

令和元年6月10日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10006

研究課題名(和文) ニーマンピック病C型における免疫系による神経変性誘導

研究課題名(英文) Neurodegeneration induced by immune system in Niemann-Pick disease type C

研究代表者

安田 徹 (Yasuda, Toru)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・成育遺伝研究部・研究員

研究者番号：50468576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ライソゾーム病の一つであるニーマンピック病C型(NPC)における神経細胞死のメカニズムを解明し、新たな治療法開発に資することを目的に研究を行った。免疫系、特に自然免疫が関与するという仮説を立て、ミクログリアを欠損するモデルマウスを作成したところ、神経変性に影響しないことがわかった。次に末梢から脳内へ浸潤するマクロファージを欠損させたところ、小脳プルキンエ細胞の脱落が有意に抑制された。このことは浸潤マクロファージが神経変性を誘導することを示している。一方、獲得免疫を担当するリンパ球が神経変性を抑制することを見出し、より詳細な神経変性制御機構の解明と新たな治療法の開発につなげたいと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ライソゾーム病は、細胞内のライソゾームに糖質や糖脂質が蓄積する病気の総称であり、およそ30種類ほどの疾患を含む。中枢神経の変性症状を伴うものが多く、その進行を止めることができる治療法は存在しない。本研究ではこれまでほとんど注目されていなかった免疫系による神経変性制御について、ライソゾーム病の代表例であるニーマンピック病C型のマウスモデルを用いて検討した。免疫系は貪食細胞などが関わる「自然免疫」とリンパ球が関わる「獲得免疫」に大別されるが、本研究では自然免疫が神経細胞死を誘導し、獲得免疫の一部がそれを抑制することを見出した。他のライソゾーム病などにも効果を示す治療法開発に役立てたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Niemann-Pick disease type C (NPC) is a lysosomal storage disorder affecting an estimated 1 in 120,000 live births worldwide. It is essential to explore the pathogenic events that promote the neurodegenerative process for future clinical interventions. In this study, we addressed an involvement of immune system in neuropathogenic process using a murine model of NPC. We found that reduction of circulating monocytes ameliorated Purkinje cell degeneration. On the other hand, lack of acquired immune system enhanced cerebellar ataxic phenotype and Purkinje cell loss, which suggested that lymphoid cells may have therapeutic effect in NPC. Importantly, peripheral injection of CD4-positive T cells ameliorated cerebellar ataxia and Purkinje cell loss. Our results disclose a previously unrecognized neuropathogenicity of immune system in NPC and would benefit future remedies for devastating neurological diseases.

研究分野：神経科学

キーワード：ライソゾーム病 ニーマンピック病C型 自然免疫 獲得免疫 神経変性 プルキンエ細胞 マクロファージ T細胞

様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ニーマンピック病 C 型 (NPC) はライソゾーム病のひとつであり、小脳プルキンエ神経細胞の変性を主病変とする。研究開始当初は、このプルキンエ細胞の変性は他の細胞、例えばグリア細胞などの影響を受けず、プルキンエ神経が自律的に死滅することで起こるものと広く考えられていた。ところが小脳のグリア細胞、特にミクログリアを詳細に観察してみると他の神経変性疾患に比べて活性化の度合いが非常に強く、このミクログリアがプルキンエ変性を誘導している可能性を考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、NPC の発症メカニズムを解明し、新たな治療法の開発に資することである。

3. 研究の方法

免疫系、特に自然免疫が関与するという仮説を立て、ミクログリアを欠損する NPC マウスモデルを作成した。また末梢から脳内へ浸潤する可能性が考えられたマクロファージを欠損させる NPC モデルについても作成した。一方で、自然免疫以外に獲得免疫を担当するリンパ球の関与についても検証するため、リンパ球欠損 NPC モデルを作成した。

4. 研究成果

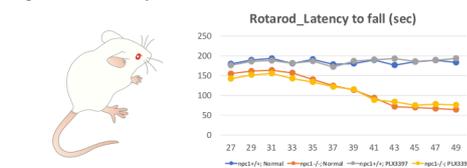
(1) まず始めにミクログリアの関与を調べるため、ミクログリアを欠損するモデルマウスを作成した。CSF1R阻害剤の混合食餌により、神経変性後期にミクログリアの死滅を誘導したところ、プルキンエ細胞の神経変性に影響はなかった。このことは神経変性後期においてミクログリアは神経変性を誘導しないことを示唆している。次に神経変性初期における関与を調べるため、ミクログリアを先天的に欠損するCsf-1欠損マウスとNPCモデルマウスとの交配を行ってきた。C57BL/6バックグラウンドであったCsf-1欠損マウスをBalb/cへと戻し交配しつつNPCモデルの作成を行ってきたが、これまでCsf-1欠損のNPCモデルは全く産まれてこなかった (およそ100匹のCsf-1欠損マウスを得ていたが)。最近、7世代目になってようやくモデルマウスが生まれるようになり解析を開始したところである。

(2) 次に脳内浸潤マクロファージの神経変性への関与を調べた。ジフテリア毒素受容体を単球・マクロファージに特異的に発現するマウスを用いて、NPCモデルマウスにおいて単球を欠損させたところ、プルキンエ細胞の脱落が有意に抑制された。このことは脳外から浸潤してくる単球・マクロファージが神経変性を誘導することを示している。現在は、恒常的に単球を欠損するCcr2-RFPノックインマウスを用いて検証を行い、このモデルもC57BL/6からBalb/cへと戻し交配しつつNPCモデルの神経変性への影響、寿命の変化を調べている。

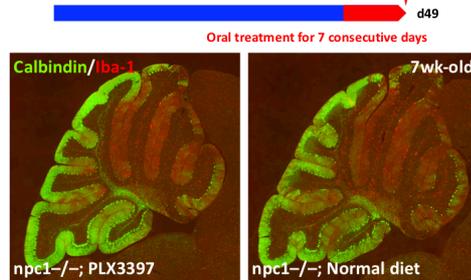
(3) また脳内浸潤マクロファージを分離してRNAシーケンスによるトランスクリプトーム解析を行い、末梢血中の単球との違いを調べた。しかし浸潤マクロファージと脳内常在性ミクログリアとの分離が完全でないことが結果的に判明し、現在では分離法の確立について検討を行っている。他大学との共同研究も開始して、多次元FACS解析による網羅的な細胞種の同定についても検討しており神経変性誘導に関わる細胞やキーモレキュールを同定したいと考えている。正常マウスとNPCモデルマウスでは末梢血中の単球において遺伝子発現がかなり異なっていることを突き止め、NPCで高発現する膜タンパクを標的としたクロドロン酸内包イムノリポソームの開発を始めたところである。

(4) また、自然免疫以外にも獲得免疫が関与する可能性を考え、リンパ球を欠損するRag1欠損マウスを用いた。これにより、リンパ球欠損NPCモデルの神経変性が促進されることがわかった。このことは神経変性を抑制するリンパ球が存在することを示唆し

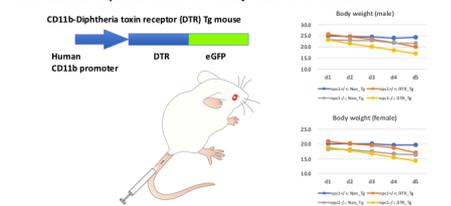
Depletion of microglia by CSF1R inhibitor PLX3397 had no effect on degeneration of Purkinje cells in NPC model mice



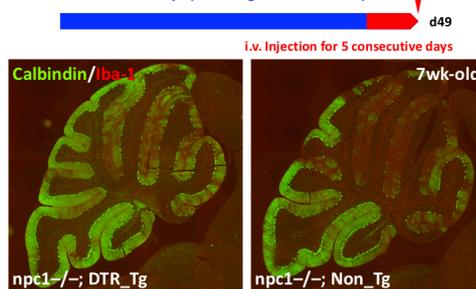
Treatment with a diet supplemented with PLX3397 (290mg/kg chow) for 7 consecutive days (at the age of 6-7wk-old).



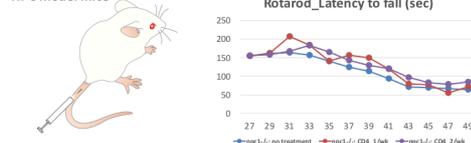
Depletion of circulating monocytes by CD11b-diphtheria toxin receptor Tg mice resulted in preservation of Purkinje cells in NPC model mice



Intravenous injection of Diphtheria toxin (10ng/g) for 5 consecutive days (at the age of 44-48d-old).



Passive transfer of CD4+ T cells increased the motor performance in NPC model mice



i.v. Injection of CD4+ T cells (1-2 x 10⁶; isolated from peripheral blood of Balb/c mice) once or twice per week



ている。実際にCD4陽性T細胞による細胞治療の効果を確認し、神経変性抑制能を有するサブタイプの同定に成功した。現在ではNPCマウスにおいてどのようなメカニズムでこのサブタイプが不活化されるか、またより効果的な細胞治療の方法を検証中である。このように自然免疫が神経変性を誘導し、獲得免疫が神経変性を抑制することが分かってきており、より詳細な免疫系による神経変性制御機構の解明と治療法の開発につなげたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 3 件）

① 安田徹、渡辺信之、内山徹、小野寺雅史、Immune cell-mediated modulation of neurodegeneration in Niemann-Pick disease type C、日本遺伝子細胞治療学会、2018

② 安田徹、渡辺信之、内山徹、望月秀樹、小野寺雅史、ニーマンピック病C型における獲得免疫系による神経変性制御、日本神経科学会、2019

③ 安田徹、渡辺信之、内山徹、望月秀樹、小野寺雅史、Modulation of neurodegeneration by peripheral immune system in Niemann-Pick disease type C、日本遺伝子細胞治療学会、2019

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。