

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20388

研究課題名(和文) 頭部外傷後の慢性神経炎症を制御する

研究課題名(英文) Assessment the inflammatory processes after TBI

研究代表者

細見 早苗 (Hosomi, Sanae)

大阪大学・医学系研究科・招聘教員

研究者番号：90644005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：頭部外傷後の高次脳機能障害の発生機序に関して、慢性神経炎症の関与が示唆されているが、まだ未解明のことが多く残されており、有効な治療法も確立されていない。頭部外傷マウスモデルに TSP0-PETを施行する事で、頭部外傷後に、直接損傷部の局所炎症が収束した後も、神経投射先である視床において慢性神経炎症が持続し、慢性炎症部位では活性化ミクログリアが集積して神経変性を惹起している事を in vivo imagingで証明した。

研究成果の概要(英文)：Experimental and clinical evidence now suggest that TBI should not be viewed as a static acute disorder. Rather, TBI initiates chronic biochemical processes leading to prolonged neuroinflammation that may contribute to late neurologic dysfunction. Recent studies have only identified limited aspects of either acute or chronic inflammation in the brain post-TBI. In this experimental TBI mouse model study using 18F-DPA714 PET, we aimed to reveal the pathophysiology underlying how acute inflammation subsides, sustains and/or converts to chronic inflammation. We found that although inflammatory responses at the cortical injury site diminished after approximately 1 week, the ipsilateral thalamus still exhibited remote neuroinflammation and neurodegeneration for up to 14 weeks.

研究分野：頭部外傷

キーワード：神経炎症 ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

頭部外傷後、明らかな画像所見がないにも関わらず、やる気、注意力、集中力に欠くなどの高次機能障害を呈し、学校や社会への復帰が妨げられ、大きな社会問題になっている。頭部外傷後の高次脳機能障害の発生機序に関して、世界中で活発に研究が行われているが、まだ未解明のことが多く残されており、有効な治療法も確立されていない。

2. 研究の目的

大脳皮質の損傷後の慢性神経炎症が、脳萎縮や高次脳機能障害をおこすと仮説をたてた。translocator protein (TSPO) - Positron Emission Tomography (PET)は主にマクロファージ/ミクログリアの活性化に伴いミトコンドリア膜上に発現する TSPO を標識することにより、神経炎症を定量評価できる。magnetic resonance spectroscopy (MRS) は、関心領域内の代謝産物を評価する事で、神経細胞死・グリア細胞増殖を定性評価する事が可能である。また、Tractography は拡散テンソル画像を用いた神経軸索の三次元的視覚的評価法である。本研究の目標は、すでに臨床の現場で用いられている、これらの画像技術を相補的に用い頭部外傷動物モデルに応用することで、CTやMRIといった従来の画像技術で捉えられなかった慢性神経炎症の診断方法を前臨床試験として確立することにある。

3. 研究の方法

1) 脳挫傷動物モデルを用いて、TSPO-PET、MRS、Tractographyを測定する。
動物実験に関しては、大阪大学医学部附属動物実験施設運営委員会の承認を得て、大阪大学動物実験規定に準じて行った。確立された focal brain injury モデルである Controlled Cortical impact (CCI) モデルを使った。C57/BL6J マウス (8-10 週齢・雄) を麻酔下で開頭し、大脳皮質運動/感覚野に直径 3mm、深さ 1mm の脳挫傷を作成した。sham 群は、開頭操作のみを行った。脳内の炎症の局在を長期的に評価するため、TSPO-PET を損傷後 1/4/7/14/21/28/42/63/94 日目に測定した。TSPO-PET で同定した慢性神経炎症部位を 28/42/63/94 日目に $2 \times 2 \times 2 \text{mm}^3$ (立方ミリメートル) の voxel で囲み MRS (single voxel 法) を測定した。慢性神経炎症部位を通過する神経を Tractography で描出し、健側と比較した。

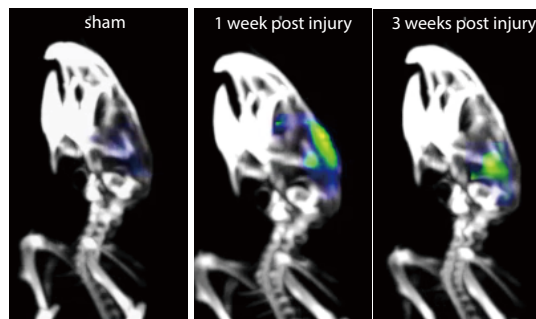
2) 1) で同定した炎症の特徴を知るため、組織学的・機能学的評価を行う。

損傷後 1 週目において①マクロファージ、ミクログリアの活性を評価するための免疫染色 (CD11b/TSPO)、②白血球の浸潤を評価するためのギムザ染色、③マクロファージの炎症への関与を評価するため、リポソーム封入クロドロネート (マクロファージ枯渇薬)

静脈投与後に TSPO-PET④炎症部位の組織を採取し サイトカイン qPCR (IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-10) を行った。また損傷後 4 週目において電子顕微鏡で慢性神経炎症部位を観察した。

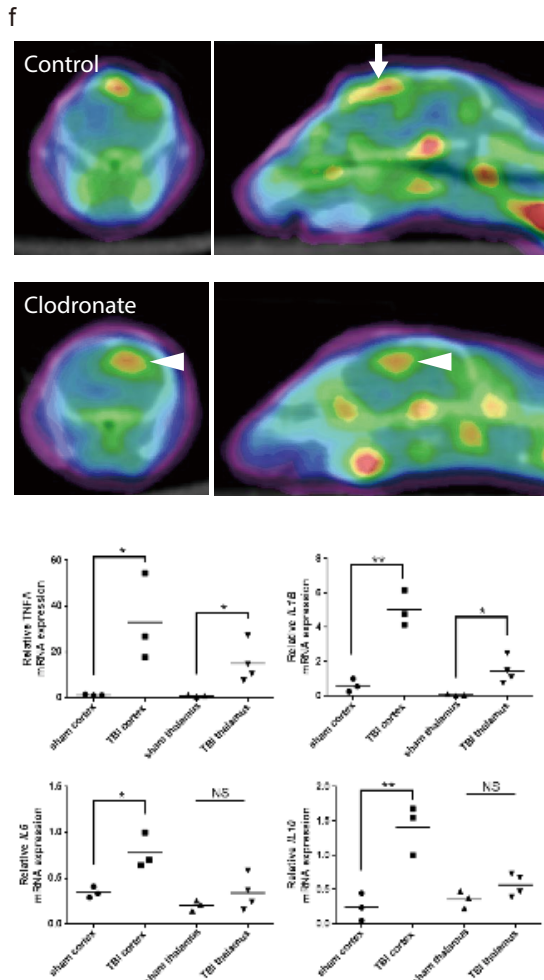
4. 研究成果

CCI 後 4 週目において、外傷初期に認められていた出血や浮腫などの急性期炎症反応がおさまり、損傷部に cavity を形成していた。次に、TSPO-PET の経日的変化を観察した。sham における脳内の TSPO-PET 集積は低かった。これに対し、損傷マウスでは、損傷部での TSPO の集積は損傷後 1 週目に強い集積した後、消失していた。視床の TSPO 集積は損傷後 1 週目から中程度の集積を認めた後、2 週目で一旦低くなり、3 週目から再度強くなり、14 週目においてもまだ認められた。さらに大脳皮質、視床部の TSPO uptake を SUVmax で各々、定量評価し、sham 群と損傷群で比較した。大脳皮質の uptake は 1 週目にピークをとり、cavity を形成した 4 週目には sham 群と有意差がなくなっていた。それに対し、視床では 4 週目以降も sham 群に比して有意に uptake が増加していた。TSPO-PET による長期的な炎症の in vivo imaging によって、大脳皮質の直接損傷部位では、急性炎症を生じた後に収束するが、損傷側視床では、慢性期にまで神経炎症が持続していることがわかった。



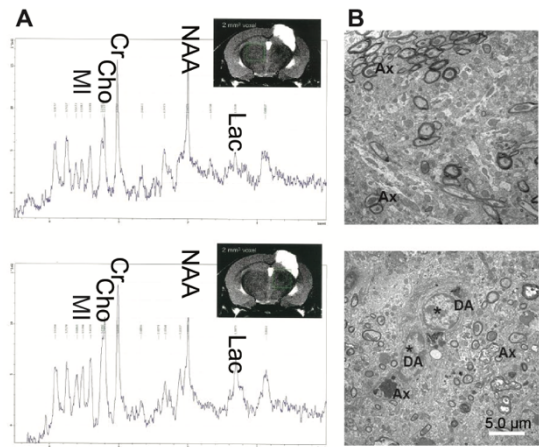
大脳皮質と視床の急性期炎症反応の性質が異なるかを調べるために、損傷後 1 週間における炎症の評価を免疫染色、qPCR、ギムザ染色、リポソーム封入クロドロネート静脈投与後 TSPO-PET を行った。免疫染色では、TSPO がどの細胞由来であるかを確かめた。損傷後 1 週間では、TSPO 陽性ミクログリア・マクロファージは大脳皮質、脳梁、視床に認められ、海馬を迂回するような分布をした。CD11b 抗体ではミクログリアとマクロファージを区別できないため、ギムザ染色にて血中から浸潤する白血球を評価した。大脳皮質の損傷部位では、多数の単核球の浸潤が認められ、損傷した細胞を貪食しているマクロファージと考えられた。これに対し、視床にはギムザ陽性細胞が認められなかった。マクロファージによる TSPO-PET uptake への関与を確かめるため、CCI 直後クロドロネートを静脈注射し、血中のマクロファージを除去した後、損

傷 1 週目に TSP0-PET を撮像した。クロドロンート投与群の大脳皮質の損傷部位の TSP0-PET uptake は減弱したが、視床は減弱せず、損傷後 1 週目の視床における TSP0-uptake は主にミクログリアの活性化を反映していると考えられた。損傷後 1 週間では、直接損傷部において炎症・抗炎症サイトカイン (IL-1 β 、TNF β 、IL-6、IL-10) が共に発現しているのに対し、視床では炎症性サイトカイン (IL-1 β 、TNF β) のみ発現していた。これらの結果により、損傷部と視床では全く異なる性質の炎症がおこなっていることがわかった。

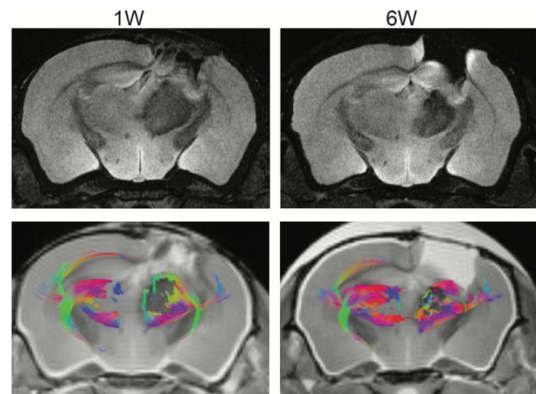


次に、視床の慢性炎症が神経再生/神経毒性に関与しているかを評価するため、損傷後 4/6/9/14 週目で MRS を行った。視床を 2 \times 2 \times 2mm³ (立方ミリメートル) の voxel で囲んだ single voxel 法で測定した。損傷側の視床では、健側に比べて、神経のマーカである N アセチルアスパレートが低下しており、嫌気性代謝のマーカである乳酸、グリア細胞のマーカであるミオイノシトール、細胞増殖のマーカであるコリンは上昇しており、神経細胞死、グリア細胞の増殖を示唆していた。6/9/14 週においても同様の結果を得た。さらに MRS の所見を組織学的に確かめるため、損傷後 4 週目の脳切片を電子顕微鏡で観察した。健側の視床では、ミエリン鞘を有する正常神

経を認めた。損傷側の視床では、ミエリン鞘がはっきりしない変性神経と、高度に変性した神経にからみつく丸い活性型ミクログリアを認めた。つまり、慢性炎症部位で、活性型ミクログリアによる神経変性・神経細胞死が生じている事を示せた。



次に、損傷後 1 週目と 6 週目に PFA 固定した脳標本を 48 時間以上かけ MRI 撮像し、より詳細な解析を行った。損傷部の cavity が high intensity area を示すとは対照的に、損傷側視床は low intensity area を示した。また、トラクトグラフィーでは両側視床を通過する神経を描出した。直接損傷部と慢性神経炎症部位は視床一皮質投射で繋がっていた。慢性神経炎症部位では、健側に比して、損傷側視床で神経軸索が少なくなっており、視床一皮質投射以外で視床の神経線維が障害を受けることがわかった。以上により、慢性神経炎症によって、損傷部の投射先である視床の神経線維がゆっくりと変性していく事がわかった。



本研究では、大脳皮質局所損傷モデルマウスの神経炎症を TSP0-PET と MRS、tractography を共に用いて評価することで、頭部外傷後におこる 2 つの炎症 (損傷部位: 急性炎症、視床: 慢性炎症) を描出した。損傷を受けた神経はマクロファージにより貪食された後、その周囲をアストロサイトに囲まれ、瘢痕を形成し、急性炎症は収束することが多くの論文でしめされており、本研究における直接損傷

部位である大脳皮質の TSP0 uptake の推移と一致した。これに対し、視床の慢性神経炎症では、皮質-視床投射の神経細胞死を感知したミクログリアが活性化し神経炎症が始まった。MRS と電子顕微鏡の結果より、視床の炎症が慢性期まで遷延することで、食食されずに残存する視床の神経が変性することが示された。神経投射先を介して炎症が波及していく病態に対し、Brain injury related inflammatory projections (BIRIP) と名称を提言する。

ミクログリアは脳内の免疫担当細胞であり、脳内の恒常性を保つだけでなく、神経に対して多くの役割を担うことがわかってきている。ミクログリアには M1 (classically activated) と M2 (alternatively activated) といった 2 つのサブタイプが存在する。M1 は炎症性のサイトカインを産生し、M2 は組織の修復を促す作用と炎症反応を軽減する作用を持つと言われている。サイトカインの結果および免疫染色での形態変化から、大脳皮質損傷後、視床で、ミクログリアが大脳皮質-視床投射の神経損傷を感知することで活性化され、炎症性ミクログリア (M1) となり、炎症性サイトカイン等の神経傷害因子を分泌し続け、損傷を受けていない生き残った神経にも軸索変性・細胞死を生じ、神経ネットワークの崩壊をきたすと考えられた。

視床は大脳だけでなく小脳や海馬などとも繋がる脳における主要な中継地点であり、損傷により多様な神経症状を示すことが知られている。実際、頭部外傷の既往があり高次脳機能障害の伴う患者さん 10 人に対して TSP0-PET を撮像した論文では、外傷後 11 ヶ月から 204 ヶ月という慢性期において、コントロールに比して視床での高い集積が認められており、私たちの動物モデルを使った結果とよく対応していた。また、視床の炎症を制御することで頭部外傷後の高次脳機能障害の発症を抑制できる可能性が示された。以上の結果を英文論文として纏めて、海外雑誌に投稿中である。今後は、本研究により確立できた診断方法を用いて、適切な炎症鎮静剤の模索していき、治療方法の検討する予定である。神経変性が完成する前に治療介入することで、高次脳機能障害の発症を防ぐことが可能となりうると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 細見早苗 他、頭部外傷後慢性神経炎症を制御する、第 45 回日本救急医学会総会・学術集会、2017、大阪

- ② Sanae Hosomi et al, Do myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) have the ability to suppress neuroinflammation in the injured brain??. 15th Annual Neurocritical Care Society Meeting, 2017, USA

- ③ 細見早苗 他、Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) による頭部外傷後の炎症抑制効果、第 45 回日本集中治療学会、2018、千葉

[図書] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細見 早苗 (HOSOMI, Sanae)
大阪大学・医学系研究科・招聘教員
研究者番号：90644005

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()