

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591590

研究課題名（和文） 免疫反応を調節する制御性T細胞の脳虚血に対する保護機構

研究課題名（英文） Protective effects of regulatory T cells on ischemic brain damage

研究代表者

阪中 雅広（Sakanaka Masahiro）

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60170601

研究成果の概要（和文）：

Organic cation transporter 3 (= OCT3)はヒスタミンの分解・排出に関与することが知られている。ヒスタミンは炎症に関与しており、脳虚血時における炎症機構の重要性が最近注目されている。そこで本研究ではOCT3ノックアウトマウスを用いて、ヒスタミンが脳虚血に及ぼす影響を検討した。その結果、OCT3をノックアウトすると虚血領域でのヒスタミン量は増大し、脳虚血障害は改善した。更に制御性T細胞の減少も改善し、脳虚血時の制御性T細胞の減少が脳虚血障害を増悪させる因子であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The organic cation transporters 3 (= OCT3) was identified as an uptake-2 transporter, responsible for clearance of histamine. Because increasing evidence suggests the involvement of histamine in cerebral ischemia, we investigated the effects of targeted disruption of OCT3 on the severity of ischemic brain damage. Transient focal ischemia for 1 hour was induced by occlusion of the middle cerebral artery (MCA) of homozygous Oct3-deficient mice and their wild type littermates. Consequently, targeted disruption of OCT3 significantly increased histamine content in the ischemic cortex and significantly reduced the infarct volume after cerebral ischemia. Furthermore, this disruption prevented the reduction of regulatory T cell proportion after cerebral ischemia. Since repeated administration of L-histidine (a precursor of histamine) to wild-type mice also showed the same effects, our observations suggested that OCT3 is the molecule responsible for clearance of ischemia-induced histamine in the brain and targeted disruption of OCT3 ameliorated ischemic brain damage through an increase in regulatory T cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳虚血、制御性T細胞、FoxP3、ヒスタミン

1. 研究開始当初の背景

正常個体の免疫系には自己反応性 T 細胞を抑制する活性をもった「制御性 T 細胞」とよばれる T 細胞のサブセットが存在し、病的免疫応答を制御していることが明らかになっている。そして自己免疫疾患の発生を抑制する機能を持った T 細胞を単離する試みがなされ、1995 年に CD25 を発現する CD4+ T 細胞がこの機能を持つことが明らかにされた (J Immunol 155:1151-1164, 1995)。この自己寛容を担う T 細胞は、CD4+CD25+制御性 T 細胞と呼ばれるようになり、転写因子 FoxP3 が制御性 T 細胞 (= Treg) のマスター遺伝子として機能するということが明らかとなった (Science 299:1057-1061, 2003)。その後の研究により Treg は自己免疫のみならず、アレルギー、炎症、移植免疫、感染免疫、腫瘍免疫といったほとんどあらゆる種類の免疫反応を制御する能力を持つことが示され、免疫系における恒常性の維持に必須の役割を果たしていることが明らかとなった。

2. 研究の目的

近年年脳虚血の病態機構に各種炎症性サイトカインを含む免疫系の及ぼす影響の重要性が認識されるようになってきている (Nat Med.17:796-808, 2011)。即ち、脳虚血も炎症の 1 つであり、脳虚血に伴う組織障害により引き起こされる炎症反応が、脳虚血の病態機構に重要な影響を及ぼすと考えられるようになってきた。

炎症の主要なメディエータとしてヒスタミンが知られている。ヒスタミンは炎症・アレルギー・胃酸分泌・神経伝達と言った生体反応を調節する生体アミンであり、生体内の広い範囲で多彩な作用を有することが知られている。脳虚血の際に、ヒスタミンは興奮性アミノ酸の放出を抑制し、脳虚血障害を改善させることが知られている。そしてあらかじめ脳室内にヒスタミンを投与しておくことで脳虚血障害が改善し、逆にヒスタミン H2 受容体遮断薬を投与すると脳虚血障害が増悪することも明らかとなっている (Brain Res Rev 50: 275-86, 2005)。

ヒスタミン等の活性化アミンの分解・排出に関与する物質として Organic cation transporter (=OCT) が知られている。このうち、特に OCT3 はヒスタミンの分解・排出にかかわる分子として知られている (J Exp Med 202:387-93, 2005)。更にヒスタミンには Treg を誘導する作用があることが明らかとなっている (J Immunol 178:8081-8089, 2007)。そこで本研究では OCT3 のノックアウトマウスを用いて、脳虚血と制御性 T 細胞、及びヒスタミンとの関係

を詳細に検討することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 動物

本実験には 16 週齢の OCT3 knockout mice (homo type) とその littermate を用いた。実験動物を一定の明暗サイクル及び温度 (22±1°C) 条件下に飼育し、餌と水は自由摂取とした。以下の実験は愛媛大学医学部倫理委員会の承諾を得た後、愛媛大学医学部動物実験指針に則り行われた。

2) 右中大脳動脈の一過性閉塞

ナイロン栓子法により右中大脳動脈起始部を 60 分間閉塞させた後再灌流させた。虚血中及び再灌流後 1 時間は直腸温を 37.0±0.2°C に保った。その後麻酔から覚醒していることを確認後、室温の飼育ケージに戻した。一部の動物ではコントロール群として sham 手術 (頸部皮膚の正中切開は行うが、中大脳動脈の閉塞は行わない) を行った。

3) TTC 染色

再灌流 24 時間後に断頭し、1 mm 幅の脳スライスを作製した後、2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) にて 30 分間染色した。その後、4% paraformaldehyde 液にて一晚固定した。脳梗塞量は TTC 染色後の脳スライスを画像に取り込み、梗塞量を定量した。

4) ヒスタミン濃度測定

Yamatodani 等の方法 (J Chromatogr 344: 115-23, 1985) に従い、high-performance liquid chromatography (HPLC)-fluorometry 法にてヒスタミン濃度測定を行った。

5) T 細胞 subset の測定

マウスの過剰量のペントバルビタール (0.1g/kg) を投与して安楽死させた後、血液を経心臓的に採取した。その後 Th1 細胞と Th2 細胞を同定するために、PE/Cy5-conjugated anti-mouse CD4 抗体、FITC-conjugated anti-mouse IFN- γ 抗体そして PE-conjugated anti-mouse IL-4 抗体 (Biolegend, San Diego, CA, USA) を用いて血球細胞をラベルした。また制御性 T 細胞を同定するために、APC-conjugated anti-mouse CD4 抗体、PE-conjugated anti-mouse CD25 抗体そして Alexa fluor-488-conjugated anti-mouse FOXP3 抗体 (Biolegend) を用いて血球細胞をラベルした。その後ラベルされた細胞を FACScan flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences, Pasadena, CA, USA) にて解析した。

6) 統計的処理

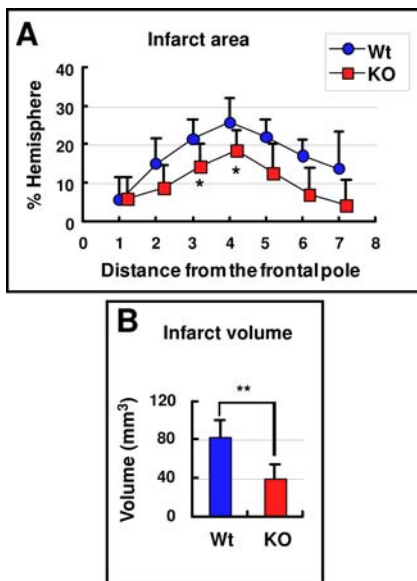
各分析データは One way 又は Two way analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison test にて評価し、p 値が 0.05 以下を有意とした。全てのデータは mean±SD にて表記した。

4. 研究成果

1) OCT3 による脳虚血障害の増強作用

homozygous OCT3 knockout mice (KO) と wild type (Wt) での 1 時間の中大脳動脈閉塞後再灌流を行い、血流再開後 24 時間目での脳梗塞量を TTC 染色にて検討した。その結果、Wt に比して KO では明らかに脳梗塞量が減少した(図 1 A、B)

図 1 脳梗塞量



2) 脳虚血領域でのヒスタミン濃度に OCT3 の及ぼす影響

脳虚血後のヒスタミン濃度に OCT3 の及ぼす影響を検討するため、脳の各領域でのヒスタミン濃度を経時的に検討した (図 2)。

図 2 での略字は以下の通り。

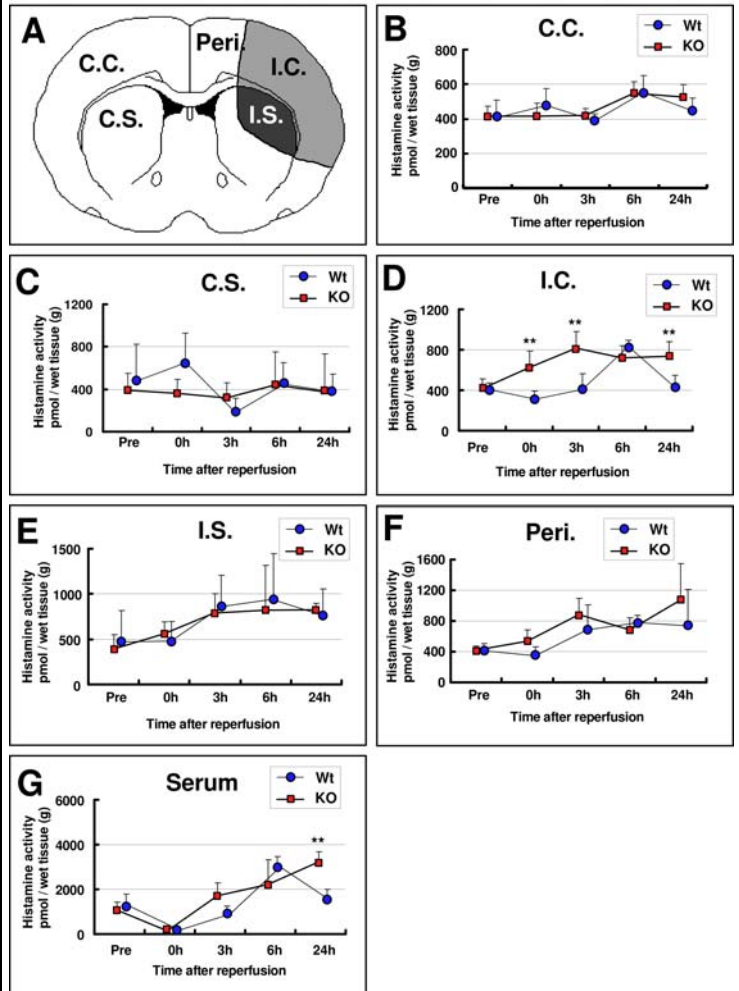
IC: 虚血側大脳皮質、IS: 虚血側線条体、peri: 傍虚血領域の正常大脳皮質、CC: 反対側正常大脳皮質、CS: 反対側正常線条体

Pre: 脳虚血前、0h: 1 時間の脳虚血後、再灌流開始前、3h: 再灌流後 3 時間目、6h: 再灌流後 3 時間目、24h: 再灌流後 24 時間目。

図 2D に示すように、虚血側大脳皮質 (IC) において、虚血前では OCT3 のノックアウト (KO) マウスと野生型 (WT) マウスでのヒスタミン濃度に変化を認めなかったが、虚血再灌流後 0h, 3h, 24h の時点でのヒスタミン濃度は KO マウスの方が WT マウスより有意に高かった。それ以外の領域では両者に差を認めな

った。一方血清では KO マウス、WT マウスとも一過性にヒスタミン濃度が減少するが、その後回復し、再灌流後 24 時間目のヒスタミン濃度は KO マウスの方が WT マウスより有意に高かった (図 2G)

図 2 脳虚血後のヒスタミン濃度変化

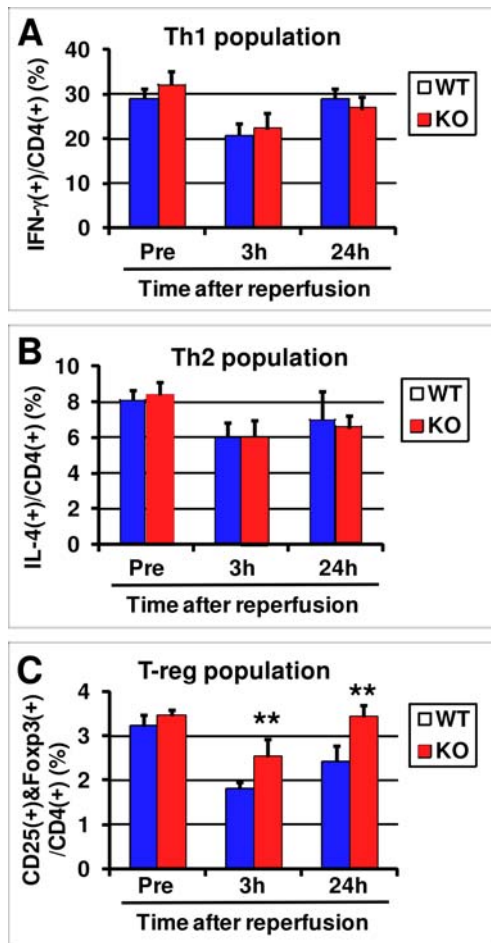


3) 脳虚血後の T 細胞 subset に OCT3 の及ぼす影響

脳虚血前、血流再開後 3 時間目と 24 時間目に採血し、白血球を蛍光標識した抗 CD4 抗体、抗 IFN- γ 抗体、抗 IL-4 抗体、抗 CD25 抗体そして抗 Foxp3 抗体でラベルし、それぞれの抗体でラベルされた細胞の数を FACSscan flow cytometer で測定した。そして CD4 陽性細胞の中で IFN- γ 陽性細胞の比率 (Th1 細胞比率) と CD4 陽性細胞の中で IL-4 陽性細胞の比率 (Th2 細胞比率)、さらには CD4 陽性細胞の中で CD25 と Foxp3 陽性細胞の比率 (制御性 T 細胞比率) を計測した。その結果 Th1 細胞比率と Th2 細胞比率は脳虚血により有意な変化を認めなかった。一方制御性 T (=Treg) 細胞比率は OCT3 KO マウスと WT マウスで共に虚血・再灌流後 3 時間目には一過性に減少するが、KO マウスでは WT に比して有意に Treg 細

胞の比率は高かった (図 3C)

図 3 Th1, Th2 及び Treg 細胞比率変化

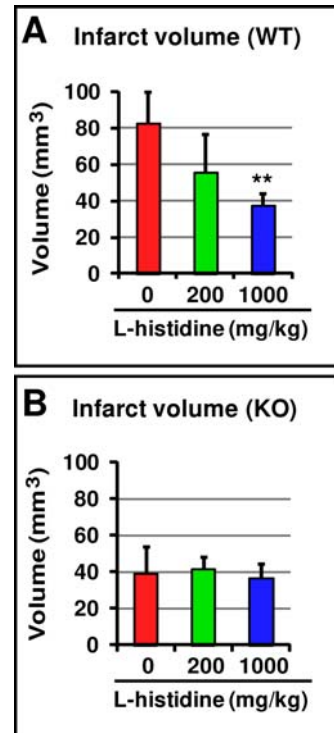


4) ヒスタミンの前駆体 (L-ヒスチジン) の投与が脳梗塞量に及ぼす影響

ヒスタミンの分解・排出に関与する OCT3 をノックアウト (=KO) したマウスでは、脳虚血後虚血側大脳皮質や血清のヒスタミン濃度は野生型 (=WT) マウスに比して有意に高く、脳梗塞量も有意に減少した。更に血清中の Th1 細胞や Th2 細胞の比率は両者で有意差を認めなかったが、制御性 T (Treg) 細胞比率は脳虚血・再灌流後では KO マウス群で有意に上昇していた。そこでヒスタミンの前駆体である L-ヒスチジンを投与した時の影響を検討した。

L-ヒスチジン (0, 200 or 1000mg/kg) を脳虚血直前に投与し、再灌流後 6 時間目に同じ量を再度投与し、再灌流後 24 時間目に TTC 染色にて脳梗塞量の検討を行った。その結果 WT マウスでは L-ヒスチジンの投与により脳梗塞量の減少を認めた (図 4A)、一方 KO マウスでは WT マウスに比して脳梗塞量は既に有意に減少しており、L-ヒスチジン投与にても脳梗塞量の変化を認めなかった (図 4B)。

図 4 L-ヒスチジンの投与と脳梗塞量



5) ヒスタミンの前駆体 (L-ヒスチジン) の投与が脳虚血後のヒスタミン濃度や Treg 細胞比率に及ぼす影響

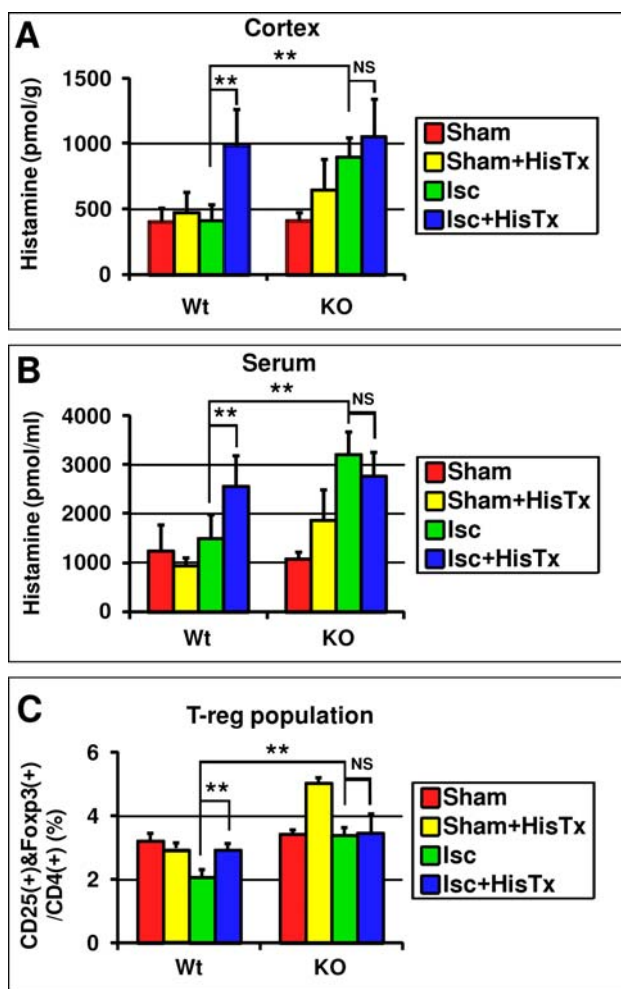
OCT3 の KO マウスとその WT マウスに L-ヒスチジン (1000mg/kg) を脳虚血又は sham 手術 (頸部皮膚の正中切開は行うが、中大脳動脈閉塞は行わない) 直前に投与し、再灌流後 6 時間目に同じ量を再度投与し、再灌流後 24 時間目に脳虚血側の大脳皮質と血清のヒスタミン量と血清の Treg 細胞比率を計測した (図 5)。

その結果 WT マウスでは L-ヒスチジンを投与しても大脳皮質でのヒスタミン量は変化しなかった、しかしながら脳虚血を負荷すると再灌流後 24 時間目では L-ヒスチジンの投与により大脳皮質でのヒスタミン量は有意に増大した。一方 OCT3KO マウスでは、L-ヒスチジンの投与により大脳皮質でのヒスタミン量は有意に増大した。そして脳虚血を負荷すると大脳皮質でのヒスタミン量は、WT マウスで L-ヒスチジンを投与し虚血負荷を行った場合とほぼ同じ程度高値となり、OCT3KO マウスに L-ヒスチジンを投与し虚血負荷を行っても、それ以上ヒスタミン量の増大を認めなかった (図 5A)。上記傾向は血清でのヒスタミン量に関してもほぼ同様の傾向を示した (図 5B)。一方 Treg 細胞比率に関しては WT マウスに L-ヒスチジンを投与しても Treg 細胞比率は変化しなかった。更に脳虚血負荷を加えた時の Treg 細胞比率の減少は L-ヒス

チジン投与にて有意に改善した。一方 OCT3KO マウスでは、L-ヒスチジン投与にて有意に Treg 細胞比率は上昇した。脳虚血を負荷すると、WT マウスで L-ヒスチジンを投与して虚血負荷を与えた場合と同じ程度高値であり、CT3KO マウスに L-ヒスチジンを投与し虚血負荷を行っても、それ以上 Treg 細胞比率の増大を認めなかった (図 5C)。

図 5 の略語は以下の通り。Sham: sham 手術 (頸部皮膚の正中切開を行うが、中大脳動脈の閉塞は行わない) 施行群。HisTx: L-ヒスチジン (100mg/kg) 投与群。Isc: 中大脳動脈 1 時間閉塞群

図 5 L-ヒスチジンの投与とヒスタミン濃度及び Treg 細胞比率



6) 結語

ヒスタミンの分解・排出に関与する OCT3 をノックアウト (=KO) したマウスでは、虚血側大脳皮質や血清のヒスタミン濃度は野生型 (=WT) マウスに比して虚血後 24 時間目には有意に高く、脳梗塞量も有意に減少した。更に血清中の Th1 細胞や Th2 細胞の比率は両者で有意差を認めなかったが、制御性 T (Treg)

細胞比率は KO マウス群で虚血後 24 時間目には有意に上昇していた。そして WT マウスにヒスタミンの前駆体である L-ヒスチジンを投与したところ、大脳皮質及び血清のヒスタミン濃度には変化が見られず、血清中の Treg 細胞比率も変化しなかった。一方ヒスタミンの分解・排出に関与する OCT3 を KO したマウス (=OCT3KO) では L-ヒスチジンの投与により、大脳皮質及び血清のヒスタミン濃度が上昇し、Treg 細胞比率も上昇した。

更に脳虚血負荷を与えた場合には、WT マウスでは L-ヒスチジンの投与により虚血側大脳皮質及び血清のヒスタミン濃度が上昇し Treg 細胞比率も上昇した。また OCT3KO マウスでは大脳皮質及び血清のヒスタミン濃度は脳虚血負荷により既に高値となっており L-ヒスチジンを投与してもそれ以上は上昇しなかった。また Treg 細胞比率も虚血負荷により既に高値であり、L-ヒスチジンを投与してもそれ以上は上昇しなかった。以上のデータより、組織ヒスタミン濃度は Treg 細胞比率と関連しており、脳虚血時に見られる、Treg 細胞比率の減少を改善することで、脳虚血障害を改善しうるということが明らかとなった。

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 14 件) すべて査読有り

1. Tei N, Tanaka J, Sugimoto K, Nishihara T, Nishioka R, Takahashi H, Yano H, Matsumoto S, Ohue S, Watanabe H, Kumon Y, Ohnishi T: Expression of MCP-1 and fractalkine on endothelial cells and astrocytes may contribute to the invasion and migration of brain macrophages in ischemic rat brain lesions. *J Neurosci Res*. 91:681-93, (2013)

2. Kimura Y, Sumiyoshi M, Sakanaka M: Effects of ginsenoside Rb₁ on skin changes. *J Biomed Biotechnol*. 2012:946242, (2012)

3. Zhu P, Hata R, Ogasawara M, Cao F, Kameda K, Yamauchi K, Schinkel AH, Maeyama K, Sakanaka M: Targeted disruption of organic cation transporter 3 (Oct3) ameliorates ischemic brain damage through modulating histamine and regulatory T cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 32:1897-908, (2012)

4. Ohue S, Kohno S, Inoue A, Yamashita D, Harada H, Kumon Y, Kikuchi K, Miki H, Ohnishi T: Accuracy of diffusion tensor

magnetic resonance imaging-based tractography for surgery of gliomas near the pyramidal tract: a significant correlation between subcortical electrical stimulation and postoperative tractography. *Neurosurgery*. 70:283-93, (2012)

5. Nishihara T, Ochi M, Sugimoto K, Takahashi H, Yano H, Kumon Y, Ohnishi T, Tanaka J. Subcutaneous injection containing IL-3 and GM-CSF ameliorates stab wound-induced brain injury in rats. *Exp Neurol*. 229:507-16, (2011)

6. Taguchi A, Zhu P, Cao F, Kikuchi-Taura A, Kasahara Y, Stern DM, Soma T, Matsuyama T and Hata R.: Reduced ischemic brain injury by partial rejuvenation of bone marrow cells in aged rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 31: 855-67, (2011)

7. Cao F, Hata R, Zhu P, Nakashiro K and Sakanaka M: Conditional deletion of Stat3 promotes neurogenesis and inhibits astrogliogenesis in neural stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 394:843-7, (2010).

8. Cao F, Hata R, Zhu P, Takeda S, Yoshida T, Hakuba N, Sakanaka M and Gyo K.: Delayed neuronal cell death in brainstem after transient brainstem ischemia in gerbils. *BMC Neurosci*. 14:11:115-126, (2010)

9. Inoue A, Takahashi H, Harada H, Kohno S, Ohue S, Kobayashi K, Yano H, Tanaka J, Ohnishi T. Cancer stem-like cells of glioblastoma characteristically express MMP-13 and display highly invasive activity. *Int J Oncol*. 37: 1121-31, (2010)

10. Ohue S, Fukushima T, Friedman AH, Kumon Y, Ohnishi T. Retrosigmoid suprafloccular transhorizontal fissure approach for resection of brainstem cavernous malformation. *Neurosurgery*. 66: 306-12, (2010)

11. Ohue S, Kumon Y, Nagato S, Kohno S, Harada H, Nakagawa K, Kikuchi K, Miki H, Ohnishi T. Evaluation of intraoperative brain shift using an ultrasound-linked navigation system for brain tumor surgery. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 50: 291-300, (2010)

12. Ohue S, Fukushima T, Kumon Y, Ohnishi T, Friedman AH. Surgical management of brainstem cavernomas: selection of approaches and microsurgical techniques. *Neurosurg Rev*. 33: 315-22, (2010).

13. Smirkin A, Matsumoto H, Takahashi H, Inoue A, Tagawa M, Ohue S, Watanabe H, Yano H, Kumon Y, Ohnishi T, Tanaka J. Iba1(+)/NG2(+) macrophage-like cells expressing a variety of neuroprotective factors ameliorate ischemic damage of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 30:603-15, (2010)

14. Inoue A, Takahashi H, Harada H, Kohno S, Ohue S, Kobayashi K, Yano H, Tanaka J, Ohnishi T. Cancer stem-like cells of glioblastoma characteristically express MMP-13 and display highly invasive activity. *Int J Oncol*. 37:1121-31, (2010)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪中 雅広 (Sakanaka Masahiro)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60170601

(2) 研究分担者

大西 丘倫 (Onishi Takanori)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70233210

久門 良明 (Kumon Yoshiaki)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80127894

朱 鵬翔 (Jyu Penjan)
愛媛大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40380216