

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659688

研究課題名（和文）重症脳傷害治療のために病巣核心部に移植すべき細胞種を決定する

研究課題名（英文）Determination of cell type(s) that should be transplanted into lesion core of the brain for better outcome

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・脳外傷などの重症脳傷害治療のために病巣核心部に移植すべき細胞種を決定するために、培養アストロサイト、マイクログリア、脳傷害核心部に集積するマクロファージなど脳傷害組織核心部への移植を試みた。しかしながら、同系動物由来の培養細胞の移植によっても拒絶反応は強く、多くの移植細胞がマクロファージによって食食除去されてしまった。それに対し、脳梗塞巣から分離培養した骨髄由来のマクロファージ BINC_s (Brain Iba1⁺/NG2⁺ Cells) は、食食除去されることが少なく、脳梗塞巣の予後改善に結びついた。

研究成果の概要（英文）：

To determine cell type(s) that should be transplanted into the lesion core of ischemic and traumatic brain injuries with an aim to ameliorate the outcomes, several kinds of cultured neural cells including microglial cells, astrocytes, and brain macrophages isolated from ischemic lesion core of rat brains. Consequently, it was found that most of transplanted cells were eliminated by phagocytic macrophages in spite of the isotransplantation. Only BINC_s were transplantable into the ischemic core, and their transplantation may be appeared therapeutically effective.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳梗塞、脳損傷、アストロサイト、マイクログリア、細胞移植、マクロファージ、骨髄、BINC_s

1. 研究開始当初の背景

甚大な脳傷害に対して、iPS細胞やES細胞を用いた幹細胞移植治療に期待が持たれている。しかし、万能性幹細胞移植には常に腫瘍発生の危険が伴うほか、想定した細胞に分化しうるかどうか明らかではない。また分化細胞を移植する場合に何を移植すべきかも不明である。神経幹細胞など多能性組織幹細胞

移植の有効性もはっきりしていない。一方、最近我々は、骨髄由来の特殊なマクロファージ様細胞 BINC_s (Brain Iba1⁺/NG2⁺ Cells) を移植すると、重症ラット脳梗塞の予後が大きく改善することを明らかにした [Smirkin et al. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism (2010) 30: 603-615]。なお、脳梗塞巣の BINC_s については Matsumoto et al.

JCBFM (2008) 28: 149-163/損傷脳組織における BINCs は Yokoyama et al. GLIA (2006) 53: 754-768 に詳述している。

2. 研究の目的

梗塞や外傷による重症脳傷害では大きな脳組織欠損を生じ、生命維持が困難となる。たとえ生存を確保できたとしても、機能的予後はきわめて悪い。このような重症症例に対して、細胞移植療法が考えられる。本研究では、骨髄由来マクロファージ様細胞 BINCs、神経幹細胞、神経細胞、アストロサイト、マイクログリアなどを脳組織欠損部位に注入移植し、その治療効果を定量する。

この研究は、近未来において iPS 細胞などの万能性幹細胞の利用が可能になったとき、腫瘍形成などの危険性がある万能細胞そのものの利用と、分化細胞の利用とどちらが良いのか、の判断根拠を与え、分化細胞ではどの細胞を選ぶべきかについても重要な情報を与えることを目的とする。

3. 研究の方法

脳組織内細胞移植をする場合、健常脳組織はもちろん、たとえ梗塞や損傷による傷害脳組織であっても細胞密度はかなり高く、そのまま細胞を注入移植することは組織傷害を拡大させてしまい、その治療効果の判定は困難である。我々は、重症脳傷害組織には発症約 24 から 48 時間後に単球様細胞が浸潤して BINCs となり [Matsumoto et al. J Neurosci Res, 2007]、その後激しく増殖、7 日後をピークに顕著に傷害組織に集積充満することを見いだしてきた [Yokoyama et al. Glia, 2006; Matsumoto et al. JCBFM, 2008]。この強い増殖性のため、梗塞あるいは損傷発症後 48 時間で抗癌剤である 5-フルオロウラシル (5FU) を腹腔内投与すると、BINCs の多くが死滅した。その結果、傷害組織は顕著に拡大し、細胞密度は低下、空洞化する [Smirkin et al. 2010 JCBFM]。ヒト高齢者脳梗塞巣にも BINCs は集積するが、若い動物モデルと異なりその密度は著しく低い。そのため、5FU モデルがむしろヒトの病理像に近いことが示されている [Smirkin et al. JCBFM, 2010]。

4. 研究成果

重症脳梗塞巣への BINCs の移植が機能的・形態的予後を改選できることが明確になったが、マイクログリアやアストロサイト、神経幹細胞などの移植では、何ら改善が見られず、移植細胞の殆どが、骨髄由来マクロファージによって貪食されてしまうことが判明した。BINCs は高い貪食能によって、死細胞や変性組織を貪食し、多種多様な成長因子類の分泌によって組織の修復再生を促しているもの

と思われた。

しかしながら、BINCs は重篤で大きな脳症外装にのみ集積する細胞であり、iPS や ES 細胞からどのようにして誘導できるのか全く不明である。そこで、本研究では、BINCs の能力を最大限に引き出すことを目的とする薬物治療法の開発研究も同時に行った。BINCs 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、BINCs 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、BINCs 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 BINCs 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 BINCs 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。

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、BINCs 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。

BINCs 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と考えられる。また、高齢者傷害脳での BINCs 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、血流中の単球様細胞が傷害脳組織に浸潤するメカニズムを解明し、その浸潤を促進することで脳病巣の再生修復を促進することを考えた。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。BINCs 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、BINCs 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、BINCs 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)。

BINCs 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 BINCs 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 8 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, Eiiichi 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-Guiliani 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

[学会発表] (計 25 件) うち主なもの 5 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, Ryutaro 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, Ryutaro 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. 8. 3-4、大分県由布市

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