

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08886

研究課題名(和文) 骨髄由来抑制細胞(MDSC)による頭部外傷後神経炎症の抑制効果に関する研究

研究課題名(英文) Myeloid-derived suppressor cells infiltrate the brain and suppress neuroinflammation in a mouse model of focal traumatic brain injury

研究代表者

細見 早苗 (Hosomi, Sanae)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90644005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄由来抑制細胞(MDSC)は、近年免疫学分野で注目されている細胞種であるが、その神経免疫学的特性は未解明である。本研究では、in vivoイメージングを用いて、局所外傷性脳損傷(TBI)後の脳炎症反応におけるMDSCsの抑制的な役割を探索した。挫滅部に浸潤するCD11b+/Gr-1+細胞が、形態、機能、表現型解析によりMDSCsであることが判明した。MDSCsは組織損傷に対する最初の応答者の一つであり、ミクログリア活性化よりも先に反応し、浸潤性MDSCsは局所的TBI後に神経細胞の炎症を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、免疫特権と考えられていた中枢神経でのMDSCsに関する論文は少ない。熱傷および敗血症のような急性炎症モデルにおいては、MDSCは自然免疫応答を増加させ有益な役割を果たすことが報告されているが、頭部外傷後の神経炎症におけるMDSCの役割やメカニズムはほとんど解明されていない。我々はMDSCが頭部外傷後の神経炎症を抑制する役割を担うことを世界に先駆けて発見した。本研究では、神経炎症におけるMDSCのまだ解明されていない免疫応答を解明することができた。

研究成果の概要(英文)：Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) have strong immunosuppressive characteristics allowing them to limit inflammation and facilitate wound healing and recovery. Although MDSCs are a newly-determined cell type that has drawn recent attention in the immunology field, their neuroimmunological characteristics remain unstudied. In this study, we explored the suppressive role of MDSCs in cerebral inflammatory reactions after focal traumatic brain injury (TBI) using in vivo imaging. We determined that CD11b+/Gr-1+ cells infiltrating the contusion area are MDSCs by morphological, functional, and phenotypic analysis. MDSCs are among the first responders to tissue injury, responding even prior to microglial activation. Positron emission tomography imaging of translocator protein results suggest that infiltrating MDSCs suppress neuronal inflammation and interact with resident immune cells, like microglia, following focal TBI.

研究分野：頭部外傷

キーワード：神経炎症 ミクログリア MDSC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨髄由来抑制細胞(Myeloid-derived suppressor cells: MDSC)は、病態下で免疫応答を制御することができる末梢性免疫細胞である。健康な状態では、未熟な骨髄系細胞が正常な骨髄に存在し、様々な末梢臓器に移動してマクロファージ、樹状細胞、顆粒球に分化する。しかし、病態においては、これらの骨髄系細胞は成熟細胞に分化できず、未分化な状態にあり、その T 細胞免疫抑制能から MDSCs と呼ばれている。MDSCs は、T 細胞を抑制することにより適応免疫応答を制御したり、サイトカイン発現の変化を介して自然免疫応答を制御することが示されている。しかしながら、外傷を受けた中枢神経で生じる神経炎症における MDSC の正確な機能は、まだ不明である。

2. 研究の目的

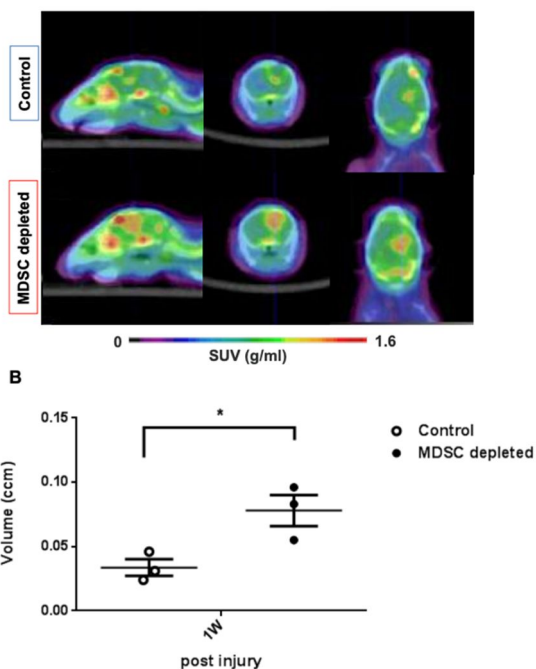
体循環系を介して脳に浸潤する MDSCs が、局所脳損傷後の中枢神経炎症を抑制するかどうかを *in vivo* イメージング技術を用いて検討した。

3. 研究の方法

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。損傷部への血球系細胞の浸潤を評価するため、損傷 1日・3日・5日・7日・28日に抗 Gr-1 抗体と抗 CD11b 抗体を用いてフローサイトメトリ法を行い、損傷脳への MDSC 浸潤を定量評価した。損傷 1日目における MDSC の脳内の局在を調べるため、抗 Gr-1 抗体を用いて免疫染色をおこなった。血中から損傷部へと浸潤する MDSC を阻害するために、損傷の 3 時間後、1~4 日目に RB6-8C5 40mg/kg を腹腔内投与したものを抗体群とし、対照群にはアイソタイプコントロール (IgG2b,) を投与した。損傷後 1 週間におけるミクログリア活性を Translocator protein (TSPO) - Positron Emission Tomography (PET)を用いて *in vivo* imaging で評価した。

4. 研究成果

フローサイトメトリ解析により、損傷脳における CD11b⁺ /Gr-1⁺細胞の集積時間経過を検討した。CD11b も陽性である Gr-1 陽性細胞は、損傷脳に集積し、損傷後 1 日目にはゲートされた全生細胞の約 30%まで増加し、その後、損傷後 7 日目まで徐々に減少した。次に、受傷後 1 日目に挫滅部位に浸潤したこれらの Gr-1⁺細胞の形態学的評価のために、Gr-1 抗体とギムザ対比染色を用いた修正免疫組織化学的手順を実施した。その結果、血腫と同様に病変部位に多形核または単核の形態を持つ、豊富な Gr-1⁺ 異種細胞が浸潤していたが対側半球は染色されなかった。MDSC は、その形態的・表現型の不均一性だけでなく、T 細胞抑制能によっても特徴づけられるので、免疫磁気ソーティングを用いて Gr-1⁺ 細胞を分離し、その T 細胞増殖抑制能を評価した。Gr-1⁺ 細胞を CD4⁺ T 細胞と 1:1 および 1:2 の割合で使用した場合、CD4⁺ T 細胞の増殖は有意に抑制された (それぞれ 0.1264 ± 0.0341 および 0.4210 ± 0.0783 ; $p < 0.001$ vs 1:0)。1:4 の比率では、抑制活性は観察されなかった。この結果は、CCI 後の損傷脳に浸潤する CD11b⁺ /Gr-1⁺ 細胞が、実際に MDSC であることを強く示唆するものであった。最後に、Gr-1 抗体を投与し MDSCs を枯渇させた後、受傷後 1 週間のマウスにおける TSPO-PET を用いて、神経炎症を調べた。MDSCs を枯渇させるために、Gr-1 またはアイソタイプコントロール抗体をマウスに投与した。TSPO の取り込みは、CCI 1 週間後のアイソタイプコントロール群では、まず大脳皮質損傷部位で高い取り込みが検出され、損傷直下の視床部位では軽度の取り込みが検出された。同じ時期に Gr-1 抗体を投与したマウスでは、対照群に比べ TSPO の取り込みが増加した (図 A)。また、同側の視床や大脳皮質など、より広い範囲で TSPO の取り込みが観察された。受傷後 7 日目の定量的評価では、Gr-1 抗体投与マウスはアイソタイプコントロール投与マウスに比べて TSPO の取り込みが有意に高かった ($p = 0.03$, 0.033 ± 0.0064 vs 0.078 ± 0.0121 ; 図 B)。外傷により脳が損傷されると、損傷部周囲には一連の炎症反応が生じ、続発性に組織損傷及び



細胞死がもたらされる。神経細胞死を免れることができたとしても、神経軸索の損傷により神経ネットワークの機能は失われ、運動機能や感覚機能の脱落症状となり、生涯にわたって後遺症が残る。血液脳関門の存在から、従来、免疫特権として考えられていた中枢神経の免疫機構に関する研究はここ数年で大きく飛躍し、中枢神経のホメオスタシスに末梢由来の免疫細胞が関与することが明らかになってきた。しかしながら、頭部外傷後の神経炎症における、末梢由来細胞の発現機序や作用機序などは十分に解明されていない。本研究では、大脳皮質局所損傷モデルマウスを用いて、MDSCが挫傷脳に集積することを確認した。さらに、脳内へのMDSC浸潤を抗体で阻害すると、局所損傷部だけでなく、神経投射先の視床の神経炎症が悪化することを、*in vivo* imagingを用いて証明した。ミクログリアはマクロファージに相当する細胞として、脳における自然免疫反応を担う中心的な細胞である。活性化したミクログリアは損傷した神経を貪食する際に、多数の抗炎症サイトカインを放出する。以上により、MDSCは脳内免疫担当細胞のミクログリアの活性を抑制することにより神経炎症を抑制しているのではないかと考えられた。

CD11b⁺/Gr-1⁺細胞が脳皮質の挫滅部に浸潤していることを、表現型マーカーとともに形態学的、機能学的に解析し、この細胞がMDSCsであることを確認した。また、局所的なTBIの後、浸潤したMDSCsが神経細胞の炎症を抑制し、ミクログリアなどの常在免疫細胞と相互作用することが示唆された。中枢神経系におけるMDSCの活性化、増殖、分化がどのように起こるかを理解することは、MDSCの免疫抑制機能の維持または調節に基づく将来の治療戦略の開発に役立つと考えられた。

参考文献：1. Gabilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(3):162-74.
2. Rupprecht R, Papadopoulos V, Rammes G, Baghai TC, Fan J, et al. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 971-88.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuura H, Ohnishi M, Yoshioka Y, Togami Y, Hosomi S, Uemura Y, Ebihara T, Shimizu K, Ogura H, Shimazu T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Original experimental rat model of blast-induced mild traumatic brain injury: a pilot study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Injury	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/02699052.2020.1861653	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sanae Hosomi, Mitsuo Ohnishi, Hiroshi Ogura, Takeshi Shimazu	4. 巻 -
2. 論文標題 Traumatic brain injury-related inflammatory projection: Beyond local inflammatory responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acute Medicine & Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hosomi S, Watabe T, Mori Y, Koyama Y, Adachi S, Hoshi N, Ohnishi M, Ogura H, Yoshioka Y, Hatazawa J, Yamashita T, Shimazu T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Inflammatory projections after focal brain injury trigger neuronal network disruption: An 18F-DPA714 PET study in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 NeuroImage: clinical	6. 最初と最後の頁 946-954
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nicl.2018.09.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hosomi S, Koyama Y, Watabe T, Ohnishi M, Ogura H, Yamashita T, Shimazu T.	4. 巻 406
2. 論文標題 Myeloid-Derived Suppressor Cells Infiltrate the Brain and Suppress Neuroinflammation in a Mouse Model of Focal Traumatic Brain Injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 457-466
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2019.03.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 S. Hosomi, Y. Koyama, T. Watabe, M. Ohnishi, H. Ogura, T. Shimazu
2. 発表標題 Myeloid-derived suppressor cells infiltrate the brain and suppress neuroinflammation in a mouse model of traumatic brain injury
3. 学会等名 31st Annual Congress of the European Society of Intensive Care Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sanae Hosomi, Tadashi Watabe, Mitsuo Ohnishi, Hiroshi Ogura, Jun Hatazawa, Takeshi Shimazu
2. 発表標題 Interpretation of TSPO uptake after focal brain injury : an 18F-DPA714 PET study in mice
3. 学会等名 第58回 日本核医学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	梅村 穰 (Umemura Yutaka) (20743561)	大阪大学・医学系研究科・招へい教員 (14401)	
研究分担者	吉矢 和久 (Yoshiya Kazuhisa) (40379201)	大阪大学・医学部附属病院・助教 (14401)	2020年7月8日に削除
研究分担者	嶋津 岳士 (Shimazu Takeshi) (50196474)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小倉 裕司 (Ogura Hiroshi) (70301265)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	大西 光雄 (Ohnishi Mitsuo) (70597830)	大阪大学・医学系研究科・招へい教員 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関