

ミニ・レビュー —中村賞受賞者—

マイクログリアおよびT細胞由来ニューロン傷害性因子の
温度依存的産生

松井智浩

山口大学大学院医学系研究科病態検査学分野(病態検査学) 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, T細胞, ニューロン傷害性因子, 時間依存性

和文抄録

脳低温療法は、新生児低酸素性虚血性脳症や心肺停止後蘇生後脳症等の脳障害時にニューロン(脳)を保護する治療法であるが、その機序には未だ不明な点が多い。脳損傷後、早期に活性化されるマイクログリアは、サイトカインや一酸化窒素(NO)等のニューロン傷害性因子を放出し、脳障害増悪に関与する。T細胞は遅発性に脳内に浸潤し、サイトカインやプロテアーゼ等のニューロン傷害性因子産生を介して、持続的な脳障害増悪に関与する。本研究では、脳低温療法による脳保護作用機構を解明するため、マイクログリアおよびT細胞由来ニューロン傷害性因子産生に低温・高温が及ぼす影響を調べた。その結果、マイクログリアからのTNF- α 、IL-10およびNO産生ならびにT細胞からのIL-17とグランザイムB(GrB)産生は、各々、37°Cに比べ33°Cでは低値、39°Cでは高値を示した。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すると、TNF- α 、IL-10、NO、IL-17およびGrBとも、各々、濃度依存的にニューロン死を誘導した。以上をまとめると、TNF- α 、IL-10、NO、IL-17および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°CでのマイクログリアからのTNF- α 、IL-10およびNOの産生低下ならびに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°Cでの産

生増加はニューロン死増加に繋がると考えられた。

はじめに

脳低温療法は、脳障害時に脳温を32~34°Cの軽度低温にすることで、二次的ニューロン障害を抑える、つまり、ニューロンを保護する治療法であり、新生児低酸素性虚血性脳症や心肺停止後蘇生後脳症等に有効である。しかしながら、その機序は多岐に渡ると考えられており、未だ不明な点が多い。我々は、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ためには、ニューロン死に関わる細胞の低温・高温応答を知ることが重要と考え、脳低酸素・虚血や脳外傷時の早期に活性化され、炎症性サイトカインや一酸化窒素(NO)等のニューロン傷害性(炎症性)因子放出を介して脳(ニューロン)障害増悪に関与するマイクログリアに着目し、研究を行ってきた¹⁻⁷⁾。また、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いる。T細胞は脳損傷後、マイクログリア活性化に引き続き、遅発性に脳内に浸潤し、二次的炎症を惹起して持続的な脳障害増悪に関与する⁸⁻¹⁰⁾。そこで、T細胞由来ニューロン傷害性因子産生の低温・高温応答についても検討した¹¹⁾。

本稿では特に、Toll様受容体2(TLR2)活性化マイクログリアの核内転写因子NF- κ B活性化とニューロン傷害的炎症性・抗炎症性因子産生が時系列的温度依存性変化を示した研究^{2, 6)}と、その結果を臨床的に関連付けるために、脳低温療法の適応とな

る新生児低酸素性虚血性 (hypoxia-ischemia: HI) 脳症のモデル動物を用いた研究⁵⁾, そして, “時系列的” という概念を發展させ, T細胞に着目し, そのニューロン傷害性因子産生が温度依存性変化を示した研究¹¹⁾ を概説したい。

TLR2活性化マイクログリアのNF- κ B活性化とニューロン傷害的炎症性・抗炎症性因子産生の時系列的温度依存性変化

脳低温療法による脳保護作用機構を解明するため, TLR2活性化マイクログリアからの炎症性・抗炎症性因子産生とTLR2シグナリング経路で重要な役割を担うNF- κ B活性化に低温・高温が及ぼす影響を調べた。TLRは様々な病原体の分子パターンを認識し, 自然免疫を作動させる受容体として発見されたが, 最近の研究により, 病原体非存在下で脳内損傷細胞等から遊離・放出される内因性物質によっても活性化され, 中枢神経障害過程において重要な役割を担うことがわかってきた¹²⁻¹⁵⁾。特にマイクログリアでは, TLR2やTLR4活性化を介した中枢神経障害過程が報告されている¹³⁻¹⁷⁾。我々は既に, TLR4活性化マイクログリアからの炎症性・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報告しているが¹⁾, これらの産生に関わるシグナル伝達因子が低温・高温下で受ける影響は不明であった。そこで本研究では, TLR2活性化マイクログリアを用いての検討を行った。その結果, TLR2活性化マイクログリアからの炎症性サイトカイン (TNF- α) 産生は培養3-6時間, 抗炎症性サイトカイン (IL-10) 産生は24-48時間, 炎症性因子 (NO) 産生は48時間, また, NF- κ B活性化は0.5時間で, 各々, 37°Cに比べ33°Cでは低値, 39°Cでは高値の温度依存性変化を示した²⁾。更に, このTLR2活性化マイクログリアの時系列的TNF- α , IL-10およびNO産生がNF- κ B活性化に依存していることも明らかにした²⁾。これらの結果をまとめると, マイクログリアの時系列的温度依存的応答—33°Cの低温培養では, TLR2活性化マイクログリアのNF- κ B阻害に基づくその後の早期でのTNF- α 抑制と後期でのIL-10/NO抑制, 一方, 39°Cの高温培養では, TLR2活性化マイクログリアのNF- κ B増加に基づくその後の早期でのTNF- α 増加と後期でのIL-10/NO増加—

となる。

このTNF- α , IL-10およびNOの温度依存的産生の病態生理学的意義の検討として, これらの因子がどのようにニューロン死を誘導するのかを調べた。その結果, TNF- α , IL-10およびNOドナーのNOR3 ((+/-)-(E)-4-ethyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-3-hexenamide) は, 各々, 濃度依存的にニューロン死を誘導した⁶⁾。つまり, TNF- α , IL-10およびNO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°CでのマイクログリアからのTNF- α , IL-10およびNOの産生低下はニューロン死抑制に, 一方, 39°Cでの産生増加はニューロン死増加に繋がると考えられた。

以上より, 脳低温療法による脳保護作用の一機序に, TLR2活性化マイクログリアのNF- κ B阻害を介した早期でのニューロン傷害的TNF- α 抑制と後期でのニューロン傷害的IL-10およびNO抑制が関与することが示唆された。脳低温療法は急性重症脳障害に対する脳保護効果をもたらすが, 全ての患者に容易に適用されるわけではない。このような観点において, 低温下ではTLR2活性化マイクログリアのNF- κ B抑制がニューロン傷害性因子産生低下に繋がるという本研究結果は, マイクログリアのTLR2-NF- κ Bシグナリング経路が急性重症脳障害の重要な治療ターゲットになることを示唆しており, 今後, 臨床レベルでそのようなアプローチの研究を發展させる可能性がある。

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, TNF- α , IL-10およびNO産生の時系列的温度依存性変化は, 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に, TNF- α が早期の, IL-10とNOが後期の, バイオマーカーになりうることを示唆している。

低酸素性虚血性 (HI) 脳障害由来マイクログリアの炎症性・抗炎症性因子産生の低温応答

興味深いことに, 最近, 脳虚血障害の動物実験および臨床研究において, 低温による梗塞体積減少や神経学的予後改善は早期での炎症性サイトカイン発

現の低下を伴うこと¹⁸⁾や、早期での低温は神経学的予後改善に、後期での高温を伴った炎症反応増強は予後不良に関係すること¹⁹⁾が報告された。つまり、脳障害の保護や増悪における温度および時間依存的機構の存在を*in vivo*で示すものであり、我々の*in vitro*結果^{2, 6)}を支持した。

そこで我々も、その*in vitro*結果を臨床的に関連付けるため、脳低温療法の適応となる新生児HI脳症のモデルマウス（HI脳障害）由来マイクログリアを用いることにした。HI脳障害マウスは、生後2日齢のマウスの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の正常酸素濃度下で更に1日留置したマウス（3日齢）の脳半球から、磁気ビーズ結合抗CD11b抗体を用いてマイクログリアを単離し、TLR2およびTLR4刺激下で低温培養を行った。中枢神経系から取り出した細胞は、生体内環境下での細胞の表現系を維持しており、その培養（*ex vivo*培養）は*in vivo*状態を知る一つの方法^{20, 21)}であり、本研究で用いた。その結果、HI脳障害由来マイクログリアのTLR誘導TNF- α 産生は培養6時間、IL-10およびNO産生は48時間で、各々、37°Cに比べ33°Cでは低値を示した⁵⁾。つまり、HI脳障害モデルを用いた研究においても、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。新生児HI脳症患者の脳脊髄液中にはサイトカインやNOの増加がみられ、その濃度は脳障害の程度と相関することが報告^{22, 23)}されており、臨床と関連する本研究結果は、特に脳低温療法による新生児HI脳症の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ことを示唆する。

T細胞由来ニューロン傷害性因子の温度依存的産生

更に近年では、“時系列的（時間依存的）”という概念を発展させ、脳障害の進行過程におけるT細胞の炎症的関与に着目し、研究を行った。T細胞は、脳障害早期でのマイクログリア活性化から遅れて脳内に浸潤し、炎症性サイトカインやプロテアーゼ等のニューロン傷害性因子の放出を介して二次的炎症を惹起し、持続的な脳障害増悪に関与する⁸⁻¹⁰⁾。こ

れらの増加は末梢性にも認められる^{9, 10)}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ターゲットになる可能性がある。そこで、末梢性T細胞の炎症性サイトカイン（IL-17）とセリンプロテアーゼのグランザイムB（GrB）産生に低温・高温が及ぼす影響を調べた。その結果、naïve CD4⁺、CD4⁺および $\gamma\delta$ T細胞のIL-17産生ならびにCD4⁺、CD8⁺および $\gamma\delta$ T細胞のGrB産生は、培養72時間で、各々、37°Cに比べ33°Cでは低値、39°Cでは高値を示した¹¹⁾。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すると、IL-17とGrBは、各々、濃度依存的にニューロン死を誘導した¹¹⁾。この場合も、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、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、が考えられた。更に、温度依存性変化を示したIL-17とGrBも、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を示唆された。

おわりに

本稿をまとめると、脳低温下では、脳損傷早期におけるマイクログリアからのニューロン傷害性因子産生低下に基づくニューロン死抑制効果のみでなく、T細胞からのニューロン傷害性因子産生も低下し、遅発性にもニューロン死抑制効果をもたらされると考えられた。これは、脳低温療法的作用機序を、新しく“時系列的”な観点から示唆したものであり、本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かもしれない。例えば、このような時系列的炎症反応をターゲットにした新しい治療（介入）戦略等が期待できる。

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) Matsui T, Tasaki M, Yoshioka T, et al. Temperature- and time-dependent changes in TLR2-activated microglial NF- κ B activity and concentrations of inflammatory and anti-inflammatory factors. *Intensive Care Med* 2012 ; **38** : 1392-1399.
- 3) Matsui T, Motoki Y, Inomoto T, et al. Temperature-related effects of adenosine triphosphate-activated microglia on pro-inflammatory factors. *Neurocrit Care* 2012 ; **17** : 293-300.
- 4) Matsui T, Motoki Y, Yoshida Y. Hypothermia reduces toll-like receptor 3-activated microglial interferon- β and nitric oxide production. *Mediators Inflamm* 2013 ; **2013** : 436263. doi : 10.1155/2013/436263.
- 5) Matsui T, Kida H, Iha T, et al. 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* 2014 ; **52** : 151-158.
- 6) Matsui T, Yoshida Y, Yanagihara M, et al. Hypothermia at 35° C reduces the time-dependent microglial production of pro-inflammatory and anti-inflammatory factors that mediate neuronal cell death. *Neurocrit Care* 2014 ; **20** : 301-310.
- 7) Matsui T, Miyazaki S, Motoki Y. Effects of delayed hypothermia on time-dependent microglial production of inflammatory and anti-inflammatory factors. *Clin Exp Neuroimmunol* 2014 ; **5** : 202-208.
- 8) Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, et al. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med* 2009 ; **15** : 946-950.
- 9) Chaitanya GV, Schwaninger M, Alexander JS, et al. Granzyme-b is involved in mediating post-ischemic neuronal death during focal cerebral ischemia in rat model. *Neuroscience* 2010 ; **165** : 1203-1216.
- 10) Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C, et al. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood* 2012 ; **120** : 3793-3802.
- 11) Matsui T, Kawahara N, Kimoto A, et al. Hypothermia reduces but hyperthermia augments T cell-derived release of interleukin-17 and granzyme B that mediate neuronal cell death. *Neurocrit Care* 2015 ; **23** : 116-126.
- 12) Cao CX, Yang QW, Lv FL, et al. Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 ; **353** : 509-514.
- 13) Lehnardt S, Schott E, Trimbuch T, et al. A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. *J Neurosci* 2008 ; **28** : 2320-2331.
- 14) Lehnardt S, Lehmann S, Kaul D, et al. Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia. *J Neuroimmunol* 2007 ; **190** : 28-33.
- 15) Ziegler G, Harhausen D, Schepers C, et al. TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 ; **359** : 574-579.
- 16) Hoffmann O, Braun JS, Becker D, et al. TLR2 mediates neuroinflammation and neuronal damage. *J Immunol* 2007 ; **178** : 6476-6481.
- 17) Babcock AA, Wirenfeldt M, Holm T, et al. Toll-like receptor 2 signaling in response to brain injury : an innate bridge to neuroinflammation. *J Neurosci* 2006 ; **26** : 12826-12837.
- 18) Ceulemans AG, Zgavc T, Kooijman R, et al. Mild hypothermia causes differential, time-dependent changes in cytokine expression and gliosis following endothelin-1-induced transient focal cerebral ischemia. *J Neuroinflammation* 2011 ; **8** : 60. doi : 10.1186/1742-2094-8-60.
- 19) Blanco M, Campos F, Rodríguez-Yáñez M, et al. Neuroprotection or increased brain

- damage mediated by temperature in stroke is time dependent. *PLoS One* 2012 ; 7 : e30700. doi : 10.1371/journal.pone.0030700.
- 20) Frank MG, Wieseler-Frank JL, Watkins LR, et al. Rapid isolation of highly enriched and quiescent microglia from adult rat hippocampus : immunophenotypic and functional characteristics. *J Neurosci Methods* 2006 ; 151 : 121-130.
- 21) Yip PK, Kaan TK, Fenesan D, et al. Rapid isolation and culture of primary microglia from adult mouse spinal cord. *J Neurosci Methods* 2009 ; 183 : 223-237.
- 22) Aly H, Khashaba MT, El-Ayouty M, et al. IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha and outcomes of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Brain Dev* 2006 ; 28 : 178-182.
- 23) Ergenekon E, Gücüyener K, Erbaş D, et al. Cerebrospinal fluid and serum vascular endothelial growth factor and nitric oxide levels in newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *Brain Dev* 2004 ; 26 : 283-286.

Hypothermia Reduces but Hyperthermia Augments Microglial- and T Cell-Derived Release of Factors that Mediate Neuronal Cell Death

Tomohiro MATSUI

Department of Clinical Laboratory Sciences (Clinical Laboratory Sciences), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

SUMMARY

Therapeutic hypothermia protects neurons after severe brain damage; however, the underlying mechanisms have yet to be fully elucidated. Activated microglia, which appear soon after the

primary injury, release cytokines and nitric oxide (NO), known to damage neurons. T cells infiltrate the infarcted brain tissue within days of cerebral ischemia and play essential roles in exacerbating ischemic brain injury by producing inflammatory factors. Then, we examined how therapeutic hypothermia can prevent and brain hyperthermia can exacerbate secondary brain damage and demonstrated that the release of tumor necrosis factor (TNF) - α , interleukin (IL) -10, and NO from microglia, and that of IL-17 and granzyme B (GrB), a serine protease, from several T cell lineages is reduced by hypothermia but augmented by hyperthermia. The pathophysiological significance of these temperature-dependent changes in TNF- α , IL-10, NO, IL-17, and GrB levels in relation to hypothermic neuronal protection and hyperthermic neuronal injury was demonstrated by showing that all these molecules independently induce neuronal cell death in a concentration-dependent manner, in which the kinetics of concentration dependence was found to be proportional to that of the temperature-dependent changes in their production. These findings suggest that a decrease in TNF- α , IL-10, NO, IL-17, and GrB levels during hypothermia contributes to the direct protection of neurons, whereas an increase in their levels during hyperthermia contributes to direct injury of neurons.

