

令和元年6月25日現在

機関番号：22701
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2016～2018
課題番号：16K10734
研究課題名(和文) 脳虚血後の、メラトニンの神経保護効果：IL-4によるミクログリアの活性化の経路

研究課題名(英文) Post-stroke administration of melatonin improves long-term outcomes after focal cerebral ischemia/reperfusion (FI/R) via interleukin-4 (IL-4) dependent M2 microglial polarization

研究代表者
末永 潤 (Suenaga, Jun)
横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：30610365
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ミクログリアは背反する神経保護的なM2表現型と、組織障害性のM1表現型の2つをもつ。メラトニン注射は、血中のIL-4を増加させM2化誘導させる。60分の局所脳虚血再灌流モデルを作成。メラトニン投与群では、有意に梗塞体積が縮小し、梗塞後の運動感覚障害も軽度。しかしIL-4欠損マウスでは、この保護作用は消失。ミクログリア初代培養では、メラトニンはLPS(M1を誘導する物質)によるNOやTNFの産生を阻害。メラトニンは、OGDニューロンの神経障害作用を打消し、この効果はIL-4欠損マウスでは消失。メラトニンは、ミクログリアの極性をIL-4依存的にM2表現型にシフトし、梗塞後の長期予後を改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミクログリアの極性を、有用なM2にシフトさせるメカニズムや作用を調べることは、脳虚血での新たな治療ターゲットを開発する上で非常に価値がある。今回は、IL-4を介する経路を明らかにすることで、今後の急性期脳卒中、血栓回収時の脳・神経保護の新たなターゲットとする可能性が生まれた。メラトニンは現在ロゼレムとして内服薬があり、これを使った臨床研究などにもつなげていきたい。

研究成果の概要(英文)：Microglia represent rational but difficult therapeutic targets for stroke due to their diverse phenotypes that play dual-faced protective (M2 phenotype) and toxic (M1 phenotype) effects. Melatonin injection increased the level of Interleukin-4 (IL-4), the best known M2 inducing cytokine. Melatonin significantly reduced infarct volume and attenuated sensorimotor deficits. IL-4 deficiency, abolished melatonin-afforded long term protection. Melatonin-treated mice showed significantly reduced expression of inflammatory cytokine and chemokines, with significantly increased expression of M2 markers and decreased expression of M1 markers. Melatonin inhibited LPS (a M1 inducer)-induced production of NO and TNF, confirming that melatonin has direct anti-inflammatory effect on microglia. Melatonin may represent an innovative therapeutic strategy that shifts microglia polarization toward a protective M2 phenotype in an IL-4-dependent manner and thus enhance long-term recovery after stroke.

研究分野：脳虚血、神経保護、ミクログリア

キーワード：Microglia Melatonin Interleukin-4 Focal cerebral ischemia Reperfusion

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳虚血におけるミクログリア ミクログリアは脳虚血後に、脳虚血の中心 (core) や辺縁領域 (penumbra) において持続的に活性化される [Schilling M, 2003; Jin R, 2010]。ミクログリアはダイナミックな細胞で、有用な働きと有害な働きの 2 面性をもつ。虚血後に、コントロール不良のミクログリアの活性は脳のダメージを増悪させる一方で [Kaushal V, 2008; Yrjanheikki J, 1999]、良好な方向へのミクログリアの活性は、サイトカインを分泌し梗塞細胞などを除去し、脳の修復に役立つ [Lalancette M, 2007; Hanisch UK, 2007]。これらの一見すると相反する作用は、異なる微小環境の刺激に反応する表現型と関係している。特に、*in vitro* の Lipopolysaccharide (LPS) や Interferon- γ (IFN- γ) は、“古典的な活性”の M1 ミクログリアを誘導し、典型的には、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 、nitric oxide (NO) など破壊性の炎症前段階調節因子を放出し、CD86 や CD68 などの M1 マーカーを発現する [Ding AH, 1988]。これに対し、IL-4 や IL-13 は、“代替的活性”の M2 ミクログリアを誘導し、IL-4 や arginase1, Ym1, CD206 や IL-10 で代表される M2 マーカーを発現する [Kigerl KA, 2009; Goerdts S, 1999; Durafourt BA, 2012]。活性化されたミクログリアの *in vivo* の状態はこの M1, M2 の二つの混在である。ミクログリア/マクロファージの相反する 2 面性のある働きはこれに起因し、脳梗塞 [Hu X, 2012]、多発性硬化症 [Mikita J, 2011]、脊髄損傷 [Kigerl KA, 2009] など、様々な中枢神経病の中で報告される。このように、ミクログリアの極性を、有用な M2 にシフトさせるメカニズムや作用を調べることは、脳虚血での新たな治療ターゲットを開発する上で非常に価値がある。

2. 研究の目的

脳虚血、再灌流後に松果体ホルモンのメラトニンを投与すると、長期的な運動・感覚機能の改善が認められる。このメカニズムは、今までに明らかにされていないインターロイキン 4 (IL-4) を介する経路であるという仮説を検証する。

In vitro でミクログリアの初代培養やミクログリアと神経との共培養系を用いて、メラトニンがミクログリアの神経保護的な M2 表現型を強調し、炎症・破壊性の M1 を抑制しながら脱酸素・脱グルコース (OGD) が誘導する神経細胞死を緩和し、この効果が IL-4 の産生増加によるものであることを実証する。*In vivo* ではメラトニン投与が、局所の虚血・再灌流後の長期予後を改善し、IL-4 の経路でミクログリアの M2 維持と関係していることを証明する。ミクログリアの活性を極端に上げて、脳虚血には悪影響を及ぼす。しかし、過去のデータでは全般的な抗炎症薬も、臨床的に脳虚血患者の予後改善に対しては失敗した。一つの解釈としては、広範に炎症を抑制することは、ミクログリアの有用な働きも抑制し、正常な脳の働きをおさえてしまうことで望まない悪い結果をもたらす可能性がある。メラトニンは、革新的な抗炎症の戦略をもたらす、ミクログリアの極性を神経保護的にシフトさせ、脳梗塞からの長期予後を改善する可能性がある。これを研究期間内に *in vivo*、*in vitro* のモデルで示すことを目的とした。

3. 研究の方法

In vitro では、ミクログリア、神経の共培養系を使用。ミクログリアを M1 に誘導する LPS + IFN- γ 処理、OGD 処理培養液を加え、M1 による神経細胞障害がメラトニンで減弱されるかを検証した。この経路に IL-4 が必要であるかを、IL-4 KO マウス、またメラトニン受容体 (MT1, MT2) KO マウスの細胞培養で検討。*In vivo* では、脳虚血モデルで、メラトニン投与による梗塞体積、運動感覚機能、認知機能を比較。同じくミクログリアの

M1、M2 マーカーの発現を調べ、IL-4 KO マウスなどで、IL-4 経路が必須かを検討した。

4. 研究成果

【Fig.1】マウス中大脳動脈 60 分虚血モデル(系上げ法 MCAO モデル)に、再灌流後にメラトニンを腹腔内に注入(6mg/kg)。Control 群(Veh)と比べてメラトニン群(Mt)では、3d (TTC 染色)および 14d (MAP2 染色)で脳虚血体積の有意な減少を確認 (Fig. 1A, C)、約 30%の虚血体積改善を示した。脳血流量に両者で有意差なし(Fig. 1B)。機能評価として、Corner test での右大脳半球機能評価では、Veh に比べ、Mt 群で sham 手術の正常に近い機能改善を示した。

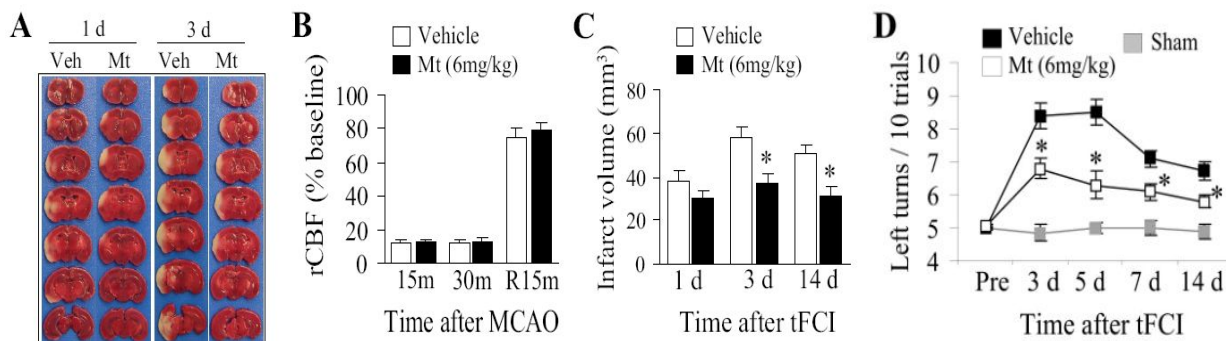


Fig. 1 脳梗塞（一過性の脳虚血・再灌流モデル）後のメラトニン投与は、長期予後を改善させる 60 分の局所脳虚血、再灌流を行ったマウスに、メラトニンを投与（6mg/kg）(A) 虚血 1 および 3 日目での TTC 染色 (B) 虚血中 15 分、30 分および再灌流後 15 分での脳血流量 (C) 虚血後 1 および 3 日目での TTC 上の梗塞体積と、14 日目での MAP2 染色での梗塞体積 (D) 運動感覚機能評価として corner test での結果。 Data は平均 ± 標準誤差、N=8/group、*p<0.05 vs 生食投与群

【Fig.2】脳梗塞モデルにおいて、メラトニン投与は脳虚血耐性を発揮し長期予後を改善した。このメカニズムとして、メラトニンは抗炎症作用が知られており、脳虚血後に脳の炎症を抑制するメカニズムに関与したことで、脳虚血耐性を発揮した可能性がある。MCAO 後の投与群のマウスで、ChemiArray を用いて炎症性サイトカインやケモカインの発現を調べると Vehicle 群に比較し、メラトニン群で炎症性サイトカイン (TNF や IL-6、単球の遊走化因子 (MCP) など) が減少していた (Fig. 2)。

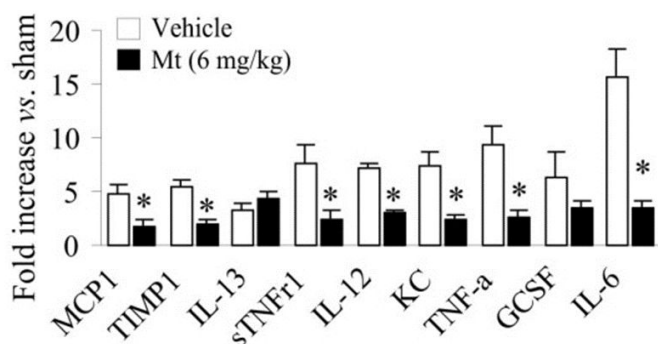


Fig.2 一過性局所脳虚血後のメラトニン投与は、大脳の炎症を減弱させる 60 分の局所脳虚血マウスに、再灌流 1h 後、24h 後にメラトニンを投与（6mg/kg） サイトカインの定量を 48h 後に ChemiArray で行うと、炎症性サイトカインの減弱が確認された。
MCP1: MCP1: monocyte chemotactic protein 1, TIMP1: tissue inhibitor of metalloproteinase 1, IL: interleukin, sTNFr1: soluble tumor necrosis factor receptor 1, KC: keratinocyte chemoattractant, TNF-a: tumor necrosis factor alpha, GCSF: granulocyte colony stimulating factor
N=4/group、*p<0.05 vs 生食投与群

【Fig.3】メラトニンの皮下注射で、末梢血の IL-4 値を上昇させる、という以前の報告がある[Champney TH, 1998]。IL-4 は、ミクログリアの貪食活性化の最もよく知られたサ

イトカインであり、組織修復において重要な役割を果たす[Gadani SP, 2012]。肥満細胞や Th2 細胞は IL-4 の主要な産生源であるが、ミクログリアも炎症変化によって IL-4 を放出する可能性があり、IL-4 発現ミクログリアは脳保護的でもある[Park KW, 2005]。

メラトニン投与がどのようにミクログリアの極性を調整し、神経細胞死に対し耐性を発揮するのか調べるために、ミクログリア、神経の共培養系を確立した。これは共同研究のグループで以前に示しているが[Hu X, Stroke 43(11): 3063-70, 2012]、脱酸素・脱グルコース (OGD : oxygen-glucose deprivation) の神経培養の培養液は、ミクログリアを M1 に誘導できる。M1 ミクログリアは、OGD 後の神経と共培養すると、神経損傷を悪化させる。このモデルを使って、メラトニンが M1 ミクログリアの OGD 神経への神経毒性を抑制することを示した(Fig. 3A, 3C および 3B, 3D)。

また、メラトニンが IL-4 を介した経路でミクログリアの活性を制御しているか証明するために、IL-4 の knock out マウスを使用。このマウスからのミクログリア培養で、メラトニンの神経保護作用の有無を比較し、メラトニンがミクログリアの極性を IL-4 依存性に調整していることを確認した (Fig. 3C, 3D)。 *In vitro* で M1 ミクログリアの毒性・障害作用に対し、メラトニンが抑制的に働くことを確認した。このミクログリアの活性化を介するメカニズムは、今までに提唱されているものではなく独創的であり、虚血研究において重要な手がかりとなりうると考えられる。

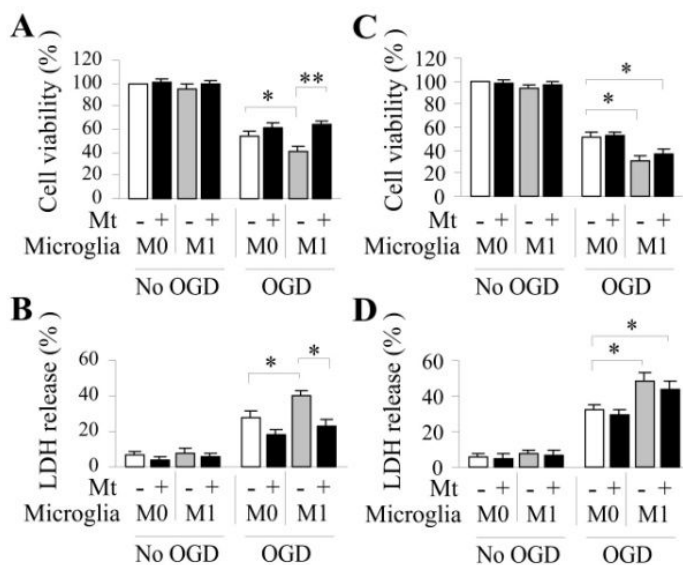


Fig.3 神経-ミクログリアの共培養系において、メラトニンは M1 ミクログリアの神経障害性効果を、IL-4 依存的に減じる ミクログリアの培養系で、通常のみクログリア培養液(M0)、OGD-神経調整培養液(M1)で 48h 培養。それにメラトニン(100nM)を加えたもの(+Mt)と、加えないもの(-Mt)を比較。トランスウェル内のミクログリアや培養液を OGD 負荷あり、なしの神経培養と 48h 培養し、神経生存を MAP 2 ELISA で測定(Fig. 3A, 3C)。神経細胞死は LDH 放出で測定(Fig. 3B, 3D)。ミクログリアは wild type マウス(Fig. 3A, 3B)、IL-4 knockout マウス(Fig. 3C, 3D)で比較。 *p<0.05 vs 生食投与群

【Fig.4】 IL-4 knockout マウスで Fig. 1 と同様の虚血、再灌流モデルを作成し、これにメラトニンを投与(再灌流 1h 後および 1 日 1 回、7d 目まで)。メラトニンの虚血耐性は、IL-4 knockout マウスでは corner test (A) および梗塞体積 (B) において、見られなかった(Fig. 3A, 3B)。3d には有意差はあったが、14d では差が認めなかった。このことは、先のメラトニンの虚血耐性効果は IL-4 を介することを示した。

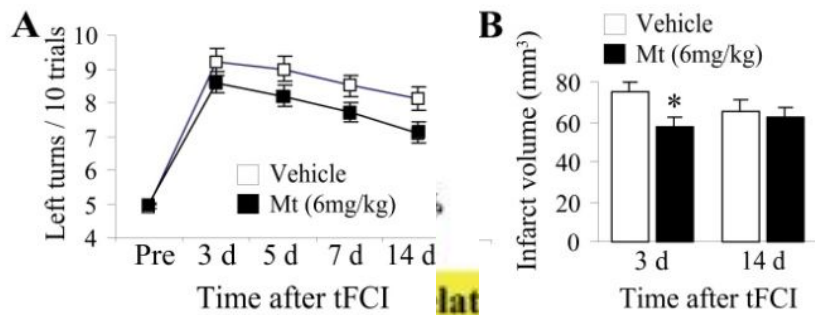


Fig.4 IL-4 knockout マウスにおいて、局所虚血再灌流モデルにメラトニンを投与しても、長期予後改善に失敗する。Fig.1 と同様の虚血モデルを IL-4 knockout マウスで行い、虚血 1 時間後、および 7 日目まで毎日メラトニンを投与したが、(A)の corner test では vehicle に比べて有意な改善はなく、(B)虚血体積に関しては 3d では有意差があったが、14d になると有意差を認めなかった。N=8/各 group *p<0.05 vs 生食投与群

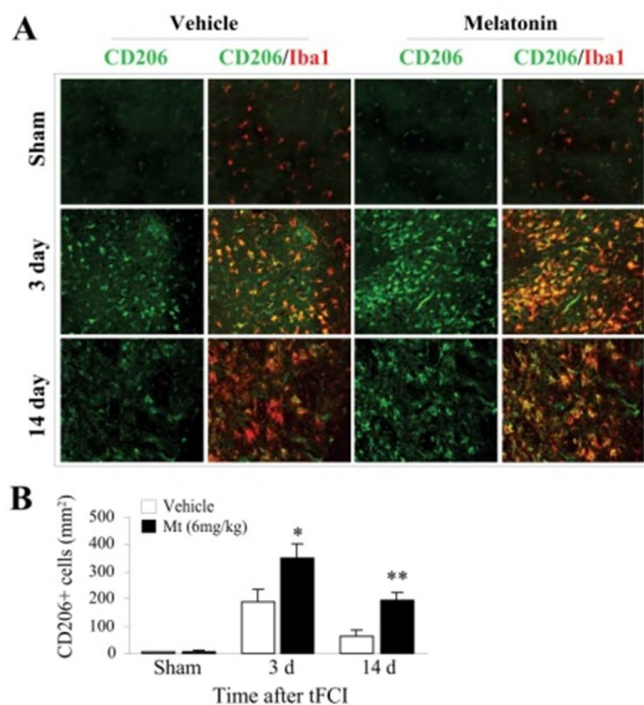
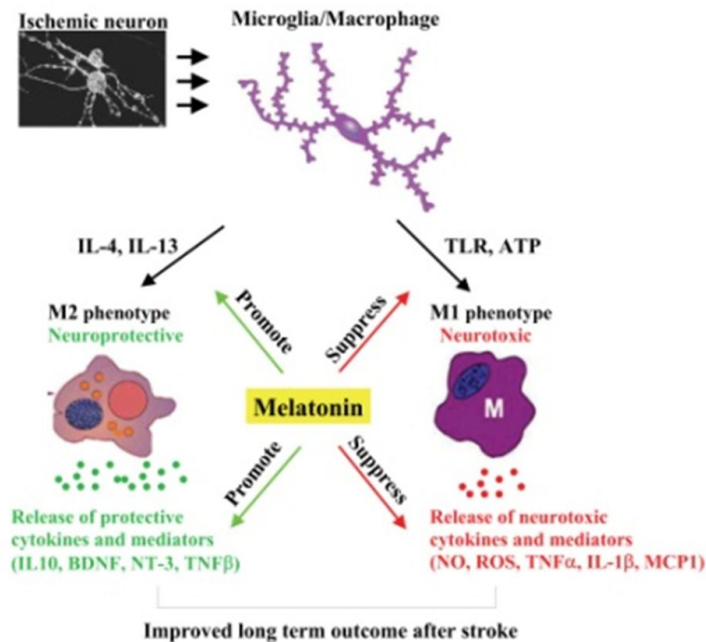


Fig.5 局所虚血再灌流モデルにメラトニン投与すると、CD206 陽性のミクログリア/マクロファージを増加させる。60 分の局所虚血再灌流モデルで、sham、3d、14d での免疫組織染色。Iba 1、CD206 の共染色でみると、メラトニン投与群(再灌流後 1h、7 日目まで 1 日 1 回)で CD206 陽性のミクログリア/マクロファージの増加が確認された。N=8/各 group *p<0.05 vs 生食投与群

【Fig.6】メラトニンの神経保護作用のシエーマ



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

1. 末永 潤, 川原信隆, Xiaoming Hu, Jun Chen: 脳梗塞後のメラトニン投与は IL-4 によるミクログリアの M2 表現型を誘導し長期予後を改善する. 第 41 回脳卒中学会, 札幌, 2016, 4.

2. Jun Suenaga, Nobutaka Kawahara, Xiaoming Hu, Jun Chen: Post-stroke administration of melatonin improves long-term outcomes after focal cerebral ischemia/reperfusion (FI/R) via interleukin-4 (IL-4) dependent M2 microglial polarization Brain & Brain PET 2019, Yokohama, 2019, 7

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: Jun Chen

ローマ字氏名: Jun Chen

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。