

研究報告書

「脳組織傷害後の慢性炎症における免疫制御機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 七田 崇

1. 研究のねらい

アルツハイマー病、多発性硬化症、脳卒中などの神経疾患において炎症の慢性化が病態と密接に関係する。炎症に伴って脳内に浸潤した免疫細胞（マクロファージやT細胞）は、何らかの脳内因子によって修飾を受けて炎症に寄与すると考えられる。本研究では、免疫細胞を活性化させて炎症促進に働く脳内因子として、Peroxisome oxidoreductin (Prx) を新たに同定した。Prxのマクロファージ活性化機構を解明し、さらにPrxを中和除去することで慢性炎症の悪循環を断ち切る治療法を開発する。一方で炎症の慢性期には、免疫細胞の一部はむしろ組織修復に働くと考えられているが、その分化メカニズムや機能は明らかになっていない。本研究ではこのような修復性の免疫細胞と脳内因子に着目して詳細な免疫学的・分子生物学的解析を行うと共に、組織修復に働く機能を解明する。本研究では脳内の免疫細胞が、脳内因子によって制御されることによって炎症を促進し、そして収束に至るという仮説を検証し、炎症が関与する神経疾患の新たな治療法を見出す。

2. 研究成果

(1) 概要

様々な神経疾患の病態に炎症が関与する。脳は無菌的な臓器であり、免疫系を活性化する病原体が存在しない。したがって脳組織に存在する内因性の炎症惹起因子 (Danger-associated molecular patterns : DAMPs) が炎症を制御していると考えられる。

まず、脳組織に存在する主な DAMPs の同定を試みた。脳抽出液を樹状細胞に添加することによって、DAMPs が含まれる脳抽出液の分画を決定し、その分画を質量分析によって解析した。その結果、得られた候補タンパクの中から Peroxisome oxidoreductin (Prx) を DAMPs として見出した。Prx は脳内に浸潤したマクロファージを TLR2、TLR4 依存的に活性化し IL-23 や IL-1 β のような炎症性サイトカインを産生させていた。IL-1 β は直接的に神経細胞を傷害し、IL-23 は IL-17 産生性 T 細胞を脳内に誘導することにより炎症を慢性化させる。Prx 抗体を脳虚血モデルマウスに投与すると、脳梗塞体積を有意に縮小させ、神経症状を改善した。

Prx が脳組織に存在し続けると炎症を慢性化させる可能性があるが、Prx は脳虚血誘導 4 日後には脳組織から概ね排除されている。したがって、Prx などの DAMPs を損傷した脳組織から積極的に排除するメカニズムが存在するものと考えられた。Prx などの DAMPs を蛍光標識して、脳梗塞巣から抽出したマクロファージやミクログリアに添加すると、蛍光標識した DAMPs がこれらの細胞に取り込まれてリソソームに運ばれ、分解排除されることが判明した。

次に、マクロファージの細胞株を用いてランダム変異を導入することにより、蛍光標識した Prx を取り込むことができない変異株を単離した。マイクロアレイ解析によって変異を起こした遺伝子群を検索した結果、Scavenger 受容体の一種である MSR1、MARCO と、マクロファージ

の分化に重要な働きを持つ転写因子 Mafb の、3 つの遺伝子が DAMPs の取り込みに重要であることを発見した。MSR1 や MARCO は脳梗塞巣に浸潤したマクロファージが強く発現しており、DAMPs を積極的に排除して炎症を収束させる働きをもつことが明らかとなった。転写因子 Mafb はマクロファージにおける MSR1 の発現を制御しており、やはり脳梗塞後の炎症の収束に重要な機能を有していた。Mafb を介して MSR1 の発現を上昇させる薬剤としてビタミン A 誘導体の 1 つであるタミバロテン (Am80) を見出し、新規の脳梗塞治療剤となり得ることを証明した。

以上のように、神経組織における炎症の慢性化を阻止するための、内在性の炎症収束メカニズムを解明することに成功し、新たな治療戦略を開発することができた。

(2) 詳細

研究テーマ A「脳組織における炎症が惹起されるメカニズムの解明」

1. 脳抽出液の強力な炎症惹起因子 (DAMPs) は Prx family タンパクである。

脳組織のホモジネート (脳抽出液) を培養樹状細胞に添加すると、IL-23、TNF α 、IL-1 β といった炎症性サイトカインの産生を誘導した。脳抽出液を熱処理、タンパク分解酵素処理すると、この活性が消失することから、活性物質はタンパク質であると考えられた。さらに脳抽出液を分画し、最終的にシヨ糖濃度勾配によって分子量で分けると、15~25kDa の分画に活性が認められた。この分画の質量分析の結果から得られた候補タンパクについてリコンビナントタンパクを作製し、樹状細胞に添加した。その結果、peroxiredoxin (Prx) family タンパクが強力に炎症性サイトカインの産生を誘導することが明らかとなった。

2. Prx は Toll 様受容体 (TLR2、TLR4) を介して浸潤マクロファージを活性化する。

Prx タンパクの変異体を作製した結果、Prx の $\alpha 3$ -helix 構造が Toll 様受容体 (TLR2 と TLR4) を介して、マクロファージや樹状細胞に炎症性サイトカインの産生を誘導することが判明した。Prx 中和抗体を脳虚血モデルマウスに投与すると、有意に脳梗塞体積を縮小、神経症状を改善し、神経保護効果を示した。Prx 中和抗体は虚血脳内でマクロファージが産生する IL-23 を減少させたことから、IL-23 によって虚血脳内で誘導される IL-17 産生性 T 細胞 (主に $\gamma \delta$ T 細胞) による脳虚血後炎症の遷延化にも、Prx が寄与しているものと考えられた。

3. Prx は脳梗塞発症 24 時間後に虚血脳内で産生され、浸潤マクロファージを活性化する。

脳梗塞組織における Prx 発現の経時変化を検討すると、Prx は虚血壊死に陥った組織で脳虚血誘導 24 時間をピークに強く発現していた。虚血ストレスに伴って脳細胞内で産生された Prx は、細胞死 (主にネクロシス) に伴って細胞外に放出され、周囲に浸潤したマクロファージを活性化するものと考えられ、細胞外に存在する Prx が脳に浸潤したマクロファージと接触する様子が多数観察された。

4. インフラマソームを介した炎症惹起メカニズムの解明

IL-1 β の産生にはインフラマソームの活性化が重要であるが、インフラマソームの活性化を阻害する作用のある低分子阻害剤を探索し、ブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) の阻害剤であるイブルチニブを見出した。イブルチニブは、NLRP3 インフラマソームを阻害し、IL-1 β の産生および放出を抑制することが明らかとなった。イブルチニブを脳梗塞モデルマウスに投与した結果、脳梗塞領域の拡大抑制や運動機能の改善が認められた。

以上の成果によって、Prx が脳梗塞後の炎症の遷延化に寄与していることが明らかとなった。脳虚血モデルにおける検討では虚血誘導後 4 日目前後には、脳梗塞組織においても Prx の発現が見られなくなることから、Prx は何らかの機序で脳内から排除されているものと考えられた。Prx などの DAMPs の排除は、炎症の慢性化を防ぎ組織修復を始めるために必要な生体防御のメカニズムであろうと予想し、次に DAMPs の排除メカニズムの解明に挑んだ。

研究テーマ B「脳組織における炎症が収束に至るメカニズムの解明」

1. DAMPs は Scavenger 受容体によって処理される

脳梗塞巣に存在する細胞を Percoll によって抽出し、蛍光標識した Prx の取り込みを評価したところ、マクロファージが主な取り込み細胞であった。マクロファージ細胞株 (RAW264.7) を用いて、ENU (N-Nitroso-N-methylurea) 処理することによって DNA に高効率なランダム突然変異を導入し、Prx の取り込みが見られない変異 RAW 細胞株を樹立した。さらにマイクロアレイによる遺伝子発現解析した結果、Prx などの DAMPs のエンドサイトーシスに Scavenger 受容体として知られる MSR1、MARCO が重要であること、さらに転写因子 Mafk が MSR1 の発現を制御することを突き止めた。

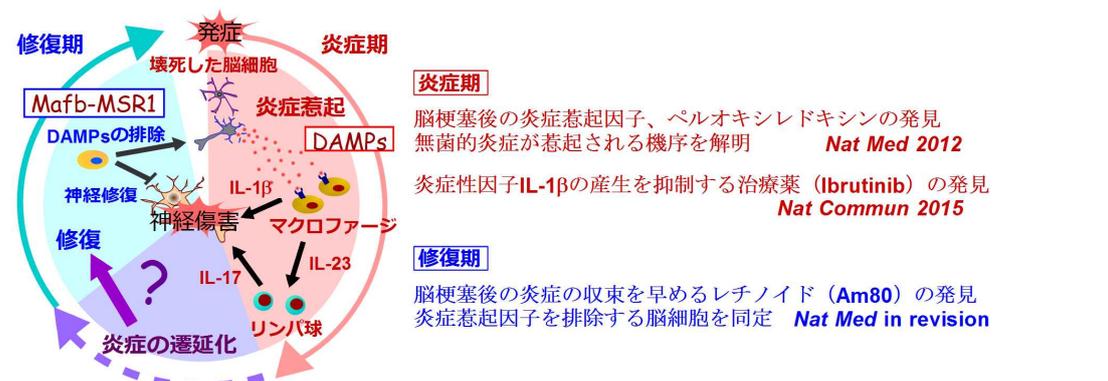
2. DAMPs 処理機構を阻害すると脳梗塞の病態が悪化する

Msr1/Marco-double KO マウスを用いて脳虚血モデルを作製すると、脳梗塞巣における Prx の排除が遅れ、炎症が遷延化し、脳梗塞体積が拡大、神経症状が悪化することが明らかとなった。MSR1 を高発現するマクロファージは炎症収束期に脳内に出現し、DAMPs を効率的に排除して神経栄養因子を産生する修復担当細胞であることが判明した。Mafk は MSR1 を高発現するマクロファージの誘導に重要な転写因子であった。

3. Am80 は Mafk を介して脳梗塞後の炎症収束を早める薬剤である。

以上の発見を新規治療法の開発に応用するため、Mafk を介して脳梗塞内で MSR1 の発現を促進する薬剤を探索した。その結果、ビタミン A 誘導体が Mafk の発現を促進することが判明した。Am80 は本邦では白血病の治療薬として使われているビタミン A 誘導体であるが、脳虚血モデルマウスに投与すると脳内では Mafk 依存的にマクロファージに作用して MSR1 の発現を促進することにより、DAMPs の排除を促進して炎症の収束を早め、梗塞体積の縮小、神経症状を軽減することを発見した。

以上のように、脳神経組織が損傷した場合に、炎症を惹起するメカニズムと炎症を収束させるメカニズムが脳に備わっており、炎症の慢性化を阻止することが解明できた。いずれも分子レベルでの解明を実現しており、脳梗塞における新たな治療標的を決定することができた。



3. 今後の展開

本研究によって脳神経組織における炎症の惹起と収束のメカニズムが明らかとなった。しかしながら、炎症後に脳組織がどのように修復されるのかはまだ十分に解明されていない。さらに修復と炎症は一体どのような関係にあるのだろうか？ 本研究の成果はこの命題に挑むための足掛かりになるものであり、今後は修復のメカニズムを詳細に解明する必要がある。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

脳神経組織の損傷後に起こる炎症の惹起と収束メカニズムを解明した。研究開始時に計画していた課題は概ね達成することができた。本さきがけ研究課題は終了となるが、今後、脳内における炎症後の修復メカニズムを詳細に解明する必要性についても明確となった。したがって、本研究課題をさらに発展させる形で研究を継続するため、平成 29 年 4 月より東京都医学総合研究所にて新規のプロジェクトチームを創設することとなった。本さきがけ研究の成果が認められた結果として、新規プロジェクトのリーダー(principal investigator)に採用されており、研究者としての飛躍につながった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

脳虚血モデルにおける脳梗塞巣拡大に関与するDAMPsとして、脳虚血誘導24時間をピークに強発現するPeroxi redoxin(Prx)を同定した。Prxは細胞死に伴って細胞外に放出され、その α 3-helix構造により、周囲に浸潤したマクロファージをTLR2/TLR4を介して活性化し、IL-23やIL-1 β のような炎症性サイトカインを産生させて、脳内炎症を引き起こすことを初めて示した。また、Prx中和抗体を脳梗塞モデルマウスに投与すると、有意に脳梗塞体積を縮小して、神経症状を改善し、神経保護効果が認められた。さらに、脳梗塞後の炎症を惹起するIL-1 β の産生にNLRP3インフラマソームの活性化が必要であることから、インフラマソームの活性化を阻害する作用のある低分子阻害剤を探索して、BTK阻害剤であるイブルチニブを見出し、その投与により脳虚血モデルマウスの脳梗塞巣の拡大抑制や運動機能の改善効果を認めた。一方、Prx放出後において脳虚血後炎症を収束させるキー分子として、Prx排除に重要なScavenger受容体であるMSR1とMARCを同定し、これら分子を欠損するマウスでは、炎症が遷延化し、脳梗塞体積の拡大と共に神経症状が悪化することを明らかにした。そして、転写因子MafkがMSR1の発現を制御することを突き止め、Mafkを介して脳梗塞内でMSR1の発現を促進する薬剤を探索し、白血病の治療薬として使われているビタミンA誘導体であるAm80を見いだした。さらに、Am80の脳梗塞モデルマウスへの投与により病態と症状を改善することを証明した。

以上のように、脳梗塞巣の拡大と神経症状の重篤化を引き起こす脳内自然炎症の発症ばかりか、その収束のメカニズムを分子レベルで解明すると共に、新たな治療標的を決定して、その炎症の抑制と収束を促進する薬物を見いだすという素晴らしい成果を上げ、非常に高いレベルの論文を複数生み出してきたことを高く評価する。また、本研究成果が認められた結果

として、平成29年4月より東京都医学総合研究所にて新規のプロジェクトチームを創設する予定であり、今後のさらなる研究の発展が見込まれる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Shichita T, Ito M, Morita R, Komai K, Noguchi Y, Ooboshi H, Koshida R, Takahashi S, Kodama T, Yoshimura A. Mafk prevents excess inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of danger signals through MSR1. *Nat Med.* in revision
2. Ito M, Shichita T, Okada M, Komine R, Noguchi Y, Yoshimura A, and Morita R. Bruton's tyrosine kinase (BTK) is an essential component for NLRP3 inflammasome activation and a potential therapeutic target for inflammation after ischemic brain injury. *Nat Commun.* 6: 7360 (2015)
3. Shichita T, Ito M, Yoshimura A. Post-ischemic inflammation regulates neural damage and protection. *Front Cell Neurosci.* 8:319 (2014)
4. Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, Sekiya T, Ooboshi H, Kitazono T, Yanagawa T, Ishii T, Takahashi H, Mori S, Nishibori M, Kuroda K, Miyake K, Akira S, Yoshimura A. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med.* 18(6): 911-917 (2012)

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・招待講演

1. Shichita T, Yoshimura A: The resolution of cerebral post-ischemic inflammation. 学会名: MMCB2016 場所: Tokyo, Japan 年月: 2016 Jun
2. 七田 崇, 吉村昭彦: 脳梗塞の炎症の収束メカニズム 学会名: 第 89 回日本生化学会大会 場所: 仙台国際センター 年月: 2016 年 9 月
3. Shichita T, Yoshimura A: Regulation of post-ischemic inflammation by DAMPs and immune cells. 学会名: 10th World Congress for Microcirculation 場所: 京都国際会館 年月: 2015 Sep
4. 七田 崇, 伊藤美菜子, 吉村昭彦: 脳梗塞の炎症とその収束 学会名: 第 36 回日本炎症再生学会 場所: 虎ノ門ヒルズフォーラム 年月: 2015 年 7 月
5. 七田 崇, 大星博明, 吉村昭彦: DAMPs による脳梗塞後の炎症とその終焉 学会名: 第 26 回脳循環代謝学会 場所: 岡山 年月: 2014 年 11 月

・受賞

1. 「循環器学研究振興基金賞」(2014)

2. 「科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞」(2013)
3. 「日本脳卒中学会賞」(2013)
4. 「日本免疫学会研究奨励賞」(2012)

・プレスリリース

1. 脳梗塞後の炎症が悪化するメカニズムを解明 ～白血病治療薬が脳梗塞の治療にも使える可能性～(2015年6月)
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20150610/index.html>
2. 「脳梗塞を悪化させる新規メカニズムを発見」(2012年5月)
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20120521/index.html>