

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790836

研究課題名（和文） 制御性T細胞誘導による脳梗塞に対する神経再生治療法開発の基礎的研究

研究課題名（英文） Immunomodulation and adult neurogenesis after stroke

研究代表者

石橋 哲（ISHIBASHI SATORU）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30533369

研究成果の概要（和文）：

本研究では、炎症制御の中心的役割を持つ制御性T細胞を虚血脳内に誘導することで、脳梗塞後に惹起される強い炎症が制御され、神経保護作用並びに神経新生促進作用が得られることを確認した。本手法では、特に新生神経細胞の生存促進効果が強く認められ、脳梗塞に対する新たな神経再生治療法が確立できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Neuroblasts in the subventricular zone proliferate markedly after stroke, and migrate to the site of injury along with blood vessels. However, a large fraction of stroke-generated neuroblasts die shortly after being born, because of local inflammation.

E-selectin is specifically expressed on endothelial cells, but only when the endothelium activates. Since endothelial activation occurs after stroke, E-selectin can serve as an immunologic tolerization antigen that can focus immunomodulation to regions of the vascular tree. Intranasal instillation of recombinant E-selectin will induce mucosal tolerance to that antigen with the generation of E-selectin-specific regulatory T cells (Tregs). Tregs may protect newly-generated neuroblasts from ischemic damage through 'bystander suppression' in which immunomodulatory cytokines such as TGF- β and IL-10 are released locally. In this series of experiments, we have shown that after E-selectin tolerization in permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO) rats Tregs transmigrate to the peri-infarct region of ischemic brain, TNF expression in the local neurovascular niche is reduced, and the survival of newly generated neuroblasts or neurons in the peri-infarct region is increased. Under these conditions, an improvement in sensorimotor function after pMCAO also occurs.

E-selectin-specific Tregs can modulate the efficacy of adult neurogenesis after ischemia and promote repair after brain injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：ライフサイエンス（共通基礎研究）

科研費の分科・細目：神経免疫

キーワード：

脳血管障害、制御性 T 細胞、E-セレクトイン、神経新生、神経幹細胞、動物モデル、再生医療、神経保護、炎症

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は、日本における臓器別死因第一位の疾患であるのみならず、例え救命できたとしても一度損傷を受けた中枢神経の再生能力は乏しいため後遺症が永続し、寝たきりの最大の原因となっている。近年げっ歯類の脳のみならず、ヒト脳内においても側脳室周囲、及び海馬歯状回において神経新生部位があり、神経幹細胞、神経前駆細胞が存在し絶えず新たな神経細胞が作り出されていることが判明した。これらの側脳室周囲の脳室下帯や海馬歯状回に存在する神経前駆細胞は、脳梗塞などにより脳が損傷を受けると増殖が活性化し、増殖した神経前駆細胞は Neuroblast へ分化後に損傷部位へ主に血管周囲を伝わるように遊走し、成熟した神経細胞に分化することがわかっている。つまり、このような中枢神経の自己修復メカニズムを賦活化することによる脳梗塞の再生治療が現実味を帯びてきている。

しかしながら、これらの新たに作り出された神経細胞の 80% 以上は梗塞巣周辺で生存することができず、機能的な神経細胞に分化できる新生細胞はげっ歯類脳内においてもただか 2-3% 程度と推定されている (Arvidson A, et al., Nat Med, 2002)。このように、いくら脳損傷後の神経前駆細胞の増殖を活性化させたとしても、梗塞巣周辺で新生細胞が死滅し効率的に自己修復ができないことは大きな問題点であり、新生神経細胞の生存を促進する環境を作り出すことができれば真に効率的な神経再生治療を実現できると考えられる。

2. 研究の目的

新たな神経細胞の多くが死滅してしまう主要な原因の一つは、梗塞巣周辺に惹起される強い炎症と考えられている。すなわち、脳梗塞では虚血急性期より炎症性サイトカインが産生され、マイクログリアが活性化し、白血球/リンパ球/マクロファージが末梢血より侵入し、これらの炎症性変化はもともと存在する神経細胞の細胞死を促進するだけでなく、新生細胞の生存へも悪影響を与えることが知られている。

そのため、梗塞脳における自己再生能力を現実的/効率的なものにするためには、特に梗塞巣及びその周辺領域に局限した部位での炎症を制御することが必要と考えられる。

近年、炎症抑制作用のあるリンパ球として制御性 T 細胞が知られるようになった。以前より、抗原を低容量投与することにより、再び同じ抗原に暴露されたときの炎症反応が抑制される現象が知られており、免疫寛容あるいは Bystander suppression と呼ばれている。この抗原暴露に対する炎症反応を抑制する作用の中心となるリンパ球 (T 細胞) が制御性 T 細胞であり、近年この制御性 T 細胞の分化に必須な転写因子「Foxp3」が我が国で同定され飛躍的に知見が増えている (Hori S, et al., Science, 2003)。この制御性 T 細胞は炎症抑制的サイトカインである TGF- β や IL-10 を産生し、細胞障害性 T 細胞による細胞傷害の抑制、炎症性サイトカイン放出抑制、及び脳内ではマイクログリアの活性化を抑制する能力があると考えられている。本研究の目的は、脳梗塞時に脳内に発現する抗原特異的な制御性 T 細胞を梗塞巣周辺に誘導することで、脳内の炎症反応が抑制されるか、脳梗塞後の神経新生が促進されるか、あるいは神経新生にかかわる血管やグリア細胞の Niche (脳内環境) へ及ぼす影響と効果を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 脳梗塞モデルとしては、Spontaneous hypertensive rat (SHR) の中大脳動脈を閉塞することにより作製した。

(2) 虚血脳内に制御性 T 細胞を誘導する目的で、虚血作製前に E-selectin 蛋白を経鼻粘膜に少量反復投与した。この手法では、E-selectin 特異的な制御性 T 細胞が誘導されることが知られている。

(3) 脳梗塞作成後に、分裂細胞を標識する目的で BrdU を一定期間腹腔内投与した。また、行動機能評価も経時的に行った。

(4) 制御性 T 細胞を定量するために、CD4 抗体、Foxp3 抗体を用い Cell sorter 及び免疫染色で解析した。

(5) 神経新生に関しては、BrdU 陽性細胞を doublecortin (Dcx) や NeuN などの細胞特異的マーカーで二重染色することにより評価した。定量は、Stereology software を用いパイアスの入らない手法を用いた。

(6) Niche (脳内環境) を解析するために、新生細胞と血管内皮細胞の関連やマイクログリアの活性化の状態を解析した。

4. 研究成果

(1) E-セレクトイン投与による制御性T細胞誘導効果

CD4 陽性 Foxp3 陽性の制御性T細胞は、E-セレクトインを鼻腔粘膜投与した脳虚血群の頸部リンパ節および虚血脳で有意に増加していることが確認された。さらに虚血脳の免疫組織染色では、制御性T細胞は主に梗塞巣周辺部位に検出された。この結果から、E-セレクトイン投与により、実際に制御性T細胞が誘導され、脳梗塞後には虚血周辺部位に浸潤していると考えられた。

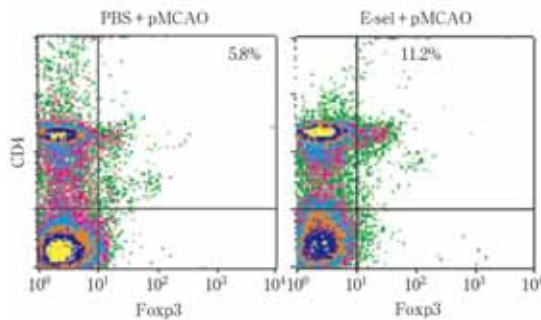


図1: CD4抗体、Foxp3抗体を用いたcell sorterの結果。CD4陽性Foxp3陽性制御性T細胞は、E-selectin投与した脳梗塞群(右)で有意に増加していた(5.8% vs. 11.2%)

(2) 制御性T細胞誘導状態での、神経新生の評価

制御性T細胞が虚血脳内に誘導されることにより、虚血後に賦活化する神経新生が変化するかどうかを検討した。梗塞巣周辺に存在する幼若ニューロンの定量 doublecortin 抗体を使用して、免疫染色およびウエスタンブロット法で確認したところ、E-セレクトイン投与群で doublecortin 蛋白量が明らかに多く検出され、主には梗塞巣周辺で幼若ニューロンが多数観察された。

また、BrdU 陽性 NeuN 陽性細胞(新生成熟新生細胞)もE-セレクトイン投与群で明らかな増加を認めた。

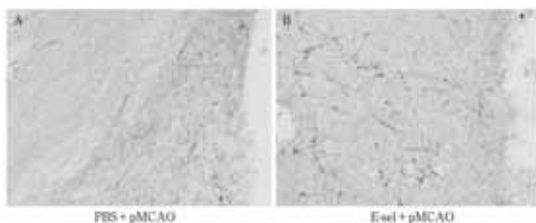


図2: Doublecortin抗体を用いた免疫染色の結果。E-selectin投与群(右)では、梗塞巣周辺にDoublecortin陽性の幼若ニューロンを多数認めた。

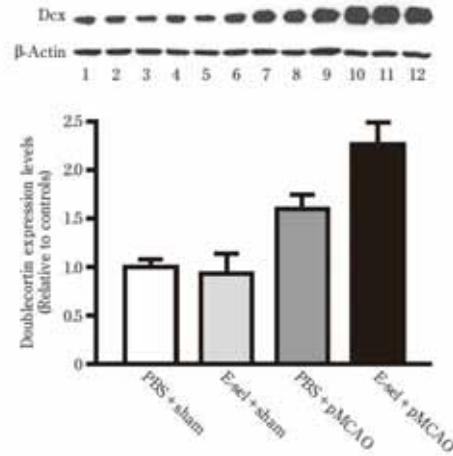


図3: 虚血脳のウエスタンブロット法によるdoublecortin蛋白量の測定。正常脳やE-セレクトイン非投与群と比較して、E-セレクトインを投与した脳梗塞ラット(E-sel + pMCAO)ではdoublecortin蛋白量が増加していた。

(3) Vascular niche 及び脳内炎症の評価

これらの新生幼若ニューロンは虚血巣では主に血管周辺に存在し、その中でもTNF- α を発現していない血管周辺で多く検出された。つまり制御性T細胞は、その免疫調整能力から虚血部位の血管内皮細胞の活性化を抑制し、幼若ニューロンの生存を促進させている可能性が考えられた。

また、MHCIIを発現したミクログリア(活性化ミクログリア)を免疫染色で定量した結果、E-セレクトイン投与群では、活性化ミクログリアの明らかな減少を認め、脳内炎症が抑制されていることが確認された。

(4) 神経機能の評価

運動機能、体性感覚機能を経時的に評価したところ、E-セレクトイン投与群は非投与群と比較して明らかな改善効果を認め、制御性T細胞を虚血脳内に誘導することで、神経機能が改善することが確認された。

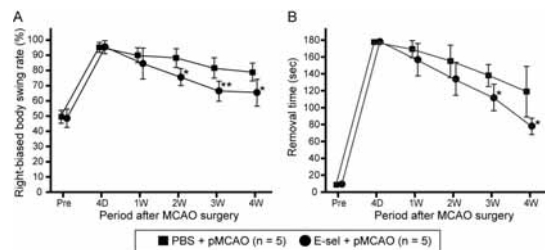


図4: 脳梗塞モデルラットでの、行動機能評価の結果(左:運動機能、右:体性感覚機能) E-セレクトイン投与群では、虚血2-3週間後より、神経機能の改善を認めた。

以上の結果から、以下の点が明らかとなった。
(1) E-セレクトイン蛋白の経鼻投与により、脳梗塞後に制御性T細胞が虚血脳内に誘導される。

(2) 制御性T細胞が虚血脳内に誘導されることにより、

- ✓ 新生した幼若ニューロン数が、梗塞巣周辺で増加する。
- ✓ 新生した成熟神経細胞数も梗塞巣周辺で増加する。
- ✓ TNF- α を発現した活性化血管内皮細胞が減少し、内皮細胞周辺に存在する幼若ニューロンの生存が促進される。
- ✓ MHCII を発現した活性化ミクログリアが減少する。
- ✓ 神経機能が改善する。

結論

制御性T細胞を虚血脳内に誘導することにより、新生神経細胞の生存が促進される環境に整えられ、より効率の良い神経再生治療が実現できる。

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5件)

1. Xu H, Miki K, Ishibashi S, Inoue J, Sun L, Endo S, Sekiya I, Muneta T, Inazawa J, Dezawa M, Mizusawa H. Transplantation of neuronal cells induced from human mesenchymal stem cells improves neurological functions after stroke without cell fusion. J Neurosci Res. 2009;88:3598-3609. 査読有り

2. 石橋哲. 脳梗塞後の炎症制御と神経再生. 臨床神経. 2010;50:882-885. 査読有

3. Ishibashi S, Maric D, Mou Y, Ohtani R, Ruetzler C, Hallenbeck JM. Mucosal tolerance to E-selectin promotes the survival of newly generated neuroblasts via regulatory T-cell induction after stroke in spontaneously hypertensive rats. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2009;29:606-620. 査読有

4. Miki K, Ishibashi S, Sun L, Xu H, Ohashi W, Kuroiwa T, Mizusawa H. Intensity of chronic cerebral hypoperfusion determines white/gray matter injury and cognitive/motor dysfunction in mice. J Neurosci Res. 2009;87:1270-1281. 査読有

5. Sun L, Kuroiwa T, Ishibashi S, Miki K, Li S, Xu H, Endo S, Mizusawa H. Two region-dependent pathways of eosinophilic

neuronal death after transient cerebral ischemia. Neuropathology 2009;29:45-54. 査読有

[学会発表](計4件、招待講演1件)

1. 石橋哲. 招待講演 脳血管障害治療の次のブレークスルーを目指して: Immunomodulation by inducing tolerance to E-selectin and adult neurogenesis after stroke. 第51回日本神経学会総会. 2010.5.21. 東京

2. 石橋哲, 水澤英洋, John Hallenbeck. 脳虚血後の制御性T細胞誘導による活性型ミクログリアに対する効果の検討. 第51回日本神経学会総会. 2010.5.22. 東京

3. 石橋哲, John M. Hallenbeck, 水澤英洋. ラット中大脳動脈閉塞モデルを使用した制御性T細胞誘導が脳梗塞後のneurovascular nicheに与える効果の検討. 第50回日本神経学会総会. 2009.5.22. 仙台

4. 石橋哲, John M. Hallenbeck, 水澤英洋. ラット中大脳閉塞モデルを使用した制御性T細胞の誘導が神経新生に与える効果の検討. 第34回日本脳卒中学会総会. 2009.3.22. 島根

[図書](計2件)

1. 石橋哲. John M. Hallenbeck. Clinical Neurosic. 2009;27: 1181. 中外医学社

2. 石橋哲. 学会印象記 第19回 European Stroke Conference (ESC) 2010. Brain & Nerve. 2011; 63:86-87.

[その他]

ホームページ等

東京医科歯科大学神経内科 website

<http://www.tmd.ac.jp/med/nuero/study.html#5>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 哲 (ISHIBASHI SATORU)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 30533369

(2) 研究分担者

なし

