

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390037

研究課題名（和文） 傷害脳に出現するマクロファージ様細胞BINCsの多能性幹細胞性の証明

研究課題名（英文） Multipotential stem cell-like nature of bone marrow-derived macrophages accumulated in lesion core of acute and severe brain injuries.

研究代表者

田中 潤也（Tanaka Junya）

愛媛大学・プロテオ医学研究センター・教授

研究者番号：70217040

研究成果の概要（和文）：

脳梗塞や脳外傷などの急性重症脳傷害での傷害核心部に骨髄由来のマクロファージ様細胞が多数集積し、これらの多くが神経系の幹細胞に発現するタンパク質のNG2コンドロイチン硫酸プロテオグリカンマクロファージ特異的タンパク質であるIba1とともに特徴的に発現することから、BINCs（Brain Iba1⁺/NG2⁺ Cells）と名付けた。BINCsは、破壊された組織の再生修復を促す好ましい効果を発揮する。血液細胞の増殖因子であるサイトカインの混合物（IL3とGM-CSF）がBINCsに働きかけ、脳外傷やパーキンソン病治療に有効であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Many bone marrow-derived macrophages were found to accumulate in lesion cores of stroke and traumatic brain injuries. Because most of the cells expressed a multipotent cell marker in the brain, NG2 chondroitin sulfate proteoglycan as well as a macrophage marker Iba1, they were termed BINCs (Brain Iba1⁺/NG2⁺ Cells). BINCs exerted neuroprotective actions and promoted regeneration and restoration of injured tissue by releasing neuroprotective growth factors and scavenging degenerated cells and tissues. We found that injection of a cytokine mixture (IL3 and GM-CSF) markedly ameliorated traumatic brain injury and Parkinson's disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2012年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：マクロファージ、マイクログリア、骨髄、分化多能性、神経細胞保護作用、単球

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞や脳損傷の傷害核心部では神経細胞は死滅しており、治療の対象とはならないという考えが普遍的であり、従って研究対象と

されることはほとんどなかった。我々は、この部分に集積しNG2コンドロイチン硫酸プロテオグリカンマクロファージ様細胞をBINCsと命名し、BINCsが脳保護的因

子を多種多量に産生、傷害拡大を防ぐ上で重要な役割を果たしていることを見いだした (Yokoyama et al. Glia 2006; Matsumoto et al. JCBFM 2008)。BINCs の類似細胞であるマイクログリアの多分化能は我々の研究 (Yokoyama et al. Glia 2004) が端緒となり世界的に注目されることとなった。また、NG2 陽性となったマイクログリアと同様に、BINCs には他の神経系細胞に変化する分化多能性を有することが明らかになった。

2. 研究の目的

BINCs の種々の性質を利用して、脳梗塞や脳損傷、脊髄損傷、脊髄虚血など重篤な急性中枢神経系病態の治療に役立てることが最大の目的である。そのために、BINCs の細胞系譜や病態脳での役割 (脳保護的か傷害的か) を明らかにする。さらに、関連細胞である、マイクログリアとの関連性に関する検討も進める。ヒト重症脳傷害においても BINCs は発現するのか、また高次機能予後との関連についても考察する。

3. 研究の方法

in vivo 研究

病態モデル:

- ① ラット右中大脳動脈一過性 (90 分) 閉塞による脳梗塞モデル
- ② ラット針刺し脳損傷モデル
- ③ ラット脊髄虚血モデル
- ④ 6-ヒドロキシドーパミンの右線条体への注入によるパーキンソン病モデル
- ⑤ 5 フルオロウラシル (5-FU) 腹腔内注入による BINCs 除去実験
- ⑥ BINCs の役割解明のための、脳梗塞巣への移植実験
- ⑦ 細胞起源追究のために、グリーンラット骨髄移植を行い、それらのラットを用いて脳・脊髄虚血を作成した
- ⑧ 脳梗塞後の減圧術で得られたヒト脳組織に対し、免疫組織化学的検索を行い、ヒト脳も BINCs は存在するかどうか検討する

病態モデル脳・脊髄解析の方法:

- ① 免疫組織化学: 細胞・タンパク質の動態解析
- ② immunoblotting による蛋白質の発現変動解析
- ③ リアルタイム RT-PCR による mRNA の発現変動の解析
- ④ 行動学的解析: オープンフィールドや回転棒試験、垂直に立てた金網の登攀時間測定

in vitro 研究

細胞培養

- ① BINCs 脳梗塞巣および脳損傷組織からの分離培養

- ② マイクログリア 出生直後ラット前脳から混合グリア培養を調製し、10 日後にマイクログリアを分離した。

- ③ in vitro 脳損傷実験: ラット新生仔大脳質細胞を、ポリ L リジンコートしたガラスカバースリップ上にまき、ピペットチップ先端で十字型、または一直線に細胞を傷つける。BINCs 添加や成長因子の有無によって、モノレイヤー上の傷が一定期間内にどの程度ふさがるかを検証した。

解析方法

- ① タンパク質および mRNA サンプルの調製
- ② 蛍光細胞染色
- ③ 移動度アッセイ: ケモカインやアストロサイトに対する移動度の解析
- ④ 細胞増殖アッセイ: 主にアラマーブルーを用いた。

4. 研究成果

BINCs の起源

脳マクロファージである、BINCs は脳内在性マイクログリアの活性化型か、血流中の単球に由来細胞であるかの議論があった。今回の我々の、グリーンラット骨髄移植ラットに対する、脳および脊髄虚血モデルで検討した結果、BINCs は骨髄由来の単球様細胞が脳傷害組織に浸潤してきた細胞であることが明らかになった。文献⑥⑩

BINCs の役割

- i) 脳梗塞発症 3 日目に 5FU を腹腔内投与すると、脳梗塞巣内で激しい増殖を開始している BINCs の大部分が死滅する。その結果脳梗塞ラットは、個体死が頻発した (対照群の死亡率 0 に対し、5FU 投与群では、9 匹中 6 匹が死亡した)
- ii) 脳梗塞発症 3 日目に 5FU を腹腔内投与した翌日、他の脳梗塞ラットより採取した BINCs を移植したところ、ラットの個体死は完全に抑止できた。
- iii) 分離培養 BINCs における神経保護因子の発現: PDGF-A、HGF、IGF-1 等神経保護に作用する増殖因子類を高レベルで発現していることをリアルタイム RT-PCR により示した。文献⑩

以上の結果から BINCs は基本的に重症脳傷害脳で脳保護的な役割を発揮しているものと結論した。

ヒトでの BINCs の存在

高齢女性小脳梗塞症例で、外減圧術を施行した小脳梗塞組織を用いて、免疫組織化学的検索を行ったところ、IGF-1 を発現する BINCs が集積していた。しかし、若いラット脳梗塞組織に比べると、高齢ヒト傷害脳での BINCs

の密度は極めて低かった。このことは、重症脳傷害における高次機能の予後は BINC_s の密度と比例することを示唆しているものと考えられた。文献⑩

BINC_s をターゲットとした治療薬の開発

BINC_s は骨髄由来であることが判明したため、骨髄造血系細胞の増殖を促進する成長因子類に対する受容体発現を検討した。その結果、BINC_s には、GM-CSF および IL-3 に対する受容体発現が高レベルであることが判明した。G-CSF、IL-3、GM-CSF、EGF 等を脳梗塞ラットに対し、皮下投与を行う予備実験を行ったところ、IL-3 と GM-CSF がある程度の改善効果を示した。

上記の *in vitro* 脳損傷実験を行ったところ、BINC_s 添加によって、傷口が縮小するが不完全であり、さらに単独添加ではなく IL3 と GM-CSF の混合物を添加すると傷口の縮小が顕著であることを見いだした。

この結果を受けて、5FU 注射を行い BINC_s 集積を抑制した針刺し脳損傷モデルラットに、IL3 と GM-CSF の混合物を皮下注射した。このモデルでは、5FU による BINC_s 集積抑制のため、概ね 50% のラットが死亡するが、IL3 と GM-CSF 注射は、この死亡率を 5% 程度にまで抑制した。文献⑧

IL3 と GM-CSF 注射は、マイクログリアの活性化が生じる 6-ヒドロキシドーパミンの右線条体への注入によるパーキンソン病モデルに対しても明らかな治療的効果を発揮した。このモデルでは、NG2 陽性マイクログリアが出現し、BINC_s 同様の脳あるいは神経細胞保護効果を発揮するものと考えられた。文献⑨

BINC_s の脳組織浸潤メカニズム

先に述べたように BINC_s は骨髄由来細胞であり、NG2 を発現しない血流中の単球様細胞が損傷脳組織に浸潤し、NG2 を発現するようになるものと考えられた。また、高齢者傷害脳での BINC_s 集積密度は低く、機能的予後を悪化させていると考えられた。集積密度低下の原因の一つとして、単球様細胞が傷害組織に浸潤する際の誘引因子発現に老化に伴う問題が生じている可能性がある。

そこで、我々は、単球様細胞が傷害脳組織に浸潤するメカニズムに関し、ケモカインに着目して検討を行った。脳虚血発症後約 24 時間の段階で、MCP-1 と Fractalkine の二種類の重要な単球誘引性ケモカインの発現が上昇していた。この発現は、24 時間後以降急激に減少した。BINC_s はこの二種のケモカインに対する受容体を高発現していた。実際に、この両ケモカインは、BINC_s に対して遊走を促進した。また、虚血脳において、MCP-1 は主に血管内皮細胞に、フラクタルカインは、

主に血管周囲のアストロサイトの終足に発現していた。これらの結果から、虚血に陥った組織の細小血管内皮細胞は MCP-1 を発現することで虚血再灌流後の単球の虚血組織周辺への集積を促す。同時に発現する PECAM や selectin 等の細胞接着因子により、虚血組織周辺血管内皮管腔側表面への単球様細胞の接着が生じる。血液脳関門の破綻と相まって、単球様細胞は内皮細胞間隙より流出するアストロサイト由来のフラクタルカインに向かって単球様細胞が遊走する。このようなメカニズムで、BINC_s 前駆細胞としての単球様細胞が脳傷害組織に浸潤すると考えられる。NG2 は、傷害組織で産生される TGF β 1 に暴露されることで、発現が誘導されると考えている (Sugimoto et al. 投稿準備中)。

BINC_s 前駆細胞の血流中からの浸潤には傷害内皮細胞やアストロサイトからのケモカインが重要な役割を果たすものと考えている。しかし、ケモカインの発現上昇はごく急性期に限られており、高齢者のように骨髄機能が低下し単球様細胞の動員が遅れると、虚血巣周辺でのケモカイン発現は消失しており、もはや病巣への浸潤ができない。高齢者脳で BINC_s の集積が悪い理由の一つは、ケモカインの一過性高発現にあると考えられる。

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 10 件)

全て査読有り

1. Expression of MCP-1 and fractalkine on endothelial cells and astrocytes may contribute to the invasion and migration of brain macrophages in ischemic rat brain lesions

Nari Tei, Junya Tanaka, Kana Sugimoto, Tasuku Nishihara, Ryutaro Nishioka, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Shirabe Matsumoto, Shiro Ohue, Hideaki Watanabe, Yoshiaki Kumon, Takanori Ohnishi
J Neurosci Res 91 (2013) 681-693

2. Anticonvulsive effect of paeoniflorin on experimental febrile seizures in immature rats: possible application for febrile seizures in children

Hitomi Hino, Hisaaki Takahashi, Yuka Suzuki, Junya Tanaka, Eiichi Ishii, Mitsumasa Fukuda

PLoS ONE 7 (2012) e42920.

doi: 10.1371/journal.pone.0042920

3 Zonisamide up-regulated them RNAs encoding astrocytic anti-oxidative and neurotrophic factors.

Choudhury ME, Sugimoto K, Kubo M, Iwaki H, Tsujii T, Kyaw WT, Nishikawa N, Nagai M, Tanaka J, Nomoto M,

Eur J Pharmacol 689 (2012) 72-80

4. Premetastatic vasculogenesis in oral squamous cell carcinoma xenograft-draining lymph nodes.

Mayorca-Guilliani AE, Yano H, Nakashiro KI, Hamakawa H, Tanaka J.

Oral Oncology 48 (2012) 663-670

5. Oct-3/4 promotes migration and invasion of glioblastoma cells.

Kobayashi K, Takahashi H, Inoue A, Harada H, Toshimori S, Kobayashi Y, Goto K, Sugimoto K, Yano H, Ohnishi T, Tanaka J.

J Cell Biochem 113 (2012) 508-517.

6. Transient ischemia-induced paresis and complete paraplegia displayed distinct reactions of microglia and macrophages.

Nakata T, Kawachi K, Nagashima M, Yasugi T, Izutani H, Ryugo M, Okamura T, Shikata F, Imagawa H, Yano H, Takahashi H, Tanaka J.

Brain Res 1420 (2011) 114-124

7. A cytokine mixture of GM-CSF and IL-3 that induces a neuroprotective phenotype of microglia leading to amelioration of (6-OHDA)-induced Parkinsonism of rats.

Choudhury ME, Sugimoto K, Kubo M, Nagai M, Nomoto M, Takahashi H, Yano H, Tanaka J.

Brain Behav 1 (2011) 26-43

8. Subcutaneous injection containing IL-3 and GM-CSF ameliorates stab wound-induced brain injury in rats.

Tasuku Nishihara, Michihisa Ochi, Kana Sugimoto, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Yoshiaki Kumon, Takanori Ohnishi, Junya Tanaka.

Exp Neurol 229 (2011) 507-516

9. Cancer stem-like cells of glioblastoma characteristically express MMP-13 and display highly invasive activity.

Inoue, A., Takahashi, H., Harada, H., Kohno, S., Ohue, S., Kobayashi, K., Yano, H., Tanaka, J., Ohnishi, T.

Int J Oncol 37 (2010) 1121-1131

10. Iba1⁺/NG2⁺ macrophage-like cells expressing a variety of neuroprotective factors ameliorate ischemic damage of the brain.

Anna Smirkin, Hiroaki Matsumoto, Hisaaki Takahashi, Akihiro Inoue, Masahiko Tagawa, Shiro Ohue, Hideaki Watanabe, Hajime Yano, Yoshiaki Kumon, Takanori Ohnishi and Junya Tanaka

J Cereb Blood Flow Metab 30 (2010) 603-615

[学会発表] (計 35 件)

1. Agents modulating neuroprotective and neurotoxic functions of microglia and their application to the pathologic brains

Junya Tanaka
第 90 回日本生理学会大会 2013. 3. 27-29、東京都

2. Response of glial cells in and around ischemic lesion of rats that were subjected to transient middle cerebral artery occlusion: the involvement of IL-18

Ayano Mise, Kana Sugimoto, Ryutarō Nishioka, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Junya Tanaka

第 90 回日本生理学会大会 2013. 3. 27-29、東京都

3. Invasion of monocytes/macrophages into ischemic lesion of rat brain: involvement of chemokines and their receptors

Yudai Ohara, Kana Sugimoto, Ryutarō Nishioka, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Nari Tei, Yoshiaki Kumon, Takanori Ohnishi, Junya Tanaka

第 90 回日本生理学会大会 2013. 3. 27-29、東京都

4. A cytokine mixture containing GM-CSF and IL-3 targeting microglia ameliorates neurological deficits of Parkinson's disease model rats

Junya Tanaka, Mohammed E. Choudhury, Kana Sugimoto, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano
第 89 回日本生理学会大会 2012. 3. 29-31、松本市

5. 脳梗塞巣に集積するマクロファージの役割とその治療的利用

田中潤也、杉本香奈、西原佑、高橋寿明、矢野元

第22回日本病態生理学会 2012. 8. 3-4、大分県由布市

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：『免疫細胞の活性化抑制剤およびその用途』

発明者：田中潤也

権利者：国立大学法人愛媛大学

種類：特許権

番号：特願2012-173405

出願年月日：平成24年8月3日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/kisogp/contents/laboratories>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 潤也 (Tanaka Junya)

愛媛大学・プロテオ医学研究センター・教授

研究者番号：70217040

(2) 研究分担者

矢野 元 (Yano Hajime)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00284414

高橋 寿明 (Takahashi Hisaaki)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20363228

杉本 香奈 (Sugimoto Kana)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00581034

(3) 連携研究者

大西丘倫 (Ohnishi Takanori)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70233210

久門良明 (Kumon Yoshiaki)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80127894