

<シンポジウム 06—4>脳血管障害治療の次のブレークスルーを目指して

脳梗塞後の炎症制御と神経再生

石橋 哲

(臨床神経 2010;50:882-885)

Key words : 神経新生, 免疫調整, E-セレクトリン, 制御性T細胞, 脳梗塞

1. はじめに

脳梗塞は日本における死因第3位の疾患であるのみならず, 例え救命できたとしても一度損傷を受けた中枢神経の再生能力は乏しいため後遺症が永続し, 寝たきりの最大の原因となっている. 近年, ヒト脳内においても側脳室外側壁, および海馬歯状回において神経新生部位があり, 神経幹細胞, 神経

前駆細胞が存在し, 絶えず新たな神経細胞が作り出されていることが判明した¹⁾. これらの側脳室外側壁の脳室下帯や海馬歯状回に存在する神経前駆細胞は, 脳梗塞などにより脳が損傷を受けると増殖が賦活化し, 増殖した神経前駆細胞は幼若ニューロンへ分化後に損傷部位へ遊走し, 一部は成熟した神経細胞に分化することが知られている.

われわれも, げっ歯類脳梗塞モデルに対し神経前駆細胞増殖作用のあるガレクチン-1 蛋白を側脳室内に投与する手法

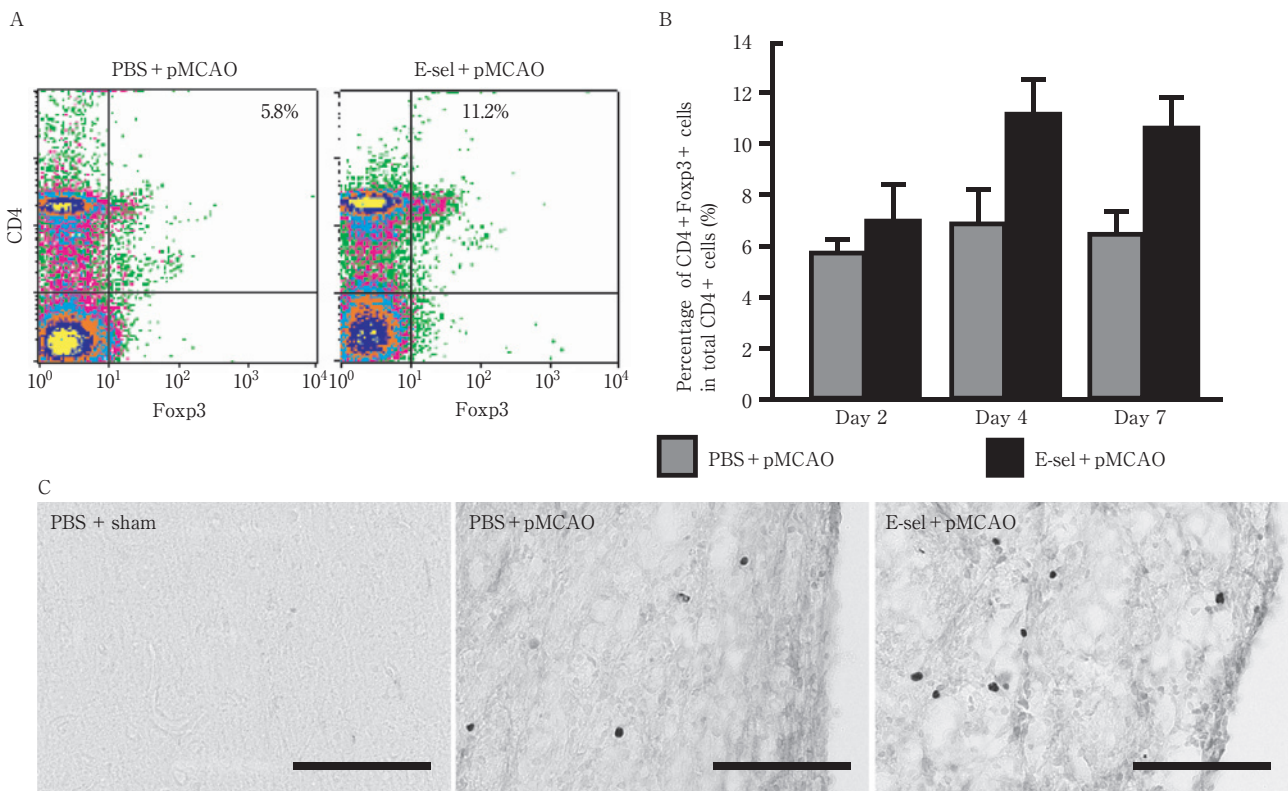


Fig. 1 虚血脳内での制御性 T 細胞の変化 (文献 9 より改変).

A, B : 虚血脳から単核球成分を分離し, Cell sorter で CD4 陽性 /Fcγp3 陽性細胞 (制御性 T 細胞) を定量した. E-セレクトリン投与群 (E-sel + pMCAO) は非投与群と比較して, 制御性 T 細胞が約 2 倍程度増加していた.

C : 脳凍結切片の Fcγp3 抗体による免疫染色. 制御性 T 細胞は正常脳では認められず, 虚血脳では主に梗塞巣周辺に検出された. E-セレクトリン投与群 (E-sel + pMCAO) では, 非投与群と比較してより多くの細胞が検出された.

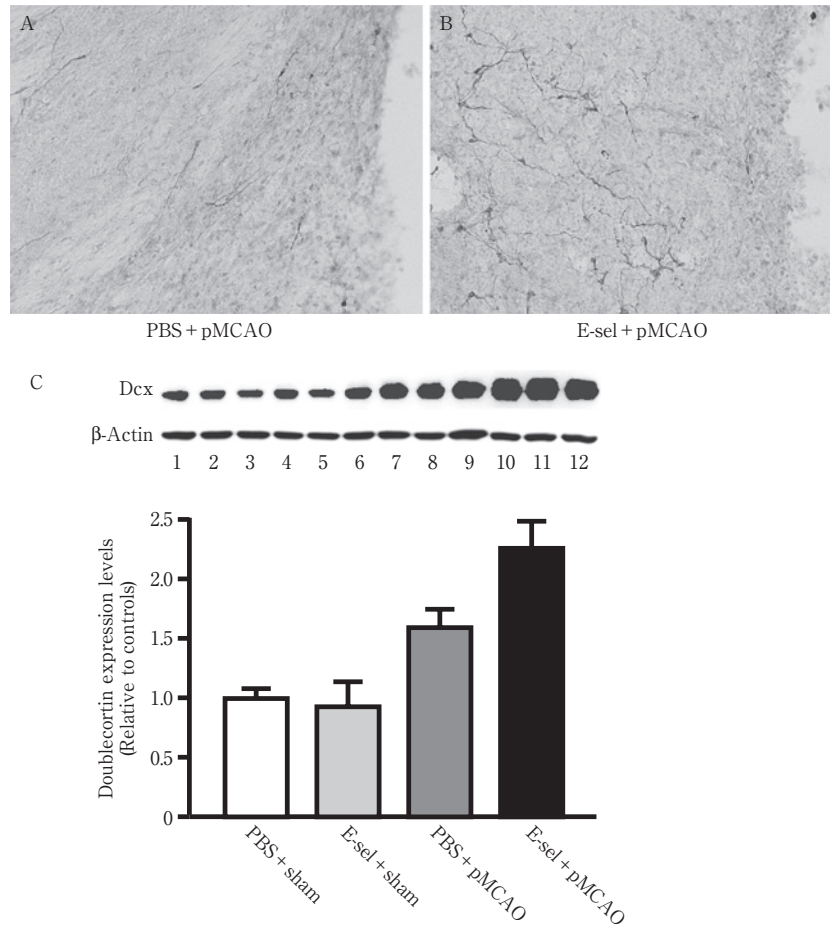


Fig. 2 虚血脳内の幼若ニューロンの変化 (文献9より改変).

A, B: 脳凍結切片の doublecortin 抗体による免疫染色. 梗塞巣周辺に認められる doublecortin 陽性の幼若ニューロンは E-セレクチン投与群 (E-sel + pMCAO) で有意に増加していた

C: 虚血脳のウェスタンブロット法による doublecortin 蛋白量の測定. 正常脳や E-セレクチン非投与群と比較して, E-セレクチンを投与した脳梗塞ラット (E-sel + pMCAO) では doublecortin 蛋白量が増加していた.

をもちいて, 脳室下帯の神経前駆細胞を増殖させると梗塞巣周辺での新生神経細胞が増加し, 神経脱落症状が改善することを確認した²⁾. しかしながら, これらの新たに作り出された神経細胞の 80% 以上は梗塞巣周辺で生存することができず, 機能的な神経細胞に分化できる新生細胞はげっ歯類脳内においてもたかだか 2~3% 程度と推定されている³⁾. このように, いくら脳損傷後の神経前駆細胞の増殖を活性化させたとしても, 梗塞巣周辺で新生神経細胞が死滅し効率的に自己修復ができないことは, 幹細胞を使用した神経再生治療法の大きな問題点である.

新生神経細胞の多くが死滅してしまう主要な原因の一つは, 梗塞巣周辺に惹起される強い炎症と考えられている. すなわち, 脳梗塞では虚血急性期より炎症性サイトカインが産生され, マイクログリアが活性化し, 白血球・リンパ球・マクロファージが末梢血より侵入し, これらの炎症性変化はもともと存在する神経細胞の細胞死を促進するだけでなく, 新生細胞の生存へも悪影響を与えることが知られている⁴⁾⁵⁾. そのた

め, 梗塞脳における自己再生能力を現実的/効率的なものにするためには, とくに梗塞巣およびその周辺領域に局限した部位での炎症を制御することが必要と考えられる.

近年, 炎症制御の中心的な役割を担っているリンパ球として制御性 T 細胞が知られるようになった. 以前より, 抗原を鼻腔粘膜や腸管粘膜に低容量投与することにより, ふたたび同じ抗原に暴露されたときの炎症反応が抑制される現象が知られており, トレランス (免疫寛容) あるいは Bystander suppression と呼ばれている. この抗原暴露に対する炎症反応を抑制する作用の中心となる T リンパ球が制御性 T 細胞であり, この制御性 T 細胞の分化に必須な転写因子 “Foxp3” が我が国で同定され⁶⁾, 飛躍的に知見が増えている.

この制御性 T 細胞は, 炎症抑制的サイトカインである TGF-β や IL-10 を産生し, 細胞障害性 T 細胞による細胞傷害の抑制, 炎症性サイトカイン放出抑制, および脳内ではマイクログリアの活性化を抑制する能力があると考えられている. 本稿では, E-セレクチン蛋白経鼻投与法により制御性 T 細胞

を梗塞巣周囲に誘導することで、脳梗塞後の神経新生が促進されるかを考察する。

2. E-セレクトイン経鼻投与法と制御性 T 細胞

鼻腔粘膜および腸管粘膜は病原菌などの有害物質にさらされる免疫系の最前線であり、抗原に対する有害な過剰免疫反応を防いでいる。そのため、鼻腔粘膜や腸管粘膜に抗原を投与することにより、その抗原に対する免疫応答が抑制される(免疫寛容)。つまり、脳梗塞発症後に病変部に限局して発現する抗原を鼻腔粘膜や腸管粘膜に投与し、その抗原に対する免疫寛容をひきおこすことができれば、虚血脳内の炎症を制御することができるはずである。

E-セレクトインは、接着因子として機能する糖鎖蛋白で、主に炎症局所の活性化血管内皮細胞に発現する。つまり、炎症性サイトカイン (IL-1 β や TNF- α など) による刺激で、血管内皮細胞表面に発現し、リンパ球や好中球などを血管内皮細胞に接着させる働きを持つ。脳梗塞では、虚血病巣の血管内皮細胞は活性化し、E-セレクトインが強く発現するため、虚血病巣に限局した免疫寛容を実現するための抗原としては都合が良い。

この E-セレクトイン蛋白を脳虚血前にあらかじめ経鼻的に投与することにより、E-セレクトインに対する免疫寛容をひきおこすことができ、げっ歯類脳虚血モデルでは脳経保護効果を発現することを、John M. Hallenbeck (Stroke Branch, NINDS, NIH) らが示した^{7,8)}。今回は、この E-セレクトイン蛋白経鼻投与により、免疫寛容の主役である制御性 T 細胞が虚血脳内に誘導されるかどうかを検討した。具体的には、高血圧自然発症ラット (SHR) に E-セレクトイン (5 μ g) を鼻腔粘膜に計 10 回隔日投与し、その後左中大脳動脈を閉塞して局所脳虚血を作製した。続いて、頸部リンパ節、大脳の制御性 T 細胞を抗 CD4 抗体、抗 Foxp3 抗体にて検出した。

その結果、CD4 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞は、E-セレクトインを鼻腔粘膜投与した脳虚血群の頸部リンパ節および虚血脳で、有意に増加していることが確認された (Fig. 1)。さらに虚血脳の免疫組織染色では、制御性 T 細胞は主に梗塞巣周辺部位に検出された (Fig. 1)。この結果から、E-セレクトイン投与により、実際に制御性 T 細胞が誘導され、脳梗塞後には虚血周辺部位に浸潤していると考えられた。

3. 制御性 T 細胞と神経新生

続いて、制御性 T 細胞が誘導されることにより、虚血後に賦活化する神経新生が変化するかどうかを検討した。梗塞巣周辺に存在する幼若ニューロンの定量を、doublecortin 抗体を使用して、免疫染色およびウエスタンブロット法で確認したところ、E-セレクトイン投与群では doublecortin 蛋白量が明らかに多く検出され、主には梗塞巣周辺で幼若ニューロンが多数観察された (Fig. 2)。

さらにこれらの新生幼若ニューロンは虚血巣では主に血管周辺に存在し、その中でも TNF- α を発現していない血管周

辺で多く検出された。つまり制御性 T 細胞は、その免疫調整能力から虚血部位の血管内皮細胞の活性化を抑制し、幼若ニューロンの生存を促進させている可能性が考えられた⁹⁾。

4. まとめ

主に、Hallenbeck 研究室に留学中におこなった研究の一部を紹介した⁹⁾。われわれが制御性 T 細胞誘導による神経新生促進作用を報告した同時期に、Liu らも制御性 T 細胞が脳梗塞に対する神経保護効果を担っていることを報告した¹⁰⁾。これらの報告から、脳梗塞において制御性 T 細胞による免疫調整を図る治療戦略は非常に有望であると考えられる。現在、E-セレクトイン蛋白の経鼻投与法に関しては、経鼻スプレーを使用した臨床試験が NIH 主導でおこなわれており、その臨床試験データの報告に期待したい。

文 献

- 1) Curtis MA, Kam M, Nannmark U, et al. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 2007;315:1243-1249.
- 2) Ishibashi S, Kuroiwa T, Sakaguchi M, et al. Galectin-1 regulates neurogenesis in the subventricular zone and promotes functional recovery after stroke. *Exp Neurol* 2007;207:302-313.
- 3) Arvidsson A, Collin T, Kirik D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 2002;8:963-970.
- 4) Hoehn BD, Palmer TD, Steinberg GK. Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin. *Stroke* 2005;36:2718-2724.
- 5) Liu Z, Fan Y, Won SJ, et al. Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia. *Stroke* 2007;38:146-152.
- 6) Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-1061.
- 7) Takeda H, Spatz M, Ruetzler C, et al. Induction of mucosal tolerance to E-selectin prevents ischemic and hemorrhagic stroke in spontaneously hypertensive genetically stroke-prone rats. *Stroke* 2002;33:2156-2163.
- 8) Wakita H, Ruetzler C, Illoh KO, et al. Mucosal tolerization to E-selectin protects against memory dysfunction and white matter damage in a vascular cognitive impairment model. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;28:341-353.
- 9) Ishibashi S, Maric D, Mou Y, et al. Mucosal tolerance to E-selectin promotes the survival of newly generated neuroblasts via regulatory T-cell induction after stroke in spontaneously hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29:606-620.

- 10) Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med* 2009;15:192-199.

Abstract

Immunomodulation by inducing tolerance to E-selectin and adult neurogenesis after stroke

Satoru Ishibashi, M.D., Ph.D.

Department of Neurology, Tokyo Medical and Dental University Hospital,
Tokyo Medical and Dental University

Neuroblasts in the subventricular zone proliferate markedly after stroke, and migrate to the site of injury along with blood vessels. However, a large fraction of stroke-generated neuroblasts die shortly after being born, because of local inflammation.

E-selectin is specifically expressed on endothelial cells, but only when the endothelium activates. Since endothelial activation occurs after stroke, E-selectin can serve as an immunologic tolerization antigen that can focus immunomodulation to regions of the vascular tree. Intranasal instillation of recombinant E-selectin will induce mucosal tolerance to that antigen with the generation of E-selectin-specific regulatory T cells (Tregs). Tregs may protect newly-generated neuroblasts from ischemic damage through 'bystander suppression' in which immunomodulatory cytokines such as TGF- β and IL-10 are released locally. In this series of experiments, we have shown that after E-selectin tolerization in permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO) rats Tregs transmigrate to the peri-infarct region of ischemic brain, TNF expression in the local neurovascular niche is reduced, and the survival of newly generated neuroblasts or neurons in the peri-infarct region is increased. Under these conditions, an improvement in sensorimotor function after pMCAO also occurs.

E-selectin-specific Tregs can modulate the efficacy of adult neurogenesis after ischemia and promote repair after brain injury.

(*Clin Neurol* 2010;50:882-885)

Key words: adult neurogenesis, immunomodulation, E-selectin, regulatory T cell, stroke
