

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09338

研究課題名(和文) T細胞の異常から捉えた神経変性疾患の病態機序解明と新規治療法開発

研究課題名(英文) Role of T cell dysregulation in neurodegenerative diseases

研究代表者

竹内 英之 (TAKEUCHI, Hideyuki)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：30362213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患の病態機序における制御性T細胞の役割を解明することを目的として、筋萎縮性側索硬化症モデルマウスを用いて検討した。SOD1-G93ATgマウスをミッドカイン欠損マウスとの交配で作出したミッドカイン欠損/SOD1-G93A Tgマウスは、SOD1-G93A Tgマウスに比して有意な生存延長を認め、循環血中の制御性T細胞数および腰髄の運動ニューロン数の増加と活性化ミクログリアの抑制を認めた。以上の結果から、ミッドカインの阻害は末梢血中の制御性T細胞増加によるグリア炎症抑制を介して神経保護作用を発揮すると考えられ、神経変性疾患の新たな治療戦略となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the role of Treg in neurodegenerative diseases using mouse models of Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. First, we developed a mouse model using wild-type and midkine-KO mice by intraventricular injection of amyloid peptide (A $\beta$ ). The novel object recognition test revealed no significant improvement of cognitive deficit in A $\beta$ -injected midkine-deficient mice, suggesting that this model represents acute A $\beta$ -neurotoxicity and was not suitable to assess extraneuronal environment alteration. Next, we generated midkine-KO/SOD1-G93A-Tg mouse. This mouse model showed significant long survival accompanied by increases in circulating Treg. Pathological analysis demonstrated reduced motor neuron death with suppressed microglial activation in the lumbar spinal cord. This study suggested that Treg enhancement by midkine inhibition is a potential therapeutic strategy against neurodegenerative diseases.

研究分野：神経内科学

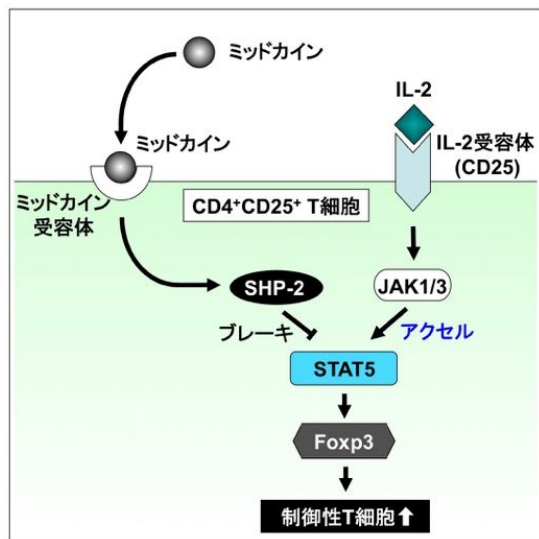
キーワード：T細胞 神経変性疾患 ミッドカイン

## 1. 研究開始当初の背景

最近の知見として、神経変性疾患の病勢進行に伴う血液脳関門の破壊と中枢神経系内への活性化T細胞の浸潤が報告されている (Zhong et al., Nat Neurosci. 2008; Henkel et al., EMBO Mol Med. 2013)。また、免疫寛容の誘導や過剰な免疫応答の抑制を担う重要な免疫細胞である制御性T細胞の活性減弱も、これらの疾患において報告されている (Henkel et al., EMBO Mol Med. 2013)。しかしながら、これまでに試みられてきた免疫抑制剤による治療は残念ながら無効であり、また、制御性T細胞を主眼にした研究はほとんどなされていない。

ミッドカインは、胎生中期に上皮系細胞に強く発現する成長因子であり、組織発生での細胞の生存や遊走に重要な役割を果たす。しかし、健全な成体ではほとんど発現が認められず、炎症や発癌部位に局限して強く発現し、病巣の進展・拡大に寄与するとされている。実際、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症においては、病勢進行に伴ったミッドカインの発現増加が報告されている。

我々はこれまでに、成体におけるミッドカインの機能として、制御性T細胞の内因性の負の調節因子としての重要な新機能を発見した。また、ミッドカイン阻害剤の投与により制御性T細胞を増加させ、この増加した制御性T細胞による自己反応性T細胞の抑制効果によって、副作用を認めることなく、関節リウマチや多発性硬化症などの自己免疫疾患のモデル動物の治療に成功している (PNAS 2008, J Immunol. 2012)。



## 2. 研究の目的

本研究では、これまでの成果を踏まえ、アルツハイマー病および筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスを用いて、神経変性疾患の病態機序における活性化T細胞および制御性T細胞の役割を解明することを目的と

する。

さらに、ミッドカインの阻害による、制御性T細胞の増加と病的な活性化T細胞の抑制を介した、神経変性疾患モデルマウスに対する治療効果を検討し、T細胞の制御を用いた神経変性疾患に対する新たな治療戦略開発へ向けた基盤研究を行う。

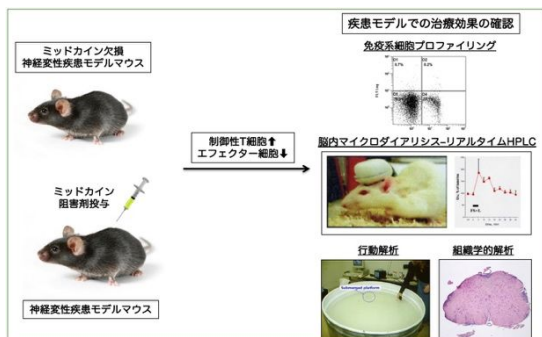
## 3. 研究の方法

### (1) 神経変性疾患の病態における中枢神経内外の免疫系細胞のプロファイリング

アルツハイマー病と筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスを用いて、病態形成における中枢神経系へ浸潤する活性化T細胞と制御性T細胞の役割について解析する。中枢神経系と同時に末梢の免疫系臓器として脾臓を採取し、神経変性疾患の各病期における、中枢神経系内と神経外に存在する免疫系細胞の詳細なポピュレーションや機能を、特に活性化T細胞などのエフェクター細胞と制御性T細胞に焦点を当てて、プロファイリングを行い、神経変性疾患の病態機序における役割を解明する。

### (2) 神経変性疾患モデルに対するT細胞の制御による治療効果の検討

アルツハイマー病と筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスを用いて、制御性T細胞を介したエフェクター細胞(特に活性化T細胞)



の抑制による治療効果について検討する。

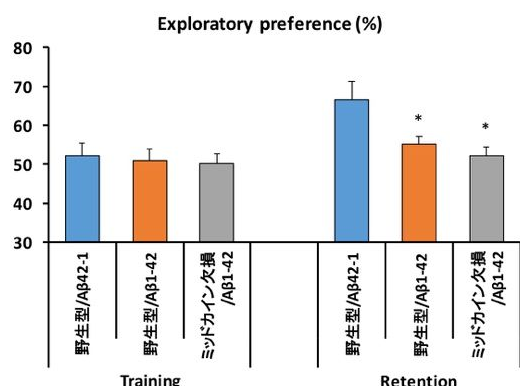
制御性T細胞の負の制御因子であるミッドカインを阻害することによって、制御性T細胞を増殖させ、エフェクター細胞(特に活性化T細胞)の抑制を図り、病勢変化および治療効果を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) アルツハイマー病モデルマウスにおける検討

本研究では、アルツハイマー病短期発症モデルとしてヒトアミロイドペプチド脳室内投与マウスを使用した。ヒトアミロイド1-42ペプチドオリゴマーあるいはコントロールとしてのヒトアミロイド42-1ペプチドオリゴマーを、8週齢の野生型C57BL/6Jマウスあるいはミッドカイン欠損マウス(各群オス6匹)の右側脳室へ定位脳手術にて脳室内投与し、認知機能は新奇物体認知試験にて評価した。

今回の実験では、初回の探索時間（図：Training）では各群で差が認められなかったが、2回目の探索時間（図：Retention）ではコントロール群に比べてヒトアミロイド 1-42 ペプチドを脳室内投与された野

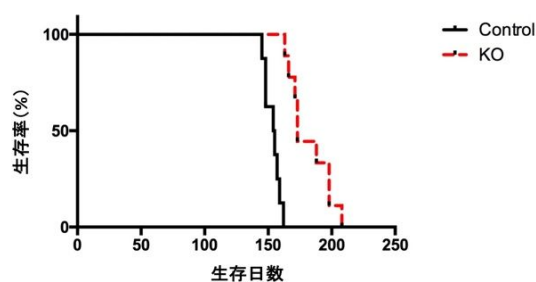


生型 C57BL/6J マウスでは新しく加えられた積み木に対する探索時間が有意に減少していた（図：\*， $p < 0.05$ ）。残念ながら、ヒトアミロイド 1-42 ペプチドを脳室内投与されたミッドカイン欠損マウスでの認知機能の改善は認められなかった。

## (2) 筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける検討

筋萎縮性側索硬化症モデルとして国際的に汎用されているヒトスーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) G93A 変異トランスジェニックマウス (SOD1-G93A Tg マウス) を使用し、ミッドカイン欠損マウスとの交配によってミッドカイン欠損/SOD1-G93A Tg マウスを作出し、病勢に対する影響について検討を行った（各群 9 匹）。

SOD-G93A Tg マウスは 154.5 日の平均生存日数であったのに対して、ミッドカイン欠損/SOD1-G93A Tg マウスでは、173 日の平均生存日数を示し、有意な生存延長を認めた（図： $p < 0.0001$ ）。



また、循環血中の制御性 T 細胞数および腰髄の運動ニューロン数は、ミッドカイン欠損/SOD1-G93A Tg マウスでは、SOD1-G93A Tg マウスに比して有意に増加しており、逆に腰髄の活性化ミクログリア数は有意に抑制されていた。以上の結果から、ミッドカインの阻害は末梢血中の制御性 T 細胞増加によるグリア炎症抑制を介して神経保護作用を発揮すると考えられ、神経変性疾患の

新たな治療戦略となり得ることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Shimajima C, Takeuchi H (責任著者), Jin S, Parajuli B, Hattori H, Suzumura A, Hibi H, Ueda M, Yamamoto A: Conditioned Medium from the Stem Cells of Human Exfoliated Deciduous Teeth Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Immunology*. 96(10): 4164-4171, 2016. 査読あり

Watanabe M, Masaki K, Yamasaki R, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Matsushita T, Suzumura A, Kira JI: Th1 cells downregulate connexin 43 gap junctions in astrocytes via microglial activation. *Scientific Reports*. 6:38387, 2016. 査読あり

Ohgomori T, Yamasaki R, Takeuchi H, Kadomatsu K, Kira JI, Jinno S: Differential activation of neuronal and glial STAT3 in the spinal cord of the SOD1<sup>G93A</sup> mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience*. 46(4):2001-2014, 2017. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

竹内英之，下島千明，金世杰，山本朗仁：Stem cells from human exfoliated deciduous teeth-conditioned media (SHED-CM) ameliorate EAE. 第 57 回日本神経学会学術大会．2016.5.（神戸）

竹内英之：ミクログリアを標的とした神経疾患の治療戦略．第 28 回日本神経免疫学会学術集会．2016.9.（長崎）

Takeuchi H, Mizoguchi H, Tanaka F, Suzumura A: Gap junction/hemichannel blockers ameliorate the disease progression of FTL/ALS mice. The XXIII World Congress of Neurology. 2017.9.（京都）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹内 英之 ( TAKEUCHI , Hideyuki )

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：30362213