

頭部外傷における PKC- δ inhibitor の有効性
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系脳神経外科学専攻

吉田 礼於那

修了年 2023 年

指導教員 大島 秀規

1 要約

脳挫傷は外力による直接的な機械的損傷である一次性脳損傷と虚血、代謝障害、炎症、髄液循環障害、シナプス機能障害などによる二次性脳損傷により構成される(1-5)。この中で、二次性脳損傷には様々な病態が合わさって起こるとされている。グルタミン酸による細胞障害(6-9)、酸化ストレスの放出(10)、活性化マイクログリアによる炎症性サイトカインの放出(11, 12)などが報告されている。二次性脳損傷の治療はそれぞれの病態に応じて様々な研究がされてきた。炎症性サイトカインは正確にどのように作用しているのかについては完全にはわかっていないが、虚血や外傷などの刺激によって細胞障害性に働くとの報告が散見される(11, 13)。炎症性サイトカインの放出が脳浮腫などの原因となるためこれをいかに抑えるかが二次性脳損傷の治療とされてきた。そこでグルタミン酸や酸化ストレスの放出に関係しているとされる **protein kinase C-delta (PKC- δ)** に注目した。

PKC は本邦で発見されたモノマー型のタンパクセリン/スレオニン・キナーゼである(13, 14)。これはカルシウムイオンとジアセリグリセロールあるいはホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸などのリン脂質によって活性化され、細胞増殖、遺伝子発現の調整、イオンチャネルの活性など様々な細胞機能に関するシグナル伝達に関わる重要な酵素である。その中で **PKC- δ** は虚血及び再灌流の過程で活性化され炎症、酸化ストレス、アポトーシスに関与するとされている(14)。この病態としては虚血によるグルタミン酸の放出が細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こし、ホスホリパーゼ C が活性化される。この活性化したホスホリパーゼ C と上昇したフリーラジカルが **PKC- δ** を活性化する。活性化した **PKC- δ** がシトクロム C の放出しカパーゼの活性化を促し細胞のアポトーシスを促進すると考えられている(14)。何らかの刺激が臓器の細胞に加わると前述のような過程を経て細胞のアポトーシスを引き起こす。逆に **PKC- δ** は細胞生存シグナル伝達に関与する **protein kinase B (Akt)** の活性を阻害する(14)。**Rottlerin** は **PKC- δ** の阻害剤であり、かつアストロサイトを損傷や炎症から保護し細胞の増殖を促進することが知られている(15, 16)。アストロサイトでは **PKC- δ** の活性化によって過剰な炎症を励起する **matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9)** が放出されることが報告されている(17)。このように何らかの刺激による **PKC- δ** の活性化はアストロサイトにおいて炎症の励起を起こし最終的にアポトーシスを誘導する原因の一つとして考えられる。

本研究ではラットの脳挫傷モデルを用いて **PKC- δ** 阻害薬 **Rottlerin** を投与し **PKC- δ** の活性化を抑制し脳挫傷後に起こる炎症反応の励起を抑制することによって、二次性脳損傷を軽減できるか検討した。

脳挫傷モデルとしてラットの cortical contusion injury (CCI) モデルを用いた。CCI 直後から腹腔内に浸透圧ポンプを留置して薬剤の全身投与を行った。Rottlerin を dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解して投与した群 (Rottlerin 投与群)、コントロールとして生理食塩水と DMSO を投与した群 (CCI 群)、正常対照群として処置を行っていない群 (Sham 群) との比較を行った。一般組織染色及び PKC- δ に対する免疫染色を行った。PKC- δ の発現量を定量するために western blotting を行った。また、PKC- δ 、MMP-9 の発現をみるために real-time quantitative reverse transcriptional Polymerase chain reaction (Real-time qRT-PCR) を行った。

統計解析には SPSS statistics (version 21: IBM, USA) を使用した。2 群間の比較はまず正規分布に従うかについて Shapiro-Wilk 検定を行った。正規分布に従うデータは 2 群間の平均の検定はパラメトリックとして t 検定を行った。正規分布に従わないデータの 2 群間の検定はノンパラメトリックとして Mann-Whitney U test を行った。3 群間の比較は正規分布に従わなかったためノンパラメトリックとしてクラスカルウォリス検定を行い、各群の差については Post-hoc 検定を行った。各検定は $p < 0.05$ を有意差ありとした。Western blotting、挫傷面積データは平均±標準偏差で示した。Real-time qRT-PCR データについては平均±標準誤差で示した。

アポトーシスの程度を可視化する目的に外傷後 3 日後の脳検体を用いて Tunel 染色を行った。CCI 群の挫傷側の脳皮質では、TdT の反応によりアポトーシスを起こしている細胞が多く観察された。一方で、Rottlerin 投与群の挫傷側の皮質においては、辺縁にわずかにアポトーシスを起こしている細胞は観察されるものの、CCI 群と比較するとアポトーシスは少なかった。

PKC- δ の発現を確認する目的で、3 日後の脳皮質検体を用いて抗 PKC- δ 抗体を使用し免疫染色を行った。CCI 群の挫傷側の皮質においては、PKC- δ 陽性細胞が多く観察された。一方で Rottlerin 投与群の挫傷側の皮質においては非投与群と比較すると陽性細胞は減少していた。Sham 群では陽性細胞は確認されているが、挫傷を与えた CCI 群、Rottlerin 投与群と比較するとわずかであった。健常側皮質でも CCI 群、Rottlerin 投与群共に PKC- δ 陽性細胞は発現したが、差異は認めなかった。

PKC- δ の発現を定量化するために、脳皮質を検体として抗 PKC- δ 抗体を用いて western blotting を行った。挫傷側脳皮質の外傷後 3 日の抗 PKC- δ 抗体の値は CCI 群 47.08 ± 13.11 、Rottlerin 投与群 13.40 ± 17.10 、Sham 群 21.42 ± 3.49 であった。CCI 群は Sham 群と比較し有意に高値を示した ($p < 0.05$)。Rottlerin 投与群は CCI 群と比較して有意に低値を示した ($p < 0.05$)。また外傷後 7 日の挫傷側脳皮質の抗 PKC- δ 抗体の値は CCI 群 52.50

±42.54、Rottlerin 投与群 20.60±31.40、Sham 群 10.57±8.03 であった。Rottlerin 投与群は CCI 群と比較して有意に低値を示した ($p<0.05$)。

健側大脳皮質の外傷後 3 日の抗 PKC- δ 抗体の値は CCI 群 30.09±17.61、Rottlerin 投与群 18.89±12.23、Sham 群 23.34±7.22 であった。Rottlerin 投与群は CCI 群と比較して有意差は認めなかった。また外傷後 7 日の挫傷側大脳皮質の抗 PKC- δ 抗体の値は CCI 群 24.31±14.43、Rottlerin 投与群 8.91±5.09、Sham 群 10.57±8.03 であった。Rottlerin 投与群は CCI 群と比較して有意に低値を示した ($p<0.05$)。

外傷後 3 日後の外傷側皮質を用いて PKC- δ の mRNA の発現定量を行った。CCI 群と比較して Rottlerin 投与群では発現量が少なく測定値のバラつきが大きいため、 0.24 ± 0.61 と減少を認めたが有意差は認めなかった。PKC- δ 発現に反応性に放出される MMP-9 についても mRNA の発現定量を行った。こちらも同様に CCI 群と比較すると大脳皮質において Rottlerin 投与群では 0.61 ± 1.3 と MMP-9 の減少が認められたが有意差はみられなかった。

外傷直下前後の 2 切片の面積の合計を測定し比較を行った。外傷後 3 日の面積は $102651.86\pm 3548.41\text{mm}^2$ (CCI 群) と $100848.95\pm 2736.29\text{mm}^2$ (Rottlerin 投与群) と近似値であった。また外傷後 7 日の面積も $85223.05\pm 6570.22\text{mm}^2$ (CCI 群) と $91251.86\pm 12198.55\text{mm}^2$ (Rottlerin 投与群) と近似値であった。外傷後 3 日と 7 日の両群とも統計学的な有意差はみられなかった。

PKC- δ 阻害薬はいくつか *in vivo* モデルを用いた研究が報告されている。PKC- δ の特異的な阻害薬としては $\delta\text{V1-1}$ と Rottlerin が主に使用されている。

Rottlerin は大コンダクタンスカルシウム (BKCa⁺⁺) チャネル開口薬として発見され、1994 年に novel PKC inhibitor として報告された(15)。Rottlerin は心筋虚血での研究での効果がみられた。心筋細胞のミトコンドリア内膜にある BKCa⁺⁺チャネルを活性化させ、心筋還流を改善させるといったものであった(18, 19)。つまりミトコンドリアにおけるカルシウムの流入を制限し、カリウムの濃度を増加させることによって脱分極を低減しミトコンドリア損傷を防ぐことによってアポトーシスを減少するものとされている(20, 21)。それ以外にも抗酸化作用や細胞生存シグナル伝達に關与する Akt を活性化するなどの作用が報告されている(22-24)。ただ肝心の PKC- δ 阻害としては意見が割れている。PKC- δ 自体は心筋において虚血及び再灌流障害後の心機能低下やアポトーシスに關連しているとされてきた(25, 26)。Rottlerin が PKC- δ に特異的な阻害薬かということに関しては疑問が呈されている。それは前述のようなミトコンドリア内の電解質を調整し脱分極を低減する作用から、結果的に細胞障害を抑制できたのではないかという考えである(27, 28)。しかし Rottlerin の PKC- δ 選択

的阻害薬としての働きに疑問がもたれた後も様々な領域で PKC- δ 選択的阻害薬として Rottlerin が研究されているのも事実である。特にアストロサイトに関連する分野では Rottlerin を PKC- δ 選択的阻害薬として投与し、PKC 経路を抑制した報告がみられる。In vitro ではあるがアストロサイトにおいて Rottlerin 投与により PKC- δ を抑制し、結果的に MMP-9 の発現を減少させたと報告している。またパーキンソン病において PKC- δ は酸化ストレス感受性キナーゼでありアポトーシスに關与する重要なメディエーターとされていたが(29)、PKC- δ を標的とした Rottlerin 投与により神経保護効果があったとしている(30)。これらのアストロサイトで PKC 経路を抑制している研究報告から本研究では δ V1-1 ではなく Rottlerin を投与することとした。

本研究では Western blotting で Rottlerin 投与群は外傷後 3 日、7 日モデルともに PKC- δ の有意な低下を認めた。これが PKC- δ を選択的に抑制していたのかは判断が難しい。実際、PKC- δ の活性によって抑制されることが想定された MMP-9 は real-time qRT-PCR において Rottlerin 投与群で有意な低下はみられなかった。MMP-9 の活性経路には PKC- δ 以外の細胞膜上に存在する別のアイソザイムの PKC との関連(31)、また IL-6 など炎症性サイトカインとの関連など報告されており、選択的な PKC- δ の抑制では MMP-9 の抑制はできなかった可能性が考えられた(32)。しかし Rottlerin は別の炎症の悪化因子である PKC 経路に含まれるホスホリパーゼ A2 の活性化を低下させたとされ(33)、炎症抑制効果が部分的には期待される。

本研究では Rottlerin 投与により挫傷周囲脳のアポトーシスの減少が期待された。Tunel 染色では Rottlerin 投与群は CCI 群と比較して染色された細胞は観察上では少なかったが、脳面積を測定したところ有意な差はみられなかった。Rottlerin 投与は他の炎症性サイトカインや酸化ストレスなどの影響を受けるため脳残存面積の改善には効果がみられなかったと考えられた。脳挫傷による二次性脳損傷は血管損傷による出血、虚血、低酸素など様々な病態が相互に作用しながら複雑な病態を形成するため、脳血管障害と比較し 1 つの病態における経路の抑制だけで治療効果を得るのは困難であると推察された。

ラット脳挫傷モデルで PKC- δ の発現を観察した。外傷側脳に PKC- δ の発現が認められた。PKC- δ 阻害薬 Rottlerin 投与は PKC- δ の発現を抑制し、アポトーシス部位を減少させた。本研究の結果から炎症を励起するマイクログリアや酸化ストレスなどほかの病態への治療と組み合わせることによって Rottlerin が二次性脳損傷の治療の 1 つとして効果を示す可能性があると考えられる。

2 引用文献

1. Lauritzen M, Dirnagl U. The Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism clinical, inaugural issue. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36(1):3.
2. Freytag E, Lindenberg R. Morphology of cortical contusions. *AMA Arch Pathol.* 1957;63(1):23-42.
3. Lindenberg R, Freytag E. The mechanism of cerebral contusions. A pathologic-anatomic study. *Arch Pathol.* 1960;69:440-69.
4. Lindenberg R, Freytag E. Morphology of brain lesions from blunt trauma in early infancy. *Arch Pathol.* 1969;87(3):298-305.
5. Gurdjian ES. Cerebral contusions: re-evaluation of the mechanism of their development. *J Trauma.* 1976;16(1):35-51.
6. Okiyama K, Smith DH, White WF, Richter K, McIntosh TK. Effects of the novel NMDA antagonists CP-98,113, CP-101,581 and CP-101,606 on cognitive function and regional cerebral edema following experimental brain injury in the rat. *J Neurotrauma.* 1997;14(4):211-22.
7. Moro N, Ghavim SS, Harris NG, Hovda DA, Sutton RL. Pyruvate treatment attenuates cerebral metabolic depression and neuronal loss after experimental traumatic brain injury. *Brain Res.* 2016;1642:270-7.
8. Ekici MA, Uysal O, Cikrikler HI, Özbek Z, Turgut Cosan D, Baydemir C, et al. Effect of etanercept and lithium chloride on preventing secondary tissue damage in rats with experimental diffuse severe brain injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(1):10-27.
9. Peterson TC, Hoane MR, McConomy KS, Farin FM, Bammler TK, MacDonald JW, et al. A Combination Therapy of Nicotinamide and Progesterone Improves Functional Recovery following Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2015;32(11):765-79.
10. Itoh T, Satou T, Nishida S, Tsubaki M, Imano M, Hashimoto S, et al. Edaravone protects against apoptotic neuronal cell death and improves cerebral function after traumatic brain injury in rats. *Neurochem Res.* 2010;35(2):348-55.
11. Scherbel U, Raghupathi R, Nakamura M, Saatman KE, Trojanowski JQ, Neugebauer E, et al. Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(15):8721-6.
12. Kumagawa T, Moro N, Maeda T, Kobayashi M, Furukawa Y, Shijo K, et al. Anti-inflammatory effect of P2Y1 receptor blocker MRS2179 in a rat model of traumatic brain injury. *Brain Res Bull.* 2022;181:46-54.
13. Bernardino L, Balosso S, Ravizza T, Marchi N, Ku G, Randle JC, et al. Inflammatory events in hippocampal slice cultures prime neuronal susceptibility to excitotoxic injury:

- a crucial role of P2X7 receptor-mediated IL-1 β release. *J Neurochem*. 2008;106(1):271-80.
14. Bright R, Mochly-Rosen D. The role of protein kinase C in cerebral ischemic and reperfusion injury. *Stroke*. 2005;36(12):2781-90.
 15. Gschwendt M, Müller HJ, Kielbassa K, Zang R, Kittstein W, Rincke G, et al. Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;199(1):93-8.
 16. Valacchi G, Pecorelli A, Sticozzi C, Torricelli C, Muscettola M, Aldinucci C, et al. Rottlerin exhibits antiangiogenic effects in vitro. *Chem Biol Drug Des*. 2011;77(6):460-70.
 17. Lee TH, Chen JL, Liu PS, Tsai MM, Wang SJ, Hsieh HL. Rottlerin, a natural polyphenol compound, inhibits upregulation of matrix metalloproteinase-9 and brain astrocytic migration by reducing PKC- δ -dependent ROS signal. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):177.
 18. Zakharov SI, Morrow JP, Liu G, Yang L, Marx SO. Activation of the BK (SLO1) potassium channel by mallotoxin. *J Biol Chem*. 2005;280(35):30882-7.
 19. Han JG, Yang Q, Yao XQ, Kwan YW, Shen B, He GW. Role of large-conductance calcium-activated potassium channels of coronary arteries in heart preservation. *J Heart Lung Transplant*. 2009;28(10):1094-101.
 20. Kang SH, Park WS, Kim N, Youm JB, Warda M, Ko JH, et al. Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels more efficiently reduce mitochondrial Ca²⁺ overload in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(1):H307-13.
 21. Sato T, Saito T, Saegusa N, Nakaya H. Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation*. 2005;111(2):198-203.
 22. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation*. 2001;104(25):3158-67.
 23. Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1767(8):1007-31.
 24. Heinen A, Aldakkak M, Stowe DF, Rhodes SS, Riess ML, Varadarajan SG, et al. Reverse electron flow-induced ROS production is attenuated by activation of mitochondrial Ca²⁺-sensitive K⁺ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(3):H1400-7.
 25. Miao LN, Pan D, Shi J, Du JP, Chen PF, Gao J, et al. Role and Mechanism of PKC- δ for Cardiovascular Disease: Current Status and Perspective. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:816369.
 26. Inagaki K, Chen L, Ikeno F, Lee FH, Imahashi K, Bouley DM, et al. Inhibition of delta-

- protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. *Circulation*. 2003;108(19):2304-7.
27. Soltoff SP. Rottlerin: an inappropriate and ineffective inhibitor of PKCdelta. *Trends Pharmacol Sci*. 2007;28(9):453-8.
 28. Tapia JA, Jensen RT, García-Marín LJ. Rottlerin inhibits stimulated enzymatic secretion and several intracellular signaling transduction pathways in pancreatic acinar cells by a non-PKC-delta-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763(1):25-38.
 29. Kaul S, Kanthasamy A, Kitazawa M, Anantharam V, Kanthasamy AG. Caspase-3 dependent proteolytic activation of protein kinase C delta mediates and regulates 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced apoptotic cell death in dopaminergic cells: relevance to oxidative stress in dopaminergic degeneration. *Eur J Neurosci*. 2003;18(6):1387-401.
 30. Zhang D, Anantharam V, Kanthasamy A, Kanthasamy AG. Neuroprotective effect of protein kinase C delta inhibitor rottlerin in cell culture and animal models of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322(3):913-22.
 31. Scoditti E, Nestola A, Massaro M, Calabriso N, Storelli C, De Caterina R, et al. Hydroxytyrosol suppresses MMP-9 and COX-2 activity and expression in activated human monocytes via PKC α and PKC β 1 inhibition. *Atherosclerosis*. 2014;232(1):17-24.
 32. Gottschall PE, Yu X, Bing B. Increased production of gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) and interleukin-6 by activated rat microglia in culture. *J Neurosci Res*. 1995;42(3):335-42.
 33. Chao H, Liu Y, Lin C, Xu X, Li Z, Bao Z, et al. Activation of bradykinin B2 receptor I nduced the inflammatory responses of cytosolic phospholipase A(2) after the early traumatic brain injury. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864(9 Pt B):2957-71.