

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18393

研究課題名（和文）脳梗塞・脳出血後の血液中monocyteの変化と重症度の関係

研究課題名（英文）Relationship between blood inflammatory monocytes and brain severity after cerebral infarction/cerebral hemorrhage

研究代表者

阿部 尚紀（Abe, Naoki）

愛媛大学・医学系研究科・講師

研究者番号：10512155

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：今回用いた炎症性マーカー(Ly6C)では、脳内の単球の性質変化を血液中の単球で捉えることはできなかった。本研究でも示されたように、脳へ浸潤した単球が炎症性の性質から時間経過とともに樹状細胞様のマーカーを発現するようになり、脳内の環境は目まぐるしく変化している。そのため、炎症等による脳の2次損傷を抑える治療は、時期を間違えると合併症を増やし余計に予後を悪化させる可能性がある。今後、脳内浸潤単球の性質変化を鋭敏に反映するマーカーが本当に血液中の単球に存在するかを確かめるためには、それぞれの時期の細胞集団を回収しmRNAの全解析を行い関連するマーカーが本当に存在するかを調べる必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液中単球の性質変化と脳の損傷程度が関連した場合、急性期の血液中の単球の性質を調べるだけで、脳の二次的損傷（過剰な炎症による損傷）の大きさを予測でき、積極的に抗炎症療法などの治療介入が必要な状態かどうかを評価できる可能性がある。さらに、その性質の単球は治療のターゲットとなりうる可能性があったため、臨床検体を用いた実験と動物実験を行ったが、今回用いた炎症性マーカーでは脳内の二次的損傷の状態を評価することができなかった。

研究成果の概要（英文）：With the inflammatory markers(Ly6C) used in this study, changes in the properties of brain-infiltrating monocytes could not be detected from blood monocytes. As shown in this study, monocytes that infiltrate the brain change from inflammatory properties in the hyperacute phase to dendritic cell-like properties in the subacute phase. Thus, the properties of brain-infiltrating monocytes are changing rapidly. Therefore, treatment to suppress secondary brain damage due to inflammation may increase complications and worsen the prognosis if the timing of treatment is incorrect. In order to confirm whether there are markers in the blood that can evaluate changes in the brain, it is necessary to collect cell populations at each stage and perform a total analysis of mRNA to determine whether such markers really exist.

研究分野：脳神経科学

キーワード：脳出血 単球 Ly6C CD11c

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は最も多い死因の一つであり、多くの脳卒中患者が長期間続く神経障害に苦しんでいる。そのため数多くの研究が行われており、脳卒中後の過剰な炎症による脳の2次的損傷がその予後を悪化させる原因として注目されている。その過剰な炎症を引き起こす原因として活性化型マイクログリアや骨髄由来のマクロファージ等が挙げられているが、形態や抗原表現型の類似性からそれらを区別して解析することは難しく、それぞれの役割について詳しく解明されていなかった。しかし近年、マイクログリア特異的マーカーやフローサイトメトリー法を用いることで、これらを区別し詳しく解析することが可能となってきた。これらの手法を用いた研究で脳損傷急性期において、浸潤した単球やマクロファージが脳の2次的損傷を増悪させる主な原因であることがわかってきた。脳損傷急性期には、グリア細胞からCCL2が分泌され、浸潤してきた単球やマクロファージから活性酸素種(ROS)やIL-1が分泌されることで脳組織が更に破壊される。そのため、血液中の単球の性質変化は、脳の炎症の程度や2次的損傷の大きさを反映している可能性がある。

2. 研究の目的

臨床的に脳卒中急性期における脳組織中の単球・マクロファージの変化を直接的に知ることは非常に困難である。そのため血液中の単球・マクロファージの性質変化を調べることで、間接的に脳の2次的損傷の程度を評価できるか調査することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

生後8-12週間のC57BL/6マウスを用い、collagenase注入脳出血モデルを作成した。まず、イソフルレンによる全身麻酔下に頭頂部を1cm程度切開し、頭蓋骨を露出した。Bregma(矢状縫合と環状縫合との交点)より0.5mm前方、2mm外側に針で穴をあけ、その穴より28G針を3.7mm挿入した。マイクロインジェクターを用いて、collagenase type (Worthington社)を3分かけて投与し、その5分後に針を抜去して脳出血モデルを作成した。その後、瞬間接着剤を用いて閉創した。脳出血モデル作成日をDay0とし、Day1とDay7に血液と脳サンプルを回収し、フローサイトメトリー法を用いて、血液中と脳内へ浸潤したLy6C high炎症性単球の割合を調査した。

また臨床において、脳卒中急性期に採血を行い、入院期間中の画像検査データを調査し、血液中のCD14⁺CD16⁺炎症性単球の割合と脳出血後の浮腫の程度に相関が認められそうかを調査した。

4. 研究成果

(1) 脳へ浸潤したLy6C high炎症性単球・マクロファージは脳出血7日目には低下する。

脳に浸潤した単球・マクロファージの数は脳出血1日目と7日目で変化は認められなかった(Figure 1)。脳に浸潤した単球・マクロファージのLy6C high炎症性単球・マクロファージの割合は、脳出血1日目平均62.4%と高かったが、7日後には平均34.5%へと有意に低下していた(Figure 1 P=0.00064)。

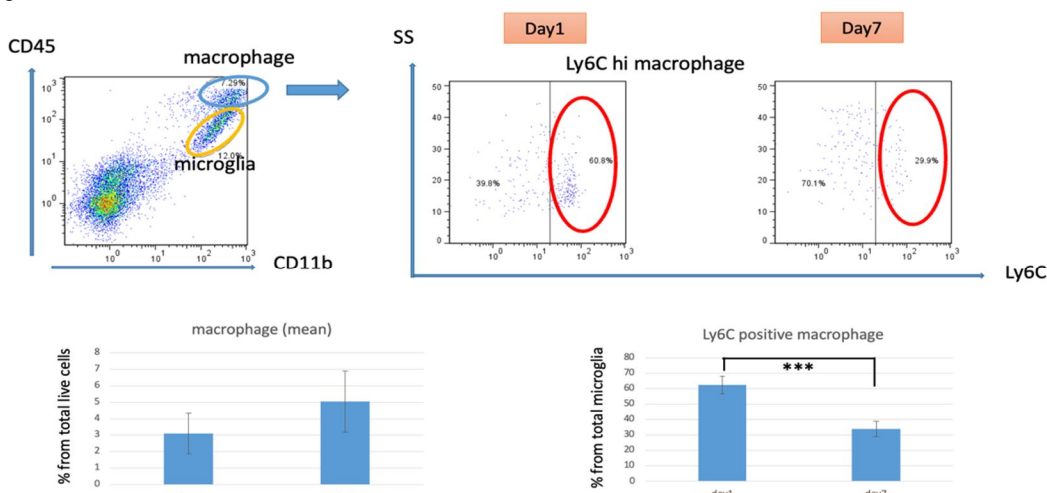


Figure 1 脳浸潤炎症性マクロファージの変化(脳出血1日目・7日目)

(2) 血液中のLy6C high炎症性単球・マクロファージの割合は脳出血7日目でも低下しない

血液中の単球の割合は、脳出血1日目と7日目で変化は認められなかった(Figure 2 P=0.15)。血液中のLy6C highの炎症性単球の割合は、脳出血1日目平均72.0%、7日目は平均78.85%と高いままであった(Figure 2 P=0.173)。

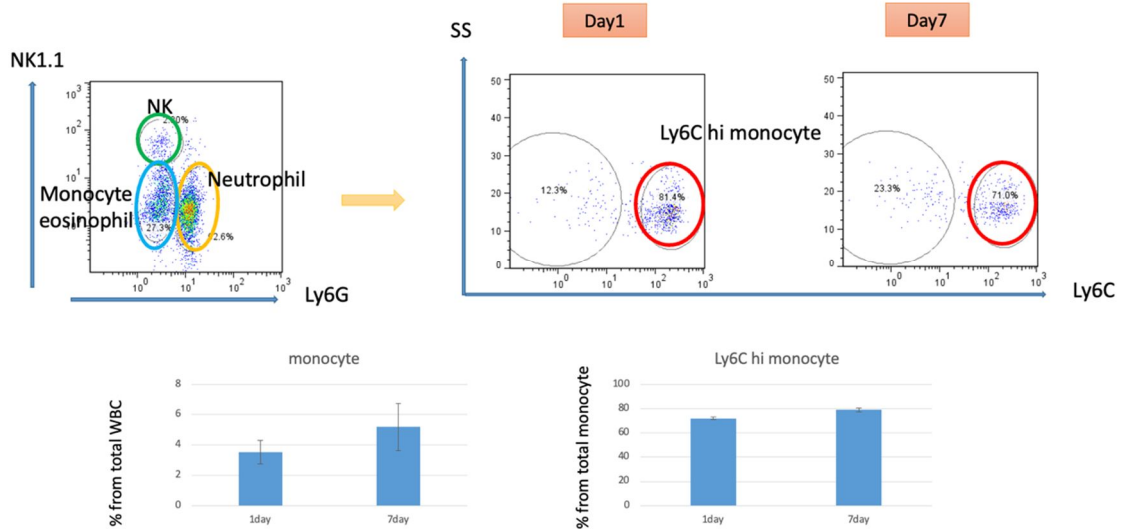


Figure 2 血液中炎症性単球の変化(脳出血1日目・7日目)

(3) 脳腫血患者の血液中炎症性単球の割合

脳出血患者の血液中単球と脳浮腫の程度を評価した、典型的なものを figure3 に示した。症例 1 の脳腫の程度は症例 2 よりも激しいが、脳出血発症時の血液中炎症性単球の割合は違いが認められなかった。数例同じような傾向が続いたため少数の検査で調査を終了した。

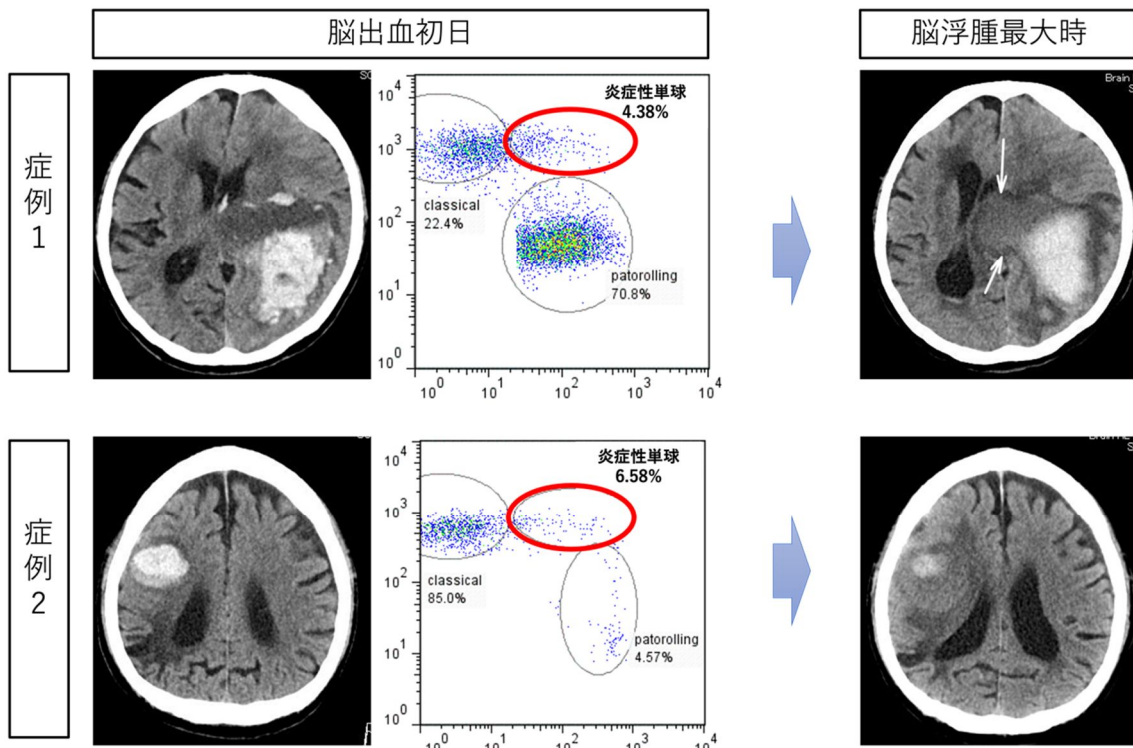


Figure 3 脳出血患者の血液中炎症性単球と脳浮腫の程度

(4) 脳浸潤単球、マクロファージは脳出血7日目には CD11c 陽性細胞の割合が増加していた

脳へ浸潤した単球・マクロファージの CD11c 陽性細胞の割合は脳出血 1 日目では平均 9.2% であったが、脳出血 7 日目では平均 26.5% へ有意に増加していた (Figure 4 P=0.005)。浸潤単球において、Ly6C の炎症性単球から CD11c を発現する樹状細胞 (Dendritic Cell) 様の性質を示す様に形質が変化しした可能性があり、これらの単球は脳損傷後の debris の除去を行なっている可能性が考えられる

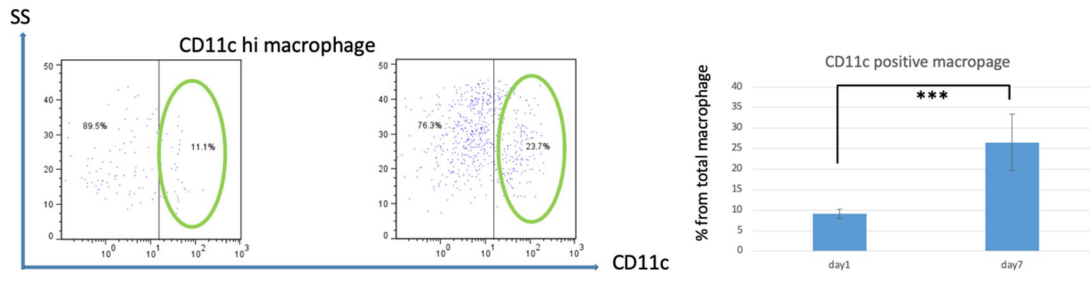


Figure 4 脳浸潤単球・マクロファージの CD11c 陽性細胞 (脳出血 1 日目・7 日目)

(5) 血液中の CD11c 陽性樹状細胞の割合は脳出血 1 日目と 7 日目で変化しなかった
 血液中の樹状細胞の割合は、脳出血 1 日目と 7 日目で変化は認められなかった (Figure 5 P=0.274)

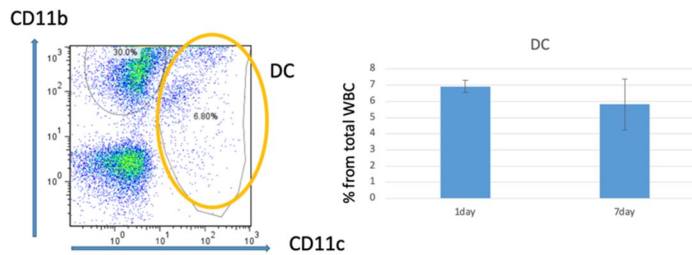


Figure5 血液中 CD11c 陽性細胞 (脳出血 1 日目・7 日目)

以上のデータより、今回用いた炎症性マーカーでは、脳内の単球の性質変化を血液中の単球で捉えることはできなかった。本研究でも示されたように、脳へ浸潤した単球が炎症性の性質から時間経過とともに樹状細胞用のマーカーを発現するようになり、脳内の環境は目まぐるしく変化している。そのため、炎症等による脳の 2 次損傷を抑える治療は、時期を間違えると合併症を増やし余計に予後を悪化させる可能性がある。今後、脳内浸潤単球の性質変化を鋭敏に反映するマーカーが本当に血液中の単球に存在するかを確かめるためには、それぞれの時期の細胞集団を回収し mRNA の全解析を行い相関するマーカーが本当に存在するかを調べる必要がある。

参考文献

Hammond MD, Taylor RA, Mullen MT, Ai Y, Aguila HL, Mack M, Kasner SE, McCullough LD, Sansing LH: CCR2+ Ly6C(hi) inflammatory monocyte recruitment exacerbates acute disability following intracerebral hemorrhage. J Neurosci 2014, 34(11):3901-3909.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 正岡衣里那 阿部尚紀 河本夕布子 西原佑 藤井園子 萬家俊博
2. 発表標題 脳出血モデルマウスにおける脳浸潤単球と血液中単球の性質は相関するののか
3. 学会等名 麻酔科学会 中国・四国支部第58回学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------