

学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏名 阿部 尚紀

学位論文名 頭部外傷後の浸潤白血球や活性化マイクログリアの作用
：催眠鎮静薬ブロムワレリル尿素による予後改善効果から

【はじめに】

頭部外傷後の過剰な炎症による脳の2次的損傷が、予後を悪化させる原因として注目されている。その過剰な炎症を引き起こす原因として活性化型マイクログリア(MG)や骨髄由来マクロファージ(MΦ)等が挙げられているが、形態や抗原表現型の類似性からそれらを区別して解析することは難しく、それぞれの役割について未だ詳しく解明されていない。しかし近年、MG 特異的マーカーやフローサイトメトリー(FCM)法を用いることで、これらを区別し詳しく解析することが可能となってきている。我々は、古典的催眠鎮静薬ブロムワレリル尿素(BU)が著明な抗炎症作用を有することを発見し、敗血症モデルやパーキンソン病モデルラットに対する治療効果を報告してきた。本研究では、BU の頭部外傷予後改善効果に加えて、FCM 法を用いて活性化型 MG と骨髄由来 MΦ を分離して解析することで浸潤白血球や活性化型 MG の作用解明を試みた。

【方法】

7-9 週齢のオス Wistar ラットを用いた。頭頂部頭蓋骨に穴を空け、注射針を刺入する方法で脳傷害を作成した。その1時間後に BU を皮下注射し、その後経口投与に切り替えて1週間 BU を投与した BU 群と、溶媒のみを皮下注射しその後水のみを飲水させた vehicle 群の二群に分け、脳 MRI の撮像や、学習行動実験等を行い BU の長期予後への影響を調べた。また、採取した脳組織等を定量的リアルタイム PCR や免疫組織化学染色、ELISA、FCM 解析、セルソーティング等の手法を用い、頭部外傷の予後増悪機序を検討した。また、初代培養 MG や肺胞 MΦ にミトコンドリア ストレステストを行い、BU の代謝への影響を調べた。

【結果】

BU は、頭部外傷 15 週間後の脳組織喪失容積を縮小させ、学習能力や空間認知機能の低下を抑制していた。

頭部外傷 1.5 日後の損傷部周辺では CCL2 等のケモカイン、IL-1β や TNFα、IL-6 等の起炎症性サイトカインや、酸化障害の良い指標であるとされる 8OHdG、髄液中 IL-6 タンパク質が BU 群で抑制されていた。頭部外傷 1.5 日後の FCM 解析では、大きさが大きく顆粒状である活性化型 MG や MΦ、

顆粒球の浸潤が増加しており、その中で浸潤 MΦ が最も強くミトコンドリア由来活性酸素種(mitROS)を産生していた。BU は MΦ の浸潤を抑制し、その mitROS 産生を抑制していた。さらに、各細胞集団をソーティングして回収し、定量的リアルタイム PCR を行ったところ、MΦ では iNOS、IL-1β や CD68、MG では TGFβ や TNFα、IL6 の発現レベルが高かった。BU は iNOS、IL-1β、TNFα、IL-6 等の発現を抑制していたが、IGF-1 や TGFβ、CD68 の発現に影響を与えなかった。

頭部外傷 7 日後の FCM 解析では、活性化型 MG や浸潤 MΦ の数に差は認められなかったが、BU は浸潤 MΦ の CD86 陽性率をやや低下させ、CD206 陽性率をやや増加させた。

また、初代培養 MG や肺胞 MΦ を用いて行ったミトコンドリア ストレステストでは、BU は基礎呼吸、最大呼吸、予備呼吸、ATP 産生を抑制し、更にミトコンドリア ATP 合成酵素阻害後の細胞外酸性化速度の上昇すなわち解糖系の活性増強も抑制した。

【考察】

頭部外傷に対して予後改善効果を発揮した BU は、CCL2 を抑制することで MΦ の脳への浸潤を抑制し、更に MΦ の mitROS や iNOS、IL-1β、MG の TNFα や IL-6 といった起炎症性メディエーターを抑制することで脳の酸化障害や炎症を軽減していると考えられた。一方で、BU は抗炎症作用を有する TGFβ や、神経保護因子である IGF1 の発現を抑制しなかった。MG は TGFβ の発現レベルが高く、mitROS 産生や iNOS、IL-1β の発現レベルは MΦ で高かった。また、MG で発現レベルが高い TNFα、IL6 は脳に於いては神経保護作用も有することから、頭部外傷急性期において脳の 2 次損傷を悪化させる主な細胞は MΦ であり、MG はむしろ神経保護的な働きをしていると考えられた。

頭部外傷亜急性期において BU は MΦ の数を抑制せず、組織修復型である M2 型 MΦ の割合を増加させていた。BU は MΦ が産生する mitROS を減少させることで、MΦ 自身の酸化障害を軽減し、その細胞死を抑制したことで頭部外傷 7 日目の細胞数に差が認められなくなったと考えられる。

BU はミトコンドリア機能障害をきたすことなくミトコンドリア活性を抑制しており、更にミトコンドリア ATP 合成酵素阻害後の代償性の解糖亢進に伴った乳酸産生増加による細胞外酸性化速度の上昇も抑制したことから、細胞の代謝を抑制することで治療効果を発揮していると考えられた。

【結論】

FCM やセルソーティング、免疫組織学的染色などを組み合わせて解析することにより、活性酸素種や IL-1β を産生する主な細胞が、MG では無く MΦ であることが判明した。有害な MΦ は急性期に自ら産生した活性酸素種によって障害を受け変性し、残った細胞は亜急性期に組織修復型へと変化する。BU は組織修復過程を阻害せず、CCL2 や細胞の代謝を抑制することで、MΦ の浸潤や活性酸素種、起炎症性メディエーターの産生を低下させ、頭部外傷の予後を改善した。BU はヒトに対して安全性が確立された薬剤で、新たな頭部外傷治療薬となる可能性があると考えられる。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 : Abe N, Choudhury ME, Watanabe M, Kawasaki S, Nishihara T, Yano H, Matsumoto S, Kunieda T, Kumon Y, Yorozuya T, Tanaka J: Comparison of the detrimental features of microglia and infiltrated macrophages in traumatic brain injury: A study using a hypnotic bromovalerylurea. GLIA 2018 DOI: 10.1002/glia.23469