

令和元年6月25日現在

機関番号：37103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10939

研究課題名(和文) Neurovascular Unitの温度応答からみた脳低温による脳保護機構

研究課題名(英文) The mechanism of neuroprotection by brain hypothermia in the view of thermal reaction of neurovascular unit

研究代表者

松井 智浩 (M, Tomohiro)

九州女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：50314828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳低温療法による脳保護機構を説明するため、Neurovascular Unit(NVU)を構成する細胞群の中で、特に、T細胞(広義)と脳血管内皮細胞に着目した研究を行い、以下の結果を得た。

CD4+およびCD8+ T細胞からのパーフォリン(Pfn)産生は、各々、37℃に比べ33℃では低値、39℃では高値を示した。また、Pfnは、濃度依存的にニューロン死および脳血管内皮細胞死(アポトーシスとネクローシス)を誘導した。

脳血管内皮細胞の接着因子とケモカインは脳内への炎症細胞浸潤に重要な役割を担うが、それらの発現は、37℃に比べ33℃では低値を示し、39℃では高値を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ニューロンの周りに存在し、その死の過程に関与するNeurovascular Unit(NVU)構成細胞の中で、特に、T細胞(広義)と脳血管内皮細胞に着目し、それら由来のニューロン傷害性因子発現に低温・高温が及ぼす影響を調べ、脳低温療法による脳保護機構を説明するものであった。得られた結果の中で、特に、T細胞由来パーフォリン(Pfn)は、血液脳関門(BBB)を構成する脳血管内皮細胞死を誘導した。脳血管内皮細胞死は、血管透過性亢進とBBB崩壊に基づく末梢性炎症細胞の更なる浸潤を伴い、脳障害増悪に繋がるため、Pfnの低温下での産生低下は脳保護機構に非常に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The underlying mechanisms of therapeutic hypothermia for the neuroprotection are partially understood. Here we examined the effects of hypothermia and hyperthermia on T cell-derived perforin (Pfn) and the expression/production of adhesion molecules and chemokines by brain microvascular endothelial (bEnd.3) cells in an attempt to identify the mechanisms of this therapy. We also evaluated whether Pfn induced death in neuronal cells and bEnd.3 cells.

Consequently, compared with normothermia, Pfn release in T cells was reduced by hypothermia but augmented by hyperthermia. Pfn caused the death of neuronal cells and induced both apoptosis/necrosis in bEnd.3 cells; both effects were concentration-dependent.

In bEnd.3 cells, the mRNA expression of adhesion molecules was reduced by hypothermia compared with normothermia. The production of chemokines was reduced by hypothermia but augmented by hyperthermia.

研究分野：神経免疫学

キーワード：脳低温療法 T細胞 パーフォリン ニューロン死 接着因子 脳血管内皮細胞 アポトーシス ケモカイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳保護治療法の一つである脳低温療法は、脳低酸素・虚血や重症頭部外傷等による脳障害時に、脳温を 32~34 の軽度低温にすることで、二次的ニューロン障害を抑える(ニューロンを保護する)治療法であるが、その機序は多岐に渡るため不明な点が多い。報告者は、脳低温療法による脳(ニューロン)保護作用の一機序を明らかにする目的で、脳低酸素・虚血や脳外傷時の早期に活性化され、炎症性サイトカインや一酸化窒素(NO)等の神経傷害性(炎症性)因子放出を介し脳障害増悪に關与するマイクログリアに着目し、それらの産生に低温・高温が及ぼす影響をまず細胞培養系(in vitro)で調べた。その結果、脳低温療法による脳保護作用の一機序に、神経傷害的炎症性因子(TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、NO)抑制のみでなく神経傷害的抗炎症性因子(IL-10)抑制も關与し、特にマイクログリアの早期での炎症性因子抑制と後期での炎症性・抗炎症性因子抑制という時系列的(時間依存的)抑制機構が關与する可能性を、また、これらの抑制には p38 MAPK(Mitogen-Activated Protein Kinase)や Nuclear Factor(NF)- κ B といった細胞内や核内シグナル伝達因子阻害が重要であること、更に、脳損傷後の高温による脳障害増悪には、逆にマイクログリアからのそれらの増加が關与する可能性を、を主に報告してきた。

報告者が示唆したその「脳障害の保護や増悪における温度および時間依存的機構」の存在は、最近の脳虚血障害の動物実験と臨床研究において支持された。そこで報告者自身も、脳低温療法の適応となる新生児低酸素性虚血性(Hypoxia-Ischemia: HI)脳障害のモデル動物からマイクログリアを単離・培養し、低温(33 $^{\circ}$ C)は脳障害由来マイクログリアの早期での TNF- α および後期での IL-10/NO 産生を低下させることを報告した。つまり、今までの in vitro データが臨床的にも関連付けできることを示した。

更に近年は、「時系列的(時間依存的)」という概念を發展させ、T細胞の炎症的關与に着目した研究を行った。T細胞は、脳障害早期でのマイクログリア活性化から遅れて脳内に浸潤し、IL-17 や蛋白分解酵素のグランザイム B(GrB)等の放出を介し持続的な脳障害増悪に關与する。よって、それらの産生に低温・高温が及ぼす影響を調べた。その結果、T細胞の神経傷害的 IL-17 と GrB 産生は、低温下で低値、高温下で高値となる温度依存性変化を示すことを明らかにし、脳低温療法は、T細胞の IL-17 と GrB 産生を低下させ、遅発性にもニューロン死抑制効果をもたらす可能性を示した。

報告者はこのように、脳低温療法による脳保護機構の解明を、時系列的免疫細胞(マイクログリア-T細胞)に着目し行ってきた。ニューロン死の過程には、その他、脳血管内皮細胞や血管周皮細胞(ペリサイト)、アストロサイトやオリゴデンドロサイトといった、いわゆる「Neurovascular Unit(NVU)」を構成する細胞群(マイクログリアや、広義には脳内浸潤T細胞等の浸潤細胞も含まれる)が、多面的・複合的な機構(クロストーク)として關与していると考えられる。よって、この NVU の概念を基盤にして、本療法による脳保護機構を捉えることは重要であると考えた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、NVU 由来神経傷害性因子発現と血液脳関門(BBB)機能(タイトジャンクション(TJ)蛋白発現や透過性)の低温・高温応答を、細胞培養系を用いて調べ、脳低温療法による脳保護機構を NVU 機能の面から包括的に説明する。研究期間内には以下のことを明らかにする。

(1)報告者は最近、T細胞-脳血管内皮細胞のクロストークとして、IL-17 による脳血管内皮細胞の接着因子(E-selectin、ICAM-1、VCAM-1)とケモカイン(MIP-2/CXCL2、IP-10/CXCL10、MCP-1/CCL2)発現の濃度依存的増加を報告した。接着因子/ケモカインは脳内への炎症細胞浸潤に重要な役割を担い、脳障害増悪に繋がるので、それらの発現に低温・高温が及ぼす影響を明らかにする。

(2)BBB は脳血管内皮細胞、ペリサイトおよびアストロサイトで構成されている。脳障害時の BBB では、脳血管内皮細胞同士を結び付けている TJ 蛋白(Claudin-5、Occludin、ZO-1 等)の消失や低下が問題となる。そこで、BBB 機能の低温・高温応答を TJ 蛋白発現と透過性(経内皮電気抵抗)で評価する。

(3)低温下で低値、高温下で高値となる温度依存性変化を示す NVU 構成細胞由来因子がみられた場合、それらの病態生理学的意義を明らかにするため、適宜、脳血管内皮細胞活性化、ニューロン死、脳血管内皮細胞死および BBB 機能障害を調べる。

3. 研究の方法

(1)NVU 構成細胞(T細胞-脳血管内皮細胞のクロストーク)に関する研究

健康人の末梢血単核球から CD4 $^{+}$ および CD8 $^{+}$ T細胞を分離した。各細胞は、抗 CD2/抗 CD3/抗 CD28 抗体添加の下、33 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、39 $^{\circ}$ C で 72 時間培養した。培養液中のパーフォリン(Pfn)濃度は ELISA により測定した。ニューロン死は、マウス神経芽細胞腫(Neuro-2a 細胞)をニューロン様細胞に分化させ、Pfn を 24 時間添加し、比色法により求めた。また、脳血管内皮細胞死(アポトーシスとネクローシス)は、マウス脳微小血管内皮細胞(bEnd.3 細胞)に Pfn を 24 時間添加し、蛍光顕微鏡下で測定した。

(2)NVU 構成細胞(マイクログリア - 脳血管内皮細胞および T 細胞 - 脳血管内皮細胞のクロストーク)に関する研究

bEnd.3 細胞に TNF- α (マイクログリア由来)や IL-17(T 細胞由来)を添加の下、37 $^{\circ}$ C 下で 2 時間培養し、接着因子とケモカインの各 mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて測定した。また、温度による影響も調べるため、同様の培養を 33 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、39 $^{\circ}$ C 下でも行い、各 mRNA 発現を調べた。

4. 研究成果

(1)NVU 構成細胞(T 細胞 - 脳血管内皮細胞のクロストーク)に関する研究

CD4 $^{+}$ および CD8 $^{+}$ T 細胞の Pfn 産生は、各々、37 $^{\circ}$ C に比べ 33 $^{\circ}$ C では低値、39 $^{\circ}$ C では高値を示した。また、Pfn は、濃度依存的にニューロン死および脳血管内皮細胞死(アポトーシスとネクローシス)を誘導した。以上の結果をまとめると、Pfn の温度依存的産生動態とこの因子による濃度依存的ニューロン死および脳血管内皮細胞死誘導動態は比例関係となり、33 $^{\circ}$ C における T 細胞からの Pfn 産生低下はニューロン死および脳血管内皮細胞死抑制に、一方、39 $^{\circ}$ C における Pfn 産生増加はこれらの細胞死増加に繋がると考えられた。脳血管内皮細胞死は、血管透過性亢進と BBB 崩壊に基づく末梢性炎症細胞の更なる浸潤を伴い、脳障害増悪に繋がるため、Pfn の低温下での産生低下は脳保護機構に非常に重要であることが示唆された。

(2)NVU 構成細胞(マイクログリア - 脳血管内皮細胞および T 細胞 - 脳血管内皮細胞のクロストーク)に関する研究

まずは、TNF- α が、脳血管内皮細胞の接着因子(E-selectin、ICAM-1、VCAM-1)とケモカイン(MIP-2/CXCL2、IP-10/CXCL10、MCP-1/CCL2)発現を、濃度依存的に増加させることを見出した。報告者は今までに、マイクログリア由来の TNF- α 産生が、低温(33 $^{\circ}$ C)下で低値、高温(39 $^{\circ}$ C)下で高値となる温度依存性変化を示すことを報告してきており、今回、この産生動態と TNF- α による濃度依存的接着因子/ケモカイン発現誘導動態が比例関係となることを示した。よって、33 $^{\circ}$ C におけるマイクログリアからの TNF- α 産生低下は接着因子/ケモカイン発現抑制に、一方、39 $^{\circ}$ C での TNF- α 産生増加はこれらの発現増加に繋がると考えられた。E-selectin や ICAM-1 および VCAM-1 は、白血球の血管内皮細胞への接着に重要な役割を担う。ケモカインは、その接着した細胞の組織浸潤に重要な役割を担い、主に、MIP-2/CXCL2 は好中球に、IP-10/CXCL10 は CD4 $^{+}$ と CD8 $^{+}$ T 細胞に、MCP-1/CCL2 は単球に作用する。以上をまとめると、脳低温療法は、マイクログリアの TNF- α 産生を低下させることで、脳血管内皮細胞の接着因子/ケモカイン発現を低下させ、脳内への炎症細胞(好中球や T 細胞および単球)浸潤抑制効果をもたらし、脳保護効果を示すことが示唆された。一方、脳高温下では、TNF- α の産生が増加し、脳血管内皮細胞の接着因子/ケモカイン発現増加により、脳内へのそれらの炎症細胞浸潤が促進され、脳障害増悪に繋がることが示唆された。

更には、TNF- α 活性化脳血管内皮細胞の接着因子(ICAM-1、VCAM-1)とケモカイン(MIP-2/CXCL2、IP-10/CXCL10、MCP-1/CCL2)発現は、37 $^{\circ}$ C に比べ 33 $^{\circ}$ C では低値を示し、39 $^{\circ}$ C ではケモカイン(MIP-2/CXCL2、IP-10/CXCL10、MCP-1/CCL2)発現のみ高値を示した。IL-17 活性化脳血管内皮細胞では、ケモカイン(MIP-2/CXCL2、IP-10/CXCL10、MCP-1/CCL2)発現が、37 $^{\circ}$ C に比べ 33 $^{\circ}$ C では低値を示した。よって、脳低温療法はマイクログリア由来および T 細胞由来の炎症性因子(各々、TNF- α および IL-17)により活性化された脳血管内皮細胞の接着因子/ケモカイン発現を直接低下させ、脳内への炎症細胞浸潤抑制効果をもたらし、脳保護効果を示すと考えられた。一方、脳高温下では、上述の TNF- α 産生増加に加え、TNF- α 活性化脳血管内皮細胞のケモカイン発現も直接増加し、脳内への炎症細胞浸潤が更に促進され、脳障害増悪は顕著に進行すると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Yanagihara M, Tsuneoka H, Tanimoto A, Otsuyama K, Nishikawa J, Matsui T, Nojima J, Ichihara K, Bartonella henselae DNA in seronegative patients with cat-scratch disease, Emerging Infectious Diseases, 査読有、24 巻、924-925、2018

松井智浩、マイクログリアおよび T 細胞由来ニューロン傷害性因子の温度依存的産生、山口医学、査読有、65 巻、81-85、2016

Matsui T, Yoshida Y, Reduction of the expression and production of adhesion molecules and chemokines by brain endothelial cells in response to tumor necrosis factor- α and interleukin-17 in hypothermia, Clinical and Experimental Neuroimmunology, 査読有、7 巻、174-182、2016

[学会発表](計 1 件)

Matsui T, Hypothermia reduces and hyperthermia augments T cell-derived release of

perforin that mediates the death of brain endothelial cells and neuronal cells、
7th International Hypothermia & Temperature Management Symposium、2018年8月28
日～2018年8月30日、Sydney (Australia)

〔図書〕(計2件)

松井智浩、窪田哲朗、藤田清貴、細井英司、梶原通子、荒木延夫、長田誠、面川進、高山成伸、谷口菊代、西尾久英、西宮達也、能登谷武、藤井康彦、坊池義浩、松橋美佳、望月照次、医歯薬出版、最新臨床検査学講座/免疫検査学(第1版)、2017、421

松井智浩、永尾暢夫、後藤正徳、石山聡子、小野寺利恵、細井英司、上野一郎、小黒博之、古杉光明、高陽淑、谷上純子、谷口菊代、武貞直子、木寺英明、医歯薬出版、臨床検査学実習書シリーズ/輸血・移植検査学実習書(第1版)(補訂)、2016、132

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。