

論 文 要 旨

鹿児島大学

Disruption of Midkine gene reduces traumatic brain injury through the modulation of Neuroinflammation

ミッドカイン遺伝子の欠損は神経炎症の調節を通じて外傷性脳損傷を軽減する

氏 名 高 田 聖 也

【はじめに】

外傷性脳損傷は世界的に、死亡や障害の主要な原因の一つである。外傷性脳損傷後最初の免疫反応はミクログリア応答である。中枢神経炎症においてミクログリアは炎症性のサイトカインを放出するM1型と抗炎症性サイトカインを放出するM2型に分極化し、炎症反応を微調整する。外傷性脳損傷治療において、ミクログリア/マクロファージのM1型減少、M2型増加を促すことが重要であることが示されている。このM1/M2分極化を調節する因子としてミッドカインに着目した。ミッドカインは発生初期および、炎症反応時において発現が増加し、多様な生理活性を要するヘパリン結合性蛋白質である。近年ミッドカインの阻害が免疫反応を抑制し、炎症軽減に作用することがいくつか報告されている。本研究では、外傷性脳損傷後の炎症期におけるミッドカインの働きと、ミクログリア/マクロファージ分極について調べた。

【対象と方法】

野生型(Mdk+/+)マウスとミッドカイン遺伝子欠損型(Mdk-/-)マウスを64匹(22.8±2.3g)使用した。流体パーカッションモデルを用いて、外傷性脳損傷(TBI)を作成した。TBI3、7、14日後に神経学的所見や運動機能評価を行い、脳を採取した。脳内唯一の免疫細胞であるミクログリアのマーカーのIba1、活性化アストロサイトのマーカーのGFAP、炎症性サイトカインを放出するミクログリア/マクロファージ(M1型)のマーカーのCD16/32、抗炎症性サイトカインを放出するミクログリア/マクロファージ(M2型)のマーカーのArginase-1、アポトーシスのマーカーのcaspase-3の発現を免疫組織化学染色で調べた。また、caspase-3と共染色しているNeuN陽性細胞をカウントし、アポトーシスを起こしているニューロンの割合を調べた。次に、M1型のマーカーであるCD16、TNF-a、CD11bとM2型のマーカーであるCD206、Arginase-1をRT-PCRで調べた。さらに、Flow cytometryを用いて過剰免疫抑制に働く制御性T細胞(Treg)、M1型(CD80、iNos)およびM2型(CD163、Arginase-1)のミクログリア/マクロファージ(CD11b⁺CD45^{low}/ CD11b⁺CD45^{high})の割合を調べた。

【結果】

Mdk+/+マウスと比較して、Mdk-/-マウスにおいて、TBI14日後の脳脱落面積が減少し、神経学的評価も有意に改善した。両群共に損傷3日後にGFAPの活性化が最も高く、その後徐々に低下した。各評価日の群間に有意差はなかった。Iba1はMdk+/+マウスではTBI3日後に最も増加し、その後徐々に減少した一方で、Mdk-/-マウスは7日後に最も発現が増加する傾向があったが、評価日間における有意差はなかった。TBI3日後においてMdk+/+マウスとMdk-/-マウスのIba1の発現が有意に低下した。TBI3日後のCD16/32免疫反応性、TNF-aおよびCD11bのmRNAレベルがMdk-/-において有意に低下した。CD11b⁺CD45^{high}CD163⁺ macrophageはMdk-/-マウスで有意に増加した。CD11b⁺ CD45^{high} Arginase-1⁺ macrophageはMdk-/-マウスにおいて有意に低下した一方でCD11b⁺ CD45^{low} Arginase-1⁺ microgliaのレベルは有意に増加した。iNos⁺ microgliaおよびmacrophageの発現はほとんど観察されなかった。発現がTregの発現はMdk-/-マウスで増加する傾向を示したが有意な差はなかった。損傷7日後におけるcaspase-3の発現はMdk-/-マウスで有意に低下した。

【結論】

本研究では、MKの欠損が損傷早期におけるミクログリア/マクロファージの遊走低下、損傷周囲部におけるM1型ミクログリア/マクロファージ減少と脳全体におけるM1型のmRNA発現低下、脳全体におけるM2型ミクログリアの増加を促すことを明らかにした。また、MKの欠損はCaspase-3を介したアポトーシスによる神経細胞死を減少させた。その結果、MKの欠損は外傷性脳損傷後の脳脱落面積及び神経学的障害を軽減させることを示唆した。