

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07072

研究課題名（和文）骨髄に由来し脈絡叢を経由して脳に供給される免疫系細胞の動態と神経変性への関与

研究課題名（英文）Bone marrow-derived myeloid cells entering the brain via the choroid plexus are involved in neuroinflammatory and neurodegenerative conditions

研究代表者

島田 厚良（Shimada, Atsuyoshi）

杏林大学・保健学部・教授

研究者番号：50311444

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）：敗血症のような全身性炎症反応は脳症の危険因子であるが、炎症の影響を脳に伝達する仕組みには不明な点が多い。本研究では、全身性炎症の影響を脳実質に伝える仕組みを、成体期と新生児期で比較しながら明らかにしたいと考えた。実験の結果、成体では全身性炎症が生じて1～4時間後という極めて早期に、脳脊髄液を産生する脳室内の器官である脈絡叢の中で、間質細胞および上皮細胞が多彩なサイトカインを発現しながら互いを刺激し合い、炎症性変化を脳実質へと伝達することが分かった。これに対して、新生仔脳ではサイトカイン濃度の上昇が成体に比べて長時間持続するのが特徴であり、その発現細胞が血管内皮である点も成体とは異なっていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は全世界で年間5000万人もの人々が罹患し、1000万人が死亡する重大な疾患である。ICUで治療を受ける敗血症患者の約50%で脳症状が発生し、重症化の初期徴候であるが、画像上で脳に病変が確認できるのは約50%と謎の多い病態である。とりわけ早産児は免疫力がまだ弱く、敗血症をはじめとする全身性炎症を発症すると、発達途上の脳に何らかの病変が誘発され、脳性麻痺や神経発達症などの後遺障害をのこす。この際に全身性炎症の影響を脳に伝達する機序は不明である。我々は、ヒトでは早産児に相当する新生仔マウスを用いて新生児敗血症モデルを作製し、全身性炎症を脳に伝達する未熟脳に特有な機序の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Systemic inflammation such as sepsis is a risk factor for encephalopathy. However, it remains to be revealed how systemic inflammation induces changes in brain microenvironment. In the present study, we aimed to investigate the mechanism underlying systemic inflammation-induced pro-inflammatory changes in the brain microenvironment and to compare the mechanisms between adult and immature brains. Our experimental studies using adult mice indicated that the choroid plexus, an organ to produce cerebrospinal fluid, plays a key role to transmit systemic inflammation to brain parenchyma by cytokine-mediated intercellular stimulation between stromal and epithelial cells. On the other hand, elevation in the brain tissue cytokine concentration lasted longer in the immature brains when newborn mice were challenged with systemic inflammation. It should be noted that the main cell population involved in the cytokine production were vascular endothelial cells in immature brains.

研究分野：実験病理学、病態神経科学

キーワード：脈絡叢 神経炎症 敗血症関連脳症

1. 研究開始当初の背景

脳はかつて「免疫系から隔絶された特権器官」とされたが、近年では、脳と免疫系は相互作用して脳機能を維持すると考えられている。一方、精神神経疾患の多くでは末梢組織の慢性炎症に起因して脳組織にも炎症性微小環境が形成される。また、敗血症に代表される急性的な全身性炎症反応は脳症の危険因子である。しかし、全身性炎症の影響を脳に伝達する機序には不明な点が多い。我々はこれまでに、脳と免疫系のインターフェイスのひとつとして、骨髄由来ミエロイド細胞が脈絡叢を經由して脳に進入する仕組みが存在することを立証した。そこで、脈絡叢が機能的にも全身性炎症の影響を脳実質に伝える機能を有するかを実験的に確かめる必要がある。また、その仕組みが成体期と新生児期とは異なるのかについても不明な点が多い。

2. 研究の目的

成体期において、全身性炎症に応答して脈絡叢の中のどの細胞がいかなるサイトカインを産生して脳実質の微小環境を炎症性に偏向させるのかを明らかにする。

新生児期に生じた全身性炎症の影響が脳に伝達する仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

8週齢オスのC57BL/6Nマウスを用い、実験群にはLPSを3.0 mg/kg体重の用量で単回腹腔投与し敗血症モデルとした。対照群には生理食塩水(Saline)を同用量で投与した。LPS投与4時間後にPBSで全身灌流し、脈絡叢を摘出して液体窒素で瞬間凍結した。凍結新鮮組織からRNAを精製し、TaqMan chemistryにて種々のサイトカインをターゲットとしたreal-time RT-PCRを7500Fast (Applied Biosystems)を用いて行った。一方、組織標本作製のためには、LPSまたはsaline投与の1, 4, 24時間後に、8週齢マウスをZamboni液で全身灌流固定し、頭蓋と脳を含む頭部の凍結ブロックを作製した。クリオスタットで14 µmに薄切し、二重免疫蛍光染色を行った。

ヒトでは早産児に相当する生後7日齢(P7)のオスのC57BL/6Nマウスを用い、実験群にはLPSを0.75 mg/kg体重の用量で単回腹腔投与し新生児敗血症モデルとした。対照群にはSalineを同用量で投与した。LPS投与4時間後、24時間後にPBSで全身灌流し、脾臓および脳を摘出した。脳は領域別に分割後、液体窒素で瞬間凍結し、アッセイには左大脳皮質を用いた。凍結新鮮組織から蛋白質を抽出し、タンパク質多項目同時イムノアッセイ装置Luminex 200 xPONENT systemを用いて、次の15種類のサイトカイン濃度を測定した。G-CSF, CCL11, IFN- γ , IL-1 β , IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, CXCL10, CXCL1, CCL2, CXCL2, TNF- α 。一方、組織標本作製のためには、LPSまたはsaline投与の4, 24時間後にP7マウスをZamboni液で全身灌流固定し、頭蓋と脳を含む頭部の凍結ブロックを作製した。クリオスタットで14 µmに薄切し、免疫組織化学的染色、二重免疫蛍光染色を行った。

4. 研究成果

免疫組織学的検討の結果、LPS投与1時間後に脈絡叢間質のマクロファージがIL-1 β を発現し、受容する細胞が脈絡叢間質に存在すること、4時間後に間質細胞はIL-6を始めCXCL2, CCL2等を発現し、CXCL1, CXCL2の受容体も有していることが分かった。さらに、脈絡叢上皮がCXCL1, CXCL2を発現し、その受容体とIL-6の受容体を有していることが分かった。

一方、real-time RT-PCRの結果から、LPS投与4時間後に脈絡叢では*Il1b*, *Il6*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Ccl2*の遺伝子発現が急激かつ著明に上昇したことが証明され、免疫染色結果はmRNAレベルの遺伝子発現の定量化によって再確認できた。以上より、全身炎症の際に脳実質に先行して脈絡叢の上皮と間質の間でIL-1 β をきっかけとするサイトカインを介した密な細胞間相互作用が生じ、炎症を脳実質に伝達する初期応答を担っていることが証明された。

サイトカインのイムノアッセイの結果、大脳皮質、辺縁系、小脳で、LPS投与後に濃度上昇したサイトカインは6種類あった。そのうち、CCL2, CXCL10, G-CSFについては4時間後も24時間後も高濃度であった。脾臓では14種類のサイトカインが濃度上昇した。CCL2, CXCL10, G-CSFについては4時間後のみ高濃度を示した。脳内CCL2発現は軟膜血管および脳実質血管の内皮細胞に顕著に認められた。

一方、免疫染色の結果から、CCL2発現はLPS投与4時間および24時間後に軟膜血管および脳実質血管の内皮細胞に著明に上昇することが明らかとなった。また、抗Iba-1抗体を用いた免疫染色の結果から、海馬、大脳新皮質、小脳をはじめとする広い範囲において、Saline4時間後に比べLPS4時間後ではミクログリアの軽度肥大が認められた。Saline24時間後に比べLPS24時間後ではミクログリアの著明な肥大・増生が認められた。

[考察] 成体期の全身性炎症にいち早く応答する頭蓋内の組織は脈絡叢であり、その上皮細胞と間質細胞とが多彩なサイトカインを介して刺激し合うことによって、脳実質内に炎症性微小環境を誘導する。一方、新生仔期の全身性炎症に応答して脳内で濃度上昇したサイトカインは、成体期で濃度上昇したものと共通であったが、その濃度の経時変化パターンは成体とは異なっていた。新生仔脳の CCL2 上昇は長時間持続するのが特徴で、発現細胞が血管内皮である点も成体脳とは異なっていた。さらに、LPS 投与 4 時間から 24 時間後という早期にミクログリアが活性化した点も成体とは異なっていた。このような新生仔の特徴は、全身性炎症に応答して血管内皮細胞が主体となり CCL2 を産生すること、CCL2 に誘発されてミクログリアの進入が亢進することによってもたらされると考える。この免疫応答様式は、全身性炎症を脳に伝達する未熟脳に特有な機序を知る上で鍵を握ると考察できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Unno Keiko, Takagi Yoshiichi, Konishi Tomokazu, Suzuki Mitsuhiro, Miyake Akiyuki, Kurotaki Takumi, Hase Tadashi, Meguro Shinichi, Shimada Atsuyoshi, Hasegawa-Ishii Sanae, Pervin Monira, Taguchi Kyoko, Nakamura Yoriyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Mutation in Sodium-Glucose Cotransporter 2 Results in Down-Regulation of Amyloid Beta (A4) Precursor-Like Protein 1 in Young Age, Which May Lead to Poor Memory Retention in Old Age	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5579 ~ 5579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21155579	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 Furukawa Ayako, Kakita Akiyoshi, Chiba Yoichi, Kitaura Hiroki, Fujii Yukihiko, Fukuda Masafumi, Kameyama Shigeki, Shimada Atsuyoshi	4. 巻 168
2. 論文標題 Proteomic profile differentiating between mesial temporal lobe epilepsy with and without hippocampal sclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Epilepsy Research	6. 最初と最後の頁 106502 ~ 106502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.epilepsyres.2020.106502	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 Ohgami Nobutaka, Iizuka Akira, Hirai Hirokazu, Yajima Ichiro, Iida Machiko, Shimada Atsuyoshi, Tsuzuki Toyonori, Jijiwa Mayumi, Asai Naoya, Takahashi Masahide, Kato Masashi	4. 巻 296
2. 論文標題 Loss-of-function mutation of c-Ret causes cerebellar hypoplasia in mice with Hirschsprung disease and Down's syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100389 ~ 100389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100389	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 Noji Natsumi, Okayama Kaori, Oda Mizue, Shimada Atsuyoshi, Okodo Mitsuaki	4. 巻 2021
2. 論文標題 Human papillomavirus infection status of single cells isolated from cervical cytology specimens by simple manual microdissection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmv.26888	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimada Atsuyoshi, Hasegawa-Ishii Sanae	4. 巻 8
2. 論文標題 Increased cytokine expression in the choroid plexus stroma and epithelium in response to endotoxin-induced systemic inflammation in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology Reports	6. 最初と最後の頁 520 ~ 528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxrep.2021.03.002	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 Kelley Keith W., Peng Yu-Ping, Liu Quentin, Chang Hui-Chih, Spencer Sarah J., Hutchinson Mark R., Shimada Atsuyoshi	4. 巻 88
2. 論文標題 Psychoneuroimmunology goes East: Development of the PNIRS affiliate and its expansion into PNIRS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain, Behavior, and Immunity	6. 最初と最後の頁 75 ~ 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbi.2020.04.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mishima Yuko, Osaki Takako, Shimada Atsuyoshi, Kamiya Shigeru, Hasegawa-Ishii Sanae	4. 巻 11
2. 論文標題 Sex-dependent differences in the gut microbiota following chronic nasal inflammation in adult mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83896-5	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 島田厚良	4. 巻 51巻
2. 論文標題 脳と免疫系の細胞間相互作用を可能にする脳の組織学的構築原理	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 杏林医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 169-177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Hasegawa-Ishii Sanae, Inaba Muneo, Shimada Atsuyoshi	4. 巻 76
2. 論文標題 Widespread time-dependent changes in tissue cytokine concentrations in brain regions during the acute phase of endotoxemia in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NeuroToxicology	6. 最初と最後の頁 67 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuro.2019.10.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Unno Keiko, Sumiyoshi Akira, Konishi Tomokazu, Hayashi Michiko, Taguchi Kyoko, Muguruma Yoshio, Inoue Koichi, Iguchi Kazuaki, Nonaka Hiroi, Kawashima Ryuta, Hasegawa-Ishii Sanae, Shimada Atsuyoshi, Nakamura Yoriyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Theanine, the Main Amino Acid in Tea, Prevents Stress-Induced Brain Atrophy by Modifying Early Stress Responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 174 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12010174	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 Hasegawa-Ishii Sanae, Imamura Fumiaki, Nagayama Shin, Murata Makiko, Shimada Atsuyoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Differential Effects of Nasal Inflammation and Odor Deprivation on Layer-Specific Degeneration of the Mouse Olfactory Bulb	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 0403 ~ 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0403-19.2020	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 該当する

1. 著者名 Shimada Atsuyoshi, Yokota Takanori	4. 巻 11
2. 論文標題 Physiological and pathological brain immune system interactions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 3 ~ 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen3.12561	査読の有無 無
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 Shimada Atsuyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Principles of neuroanatomical architecture supporting brain-immune cell-cell interactions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 5~15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen3.12559	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 Kelley Keith W., Shimada Atsuyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Neuroinflammation and the blood-brain interface: New findings in brain pathology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 16~20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen3.12558	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 該当する

1. 著者名 Hasegawa-Ishii Sanae, Shimada Atsuyoshi, Imamura Fumiaki	4. 巻 143
2. 論文標題 Neuroplastic changes in the olfactory bulb associated with nasal inflammation in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 978~989.e3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2018.09.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Shimada A
2. 発表標題 Histological Architecture Underlying Brain-Immune Cell-Cell Interactions
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the JNS Symposium "Neuroinflammation and the Blood Brain Interface: New findings in Brain Pathology" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimada A
2. 発表標題 Histological Architecture Underlying Brain-Immune Cell-Cell Interactions
3. 学会等名 The 37th International Conferenece of Australasian Winter Conference on Brain Research Symposia: Psychoneuroimmunology across the lifespan. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimada A, Miura A, Hasegawa-Ishii S
2. 発表標題 Acute responses of intracranial macrophages to LPS-induced systemic inflammation in newborn mice
3. 学会等名 PsychoNeuroImmunology Research Society 's 26th Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hasegawa-Ishii S, Imamura F, Shimada A
2. 発表標題 Differential effects of nasal inflammation and odor deprivation on layer-specific degeneration of the olfactory bulb in mice
3. 学会等名 PsychoNeuroImmunology Research Society 's 26th Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hasegawa-Ishii S, Imamura F, Shimada A
2. 発表標題 Differential effects of nasal inflammation and odor deprivation on layer-specific degeneration of the olfactory bulb in mice (慢性鼻腔炎症と嗅覚遮断が嗅球の層特異的変性に及ぼす影響)
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimada A
2. 発表標題 Microglia and neuronal degeneration in senescence-accelerated mice
3. 学会等名 19th International Congress of Neuropathology, Symposium 1 “Microglia and Synapses”, Tokyo, Sept, 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimada A, Miura A, Hasegawa-Ishii S
2. 発表標題 Cytokine-mediated cell-cell interaction between choroid plexus epithelium and stroma in response to systemic inflammation
3. 学会等名 PsychoNeuroImmunology Research Society 's 25th Annual Scientific Meeting, Florida, USA, Jun 8, 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimada A, Miura A, Hasegawa-Ishii S
2. 発表標題 Cytokine-mediated cell-cell interaction between choroid plexus epithelium and stroma in response to systemic inflammation (全身炎症に应答する脈絡叢上皮と間質のサイトカインを介した細胞間相互作用)
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会, 神戸, 2018.7.27 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Imamura F
2. 発表標題 Plastic changes in the olfactory bulb coupled with the inflammatory status of the nasal cavity (鼻腔炎症と寛解に伴う嗅球の可塑的变化)
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会, 神戸, 2018.7.27 (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of Illinois			
オーストラリア	RMIT University			
中国	China Medical University			
米国	Pennsylvania State University	University of Texas		
米国	Pennsylvania State University			