

令和元年6月7日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16650

研究課題名(和文) IL3とGM-CSFの併用投与による脳梗塞病態の改善：脳と骨髄をつなぐ研究

研究課題名(英文) Simultaneous administration of IL-3 and GM-CSF ameliorates ischemic brain injury: interaction between brain and bone marrow.

研究代表者

チョードリ エマムッセレヒン (Choudhury, Emamussalehin)

愛媛大学・医学系研究科・助教(特定教員)

研究者番号：90726803

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)：ラット中大脳動脈一過性閉塞モデルに対し、翌日からIL-3とGM-CSF混合物の皮下投与を行い、脳喪失体積の減少、認知行動能力の極めて大きく改善させた。対照群の虚血辺縁部(ペナンプラ)ではマイクログリアにBcl-xL発現が見られたのに対し、IL-3とGM-CSF混合投与群では神経細胞にBcl-xLが発現し、マイクログリアでの発現は消失していた。これらの結果は、IL-3とGM-CSFが神経細胞のアポトーシスを抑制する結果、マイクログリアの貪食による神経細胞死の促進(phagoptosis)が抑制され、予後改善に至ったと結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、脳梗塞後の虚血辺縁部の慢性的な神経細胞死の拡大を防ぐ方法を、サイトカイン投与という形で可能になることを明らかにし、現実的な治療法を提示したことになり、医学医療上の意義は大変大きい。また、脳梗塞後の亜急性期の神経細胞死の原因はよくわかっていなかったが、神経細胞障害が引き金となってマイクログリアの活性化が生じ、そのマイクログリアは抗アポトーシス因子 Bcl-xL発現によって防がれていることを示した意義も大きい。フローサイトメトリーにおいて、CD200をターゲットとして用いれば神経細胞を分離できることを明らかにした点は、今後の研究手法の発展につながる。

研究成果の概要(英文)：The rat middle cerebral artery was transiently occluded and stroke model was prepared. The subcutaneous administration of a mixture of IL-3 and GM-CSF from the next day reduced the brain tissue loss and improved cognitive dysfunction. The cytokine mixture increased Bcl-xL expression in neurons but reduced that in microglia. These results suggest that the cytokine mixture inhibited neuronal apoptotic changes, thereby preventing aggravating effects of activated microglia.

研究分野：神経科学、脳神経外科学

キーワード：マイクログリア 神経細胞 アポトーシス 活性酸素 フローサイトメトリー CD200

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

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞など脳卒中は、死亡原因としても重大な疾患であるが、死に至らない場合も脳機能の後遺障害が患者本人の苦痛のみならず介護・看護負担の大きさに結びつき、医学的・社会的・経済的に巨大な問題であり続けている。最近、脳梗塞病巣での免疫反応に注目が集まり、その適正化により予後を改善しようという試みが広まりつつある。特に、脳神経外科の先生方の中で、自己骨髄の移植を脳卒中患者に行う試みがなされ、一定の治療効果のあることが、複数の施設から報告されるようになった。

我々はこの動きに先駆けて、梗塞巣に集積する脳保護的骨髄由来マクロファージ BINCs に注目し、高齢者ヒト病巣でのこれらの細胞の集積が乏しいことを示してきた。骨髄細胞の脳病巣への動員を増強するために、IL3 と GM-CSF からなる皮下注射剤を投与すると、脳外傷モデルの機能的予後が改善することを示した。この注射剤による治療は、自己骨髄移植より遥かに迅速に実施出来、かつ患者負担、経済的負担も少ないと期待される。本研究では、この骨髄刺激療法の脳梗塞に対する有効性の動物実験での確たる証明を行い、脳梗塞病巣や、骨髄、末梢血での免疫細胞の反応の変化を解析する。本研究遂行により、機能的予後改善療法として必ずや実地臨床への応用を目指したい。

2. 研究の目的

脳梗塞巣核心部は血流のほぼ完全な途絶によって神経細胞のみならずグリア細胞の壊死が生じる。若いラットの脳梗塞モデルでは骨髄に由来するマクロファージで梗塞巣核心部は充満するようになる。このマクロファージは脳を守る働きがあるが、高齢ヒト脳ではその集積は極めて少ない。最近、脳神経外科領域で脳梗塞患者に骨髄移植が試みられている。骨髄移植に代わる方法として、我々は骨髄刺激作用のあるサイトカインのインターロイキン 3 (IL3) と顆粒球/マクロファージ-コロニー刺激因子(GM-CSF)の混合物が、ラット脳梗塞モデルに対し顕著な治療効果のあることを見いだした。本研究では、梗塞巣核心部に集積するマクロファージの分析や末梢血白血球の変化を分析し、その治療効果のメカニズムを示し、臨床研究につなげていく。

3. 研究の方法

IL3 と GM-CSF 混合注射剤の脳梗塞予後改善効果の証明と脳組織、末梢血、骨髄の変化を明らかにすることで、有効性のメカニズムを解明、臨床研究に向けての前進する。第1年度：1) IL3 と GM-CSF 混合剤皮下注射の脳梗塞モデルラットに対する有効性の最終的な証明、2) IL3 と GM-CSF 投与時の脳内の変化(免疫組織学染色、mRNA、タンパク質発現、脳保護因子の ELISA) 3) 副作用分析；血算、生化学検査、動脈血ガス、生理学的検査、体重変化、行動変化、脳梗塞後の繁殖能、仔の異常) 第2年度：1) IL3 と GM-CSF 注射による末梢血及び骨髄の変化、2) 臨床研究実施に向けた検討開始

4. 研究成果

私は、このサイトカイン IL3 と GM-CSF の組み合わせに関心を持ち、6-OHDA 誘発パーキンソン病モデルに対し、IL3 と GM-CSF の皮下注射を試みたところ、黒質緻密部ドーパミン神経細胞死が顕著に防がれ、極めて良好な転帰を得た(Choudhury et al. Brain and Behavior, 2011)。この研究において、それぞれのサイトカイン単剤を比較したところ、混合剤の方が、マイクログリアの神経保護作用や、神経細胞の抗アポトーシス因子 Bcl-xL 発現の増強作用が単剤に比べ勝っていた。

本研究では、ラット中大脳動脈一過性閉塞モデルに対し、翌日から IL-3 と GM-CSF の混合物の皮下投与を5日間行ったところ、3ヶ月目までに脳喪失体積の減少、認知行動能力(水迷路、オープンフィールド、回転棒試験)の改善を見た。我々は、多くの薬物・成長因子類の投与を MCAO モデルに対し行ってきたが、翌日投与でこれほどの改善を見たものは他にない。

次にメカニズムであるが、パーキンソン病モデル研究から判明した抗アポトーシス因子 Bcl-xL の発現変化を調べた。その結果、驚くべきことに、対照群の虚血辺縁部(ペナンプラ)ではマイクログリアに Bcl-xL 発現が見られてのに対し、IL-3 と GM-CSF 混合投与群では神経細胞に Bcl-xL が発現し、マイクログリアでの発現は消失していた。これらの結果は、IL-3 と GM-CSF が神経細胞のアポトーシスを抑制する結果、eat-me signal であるフォスファチジルセリンの神経細胞外部への露出が減少し、マイクログリアの活性化が抑制され、マイクログリアの貪食による神経細胞死の促進(phagoptosis)が抑制され、予後改善に至ったと結論した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

1件目

著者名 Miyanishi, K., Choudhury, M.E., Watanabe, M. et al.

論文表題 Behavioral tests predicting striatal dopamine level in a rat hemi-Parkinson's disease model

雑誌名 Neurochemistry International 2019, 122: 38-46

掲載論文の DOI doi.org/10.1016/j.neuint.2018.11.005

査読あり, オープンアクセス なし, 国際共著 : 該当しない

2 件目

著者名 Yoshitomo Ueno, Saya Ozaki, Akihiro Umakoshi, Hajime Yano, Mohammed E. Choudhury, et al.

論文表題 Chloride intracellular channel protein 2 in cancer and non-cancer human tissues: relationship with tight junctions

雑誌名 Tissue Barriers article in press 2019 online journal

掲載論文の DOI doi.org/10.1080/21688370.2019.1593775

査読の有無 有り, オープンアクセスとしている, 国際共著 : 該当しない

3 件目

著者名 Abe, N., Choudhury, M.E., Watanabe, M., et al.

論文表題 Comparison of the detrimental features of microglia and infiltrated macrophages in traumatic brain injury: A study using a hypnotic bromovalerylurea

雑誌名 GLIA 2018, 66: 2158-2173

掲載論文の DOI DOI: 10.1002/glia.23469

査読の有無 有り, オープンアクセス なし, 国際共著 : 該当しない

4 件目

著者名 Ando, R., Choudhury, M.E., Yamanishi, Y., et al.

論文表題 Modafinil alleviates levodopa-induced excessive nighttime sleepiness and restores monoaminergic systems in a nocturnal animal model of Parkinson's disease

雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences 2018, 136: 66-271

掲載論文の DOI doi.org/10.1016/j.jpshs.2018.03.005

査読の有無 有り, オープンアクセスとしている, 国際共著 : 該当しない

5 件目

著者名 Islam, A., Choudhury, M.E., Kigami, Y. et al.

論文表題 Sustained anti-inflammatory effects of TGF- β 1 on microglia/macrophages

雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease 2018, 1864: 721-734

掲載論文の DOI doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.12.022

査読の有無 有り, オープンアクセスとしている, 国際共著 : 該当しない

6 件目

著者名 Jun Kuwabara, Akihiro Umakoshi, Naoki Abe, Yutaro Sumida, Shota Ohsumi, Eika Usa, Kana Taguchi, Mohammed E. Choudhury et al.

論文表題 Truncated CD200 stimulates tumor immunity leading to fewer lung

metastases in a novel Wistar rat metastasis model

Biochemical and Biophysical Research Communications 2018, 496, 542-548

掲載論文の DOI doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.065

査読の有無 有り, オープンアクセス なし, 国際共著 : 該当しない

7 件目

著者名 Aono, H., Choudhury, M.E., Higaki, H. et al.

論文表題 Microglia may compensate for dopaminergic neuron loss in experimental Parkinsonism through selective elimination of glutamatergic synapses from the subthalamic nucleus

雑誌名 GLIA 2017, 65, 1833-1847

掲載論文の DOI DOI: 10.1002/glia.23199

査読の有無 有り, オープンアクセス なし, 国際共著 : 該当しない

8 件目

著者名 Shun Kawasaki, Naoki Abe, Fumito Ohtake, Afsana Islam, Mohammed E Choudhury, et al.

論文表題 Effects of hypnotic bromovalerylurea on microglial BV2 cells

雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences 2017, 134: 116-123

掲載論文の DOI doi.org/10.1016/j.jphs.2017.05.007

査読の有無 有り, オープンアクセスとしている, 国際共著 : 該当しない

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

Chapter 41 – Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP)-Induced Animal Models of Parkinson’s Disease

Jiro Kasahara, Mohammed E. Choudhury et al.

Animal Models for the Study of Human Disease (Second Edition) 2017, Pages 1087–1108

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等 <https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/mcp/>

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：田中潤也

ローマ字氏名：TANAKA Junya

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。