

学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏 名 松本 調

論 文 名 脳梗塞巣に集簇する CD200⁺/CD200⁻の 2 種類のマクロファージ
: NG2 プロテオグリカンと CD200 発現による分類

学位論文の要約

【諸言】 脳梗塞の発症とともに、脳梗塞巣中心部では、神経細胞やマイクログリアの細胞死が急速に起こる一方、好中球、単球、リンパ球などの血球細胞が浸潤する。これまで、私達は、ラット脳梗塞巣中心部に Iba1 陽性骨髄由来マクロファージが侵入し、NG2 proteoglycan(以下 NG2)を発現するとともに、激しく増殖し、大量の細胞が梗塞巣に集積することを見出してきた。この細胞群は BINCs(Brain Iba1⁺/NG2⁺ Cells)と呼ばれ、虚血による組織障害の増悪を防ぐことが示されている。私達は、この細胞群の機能解析により脳梗塞に対する新たな治療法の開発に向けた研究を続けてきた。一方、私達は脳梗塞巣中心部に集積するマクロファージに、CD200 を発現する細胞が集積していることを明らかにした。CD200 は、CD200R を発現するマイクログリアや骨髄由来細胞の起炎症反応を抑制する分子として知られている。また、T 細胞の Th1、Th2 の 2 分類に対応する形で、近年マクロファージを二類型に分類するようになった。すなわち、起炎症性の M1 マクロファージと抗炎症性あるいは損傷組織修復に働く M2 マクロファージであり、脳梗塞においては、活性化するマイクログリア・マクロファージが M1 型か M2 型かということは明らかにされていない。

【目的】 私達は、脳梗塞巣中心部に集積するマクロファージで NG2 を発現するものの性状解析を行い、これらが、M1、M2 に対応するかどうか、骨髄系細胞の起炎症性活性化を抑制する CD200 の機能にも着目し、検討を行った。

【方法】 中大脳動脈一過性閉塞によるラット脳梗塞モデルを作成し、虚血 1、2、3、5、7、14 日目の脳梗塞巣の中心部、辺縁部、対側非虚血部組織の CD200 と CD200R の mRNA の発現量を定量的リアルタイム RT-PCR により検討した。脳梗塞 7 日目の梗塞巣よりマクロファージを分離し、CD200 の cDNA 配列を調べた。また、CD200 に対する各種抗体を用い、ラット脳梗塞組織の CD200 の蛋白発現を Western blotting 法で解析した。ラット脳梗塞の凍結切片を作成し、NG2 陽性細胞

と CD200 陽性細胞の局在、および M1、M2 マーカーの発現を免疫組織化学的に検討した。

【結果】免疫組織染色の結果、脳梗塞巣マクロファージは、NG2 陽性細胞と CD200 陽性細胞に分類することができ、NG2 陽性細胞(BINCS)は CD200 陰性、CD200 陽性細胞は NG2 陰性であった。また、Iba1 陽性細胞すなわちマクロファージは、ほぼすべて CD200 受容体である CD200R を発現していた。脳梗塞巣マクロファージが発現する CD200 は、その cDNA 配列を解析により、exon1、2 および exon3 の一部に由来する配列が欠損した CD200-truncated form(以下 CD200S)を発現し、脳梗塞巣中心部では、CD200S が CD200-full-length(以下 CD200L)に比べ mRNA の発現が有意に高かった。Western blotting 法による CD200 の蛋白発現の解析で、OX2 抗体では、脳梗塞巣対側や辺縁に高い発現を示し、抗 CD200 C 末抗体では、脳梗塞中心部に高い発現を示した。吸収試験等による検討から、抗 CD200 C 末抗体は CD200S 特異的抗体で、OX2 抗体は CD200L 特異的抗体であると考えられた。免疫組織染色において、多くの CD200 陽性細胞は、CD200L と CD200S を共発現していた。さらに、NG2 陽性細胞は梗塞巣皮質に、CD200 陽性細胞は梗塞巣脳梁に集簇しており、NG2 陽性細胞周辺には OX2 抗体のみ陽性の CD200L 陽性変性組織が多量に存在していた。CD200 陽性細胞は、M1 マーカーの CCL2、iNOS、IL-1 β 、TLR4、M2 マーカーの CD68、CD163、TGF β に陽性であり、NG2 陽性細胞は、M1 マーカーである CD86 を除いて陰性であった。

【考察】脳梗塞巣に集積するマクロファージには、NG2 陽性細胞、CD200 陽性細胞の 2 種類があり、いずれも M1、M2 に分類し得なかった。脳梗塞中心部の CD200 陽性細胞は起炎症性活性を有し、NG2 陽性細胞は起炎症性メディエーターや食食能が抑制されていると考えられた。NG2 陽性細胞の周囲には、神経細胞由来と考えられる CD200L 陽性変性組織が存在し、CD200L 陽性組織と自身の CD200R との相互作用による起炎症反応の抑制効果が示唆された。一方 CD200 陽性細胞は、CD200L と CD200S を共発現しており、CD200L-CD200R による起炎症性活性の抑制が CD200S によって無効化されている可能性が考えられた。

なおこの学位論文の内容は、以下の原著論文に既に公表済である。

主論文: Matsumoto S, Tanaka J: CD200(+) and CD200(-) macrophages accumulated in ischemic lesions of rat brain: The two populations cannot be classified as either M1 or M2 macrophages. J Neuroimmunol. 2015 May 15;282:7-20. doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.03.013. Epub 2015 Mar 14.