

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870571

研究課題名(和文)脳虚血後に浸潤する血液細胞による神経修復機構の解明

研究課題名(英文)Neurorepair after ischemic stroke by hematopoietic cells

研究代表者

七田 崇 (Shichita, Takashi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00598443

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)：脳梗塞は我が国における、寝たきりの原因の第1位、死因の第4位を占めている。脳梗塞に対して有効な治療法は、脳梗塞発症の早期に開始する必要があるが、長期にわたって有効な治療法は現在までに発見されていない。脳梗塞は、脳への血流が途絶することにより、脳組織が壊死する病態であり、脳には強い炎症が引き起こされる。脳梗塞の後に起こる炎症は、麻痺などの神経症状を悪化させて社会復帰の妨げとなる。本研究は脳梗塞後の炎症を制御する治療法を開発するため、特に炎症を収束に向かわせるメカニズムを解明した。

研究成果の概要(英文)：Stroke is a leading cause of death and disability worldwide, and approximately 70% of stroke are ischemic stroke. The approved treatments for ischemic stroke are limited within the early time after stroke onset. There is a need for an efficacious therapy which can be administered in the delayed phase of ischemic stroke. Post-ischemic inflammation is an essential step in the pathologies of ischemic stroke. The secondary progression of the infarct lesion by inflammation is directly linked to the prognosis of ischemic stroke patients. In this research, we clarified the molecular mechanisms in the resolution of cerebral post-ischemic inflammation to establish novel therapeutic strategies for ischemic stroke.

研究分野：免疫学

キーワード：脳梗塞 炎症 マクロファージ 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は、脳血流の途絶によって脳組織が虚血壊死に陥る病態である。脳組織の壊死に伴って脳内では炎症が惹き起こされる。脳虚血後炎症は病態の悪化、組織の修復に密接に関連していると考えられ、脳梗塞患者の予後に大きな影響を与えることが判明している。しかしながら、脳梗塞における炎症のメカニズムはまだ十分に明らかになっていない。特に、脳梗塞後の炎症がどのように鎮静化して、組織修復へと至るのか、そのメカニズムについてはほぼ未解明のままである。

2. 研究の目的

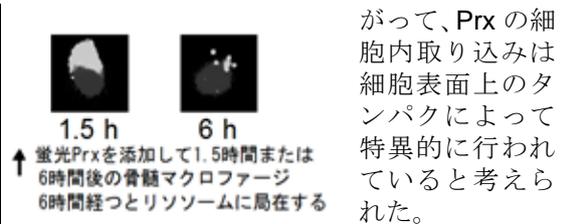
脳卒中は、本邦の死因の第4位、寝たきりの原因の第1位であり、本邦が高齢化社会を迎えるにあたり、緊急を要する対策課題である。脳卒中の約7割を脳梗塞が占めているが、脳梗塞に対する有効な治療法は乏しく、神経機能を改善する手段に至っては現状、リハビリのみである。申請者はこれまでに、脳梗塞における新規の炎症メカニズムを独自の手法によって解明しており、本研究ではその手法を応用することによって、脳内で組織修復に働く細胞集団を同定する。脳虚血後炎症の鎮静化と組織修復のメカニズムを明らかにすることによって、脳梗塞患者の生活予後を改善するような画期的な新規治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 我々はペルオキシレドキシシン (Peroxiredoxin: Prx) が神経組織における強力な DAMPs であることを見出した。Prx が虚血脳組織中から消失することが炎症の収束と関連している可能性が考えられる。そこで、Prx をマクロファージ細胞株 (骨髄マクロファージ、RAW264.7 細胞) に投与することによって Prx がどのように処理されるのか、検討を行った。さらに Prx の処理メカニズムと神経組織の損傷との関連を探るため、脳虚血モデルマウスを用いた解析を行った。
- (2) Scavenger 受容体の阻害剤を用いて脳虚血モデルを作製し、脳梗塞体積や神経症状、脳内炎症の程度を FACS、mRNA 定量解析、病理組織の解析を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 蛍光標識した Prx タンパクを作製し、マクロファージ (骨髄マクロファージ、RAW264.7 細胞) に添加する実験を行った。Prx はマクロファージによって選択的に細胞内に取り込まれていることが判明した。取り込み後は細胞質全体に Prx が検出されるが、次第にリソソームに局在し分解処理されているものと考えられた。マクロファージの細胞膜表面上のタンパクをタンパク分解酵素 (trypsin)、新規タンパク合成阻害剤 (cyclohexamide) で処理すると、Prx の取り込みが著明に減少することが判明した。した



がって、Prx の細胞内取り込みは細胞表面上のタンパクによって特異的に行われていると考えられた。

DAMPs の取り込み受容体を検索するため、ENU を用いて RAW 細胞にランダム変異を誘導し、Prx を取り込まない細胞を単離、限界希釈することによって、変異 RAW 細胞株を樹立した。正常細胞株と変異細胞株をマイクロアレイ解析によって遺伝子発現パターンを比較した。変異細胞株においては数十種類の免疫関連受容体の発現が低下していた。このうち DAMPs の取り込みに関連する受容体を検索するため、変異細胞株にレンチウイルスを用いて受容体を高発現させて Prx の取り込みを検証した。その結果、Scavenger 受容体が DAMPs の細胞内取り込みに重要であることが判明した。

Scavenger 受容体には細胞内取り込みの阻害剤として maleylated BSA (M-BSA) が知られている。RAW 細胞や骨髄マクロファージを M-BSA で処理した上で Prx を添加すると、細胞内への Prx の取り込みはほとんど見られなくなった。Prx は Toll 様受容体 (TLR2、TLR4) を介してマクロファージを活性化して炎症性サイトカインを産生させるが、Prx の細胞内取り込みに関しては TLR2、TLR4 は寄与していなかった。脳梗塞巣に浸潤した炎症細胞を Percoll によって抽出して Prx の細胞内取り込みを評価したところ、主にマクロファージとミクログリアが取り込み細胞であった。この細胞内取り込みは M-BSA の添加によって顕著に阻害された。

DAMPs の細胞内取り込み機構と神経組織の損傷との関連を調べるため、脳虚血モデルマウスを用いて M-BSA の投与効果を検討した。M-BSA の投与は発症 4 日目の脳梗塞体積を有意に増加させ、神経症状を悪化させた。

M-BSA投与による梗塞巣拡大



脳梗塞巣において Prx を含む debris が残存する体積は、M-BSA の投与によって有意に増加していた。

以上の研究成果により、脳梗塞後の炎症が収束する分子メカニズムの詳細が明らかとなった。今後は新規治療法の開発に結び付けるための研究を行う予定である。

5. 主な発表論文等

- [雑誌論文] (計 14 件)
- ① Shichita T, Yoshimura A. Inflammation in central nervous system diseases. *Clin Exp Neurol.* 7:18-27 (2016) 査読あり
 - ② 七田 崇, 吉村昭彦: 脳虚血と細胞死. 実験医学増刊 34(7):105-109 (2016)

- 査読なし
- ③ 伊藤美菜子、七田 崇、森田林平、吉村昭彦：脳虚血と炎症．最新医学 71(2):243-249 (2016) 査読なし
- ④ Sakaguchi R, Chikuma S, Shichita T, Morita R, Sekiya T, Ouyang W, Ueda T, Seki H, Morisaki H, Yoshimura A. Innate-like function of memory Th17 cells for enhancing endotoxin-induced acute lung inflammation through IL-22. *Int Immunol*. 28(5):233-243 (2015) 査読あり
- ⑤ Sekiya T, Kondo T, Shichita T, Morita R, Ichinose H, Yoshimura A. Suppression of Th2 and Tfh immune reactions by Nr4a receptors in mature T reg cells. *J Exp Med*. 212(10):1623-1640 (2015) 査読あり
- ⑥ Suzuki M, Morita R, Hirata Y, Shichita T, Yoshimura A. Spred1, a Suppressor of the Ras-ERK Pathway, Negatively Regulates Expansion and Function of Group 2 Innate Lymphoid Cells. *J Immunol*. 195(3):1273-1281 (2015) 査読あり
- ⑦ Kashiwagi I, Morita R, Shichita T, Komai K, Saeki K, Matsumoto M, Takeda K, Nomura M, Hayashi A, Kanai T, Yoshimura A. Smad2 and Smad3 Inversely Regulate TGF- β Autoinduction in Clostridium butyricum-Activated Dendritic Cells. *Immunity*. 43(1):65-79 (2015) 査読あり
- ⑧ Ito M, Shichita T, Okada M, Komine R, Noguchi Y, Yoshimura A, and Morita R. Bruton's tyrosine kinase (BTK) is an essential component for NLRP3 inflammasome activation and a potential therapeutic target for inflammation after ischemic brain injury. *Nat Commun*. 6: 7360 (2015) 査読あり
- ⑨ Morita R, Suzuki M, Kasahara H, Shimizu N, Shichita T, Sekiya T, Kimura A, Sasaki K, Yasukawa H, Yoshimura A. ETS transcription factor ETV2 directly converts human fibroblasts into functional endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(1): 160-165 (2015) 査読あり
- ⑩ 七田 崇、伊藤美菜子、吉村昭彦：脳虚血後炎症．脳循環代謝学会雑誌 26:135-139 (2015) 査読なし
- ⑪ 七田 崇、吉村昭彦：老化と脳虚血後炎症．別冊BIO Clinica 4(2):79-84 (2015) 査読なし
- ⑫ Takasato F, Morita R, Shichita T, Sekiya T, Morikawa Y, Kuroda T, Niimi M, Yoshimura A. Prevention of allogeneic cardiac graft rejection by transfer of ex vivo expanded antigen-specific regulatory T-cells. *PLoS One*. 9(2): e87722 (2014) 査読あり
- ⑬ Shichita T, Ito M, Yoshimura A. Post-ischemic inflammation regulates neural damage and protection. *Front Cell Neurosci*. 8:319 (2014) 査読あり
- ⑭ 七田 崇、吉村昭彦、大星博明：脳梗塞と炎症．最新臨床脳卒中学 (上) 日本臨牀 72 巻増刊号:111-115 (2014) 査読なし
- [学会発表] (計 13 件)
- ① Shichita T : The role of innate immunity in ischemic stroke. 学会名：熊本慢性炎症性疾患国際シンポジウム 場所：熊本大学薬学部 (熊本県熊本市) 年月：2015 Oct 口頭発表 (招待講演)
- ② Shichita T, Yoshimura A : Regulation of post-ischemic inflammation by DAMPs and immune cells. 学会名：10th World Congress for Microcirculation 場所：京都国際会館 (京都府京都市) 年月：2015 Sep 口頭発表 (招待講演)
- ③ Shichita T, Ito M, Yoshimura A : Induction and resolution of post-ischemic inflammation by DAMPs. 学会名：Brain'15 場所：Vancouver Convention Centre (Vancouver, Canada) 年月：2015 Jun ポスター発表
- ④ Shichita T : Role of innate immunity in cerebral postischemic inflammation. 学会名：国立精神神経医療研究センターシンポジウム 場所：国立精神神経医療研究センター (東京都小平市) 年月：2015 年 6 月 口頭発表 (招待講演)
- ⑤ 七田 崇、伊藤美菜子、大星博明、吉村昭彦：脳梗塞の炎症とその収束 学会名：第 27 回脳循環代謝学会 場所：富山国際会議場 (富山県富山市) 年月：2015 年 10 月 口頭発表
- ⑥ Shichita T, Ito M, Yoshimura A : Regulation of post-ischemic inflammation by DAMPs 学会名：第 58 回日本神経化学会大会 場所：大宮ソニックシティ (埼玉県さいたま市) 年月：2015 年 9 月 口頭発表
- ⑦ 七田 崇、伊藤美菜子、吉村昭彦：脳梗塞の炎症とその収束 学会名：第 36 回日本炎症再生学会 場所：虎ノ門ヒルズフォーラム (東京都港区) 年月：2015 年 7 月 口頭発表 (招待講演)
- ⑧ 七田 崇、吉村昭彦：脳梗塞と炎症 (DAMPsによる脳虚血後炎症の制御) 学会名：第 15 回抗加齢医学会総会 場所：福岡国際会議場 (福岡県福岡市) 年月：2015 年 5 月 口頭発表 (招待講演)
- ⑨ 七田 崇、吉村昭彦：DAMPsによる脳虚血後炎症の制御 学会名：第 3 回 Neurovascular Unit研究会 場所：慶應義塾大学医学部 (東京都新宿区) 年月：

- 2015年1月 口頭発表(招待講演)
- ⑩ 七田 崇 : 脳梗塞と炎症～炎症は敵か? 味方か?～ 学会名: 第6回 Stroke Science Academy 場所: ホテル日航福岡(福岡県福岡市) 年月: 2014年11月 口頭発表(招待講演)
 - ⑪ 七田 崇、大星博明、吉村昭彦: DAMPsによる脳梗塞後の炎症とその終焉 学会名: 第26回脳循環代謝学会 場所: 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市) 年月: 2014年11月 口頭発表(招待講演)
 - ⑫ 七田 崇、大星博明、吉村昭彦: NVUと damage-associated molecular patterns (DAMPs) 学会名: 第24回脳血管シンポジウム 場所: 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市) 年月: 2014年9月 口頭発表(招待講演)
 - ⑬ Shichita T, Yoshimura A: Regulation of post-ischemic inflammation by DAMPs and immune cells. 学会名: 第37回日本神経科学大会 場所: パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 年月: 2014

[その他]

慶應義塾大学医学部プレスリリース「脳梗塞後の炎症が悪化するメカニズムを解明」平成27年6月10日

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20150610/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

七田 崇 (SHICHITA, Takashi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 00598443