

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 8月31日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890113

研究課題名（和文）中枢神経損傷後の獲得免疫系の機能とその制御による治療

研究課題名（英文）Functions of adoptive immune system after injury of the central nervous system and immunomodulatory treatment

研究代表者

石井 宏史（ISHII HIROSHI）

大阪大学大学院・医学系研究科・助教

研究者番号：90634171

研究成果の概要（和文）：我々は、意外にも炎症性の Th1 細胞投与により、脊髄損傷後の機能回復が促進されることを示した。そして Th1 細胞のインターフェロン γ の発現および損傷部のミクログリア・マクロファージから上昇するインターロイキン 10(IL-10)の分泌、そして Th1 細胞から分泌される IL-10 が機能回復の促進効果に必要であることを証明した。

研究成果の概要（英文）： We demonstrated that transfer of proinflammatory Th1 cells unexpectedly promoted functional recovery after spinal cord injury (SCI). The effects of Th1 cells depended on expression of *interferon- γ* in Th1 cells as well as interleukin 10 (IL-10) up-regulation from microglia and macrophages in the injured site. In addition, genetic deletion of IL-10 from Th1 cells abrogated complete effects of Th1 cell transfer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2013年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

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：中枢神経損傷、獲得免疫系、Th1 細胞、ミクログリア、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷や脳挫傷と言った中枢神経の外傷後に、神経再生そして顕著な機能回復をすることは極めて困難である。中枢神経の外傷後に起こる免疫反応は神経再生および機能回復の妨げになると考えられて来た。ところが近年、自己反応性Tリンパ球の投与や活性化により、中枢神経損傷後の機能回復が改善すると報告されている。驚くべきことに、本来は多発性硬化症等の自己免疫性疾患を起こす病原性と考えられてきたリンパ球が、中枢神経外傷後に神経保護作用を示すことが報告された。一方、同様の研究で反対の結果、即ち神経にとって有害であったとする報告もある。しかし、Tリンパ球がどのような条件下で中枢神経外傷後に有益、あるいは有害であるか詳細は未解明であった。予備的に我々は炎症性のTh1細胞が脊髄損傷後に治療効果を示すことを発見した。

2. 研究の目的

(1) 中枢神経損傷後に治療効果を持つTh1細胞の作用機序を同定する。

①脊髄損傷モデルマウスへのTh1細胞投与による神経回路への影響を明らかにする。

②①における脊髄損傷後のミクログリア・マクロファージへの影響を示す。

③Th1細胞による脊髄損傷後における治療効果の分子機構を解明する。

(2) マウス脊髄損傷後の生体内のThの偏向性の解明とその制御による治療効果の検証

①急性期から亜急性期に損傷部に集積するTリンパ球のサブタイプの同定する。

②①から分かるTリンパ球の阻害による組織と機能への影響を解明する。

③脊髄損傷後に生体内をTh1に偏向させることによる治療効果を検証する。

④損傷中枢神経内のミクログリアが発現す

る神経再生阻害因子であるRGMaによるTh偏向性の制御機構の解明

3. 研究の方法

(1) ①脊髄損傷後にTh1細胞を腹腔内投与した後の慢性期における、運動機能を司る皮質脊髄路を可視化する。

②免疫組織学染色、フローサイトメトリーにより損傷脊髄内の集積ミクログリア・マクロファージの性状を同定する。

③インターフェロン γ (ifn- γ)ノックアウトマウス由来のTh1細胞の投与実験、インターロイキン10 (IL-10)中和抗体の髄空内投与、およびIL-10ノックアウトマウス由来のTh1細胞の投与実験を行う。

(2) ①細胞内サイトカイン染色を含めたフローサイトメトリー法により同定する。

②①により同定されたTリンパ球を特異的に阻害するノックダウン実験、中和抗体投与実験を施行する。

③中和抗体や薬剤を用いて脊髄損傷後に生体をTh1へ偏向させると治療効果が得られるかを検証する。

④脊髄損傷モデルマウスにRGMa中和抗体やミクログリア特異的shRNAによりRGMaを抑制した場合に集積T細胞の性状をフローサイトメトリーにより解析する。

4. 研究成果

治療効果のあるTh1細胞投与群の損傷脊髄組織を解析した結果、対照群に比べて運動機能を司る皮質脊髄路と縫線核脊髄路の再構成が促されており運動機能の改善を反映するものであった。GFAP染色によるグリア瘢痕の比較においては差がなかったが、ミエリン染色により脊髄損傷後のミエリン化がTh1細胞投与により、良く保たれることが分かった。また損傷脊髄に集積する免疫細胞について特にミクログリア、マクロファージをフ

ローサイトメトリーにより解析した結果、神経保護作用があると知られている M2 型ミクログリア/マクロファージが Th1 細胞投与により増加している (M2 マーカーの CD206, Arg1 陽性細胞の増加) ことが分かった。ここで M2 サブタイプのマーカーであり、組織保護作用を持つと言われているサイトカインである IL-10 が損傷部のミクログリア/マクロファージからの分泌されることが分かった。1

さらに Th1 細胞の治療効果の分子機構を探索した結果、Th1 細胞からの $\text{ifn-}\gamma$ の発現が機能回復促進に必要である事が分かった。一方、Th1 細胞の投与により、損傷脊髄内のマクロファージ・ミクログリアから神経保護作用を持つ IL-10 の分泌が $\text{ifn-}\gamma$ 依存的に促進されることが分かった。この IL-10 の上昇を髄空内へ IL-10 中和抗体を投与することにより抑制した結果、機能回復が部分的に阻害されたために、Th1 細胞投与による機能回復へ寄与することが分かった。また、投与した Th1 細胞自体が $\text{ifn-}\gamma$ 依存的に IL-10 を大量に分泌していることが分かり、IL-10 ノックアウトマウス由来の Th1 細胞を脊髄損傷モデルマウスに投与すると治療効果が消失したために、Th1 細胞の分泌する IL-10 が機能回復にとって必要であることが分かった (図 1)。



(2) ①脊髄損傷後の集積 T リンパ球の性状を細胞内サイトカイン染色を用いてフローサイトメトリーにより解明しようと試みた。しかし集積細胞数がミクログリア・マクロファージなどの単球系細胞と比べると 2 桁レ

ベルで数が少ないために困難を極めたために詳細な、性状の解明には至らなかった。従って②、③の実験へと進めることが出来なかった。

④脳挫傷モデルマウスを用いて、共同研究者の大学院生とともに探索中である。

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 2 件)

1. **Ishii H**, Tanabe S, Ueno M, Kubo T, Kayama H, Serada S, Fujimoto M, Takeda K, Naka T, and Yamashita T. Interferon-gamma-dependent secretion of IL-10 from Th1 cells and microglia/macrophages contributes to functional recovery after spinal cord injury. Cell Death and Disease, Nature Publishing Group, 4:e710, 2013.
2. **Ishii H**, Jin X, Ueno M, Tanabe S, Kubo T, Serada S, Naka T, Yamashita T. Adoptive transfer of Th1-conditioned lymphocytes promotes axonal remodeling and functional recovery after spinal cord injury. Cell Death and Disease, Nature Publishing Group, 3:e363, 2012.

[学会発表] (計 1 件)

Ishii H, Kubo T, Naka T, Yamashita T, IFN- γ and IL-10 are required for neuroprotection by Th1 cells after spinal cord injury. Neuroscience 2012 (New Orleans, LA, USA), Society for Neuroscience. Daily Books Book Six, page 43 (October 17, 2012)

〔図書〕（計 0 件）

〔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

大阪大学大学院医学系研究科分子神経科学

ホームページ

www.molneu.med.osaka-u.ac.jp

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 宏史 (ISHII HIROSHI)

大阪大学大学院・医学系研究科・助教

研究者番号：90634171