

ミニ・レビュー —中村賞受賞者—

低温・高温下におけるマイクログリアの
サイトカインおよびNO産生動態

松井智浩

山口大学医学部保健学系・病態検査学講座 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 脳低温療法, マイクログリア, 炎症性サイトカイン, 抗炎症性サイトカイン, 一酸化窒素

和文抄録

炎症性サイトカインや一酸化窒素 (NO) は脳障害増悪に関与することが知られている。活性化マイクログリアはこれらの細胞傷害性 (炎症性) 因子産生を介しニューロン傷害を引き起こす。よって、脳 (ニューロン) 保護を目的とする脳低温療法の一作用機序に、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、本療法による脳保護作用機構を調べる目的で、リポポリサッカライド (LPS) 活性化培養マイクログリアからの炎症性および抗炎症性サイトカインとNO産生に低温・高温が及ぼす影響を調べた。その結果、低温下ではマイクログリアからの炎症性サイトカイン (IL-6)、抗炎症性サイトカイン (IL-10) およびNO産生が低値を示すことが判明し、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する可能性が示唆された。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も初めて証明した。このIL-10の温度依存性変化は、IL-10が低温下でのニューロン保護効果および高温下でのニューロン傷害増悪において、病態把握のための重要なマーカーになりうることを示唆している。

はじめに

脳低温療法は脳損傷時に脳温を32-34℃に低下させることにより二次的ニューロン傷害を抑える治療法であり、重症頭部外傷や脳卒中、心肺機能停止の急性期等に有効である。その作用機序は特に虚血モデル動物でのニューロン傷害に対する保護効果から調べられている。しかし、それらの研究の多くはその脳保護機構を脳エネルギー代謝抑制や脳脊髄液中グルタミン酸放出抑制によるニューロン虚血応答の低下等からみたものであり、その周りに存在しニューロン死の過程に関与するグリア細胞や血管内皮細胞に関しての報告は少ない。

我々は、脳低温療法がより有効な治療法として確立されていくためには、ニューロン死に関わる細胞の低温応答を知ることが重要と考え、今回、炎症性サイトカインや一酸化窒素 (NO) 等の細胞傷害性 (炎症性) 因子を産生し、ニューロン傷害を引き起こす活性化マイクログリアに着目した。脳損傷時に産生が増加するこれらの因子は脳障害増悪に関与するので、脳低温療法による脳 (ニューロン) 保護作用の一機序に、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る。

そこで我々は、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からの炎症性および抗炎症性サイトカインとNO産生に低温培養が及ぼす影響を調べた。また、脳損傷後にはしば

しば脳温が上昇し、ニューロン傷害が増悪するので、高温培養の検討も併せて行った。

本稿では、本研究から得られた結果とその意義・重要性について述べてみたい。

低温・高温下におけるマイクログリアの サイトカインおよびNO産生動態

新生仔ラットの脳より単離したマイクログリアをリポポリサッカライド (LPS) で刺激し、低温 (33°C)、常温 (37°C)、高温 (39°C) 下で72時間まで培養し、培養上清中のサイトカインとNO (NO₂⁻) 濃度を調べた。その結果、炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL)-6産生は37°Cに比べ、33°Cでは早期(培養6時間)で低値となった(図1)¹⁾。抗炎症性サイトカインであるIL-10産生は37°Cに比べ、33°Cでは低値となったが、39°Cでは高値となった(培養24-72時間)(図2)¹⁾。NO産生は37°Cに比べ、33°Cでは全時間(培養6-72時間)で低値となった(図3)¹⁾。このように、LPS活性化マイクログリアからの炎症性因子(IL-6とNO)産生が低温下で低値を示した結果は、同様な検討を行った他のグループの報告²⁻⁴⁾と一致するが、重要なことは、本研究により抗炎症性サイトカイン(IL-10)も低温下で低値を示すことが初めて証明されたことである。従って、脳低温療法による脳保護作用の一機序に、活性化マイクログリアからの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が示唆された。

マイクログリアのIL-10産生における 温度依存性変化

IL-10投与は外傷性脳・脊髄損傷後の炎症性サイトカイン産生を抑制し、ニューロン保護的に作用するとの報告^{5, 6)}がある一方で、外傷性脳損傷患者の死亡率に脳脊髄液中のIL-10濃度増加(IL-6濃度増加ではなく)が相関するとの報告⁷⁾があり、IL-10のニューロン傷害的作用も示唆されている。更に、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傷害増悪に作用する。上述のように、我々はマイクログリアからのIL-10産生が低温下では低

値を示すが、高温下では高値を示すことを初めて証明した¹⁾。よって、このIL-10産生の温度依存性変化は、IL-10が低温下でのニューロン保護効果および

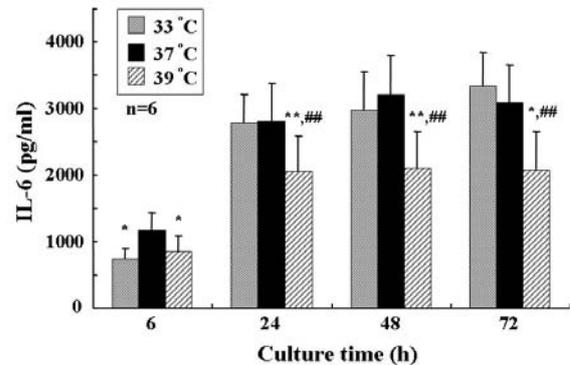


図1 LPS活性化マイクログリアからのIL-6産生に及ぼす低温・高温培養の影響
平均±標準誤差, n=6. *P<0.05; **P<0.01 vs 37°C; ##P<0.01 vs 33°C. (文献1より引用)

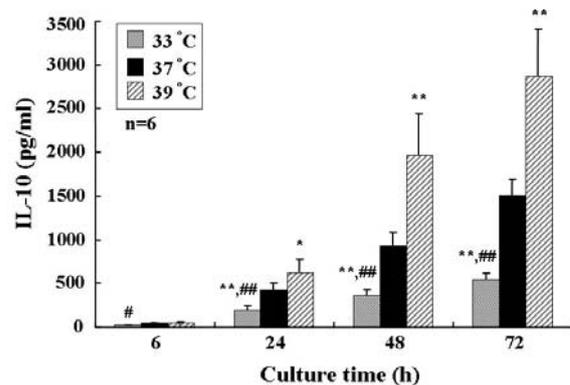


図2 LPS活性化マイクログリアからのIL-10産生に及ぼす低温・高温培養の影響
平均±標準誤差, n=6. *P<0.05; **P<0.01 vs 37°C; #P<0.05; ##P<0.01 vs 39°C. (文献1より引用)

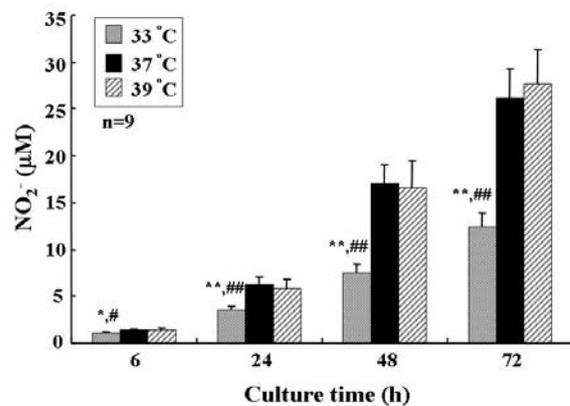


図3 LPS活性化マイクログリアからのNO産生に及ぼす低温・高温培養の影響
平均±標準誤差, n=9. *P<0.05; **P<0.01 vs 37°C; #P<0.05; ##P<0.01 vs 39°C. (文献1より引用)

高温下でのニューロン傷害増悪において、病態把握のための重要なマーカーになりうることを示唆している。

脳低温療法とIL-10投与の併用に関する1考察

脳損傷後の炎症性因子抑制が脳保護に繋がるとの概念より、脳低温とIL-10投与を併用し、外傷性脳損傷後の脳保護に対する相乗効果を調べる論文が報告された⁸⁾。しかし、両者による相乗効果はみられるどころか、このIL-10の全身性投与は脳低温によるニューロン保護効果を抑制させた。これは我々が示した低温下ではマイクログリアと末梢血単核球からのIL-10産生が低値を示すこと^{1, 9)}やIL-10増加がニューロン傷害に関与しうること⁷⁾により説明できるかもしれない。つまり、脳低温療法はIL-10産生も抑制することで脳保護作用を示す可能性があるにも関わらず、この報告ではIL-10投与を併用している。これではIL-10の抑制は起きず、むしろ増加させている可能性すらあり脳保護効果は期待できないのである。この場合、IL-10増加によるニューロン傷害反応が引き起こされ、脳低温による治療効果が抑制されたのではないかと推測される。

脳低温下のサイトカインおよびNO産生と マイクログリア

— *in vivo*と*in vitro*研究の比較より—

低温下でIL-6とNO産生が低値を示したこと¹⁾は、臨床研究や動物実験での脳低温療法による脳脊髄液中や内頸静脈中のそれらの変動^{10, 11)}と一致する。つまり、このことはIL-6とNO産生の抑制は脳低温療法によるニューロン保護効果に重要であり、それらの中樞神経系 (Central nervous system : CNS) での産生をマイクログリアが担うことを強く示唆している。IL-10も外傷性脳損傷後の炎症過程において脳脊髄液中に増加する^{7, 12)}が、その産生を担う細胞は不明である。しかし、LPSによる炎症性刺激によりマイクログリアから多量のIL-10産生を確認した¹⁾ようにマイクログリアがCNSでのIL-10産生も担っている可能性は高い。今回、我々の研究により初めてマイクログリアからの抗炎症性サイトカインに対する低温・高温の影響が明らかとなった¹⁾。今後、

脳低温療法の臨床研究や動物実験においてIL-10動態の報告が蓄積されるにつれて、脳障害や脳高温下、そして脳低温療法におけるIL-10の実際の役割が解明されていくと期待される。

おわりに

本稿では、低温・高温下におけるLPS活性化マイクログリアのサイトカインおよびNO産生動態とその意義・重要性について、特にIL-10を中心に述べた。

LPSはマイクログリアのToll-like receptor 4 (TLR4) 活性化を介してサイトカインやNOを産生させる。LPSは非生理的物質ではあるが、本研究はマイクログリアに存在するTLR4活性化によるサイトカインとNO産生の温度依存性変化をみた重要な研究であった。一方で、最近我々は臨床により近い状態でマイクログリアを活性化させ同様な研究を行うことは意義深いと考え、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 (Adenosine triphosphate : ATP)¹³⁾に着目し、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とNO産生が低温下で抑制されること並びにその抑制はp38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化阻害に基づいていることを見出し¹⁴⁾、脳低温療法のニューロン保護作用における炎症性因子抑制にはマイクログリアのp38 MAPK阻害が重要である可能性を示した。

今後、脳低温療法の脳保護作用機構における活性化マイクログリアからのサイトカインやNOの関与をより詳細に調べるためには、サイトカインやNO産生のみでなく、以上のようにそれらの産生に関与する細胞内情報伝達因子や核内転写因子にも温度変化が及ぼす影響をみる必要がある。その際マイクログリアを活性化させる“シグナル”としては、脳障害を引き起こす低酸素刺激や脳損傷で増加する生体 (細胞) 由来の内因性TLRリガンドとその受容体 (TLR) に注目したい。

引用文献

- 1) Matsui T, Kakeda T. IL-10 production is reduced by hypothermia but augmented by

- hyperthermia in rat microglia. *J Neurotrauma* 2008 ; 25 : 709-715.
- 2) Si QS, Nakamura Y, Kataoka K. Hypothermic suppression of microglial activation in culture : inhibition of cell proliferation and production of nitric oxide and superoxide. *Neuroscience* 1997 ; 81 : 223-229.
 - 3) Maekawa S, Aibiki M, Si QS, Nakamura Y, Shirakawa Y, Kataoka K. Differential effects of lowering culture temperature on mediator release from lipopolysaccharide-stimulated neonatal rat microglia. *Crit Care Med* 2002 ; 30 : 2700-2704.
 - 4) Gibbons H, Sato TA, Dragunow M. Hypothermia suppresses inducible nitric oxide synthase and stimulates cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide stimulated BV-2 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2003 ; 110 : 63-75.
 - 5) Knobloch SM, Faden AI. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 1998 ; 153 : 143-151.
 - 6) Bethea JR, Nagashima H, Acosta MC, Briceno C, Gomez F, Marcillo AE, Loo K, Green J, Dietrich WD. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 1999 ; 16 : 851-863.
 - 7) Bell MJ, Kochanek PM, Doughty LA, Carcillo JA, Adelson PD, Clark RS, Wisniewski SR, Whalen MJ, DeKosky ST. Interleukin-6 and interleukin-10 in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in children. *J Neurotrauma* 1997 ; 14 : 451-457.
 - 8) Kline AE, Bolinger BD, Kochanek PM, Carlos TM, Yan HQ, Jenkins LW, Marion DW, Dixon CE. Acute systemic administration of interleukin-10 suppresses the beneficial effects of moderate hypothermia following traumatic brain injury in rats. *Brain Res* 2002 ; 937 : 22-31.
 - 9) Matsui T, Ishikawa T, Takeuchi H, Tsukahara M, Maekawa T. Mild hypothermia inhibits IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004 ; 48 : 205-210.
 - 10) Aibiki M, Maekawa S, Ogura S, Kinoshita Y, Kawai N, Yokono S. Effect of moderate hypothermia on systemic and internal jugular plasma IL-6 levels after traumatic brain injury in humans. *J Neurotrauma* 1999 ; 16 : 225-232.
 - 11) Sakamoto KI, Fujisawa H, Koizumi H, Tsuchida E, Ito H, Sadamitsu D, Maekawa T. Effects of mild hypothermia on nitric oxide synthesis following contusion trauma in the rat. *J Neurotrauma* 1997 ; 14 : 349-353.
 - 12) Csuka E, Morganti-Kossmann MC, Lenzlinger PM, Joller H, Trentz O, Kossmann T. IL-10 levels in cerebrospinal fluid and serum of patients with severe traumatic brain injury : relationship to IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1 and blood-brain barrier function. *J Neuroimmunol* 1999 ; 101 : 211-221.
 - 13) Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 2005 ; 8 : 752-758.
 - 14) Matsui T. 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 2009 ; 10 : 54-58.

Microglial Cytokine and NO Production in Hypothermia and Hyperthermia

Tomohiro MATSUI

*Division of Clinical Laboratory Sciences,
Faculty of Health Sciences, Yamaguchi
University School of Medicine, 1-1-1 Minami
Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan*

SUMMARY

Pro-inflammatory cytokines and nitric oxide (NO) are considered responsible for exacerbating brain injury. Activated microglia produce these potentially cytotoxic factors during neuron destruction. The beneficial effects of hypothermia on neuroprotection are considered to be due, in part, to suppression of post-injury inflammatory factors by microglia. However, the underlying mechanisms remain unclear. In particular, the hypothermia's role in modulating anti-inflammatory cytokines is unknown. We examined whether altering culture temperature modifies microglial production of cytokines and NO. Microglia isolated from neonatal rats were cultured with lipopolysaccharide (LPS) under hypothermic, normothermic, and hyperthermic conditions for 72 h. Compared to normothermia, hypothermia decreased LPS-induced interleukin (IL)-6 production at 6 h of culture. IL-10 production was reduced by hypothermia but augmented by hyperthermia at 24-72 h. NO production was reduced by hypothermia throughout culture. In this study, hypothermia reduced production of IL-6, IL-10, and NO by LPS-activated microglia, suggesting that the neuroprotective effects of hypothermia might involve not only the inhibition of inflammatory factors, but also anti-inflammatory factor(s). Hyperthermia specifically increased IL-10

production in these cells. These temperature-dependent changes in IL-10 production may imply an important clinical marker for this cytokine in hypothermia-related neuronal protection and in hyperthermia-related neuronal injury.