

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462162

研究課題名(和文) 梗塞巣への浸潤細胞を使って脳梗塞を治す

研究課題名(英文) Therapy for cerebral infarction using infiltrated cells in ischemic brain

研究代表者

久門 良明 (Kumon, Yoshiaki)

愛媛大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：80127894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞巣に浸潤するマクロファージには、NG2+細胞とCD200+細胞がみられる。CD200の役割を検討した結果、M1型(起炎症作用)やM2型(神経保護作用)に分類できなかったが、CD200+細胞はfull-length CD (CD200L)とtruncated form CD (CD200S)を共発現していた。CD200LとCD200Sの役割を検討するためにCD200LまたはCD200S強制発現C6細胞株を作成してラット脳移植したところ、CD200Sの強い起炎症性作用が確認された。したがって虚血脳では、CD200Lの炎症活性の抑制作用がCD200Sによって無効化されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Two types of macrophages in lesion core of rat stroke model were identified according to NG2 chondroitin sulfate proteoglycan (NG2) and CD200 expression. NG2+ macrophages were CD200-, and vice versa. Although CD200+ macrophages cannot be classified as either M1 or M2, CD200+ macrophages expressed two splice variants of CD200 that are CD200L and CD200S. Rats transplanted with C6-CD200S cells in the brain survived for a longer period than those transplanted with original C6 or C6-CD200L cells. The C6-CD200S tumors were smaller than the C6-CD200L or C6-original tumors, and many apoptotic cells were found in the tumor cell aggregates. Tumor-associated macrophages in C6-CD200S tumors displayed dendritic cell-like morphology and CD86 expression. These results suggested that the inflammatory reaction induced by CD200S is superior to the contrary function by CD200L in the ischemic brain.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳梗塞 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞の発症とともに、脳梗塞巣中心部では、神経細胞やマイクログリアの細胞死が急速に起こる一方、好中球、単球、リンパ球などの血球細胞が浸潤する。これまで我々は、ラット脳梗塞巣中心部に Iba1 陽性骨髄由来マクロファージが侵入して NG2 proteoglycan (以下 NG2) を発現するとともに激しく増殖し、大量の細胞が梗塞巣に集積することを見出した。この細胞群は BINCS (Brain Iba1⁺/NG2⁺ Cells) と呼ばれ、虚血による組織障害の増悪を防ぐことを示した。そして、この細胞群の機能解析により脳梗塞に対する新たな治療法の開発に向けた研究を続けてきた。一方、脳梗塞巣中心部に集積するマクロファージに、CD200 を発現する細胞が集積していることも見出した。CD200 は、CD200R を発現するマイクログリアや骨髄由来細胞の起炎症反応を抑制する分子として知られている。また、T 細胞の Th1、Th2 の 2 分類に対応する形で、近年マクロファージを二類型に分類するようになった。すなわち、起炎症性の M1 マクロファージと抗炎症性あるいは損傷組織修復に働く M2 マクロファージである。脳梗塞においては、活性化するマイクログリア・マクロファージが M1 型か M2 型かということは明らかにされていない。

2. 研究の目的

虚血脳における CD200 の役割を明らかにして、浸潤細胞の神経保護効果を高める新たな脳梗塞治療に繋げることを目的とした。

(1) 脳梗塞巣中心部に集積するマクロファージで NG2 を発現するものの性状解析を行い、これらが M1、M2 に対応するか否かを明らかにするとともに、骨髄系細胞の起炎症性活性化を抑制する CD200 の機能にも着目する。

(2) CD200L または CD200S を強制発現させた C6 細胞株を作成して新生ラット脳に移植し、腫瘍形成に及ぼす影響や周囲脳に起こる炎症反応を検討することで C6-CD200S と CD200L

の働きを明らかにする。

3. 研究の方法

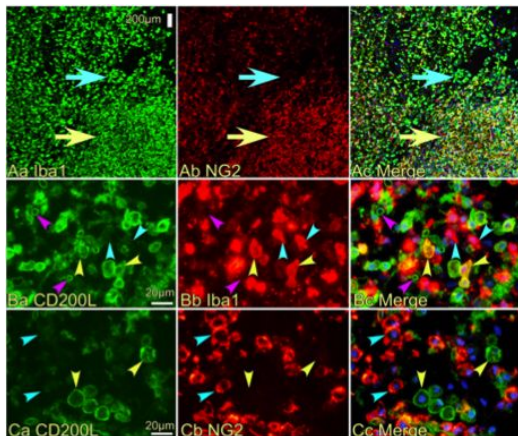
(1) 中大脳動脈一過性閉塞 (90 分間) によるラット脳梗塞モデルを作成し、虚血 1、2、3、5、7、14 日目の脳梗塞巣の中心部、辺縁部、対側非虚血部組織の CD200 と CD200R の mRNA の発現量を定量的リアルタイム RT-PCR により検討した。脳梗塞 7 日目の梗塞巣よりマクロファージを分離し、CD200 の cDNA 配列を調べた。また、CD200 に対する各種抗体を用い、ラット脳梗塞組織の CD200 の蛋白発現を Western blotting 法で解析した。ラット脳梗塞の凍結切片を作成し、NG2 陽性細胞と CD200 陽性細胞の局在、および M1、M2 マーカーの発現を免疫組織化学的に検討した。

(2) ラット C6 グリオーマ細胞にウイルスベクターを用いて CD200L (C6-L) および CD200S (C6-S) をそれぞれ強制発現させた細胞株を作成した。対照細胞株として空ベクターを導入した C6-empty 株 (C6-e) および親株を用いた。これらの株の増殖率や特性を定量的リアルタイム RT-PCR (qPCR) で調べた。各細胞を生後 24 時間以内のウイスターラット新生仔線条体に注入し、実験的脳腫瘍モデルを作成し、その生存率、腫瘍の病理組織学的検索を行うとともに、qPCR による腫瘍免疫に関わる種々の因子の発現の違いを検討した。親株腫瘍から分離した腫瘍関連マクロファージ (TAM) と、各細胞株との共培養を行い、TAM の形質変化を調べた。

4. 研究成果

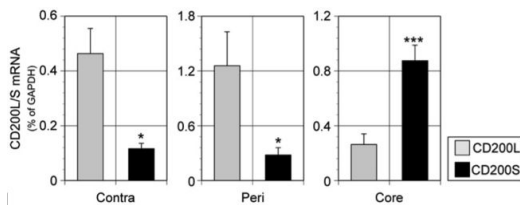
(1) CD200mRNA の経時的な変動には部位による差はなかったが、CD200RmRNA は中心部で変動し 5-7 日目にピークを示した。免疫組織染色の結果、脳梗塞巣マクロファージは、NG2 陽性細胞と CD200 陽性細胞に分類することができ、NG2 陽性細胞 (BINCS) は CD200 陰性、CD200 陽性細胞は NG2 陰性であった。また、Iba1 陽性細胞すなわちマクロファージは、ほ

ばすべて CD200 受容体である CD200R を発現していた (図 1)。



【図 1】 虚血負荷 7 日後の中心部のマクロファージの所見 : A) Iba1⁺マクロファージは NG2⁺であったが (黄矢) NG2⁻細胞も認められる (青矢)。B) CD200L⁺/Iba1⁺細胞 (黄矢)、CD200L⁻/Iba1⁺細胞 (青矢)、CD200L⁺/Iba1⁻細胞 (桃矢) の 3 タイプがみられ、最後は血管内皮細胞。C) CD200L⁺細胞 (黄矢) は NG2⁻で、逆も真である。

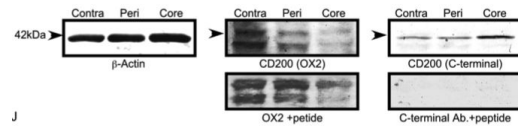
脳梗塞巣マクロファージが発現する CD200 は、その cDNA 配列を解析により、exon1、2 および exon3 の一部に由来する配列が欠損した CD200-truncated form (以下 CD200S) を発現し、脳梗塞巣中心部では、CD200S が CD200-full-length (以下 CD200L) に比べて mRNA の発現が有意に高かった (図 2)。



【図 2】 CD200L mRNA は対側皮質と辺縁部に CD200S mRNA は中心部に高発現。

Western blotting 法による CD200 の蛋白発現の解析で、OX2 抗体では脳梗塞巣対側や辺縁に高い発現を示し、抗 CD200 C 末抗体では脳梗塞中心部に高い発現を示した。吸収試験

等による検討から、抗 CD200 C 末抗体は CD200S 特異的抗体で、OX2 抗体は CD200L 特異的抗体であると考えられた (図 3)。



【図 3】 CD200 蛋白発現では OX2 抗体では対側や辺縁部に高発現が、抗 CD200 C 末抗体では中心部に高発現がみられ、吸収試験から抗 CD200 C 末抗体は CD200S 特異的抗体、OX2 抗体は CD200L 特異的抗体と考えられた。

免疫組織染色において、多くの CD200 陽性細胞は、CD200L と CD200S を共発現していた。さらに、NG2 陽性細胞は梗塞巣皮質に、CD200 陽性細胞は梗塞巣脳梁に集簇しており、NG2 陽性細胞周辺には OX2 抗体のみ陽性の CD200L 陽性変性組織が多量に存在していた。CD200 陽性細胞は、M1 マーカーの CCL2、iNOS、IL-1、TLR4、M2 マーカーの CD68、CD163、TGF に陽性であり、NG2 陽性細胞は、M1 マーカーである CD86 を除いて陰性であった (表 1)。

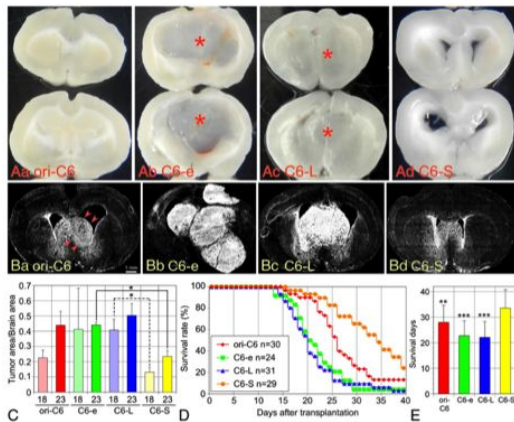
Antigen	NG2 + macrophage	CD200 + macrophage
Iba1	+	+
Tomato lectin	Weak	Strong
NG2	+	-
CD8	-	+
CD200L	-	+
CD200S	-	+
CD200R	+	+
CCL2	-	+
Ki67 (positive %)	55.5%	4.7%
TLR4	-	+
<i>Presumable M1 markers</i>		
CD11b	+	+
CD86	+	-
IL-1β	-	+
iNOS (positive %)	3.0%	50.7%
<i>Presumable M2 markers</i>		
CD68	-	+
CD163	-	+
IGF1	+	+
TGFβ	-	+

【表 1】 中心部 NG2⁺、CD200⁺マクロファージの特徴で、M1、M2 に分類し得なかった。

これらの結果より、脳梗塞巣に集積するマクロファージには、NG2 陽性細胞と CD200 陽性細胞の 2 種類があり、いずれも M1、M2 に分類し得なかった。脳梗塞中心部の CD200 陽性細胞は起炎症性活性を有し、NG2 陽性細胞は起炎症性メディエーターや貪食能が抑制

されていると考えられた。NG2 陽性細胞の周囲には、神経細胞由来と考えられる CD200L 陽性変性組織が存在し、CD200L 陽性組織と自身の CD200R との相互作用による起炎症反応の抑制効果が示唆された。一方、CD200 陽性細胞は CD200L と CD200S を共発現しており、CD200L-CD200R による起炎症性活性の抑制が CD200S によって無効化されている可能性が考えられた。

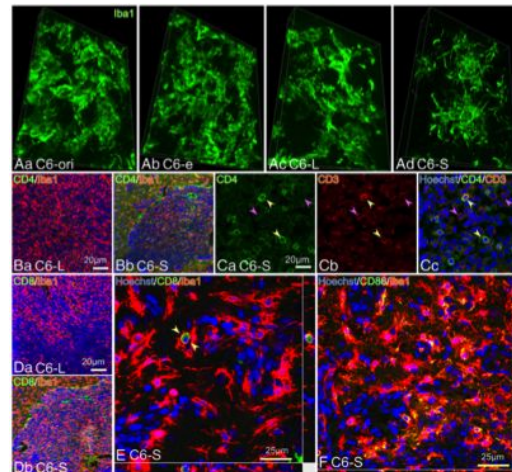
(2) 4 つの細胞株では、増殖率、腫瘍進展、腫瘍免疫に関わるとされる因子の発現に有意な差はみられなかった。ラット実験的脳腫瘍モデルでは、親株・C6-e、C6-L 株注入モデルと比べて C6-S 株注入モデルでは優位な生存期間の延長を認めた。(図 4)



【図 4】 (A) 移植後 18 日の摘出脳で、腫瘍塊 (*) は C6-e (Ab) と C6-L (Ac) のみに認められた。(B) 腫瘍細胞を見ると C6-e (Bb) と C6-L (Bc) が大きな腫瘍塊を形成し、オリジナル C6 細胞 (ori-C6) も塊を形成したが小さかった (Ba)。C6-S 移植脳に明らかな腫瘍塊はなかった (Bd)。(C) 移植後 18、23 日の摘出脳での腫瘍面積/全脳面積は C6-S 移植脳で小さかった。Kaplan-Meier 生存曲線(移植後 40 日迄)は、C6-S 移植ラットは他群より長く (D)、平均生存日数も他群より長かった (E)。

また C6-S 腫瘍内 (C6-S) では腫瘍細胞にアポトーシスが多発し、腫瘍のサイズは優位に小さかった。一方で、C6-e や C6-L 腫瘍細胞ではアポトーシスはほとんど生じておらず、

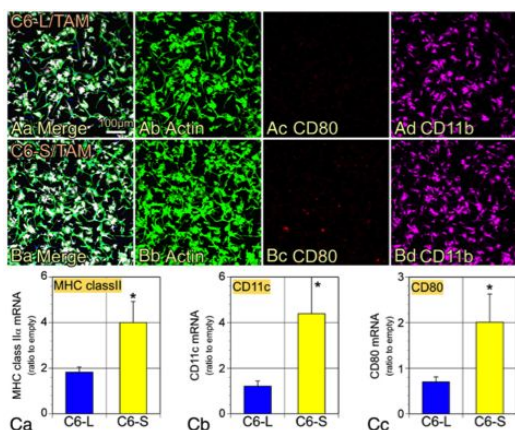
周囲の正常組織にアポトーシス細胞を認めるのみであった。これは、腫瘍増大により周囲の正常組織が圧排により死滅しているためと考えられた。また、腫瘍増大に関連する因子 (増殖因子や TGF など) について、各細胞株の定量的 PCR にて検討を行なったが、上記の現象を説明するような結果は得られなかった。脳腫瘍内には骨髄由来の TAM の集積が認められ、TAM は一般的に腫瘍増悪に関与することが言われている。しかし、C6-S 腫瘍内では TAM は樹状細胞様の形態と性質を示し、CD4⁺ または CD8⁺ T 細胞を取り囲むようにして存在していた。このことから樹状細胞化した TAM が T 細胞へ抗原提示を行なっていることが示唆された。また、同腫瘍内では、グランザイムやパーフォリンなどのアポトーシス誘導因子の高発現を認めた。(図 5)



【図 5】 (A) C6-ori (Aa)、C6-e (Ab)、C6-L (Ac)、C6-S (Ad) 腫瘍での Iba1⁺TAM の 3D イメージで、C6-S 腫瘍では多数の突起を有する樹状細胞様形態を呈した。(B) CD4⁺細胞と構築は、C6-L 腫瘍 (Ba) に比して C6-S 腫瘍 (Bb) で豊富であった。(C) C6-S 腫瘍内には CD4⁺ (Ca) と CD3⁺ (Cb) の T 細胞が豊富であった。黄矢頭は CD3⁺/CD4⁺細胞を桃矢頭は CD3⁺/CD4⁺細胞を示す。突起をもった Iba1⁺TAMs は CD4⁺リンパ球様細胞を取り囲んでいた。(D) CD8⁺細胞と構築は C6-S 腫瘍に高頻度に認められたが (Db) C6-L 腫瘍には見られなかった (Da)。(E) 円形の CD8⁺細胞は突起を有する TAM と密

に共存していた。(F) C6-S 腫瘍内の TAM は CD86⁺であった。

in vitro で、各種細胞株と TAM を 48h 共培養すると、C6-S 株と共培養した TAM は樹状細胞マーカーの発現が誘導されることが、qPCR および蛍光免疫染色にて確認できた。(図 6)。



【図 6】 オリジナル C6 腫瘍から分離した TAM が C6-L, C6-S 細胞と混合培養された(A と B)。Aa と Ba の白色細胞は TAMs で、緑色細胞は C6 細胞。TAM は C6-L 細胞(A)あるいは C6-S 細胞(B)と混合培養された。C6-S 細胞との混合培養でのみ CD80+/Iba1+TAM がみられた (Bc)。 (C) qPCR は TAM と C6-S 細胞の混合培養は、C6-L 細胞に比して、MHC class II, CD11c, CD80 の mRNA の発現を増強した。

これらの結果より、実験的ラット脳腫瘍モデルにおいて、CD200S 分子により腫瘍内に集積した TAMs が樹状細胞様へと機能変化し、樹状細胞化した TAMs が腫瘍に対する細胞性免疫を活性化することが判明した。そして、先行研究で提唱されているような CD200S 分子が CD200/CD200R 相互作用に対する生理的 antagonist として作用するような結果は得られず、むしろ全く新しい機能を有している可能性が示唆された。

したがって、脳梗塞モデルで推測した「CD200S は CD200L-CD200R による起炎症性活性の抑制を無効化する」可能性が示され、CD200L と CD200S 作用のコントロールによる

新しい脳梗塞治療手段を提供することが期待された。

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) KOBAYASHI Kana, Yano Hajime, Umakoshi Akihiro, Matsumoto Shirabe, Mise Ayano, Funahashi Yu, Ueno Yoshitomo, Kamei Yoshiaki, Takada Yasutsugu, KUMON Yoshiaki, OHNISHI Takanori, TANAKA Junya: A truncated form of CD200 (CD200S) expressed on glioma cells prolonged survival in a rat glioma model by induction of a dendritic cell-like phenotype in tumor-associated macrophages. *Neoplasia*, 査読あり, 18, 2016, 229-241 (DOI: 10.1016/j.neo.2016.02.006)

(2) MATSUMOTO Shirabe, TANAKA Junya, YANO Hajime, TAKAHASHI Hisaaki, SUGIMOTO Kana, OHUE Shiro, INOUE Akihiro, AONO Hitomi, KUSAKAWA Akari, WATANABE Hideaki, KUMON Yoshiaki, OHNISHI Takanori: CD200+ and CD200- macrophages accumulated in ischemic lesions of rat brain: the two populations cannot be classified as either M1 or M2 macrophages. *Journal of Neuroimmunology*, 査読あり, 15, 2015, 7-20 (DOI: 10.1016/j.jneuroim2015.03.013)

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 松本 調、田中潤也、久門良明、渡邊英昭、井上明宏、國枝武治：脳梗塞辺縁部での活性化マイクログリアの機能解析。日本脳神経外科学会第 75 回学術総会、2016 年 9 月 29 日～10 月 10 日、マリンメッセ福岡、福岡県福岡市

(2) 松本 調、田中潤也、久門良明、渡邊英昭、井上明宏、大西丘倫：脳梗塞辺縁部での活性化マイクログリアによる変性神経細胞

の貪食. 第 41 回日本脳卒中学会総会, 2016 年 4 月 14 日~16 日、ロイトン札幌、北海道札幌市

(3) MATSUMOTO Shirabe, TANAKA Junya, KUMON Yoshiaki, WATANABE Hideaki, INOUE Akihiro, OHNISHI Takanori: CD200+ and NG2+ macrophages accumulated in ischemic lesions of rat brain - the two populations cannot be classified as either M1 or M2 macrophages. 24th European Stroke Conference, 2015 年 5 月 13-15 日, Congress Center of the Reed Exhibition Hall, Vienna, Austria

(4) 松本 調、井上明宏、渡邊英昭、大上史朗、大西丘倫、久門良明、田中潤也: 脳梗塞巣に集簇する 2 種類のマクロファージ: NG2 プロテオグリカンと CD200 の発現による分類. 第 40 回日本脳卒中学会総会, 2015 年 3 月 26 日~29 日、リーガロイヤルホテル、広島県広島市

(5) 松本 調、井上明宏、渡邊英昭、大上史朗、大西丘倫、久門良明、田中潤也: CD200+ and CD200- macrophages accumulated in ischemic lesions of rat brain: the two populations cannot be classified as either M1 or M2 macrophages. 第 26 回日本脳循環代謝学会、2014 年 11 月 21-22 日、岡山コンベンションセンター、岡山県岡山市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久門 良明 (Kumon, Yoshiaki)
愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号: 80127894

(2) 研究分担者

渡邊 英昭 (Watanabe, Hideaki)
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 30322275

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし