

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350591

研究課題名(和文)脳梗塞モデルにおけるミクログリアとマクロファージが神経機能に与える影響の解明

研究課題名(英文)Microglia and blood-derived macrophage in brain after stroke

研究代表者

西山 康裕(NISHIYAMA, Yasuhiro)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20350077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳ミクログリアが脳梗塞後に果たす役割や外因性マクロファージと脳ミクログリアの連携は未だ不明である。内因性ミクログリアの数の推移は脳梗塞前から5日目まで統計学的な有意差を認めなかった。一方で、脳虚血反応性に単球が血液から脳へ流入し、その後脳内で単球からマクロファージへの変化を認めた。3日目、5日目にミクログリア、Ly6Chiマクロファージ、Ly6Cloマクロファージをsortし、DNA合成後にgene expression assayを行った。ミクログリアは特異的な変化を認めなかったが、マクロファージは急性期の炎症性優位の時期にはM2関連マーカーが、修復期にM1関連マーカーが優位に発現していた。

研究成果の概要(英文)：Microglia and M (M)play significant roles in infection control, tissue repair, and sterile inflammation. However, some mechanisms are still unknown. We first showed the in vivo time course of types of microglia and M in the brain after stroke, Ly6Chi M infiltrated and peaked by d3, followed by increased numbers of Ly6Clo M by d5. But, microglia in the brain didn't show a significant change the number of them in the time course. Also, from the molecular level, the dominant M population at d3 after stroke, Ly6Chi M , expressed more Arg-1, VEGF-a and IGF-2g and less IGF-1, CCL-3, TNF than the Ly6Clo M . This means that Ly6Chi M show more of M2-like pattern, whereas Ly6Clo M show more of M1-like pattern. However, we didn't show significant patterns in microglia. It is also very interesting to find that these M but microglia turned into one another over time, suggesting more of a continuum of the functional phenotype, rather than classifying them in a strict binary fashion.

研究分野：脳虚血の炎症性メカニズム

キーワード：ミクログリア マクロファージ 脳梗塞 マウス 単球

1. 研究開始当初の背景

臨床現場において、脳卒中による死亡・後遺症はその頻度の高さ、経済的な損失の大きさから、重要な社会問題となっている。このため、脳梗塞の超急性期だけでなく、急性期から亜急性期にかけての病態解明および動物実験からヒトへの臨床応用にかかる期待は増している。しかしながら、脳梗塞の分野において、過去の動物実験での結果は必ずしもヒトに応用できたとは言えない。この原因の一つは神経組織や構造が動物とヒトで異なるため、治療の標的が分子学的に異なっていたことがあげられる。ところが近年脳梗塞は一連の炎症反応であるとする研究結果が相次いでいる (Iadecola C, et al. *Nat Med* 2011, Chamorro A, et al. *Lancet Neurol* 2016)。炎症性疾患はステロイドからチェックポイント阻害薬までヒトでも治療に応用されていることは周知であり、脳梗塞への応用が期待される。

2. 研究の目的

近年動物実験レベルでは、免疫寛容により梗塞巣の縮小・予後の改善が認められるなど、脳梗塞における組織炎症に免疫系が大きく関与している可能性が指摘されている。例えば、脳梗塞後に血中単球が脳内に移行し、脳内で単球から脳内免疫担当細胞である外来性マクロファージへの変化する報告が認められているものの (Gliem M et al. *Ann Neurol* 2012, Hu X *Stroke* 2012)、内在性のミクログリアが脳梗塞後に果たす役割や外因性マクロファージと内因性ミクログリアの連携については未だ明らかとなっていない。本研究の目的は、「外因性マクロファージと内因性ミクログリアの脳梗塞後の脳内変化を経時的に捉え、炎症が収束して修復に至るまでのメカニズム」の一部を解明することである。

3. 研究の方法

(1)脳梗塞モデル作成、脳細胞単離方法の確立

実験動物として雄性 11-14 週齢の C57BL/6J マウスを用い、30 分間の中大脳動脈閉塞 suture モデルを作成した。脳梗塞モデル作成後、脳細胞の単離を行った。すなわち、脳を取り出しホモジュナイズした後に、Liberase CI (Roche 社製) を用いて 60 分間インキュベートを行い、比重法にて回収した。同時に血液、骨髄を採取した。(2)細胞表面マーカーの染色とミクログリア、マクロファージのフローサイトメトリーによる同定

CD45 および CD11b で染色し、flow cytometry (Becton Dickinson 社) で解析を行い、ミクログリアである CD45^{int} および CD11b^{high} の部分に gate をかけた(図 1)。また、CD45^{high} には CD11b^{high} と Lin^{negative} (Lineage markers: B220, CD90.2, Ly6G, NK1.1, CD49b) に gate をかけ、さらに F4/80 と Ly6C で染色。F4/80^{positive} を macrophage とした。

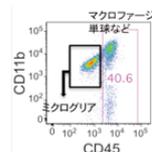


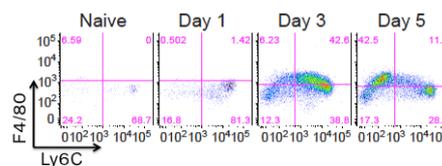
図1.フローサイトメトリーを用いたミクログリアの同定
CD45; hematopoietic cells
CD11b; myeloid cells
ミクログリアはCD11b陽性CD45^{弱陽性}
マクロファージはCD11b陽性CD45^{強陽性}

(3)経時的なミクログリアとマクロファージの遺伝子発現解析

FACS-Diva (Becton Dickinson 社)を用いて sorting し、RNA を抽出。

その後 cDNA を合成した。Sorting は冷却水をまわしながら行うことで、細胞の劣化を可能な限り防ぐ事が可能であった。各サンプルは 3 匹の脳細胞を混ぜることで、脳梗塞モデルの梗塞体積や動物間のばらつきを防ぐこととした。RNA isolation は RNeasy Micro Kit (Qiagen 社) を用いてプロトコール通りに行う。RNA の定量および質の評価は Agilent 2100 Bioanalyzer™ (Agilent Technologies,社)を用いる。cDNA 合成は iScript cDNA Synthesis Kit (Gibco-Invitrogen 社)を用いて行う。各種炎症性サイトカインなどの遺伝子発現は Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystem 社)を用いた。脳梗塞後 1 日目、3 日目、5 日目に実験を行い、各群のサンプルから各種サイトカイン、ケモカインの解析を開始した。下の図は脳内単球、マクロファージの経時的变化を見たものだが、Naive マウスではほとんどこれらの細胞は認められず、脳梗塞後 1 日目から Ly6C^{high} の単球が脳内に入り込み、3 日目には Ly6C^{high} マクロファージが優勢に、5 日目には Ly6C^{low} マクロファージが優勢になることがわかる。

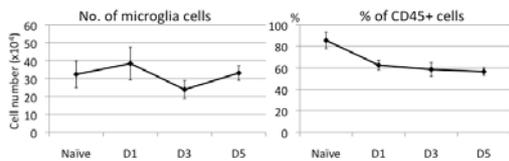
4. 研究成果



(1)経時的なミクログリア数の推移

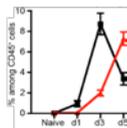
まずは内因性ミクログリアの数の推移を見たが、ミクログリアの数は 5 日目まで統計学的な有意差を認めなかった。同様に CD45 陽性細胞におけるミクログリアの割合も 1 日目から 5 日目にかけて有意差を認めなかった。このことは脳梗塞により反

応性に内因性ミクログリアが増減しないことを示唆する。



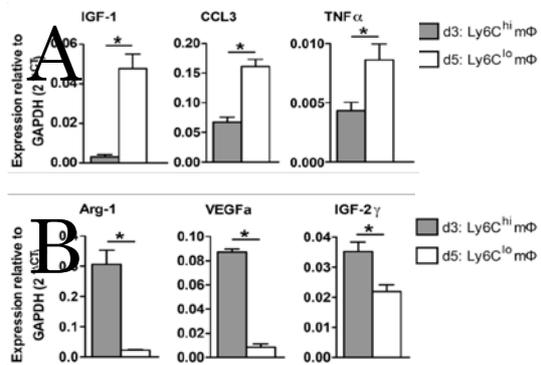
(2)マクロファージ数は脳梗塞により増加する

右下の図に示す通り、脳梗塞に対する反応性に血液から脳へ流入し、その後単球からマクロファージに変化することが示唆される。



(3)マクロファージにおける各種炎症性マーカーの経時的な変化

図 a,b には3日目、5日目に図に示した部分をソートし、各種炎症性マーカー、サイトカインを測定した。結果としてAに示すように5日目の Ly6Clow マクロファージは3日目の Ly6Chigh マクロファージと比較して M1 関連マーカーの上昇を主に

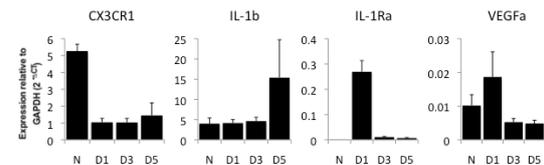


認めた。一方で、Bに示すように Ly6Chigh マクロファージは M2 関連マーカーを優位に示した。すなわち、急性期の炎症性優位の時期には M2 関連マーカーがマクロファージから優位に分泌され、修復期に M1 関連マーカーが発現することが示唆された。

(4)ミクログリアにおける経時的変化に特異的な変化を認めず

一方で、内因性ミクログリアに対して同様に経時的な変化を追跡したが、特異的なパターンは認めず、CX3CR1 は脳梗塞直後から発現の劇的な低下を認めた。一方で、マクロファージにおいては5日目に Ly6Clow マクロファージから CX3CR1 が大量に発現することがわかった。

本研究の結果、脳梗塞マウスモデルにおいてミクログリアについて経時的な変化について数及びサイトカインなどの発現について特に急性期に有意な変化を認める



ことはなかった。しかしながら、外因性マクロファージについては急性期から修復期にかけての各種遺伝子発現変化を顕著に認め、特に急性期に M2 マーカーの上昇、修復期に M1 マーカーの上昇を認めた。しかしながら、ケモカインレセプターでありミクログリアに多く発現しているが、脳梗塞後に急激に減少し、一方で外因性のマクロファージが上昇していくことから、何らかの補足的な関係が存在することが示唆された。これらにより急性期の M2 関連マーカーの上昇を抑制することが脳梗塞の治療ターゲットとなりうる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

① 西山康裕、上田雅之、仁藤智香子、須田智、他 脳梗塞モデルマウスにおける脳内マクロファージとミクログリアの経時的な性質変化について. 第 27 回日本脳循環代謝学会総会. 2015 年 10 月 30-31 日

② Nishiyama Y, Ueda M, Nito C, Suda S, et al. Blood-derived brain macrophages contribute to spontaneous recovery after stroke. 第 56 回日本神経学会総会 2015 年 5 月 20-23 日

〔図書〕(計 2 件)

① 西山康裕、片山泰朗：脳梗塞に対する

細胞移植療法. 日医大医会誌

2014;10,149-150.

② 西山康裕、木村和美：脳梗塞急性期治療—再開通療法とその先にある道. 日医

大医会誌 2018;14,81-89.

〔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

西山 康裕 (NISHIYAMA, Yasuhiro)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20350077

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()