

日本神経化学会優秀賞受賞者研究紹介

脳梗塞における無菌的な炎症メカニズムの解明

七田 崇

(東京都医学総合研究所脳卒中ルネサンスプロジェクト、
日本医療研究開発機構)

はじめに

脳梗塞は本邦における脳血管障害の約8割を占め、寝たきりや後遺症としての重篤な神経症状を引き起こす主な原因となっている。脳梗塞に対する治療法は発症早期の再灌流療法 (rt-PA 静注療法や血栓除去術)、free radical scavenger の投与などに限られており、発症 24 時間以後の亜急性期以降に有効な治療剤がほとんど見出されていない。しかしながら、脳梗塞後に引き起こされる脳内炎症は発症後 1 週間程度持続する。神経傷害を抑えて組織修復を促進するように、脳梗塞後の炎症を制御することによって亜急性期にも有効な脳梗塞治療剤を見出せる可能性がある¹⁾。

脳血管の閉塞または高度狭窄などにより、脳組織に十分な脳血流が供給されないと脳組織が虚血壊死 (梗塞) に陥る。脳血流の低下に伴い、神経細胞ではタンパク合成が抑制され、選択的遺伝子 (c-fos など) の発現⇒嫌気性解糖⇒グルタミン酸放出、細胞内 pH 低下、ATP 低下が次々と起こる。最終的に細胞内の Ca 濃度が上昇すると Ca 依存的な酵素群 (プロテアーゼ、ホスホリパーゼ) が活性化して膜を破壊し、ミトコンドリアの機能障害が起こって細胞死に至る。このような高度な脳虚血による細胞死はネクローシスであると考えられ、周囲に炎症を惹起する。

免疫系には大きく分けて、特定の抗原に対して免疫応答を起こす獲得免疫と、抗原に依存しない免疫応答を起こす自然免疫の、2つのメカニズムが存在する。よって、脳梗塞における炎症が、自

然免疫、獲得免疫によるどのような免疫応答であるかを解明することによって、脳梗塞後の炎症における治療標的を定めることができる。

脳梗塞におけるリンパ球による免疫応答

リンパ球は主に T 細胞、B 細胞に分けられ、リンパ節などのリンパ組織において抗原提示を受けて活性化される。これらの細胞を欠損する SCID (severe combined immunodeficiency) マウスや RAG2 (recombination activating gene 2) 欠損マウスを用いて脳梗塞モデルを作製すると脳梗塞体積が顕著に減少する²⁾³⁾。RAG2 欠損マウスに T 細胞または B 細胞をそれぞれ移植すると、T 細胞を RAG2 欠損マウスに移植した場合にだけ野生型と同程度まで梗塞体積が増大する⁴⁾。このように脳虚血に伴う神経傷害では T 細胞が重要な役割を持つと考えられる。

抗体を産生する B 細胞は、脳梗塞後の炎症や認知症の発症に関与するとの報告があるものの、脳梗塞における役割はあまり明らかになっていない。末梢における B 細胞、T 細胞は、脳梗塞後の交感神経の過緊張によってアポトーシスに陥り、脾臓やリンパ節などのリンパ組織は顕著に萎縮する⁵⁾。この状態は末梢リンパ球の減少による一過性の免疫不全状態であると考えられ、免疫応答が必要な局所にリンパ球が送られなくなる、体内での不均衡分布が原因と考えられている。同様の現象は脳梗塞患者でも報告されているが、脳梗塞患者では発症時より肺炎を併発していることがあり、

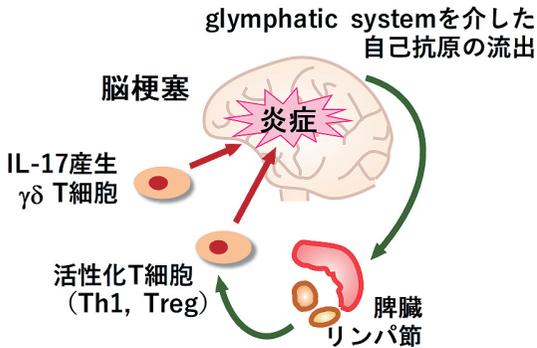


図1 脳梗塞後の炎症におけるT細胞の役割

脳梗塞の亜急性期（発症24時間以後）には、脳内に活性化したヘルパーT細胞や $\gamma\delta$ T細胞が浸潤し、炎症を促進する。 $\gamma\delta$ T細胞はIL-17を産生して亜急性期の炎症を遷延化させる。IFN- γ を産生するTh1は炎症を促進すると考えられる。Tregには神経保護効果と炎症を促進する効果が知られている。ヘルパーT細胞の活性化には抗原提示が必要であるが、脳組織の損傷に伴って自己抗原がglymphatic systemを介して流出し、頸部リンパ節などのリンパ組織に到達することが予想されている。

時に致命的である。末梢におけるリンパ球の動態は、脳梗塞後の感染症の併発と関連があるかもしれない⁶⁾。

脳梗塞発症後に、脳内に浸潤するT細胞は約40%がCD4陽性ヘルパーT細胞であり、約30%がCD8陽性の細胞傷害性T細胞である。これらを除去抗体によって体内から除去すると脳梗塞体積が縮小することから、抗原特異的な免疫応答を惹起するT細胞は神経傷害性に働くと考えられる⁷⁾。ヘルパーT細胞は様々な細胞分画が存在するが、主にIFN- γ を産生するTh1細胞と、免疫寛容の役割を持つ制御性T細胞(Treg)が脳梗塞巣から検出され、IL-4を産生するTh2細胞はほとんど認めない。脳梗塞におけるIFN- γ やTregの役割は神経傷害性に働くとする報告と、神経保護的に働くとする報告が多数あり、機能は複雑である^{8)~10)}。このようにT細胞は全体的には神経傷害性に働くが、部分的には神経保護的な作用も見られるようである。

T細胞は、脳虚血による血管内皮細胞の活性化と脳血液関門の破綻に伴い、脳内に浸潤する。マクロファージや好中球と比較すると、T細胞の脳

内浸潤は発症24時間以後の亜急性期に見られることから¹¹⁾、T細胞を標的とした治療剤を開発できれば脳梗塞発症後の治療可能時間(therapeutic time window)が長い治療法を開発できる可能性がある。FTY720(Fingolimod)はリンパ球の炎症組織への浸潤を阻止する免疫抑制剤であり、多発性硬化症の治療剤として使われているが、脳梗塞モデルマウスに投与すると梗塞体積を縮小させる⁴⁾¹²⁾。FTY720にはアストロサイトなどを介した神経保護作用もあることが知られており¹³⁾、脳梗塞患者においても発症72時間以内までの投与で、発症90日後の神経予後を改善したとの結果が出ている(第II相臨床試験)¹⁴⁾。

脳内にはリンパ管構造が存在し、脳組織におけるリンパ系とグリア細胞が組み合わさった排出経路(glymphatic system)を形成していると考えられている¹⁵⁾。脳組織の損傷に伴って何らかの自己抗原が生じ、リンパ液の流れによって脳から頸部リンパ節に達することにより抗原特異的なT細胞による免疫応答が惹起されることが予想されている(図1)。脳損傷に伴う脳由来の自己抗原としてはMAP2(microtubule associated protein 2)などが知られているが¹⁶⁾、脳血管傷害後の自己免疫的な機序による神経傷害は極めて稀である。脳梗塞後に生じる自己抗原には何らかの炎症特異的な修飾が加えられているか、このような自己抗原に対しては免疫寛容が生じるメカニズムがあると考えられる。

脳梗塞後の脳内には、以上のような抗原特異的なT細胞($\alpha\beta$ 型)が7割程度を占めるが、抗原非特異的な自然免疫応答を起こす $\gamma\delta$ T細胞も2割程度観察される。脳内で $\gamma\delta$ T細胞を活性化する自己抗原は知られていないが、 $\gamma\delta$ T細胞は予め末梢において自己抗原(β 2 microglobulinなど)によって活性化されており、 $\alpha\beta$ 型と比較して速やかな炎症を惹起すると考えられている。 $\gamma\delta$ T細胞は末梢のT細胞の1%以下しか存在しないが、主に脳梗塞巣の周辺部に浸潤が観察される。マクロファージが産生する炎症性サイトカインであるIL-23の刺激によって、IL-17を産生する $\gamma\delta$ T細胞が発症3日目をピークとして脳内に誘導される⁴⁾¹⁷⁾。IL-17

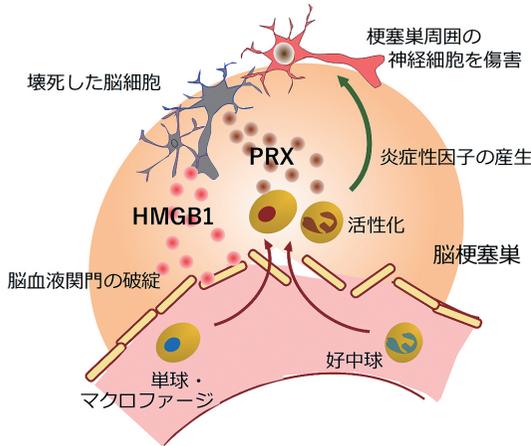


図2 脳梗塞における無菌的炎症の惹起

脳虚血発症後、虚血に陥った脳細胞からはHMGB1が速やかに放出され、脳血液関門を破綻させる。虚血に陥った脳細胞ではPRXの発現が増加し、細胞内のPRXは酸化ストレスを解除して脳保護的な役割を持つ。しかし虚血壊死に陥った脳細胞からはPRXが細胞外に放出され、周囲のマクロファージや好中球をTLR2とTLR4依存的に活性化し、炎症性因子(TNF- α 、IL-1 β など)の産生を誘導する。このように2種類のDAMPsによって脳梗塞後の無菌的炎症が惹起される。

は好中球や血管内皮細胞を活性化し、炎症性因子の産生を誘導することによって炎症を遷延化させるほか、脳血液関門を破綻させる役割も知られている¹⁸⁾。IL-23またはIL-17を欠損したマウスでは脳梗塞亜急性期における炎症の遷延化が阻止されて梗塞体積が縮小する。以上のように、T細胞による炎症は脳梗塞の病態と密接な関連があり、重要な治療標的となりえる。

脳梗塞における無菌的炎症と自然免疫

脳梗塞後の炎症は、虚血に伴う大量の脳細胞死によって惹起される。このような急性炎症に関与する免疫細胞は、ミクログリア、好中球、マクロファージである。これらの細胞は、細菌やウイルスなどの病原体を認識して活性化し、殺菌しつつ炎症性サイトカインを産生して炎症を惹起するほか、病原体を細胞内に取り込んで消化し、リンパ組織においてT細胞に対して抗原提示を行い、抗

原特異的な免疫応答を引き起こす。しかしながら、脳は無菌的な臓器であり、免疫細胞を活性化する病原体由来の成分に乏しい。

ミクログリア、好中球、マクロファージなどの細胞は、病原体由来の構成成分(核酸やリポ多糖、リポタンパクなど)を認識する受容体を発現しており、これらはパターン認識受容体(pattern recognition receptor: PRR)と呼ばれている。PRRを介したシグナルはNF κ BやAP-1などの転写因子を活性化し、炎症性サイトカインの産生を誘導する。このように惹起された免疫応答は抗原に非特異的な炎症であることから、自然免疫と呼ばれている¹⁹⁾。PRRは病原体由来の成分のみでなく、自己組織由来の核酸、タンパク、脂質、細胞外マトリックスなども認識できることが知られている²⁰⁾。特に細胞の破壊によって細胞外に放出されたミトコンドリア由来のタンパクや核酸、細胞膜を構成するリン脂質などは、炎症を惹起する自己組織由来の分子として働くことが報告されており、damage-associated molecular patterns (DAMPs)と総称されている²¹⁾。脳梗塞後の炎症惹起に寄与するDAMPsとして、HMGB1 (high mobility group box 1)とPRX (peroxiredoxin)という2種類のタンパクが同定されている(図2)。

HMGB1は神経細胞を含め、脳細胞の核内に存在するDNA結合タンパクであり、脳梗塞の発症2~4時間後には細胞外に放出される²²⁾。HMGB1を認識するPRRはToll-like receptor (TLR)とreceptor for advanced glycation end product (RAGE)が知られており、どちらも脳梗塞後の炎症に重要な役割を持つ。TLRは哺乳類では10種類ほど存在し、そのうちTLR2とTLR4は脳梗塞後の炎症性サイトカインの発現に重要である²³⁾。RAGE欠損マウスでは脳梗塞体積が縮小することが知られている²⁴⁾。HMGB1は特に、脳血液関門を破綻させる役割を持ち、抗HMGB1抗体を脳梗塞モデルに投与すると、タンパクなどの血管外漏出が抑制され脳保護効果が見られる²⁵⁾。

PRXは哺乳類では6種類存在し、生体内では特に脳組織に多く含まれる細胞内タンパクである²⁶⁾。従来より過酸化水素を水に代謝する抗酸化

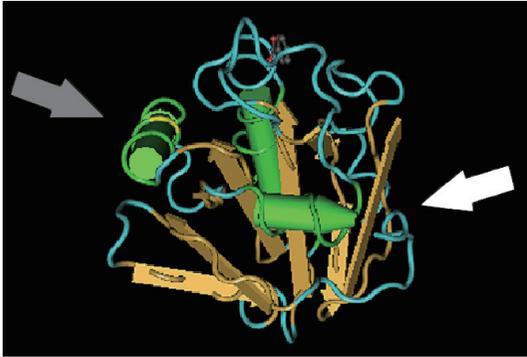


図3 PRXの結晶構造

PRXは細胞内では酸化ストレスを解除して脳保護効果をもつ。細胞外に放出されるとTLR2やTLR4を活性化して炎症を惹起し、神経傷害を促進する。酸化ストレスを解除する抗酸化タンパクとしての酵素活性をもつ部位を白色の矢印で示す。TLRを活性化する α 3-helix構造を灰色の矢印で示す。

タンパクとして知られており、虚血ストレス時には細胞内のPRX発現量が増加し、酸化ストレスを解除して細胞内では脳保護的に働くと考えられている²⁷⁾。ミクログリアではPRX1、神経細胞ではPRX2~5、アストロサイトなどではPRX6が発現しているが、PRX3と4は膜タンパクであり発現量が比較的少ない²⁸⁾。細胞質にはPRX1、2、5、6が多く含まれており、脳細胞の虚血壊死に伴って細胞外に放出される。細胞外に放出されたPRXは速やかに酸化されるが、結晶構造解析の結果からは大きな構造変化は生じないことが判明している²⁹⁾。細胞外に放出されたPRXは、免疫細胞が発現するTLR2とTLR4によって認識され炎症性サイトカインの産生を誘導する。この際、TLRによって認識されるPRXタンパクの構造は α 3-helixを中心とした部位であり、抗酸化作用を有する部位とは対極に存在している(図3)²³⁾。

脳梗塞患者の梗塞巣から微小透析によって細胞外液を採取し、質量分析によってタンパクを解析すると、検出されるタンパク質の中でもPRXは特に多く含まれるタンパクであることが知られている³⁰⁾。脳梗塞モデルマウスにおいては発症12~24時間後に、脳梗塞巣に一致してPRXの細胞外放出が増加し、発症4日後には発現があまり見ら

れなくなる。この経過は、脳梗塞後の炎症細胞浸潤のピークと一致しており、好中球やマクロファージによる炎症を制御していることが示唆される。抗PRX抗体の投与により脳梗塞モデルマウスでは、炎症性サイトカインの発現が抑制され、脳梗塞体積が縮小する²³⁾。

脳梗塞における自然免疫の役割

脳虚血に伴い、ミクログリアは速やかに活性化され、炎症を惹起する。細胞外に増加したATPはP2X受容体を介してミクログリアを活性化する。正常な脳組織におけるミクログリアは、不要なシナプスを貪欲して刈り込み、恒常性の維持に寄与していると考えられるが、脳虚血において活性化したミクログリアは細胞死に陥った神経細胞のみでなく、脳梗塞巣周囲の正常な神経細胞をも貪食除去することが知られている³¹⁾³²⁾。ミクログリアもTLRなどのパターン認識受容体を発現しており、DAMPsの影響を受けると考えられるが、脳梗塞後の炎症がピークを迎える発症3日目前後では、ミクログリアによる炎症性サイトカインの産生はほとんど観察されない。同時期のミクログリアの一部は炎症に伴う細胞死に陥いるが、一部は神経栄養因子IGF1 (insulin-like growth factor 1)を産生して発症6日後の炎症収束期における神経修復の役割を担うようになる。このような修復性ミクログリアを特異的に除去すると、脳梗塞の病態が悪化することが知られている³³⁾。

好中球は血液中の免疫細胞の多くを占め、組織の損傷に伴っていち早く浸潤して炎症を惹起する免疫細胞である。好中球が産生する一酸化窒素(NO)は神経傷害性に働くと考えられており、脳梗塞患者における末梢血中の好中球数は、機能予後の悪化とも相関することが知られている³⁴⁾。好中球はパターン認識受容体を発現し、DAMPsを認識して炎症性サイトカインを強く発現する。最近では活性化した好中球が、DNAを主な成分とする網目状構造物を細胞外に放出することが注目されており、好中球細胞外トラップ(Neutrophil extracellular trap: NET)と呼ばれている³⁵⁾。NET

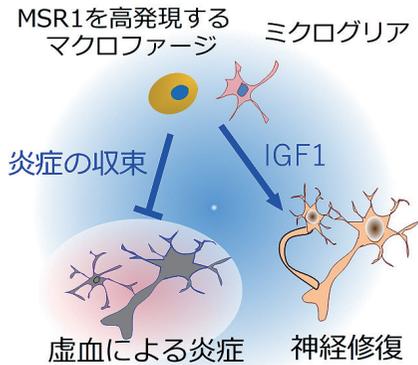


図4 脳梗塞における炎症の収束

脳梗塞の炎症収束期（発症6日目前後）になると脳内のミクログリアやマクロファージは炎症性因子を産生せず、MSR1を高発現してDAMPsを排除して炎症を収束させる。また神経栄養因子IGF1を産生して神経修復に働く。

は病原体を取り込み、殺菌して排除するための生体防御のメカニズムであると考えられている。NETは血管内に生じた血栓の構成成分としても検出され、血管障害においては虚血の発症や炎症に伴う2次的な灌流障害にも寄与することが知られている³⁶⁾。

マクロファージは末梢血における重要な免疫細胞であるが、ケモカイン受容体CCR2を発現するものとしらないものが存在する。CCR2陽性のマクロファージは1割程度であり、これらが炎症を起こした脳組織に浸潤する³⁷⁾。CCR2陰性のマクロファージはほとんど脳内に浸潤せず、patrolling monocyteと呼ばれている。CCR2のリガンドはMCP1 (CCL2)と呼ばれるケモカインであり、虚血に陥った脳細胞から産生され、マクロファージの浸潤に重要な役割を持つ。脳内に浸潤したCCR2陽性マクロファージはパターン認識受容体を介してDAMPsに応答し、様々な炎症性サイトカインを産生する。炎症のピークを迎える発症3日目前後において炎症性サイトカインを産生する主な集団はマクロファージである。

発症6日目の炎症収束期になると脳内のマクロファージによる炎症性サイトカインの産生は観察されなくなる。この時期のマクロファージはIGF1

を産生する修復性マクロファージへと変化している(図4)。IGF1は軸索伸長を促進し、脳梗塞後の神経修復に重要な役割を持つ³⁸⁾。また、修復性マクロファージはスカベンジャー受容体MSR1を強く発現しており、MSR1は細胞外に存在するDAMPsを認識して細胞内に取り込み、リソソーム内で分解排除する役割を持つ³⁹⁾。ビタミンA誘導体であるタミバロテンは、脳梗塞に浸潤したマクロファージのMSR1発現を促進することができ、脳梗塞モデルマウスにおける炎症の収束を早めることが判明している。

おわりに

脳梗塞における無菌的な炎症メカニズムについて概説した。組織損傷に伴う炎症は、組織修復の引き金であると考えられているものの、その詳細な分子メカニズムは未解明である。脳梗塞に伴う無菌的な炎症は、神経細胞、グリア細胞、血管内皮細胞に加えて免疫細胞が、炎症から修復へとdrasticに機能を変化させる生体防御の過程であると考えられる。脳梗塞における神経修復はいつ、何が引き金となって開始されるのだろうか。炎症を標的とするだけでなく、神経修復の詳細な分子・細胞メカニズムを解明することが、脳血管障害に対する神経機能改善薬の開発に必須であると思われる。

参考文献

- 1) Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*, 17, 796-808 (2011).
- 2) Yilmaz G, et al. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation*, 113, 2105-2112 (2006).
- 3) Hurn PD, et al. T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27, 1798-1805 (2007).
- 4) Shichita T, et al. Pivotal role of cerebral

- interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med*, 15, 946-950 (2009).
- 5) Offner H, et al. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *J Immunol*, 176, 6523-6531 (2006).
 - 6) Meisel C, Meisel A. Suppressing immunosuppression after stroke. *New England journal of Medicine*, 365, 2134-2136 (2011).
 - 7) Yilmaz G, et al. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation*, 113, 2105-2112 (2006).
 - 8) Kleinschnitz C, et al. Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature. *Blood*, 121, 679-691 (2013).
 - 9) Ren X, et al. CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T-cells in cerebral ischemic stroke. *Metab Brain Dis*, 26, 87-90 (2011).
 - 10) Stubbe T, et al. Regulatory T cells accumulate and proliferate in the ischemic hemisphere for up to 30 days after MCAO. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33, 159 (2013).
 - 11) Schroeter M, et al. Local immune responses in the rat middle cerebral artery occlusion. *J Neuroimmunol*, 55, 195-203 (1994).
 - 12) Wei Y, et al. Fingolimod provides long-term protection in rodent models of cerebral ischemia. *Ann Neurol*, 69, 119-129 (2011).
 - 13) Dev KK, et al. Brain sphingosine-1-phosphate receptors: implication for FTY720 in the treatment of multiple sclerosis. *Pharmacol Ther*, 117, 77-93 (2008).
 - 14) Zhu Z, et al. Combination of the Immune Modulator Fingolimod With Alteplase in Acute Ischemic Stroke: A Pilot Trial. *Circulation*, 132, 1104-1112 (2015).
 - 15) Nedergaard M. Garbage truck of the brain. *Science*, 340, 1529-1530 (2013).
 - 16) Planas AM, et al. Brain-derived antigens in lymphoid tissue of patients with acute stroke. *J Immunol*, 188, 2156-2163 (2012).
 - 17) Gelderblom M, et al. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood*, 120, 3793-3802 (2012).
 - 18) Kebir H, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*, 13, 1173-1175 (2007).
 - 19) Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11, 373-384 (2010).
 - 20) Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*, 8, 279-289 (2008).
 - 21) Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*, 10, 826-837 (2010).
 - 22) Qiu J, et al. Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28, 927-938 (2008).
 - 23) Shichita T, et al. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med*, 18, 911-917 (2012).
 - 24) Muhammad S, et al. The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage. *J Neurosci*, 28, 12023-12031 (2008).
 - 25) Zhang J, et al. Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats. *Stroke*, 42, 1420-1428 (2011).
 - 26) Seo MS, et al. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem*, 275, 20346-20354 (2000).
 - 27) Rashidian J, et al. Essential role of cytoplasmic cdk5 and Prx2 in multiple ischemic injury models, in vivo. *J Neurosci*, 29, 12497-12505 (2009).
 - 28) Jin MH, et al. Characterization of neural cell types expressing peroxiredoxins in mouse brain. *Neurosci Lett*, 381, 252-257 (2005).

- 29) Wood ZA, et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trend Biochem Sci*, 28, 32-40 (2003).
- 30) Dayon L, et al. Brain extracellular fluid protein changes in acute stroke patients. *J Proteome Res*, 10, 1043-1051 (2011).
- 31) Wake H, et al. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci*, 29, 3974-3980 (2009).
- 32) Neher JJ, et al. Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, E4098-4107 (2013).
- 33) Lalancette-Hebert M, et al. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci*, 27, 2596-2605 (2007).
- 34) Maestrini I, et al. Higher neutrophil counts before thrombolysis for cerebral ischemia predict worse outcomes. *Neurology*, 85, 1408-1416 (2015).
- 35) Brinkmann V, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303 (5663), 1532-1535 (2004).
- 36) Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med*, 23, 279-287 (2017).
- 37) Mildner A, et al. Microglia in the adult brain arise from Ly-6C (hi) CCR2 (+) monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci*, 10, 1544-1553 (2007).
- 38) Li SL, et al. An age-related sprouting transcriptome provides molecular control of axonal sprouting after stroke. *Nat Neurosci*, 13, 1496-1504 (2010).
- 39) Shichita T, et al. MAFB prevents excess inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of damage signals through MSR1. *Nat Med*, 23, 723-732 (2017).