

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861719

研究課題名(和文) 頭部外傷後の脳浮腫進行におけるVEGF, MMP-9の役割に関する研究

研究課題名(英文) Matrix metalloproteinases-9 and VEGF in edema after traumatic brain injury in mice

研究代表者

細見 早苗 (Hosomi, Sanae)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：90644005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、脳浮腫に関わるメディエーターとしてmatrix metalloproteinase (MMP)-9の役割が重要視されている。しかし、頭部外傷後に、どのような機序でMMP-9が損傷周囲に上昇するのか、よく解明されていない。我々は、脳挫傷マウスモデルを用いて、挫傷後の脳内細胞と血中細胞をフローサイトメトリーで解析し、どのような特徴を持つ細胞がMMP-9を分泌しているかを同定することを目的とした。これまで、脳内の細胞がMMP-9を分泌すると考えられていたが、我々の研究により骨髄由来抑制細胞(CD11b+/Gr-1hi)と呼ばれる細胞がMMP-9を分泌していることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Many basic and clinical studies suggest the strong relationship between MMP-9 and brain edema. However, detailed information regarding MMP-9 secretion after blunt TBI is still unavailable. In this study, we analyzed what type of immune cells expresses MMP-9 in the injured brain using CCI model mice. MMP-9 is secretor enzyme, and both microglia and macrophages have same antigen, so traditional immunohistochemistry analysis can't quantify what type of immune cells secrete MMP-9. That is why we used flow cytometry intracellular analysis. MMP-9 positive cells are detected in the injured brain over 7days, but not sham mice. And these MMP-9 positive cells are positive both CD11b+/Gr-1hi. We confirmed these cell sorted by FACS inhibited T cell proliferation in vitro. In conclusion, cells expressed MMP-9 after TBI are myeloid-derived suppressor cells accumulated in the injured site but not resident immune cells in the brain.

研究分野：頭部外傷後の炎症制御

キーワード：脳浮腫

1. 研究開始当初の背景

頭部外傷後の脳浮腫進行は、しばしば脳ヘルニアという不可逆性変化を引き起こす。高度脳浮腫併発例の死亡率は高く、また生存しえたとしても後遺症のため社会復帰の可能性が低くなる。頭蓋内損傷に伴う脳浮腫は、血管原性浮腫(vasogenic edema)と細胞毒性浮腫(cytotoxic edema)の2つに大きく分類される。vasogenic edemaは血液脳関門(blood brain barrier:BBB)の破綻により、血漿成分と共に水分が血管外の細胞間隙へ漏出して起こる現象であり、cytotoxic edemaは主にイオンポンプ機能不全により神経細胞や特にグリア細胞の細胞質に水が貯留し、細胞が腫脹する浮腫である。外傷や脳虚血の際に急速に進行し、生命の危険を招く浮腫はvasogenic edemaが主因と考えられており、vasogenic edemaの有効な治療法の開発が急務と考えられる。

近年、頭部外傷後の脳浮腫 vasogenic edemaに関わるメディエーターの候補が同定されつつある。vascular endothelial growth factor (VEGF)は血管透過性を亢進する因子であり、治癒過程では血管内皮細胞を活性化し血管新生を促す。matrix metalloproteinase (MMP)は基底膜タンパク質を融解する一群の酵素であり、Type4 コラーゲン、フィブリノゲン、ラミニンを融解して内皮細胞の接着を分解し血液脳関門を破壊し、血管透過性を亢進する。重症頭部外傷患者の血清もしくは脊髄液中の VEGF および MMP-9 が正常人よりもはるかに高値を示すことが報告されている。しかしながら、これらの因子の発現機序、産生部位などは未だ解明されていない。我々は脳挫傷後に血腫周囲の脳浮腫形成が急速に進行した症例において、開頭手術を行い脳内血腫を除去し、血腫中の VEGF、MMP-9 を測定したところ、異常高値を示したことを世界に先駆けて報告した。これらの発見を通じて、我々は挫傷内血腫とダメージを受けた周囲の脳挫傷組織の相互的炎症反応の誘導により血腫中の VEGF、MMP-9 が産生され、これが脳浮腫を悪化させるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、頭部外傷後の脳浮腫の形成に関して、損傷をうけた中枢神経系細胞と血腫との関連性を解明することで、頭部外傷後の炎症反応における新たな治療法を開発することである。以下の2点に絞り研究を実施した。

脳挫傷マウスモデルを用いて、挫傷後に脳に浸潤してくる免疫細胞と血中で増加する免疫細胞をフローサイトメトリーで解析し MMP-9 分泌細胞を同定する。MMP-9 分泌細胞の浸潤を阻害することで、脳内炎症が抑えられるか TSPO-PET を用いて in vivo で可視化し評価する。

当救命救急センターに搬送された重症

単独脳挫傷患者から検体を採取し、ヒトでの挫傷内血腫での MMP-9 の発現機序を調べる。

3. 研究の方法

動物実験に関しては、大阪大学医学部附属動物実験施設運営委員会の承認を得て、大阪大学動物実験規定に準じて行った。

臨床研究に関しては、大阪大学医学部附属倫理委員会の承認を得て行った。

(1) 基礎実験プロトコール

実験モデル

すでに鈍的頭部外傷モデルとして確立されている Controlled cortical impact (CCI) モデルを用いた。C57/BL6J マウス 8-10 週齢雄を三種混合麻酔(メドミジン 0.3 mg/kg、ミタゾラム 4.0 mg/kg、ブトルファノール 5.0 mg/kg)を腹腔内投与し全身麻酔を行い、impactor (Amsci Instruments)で左側大脳皮質に挫傷(深さ 1.0mm、速度 4.0-4.5m/s、時間 120ms)を作製した。sham 群は脳損傷以外の同様の手術を行った。

組織学的評価

損傷後1日目に挫傷脳のパラホルムアルデヒドによる灌流固定標本を作製し、薄層切片を免疫染色 Gr-1 (R&D 1:500)、Iba-1 (Wako 1:250)、ギムザ染色を行い、浸潤細胞を評価した。

フローサイトメトリー

損傷後1日、7日、28日において挫傷脳の大脳皮質を摘出し、コラゲナーゼ D (2.5mg/ml, BD bioscience)で処理後、70 μM のナイロンセルストレイナーで濾過した。試験官の上層に 30%パーコールに懸濁した細胞を、下層に 70%パーコールを入れ、2000rpm で 20 分間で遠心後、中間層を回収した。また同時に血液を採取し、溶血処理を行った後、遠心で細胞を回収した。回収した細胞を Fixation/Permeabilization Buffer (eBioscience)で固定・細胞膜透過を行った。-mouse MMP 抗体で反応させた後、2次抗体として F goat IgG で細胞内染色を行うとともに、CD45、CD11b、Gr1 抗体で細胞表面染色を行い、BD FACS Canto で解析した。アイソタイプコントロールとの比較を行った。

T 細胞抑制試験

健常マウスと損傷後1日目のマウスから脾臓を摘出し、分離した細胞を 7AAD、CD11b、Gr1 で細胞表面染色を行ったあと、BD Aria で生細胞をゲーティングし Gr-1+CD11b+細胞のソーティングを行った。別の個体の脾臓から CD4 陽性 T 細胞を同様に回収し、Gr-1+CD11b+細胞と 2 日間の共培養したのち、CD4 陽性細胞の増殖能を BrdU キット (BD bioscience) を用いて評価した。

TSPO - PET を用いた評価

抗 Gr-1 抗体 (clone RB6-8C5, BD bioscience) を損傷後 2 時間、1/2/3/4 日目に 100 μ g/日を腹腔内投与し、7 日目にイソフレン吸入麻酔下で、TSP0-PET を測定した。対照群にはアイソタイプコントロールを同様の方法で投与した。放射線リガンドとして [18F]DPA-714 を使い、小動物用 PET/CT (Inveon PET/CT, Siemens) で撮影した。PET 撮像は [18F]DPA-714 静脈注射の 20 分後から (10 分間かけて) 行った。PET/CT 画像で挫傷脳に関心領域を設定し、SUV (standardized uptake value) を計算した。

(2)

当センターに搬送された脳挫傷の単独頭部外傷のうち単独頭部重症外傷の患者から、血液を採取し、溶血処理を行った後 CD11b/CD14/CD33 抗体を用いてフローサイトメトリーで解析した。

4. 研究成果

損傷脳の肉眼的変化を Fig1 に示す。損傷後 1 日目には挫傷部は血腫を伴っていた。これをギムザ染色したところ、多数の多核球細胞挫傷部に浸潤していることがわかった (Fig1B)。Fig1C に損傷後 1 日目に大脳皮質における、Iba-1 抗体 (ミクログリア・マクロファージのマーカ―) と Gr-1 抗体の免疫染色の結果を示す。損傷後 1 日目の挫傷部位に、脳内の免疫細胞であるミクログリアではなく、主に BBB の破壊に伴い末梢循環から脳に浸潤してきた好中球、マクロファージが集積することを組織学的に確かめた。

Fig.1

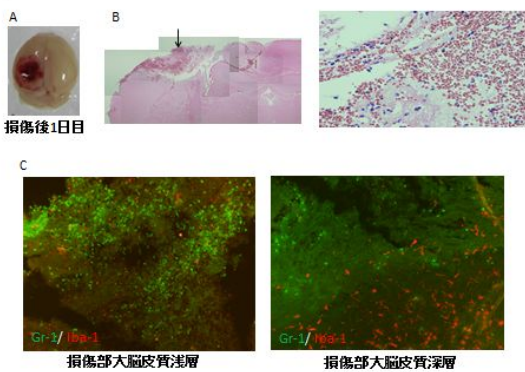
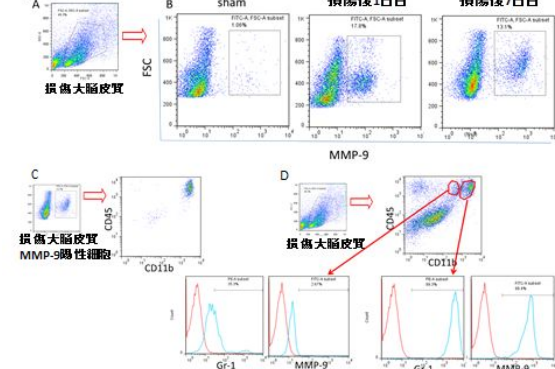


Fig.2 に損傷脳の MMP-9 陽性細胞の経時変化を示す。sham ではほとんど MMP-9 陽性細胞は存在しなかった (Fig.2A)。MMP-9 陽性細胞は損傷後 1 日目をピークに減少していった (Fig.2B)。次に挫傷後、脳内で MMP-9 を分泌する細胞を同定した。損傷脳の MMP-9 陽性細胞は CD11b (骨髄系細胞マーカ―) と CD45 (白血球抗原マーカ―) のどちらも陽性だった。 (Fig.2C)。脳組織をフローサイト解析では、ミクログリア (CD11b^{lo}/CD45⁺)、白血球 (CD11b^{hi}/CD45⁺)、リンパ球 (CD11b⁻/CD45⁺) は

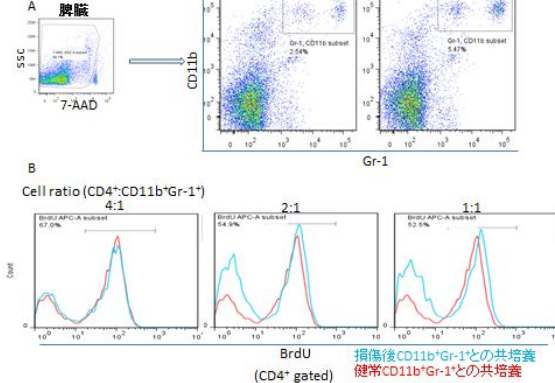
それぞれの細胞群に分かれる。MMP-9 陽性であった CD11b^{hi}/CD45⁺細胞集団のうち、左の細胞集団をゲートすると、Gr-1^{lo}であり、MMP-9 は陰性だった。右の細胞集団をゲートすると、Gr-1^{hi}であり、MMP-9 は陽性だった (Fig.2D)。

Fig.2



骨髄由来抑制細胞 (Myeloid-derived suppressor cells: MDSC) は炎症や担癌状態といった病的な条件で腫瘍組織、リンパ節、末梢血に増加する。未熟な骨髄細胞で強力な免疫抑制活性を示し、マウスでは CD11b+Gr-1+ の細胞とされる。MMP-9 を分泌している CD11b+Gr-1+細胞が MDSCであることを証明するために T細胞抑制試験を行った。大脳皮質損傷後 1 日目において、脾臓での CD11b+Gr-1+細胞は健常マウスより増加した (Fig3A)。この細胞には CD4 陽性 T細胞の増殖を抑制する効果をもっており、この細胞集団は Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) であることが明らかとなった (Fig3B)。

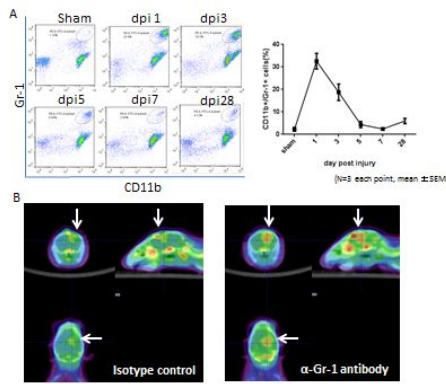
Fig.3



脳内に浸潤してくる MDSC (CD11b+Gr-1+細胞) の経日的変化を Fig4A に示す。MDSC の細胞集団は損傷後 1 日目をピークとして 5 日目には sham のレベルまで減少することがわかった。そこで、抗 Gr-1 中和抗体を損傷後 2 時間、1/2/3/4 日目に投与し、MDSC を除去した後、損傷後 7 日目に TSP0-PET を用いて脳内炎症 (活性化ミクログリア) を可視化した。アイソタイプコントロール群に比して Gr-1 抗体投与群は TSP0 集積が広がり強くなった (Fig4B 矢印)。MDSC が脳内の免疫細胞であるミクログリア活性が抑制しているのでは

と考えられた。

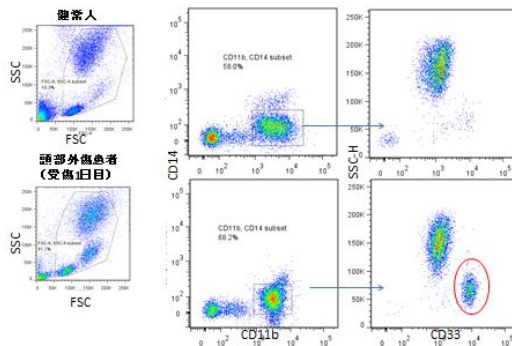
Fig.4



Gr-1 はヒトでは発現しておらず、ヒトにおける MDSC は CD11b/CD14/CD33 の細胞集団に対応する。頭部外傷患者において、受傷後、血中のフローサイトメトリー解析を行ったところ、CD11b/CD14/CD33 が上昇していた。よって、我々の発見がマウスだけでなく、ヒトでも同様の機序をとっている可能性が示された。

Fig.5

頭部外傷患者血中のMDSC
ヒトMDSC: CD11b+/CD14-/CD33+



今回の研究では、脳浮腫進行に関わる MMP-9 を頭部外傷後に分泌する細胞を同定した。これまでの報告は、血管内皮細胞、ミクログリア、アストロサイト等の脳由来の細胞が MMP-9 を分泌するとされていた。それゆえ、頭蓋内の血腫で増加した MMP-9 が血液脳関門の破壊により体循環内へと移行して血清 MMP-9 が上昇すると考えられていた。しかし、我々の動物モデルを使った実験で、挫傷後、循環血液から挫傷脳内に浸潤した MDSC が MMP-9 を分泌していたことが明らかとなった。

頭部外傷後の重症の脳浮腫は、硬膜外血腫・硬膜下血腫・クモ膜下血腫よりも脳挫傷に伴う血腫の周囲に生じやすく、すなわち、損傷を受けた中枢神経系細胞と循環由来免疫細胞が相互応答することで血腫周囲の浮腫が生じる可能性が示唆される。我々の結果は、この仮説を支持するものであり、その主因の一つとして MMP-9 が関連していることが明らかになった。しかしながら、単純に MDSC 浸潤を阻害しただけでは、ミクログリア活性による脳内の炎症が逆に増強された。今後、

基礎実験・臨床研究の両面から、さらなる抗脳内炎症療法の検討が求められる。

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)

[学会発表](計 10 件)

Sanae Hosomi, Toshihide Yamashita, Hiroshi Ogura, and Takeshi Shimazu. Matrix metalloproteinases-9 secretion from accumulated Myeloid-derived suppressor cells after traumatic brain injury in mice. The 43rd Critical Care Congress, 2014.01, San Francisco.

細見早苗, 山下俊英, 小倉裕司, 嶋津岳士. マウス脳挫傷モデルにおける matrix metalloproteinase (MMP)-9 産生細胞の動態解明. 第 41 回日本集中治療医学会学術集会, 2014 年 2 月, 京都

Sanae Hosomi, Toshihide Yamashita, Hiroshi Ogura, and Takeshi Shimazu. Infiltrating Myeloid-derived cells secrete Matrix metalloproteinases-9 after traumatic brain injury in mice. International Neurotrauma Society 2014, 2014.3. Budaest.

細見早苗, 山下俊英, 小倉裕司, 嶋津岳士. マウス脳挫傷モデルにおける Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) の発現と matrix metalloproteinase(MMP)-9 分泌. 第 114 回日本外科学会定期学術集会, 2014.4. 京都

Sanae Hosomi, Toshihide Yamashita, Hiroshi Ogura, and Takeshi Shimazu. Why Matrix metalloproteinase (MMP)-9 concentration in blood reflects fragility after traumatic brain injury? International conference on Emergency Medicine, 2014.6 香港

Sanae Hosomi, Kazuhisa Yoshiya, Tadashi Watabe, Toshihide Yamashita, Hiroshi Ogura, and Takeshi Shimazu. TSP0-PET imaging after traumatic brain injury in mice. The 32nd Annual Symposium of the National Neurotrauma Society, 2014.6 San Francisco

細見早苗, 渡部直史, 小山佳久, 山下俊英, 畑澤 順, 小倉裕司, 嶋津岳士. Translocator protein (TSP0) PET による頭部外傷後の神経炎症イメージング. 第 42 回日本救急医学会総会・学術集会, 2014.10. 福岡

細見早苗, 渡部直史, 金井泰和, 池田隼人, 小山佳久, 山下俊英, 畑澤 順, 小倉裕司, 嶋津岳士. 頭部外傷後の神経炎症イメージング: 18F-DPA714-PET. 第 54 回日本核医学会学術総会, 2014.11. 大阪

細見早苗. 頭部外傷後の神経炎症イメージング: 18F-DPA714-PET による評価. 第 3 回

臨床免疫核医学研究会 2015.1 大阪

細見早苗、藤田幸、渡部直史、小山佳久、
山下俊英、小倉裕司、嶋津岳士. 頭部外傷後
の慢性神経炎症の新たな診断ツール：TSP0 -
PET の応用、第 42 回日本集中治療医学会学術
集会、2015.2 東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

細見 早苗 (HOSOMI Sanae)

大阪大学医学系研究科・特任研究員

研究者番号：90644005