

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16587

研究課題名(和文) 脳梗塞マイクログリアの網羅的機能解析：そのダイナミクスと治療応用

研究課題名(英文) Cyclopedic analysis of microglia at the cerebral infarction : The dynamics and treatment application

研究代表者

松本 調 (Matsumoto, Shirabe)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30772503

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)：虚血辺縁部では、eat-me signal経路であるProteinS/MerTK経路や補体/CD11b経路を介し、生存した神経細胞が活性化したマイクログリアによって貪食されている。これがdelayed neuronal loss (DNL)と関わっていると考えられる。GM-CSF/IL-3は神経細胞に作用し、抗アポトーシス分子Bcl-xLの発現を増加させた。その結果、神経細胞のミトコンドリア機能が維持され、細胞内ATPが増加する。細胞表面のホスファチジルセリンの露出が減少してeat-me signal分子が神経細胞に結合しにくくなり、マイクログリアによる神経細胞の貪食が抑えられたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症脳梗塞は、虚血超急性期の後も徐々に神経細胞死が進行していくことが临床上重要な問題である。虚血辺縁部では、生存した神経細胞がマイクログリアによって貪食されている現象が起こっている。本研究では、この神経細胞とマイクログリアの貪食に関わっているeat-me signalの分子を解明した。また、GM-CSF/IL-3というサイトカインが、この虚血辺縁の神経細胞のアポトーシス、マイクログリアの貪食を抑制する作用があることを示し、脳梗塞治療ターゲットとなりうる可能性があることを示した。

研究成果の概要(英文)：Activated microglia phagocytose neurons which survived at the periphery of cerebral infarction through eat-me signal cascade; ProteinS/MerTK and complement/CD11b. This Phagocytosis is thought to be associated with delayed neuronal loss (DNL). GM-CSF/IL-3 increased expression of the anti-apoptotic molecule Bcl-xL on neurons. The Bcl-xL maintained the mitochondrial function of neurons and increased the intracellular ATP. The intracellular ATP decreased phosphatidylserine which was exposed to the neuronal surface, eat-me signal molecules was less likely to combine with neurons, and neuronal phagocytosis by the microglia was suppressed.

研究分野：脳虚血

キーワード：脳虚血 マイクログリア アポトーシス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞神経細胞死におけるマクロファージとマイクログリアの役割

虚血急性期以降に緩徐に進む神経細胞死「遅発性神経細胞死 delayed neuronal loss(DNL)」を阻止することを、脳梗塞研究の目的としている。その DNL の重要な因子として神経炎症があり、脳梗塞内における神経炎症については、骨髄由来マクロファージや脳常在性マイクログリアが主たる役割を担っているとされている。従来マイクログリアは、脳病態時に活性化し、最終的にはアメーバ型を呈する貪食細胞に変化すると考えられてきた。しかし、我々は、マイクログリアは虚血に弱く、極めて早期に死滅することを示し (Matsumoto et al. J Neurosci Res. 2007)、この概念が誤っていることを明らかにした。梗塞巣中心部で変性神経細胞等を貪食するのは骨髄由来(単球由来)のマクロファージである。これらのマクロファージの多くは、マクロファージ・マイクログリアのマーカーである Iba1 およびオリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカーである NG2 chondroitin sulfate proteoglycan (NG2) を発現することから、この細胞を BINCs (Brain Iba1+/NG2+ Cells)としてきた(Matsumoto et al. J Cereb Blood Flow Metab, 2008)。一方、脳梗塞中心部には、NG2 を発現しないマクロファージも集積し、これら 2 種類の細胞はマクロファージ活性化抑制分子 CD200 分子の発現の有無で分類できた(Matsumoto et al. J Neuroimmunol, 2015)。脳梗塞中心部には、2 種類のマクロファージが存在し、分布も異なっていた。CD200+細胞は脳梁や線条体などに多く存在し、iNOS や IL-1b などの起炎症性因子や Toll-like Receptor(TLR4)を発現する。

脳梗塞辺縁部でのマイクログリアの役割

近年、マクロファージ、マイクログリアが虚血辺縁部においてなお生存しうる神経細胞を貪食するために、神経細胞死が促進されると報告されている (Neher et al. PNAS, 2013)。我々は、虚血辺縁部で、マイクログリアは活性化し、NG2 を発現、変性神経細胞を取り囲み貪食している (Sugimoto et al. Glia, 2014)。脳梗塞中心部では、BINCs が TGF- β 1 が高発現し、TGF- β 1 は培養マイクログリアの NG2 や貪食細胞マーカーの発現が促進した。さらに、TGF- β 1 と培養されたマイクログリアは、Lipopolysaccharide(LPS)刺激による nitric oxide(NO)の産生が抑制されることを示した (Islam et al. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2018)。マイクログリアを M2 タイプに誘導するとされる interleukin-4(IL-4)刺激では、マイクログリアは抗炎症性の性質を獲得しないが、TGF- β 1 刺激ではサイトカイン除去後も LPS 刺激による NO 産生は低下したままであり、抗炎症性の性質を獲得している。

2. 研究の目的

脳梗塞マイクログリアの機能は、未だ明らかではない。その理由として、我々は虚血組織からは TGF- β 1 のようなサイトカイン・ケモカインが分泌され、経時的にマイクログリアの機能変化を引き起こしているためと考えた。よって、マイクログリアの機能のひとつである貪食能の解析を行った。アポトーシス神経細胞の貪食において関与しているとされる Eat-me signal 分子の MFG-E8、Gas6、ProteinS などの経時変化を解析し、NG2+マイクログリアの役割を見極める。さらに、神経保護作用や単球前駆細胞刺激作用をもつサイトカインである GM-CSF と IL-3 によって、神経細胞アポトーシスや脳梗塞マイクログリアによる貪食能がどのように影響するか調べ、これらのサイトカインの治療応用も検討した。

3. 研究の方法

脳梗塞モデルの作成

生後 8 週の雄性ウィスターラットを使用する。脳梗塞モデルとしてすでに確立されている 90 分間一過性中大脳動脈閉塞 tMCAO モデルを作成する。虚血負荷翌日に MRI 撮像を行い、脳梗塞巣の作成に問題ないことを確認する。

定量的リアルタイム RT-PCR(qPCR)およびウエスタンブロッティング

MCAO 作成 1 日、3 日、5 日、7 日経過後に、2 mm 厚の線条体位置でスライスを作成し、脳梗塞巣中心部(Core)、辺縁部(Peri)、対側(Cotra)の大脳皮質から組織を切り出し、全 RNA 及び SDS-PAGE 用に処理した。組織電気泳動サンプル、total RNA を調整し、それぞれウエスタンブロッティング、定量的リアルタイム RT-PCR(qPCR)を行った。アポトーシス細胞貪食に関わる分子(MFG-E8, VNR, GAS6, ProteinS, MerTK, CD68, MMPs、補体)の発現を調べる。また、IL-1、iNOS、PHOX などの起炎症性メディエーターの発現や神経細胞のアポトーシスを誘導する可能性のある因子や抗アポトーシス分子(Bcl-xL)の発現も調べる。

免疫組織化学的研究

MCAO 作成 1 日、3 日、5 日、7 日経過後にラットを灌流固定し、凍結切片を作成、間接蛍光交代法により免疫組織染色した。貪食、アポトーシス関連分子とマイクログリアおよび神経細胞マーカーとの多重免疫組織染色を行い、これらの因子の時間的・空間的分布について高精度 / 高倍率の対物レンズを用いた共焦点顕微鏡による観察を行った。

FACS

3dpr のラット梗塞脳から脳梗塞中心部、辺縁部の組織を採取し、gentle Macs Dissociators(Milteny Biotec 社)にて組織を分散し、ホモジナイズさせる。Flow cytometry によってマクロファージ、マイクログリアを分離し、アポトーシスに関わる分子や起炎症性メディエーターの発現を調べた。

サイトカイン

GM-CSF は、強力な起炎症性サイトカインとして、TNF- α を介し、顆粒球・マクロファージに特異的に作用するとされている。一方、IL-3 は、造血前駆細胞の増殖や分化、活性化や生存を調節するとともに、肥満細胞や好酸球、好塩基球、単球、巨核球、赤血球系の細胞の分化を促進する幅広い機能を有している。

培養実験によるマイクログリアの機能解析

初代培養マイクログリアのサイトカイン投与によって貪食マーカーの発現について調べた。

4. 研究成果

(1) ラット中大脳動脈閉塞モデルにおけるマイクログリアの貪食能の解析

3,5,7dpr での神経細胞特異タンパク質の MAP2、Synapsin1 の経時的変化を調べた。ウェスタンブロットングで、脳梗塞辺縁部(peri)では 3dpr で多くの神経細胞が残っているにも関わらず、5dpr、7dpr と徐々に神経細胞死が進行していた。次に、神経細胞マーカー(シナプシン 1、MAP2、PSD95)、5dpr での MAP2 と CD68 の発現をウェスタンブロットング法と RT-PCR 法で調べた。core で MAP2 の発現はなく、貪食マーカーである CD68 の著明な発現がみられ、活発な貪食が起こっていると思われる。一方 peri では、MAP2 の発現がみられ、神経細胞が生存しているにも関わらず、活発な貪食が起こっていることから、DNL と関連性が示唆された。また、5dpr のラット梗塞脳の蛍光免疫染色では、NG2 陽性の脳常在性マクロファージが NeuN 陽性の神経細胞を貪食している像が観察された。

次に、Eat-me signal である補体(C1q・C3)、MerTK、ProteinS の発現を、5dpr ラット梗塞脳組織、一次培養細胞で RT-PCR 法、ウェスタンブロットング法で調べた。C1q、C3、MerTK、ProteinS は脳梗塞 core で高い発現を認めたが、ついで peri でも高い発現を認めた。5dpr 梗塞脳の peri でマイクログリアマーカー CD11b と神経細胞マーカー NeuN と Eat-me signal の ProteinS および C3 との多重免疫組織染色を行ったところ、神経細胞とマイクログリアの境界に ProteinS、C3 の染色が認められ、脳梗塞辺縁部における神経細胞の貪食に Eat-me signal 分子が介在していることが示唆された。これらの結果より、梗塞辺縁部 peri では、脳梗塞発症から 3-7 日目に徐々に神経細胞死が進行していき、神経細胞は活性化したマイクログリアに生き残ったまま貪食されていると考えられた。また、この神経細胞はまだ生存しているにも関わらず、Eat-me signal 分子である補体や ProteinS などを介在して、貪食されていると考えられた。

(2) GM-CSF、IL-3 のサイトカインによる脳梗塞マイクログリアによる神経細胞貪食への影響

Bcl-xL はミトコンドリア外膜に局在し、活性酸素によるミトコンドリア膜障害を防ぎ、アポトーシスを抑制する抗アポトーシス分子である。tMCAO モデルラットに対して GM-CSF/IL-3 を皮下投与した 3dpr 脳組織の Bcl-xL の発現を調べた。対照群では、神経細胞の Bcl-xL の発現が低いのにに対し、GM-CSF/IL-3 群では、多くの神経細胞に Bcl-xL の発現がみられた。ウェスタンブロットング法で 3dpr 梗塞脳組織の Bcl-xL の発現を調べた。GM-CSF/IL-3 を投与した cytokine 群において Bcl-xL の発現が高かった。よって、GM-CSF/IL-3 の投与によって脳梗塞辺縁部における神経細胞のアポトーシスが抑制されていることが示唆された。さらに、一次培養マイクログリアを GM-CSF、IL-3、GM-CSF/IL-3 で培養し、貪食マーカーや Eat-me signal の発現を RT-PCR 法で比較した。CD68、CathepsinS、C1qb、C3 の発現は、GM-CSF、IL-3、両者の培養下で低下していた。また、活性酸素の産生酵素である NOX2 はこれらの cytokine を投与しても上昇せず低下していた。このことから、GM-CSF・IL-3 はマイクログリアの貪食活性を抑制する可能性が考えられた。

3dpr の梗塞側の脳半球の組織を分離し、FACS で細胞の population を解析した。マイクログリアを sorting し、起炎症性マーカーの発現を解析した。GM-CSF/IL-3 を投与した cytokine 群のマイクログリアは、TNF- α や IL-1 β 、iNOS の起炎症性マーカーの発現が低下していた。GM-CSF/IL-3 は脳梗塞辺縁部においてマイクログリアによる起炎症性メディエーターの発現を上昇させていないことが示唆された。次に、脳梗塞ラットに対して、GM-CSF/IL-3 の cytokine を投与し、MRI 検査にて脳梗塞体積の経時的変化を調べた。90dpr まで cytokine 投与群は有意に梗塞体積が小さかった。この結果より、GM-CSF/IL-3 は脳梗塞治療になりうる可能性が示された。

(3) 結果のまとめと考察

虚血辺縁部では生存した神経細胞が存在するにも関わらず、マイクログリアによる貪食が起こっており、これが DNL に関わっている可能性が示唆された。このマイクログリアによる神経細胞貪食には、ProteinS/MerTK 経路と補体/CD11b 経路が関与していると考えられた。

GM-CSF/IL-3 は、虚血辺縁部においてこのマイクログリアの貪食機能や Eat-me signal の発現を抑制するとともに、神経細胞の Bcl-xL の発現を上昇させアポトーシスを抑制していた。GM-CSF/IL-3 は、強力なサイトカインではあるが、脳梗塞辺縁部のマイクログリアの起炎症性メディエーターを上昇させてはいなかった。虚血辺縁部における貪食では、神経細胞でミトコンドリア障害が生じ、ATP 合成が低下し、アポトーシスにつながる変化として細胞膜にホスファチジルセリン(PS)の露出が増加してきて、Eat-me signal 分子が結合する。マイクログリアはこれを認識し、貪食を始めるが、神経細胞はアポトーシスにいたっていない状態であり、これが

DNL の進行と考えられる。GM-CSF/IL-3 は、神経細胞に作用し Bcl-xL の発現を増加させ、神経細胞のミトコンドリア機能を維持し、細胞内 ATP を増加させて、細胞膜表面の PS を細胞膜内に戻すことで Eat-me signal の結合を減らしたものと考えられる。また、GM-CSF/IL-3 はマクログリアの貪食能だけでなく、起炎症性メディエーターの発現も抑制していることから、DNL 進行を抑制する脳梗塞治療になりうる分子と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Abe N, Choudhury ME, Watanabe M, Kawasaki S, Nishihara T, Yano H, Matsumoto S, Kunieda T, Kumon Y, Yorozuya T, Tanaka J.	4. 巻 66(10)
2. 論文標題 Comparison of the detrimental features of microglia and infiltrated macrophages in traumatic brain injury: A study using a hypnotic bromovalerylurea	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2158-2173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23469	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 Kuwabara J, Umakoshi A, Abe N, Sumida Y, Ohsumi S, Usa E, Taguchi K, Choudhury ME, Yano H, Matsumoto S, Kunieda T, Takahashi H, Yorozuya T, Watanabe Y, Tanaka J.	4. 巻 2
2. 論文標題 Truncated CD200 stimulates tumor immunity leading to fewer lung metastases in a novel Wistar rat metastasis model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 542-548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.01.065	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 Mohammed E Choudhury, Kazuya Miyaniishi, Haruna Takeda, Afsana Islam, Nayu Matsuoka, Madoka Kubo, Shirabe Matsumoto, Takeharu Kunieda, Masahiro Nomoto, Hajime Yano, Junya Tanaka	4. 巻 68(1)
2. 論文標題 Phagocytic Elimination of Synapses by Microglia During Sleep	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 44-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23698	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本 調、久門 良明、渡邊 英昭、田中 潤也、國枝 武治
2. 発表標題 脳梗塞に対するIL-3/GM-CSFの混合投与による骨髄刺激療法有効性の検討
3. 学会等名 Stroke2018 (2018.3.15-3.18)福岡
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 調、久門 良明、渡邊 英昭、田中 潤也、國枝 武治
2. 発表標題 ラット脳梗塞モデルにおける活性型および静止型マイクログリアと骨髄由来マクロファージの差異について
3. 学会等名 脳神経外科学会総会(2018.10.10-10.12)仙台
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 調、久門 良明、渡邊 英昭、田中 潤也、國枝 武治
2. 発表標題 ラット脳梗塞モデルにおける貪食メカニズムとIL-3/GM-CSF投与の有効性
3. 学会等名 脳神経外科学会総会(2019.10.9-10.12)大阪
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----