

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GrB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

/IL-23/TGF- β 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⁺、CD4⁺(Th17)および T細胞のIL-17産生ならびに CD4⁺、CD8⁺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加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産生を低下させ、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産生が増加し、持続的なニューロン死増加に繋がること、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⁺とCD8⁺T細胞に、MCP-1/CCL2は単球に作用する。また、naïve CD4⁺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す、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 that 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 production of pro- and anti-inflammatory cytokines and 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 of delayed hypothermia on

time-dependent microglial production of inflammatory and anti-inflammatory factors, Clin Exp Neuroimmunol、査読有、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、査読有、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、松井智浩、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 の低温はマクログリア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