

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月12日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10220

研究課題名(和文) MRIによる病態プロテアーゼ活性動態解析技術の創出と、その統合失調症予防への応用

研究課題名(英文) Development of analytical technology of pathological protease activity based on MRI, and its application for the prevention of schizophrenia

研究代表者

植木 孝俊 (Ueki, Takatoshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60317328

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)：本研究では統合失調症病態脳で発症初段階に脳内ミクログリアが賦活する神経病理を解明するとともに、ミクログリアの活性化をin vivoで画像化するためのMRI技術を創出し、その統合失調症早期診断への応用を図ることを目的とし研究を行った。ここでは、ミクログリアの活性化が、隣接するニューロンにおけるfractalkineの代謝産物と、それによるCRXCR3受容体の賦活で生起することに着目し、fractalkineの代謝酵素の活性化の病理と、その酵素活性を描出するプローブの創成を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症は、多因子疾患であり、症候群である。これまでに、統合失調症患者でのMRI(磁気共鳴画像法)による脳構造解析の結果、脳局所での容積変化が報告される等、統合失調症患者で健常人との有為差が認められているが、個々の因子は、患者間での標準偏差が大きく、それらを統合失調症の診断のための指標とすることは困難である。対して、活性化ミクログリアの著明な増加は、未治療の統合失調症患者の全てにおいて認められる現象であり、統合失調症患者と健常人とを識別するのに極めて有用な指標であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study the investigators aim at exploring the neuropathology underlying microglial activation in the brain in the early stage of onset of schizophrenia, and development of in vivo MRI system to visualize behavior of microglia. Here, based on the observation that processing of fractalkine in the adjacent neuronal axon triggers microglial activation via its membranous CRXCR3 receptor, the pathophysiology of the activation of metabolic enzyme of neuronal fractalkine was explored and also MRI switching molecular probe to visualize the enzymatic activity was developed.

研究分野：解剖学

キーワード：神経免疫系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最近、申請者らは PET により初発未治療の統合失調症患者 17 名で活性化ミクログリアの脳内分布と、その程度について精査した。PET イメージングは、活性化ミクログリアに結合するトレーサーである [^{11}C]PK11195 によった。その結果、すべての統合失調症患者脳で、健常者脳と比較し、2 倍以上の活性化ミクログリアの増加を認めた。統合失調症は、多因子疾患であり、症候群である。しかし、この疾患の別個の症例の依って立つ共通の生物学的基盤を同定することにより、発症前、あるいは発症初期に治療的介入を行うことは可能であると考えられる。これまでに、統合失調症患者での MRI (磁気共鳴画像法) による脳構造解析の結果、脳局所での容積変化が、また、患者血清の生化学的解析の結果、種々の脳内タンパク質の挙動変化が報告される等、神経活動に関連した諸因子について、統合失調症患者で健常人との有為差が認められているが、個々の因子は、患者間での標準偏差が大きく、それらを統合失調症の診断のための指標とすることは困難である。対して、活性化ミクログリアの著明な増加は、未治療の統合失調症患者の全てにおいて認められる現象であり、統合失調症患者と健常人とを識別するのに極めて有用な指標であると考えられる。統合失調症患者で活性化ミクログリアの脳画像研究を行った例は、これまでも van Berckel らや、Doorduyn らによる研究があるが、ここでは、抗精神病薬を服用している患者で解析が行われており、活性化ミクログリアの増加は顕著ではなかった。わずかな差しかなかったという彼らの結果は、抗精神病薬がミクログリアの活性化を抑制することに由来すると考えられる。

2. 研究の目的

統合失調症患者脳でのミクログリアの活性化は、脳内での炎症反応の生起を示唆しており、また、活性化ミクログリアが初発患者脳で確認されたことから、ミクログリアの活性化を惹起する脳内因子の賦活が統合失調症の病態早期に起こると考えられる。そこで、本研究では統合失調症病態脳で発症初段階に脳内ミクログリアが賦活する神経病理を解明するとともに、ミクログリアの活性化を *in vivo* で画像化するための MRI 技術を創出し、その統合失調症早期診断への応用を図ることを目的とし研究を行った。

3. 研究の方法

統合失調症の発症初期に、ミクログリアが休止状態から活性化し、さらに慢性的に炎症を持続している仕組みを探究するため、統合失調症モデル動物として polyI:C ラットを用い、ミクログリアの活性化を惹起する脳内分子群を探究する。ニューロン膜上のリガンド様タンパク質である CX3CR1 と CD200R は、ミクログリア上にあるフラクタルカイン(fractalkine:FKN)、CD200 それぞれとの結合により、ミクログリアを休止状態に留めている。膜結合 FKN は、統合失調症脆弱因子 DISC1 の機能調節に与る ADAM10 によりプロセシングされ、可溶性 FKN リガンドを生じる。ミクログリアの自律的活性化には ITAM-Syk 情報伝達系が機能し、その抑制には ITIM 情報伝達系が機能することが明らかになっているが、統合失調症では単球における ITAM-Syk 情報伝達系を賦活する TREM1 と DAP12 の発現が増加していることが報告されている。これらの所見から、統合失調症の脳で認められているミクログリア活性化は、ニューロン・ミクログリア相関の破綻による、FKN-CX3CR1 情報伝達系、CD200-CD200R 情報伝達系の抑制に加え、ITAM-Syk 情報伝達系の賦活もしくは ITIM 情報伝達系の抑制により生じていることが示唆される。本研究では、polyI:C マウスにて、ミクログリアの過剰な活性化が惹起される過程を、研究代表者ら独自の脳内分子動態解析技術を組合せ解析する。統合失調症の脳で、ミクログリアの活性化を

抑制している FKN-CX3CR1・CD200-CD200R 情報伝達系がいかにして阻害されるか、あるいはミクログリア活性化シグナルを担う ITAM-Syk 情報伝達系がいかにして賦活されるか、を探究するため、病態モデル動物 poly I:C マウスより採取したニューロンとミクログリアにおいて、各情報伝達系を制御している分子群を探索した。

(1) caspase-3/-7 等のプロテアーゼ様酵素の活性を培養細胞にて蛍光イメージングもしくは NMR で定量解析することができる申請者ら独自の分子動態解析技術を基に、タンパク質プロセッシングを *in vivo* で観察できる MRI を創出する。これにより、モデルマウスの脳内で FKN 産生の変化を経時的に追うことが可能となる。病態脳における可溶性 FKN 産生の低下は、ミクログリア活性化に先だって生じることが報告されているので、poly I:C マウスにて、精神症状の行動学的解析を行いつつ、上記 MRI による可溶性 FKN 産生 *in vivo* イメージングとを併せて行い、発症超早期のマウス脳スライスを調製した。

(2) その超早期 poly I:C マウスの脳組織から、レーザーマイクロダイセクション法(LMD 法)によりニューロンとミクログリアを採取し、それら細胞での遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。

(3) また、FKN-CX3CR1 情報伝達系、CD200-CD200R 情報伝達系の阻害は、ニューロンにおける FKN と CD200、ミクログリアにおける CX3CR1 と CD200R の発現減少もしくは機能低下等に起因するので、それら遺伝子の転写調節因子、及び、受容体結合タンパク質の探索を、免疫沈降、プルダウンアッセイ、蛍光相関分光法(FCS)等によって行い、それを上記 DNA マイクロアレイの解析結果と照合した。

(4) 加えて、採取したニューロンとミクログリアから核画分を調製し、FKN、CD200、CX3CR1、CD200R に関連するトランスクリプトーム・メチローム解析を行うことにより、関連分子を探索した。

(5) TAM-Syk 情報伝達系(賦活系)の内因性リガンドの検索・同定。ITAM-Syk 情報伝達系は ITIM 情報伝達系と拮抗的に機能し、TREM2 や SIRPβ1 等の膜受容体にリガンドが結合することで賦活するが、病態脳にてミクログリア活性化を惹起する内因性リガンドはまだ分かっていない。また、ITAM-Syk 情報伝達系の持続的な賦活は、統合失調症の病態生理にかかわる慢性炎症の分子基盤をなすと考えられる。そこで本研究では、poly I:C マウスより発症超早期の脳組織を調製し(上記 2)、TREM2 と SIRPβ1 に結合する内因性リガンドをアフィニティクロマトグラフィ/質量分析等で探索した。さらに LMD 法にて 100μm² 程度の隣接する微小な領域を脳スライスから採取し、それを質量分析計に掛けプロテオーム解析することにより、活性化ミクログリア膜受容体に結合しているリガンド分子を同定した

(6) 統合失調症ではミクログリア活性化を抑制する FKN-CX3CR1 情報伝達系、CD200-CD200R 情報伝達系の機能障害が示唆されるため、CX3CR1 や CD200R に対するアゴニストには神経炎症抑制効果が期待される。よって本研究では、FKN と CD200 の受容体結合部位の配列を基にペプチドを合成し、これが予防薬としての効果を持つかどうかを検証した。当該ペプチドには、狂犬病ウイルス糖タンパク質(RVG)を結合することにより、血液脳関門透過性を持たせた。また、安定同位体標識した CX3CR1 及び CD200R に結合するアゴニスト低分子化合物を、既に申請者らが構築済の膜受容体結合低分子化合物ライブラリーから個体 NMR により探索した。そして、それら受容体アゴニストの生理活性を、LPS で活性化を誘導した初代培養ミクログリアで解析した。

4 . 研究成果

(1) ミクログリアの病的活性化の分子病理に関する研究

ここでは、初めに、統合失調症の病態モデルである poly I:C 母体投与モデルマウスで、ニューロン・ミクログリア相関に与るミクログリア受容体等の遺伝子発現、細胞内情報伝達系の活性化等を網羅的に検討した結果、統合失調症病態下でミクログリアの性状転化が生じ、神経細胞毒性に与る TNF、IL1、IL6 等の産生の増加と神経保護に働く IGF1、BDNF 等の産生の低減を来していることを見出し、その性状転化に CX3CR1、CD200R 等のミクログリア細胞膜上の受容体が機能していることを確認した。また、CD200R を活性化する低分子化合物を、医薬候補低分子化合物ライブラリーよりスクリーニングし、その賦活がミクログリアの活性化を阻害するとともに、統合失調症様精神症状を緩和することを見出した。そして、poly I:C モデルマウスにて、プレパルス抑制障害を来す以前の 7 週齢に、探索した CD200R 賦活薬を投与した結果、10 週齢における脳内ミクログリア活性化及びプレパルス抑制障害の低減を確認した。

(2) ニューロン・ミクログリア相関を治療標的とする統合失調症予防創薬に掛かる研究

本研究では、fractalkine(FKN)のプロセッシングによる可溶性 FKN の産生が、ITAM-Syk 系を刺激しミクログリアの病的賦活を誘引することを生化学的解析により見出した。また、可溶性 FKN の産生を MRI により画像化することをねらい可溶性 FKN の産生を蛍光画像法で可視化する機能プローブを創製した。次いで、当該プローブを改変し paramagnetic effect により MRI 信号を生起する MRI 機能プローブを創製し、それを poly I:C による統合失調症病態モデルマウス 8 週齢から調製した脳切片培養系に適用することで NMR 信号を検出した。そして、創製済のプローブに狂犬病ウイルス由来の糖タンパク質を結合し、血液脳関門透過性を持たせることにより、統合失調症発症初段階における脳内ミクログリア活性化を MRI で画像化することに成功した。

本研究では、統合失調症などの諸精神神経疾患患者脳で、病態初期にミクログリアなどの脳内免疫細胞の毒性転化が生起する分子・神経病理を解明することを目的としている。研究代表者らは、これまでに PET により統合失調症患者で発症初段階に脳内ミクログリアが活性化することを観察した。そこで、ここでは、ミクログリアの活性化を惹起する病態プロテアーゼの賦活と、それによる代謝産物の産生を in vivo で MRI などの医療機器により非侵襲的に画像化し、定量評価するための分子イメージング技術の創成を目指し、初めに、NMR で当該プロテアーゼの活性化を検出・評価することができるスイッチングプローブを設計、合成した。そして、生細胞培養系で病態プロテアーゼの賦活に伴い NMR/MRI シグナルを発生する NMR/MRI プローブを作出した。即ち、病態プロテアーゼによりプロセッシングされ、常磁性体が NMR/MRI 核種から遊離する結果、T2 緩和時間が短縮するスイッチングプローブを創製し、その NMR/MRI シグナルを NMR で探知、画像化した。当該プローブは、病態プロテアーゼの基質が未同定であっても、その活性を定量的に評価するのに有用である。本研究では、Poly I:C による統合失調症病態モデルマウスから調製した脳細胞初代培養系に In-cell NMR を適用し、ミクログリアの毒性転化に伴う病態プロテアーゼの活性化を、NMR で画像化し定量評価し得ることを確認するとともに、その MRI による諸精神神経疾患早期診断への応用への見通しを付けた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Asai H, Inoue K, Sakuma E, Shinohara Y, Ueki T. Potential implication of SGK1-dependent activity change in BV-2 microglial cells. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2018 10:115-123. eCollection (査読有)

2. Inoue K, Sakuma E, Morimoto H, Asai H, Koide Y, Leng T, Wada I, Xiong ZG, Ueki T. Serum- and glucocorticoid-inducible kinases in microglia. Biochem Biophys Res Commun. 2016 478:53-59. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.094. (査読有)
3. Inoue K, Leng T, Yang T, Zeng Z, Ueki T, Xiong ZG. Role of serum- and glucocorticoid-inducible kinases in stroke. J Neurochem. 2016 138:354-61. doi: 10.1111/jnc.13650. (査読有)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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。