# 科研費

# 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号: 15501

研究種目: 基盤研究(C)(一般)

研究期間: 2013~2015

課題番号: 25462403

研究課題名(和文)脳低温による脳保護効果と免疫細胞の時系列的IL-23 - IL-17産生との関連

研究課題名(英文)Relationship between the neuroprotection by brain hypothermia and the temporal IL-23 - IL-17 production by immune cells

研究代表者

松井 智浩 (MATSUI, Tomohiro)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号:50314828

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文):脳損傷後、T細胞は遅発性に脳内に浸潤し、IL-17やグランザイムB (GrB)を放出することで脳障害増悪に関与する。これらの増加は末梢性にも認められるため、末梢 - 浸潤T細胞のニューロン傷害性因子は脳障害の治療標的になる可能性がある。そこで脳低温療法による脳保護作用機序を解明するため、末梢血T細胞のIL-17とGr B産生に低温・高温が及ぼす影響を調べた。その結果、それらは37 に比べ33 では低値、39 では高値を示した。また、IL-17とGrBは濃度依存的にニューロン死を誘導した。よって、脳低温療法はT細胞のIL-17とGrB産生を低下させ、遅発性にもニューロン死抑制効果をもたらすと考えられた。

研究成果の概要(英文): T cells infiltrate into the infarcted brain within days after cerebral ischemia and play essential roles in exacerbating the delayed phase of the brain injury by producing pro-inflammatory factors. However, the involvement of these factors in brain damage is also demonstrated systemically. Such periphery-brain abnormalities are interesting because they may constitute a pathway to the central nervous system, which may be a target of therapeutic hypothermia. We examined the effects of hypothermia and hyperthermia on peripheral T cell-derived release of IL-17 and granzyme B (GrB). As a result, compared with normothermia, IL-17 and GrB release was reduced by hypothermia but augmented by hyperthermia. Moreover, IL-17 and GrB caused the death of neuronal cells in a concentration-dependent manner. These results suggest that the attenuation of T cell-derived release of IL-17 and GrB by therapeutic hypothermia leads to the inhibition of neuronal cell death in the delayed phase of brain injury.

研究分野: 神経免疫学

キーワード: 脳低温療法 T細胞 インターロイキン17 グランザイムB 高温培養 ニューロン死 脳血管内皮細胞

## 1.研究開始当初の背景

脳低酸素・虚血等による脳障害において、 ニューロン傷害と炎症が進行する機序は複 雑であり、種々の免疫(炎症)細胞や炎症性因 子が時間依存的に関与すると考えられる。-方、脳保護治療法の1つである脳低温療法は、 脳低酸素・虚血や重症頭部外傷等による脳障 害時に脳温を 32~34 の軽度低温にするこ とで、2次的ニューロン傷害を抑える(ニュー ロンを保護する)治療法であるが、その機序 は多岐にわたるため不明な点が多い。脳内免 疫担当細胞であるマイクログリアは脳低酸 素・虚血や組織損傷時に活性化され、炎症性 サイトカインや一酸化窒素(NO)等の神経傷 害性(炎症性)因子を放出し、脳障害増悪に関 与する。報告者らは、脳低温療法による脳保 護作用の一機序を明らかにする目的で、活性 化マイクログリアの産生する炎症性のみな らず抗炎症性サイトカイン並びに NO が、低 温・高温によりどのような影響を受けるかを 培養系で調べ、以下のことを報告してきた。 (1)低温(33)下では、活性化マイクログリ アの早期での炎症性サイトカイン(TNF-IL-6)および NO、並びに後期での抗炎症性サ イトカイン(IL-10)および NO が抑制される。 (2)高温(39)下では、活性化マイクログリ アの早期での炎症性サイトカイン(TNF-) および NO、並びに後期での抗炎症性サイトカ イン(IL-10)および NO が増加する。

(3)これらの因子産生は細胞内シグナル伝達因子 p38 MAPK(Mitogen-Activated Protein Kinase)と核内転写因子 Nuclear Factor (NF)-B に依存しており、低温下で p38 MAPK とNF-B は抑制される。

(<u>Matsui</u> and Kakeda. *J Neurotrauma* 2008 「山口大学医学会学会賞受賞論文」

Matsui et al. Intensive Care Med 2012「山口大学医学会学会賞受賞論文」

Matsui et al. Neurocrit Care 2012)

上記の炎症性・抗炎症性因子の温度依存性 変化は、脳低温療法による脳保護作用の一機 序に、炎症性因子抑制のみでなく抗炎症性因 子抑制も関与 特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 症性因子抑制という時間依存的抑制機構が 関与する可能性 、また、これらの抑制には p38 MAPK や NF- B 阻害が重要であること、 更に、脳損傷後の高温による脳障害増悪には、 逆にマイクログリアのそれらの増加が関与 する可能性、を示している。最近では、それ らの炎症性・抗炎症性因子の温度および時間 依存的変化がニューロン傷害に及ぼす病態 生理学的意義を調べ、TNF- や NO のみでな く IL-10 も濃度依存的(つまり、温度依存性 でみられたように産生量依存的)かつ時間依 存的にニューロン傷害作用を示すことを見 出した。つまり、脳低温療法には早期での炎 症性因子抑制と後期での炎症性・抗炎症性因 子抑制が関与するという時間依存的抑制機 構の存在を更に支持する結果を得た。

このように報告者らは、脳低温療法による 脳保護作用の一機序解明を、活性化マイク伝達 グリアに着目し、細胞内・核内シグナル伝達 からサイトカイン(炎症性・抗炎症性)や 産生までの時系列的変化に、低温・高温の ぼす影響を調べることで目指している(in vitro)。一方、近年では脳障害の進行過程に 脳内浸潤 T細胞の炎症的関与が注目されて る。 T細胞は脳損傷後、マイクログリア2 的炎症を惹起して持続的な脳障害増悪性 化に引き続き、しかし、このような脳内炎症性 的炎症を惹起して持続的な脳内炎症性 的炎症を惹起して持続的な脳内炎症性 上力インやプロテアーゼ等)に低温・ が及ぼす影響は全く知られていない。

# 2.研究の目的

そこで本研究では、炎症性 T 細胞に主眼を置き研究を行った。特に、最近注目されている炎症性サイトカイン IL-23 により誘導・活性化される IL-17 産生ヘルパーT 細胞(Th17 細胞: ヘルパーT(Th)細胞の新しいサブセット)および IL-17 に着目した。これらは多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症や進行に決定的な役割を果たす。一方、Th17 細胞以外からの IL-17 産生も知られており、中でもガンマデルタ(リエ細胞(型 T 細胞受容体をもつ T 細胞)は IL-23 の刺激を受けて IL-17 を産生する。

上述のように、脳虚血等による脳損傷後、 T 細胞は遅発性に脳内に浸潤し、炎症性サイ トカインの IL-17 やセリンプロテアーゼのグ ランザイム B(GrB)等の神経傷害性因子を放 出することで脳障害増悪に関与するが、これ らの増加は末梢性にも認められることから、 末梢 - 浸潤 T 細胞の神経傷害性因子は脳障害 の治療ターゲットになる可能性がある。そこ で今回、末梢性 T 細胞の IL-17 と GrB 産生に 低温・高温が及ぼす影響を調べた。また、そ れらの因子の脳内障害的作用をニューロン 死で評価した。更に、脳血管内皮細胞の接着 因子とケモカインは脳内への炎症細胞浸潤 に重要な役割を担い、脳障害増悪に関与する ため、IL-17 がそれらの発現をどのように誘 導するのかも調べた。

以上より、マイクログリア以外のニューロン死に関わる細胞(本研究では T 細胞)の低温・高温応答を知ることができ、その知見を基にすれば、脳低温療法がより有効かつ応用の利く治療法へと確立されていくことに繋がる可能性がある。

### 3.研究の方法

健常人の末梢血単核球から各種 T 細胞 (naïve CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>および T 細胞)を分離した。CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>および T 細胞は、抗CD2/抗CD3/抗CD28 抗体添加の下、IL-1/IL-23 で刺激し、33、37、39下で72時間培養した。naïve CD4<sup>+</sup>細胞は、抗CD2/抗CD3/抗CD28 抗体添加の下、IL-1

/IL-23/TGF- 1で刺激し、Th17 polarizationを行った後、同様に培養した。培養液中のIL-17と GrB 濃度は ELISA により測定した。ニューロン死は、ヒト神経芽細胞腫(SH-SY5Y株)をニューロン様細胞に分化させ、IL-17と GrB を 24 時間添加し、比色法により求めた。また、接着因子とケモカイン mRNA 発現は、マウス由来脳血管内皮細胞(b.End3 細胞)にIL-17を 2 時間添加し、リアルタイム PCR 法にて測定した。

# 4. 研究成果

naïve CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>(Th17)および T 細胞の IL-17 産生ならびに CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>および T 細胞の GrB 産生は、各々、37 に比べ 33 で は低値、39 では高値を示した。

また、IL-17 と GrB は、各々、濃度依存的にニューロン死を誘導した。

更に、IL-17 は、脳血管内皮細胞の接着因子(E-selectin、ICAM-1、VCAM-1)とケモカイン (MIP-2/CXCL2、IP-10/CXCL10、SDF-1/CXCL12、MCP-1/CCL2)発現を、濃度依存的に増加させた。

以上をまとめると、IL-17 と GrB の温度依存的産生動態とこれらの因子による濃度依存的ニューロン死誘導動態は比例関係となり、33 における T 細胞からの IL-17 と GrB の産生低下はニューロン死抑制に、一方、39 における産生増加はニューロン死増に繋がると考えられた。つまり、脳低温療法は、様々な T 細胞の IL-17 と GrB 産生を低下はこューロン死抑制効果をきせ、遅発性にもニューロン死抑制効果をもたらすこと、一方、脳高温下ではこれらの繋がること、が示唆された。

また、脳温はニューロンの生死決定に重要な因子であり、脳損傷後、脳低温はニューロン保護に、脳高温はニューロン障害増悪に作用する。よって、温度依存性の産生変化を示した IL-17 と GrB は、低温下での脳保護効果ならびに高温下での脳障害増悪の把握のためのバイオマーカーになりうることも示唆された。

更に、IL-17 の温度依存的産生動態とこの 因子による濃度依存的接着因子/ケモカイン 発現誘導動態も比例関係となり、33 におけ る T 細胞からの IL-17 の産生低下は接着因子 /ケモカイン発現抑制に、一方、39 での産 生増加は接着因子/ケモカイン発現増加に繋 がると考えられた。E-selectin や ICAM-1 お よび VCAM-1 は、白血球の血管内皮細胞への 接着に重要な役割を担う。また、ケモカイン は、その接着細胞の組織浸潤に重要な役割を 担い、主に、MIP-2/CXCL2 は好中球に、 IP-10/CXCL10 と SDF-1 /CXCL12 は CD4<sup>+</sup>と CD8<sup>+</sup>T 細胞に、MCP-1/CCL2 は単球に作用する。 また、naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞は SDF-1 /CXCL12 により、 T細胞は MCP-1/CCL2 により、組 織浸潤が誘発される。まとめると、脳低温療 法は、様々なT細胞の IL-17 産生を低下させ ることで、脳血管内皮細胞の接着因子/ケモカイン発現を低下させ、脳内への炎症細胞(好中球や単球のみならず、今回調べた全ての T 細胞も含む)浸潤抑制効果をもたらし、脳保護に繋がると考えられた。一方、高温下では、IL-17 の産生が増加し、脳血管内皮細胞の接着因子/ケモカイン発現増加により脳内へのそれらの炎症細胞浸潤が促進され、脳障害増悪に繋がると考えられた。

報告者らはこのように、脳低温療法による 脳保護機構の解明を、時系列的免疫細胞(マ イクログリア - T 細胞)に着目し行ってきた。 ニューロン死の過程には、その他、脳血管内 皮細胞や血管周皮細胞(ペリサイト)、アスト ロサイトやオリゴデンドロサイトといった、 いわゆる "Neurovascular Unit(NVU)"を構 成する細胞群(マイクログリアや、狭義には 脳内浸潤 T 細胞等の浸潤細胞も含まれる)が、 多面的・複合的な機構(クロストーク)として 関与していると考えられる。よって今後は、 この NVU の概念を基盤にして、本療法による 脳保護機構を捉える研究を行う予定である。 具体的には、NVU 由来神経傷害性因子発現と 血液脳関門機能(Tight Junction 蛋白発現や 透過性、構成細胞数/細胞死や形態変化)の低 温・高温応答を、細胞培養系(in vitro)およ び低酸素性虚血性脳障害モデル(ex vivo、in vivo)を用いて調べ、脳低温療法による脳保 護機構を NVU 機能の面から包括的に明らかに する。

#### 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7件)

Matsui T、Kawahara N、Kimoto A、Yoshida Y、Hypothermia reduces but hyperthermia augments T cell-derived release of interleukin-17 and granzyme B that mediate neuronal cell death、Neurocrit Care、査読有、23 巻、116 126、2015

Matsui T、Yoshida Y、Yanagihara M、 Suenaga H , Hypothermia at 35 ° C reduces the time-dependent microglial production of pro-inflammatory and anti-inflammatory factors mediate neuronal cell death, Neurocrit Care、査読有、20 巻、301 310、2014 Matsui T、Kida H、Iha T、Obara T、 Nomura S, Fujimiya T, Suzuki M, Effects of hypothermia on ex vivo microglial proproduction οf and anti-inflammatory cytokines nitric oxide in hypoxic-ischemic brain-injured mice、Folia Neuropathol、 査読有、52巻、151 158、2014 Matsui T, Miyazaki S, Motoki Y, Effects delayed hypothermia

time-dependent microglial production of inflammatory and anti-inflammatory factors、Clin Exp Neuroimmunol、查読有、5 巻、202 208、2014
Ishikawa T、Suzuki H、Ishikawa K、Yasuda S、Matsui T、Yamamoto M、Kakeda T、Yamamoto S、Owada Y、Yaksh TL、Spinal cord ischemia/injury、Curr Pharm Des、查読有、20 巻、5738 5743、2014

Matsui T、Yoshida Y、Motoki Y、Hypothermia reduces toll-like receptor 3-activated microglial interferon- and nitric oxide production、Mediators Inflamm、査読有、2013 巻、436263 (7 pages)、2013 DOI:10.1155/2013/436263

上田順子、尾野緑、篠原紀幸、<u>松井智浩</u>、柳原正志、末永弘美、保健学科における 学部教育の検証、臨床検査学教育、査読 無、5 巻、13 16、2013

# [学会発表](計3件)

松井智浩、TLR2 活性化マイクログリアの NF- 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 121 回 山口大学医学会、2015 年 9 月 13 日、霜 仁会館(山口県・宇部市)

Matsui T、Hypothermia reduces but hyperthermia augments T cells-derived release of interleukin-17 and granzyme B that mediate neuronal cell death、5th International Hypothermia Symposium、2014年9月8日~2014年9月10日、Edinburgh (Scotland) 松井智浩、35 の低温はマイクログリアの神経傷害的炎症性および抗炎症性因

の神経傷害的炎症性および抗炎症性因 子産生を時系列的に抑制する、第 16 回 日本脳低温療法学会、2013年7月20日、 キャッスルプラザ(愛知県・名古屋市)

# [図書](計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件) 取得状況(計0件)

〔その他〕 ホームページ等 なし

# 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

(2)研究分担者 なし

## (3)連携研究者

木田 裕之(KIDA, Hiroyuki) 山口大学・大学院医学系研究科・助教 研究者番号:70432739