

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 25 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591262

研究課題名(和文)炎症性免疫応答を標的とする脳梗塞治療の研究

研究課題名(英文) Targeting inflammation-immune response as a novel strategy for the treatment of brain infarction

研究代表者

大星 博明(Ooboshi, Hiroaki)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10311838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：我々は最近、脳梗塞増悪過程におけるインターロイキン(IL) 23-17 axisの重要性を明らかにしている。本研究では、この上位シグナルについて遺伝子改変動物を用いて解析を行った。浸潤炎症細胞からのIL-23の放出に、Toll like受容体(TLR)であるTLR2およびTLR4が寄与すること、傷害脳組織から放出されてTLR2/4を刺激する物質が、従来抗酸化物質と認識されてきたperoxiredoxin familyであり、新規のdanger signalとして、脳虚血後の炎症惹起物質として働くことを示し、免疫担当細胞とそのメディエーターが脳梗塞治療の標的となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Immune responses following stroke continue to be an active area of investigation. Prior work has shown that lymphocytes lead to worsened outcome. However, the role of T lymphocyte subtypes has not been well studied. We have recently reported that the gamma-delta T cells can produce IL-17 following stimulation by macrophage derived IL-23. These cytokines appear to contribute negatively to stroke evolution, as mice deficient in these cytokines are protected. In this study, peroxiredoxin (Prx), an endogenous antioxidant, was identified as a danger signal. Prx is shown to induce IL-23 and leads to worsened stroke outcome through toll-like receptors-2 and -4 pathway. These findings show that Prx is a novel damage-associated molecular patterns (DAMPs) and inhibiting Prx appears to be protective.

研究分野：内科系臨床医学

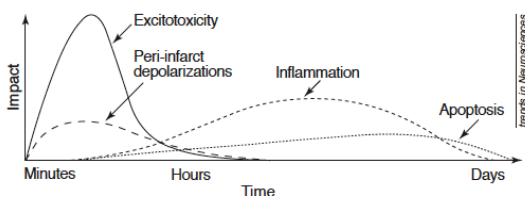
科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：脳梗塞 TLR DAMPs Peroxiredoxin マクロファージ インターロイキン23 インターロイキン17  
T細胞

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えてますます臨床的な重要性を増している脳血管障害であるが、その後遺症を軽減する画期的な治療法は未だ開発されていない。脳血管障害の7割を占めている脳梗塞は、急性期に拡大・増悪し、時に致死的状态をもたらすが、急性期脳梗塞における分子機構・シグナル伝達が明らかになりつつある。申請者はこれまでに、脳梗塞に対する新規治療法としての遺伝子治療の可能性を検討してきており、これまでの検討で、抗アポトーシス作用を有する midkine (Takada et al: Gene Ther 2005) や血液脳関門の破綻に寄与し vascular permeability factor でもある VEGF を阻害する sFlt-1 (Kumai et al: JCBFM 2007)などを脳虚血後に遺伝子導入し、脳梗塞発症後の治療であっても梗塞巣や脳浮腫を縮小することを示してきた。また、同様の手法を用い、白血球走化因子 MCP-1 の阻害物質(Kumai et al: JCBFM 2004)や広範な抗炎症作用を有する interleukin (IL)-10 (Ooboshi et al: Circulation 2005)の遺伝子導入が、脳梗塞を著明に縮小することを明らかとしてきた。これらの成果は、すなわち、神経のみを対象とする従来の薬物療法と比較して、炎症・免疫機構を標的とする遺伝子導入が画期的な脳梗塞治療効果を発揮すること、また、脳虚血発症後に脳血流以外の因子が脳梗塞を拡大・増悪させることを示唆している。また、他の研究者の報告でも、近年脳梗塞における免疫応答の重要性が報告され(図1)、特にT細胞の役割が注目され始めていた。

図1

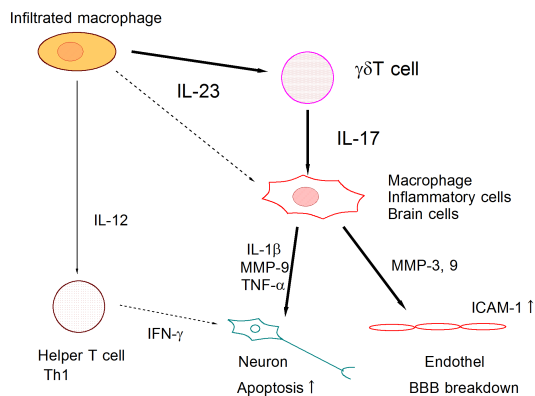


### 2. 研究の目的

脳梗塞における免疫応答の役割が注目されてきているが、我々は最近、脳梗塞増悪過程における IL-23-17 axis の重要性を明らかにしている。すなわち、IL-17 を産生する細胞が虚血脳で増加し、その浸潤には IL-23 の刺激が必要であること、IL-23 産生細胞が脳虚血後1日をピークに浸潤してくるマクロファージであること、また、IL17 産生細胞が当初想定された CD4 陽性 Th17 細胞ではなく、T 細胞であり、その浸潤が脳虚血後3日をピークとすること、さらに、脳虚血導入1日後からの治療開始による IL-17 の抑制であっても脳梗塞を縮小できることを報告している(図2)(Nat Med 2009)。

したがって、本研究では、遺伝子改変動物を用い、免疫学的ならびに分子生物学的手法を駆使して、脳梗塞における IL-23-17 axis の上流シグナルを中心とした免疫応答・炎症反応の詳細な機構と治療標的としての意義を探究することを目的とした。

図2



### 3. 研究の方法

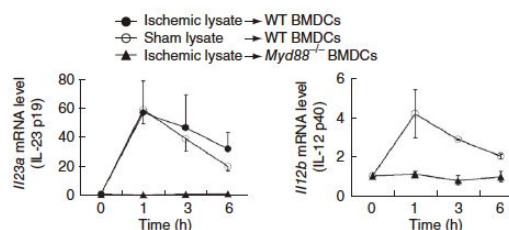
脳虚血の作製には、これまで遺伝子改変マウスで行って来た栓子閉塞による一過性中大脳動脈閉塞モデル(Nat Med 2009)を用いた。IL-23 産生細胞への刺激機構を解明する目的で、免疫担当細胞上のセンサーとして Toll 様受容体を想定した。その遺伝子欠損マウスから取り出した骨髄由来樹状細胞を用い、同細胞に IL-23 発現誘導をもたらす脳虚血由来物質の探索を行った。目的物質の同定には質量分析(LC/MS)などを用い、候補物質については、合成物による IL-23 誘導能を検討した。また、候補物質の脳虚血での発現動態を in vivo 脳虚血モデルで検討するとともに、阻害治療による効果も検討した。

### 4. 研究成果

#### TLR2/4 の脳梗塞増悪への影響

TLR2 よび TLR4 の遺伝子欠損マウスでは、脳虚血による組織障害および神経学的異常が野生型と比較し、有意に軽減していた。これら遺伝子改変マウスを用い、骨髄由来樹状細胞を虚血脳あるいは非虚血脳の抽出液で刺激すると、両者ともに IL-23 産生を誘導すること(図3)、その誘導は TLR2 および TLR4 に依存することを明らかにした。

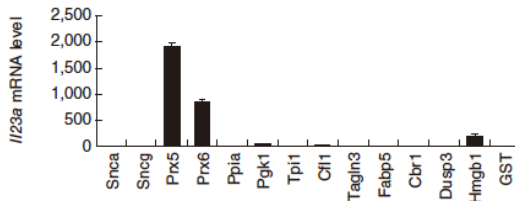
図3



### 新規 DAMPs の同定

熱処理や蛋白分解酵素処理で脳抽出液による IL-23 産生の活性は消失することなどから、15~25kDa のタンパクが活性化物質であること、質量分析による解析などから、活性化物質が抗酸化作用を有するタンパクとして知られるペルオキシレドキシン (peroxiredoxin: Prx) ファミリーであることを同定した(図 4)。

図 4

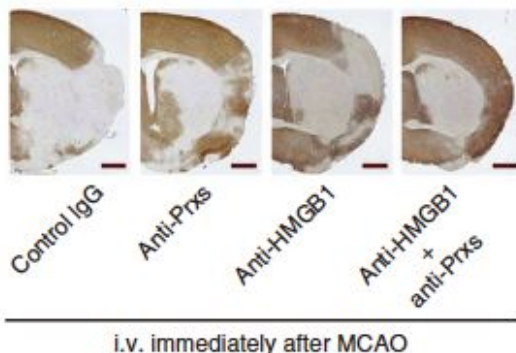


Prx はチオレドキシンとともに過酸化水素を中和し、以前はチオレドキシンペルオキシダーゼと呼ばれていた。Prx の含有量は特に脳組織で多く、細胞内に生じた活性酸素種である過酸化水素を分解することによって細胞を保護すると考えられてきた。脳虚血発症 12 時間後に脳梗塞巣で Prx が強く発現誘導することを確認したが、今回我々は新たに、脳虚血後に障害神経細胞内で発現した Prx が、細胞外に遊離すること、遊離した Prx は浸潤マクロファージに認識されること、Prx が TLR2 および TLR4 依存性に細胞障害を引き起こすことを示し、Prx が danger signal、すなわち、damage-associated molecular patterns (DAMPs) として機能し、浸潤免疫細胞の活性化により炎症を惹き起こすことを明らかにした。

### Prx 阻害による脳梗塞治療効果

Prx ファミリーは 1 から 6 まで存在し、Prx1 と Prx2 は特に構造相同性が高い。脳抽出液の検討から Prx5 と Prx6 が最も刺激活性が高く、Prx1,2 も活性を示すことが予想された。そこでこれらの抗体を作製し、治療効果を検討すると、脳虚血前の投与のみならず脳虚血後最大 12 時間での投与でも Prx 抗体による

図 5

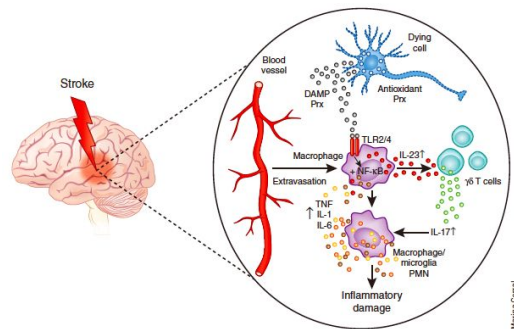


脳梗塞縮小効果が認められ、虚血後治療の効果は抗 HMGB1 抗体より有効であった。(図 5)

これらの成果については、研究者が日本側責任者として日米の第一線脳虚血研究者 30 名を招いて New Orleans で開催した Transpacific Workshop on Stroke で、講演発表を行った。

今回の研究で、本来脳保護的に働く抗酸化因子である Prx が、虚血障害が高度になると脳神経細胞から放出され、DAMPs として脳内に浸潤したマクロファージを TLR 依存的に活性化し、さらなる組織傷害に寄与することを明らかにした(図 6)。

図 6



マクロファージが産生する IL-23 は、マクロファージに遅れて脳内に浸潤する T 細胞に作用して IL-17 の産生を誘導することにより、亜急性期の免疫応答も制御する。このような炎症性免疫応答のメカニズムをさらに解明し、特異的な治療標的を明らかにすることは、脳梗塞の新規治療法の開発に結びつくものと期待される。

### 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 13 件)

1. Yamada S, Tokumoto M, Tatsumoto N, Taniguchi M, Noguchi H, Nakano T, Masutani K, Ooboshi H, Tsuruya K, Kitazono T: Phosphate overload directly induces systemic inflammation and malnutrition as well as vascular calcification in uremia. *Am J Physiol Renal Physiol* 査読有り 2014 in press,
2. Wakisaka Y, Ago T, Kamouchi M, Kuroda J, Matsuo R, Hata J, Gotoh S, Isomura T, Awano H, Suzuki K, Fukuda K, Okada Y, Kiyohara Y, Ooboshi H, Kitazono T; REBIOS Investigators. Plasma S100A12 is associated with functional outcome after ischemic stroke: Research for Biomarkers in Ischemic Stroke. *J Neurol Sci* 査読有り 340:75-9, 2014
3. Kiyohara T, Kamouchi M, Kumai Y, Ninomiya T, Hata J, Yoshimura S, Ago T, Okada Y,

- Kitazono T; Fukuoka Stroke Registry Investigators (Ooboshi H). ABCD3 and ABCD3-I scores are superior to ABCD2 score in the prediction of short- and long-term risks of stroke after transient ischemic attack. *Stroke 査読有り* 45: 418-25, 2014
4. Ishitsuka K, Kamouchi M, Hata J, Fukuda K, Matsuo R, Kuroda J, Ago T, Kuwashiro T, Sugimori H, Nakane H, Kitazono T; FSR Investigators (Ooboshi H): High blood pressure after acute ischemic stroke is associated with poor clinical outcomes: Fukuoka Stroke Registry. *Hypertension 査読有り* 63: 54-60, 2014
  5. Namura S, Ooboshi H, Liu J, Yenari MA: Neuroprotection after cerebral ischemia. *Ann N Y Acad Sci 査読有り* 1278: 25-32, 2013
  6. Abe K, Uchiyama S, Matsubara E, Muramatsu S, Atsuta N, Kitagawa K, Iguchi Y, Ooboshi H, Kaji R, Terao Y: IT network establishment for neuropatients. *Rinsho Shinkeigaku 査読有り* 53:1155-8, 2013
  7. Yamada S, Tokumoto M, Ohkuma T, Kansui Y, Wakisaka Y, Uchizono Y, Tsuruya K, Kitazono T, Ooboshi H: Slowly progressive and painless thoracic aortic dissection presenting with a persistent Fever in an elderly patient: the usefulness of combined measurement of biochemical parameters. *Case Rep Med 査読有り* doi: 10.1155/2013/498129, 2013
  8. Shichita T, Ago T, Kamouchi M, Kitazono T, Yoshimura A, Ooboshi H: Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke. *J Neurochem 査読有り* 123S2: 29-38, 2012
  9. Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, Sekiya T, Ooboshi H, Kitazono T, Yanagawa T, Ishii T, Takahashi H, Mori S, Nishibori M, Kuroda K, Akira S, Miyake K, Yoshimura A: Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med 査読有り* 18: 911-7, 2012
  10. Arimura K, Ago T, Kamouchi M, Nakamura K, Ishitsuka K, Kuroda J, Sugimori H, Ooboshi H, Sasaki T, Kitazono T: PDGF receptor  $\beta$  signaling in pericytes following ischemic brain injury. *Curr Neurovasc Res 査読有り* 9: 1-9, 2012
  11. Kuwashiro T, Sugimori H, Ago T, Kamouchi M, Kitazono T; FSR Investigators (Ooboshi H): Risk factors predisposing to stroke recurrence within one year of non-cardioembolic stroke onset: the Fukuoka Stroke Registry. *Cerebrovasc Dis 査読有り* 33:141-9, 2012
  12. Kamouchi M, Matsuki T, Hata J, Kuwashiro T, Ago T, Sambongi Y, Fukushima Y, Sugimori H, Kitazono T; FSR Investigators (Ooboshi H): Prestroke glycemic control is associated with the functional outcome in acute ischemic stroke: the Fukuoka Stroke Registry. *Stroke 査読有り* 42: 2788-94, 2011
  13. Ooboshi H: Gene therapy as a novel pharmaceutical intervention for stroke. *Curr Pharm Des 査読有り* 17: 424-33, 2011
- [学会発表](計 12 件)
1. Nakamura K, Ago T, Arimura K, Makihara N, Nishimura A, Matsuo R, Kuroda J, Wakisaka Y, Isomura T, Awano H, Suzuki K, Okada Y, Kamouchi M, Kiyohara Y, Ooboshi H, Kitazono T: Basic fibroblast growth factor after ischemic stroke in diabetic patients - Research for Biomarkers in Ischemic Stroke (REBIOS) -. International Stroke Conference 2014, Feb 12, 2014, San Diego, USA
  2. Nakamura K, Arimura K, Ago T, Makihara N, Isomura T, Watabe W, Awano H, Suzuki K, Kamouchi M, Kiyohara Y, Ooboshi H, Kitazono T: The expression of pericyte PDGFR $\beta$  is regulated by basic FGF after ischemic stroke - Research for Biomarkers in Ischemic Stroke (REBIOS) -. Neuroscience Meeting 2013, Nov 9, 2013, San Diego, USA
  3. Yamada S, Tokumoto M, Taniguchi M, Tsuruya K, Ooboshi H, and Kitazono T. Phosphate overload induces systemic inflammation, malnutrition, and vascular calcification in uremia. *ASN Kidney Week 2013, Nov 8, 2013, Atlanta, USA*
  4. Tokumoto M, Yamada S, Fujino T, Tsuruya K, Kitazono T, Ooboshi H: The combined therapy with calcitriol and a calcimimetic agent, R568, ameliorates phosphorus-induced calcification with altered expression of SIRT1 and ALP in human vascular smooth muscle cells. *ASN Kidney Week 2013, Nov 8, 2013, Atlanta, USA*
  5. 中村晋之、吾郷哲朗、有村公一、牧原典子、粟野秀人、鈴木一夫、清原裕、鴨打正浩、大星博明、北園孝成: . 脳梗塞発症後の糖尿病患者における basic FGF の上昇: Research for Biomarkers in Ischemic Stroke (REBIOS). 日本脳循環代謝学会総会, 2013年11月1日, 札幌
  6. 脇坂義信、吾郷哲朗、鴨打正浩、磯村哲、粟野秀人、鈴木一夫、岡田靖、清原裕、大星博明、北園孝成: . 脳梗塞後の S100A12 血漿濃度は昨日予後不良と挿管する: Research for Biomarkers in Ischemic Stroke. 第38回日本脳卒中学会総会, 2013年3月21日, 東京
  7. Wakisaka Y, Ago T, Kamouchi M, Kuroda J, Matsuo R, Gotoh S, Watanabe W, Isomura T, Awano H, Suzuki K, Fukuda K, Okada Y, Kiyohara Y, Ooboshi H, Kitazono T. Extracellular newly identified receptor for advanced glycation endproducts binding protein (EN-RAGE) predicts the outcome in patients with acute ischemic stroke: Research for Biomarkers in Ischemic Stroke.

- International Stroke Conference 2013 , Feb 6, 2013, Honolulu, USA
8. Hiroaki Ooboshi: Innate immunity as a novel therapeutic target of brain infarction. Transpacific Workshop o Stroke, Oct 18, 2012, New Orleans, USA
  9. 大星博明: Immune response as a novel therapeutic target of brain infarction. 第 44 回日本動脈硬化学会, 2012 年 7 月 19 日, 福岡
  10. Shichita T, Ooboshi H, Takada I, Ishii T, Kuroda K, Miyake K, Yoshimura A: IL-23 production from infiltrating macrophage in the ischemic brain is dependent on TLR signaling pathway. XXVth International Symposium on Cerebral Blood Flow and Metabolism (Brain 2011) , May 27, 2011, Barcelona, Spain
  11. Ooboshi H: Innate immune response as a novel therapeutic target of brain infarction. First Turkish International Stroke Meeting. Oct 2, 2011, Antalya, Turkey
  12. 七田崇、大星博明、北園孝成、石井哲郎、黒田和道、三宅健介、審良静男、吉村昭彦: T 細胞と脳虚血後炎症. 第 23 回日本脳循環代謝学会, 2011 年 11 月 5 日, 東京

〔図書〕(計 2 件)

1. Ooboshi H, Ishikawa E, Takada J, Shichita T, Kumai Y: Springer Science. Midkine gene transfer in brain infarction. Chap 13, Midkine: From Embryogenesis to Pathogenesis and Therapy. 2012, total page 380
2. 大星博明: 中山書店. 無症候性脳出血と microbleeds. 脳血管障害の治療最前線. pp312-317. 2014, 総ページ数 436

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大星 博明 (Ooboshi Hi roaki )

研究者番号 : 10311838

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし