

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 5月 27日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010~2012

課題番号：22791435

研究課題名（和文） TLR活性化と低酸素刺激とのクロストークによるマクログリア制御と低温・高温効果

研究課題名（英文） Hypothermic and hyperthermic effects on microglial regulation through cross-talk between activation of toll-like receptor and hypoxia-ischemia

研究代表者

松井 智浩 (MATSUI TOMOHIRO)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50314828

研究成果の概要（和文）：マクログリアは脳低酸素・虚血や脳外傷時に活性化され、神経傷害性因子放出を介し、脳障害増悪に関与する。よって、脳低温療法は活性化マクログリアのこれらの産生を低下させ、脳保護効果をもたらす可能性がある。本研究では、低酸素性虚血性（HI：hypoxia-ischemia）脳障害由来マクログリアを用い、Toll様受容体（TLR2 および TLR4）刺激によるサイトカイン（炎症性：TNF- α 、抗炎症性：IL-10）および一酸化窒素（NO）産生を33°Cと37°C培養下で比較した。その結果、TNF- α 産生は培養6時間、IL-10とNO産生は培養48時間で、各々、37°Cに比べ33°Cでは低値を示し、軽度低温はHI脳障害由来活性化マクログリアの早期でのTNF- α および後期でのIL-10/NO産生を抑制することが判明した。この機序はHI脳障害に対する脳低温療法の脳保護機構になることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Activated microglia produce neurotoxic factors, including pro-inflammatory cytokines and nitric oxide (NO), in response to neuronal destruction. Hence, the suppression of the microglial release of these factors may contribute to the neuroprotective effects of therapeutic hypothermia. I examined the effects of hypothermic culture on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines and NO in *ex vivo* microglia that were derived from mice with hypoxic-ischemic (HI) brain injury, through the stimulation of toll-like receptors (TLRs) that play significant roles in the pathological processes underlying sterile central nervous system injury. Microglia were isolated from HI brain-injured mice and then cultured with TLR2 and TLR4 agonists at 33°C and 37°C. As a result, compared with 37°C, hypothermia (33°C) reduced the production of TNF- α at 6 h and IL-10 and NO at 48 h. In a clinically relevant setting using TLR-activated microglia that were derived from mice with HI brain injury, hypothermia reduced the production of TNF- α , IL-10, and NO in a time-dependent manner, supporting the idea that neuroprotection conferred by therapeutic hypothermia could be related to attenuation of both early-phase TNF- α and late-phase IL-10 and NO released from microglia. In particular, this mechanism may be responsible for HI brain injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、麻酔・蘇生学

キーワード：脳低温、マイクログリア、Toll 様受容体、低酸素性虚血性脳障害、炎症性サイトカイン、抗炎症性サイトカイン、一酸化窒素、*ex vivo* 培養

1. 研究開始当初の背景

重症頭部外傷や低酸素・虚血等の脳損傷により増加した炎症性サイトカインや一酸化窒素 (NO) は二次的脳障害に関与する。マイクログリアは虚血や組織障害時に増殖・活性化し、これらの細胞傷害性 (炎症性) 因子を放出し、ニューロン障害を引き起こす。よって、脳低温療法による脳 (ニューロン) 保護作用の一機序には、活性化マイクログリアからの炎症性因子抑制の関与が考えられる。しかし、その機序は未だ明らかでなく、特に抗炎症性サイトカインに対して低温が及ぼす影響は全く不明であった。

そこで、研究代表者は現在までに、脳低温療法による脳保護作用機構を調べる目的で、活性化マイクログリアの産生する炎症性 (IL-6) および抗炎症性 (IL-10) サイトカイン並びに NO 産生が、温度 (低温および高温) によりどのような影響を受けるのかを細胞培養系で解析し、以下のように報告してきた。

低温 (33°C) 下では、Lipopolysaccharide (LPS) 活性化マイクログリアからの IL-6、IL-10 および NO 産生が低値を示すこと、また、高温下ではマイクログリアからの IL-10 産生が特異的に増加することを見出し、脳低温療法による脳保護作用の一機序に、従来報告されてきた炎症性因子抑制のみでなく、抗炎症性因子抑制も関与する可能性並びに脳損傷後の高温下における脳障害増悪にはマイクログリアからの IL-10 増加が関与する可能性を示してきた (Matsui and Kakeda, IL-10 production is reduced by hypothermia but augmented by hyperthermia in rat microglia. *J Neurotrauma*, 25:709-715, 2008)。

LPS はマイクログリア活性化によく用いられているが、本物質は非生理的であり、より臨床に近い状態でこのような研究をすることは意義深いと考え、最近、脳損傷時のニューロンやグリア細胞から遊離・放出されるマイクログリアの内因性刺激物質、アデノシン三リン酸 (ATP) に着目し、同様の検討を行った。その結果、ATP 活性化マイクログリアからの IL-6 および NO 産生が低温下で抑制されること並びにその抑制は p38 MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) の活性化阻害に基づいていることを見出し、本療

法の脳保護効果における炎症性因子抑制にはマイクログリアの p38 MAPK 阻害が重要であることを示してきた (Matsui, Hypothermia reduces the release of inflammatory factors via suppression of p38 MAPK in ATP-activated rat microglia. ニュー・フロンティア・プロジェクト報告集, 10:54-58, 2009)。

以上、研究代表者は脳低温療法による脳保護作用機構の一端を、活性化マイクログリアに着目し、産生されるサイトカイン (炎症性のみでなく抗炎症性も) や NO 動態から解明する研究を行っているが、マイクログリアを活性化させる“シグナル”は、その性質を変える可能性があり (Suzuki *et al*, Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci*, 24:1-7, 2004)、“シグナル”に依存したサイトカインや NO 動態が温度変化によりどのような影響を受けるのかを調べるのは非常に興味深い。

2. 研究の目的

そこで本研究では、“Toll 様受容体 (TLR) 活性化”と“低酸素・虚血刺激”の2つのマイクログリア活性化シグナルに着目し、低酸素性虚血性 (HI: hypoxia-ischemia) 脳障害モデルを用いた *ex vivo* 解析を行った。

TLR は各種病原菌を認識し、炎症反応を惹起することで生体防御を担う自然免疫に極めて重要な受容体であるが、近年の研究から Central Nervous System (CNS) 領域における組織障害や神経変性疾患等の炎症反応においても重要な役割を担うことが次第に報告されてきている。つまり、ある特定の微生物成分 (LPS 等) が存在しなくても、ATP のような内因性物質が TLR を活性化させている。マイクログリアには TLR1~TLR9 が存在している。脳虚血時、CNS 領域において増加するのは主に TLR2 と TLR4 であり、これら TLR を介した活性化マイクログリアは虚血による脳障害に関与している可能性がある。

CNS 系から取り出した細胞の *ex vivo* 培養は、生体内環境下での細胞の表現系を維持しており、*in vivo* 状態を知る1つのモデルである。

以上、本研究では、HI 脳障害由来マイクログリア (*ex vivo*) の TLR 刺激による炎症性および抗炎症性サイトカイン並びに NO 産生に低温培養が及ぼす影響を調べた。

3. 研究の方法

HI 脳障害モデルはマウス (2 日齢) を用いて、右総頸動脈を結紮後、37°C 下で酸素濃度 6% に 30 分間留置することにより作製した。その後 37°C 下に 1 日留置したマウス (3 日齢) の大脳から、MicroBeads 結合抗 CD11b 抗体を用いてマイクログリアを磁気分離し、TLR2 および TLR4 活性化剤 (Pam₃CSK₄ および LPS) を加え、33°C および 37°C 下で 48 時間培養した。培養液中のサイトカイン (炎症性: TNF- α 、抗炎症性: IL-10) 濃度は ELISA により、NO₂⁻ (NO の安定な代謝産物) 濃度は比色法により、各々測定した。

4. 研究成果

HI 脳障害由来マイクログリアの TLR2 (Pam₃CSK₄) および TLR4 (LPS) 誘導 TNF- α 産生は培養 6 時間 (図 1)、IL-10 産生は培養 48 時間 (図 2)、NO 産生は培養 48 時間 (図 3) で、各々、37°C に比べ 33°C では低値を示した。

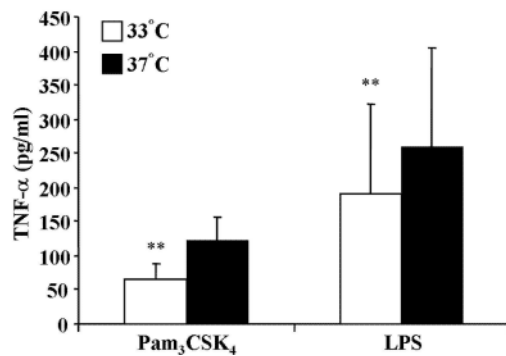


図 1. HI 脳障害由来マイクログリアの TLR 誘導 TNF- α 産生に及ぼす低温培養の影響
** $p < 0.01$ vs 37°C

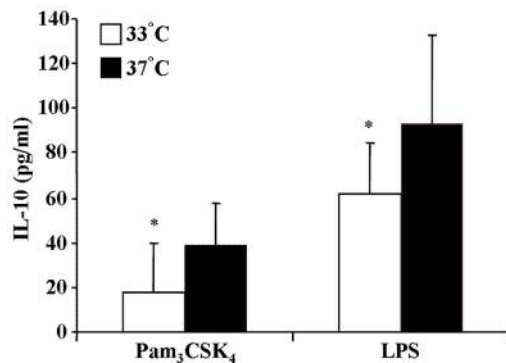


図 2. HI 脳障害由来マイクログリアの TLR 誘導 IL-10 産生に及ぼす低温培養の影響
* $p < 0.05$ vs 37°C

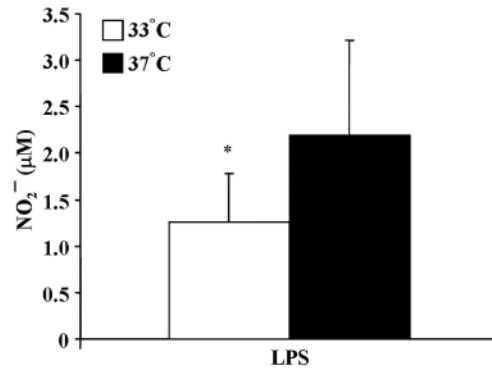


図 3. HI 脳障害由来マイクログリアの TLR 誘導 NO 産生に及ぼす低温培養の影響
* $p < 0.05$ vs 37°C

以上、臨床と関連した HI 脳障害モデルを用いた本研究においても、軽度低温は TLR 活性化マイクログリアの早期での TNF- α および後期での IL-10/NO 産生を抑制した。よって、脳低温療法による脳保護作用の一機序に、マイクログリアの早期での炎症性因子抑制と後期での炎症性・抗炎症性因子抑制が関与する可能性が更に支持された。特に、この機序は HI 脳障害後の脳保護機構になることが示唆された。

今後は、脳損傷直後 (急性期から) のマイクログリアのみでなく、亜急性期からの脳内浸潤炎症性 T 細胞にも主眼を置き、それらと脳障害との関連に低温・高温が及ぼす影響を HI 脳障害モデルを用い、*ex vivo* および *in vivo* で解析していく予定である。

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 6 件)

- ① Matsui T, Tasaki M, Yoshioka T, Motoki Y, Tsuneoka H, Nojima J, Temperature- and time-dependent changes in TLR2-activated microglial NF- κ B activity and concentrations of inflammatory and anti-inflammatory factors, Intensive Care Med, 査読有、38 巻、1392-1399、2012
- ② Matsui T, Motoki Y, Inomoto T, Miura D, Kato Y, Suenaga H, Hino K, Nojima J, Temperature-related effects of adenosine triphosphate-activated microglia on pro-inflammatory factors, Neurocrit Care, 査読有、17 巻、293-300、2012
- ③ Motoki Y, Nojima J, Yanagihara M, Tsuneoka H, Matsui T, Yamamoto M,

Ichihara K、Anti-phospholipid antibodies contribute to arteriosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus through induction of tissue factor expression and cytokine production from peripheral blood mononuclear cells、Thromb Res、査読有、130 巻、667-673、2012

- ④ 松井智浩、田崎萌、吉岡貴裕、本木由香里、木田裕之、野島順三、軽度低温は TLR2 活性化マクログリアの NF- κ B 活性化阻害を介し炎症性・抗炎症性因子産生を抑制する、神経外傷、査読有、34 巻、218-220、2011
- ⑤ Nojima J、Motoki Y、Tsuneoka H、Kuratsune H、Matsui T、Yamamoto M、Yanagihara M、Hinoda Y、Ichihara K、‘Oxidation stress index’ as a possible clinical marker for the evaluation of non-Hodgkin lymphoma、Br J Haematol、査読有、155 巻、528-530、2011
- ⑥ Matsui T、Svensson CI、Hirata Y、Mizobata K、Hua XY、Yaksh TL、Release of prostaglandin E₂ and nitric oxide from spinal microglia is dependent on activation of p38 mitogen-activated protein kinase、Anesth Analg、査読有、111 巻、554-560、2010

[学会発表] (計 6 件)

- ① 松井智浩、低酸素性虚血性脳障害由来マクログリアの炎症性および抗炎症性サイトカイン産生に及ぼす軽度低温の影響、第 15 回日本脳低温療法学会、2012 年 7 月 6 日、横浜シンポジア (神奈川県)
- ② Matsui T、21st Century Measures for National Health Promotion、7th Asia-Pacific Alliance of Health Leaders Forum、2011 年 10 月 24 日、Chiang Mai (Thailand)
- ③ 松井智浩、TLR2 活性化マクログリアの NF- κ B 活性化と炎症性・抗炎症性因子産生の時系列的温度依存性変化、第 14 回日本脳低温療法学会、2011 年 7 月 2 日、かごしま県民交流センター (鹿児島県)
- ④ 松井智浩、軽度低温は TLR2 活性化マクログリアの NF- κ B 活性化阻害を介し炎症性・抗炎症性因子産生を抑制する、第 34 回日本脳神経外傷学会、2011 年 4 月 16 日、誌上発表
- ⑤ 本木由香里、全身性エリテマトーデス患

者の動脈硬化性病態における抗リン脂質抗体の影響、第 11 回日本検査血液学会、2010 年 7 月 24 日、東京ビックサイト (東京都)

- ⑥ 松井智浩、軽度低温は ATP 活性化マクログリアの p38 MAPK 活性化阻害を介し炎症性因子を抑制する、第 13 回日本脳低温療法学会、2010 年 7 月 3 日、千里ライフサイエンスセンター (大阪府)

[図書] (計 2 件)

- ① 松井智浩、ほか、医歯薬出版株式会社、臨床検査学講座/免疫検査学 第 2 版(補訂)、2011、1-410
- ② 松井智浩、ほか、医歯薬出版株式会社、臨床検査学実習書シリーズ/輸血・移植検査学実習書 第 1 版、2010、1-111

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 智浩 (MATSUI TOMOHIRO)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：50314828