

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10836

研究課題名(和文) 梗塞巣への細胞浸潤を促進して脳梗塞を治す

研究課題名(英文) Treatment of cerebral infarction by facilitation of cell infiltration

研究代表者

久門 良明 (Kumon, Yoshiaki)

愛媛大学・医学部・研究員

研究者番号：80127894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ラット一過性中大脳動脈閉塞tMCAOモデルに、サイトカインのIL-3とGM-CSFの皮下注射を行い、脳梗塞に対する効果を調べた。その結果、tMCAOによる梗塞脳の脳体積減少を半分に抑え、空間学習記憶能力や運動能力の障害を改善させた。サイトカイン投与により、梗塞中心部では神経保護作用をもつBINCs (NG2陽性マクロファージ)を集簇させるとともに、貪食や起炎症作用のあるCD200陽性マクロファージを減少させて、脳梗塞の増悪を抑制していた。梗塞辺縁部ではアポトーシス抑制分子のBcl-xLが高発現し、神経細胞のアポトーシスが抑制されていた。これらの機序により予後が改善されたと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、虚血脳に浸潤する細胞の神経保護的機能を利用した治療法の開発を目指している。ヒト脳では梗塞脳に浸潤する神経保護作用をもつ細胞数が少ない為に、脳梗塞に陥る可能性を示した。そのため、これまで、神経保護効果を持つ浸潤細胞を直接虚血脳内に注入することによる脳梗塞治療の有効性を明らかにしてきた。しかし、脳内へ注入する操作は侵襲的であり、急性期治療には適当でないと考えられる。今回は、薬物投与により神経保護的作用を持つ細胞の浸潤を増加させ、脳保護作用を発揮しやすい脳環境を作ることを目的とした。今、神経幹細胞療法が進んでいるが、その状況を薬剤投与により作り出す治療法であり、医療経済的にも意義がある。

研究成果の概要(英文)：The effects of subcutaneous injection of cytokines IL-3 and GM-CSF on cerebral infarction were studied in a transient MCA occlusion rat model. Brain volume 90 days after ischemia and motor and cognitive functions were examined in cytokine-treated rats, saline-injected rats, and sham-operated rats. Brain volume loss decreased about 50% less in cytokine-treated rats than in saline-injected rats. Motor impairment on the Rota-rod test and Open-field test and spatial cognitive dysfunction on the Morris water maze test were better in cytokine-treated rats than in saline-injected rats. In the cytokine-treated rat brain, there was heavy infiltration of brain Iba1+/NG2+ cells (BINC) having a neuroprotective function, and CD200+ macrophages with phagocytic and inflammatory activities were less infiltrated in the ischemic core. Bcl-xL, which inhibits neuronal apoptosis, was highly expressed, and apoptosis of neurons was reduced in the ischemic margin.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳梗塞 マクロファージ ミクログリア サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、*in vitro* 実験で、マイクログリアがニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトになるポテンシャルを有することを確認した (GLIA, 2004)。また、ラット局所脳虚血モデルを用いた *in vivo* 実験でも、虚血中心部に虚血後 7 日目をピークに、抗 anti-ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba 1) 陽性細胞および NG2 コンドロイチン硫酸プロテオグリカン陽性 (幹細胞に発現するとされる) 細胞が出現することを観察し、これらの細胞の中には、両者が陽性の細胞 brain Iba1⁺/NG2⁺ cells (BINCs と名付けた) が多数含まれることを明らかにした (J Neurosci Res, 2007)。さらに、Iba 1 陽性細胞の一部は nestin ないし glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性であることを見だし、虚血中心部に出現してくるマイクログリアには *in vitro* と同様に、多能性前駆細胞の役割を有するものが含まれる可能性を示した (Neurosci Lett, 2007)。そして、これが骨髄由来細胞であり、虚血脳より採取した多分化能をもつマイクログリアを虚血負荷後の虚血脳中心部に直接注入することにより、脳梗塞が軽減されることと栄養因子産生による機序を明らかにした (J Cereb Blood Flow and Metab, 2010)。さらに、脳梗塞中心部に集積するマクロファージには、BINCs だけでなく免疫抑制分子 CD200 を発現するが NG2 は発現しない集団が存在することも見いだしたが (J Neuroimmunol 2015)、この細胞集団は脳保護的とは考え難いものであった。さらに重要な知見として、高齢のヒト脳梗塞患者の梗塞巣中心部にも、Iba1 と NG2 を発現する BINCs が集積するものの、その集積は非常に少ないことが確認され (J Cereb Blood Flow and Metab, 2010)、予後の良い若いラットに比べ、ヒト脳梗塞の予後が悪い理由として、BINCs の集積密度が関与する可能性が高いと考えられた。我々は、高齢のヒト患者では骨髄機能が低下しているために、梗塞巣中心部での BINCs 集積密度が低下すると考え、骨髄刺激効果のあるサイトカインを脳損傷ラットに投与した。その結果、IL-3 と GM-CSF の混合投与が、脳損傷部位での BINCs の集積密度を高め、予後を大きく改善させた (Exp Neurol 2011)。GM-CSF は、強力な起炎症性サイトカインとして、TNF- α を介し、顆粒球・マクロファージに特異的に作用するとされている。一方、IL-3 は、造血前駆細胞の増殖や分化、活性化や生存を調節するとともに、肥満細胞や好酸球、好塩基球、単球、巨核球、赤血球系の細胞の分化を促進する幅広い機能を有している。GM-CSF は、これまでに脳梗塞モデル動物に対する治療効果は検討され、その有用性が示されている。一方、IL-3 の脳梗塞に対する治療効果の報告はない。

2. 研究の目的

我々はこれまで、これらの脳梗塞巣内の炎症細胞は、梗塞脳に対して保護的で予後改善に働く面と、傷害的で予後増悪に作用する両面があることを示してきた。そして、炎症細胞の性質を明らかにするとともに、これらの細胞の好ましくない性質を抑制し、好ましい性質を増強させる治療法の開発を目指してきた。その目的のために今回は、ラット局所脳虚血モデルに、骨髄からの単球系細胞動員の促進と神経細胞保護効果を併せた治療法として、IL-3 と GM-CSF の混合を皮下注射し、組織学と神経機能の両面よりその効果を確認する。さらにその機序を明らかにするために、浸潤細胞の数や局在、多分化能の有無、ならびに梗塞巣での様々な起炎症性メディエーター、神経栄養因子、アポトーシス関連因子の発現を観察する。そして、本治療法の虚血脳における起炎症性や神経保護効果への影響を明らかにし、浸潤細胞を促進させる新たな臨床的脳梗塞治療に結びつける。

3. 研究の方法

(1) 脳梗塞モデルの作成

生後 8 週の雄性ウィスターラットを使用する。脳梗塞モデルとして既に確立されている 90 分間一過性中大脳動脈閉塞 (transient MCA occlusion: tMCAO) モデルを作成する。虚血負荷翌日に MRI 撮像を行い、想定通りの脳梗塞巣が作成されていることを確認する。

(2) サイトカイン投与方法

GM-CSF は顆粒球・単球前駆細胞を特異的に刺激する作用があり、IL-3 は造血幹細胞の増殖や分化・活性化など幅広い作用をもつサイトカインである。GM-CSF (10 μ g/kg) と IL-3 (10 μ g/kg) を脳梗塞作成の翌日から連続 5 日間皮下投与した。

(3) 脳梗塞の形態的・機能的評価

梗塞領域の評価は、MRI T2WI で梗塞体積を計測し、その変化を比較する。発症から 90 日目まで経時的に評価してから梗塞脳を摘出し、残存脳体積を測定する。

運動機能評価は Open-field 試験と Rota-rod 試験を行い、高次脳機能は水迷路試験と 8 方向迷路試験を行う。

(4) 定量的リアルタイム RT-PCR (qPCR) およびウエスタンブロッティング

tMCAO モデル作成の 1 日、3 日、5 日、7 日後に線条体位置で 2mm 厚のスライスを作成し、脳梗塞巣中心部、辺縁部、対側の大脳皮質から組織を切り出し、全 RNA 及び SDS-PAGE 用に処理した。組織電気泳動サンプル、total RNA を調整し、それぞれウエスタンブロッティング、定量的リアルタイム RT-PCR (qPCR) を行った。

(5) 免疫組織化学的研究

tMCAO モデル作成の 1 日、3 日、5 日、7 日後にラットを灌流固定して凍結切片を作成し、

間接蛍光抗体法により免疫組織染色を行った。貪食、アポトーシス関連分子とマイクログリアおよび神経細胞マーカーとの多重免疫組織染色を行い、これらの因子の時間的・空間的分布について、高精度/高倍率の対物レンズを用いた共焦点顕微鏡による観察を行った。

4. 研究成果

(1) サイトカイン投与による脳梗塞の形態的・機能的予後評価

脳梗塞ラットのサイトカイン投与群と生食投与群で、脳梗塞体積を比較した。MRI 検査で 10 日後から 90 日後まで経時的变化を調べたところ、サイトカイン投与群で有意に梗塞体積が小さかった。また、90 日後に摘出した梗塞脳における脳体積欠損（対側半球体積-虚血側半球体積/対側半球体積 x100）は、サイトカイン投与群で 30%弱であり、生食投与群の 50%に比べて有意に少なかった。

次に、機能的予後評価として、高次脳機能と運動能力を評価した。空間学習記憶能力を Morris 水迷路試験で評価し、Sham 群、脳梗塞ラットサイトカイン投与群、脳梗塞ラット生食投与群で比較した。その結果、脳梗塞サイトカイン投与群は脳梗塞生食投与群に比べて Moved distance は有意に短く Sham 群と差はなく、Near-by duration は有意に長くなり、明らかな改善を示した。運動能力評価を Open-field 試験と Rota-rod 試験で行い、Sham 群、脳梗塞ラットサイトカイン投与群、脳梗塞ラット生食投与群で比較した。その結果、脳梗塞ラットサイトカイン投与群は脳梗塞ラット生食投与群に比べて、Open-field 試験では duration in central square が、Rota-rod 試験では落下までの時間が有意に長くなって明らかに改善し、Sham 群と同等であった。

(2) サイトカイン投与による脳梗塞改善メカニズム

脳梗塞ラットのサイトカイン投与群 (GM-CSF 単独、IL-3 単独、GM-CSF/IL-3 混合) と生食投与群において、NG2 と CD200 の発現を Real-time PCR 法で調べた。なお、我々はこれまでに、NG2 陽性マクロファージは神経保護的に作用し、CD200 陽性マクロファージは貪食作用をもち起炎症性メディエーターを発現する細胞であり、NG2 陽性は梗塞皮質の中心部でも中央部に多く、CD200 陽性細胞は梗塞中心部でも辺縁部に近い脳梁部分に集積していることを報告している。GM-CSF/IL-3 混合投与群の脳梗塞中心部では、NG2 の発現が有意に高く、CD200 の発現が有意に低かった。また、起炎症性マーカーの CD86 は、GM-CSF/IL-3 混合投与群、GM-CSF 単独投与群の脳梗塞中心部で有意に低かった。

次に、脳梗塞辺縁部で神経細胞の Bcl-xL の発現を調べた。Bcl-xL はミトコンドリア外膜に局在し、活性酸素によるミトコンドリア膜障害を防ぎ、アポトーシスを抑制する抗アポトーシス分子である。脳梗塞ラットに対して GM-CSF/IL-3 を皮下投与した 3 日後の脳組織で Bcl-xL の発現を調べたところ、生食投与群では神経細胞の Bcl-xL の発現が低いのに対し、GM-CSF/IL-3 混合投与群では、多くの神経細胞に Bcl-xL の発現が認められた。ウェスタンブロッティング法で、GM-CSF/IL-3 投与群では生食投与群に比べて Bcl-xL の発現が約 1.5 倍高かった。一次培養マイクログリアを GM-CSF/IL-3 添加の培養下で貪食マーカー、Eat-me signal の発現を非添加群と比べたところ、CD68、Cathepsin S、C3 の発現は有意に低下し、活性酸素の産生酵素である NOX2 も約 1/3 と有意に低下していた。したがって、GM-CSF/IL-3 の投与によって脳梗塞辺縁部における神経細胞のアポトーシスが抑制されていると示唆された。

(3) 結果のまとめと考察

GM-CSF と IL-3 のサイトカインには、3 か月間という長期にわたってラット脳梗塞巣を減少させ、運動能力と高次脳機能を改善させる作用があり、脳梗塞改善効果を有することが示された。

脳梗塞中心部においては、サイトカインを投与すると、我々がこれまで研究してきた神経保護的に作用する BINCS (NG2 陽性マクロファージ) を集簇させ、脳梗塞の増悪を抑制していた。一方、貪食や起炎症作用のある CD200 陽性マクロファージを減少させ、起炎症性メディエーターの発現も低下させていた。また、活性化したマイクログリアによって神経細胞の貪食像が多くみられる脳梗塞辺縁部では、神経細胞のアポトーシス抑制分子である Bcl-xL が高発現し、神経細胞のアポトーシスが抑制されていた。これはサイトカインの神経保護作用により、神経細胞のミトコンドリア機能が維持され、細胞内 ATP が増加し、細胞表面の Eat-me signal であるホスファチジルセリンが減少し、活性化したマクロファージやマイクログリアによる貪食を抑制しているためと考えられた。これらの効果により、サイトカインは、徐々に進行してくる遅発性の神経細胞死を抑制し、脳梗塞の形態的・機能的予後を改善したものと考察する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Islam A, Choudhury ME, Kigami Y, Utsunomiya R, Matsumoto S, Watanabe H, Kumon Y, Kunieda T, Yano H, Tanaka J.	4. 巻 1864 (3)
2. 論文標題 Sustained anti-inflammatory effects of TGF- 1 on microglia/macrophages.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta	6. 最初と最後の頁 721-734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2017.12.022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Abe N, Choudhury ME, Watanabe M, Kawasaki S, Nishihara T, Yano H, Matsumoto S, Kunieda T, Kumon Y, Yorozyua T, Tanaka J	4. 巻 66 (10)
2. 論文標題 Comparison of the detrimental features of microglia and infiltrated macrophages in traumatic brain injury: A study using a hypnotic bromovalerylurea.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2158-2173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia. 23469.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本 調、久門 良明、渡邊 英昭、田中 潤也、國枝 武治
2. 発表標題 脳梗塞に対するIL-3/GM-CSFの混合投与による骨髄刺激療法有効性の検討
3. 学会等名 Stroke2018第43回日本脳卒中学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 調、久門 良明、渡邊 英昭、田中 潤也、國枝 武治
2. 発表標題 ラット脳梗塞モデルにおける活性型および静止型マイクログリアと骨髄由来マクロファージの差異について
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第77回学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 調、井上明宏、渡邊英昭、久門良明、國枝武治、田中潤也
2. 発表標題 脳梗塞に対するIL-3/GM-CSFの混合投与による骨髄刺激療法有効性の検討
3. 学会等名 Stroke 2017第42回日本脳卒中学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松本 調、井上明宏、渡邊英昭、久門良明、國枝武治、田中潤也
2. 発表標題 ラット脳梗塞巣におけるIL-3とGM-CSF混合皮下投与の有効性の検討
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第76回学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松本 調、渡邊英昭、久門良明、國枝武治、田中潤也
2. 発表標題 ラット脳梗塞巣におけるIL-3とGM-CSF混合皮下投与の有効性の検討
3. 学会等名 第60回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	渡邊 英昭 (Watanabe Hideaki) (30322275)	愛媛大学・医学系研究科・准教授 (16301)	