

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09783

研究課題名(和文)パーキンソン病における脳内-血液免疫系細胞間のクロストーク開始起点と病態への関与

研究課題名(英文)Origin of crosstalk between brain and blood immune cells in Parkinson's disease and its involvement in pathology

研究代表者

鈴木 秀一郎 (Suzuki, Syuuichirou)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：90532929

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)：パーキンソン病(PD)は根本的な治療法のない神経変性疾患であり、その発症メカニズムについては多くの指摘があるものの特定されていないが近年の核医学的手法においてPD患者脳の中脳黒質においてミクログリア(MG)の活性化やリンパ球の脳内移行が確認され病態への関与が注目されている。我々はPD動物モデルを用いた研究においてPDの病態形成には血管内免疫細胞の関与が大きいことを示唆するデータを得、これを確認するため遺伝子プロファイルが重複するMGと末梢マクロファージを識別可能なGFP骨髄キメラPDラットを作製することに成功し、更に同ラットのの中脳黒質領域において血管内免疫細胞の脳内移行があることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PDに限らず神経変性疾患の原因は当然神経やグリアにあるとされ研究が進められてきたが、本研究の特色としてPDの病態形成を血管内の免疫細胞に着目し原因を探索することがあげられる。本研究で得た新知見によりPD発症前の血液バイオマーカーの発見に繋がり、発症予防や早期治療の開始時期が提言できる可能性がある。この研究手法がアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症など病態形成に炎症の関与が指摘される他の神経変性疾患にも応用できる可能性がある。本研究の着眼点と研究手法が神経変性疾患だけでなく、他の加齢性疾患の病態解明にも応用され、免疫細胞の関与が発見される可能性もあり重要な意義がある。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease for which there is no underlying cure, and there are many indications about its pathogenic mechanism but it has not been identified. Recent nuclear medicine technology showed that activation of microglia (MG) and migration of lymphocytes into the brain were confirmed in the substantia nigra of the PD patient's brain, and their involvement in the pathological condition has attracted attention. We obtained data suggesting that intravascular immune cells are greatly involved in the pathogenesis of PD in studies using PD animal models. To prove this, we succeeded in producing GFP bone marrow chimeric PD rats capable of distinguishing MG and peripheral macrophages with overlapping gene profiles. Furthermore, it was confirmed that intravascular immune cells were transferred to the substantia nigra region of the rat model.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：パーキンソン病 免疫細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)の病態形成メカニズムは複雑で十分には解明されていないがミトコンドリア機能異常、タンパク質分解異常、酸化ストレス、グリアや免疫細胞による自己免疫応答などが互いに影響しあいながら関与していると考えられている。これらはミトコンドリア機能異常やタンパク質分解異常などの神経細胞内因性の関与と、グリアや免疫細胞による神経細胞外因性の応答に大別できる。PD患者における自己免疫応答に関する最初の報告は古く、PD患者死後脳の中脳黒質でミクログリア(MG)が活性化することやリンパ球が血液脳関門を越えて脳内移行することが1988年にMcGeerらによって報告されたが(McGeer et al., Neurology 1988)、近年ではPETを用いた脳MGの画像化が可能となりPD病初期でも脳MGの活性化が起きていることがわかり、病態への関与が改めて注目されている。更にはCD4陽性T細胞ノックアウトマウスに対し、ドパミン神経毒であるMPTPの投与を行ってもドパミン神経障害が小さいことが報告され(Brochard et al., J Clin Invest 2009)、CD4陽性T細胞と活性型MG間で抗原提示を介した直接的相互作用があること、免疫治療も治療候補になりえることが示された。しかしMGは神経やアストロサイトと相互作用する中で、炎症性サイトカインなどを産生し神経細胞死への誘導を引き起こす反面、抗炎症性サイトカインや神経栄養因子を産生し神経保護にも作用するため、PDにおけるMGの役割は単純ではない。PD患者の中脳黒質において、ミクログリア(MG)の活性化やリンパ球の脳内移行が以前より確認されているが、免疫細胞の病態形成へのメカニズムは未だ十分には解明されていない。我々はこれまで、ドパミン神経毒である6-hydroxydopamine(6-OHDA)をラット中脳黒質-線条体経路に投与したPDモデルラットを用いて、ドパミン神経およびMGに発現している7ニコチン性アセチルコリン受容体への刺激がドパミン神経細胞死に対し保護作用を示し、投与部位のMG活性が抑制された結果を得ている(Suzuki et al., J Neurosci Res. 2013)。更に別の検討では6-OHDA線条体投与PDモデルラットを用いて、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hBM-MSCs)を静脈内投与したところ行動学的、免疫組織学的に有意な改善を認め、線条体のMG活性の抑制を確認した。ところが、予想に反して静脈内投与されたhBM-MSCsの明らかな脳内移行は認められなかった(Suzuki et al., Neurosci Lett. 2015)。6-OHDAを線条体に投与すると進行性のドパミン神経細胞死が起きるが、その病態形成にはドパミン神経の軸索輸送障害やMGの活性化が関与すると考えられている。一方で、hBM-MSCsは障害部位への遊走能や多分化能、神経栄養因子分泌能に加え、強力な免疫調整作用を有することから炎症性疾患への臨床応用が進められており、ステロイドや免疫抑制剤抵抗性の重症急性graft versus host diseaseに対して既に臨床応用されている。hBM-MSCsが脳内移行しないにもかかわらず静脈内投与で神経保護作用を示した事実および上述のhBM-MSCsの細胞特性から、6-OHDA線条体投与による進行性のドパミン神経細胞死の病態形成には脳実質外の、特に血管内免疫細胞の関与が大きいのではないかと考えた。この仮説は前述したPD患者の死後脳を用いた免疫組織学的検討の結果にも裏付けがある。

2. 研究の目的

本研究では脳に対する免疫系の影響のないGFP骨髄キメラPDモデルラットの作製方法を確立すること、このモデルラットの中脳黒質においてドパミン神経障害から神経細胞死に至る過程の中で血管内免疫細胞の脳内移行の有無を確認すること、更に脳MGが何を起点に関わり始め病態を形成していくのかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

X線照射したSDラットにGFPトランスジェニックラットの骨髄を移植し、GFP骨髄キメララットを作製した。X線照射時に頭部防護の有無、脾細胞の併用移植の有無、移植後プレドニゾロンの投与の有無で条件割付を行い、高キメラ率の作製方法を探索した。更に線条体に6-OHDAを投与した上でX線全身照射と脳防護照射で脳組織内のミクログリアに違いがないか免疫組織学的に評価した。以下に手順を示す。

(1) 放射線照射によるラット骨髄細胞の破壊

5週齢のSprague Dawley(SD)ラットを放射線照射器に置き頭部を鉛で防護した上で、骨髄死が得られる10GyでX線照射した。一部のラットは防護処置を行わず全身照射した。

(2) ドナー細胞の調整

ほぼ全身の細胞にEGFPが発現し緑色蛍光を呈するSDトランスジェニックラットの大腿骨を深麻酔下で離断し骨髄細胞を採取した。また、同ラットの脾臓を採取し、セルストレーナーを用いて脾細胞をシングルセルに分離した。各細胞数が 1×10^8 細胞/mLになるように調整した。

(3) レシピエントへの移植

X線照射後のラットに(2)で調整したドナー細胞浮遊液を静脈内投与した。X線を全身照射したラットに対してはレシピエント1匹あたり骨髄細胞 1×10^8 で投与した。頭部防護しX線照射したラットは2群に分け骨髄細胞 1×10^8 、あるいは骨髄細胞 1×10^8 および脾細胞 $1 \sim 2 \times 10^8$ を静脈内投与した。

(4) プレドニゾロンの投与

頭部防護照射および骨髄・脾細胞投与群は更に群分けし、プレドニゾン(PSL)を腹腔内投与した。1回投与量はどちらも10 mg/kgとし、連日投与あるいは週3回投与した。

(5) フローサイトメトリーによるキメラ率の検証

感染に注意し飼育したうえで4週間後に尾静脈から採血し、フローサイトメトリーにてゲート内の白血球中数およびGFP陽性細胞数をカウントした。GFP陽性白血球数/末梢白血球数をキメラ率とした。各ラット群におけるキメラ率の検証を行った。

(6) GFP 骨髄キメラ PD ラットの作製、脳組織検証

(5)にて一定のキメラ率が得られたラットをGFP 骨髄キメララットとし、更に深麻酔下で脳定位固定装置に設置した上で、片側線条体2ヶ所に6-OHDAを脳内微量投与した。更に、このGFP 骨髄キメラ PD ラットの一部分を灌流固定後、脳を採取した。ラット脳組織におけるX線照射の脳内MGへの影響を全身照射と脳防護照射ラットを用いて比較した。

(7) 解析データの統計処理

解析データは平均値+標準誤差で示し、統計処理にはJMP10.0を使用した。one-way ANOVAによる群間比較の後、post-hoc testとしてTukeyのHSD検定を行い、有意水準<5%を有意差ありとした。

上記検討にてキメラ率の高くかつ放射線照射の脳内への影響の少ないGFP 骨髄キメララットの作製方法を確認した上で、GFP 骨髄キメラ PD ラットの6-OHDAによるドパミン神経変性の経時変化に関してミクログリアの活性化やGFP陽性細胞の経時的な動態とともに解析を行った。以下に手順を示す。



(1) GFP 骨髄キメラ PD ラットの作製

上記検討をより得られたGFP 骨髄キメララットの作製方法は鉛による頭部防護下にて10Gy照射、照射1日後にレシピエント1匹あたりGFPトランスジェニックラットの骨髄細胞1 × 10⁸および脾細胞1~2 × 10⁸を静脈内投与し4週間後に尾静脈から採血の上、キメラ率が70%以上を骨髄キメララットとした。上記方法にて6-OHDAの脳内微量投与を行い6-OHDA投与1、2、3、5、7、14、21、28日後に同モデルラットを灌流固定後、脳を採取した。

(2) 行動評価

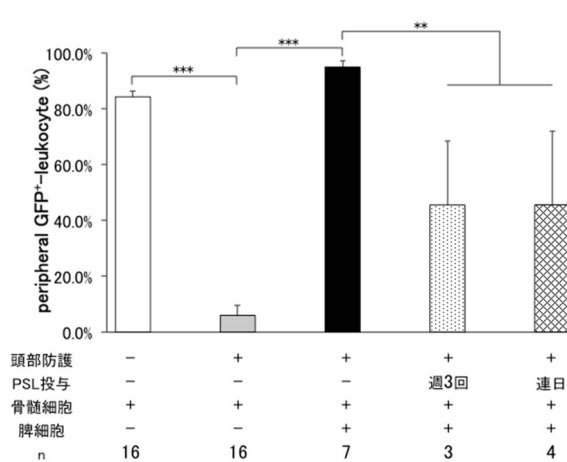
6-OHDA投与後14日目以降のラットに関しては7日おきにメタンフェタミン誘発旋回運動を120分間測定し、1分間あたりの回転数が6回転以上20回転未満であることを確認した。

(3) 免疫組織学的解析

免疫組織化学染色、免疫蛍光染色にドパミン神経は抗Tyrosine hydroxylase (TH)抗体、ミクログリアは抗ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1)抗体を用いGFP陽性細胞とともに評価した。

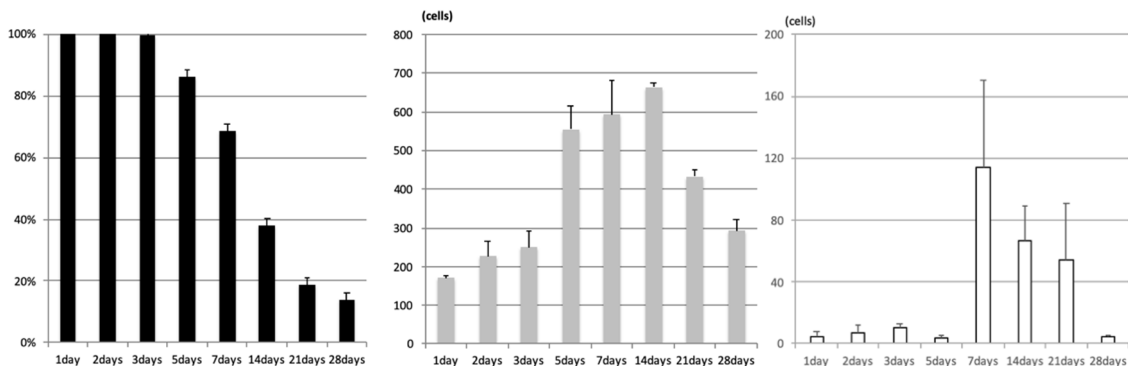
4. 研究成果

各GFP 骨髄キメララット群のキメラ率を右に示す。X線全身照射後に細胞移植を行ったラットでは、移植細胞が骨髄細胞のみであったがキメラ率が84.2 ± 2.0%と高値であった。一方で、頭部を防護しX線照射を行ったラットでは骨髄移植単独では6.0 ± 3.8%と有意に極めて低値であった。しかし、移植細胞に脾細胞を加えると有意にキメラ率が向上した(キメラ率94.8 ± 4.8%)。移植後PSL併用群では週3回投与、連日投与群ともに十分なキメラ率を有するラットは得られなかった(キメラ率は週3回投与45.5 ± 22.8%、連日投与25.6 ± 26.4%)。また、各群における移植4週間後までの累積生存率はX線全身照射群66.7%、頭部防護群80.0%、頭部防護および骨髄・脾細胞移植群58.3%、PSL週3回投与群50.0%、PSL連日投与群66.7%であった。



一部のGFP 骨髄キメラ PD ラットの脳組織におけるMGおよびマクローファージを抗Iba1抗体を用いて、免疫組織学的に同定した。X線全身照射ラットでは健側を含めた大脳皮質、線条体においてIba1陽性細胞はほぼ全てGFP陽性であり、突起を伸長させた細胞形態であった。脳防護X線照射ラットではIba1陽性かつGFP陽性細胞は6-OHDA投与領域および穿刺部位周囲に局限しており、球状の細胞形態であった。また6-OHDA投与領域にはGFP陽性Iba1陰性の球状細胞も認められた。他の領域においてIba1陽性細胞はGFP陰性であり突起をより広く伸長させた細胞形態が観察された。

患側中脳黒質領域における TH 陽性細胞数は、健側に比較し 6-OHDA 投与 3 日後までは差がみられなかったが 3 日後には 86%まで減少し、その後も進行性に低下し 14 日後には 38%、28 日後には 14%まで低下した。患側中脳黒質領域における Iba1 陽性細胞数は 6-OHDA 投与 3 日後までは微増するものの大きな変化は認められず、5 日後には 1 日後に比較し約 3.3 倍まで上昇、14 日後をピークに減少に転じ 28 日後には 1 日後の 1.7 倍程度となった。患側中脳黒質領域における GFP 陽性細胞数は 6-OHDA 投与 5 日後までは Iba1 陽性細胞と同様に微増するものの大きな変化は認められなかった。しかし 7 日後には 1 日後に比較して約 25 倍上昇しピークとなり、その後は減少し 28 日後には 1 日後とほぼ同値となった。



中脳黒質 TH 陽性細胞数対側比 患側中脳黒質 Iba1 陽性細胞数 患側中脳黒質 GFP 陽性細胞数

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 鈴木秀一郎、鈴木紘美、蒲生直希、齋藤太郎、横川和樹、藤倉舞、真部建郎、岩原直敏、松村晃寛、松下隆司、久原真、川又純、下濱俊
2 . 発表標題 Intracerebral infiltration of immune cells in 6-OHDA-induced Parkinson's disease model rat.
3 . 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Syyuichirou Suzuki, Hiromi Suzuki, Taro Saito, Kazuki Yokokawa, Mai Fujikura, Tatsuo Manabe, Naotoshi Iwahara, Akihiro Matsumura, Takashi Matsushita, Shin Hisahara, Jun Kawamata, Miho Emoto, Shun Shimohama
2 . 発表標題 The optimal preconditioning for bone marrow transplantation to establish 6-OHDA-lesioned GFP bone marrow chimeric PD model rat.
3 . 学会等名 第23回世界神経学会議(WCN2017)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 鈴木 紘美、齋藤 太郎、横川 和樹、藤倉 舞、真部 健郎、岩原 直敏、松下 隆司、松村 晃寛、久原 真、川又 純、下濱 俊
2 . 発表標題 Time course of intranigral invasion of immunocytes in 6-OHDA-induced Parkinson's disease rat model.
3 . 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 S Suzuki, H Suzuki, K Yokokawa, T Saito, M Fujikura, T Manabe, N Iwahara, A Matsumura, T Matsushita, S Hisahara, J Kawamata, S Shimohama
2 . 発表標題 THE OPTIMAL PRECONDITIONING FOR BONE MARROW TRANSPLANTATION TO ESTABLISH 6-OHDA-LESIONED GFP BONE MARROW CHIMERIC PD MODEL RAT.
3 . 学会等名 World Congress of Neurology 2017 (国際学会)
4 . 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	下濱 俊 (SHIMOHAMA Shun) (60235687)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	