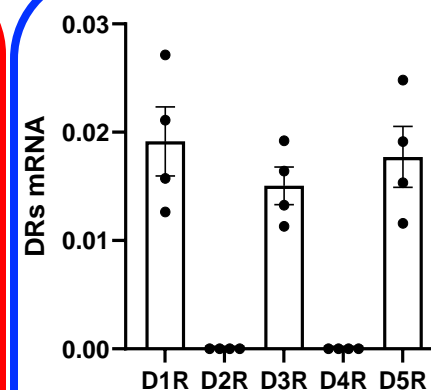
脳内では、D5RよりD1Rの発現が優位である可能性がある。(A)
ミクログリア、マクロファージ共にD1様受容体の発現量が多い。(B・C)

ns $p > 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

C

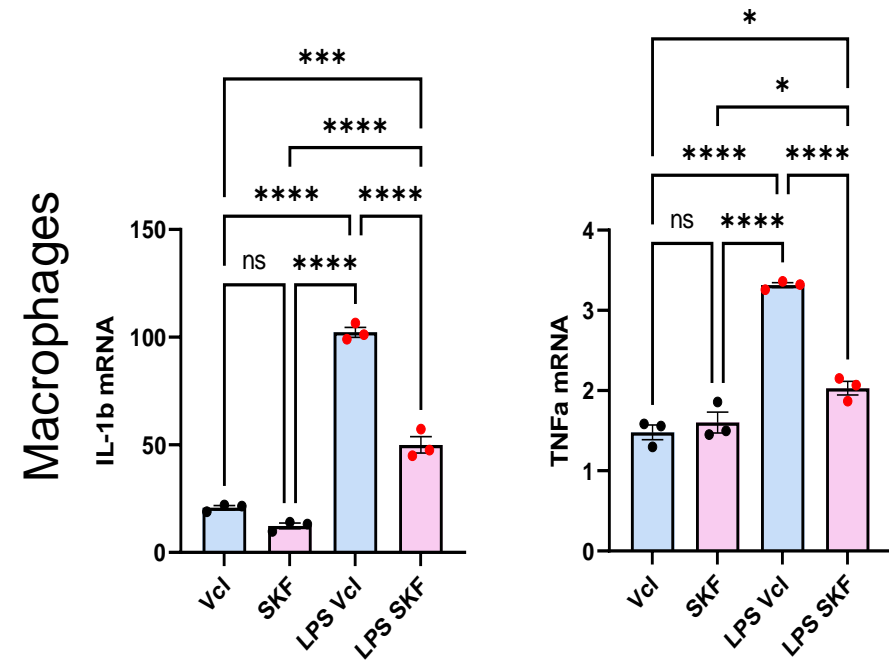
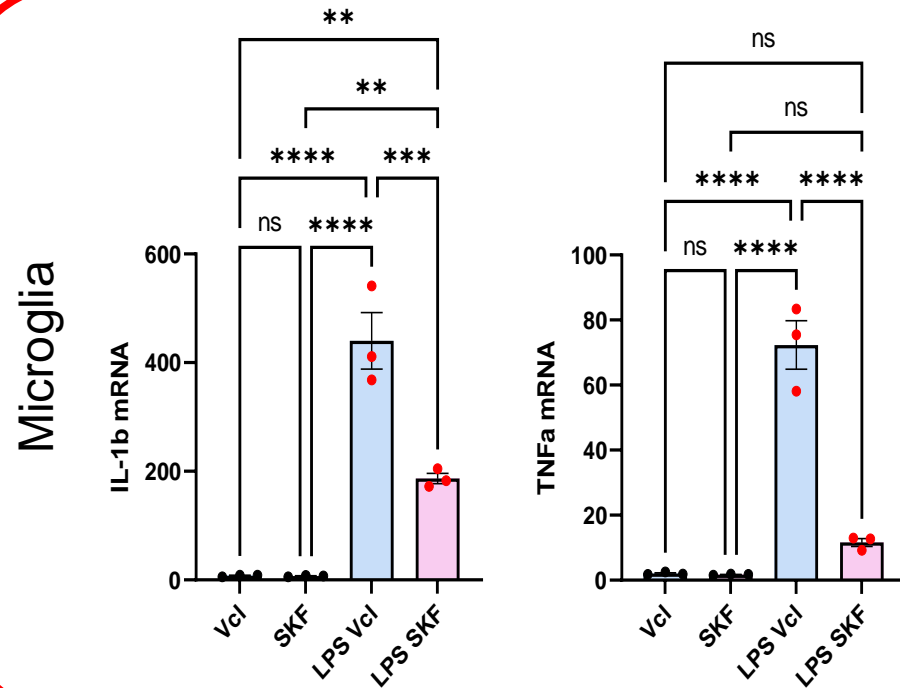


Sorted microglia (MG)



Sorted macrophages (MP)

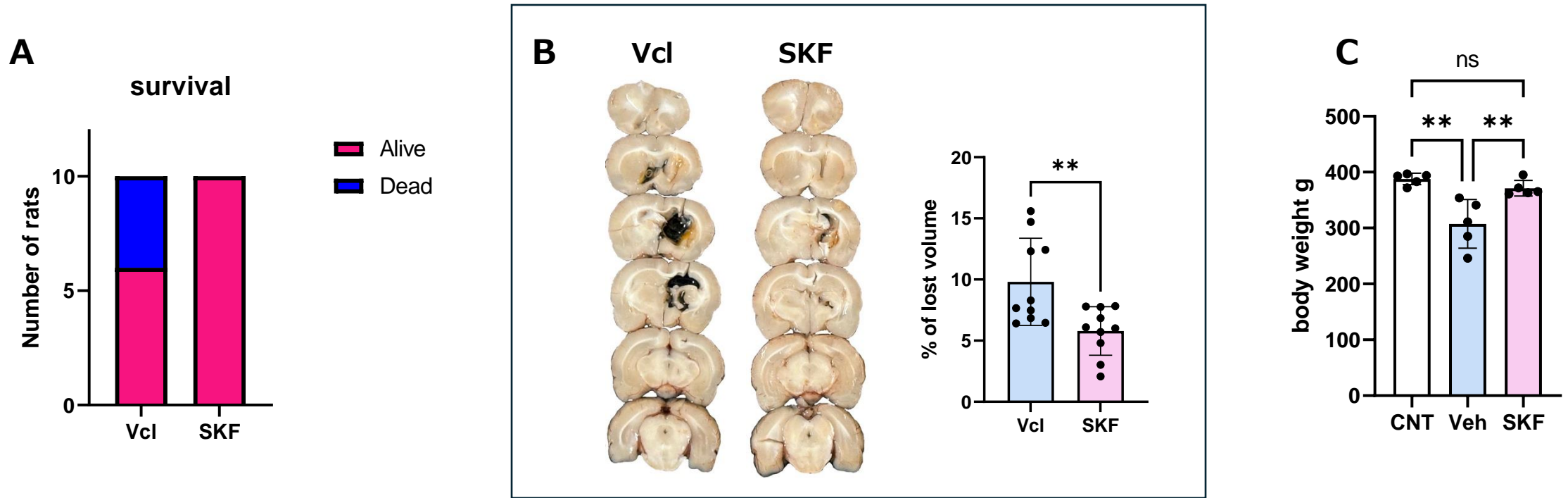
LPS誘発性炎症に対するSKFの効果



SKFを投与すると、培養ミクログリア、腹腔マクロファージ共にLPS誘導性の炎症性サイトカイン（IL-1β、TNFα）の発現量が減少した。

ns p>0.05, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001

SKFはTBIに対する治療効果を発揮する



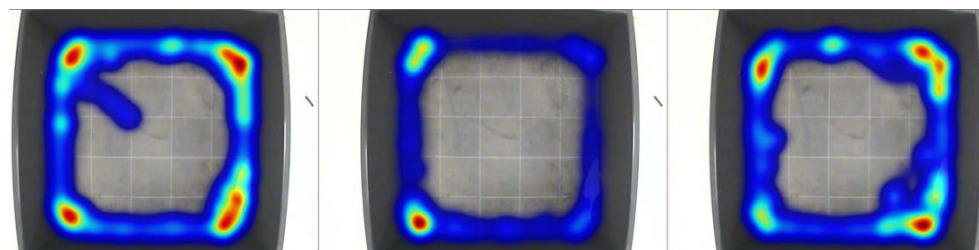
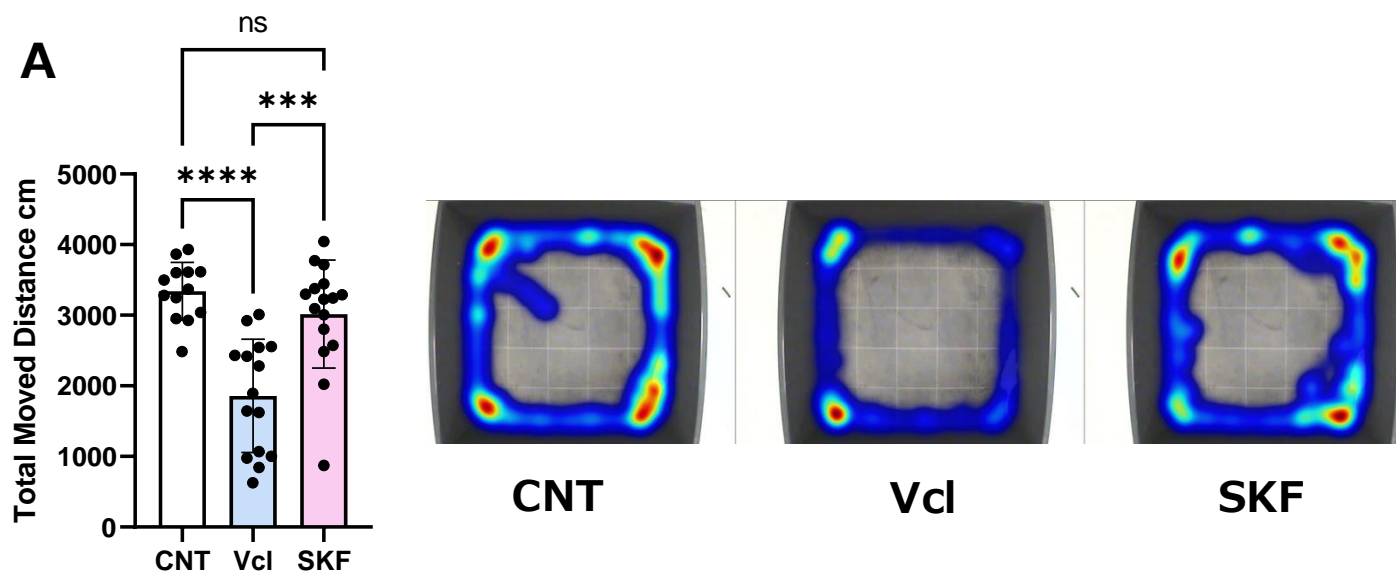
(A) SKF群のTBI 24時間後の生存率は向上した。

(B) TBIによる9週間後の脳組織の喪失は、SKF投与によって有意に改善された。

(C) また、1週間後の体重減少も防がれた。

ns $p > 0.05$, ** $p < 0.01$

SKF投与後の運動機能および認知機能



CNT

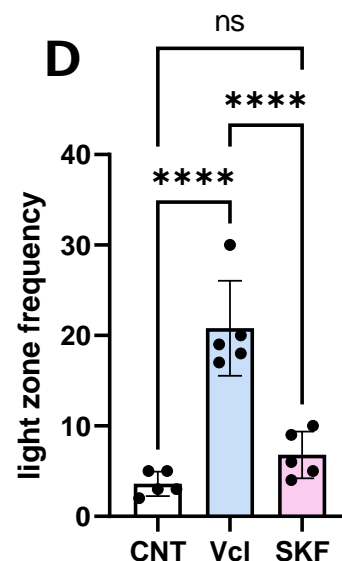
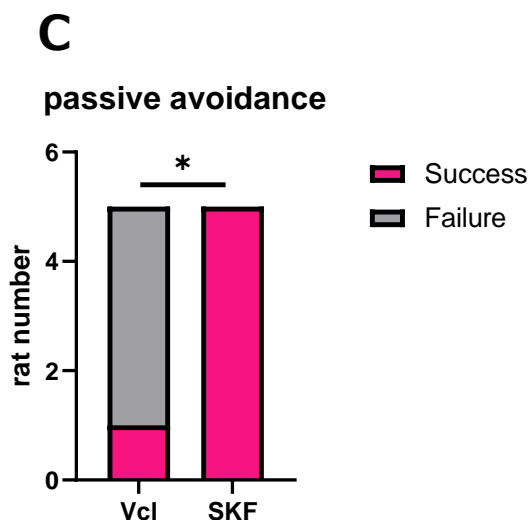
Vcl

SKF

SKF投与後、以下のTBIによって誘発される機能障害は改善された。

(A) Open-field test : 運動機能

(B) Morris water maze (MWM) test : 認知機能

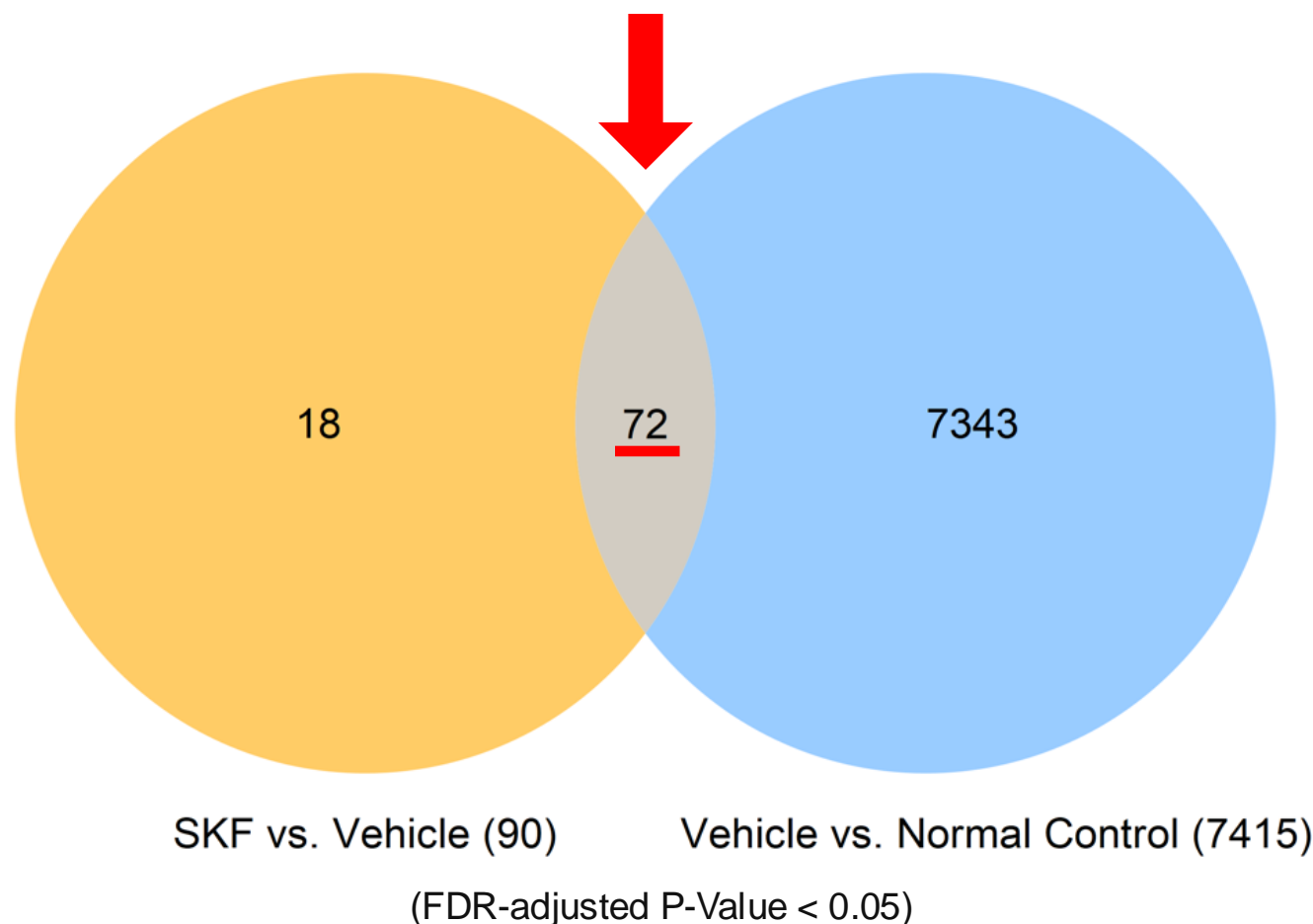


(C) Passive avoidance (PA) test : 学習・記憶機能

(D) Light and Dark box (LD box) test : 注意力

ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

発現変動遺伝子(DEGs, Differentially expressed genes)

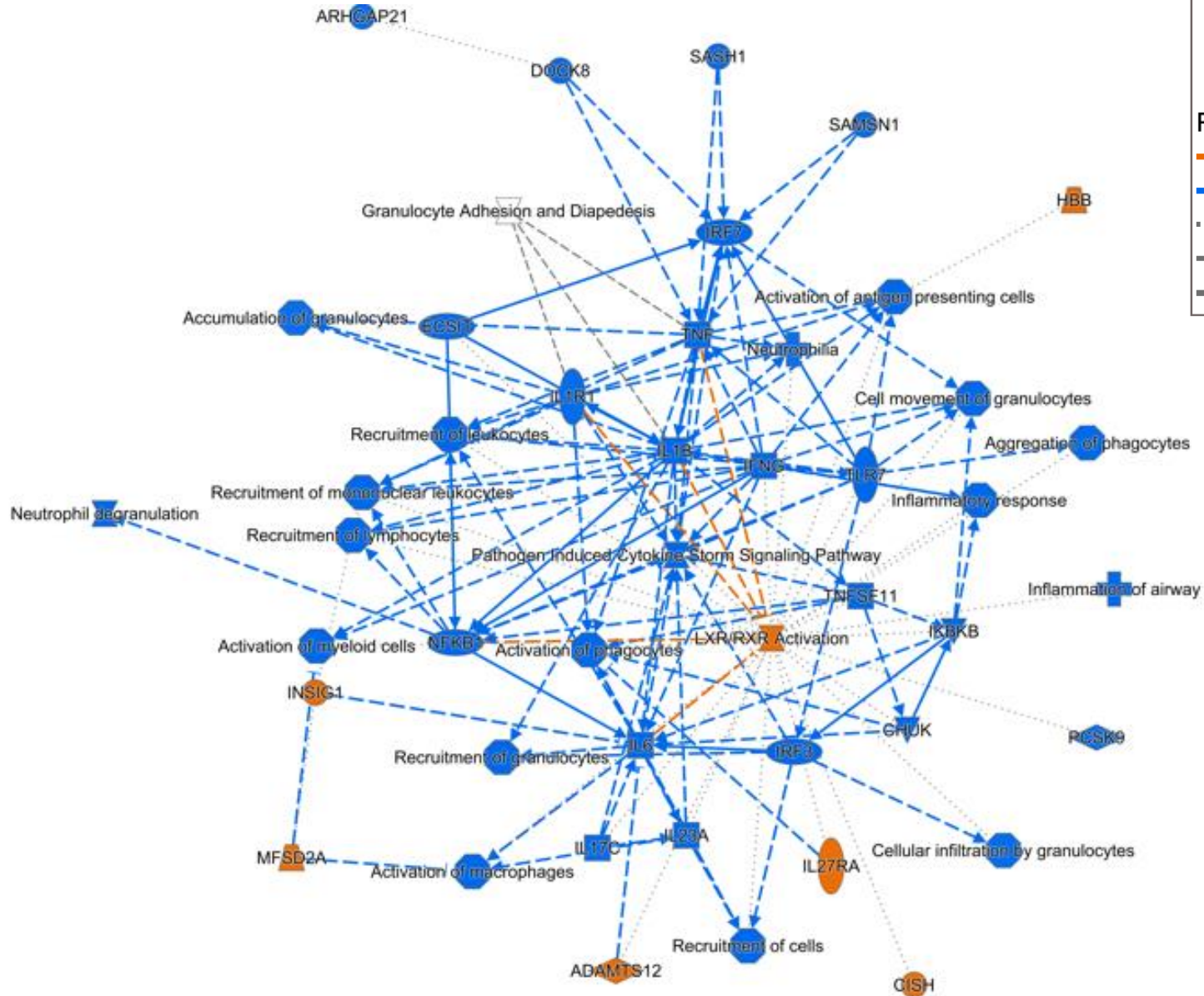


全遺伝子発現を調べるRNAseqにより、
TBIによって誘導される
7343遺伝子の発現変動を
確認した。

そのうち、SKF投与によって
72遺伝子の発現が変化した。


主な発現変動遺伝子はIL-1 β など
起炎症性シグナル分子群である。

Pathway analysis



Graphical Summary Legend

Predicted Activity

 Predicted activation Predicted inhibition

Relationships Between Nodes

— Leads to activation

— Leads to inhibition

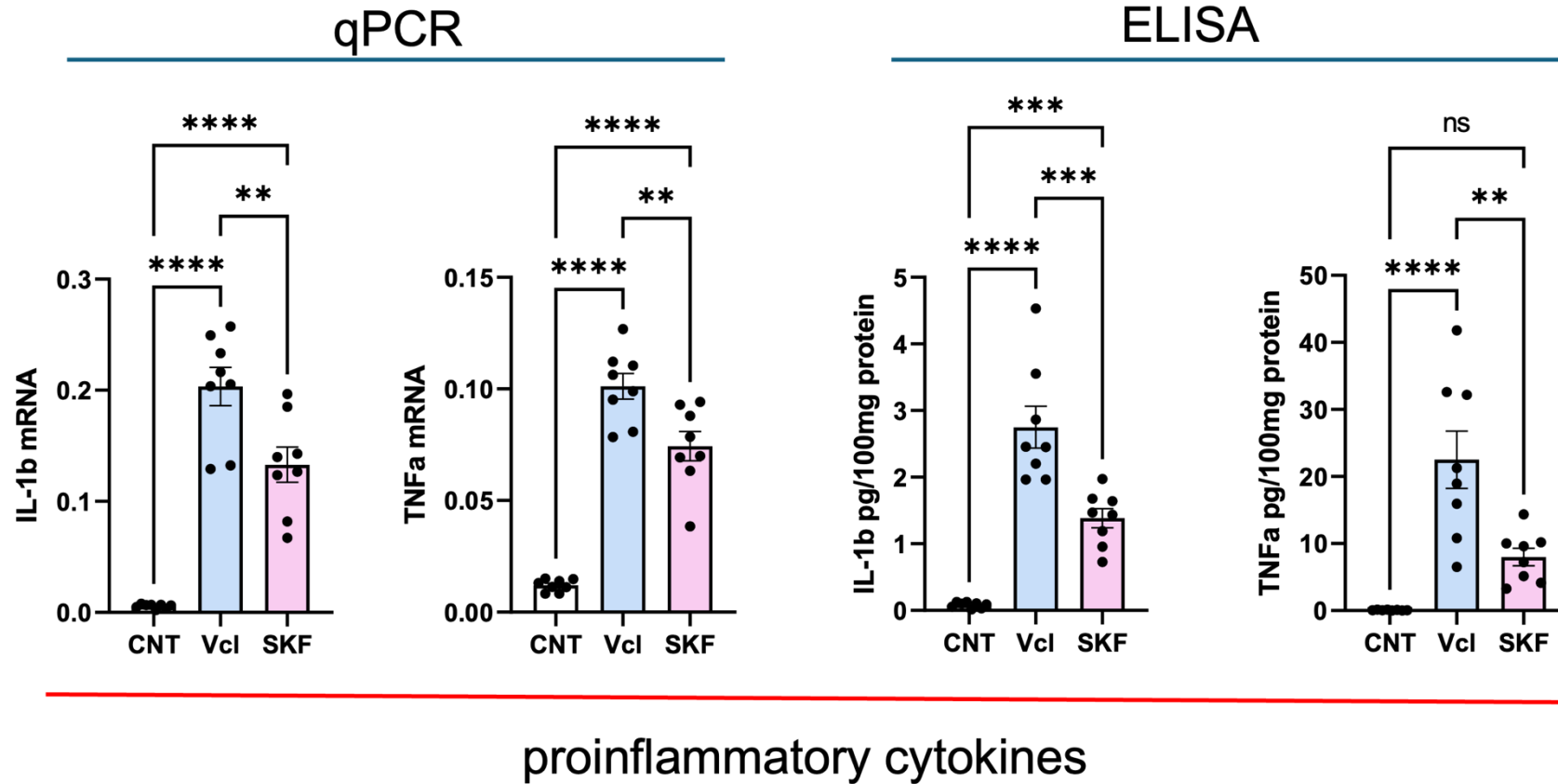
```
..... Inferred relationship
```

- - - Indirect interaction

— Direct interaction

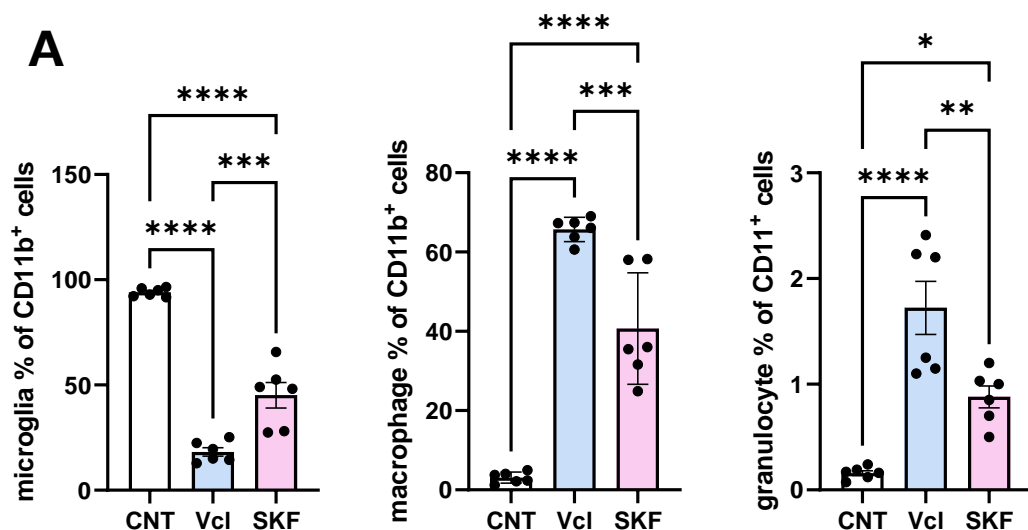
SKFは、免疫細胞の活性化や、白血球の脳内浸潤などを促進するパスウェイを阻害していることがわかった。

TBI後の脳内の炎症性サイトカインの発現変化

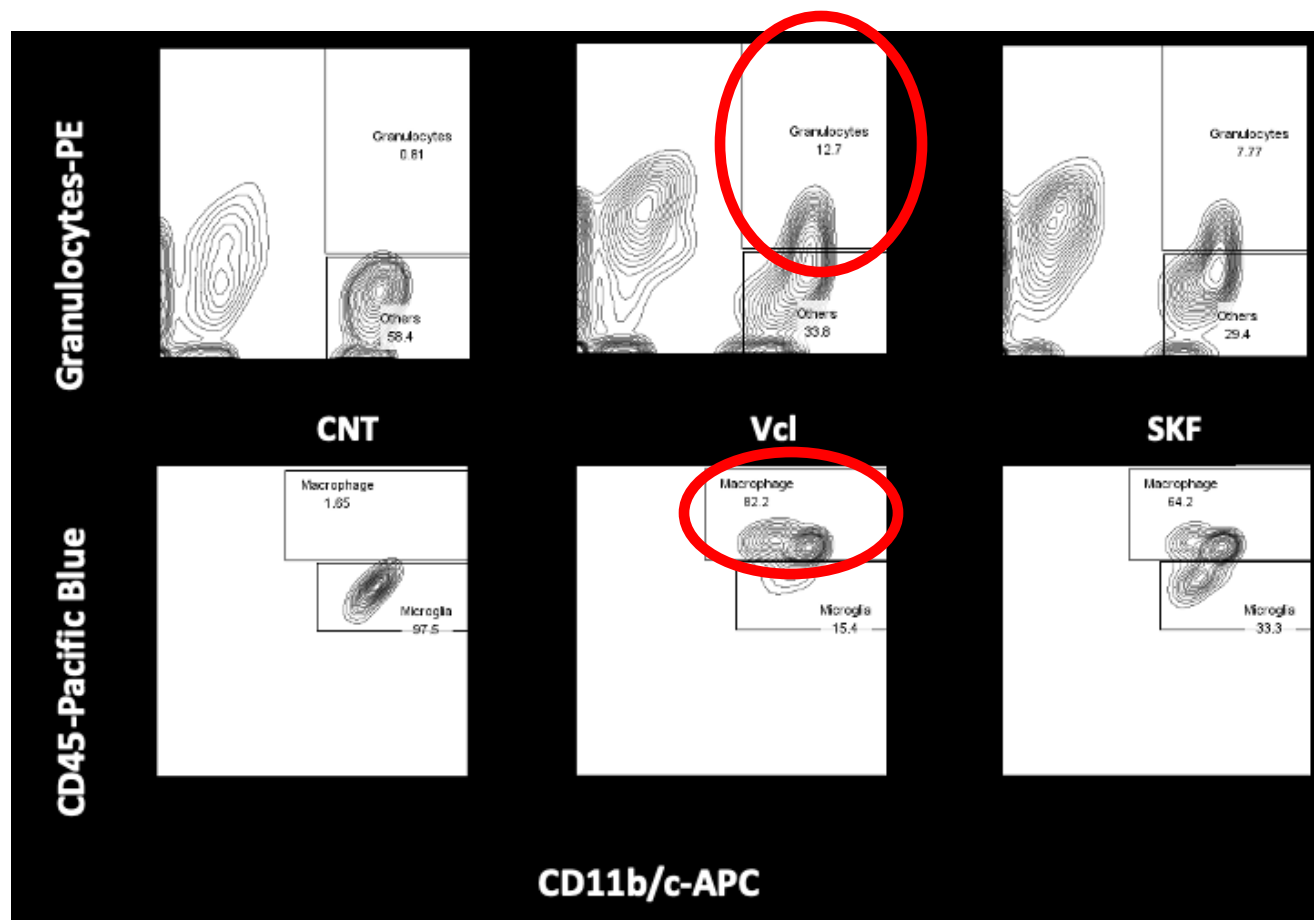


SKFを投与すると、TBI誘導性の炎症性サイトカイン（IL-1β、TNFα）の発現量が減少した。 ns $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

TBI後の脳内の白血球数



B



TBI後には単球および顆粒球といった白血球の浸潤が見られる。

SKFを投与すると、白血球の浸潤は抑えられた。(A・B)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

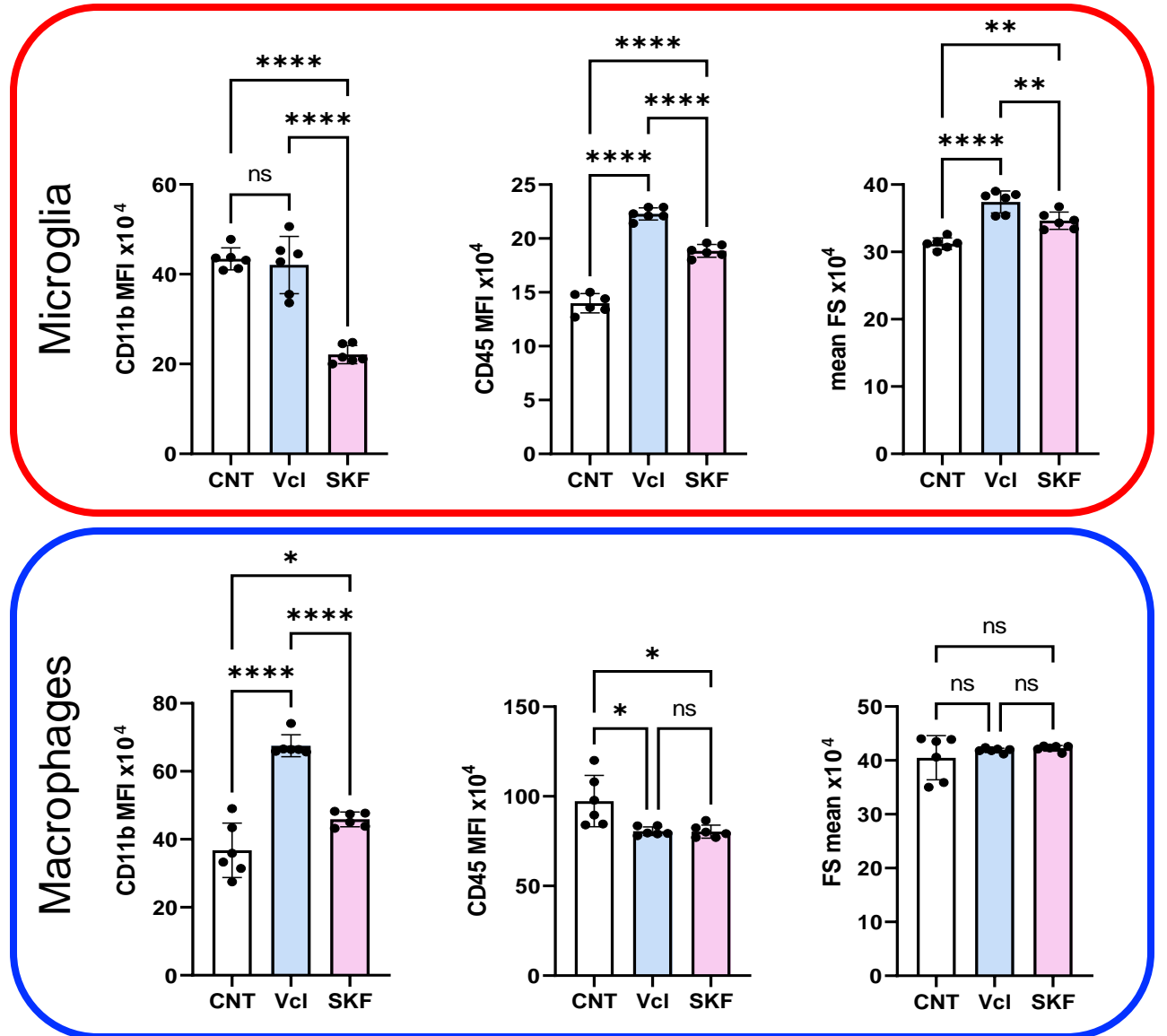
ミクログリアとマクロファージの発現変化

MFI: mean florescence intensity

SKFを投与すると、
ミクログリアのCD11bとCD45の
発現量は減少し、
FS値（=細胞の大きさ）も
減少した。

一方、マクロファージでは
CD11bの発現量は減少したものの、
CD45とFS値では変化が
見られなかった。

ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

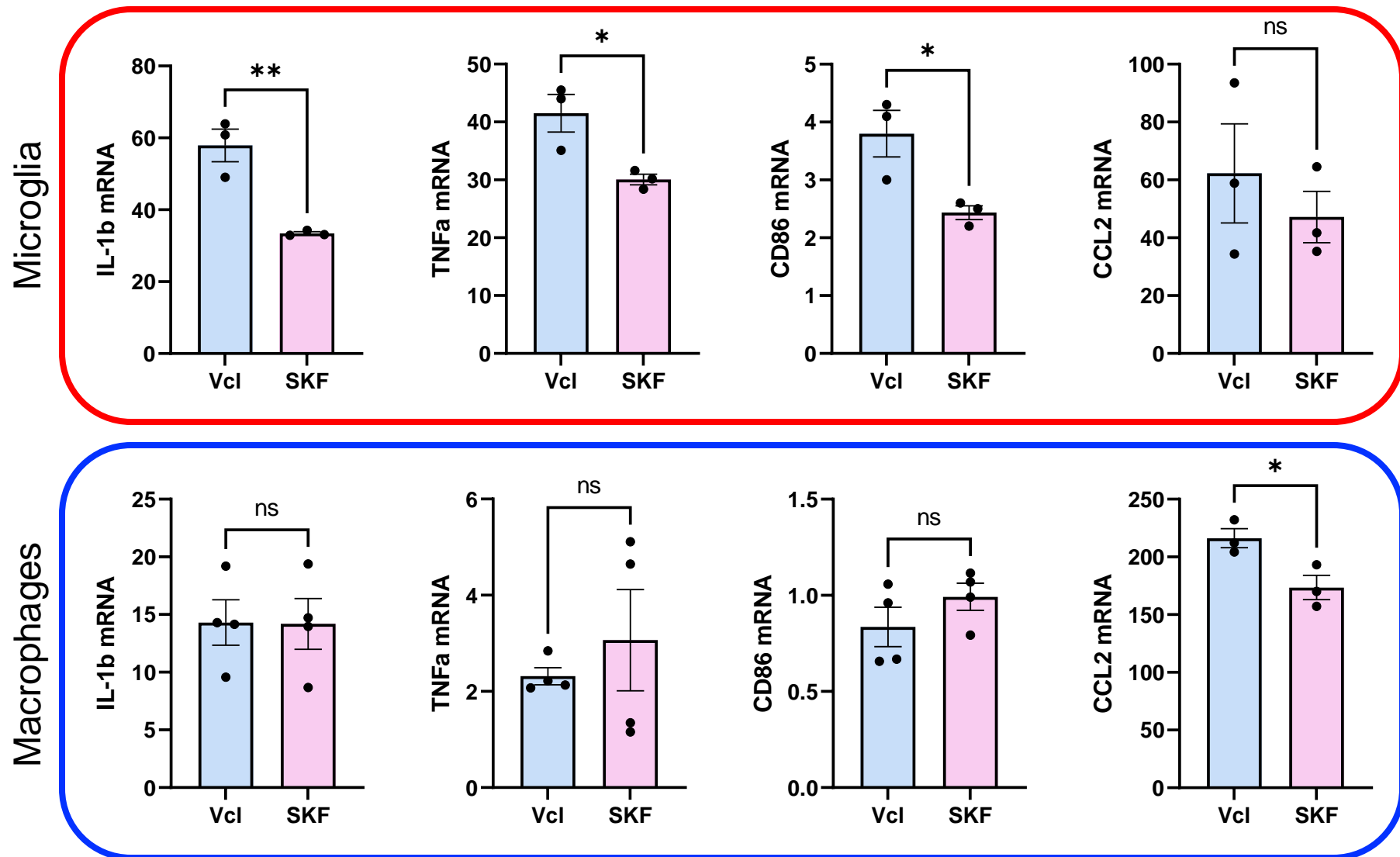


分取ミクログリアとマクロファージ：炎症性サイトカインの発現

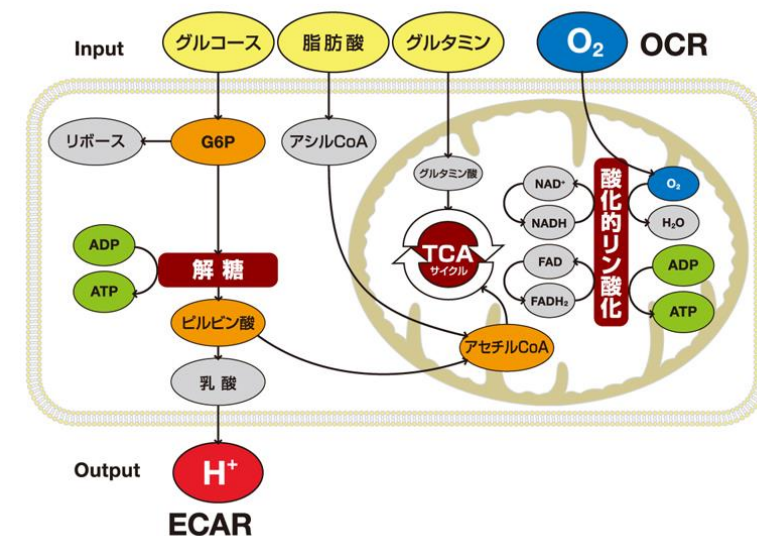
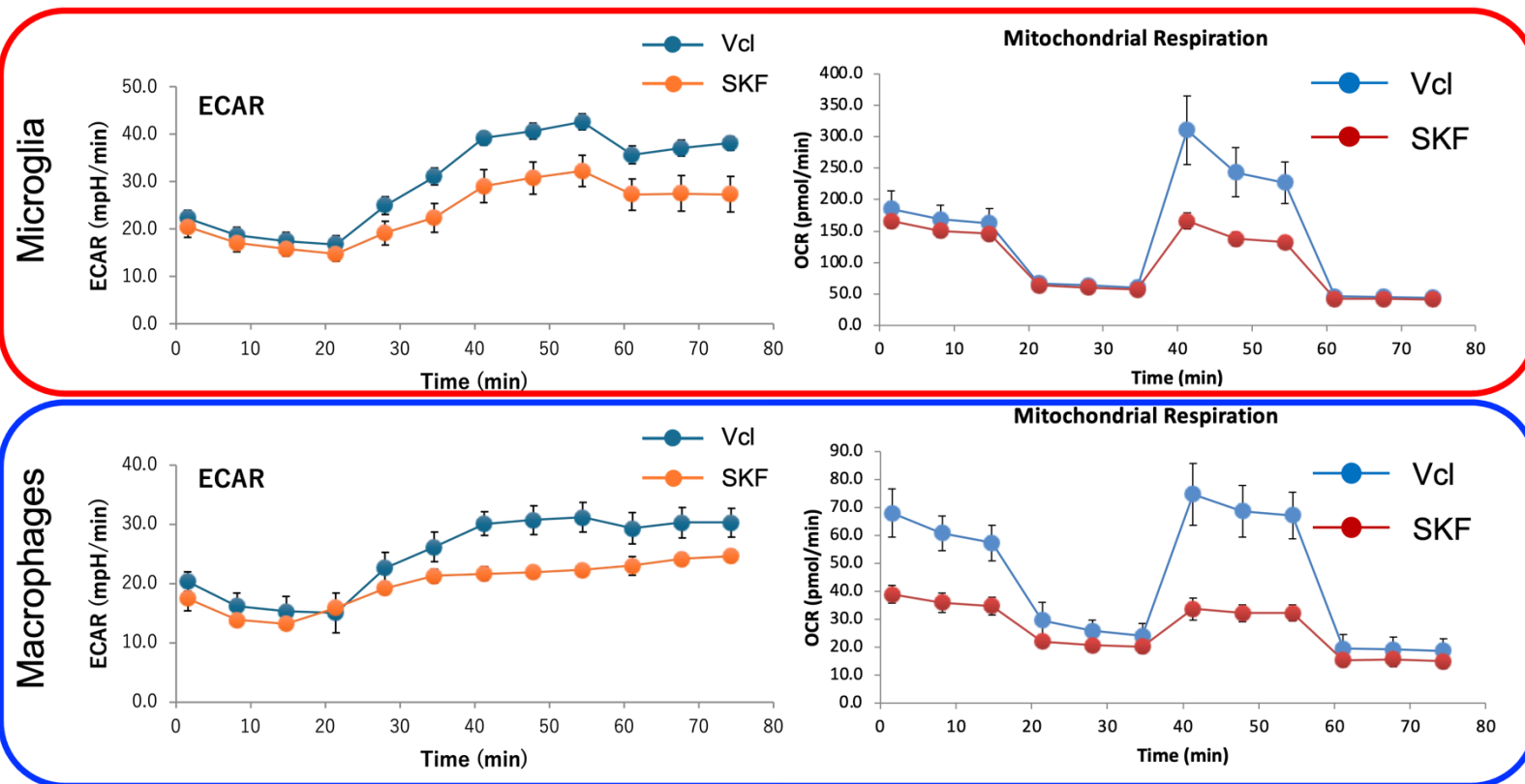
ミクログリアでは炎症性サイトカイン（IL-1 β 、TNF α 、CD68、CCL2）の発現量は減少した。

一方、マクロファージでは有意な差が見られなかった。

これは、SKFの主たるターゲットがミクログリアであることを示唆している。



SKFの細胞代謝活性への効果

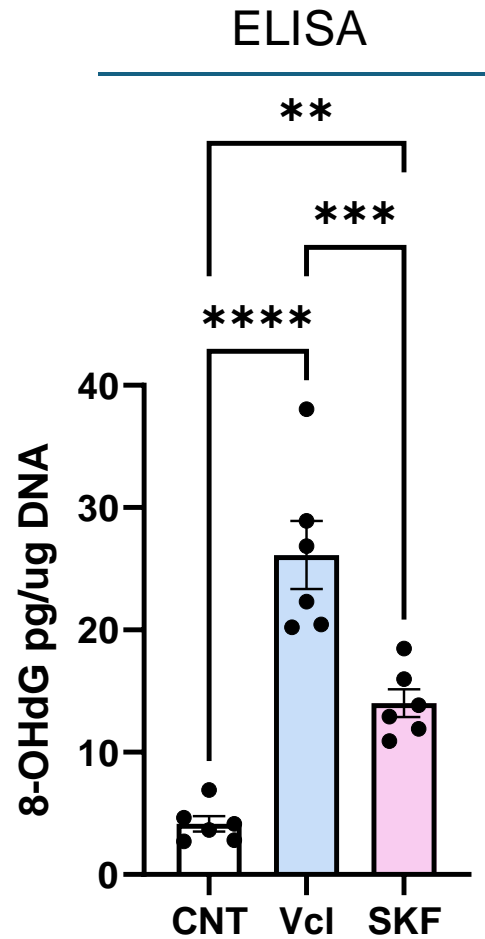


ECAR.....解糖系

OCR.....ミトコンドリア呼吸

SKFはミクログリア、マクロファージの細胞代謝活性（解糖系、酸化的リン酸化）を抑制する。これは、炎症反応の抑制と関連すると考えられる。

TBI後の脳内の酸化ストレスマーカーの発現変化



8-OHdG : 8-ヒドロキシデオキシグアノシン

TBI後の酸化ストレスによってDNAは損傷される。DNA酸化損傷マーカーである8-OHdGは、TBI後に増加するが、SKFを投与すると減少する。SKFは酸化ストレスから脳を保護する可能性がある。

** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001

SKFの酸化ストレスへの効果

SKFはNADPHオキシダーゼ2 (NOX2) といった酸化酵素の発現量を減少させた。

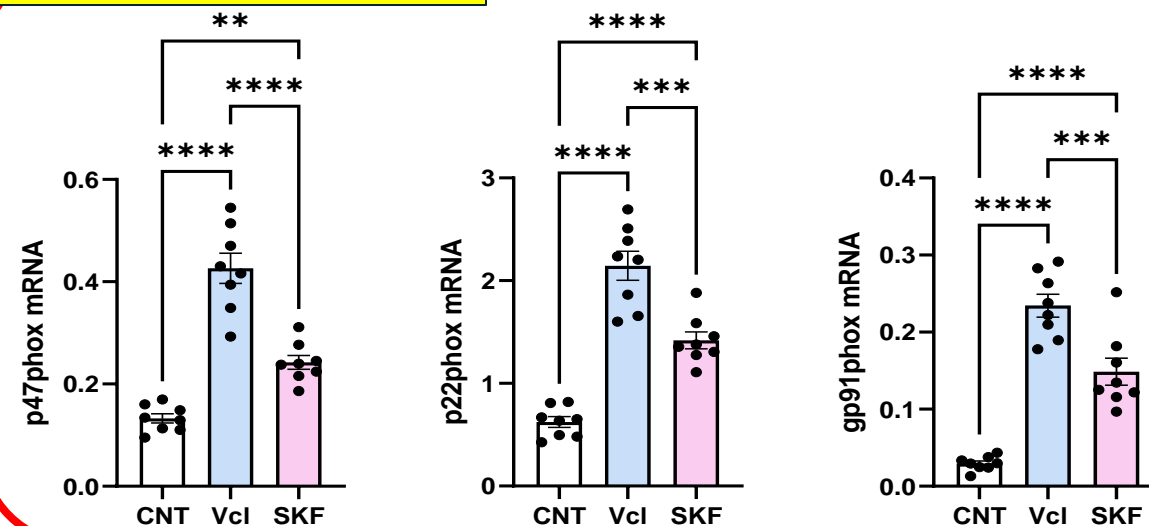
一方で、抗酸化酵素の発現は促進されなかった。

これは、SKFが酸化酵素の発現の抑制を介して、活性酸素種による障害を減らすことを示唆している。

ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

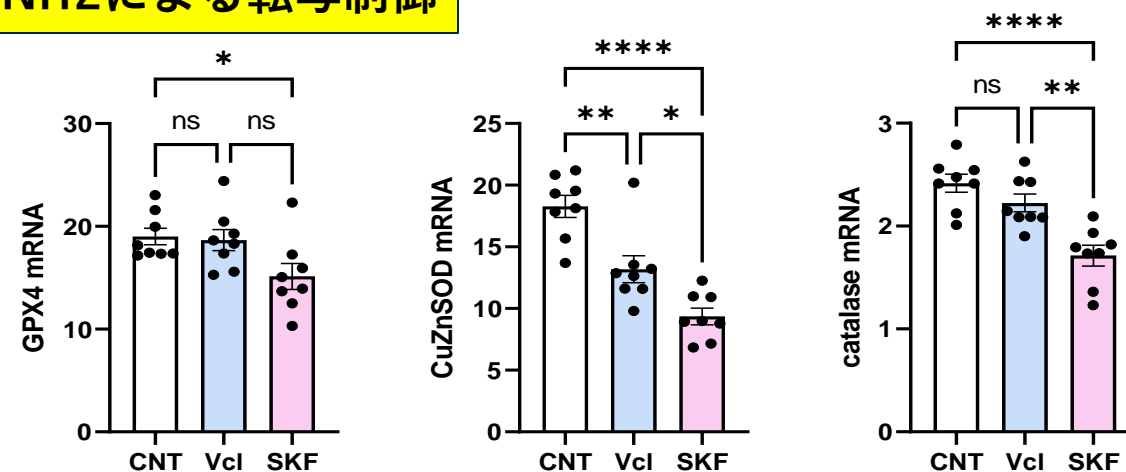
NF κ Bによる転写制御

Oxidative enzymes

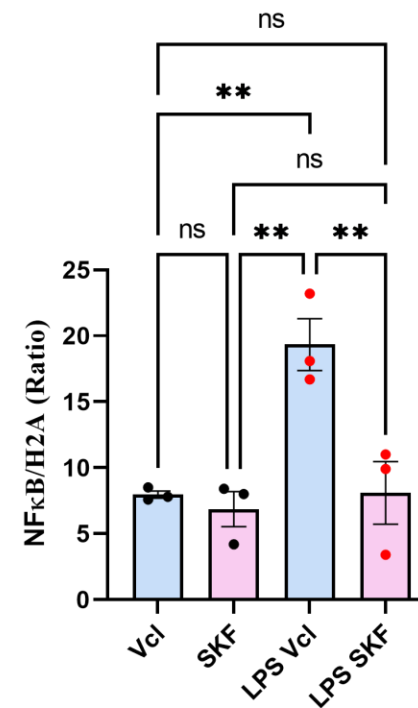
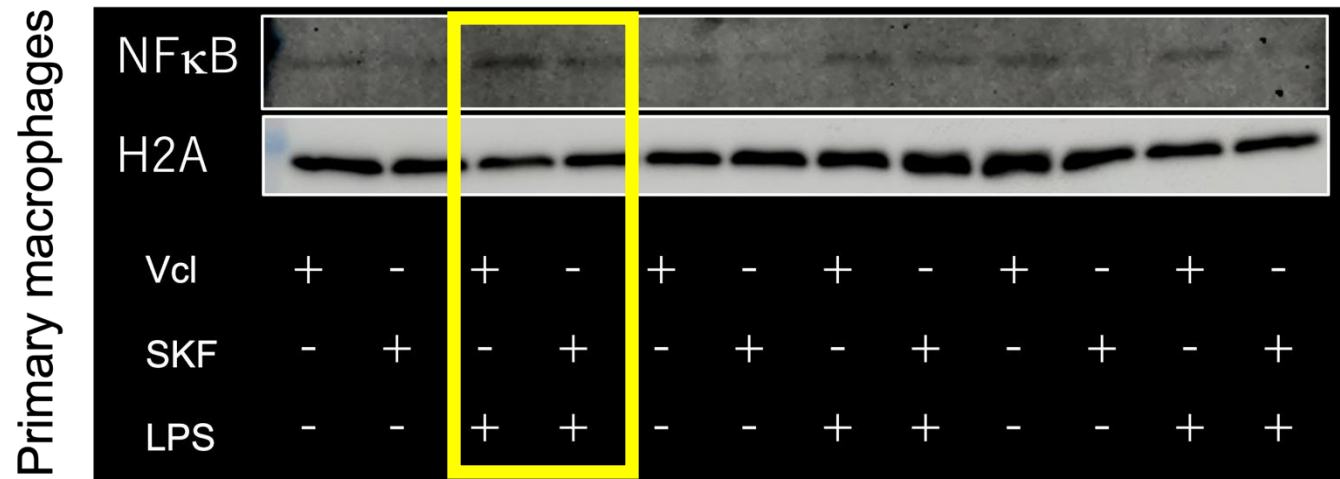


Nrf2による転写制御

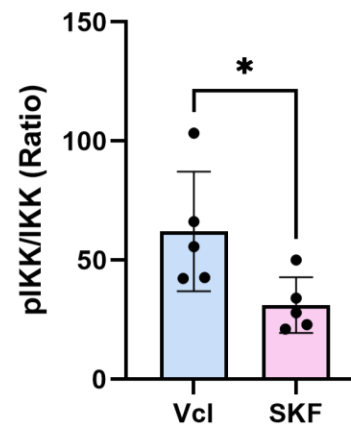
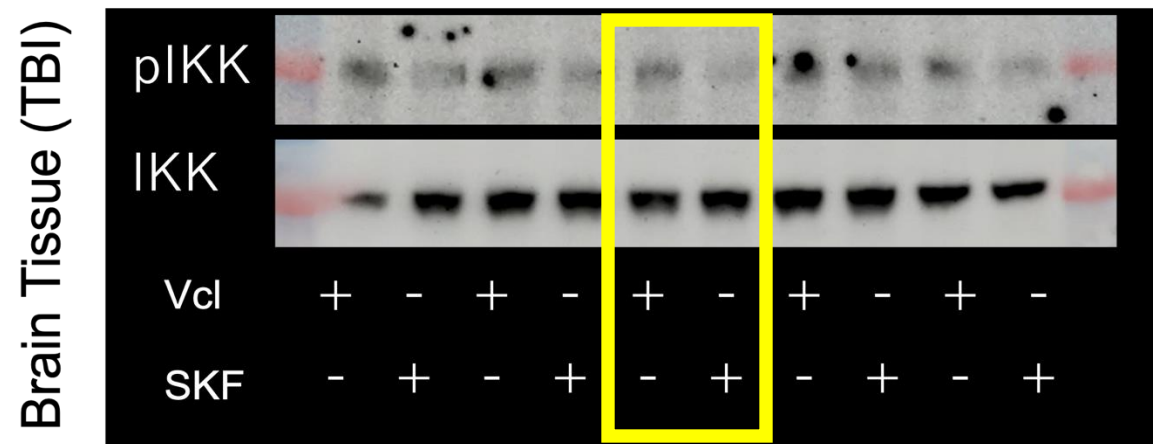
Anti-oxidative enzymes



NFκBシグナル伝達経路におけるSKFの影響



SKFはNFκBの核内移行を防いだ。



SKFはTBI病変領域におけるIKKのリン酸化を防いだ。

ns p>0.05, * p<0.05, ** p<0.01

結果のまとめ

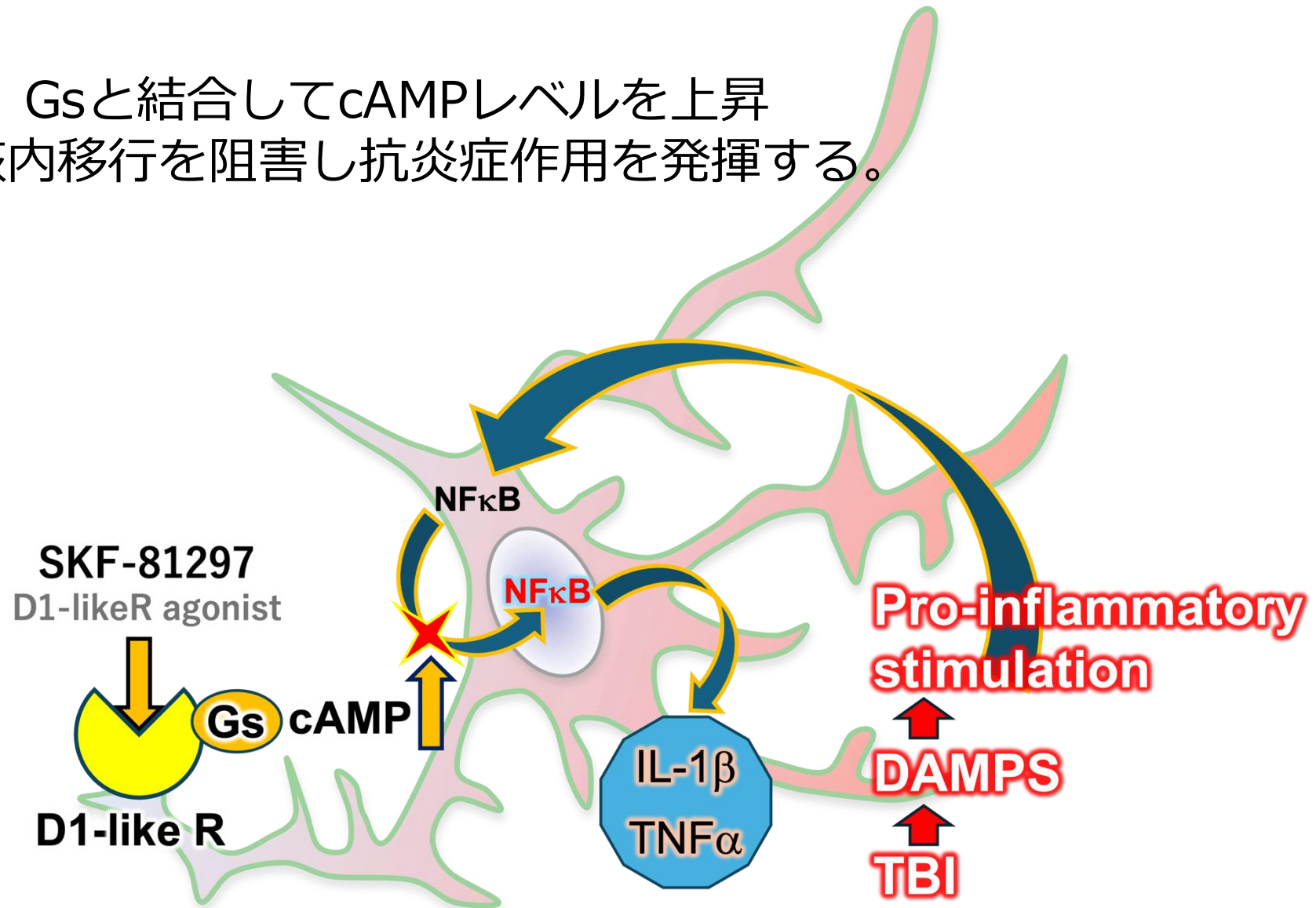
TBIは脳内に炎症反応を引き起こし、ミクログリアがその中心的な役割を果たしている可能性がある。

- ・ SKFはミクログリアの炎症性活性化を抑制し、顆粒球の浸潤も抑制した。
- ・ SKFはミクログリアとマクロファージの代謝活性を抑えることで、TBI病変領域、およびその周辺の酸化損傷を改善した。
- ・ SKFはNF κ Bの核内移行を抑制し、抗炎症効果を発揮した。

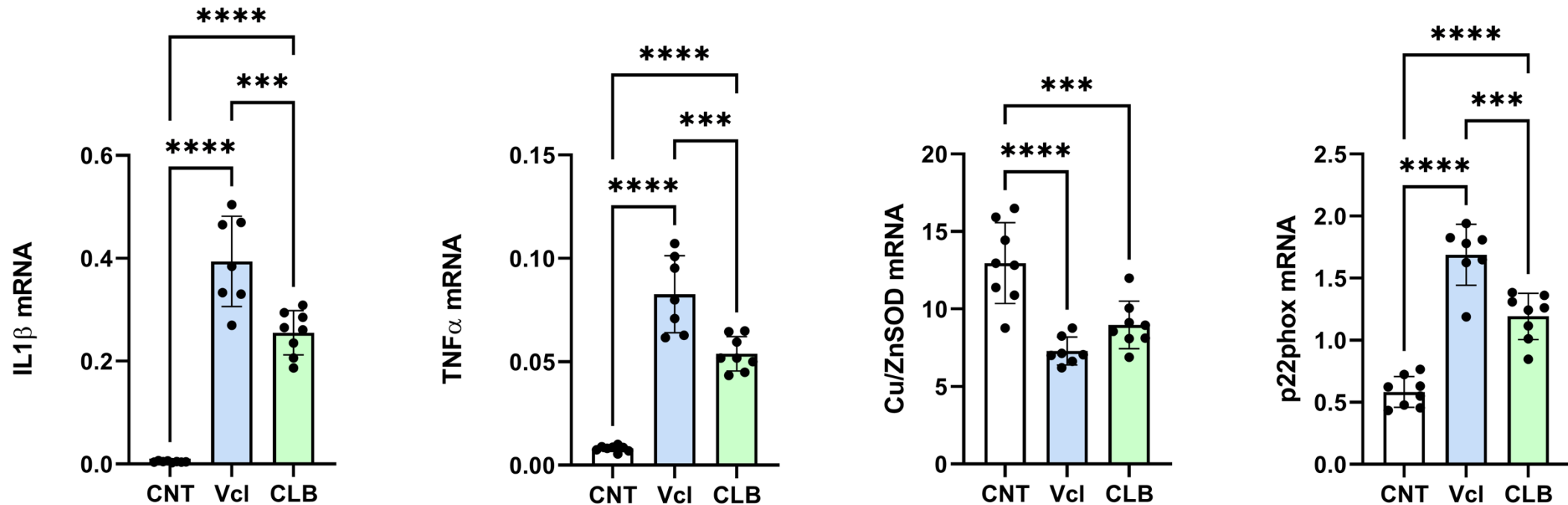
考察

アドレナリン β 2受容体は、Gsと結合してcAMPLレベルを上昇させることで、NF κ Bの核内移行を阻害し抗炎症作用を発揮する。

同様に、D1様受容体はcAMPLレベルを上昇させ、NF κ Bの核内移行を阻害することにより、抗炎症作用を発揮すると考えられる。

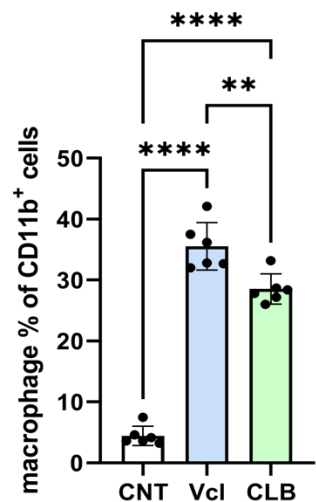


CLBによる遺伝子変化

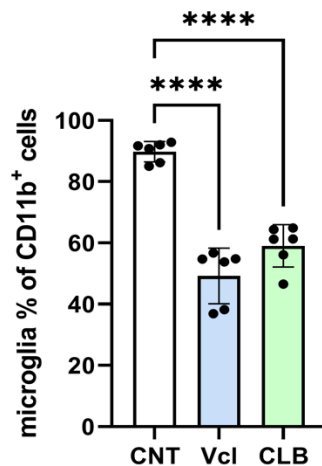


BBB透過性アドレナリン β 2受容体作動薬（クレンブテロール, CLB）は起炎症性サイトカインの発現を抑制、p22phoxも抑制するが、Cu/ZnSODの発現はむしろ促進された。

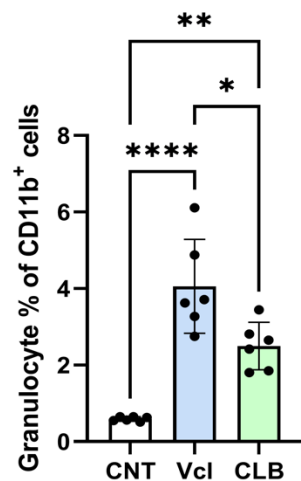
CLB投与時の各種細胞に対する効果



Macrophage

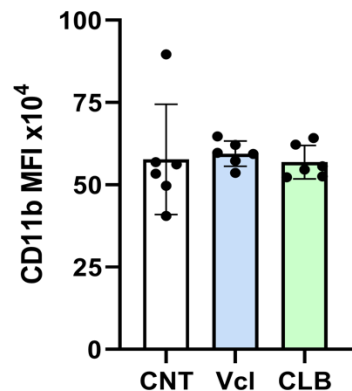


Microglia

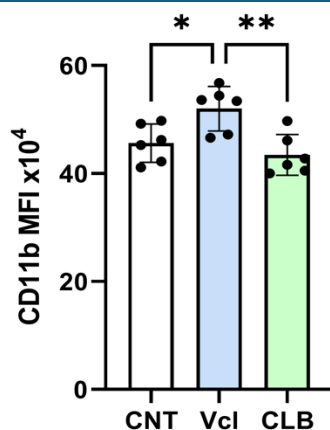


Granulocyte

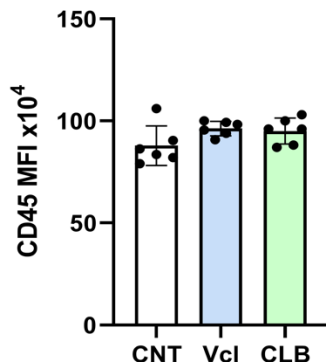
CLBは血液中白血球の
脳内への浸潤を抑制する。



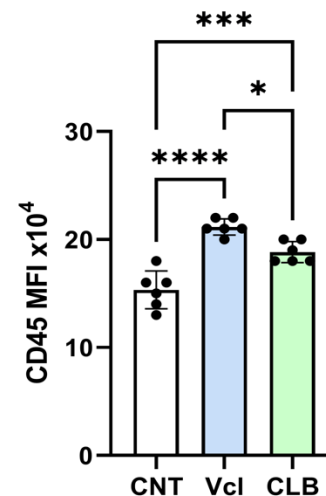
Macrophage



Microglia



Macrophage



Microglia

ミクログリアの
活性化を抑制するが、
マクロファージの
活性には大きな影響
を与えない。

展望

今後は、以下のことを確認していきたい。

- BBB透過性アドレナリン β 2受容体作動薬（クレンブテロール）とSKFの効果の比較
- SCH（D1様受容体拮抗薬）を用いた、TBIにおけるSKFのオフターゲット効果の否定

