

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07062

研究課題名(和文) 全身老化誘導における脳内インターフェロンシグナルの影響

研究課題名(英文) Effect of interferon signals in the brain on the induction of systemic aging

研究代表者

佐藤 卓 (Taku, Sato)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：40375259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：I型インターフェロン(IFN)は、生体の抗ウイルス応答に重要なサイトカインである。一方、脳内や末梢において非感染性に発現したIFNが、少なからず神経系の恒常性や機能に影響を及ぼし、脳老化や全身老化に関わる可能性が報告されている。本研究では、脳内でIFNシグナルが慢性活性化する新規マウスモデルの確立を試みた。その中で、脳内炎症に関わるミクログリアで同シグナルを恒常活性化しうるマウスモデルを樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会が迎えた日本において、健康長寿社会を創生することは重要なテーマである。我々はこれまでに非感染性に分泌されるIFNが、生体内ストレス要因の一つであることを、様々な臓器で明らかにしてきた。最近になり、老化したマウスや老人の脳内では、非感染性にIFNの生産が高まり、海馬の認知機能を低下させる一因となることが示されている。さらに、脳内に起こった炎症は、全身の老化を引き起こす可能性も示されている。IFNは、この老化のドミノを引き起こすトリガーの一つである可能性があり、本研究において見出したマウスモデルは、このメカニズムを検証しうる有用なリソースである。

研究成果の概要(英文)：Type I interferon (IFN) is a cytokine important for the host antiviral response. On the other hand, it has been reported that IFN, which is non-infectiously expressed in the brain and the periphery, affects the homeostasis and function of the nervous system and may be involved in brain aging and systemic aging. In this study, we attempted to generate a novel mouse model in which IFN signals are chronically activated in the brain. Among them, we established a mouse model capable of constitutively activating the IFN signal with microglia, which is involved in the regulation of neuroinflammation and neurobehavior.

研究分野：幹細胞生物学、免疫学

キーワード：インターフェロン 脳内炎症 炎症老化 ミクログリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

I型インターフェロン(IFN)は、生体がウイルスに感染する際にあらゆる種類の細胞から速やかに分泌され、抗ウイルス応答に働く重要なサイトカインである。一方、同分子は感染のない状態でも微量に分泌されることで、宿主免疫系を恒常的に“アイドリング状態”に保ち、実際にウイルス感染が起こる際の速やかな免疫系活性化に寄与している(文献1)。興味深いことに、老化したマウスや老人の脳内では、非感染性にIFNの生産が高まっており、これは少なくとも海馬が関わる認知機能を低下させる一因となっている(文献2)。また、IFNは、海馬の神経幹細胞に直接作用し神経新生を抑制することで、うつ様症状を引き起こし(文献2)、これはヒトのIFN治療の際に認められる副作用としてよく知られている(文献3。)さらに、IFNの作用が病態形成に関わると考えられる全身性エリテマトーデス(SLE)のマウスモデルの解析では、末梢組織で発現したIFNが脳内のミクログリアを恒常的に活性化し、神経間の情報伝達に関わるシナプスの異常な貪食を誘導することが明らかにされており、この機構は、実際のSLE患者の多くに認められる中枢神経症状(CNSループス)の出現に関わると考えられている(文献4)。このように、脳内、及び末梢において非感染性に発現したIFNは、少なからず神経系の恒常性や機能に影響を及ぼすことから、全身老化に関わる視床下部の「神経炎症」を誘導する分子候補として有力である。しかしながら、現時点で視床下部及び同部位の神経幹細胞へのIFNの作用については報告がなく、当然のことながら、全身老化との関わりについても全く不明である。

申請者はこれまでに、IFNの細胞内シグナルを「負」に制御する転写因子である Interferon Regulatory Factor-2 (IRF2) を欠損するマウス (*Irf2*^{-/-}マウス) の組織幹細胞機能について解析を行ってきた。興味深いことに、*IRF2*^{-/-}マウスでは、少なくとも血液(申請者ら、文献5)、腸上皮組織(申請者ら、文献6)、皮膚毛包組織(投稿準備中)において損傷誘導後の組織再生能力が著しく低下し、また各組織幹細胞(造血幹細胞、腸上皮幹細胞、毛包幹細胞)の数も減少していた。これらの結果から、非感染時において分泌される生理レベルの微量のIFNは、組織幹細胞にとって重大な「生理的ストレス因子」にほかならず、IRF2の働きを介してこの作用を定常的に制御することが、組織幹細胞の長期維持に必須であることを示している。このような組織再生能低下は老化表現型の一つでもあるが、*Irf2*^{-/-}マウスでは、これ以外にも老化に関連した様々な表現型がコントロールマウスに比べ早い時期に出現することを申請者は最近見出しており、同マウスでは全身老化のスピードが早まっていると考えている。本研究では、以上のような脳神経系に対するIFNの作用についての様々な報告、およびIFNシグナルが多様な組織幹細胞機能に影響を及ぼすという申請者自身のこれまでの知見を踏まえ、この脳内IFNシグナルと、老化制御中枢である視床下部の神経幹細胞機能、さらに全身老化の連関を明らかにし、全身老化誘導の新たなメカニズム解明に挑戦する。

2. 研究の目的

本研究では、脳内のIFNシグナルが全身老化にどのように関わるかを明らかにする。このためには慢性的に脳内のIFNシグナルが過剰になる状況を再現する必要がある。しかしながら、例えば脳内への長期的なIFNの投与は、実験手法の点で非現実的である。そこで、脳特異的IRF2欠損マウス (*Nestin-Cre: Irf2*^{fl/fl}マウス) を作製し、脳内の生理的IFNシグナルが過剰になるかどうかを検討する。同マウスの脳内においてIFNシグナル標的遺伝子の発現亢進が確認されたら、まず老化表現型の出現を詳しく解析する。特に、老化に関連する行動異常、

組織の機能低下、老化変化の組織学的特徴に着目する。

一方、IFNの作用はミクログリアの機能異常を引き起こすことが知られていることから（文献7,8）、この過程を介した間接的な神経細胞及び神経幹細胞の機能低下誘導の可能性を想定し、マクロファージ（ミクログリア）特異的なIrf2欠損マウスを作製する。

3. 研究の方法

(1) マウス

Irf2^{-/-}マウスは、Tak W Mak(Princess Margaret Cancer Centre, University Health Network)より供与された。Irf2^{fllox}マウスは、筑波大学生命科学動物資源センターにおいて作製した。Nestin-Cre マウス、Cx3cr1-CreERT マウスは Jackson Lab.より購入した。Irf2^{fllox}マウスをそれぞれ、Nestin-Cre マウス、Cx3cr1-CreERT マウスと交配し、それぞれ神経特異的 Irf2 欠損マウス (Irf2^{fl/fl}:Nestin-Cre マウス) および Tamoxifen 誘導性に Cx3cr1 陽性マクロファージ特異的に Irf2 を欠損するマウス (Irf2^{fl/fl}:Cx3cr1-CreERT2 マウス) を作製した。8 週齢の Irf2^{fl/fl}:Cx3cr1-CreERT2 マウスに、Tamoxifen(Sigma, 2 mg/day, 5 days)腹腔内投与し、その3ヶ月後にミクログリアを採取した。すべての実験は、「国立大学法人東京医科歯科大学動物実験規則」および「国立大学法人東京医科歯科大学組換え DNA 安全規則」に定める東京医科歯科大学動物実験委員会・東京医科歯科大学組換え DNA 実験安全委員会の審査・承認を経て遂行した。

(2) 定量的 PCR

脳組織からの totalRNA 採取は、Sepasol®-RNA Super G (ナカライテスク)での粗精製の後、RNeasy® Mini Kit (Qiagen)を使用した。また、精製したミクログリアからの totalRNA 採取は、RNeasy® Mini Kit (Qiagen)を使用した。精製した totalRNA 1µg から、Random primer と SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific)を用いて、cDNA を合成した。各サンプルから合成した cDNA を鋳型とし、遺伝子特異的プライマーおよび LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) により、LightCycler® 480 を用いて定量的 PCR を行った。

(3) 行動解析

オープンフィールドテストでは、マウスにとって新奇な環境であるオープンフィールドにマウスを置き、10 分間自由に探索させることで、新奇環境下での自発的な活動性を測定した。具体的には、マウスの活動をビデオで撮影後、総移動距離、総移動時間、および中央部滞在時間を計測した。モリス水迷路では、まず水を張ったプール内で、水面下に設置された逃避台をマウスに泳いで探索させ、その位置を空間記憶としてマウスに記憶させる。1日4回、5日間のトレーニングにより逃避台の位置を記憶させ、最後のトレーニングから24時間後に逃避台を取り外し、もともと逃避台があった位置をマウスがどの程度横切るかを検討することで、当該マウスの空間記憶を評価した（プローブテスト）。

(4) 免疫染色

脳組織を4%PFAで4時間固定後、15%および30%スクロースで置換した。Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek)を用いて組織を包埋後、CM3050S (Leica)を使用して薄切した。PBSで洗浄後、0.5% Triton X-100/PBS (洗浄液)で膜透過処理、5%BSA/PBSでブロッキング後、未標識抗 Iba1 抗体 (Wako) もしくは未標識ウサギ IgG コントロール抗体 (SouthernBiotech)で4、24時間で抗体反応を行った。AF488 標識抗ウサギ IgG (H+L) 口バポリクローナル二次抗体 (Invitrogen)と反応後、DAPIで核染色し、TCS SP 8 (Leica)で観察、画像データを取得した。

(5) ミクログリア精製

マウスから脳を採取し、Collagenase (Sigma-Aldrich) 及び DNaseI (Roche) を含む酵素溶液に浸し、gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) を用いて組織を分散した。遠心後、30% Percoll (GE Health Care) に懸濁し、70% Percoll をその下層に加え、25、2000rpm、20 分間遠心分離した。マイクログリアを含む層を回収し、洗浄後、以下の抗体で 4、30 分間染色した； APC 標識 抗マウス CD11b ラットモノクローナル抗体 (M1/70) (eBioscience)、PE/Cy7 標識 抗マウス CD45.2 マウスモノクローナル抗体 (104) (BioLegend)、PE 標識 抗マウス CX3CR1 マウスモノクローナル抗体 (SA011F11) (BioLegend)、洗浄後、解析用チューブに Propidium Iodide (PI) を最終濃度 1 µg/ml で添加し、FACS Aria III (BD Biosciences) を用いて、PI⁻ CD45^{int} CD11b⁺ CX3CR1⁺ 分画をマイクログリアとして回収した。

(6) 網羅的遺伝子発現解析

マイクログリアから採取した totalRNA をダナフォーム社 (神奈川) に送付し、Cap Analysis Gene Expression (CAGE) 用ライブラリー作製、およびシーケンスを実施した。得られたデータを Gene Set Enrichment Analysis (GSEA v4.0.3, Broad institute) や DAVID (DAVID v6.8) を用いて再解析した。

4. 研究成果

(1) Irf2^{-/-}マウスおよび Irf2^{fl/fl}:Nestin-Cre マウス脳での ISG 発現

既述の通り、老化したマウスや老人の脳内では、非感染性に IFN の生産が高まっており、これは少なくとも海馬が関わる認知機能を低下させる一因となっている (文献 2)。このことから、IFN の作用に感受性の高いと考えられる Irf2^{-/-}マウスでは、早期老化の表現型が認められる可能性を考え、11-12 ヶ月齢の Irf2^{-/-}マウスおよびコントロール (Irf2^{+/+}) マウスより、脳組織を採取し、IFN 誘導遺伝子 (ISG) 発現を定量的 PCR により検討した。しかしながら予想に反し、いずれのマウスも代表的な ISG である、Ifit1、Ifit2、Tapbp 発現は同程度だった。また、それ以外の脳内炎症マーカーである、Ccl2、Cxcl10、C3、C1qa の遺伝子発現も同程度であった。同様に、Irf2^{fl/fl}:Nestin-Cre マウスおよび Irf2^{fl/fl} マウスでも上記 ISG 発現を検討したが両者に差は認められなかった。

(2) Irf2^{-/-}マウスの行動解析

オープンフィールドテストにおいて Irf2^{-/-}マウスと Irf2^{+/+}マウスを比較したところ、5~6 ヶ月齢のマウスですでに、総移動距離が Irf2^{-/-}マウスで有意に短縮しており、また総移動時間も減少傾向にあった。一方、中央部滞在時間には違いが認められなかった。この結果から、Irf2^{-/-}マウスでは自発的行動が軽度低下している可能性が考えられた。

(1) の ISG 発現が脳内でほとんど変化がなかったこと、および (2) で 5~6 ヶ月ですでに運動能力そのものがすでに低下していることから、当初 Irf2^{-/-}マウスでモリス水迷路試験を計画していたが、実施が難しいと判断した。

(3) Irf2^{-/-}マウスの脳マイクログリアの形態解析

正常な状態 (若齢マウス) のマイクログリアは枝分かれした突起を持つ、ラミファイド型の形態を示すが、加齢マウスのマイクログリアは、活性化することで突起が短く、細胞体が大いアメボイド型となることが知られている。そこで、本年度の研究では、まずこのような形態変化について、7-8 ヶ月齢程度の Irf2^{-/-}マウスおよび Irf2^{+/+}マウスの脳内マイクログリアについて解析した。その結果、Irf2^{-/-}マウスの、特に大脳皮質のマイクログリアでは、すでにアメボイド型に近い形態を示すマイクログリアが検出された。一方、脳内マイクログリアのフローサイトメーター解析を行ったが、それらの細胞表面マーカー発現 (CD11b, CX3CR1) およびその数には変化を認めなかった。

(4) Irf2^{fl/fl}:Cx3cr1-CreERT2 マウスミクログリアの遺伝子発現

ミクログリア(マクローファージ)特異的 Irf2 欠損マウス(Irf2^{fl/fl}: Cx3cr1-CreERT2、以下 Irf2-MGKO)から、脳ミクログリアをフローサイトメーターにより精製し、網羅的遺伝子発現解析により、コントロールマウスとの性質の違いについて検討した。このマウスを用いることで、ミクログリアにおける IFN シグナル亢進の直接の影響を解析可能である。データ解析の結果、予想された通り、コントロールマウスのミクログリアに比べ、Irf2-MGKO の同細胞では多様な IFN 誘導性遺伝子発現が亢進していた。また、Irf2-MGKO マウスミクログリアで発現亢進した遺伝子の GO 解析からも、同ミクログリアでは確かに IFN シグナル経路の活性化していることがわかった。興味深いことに、Irf2-MGKO マウスミクログリアでは、別途独自に取得した2歳齢以上の超高齢マウスミクログリアが特徴的に発現する遺伝子群(加齢ミクログリアシグネチャ)を有意に高発現していることがわかった。一方、Tnf や Il1b といった典型的な炎症性サイトカイン遺伝子発現には変化がなかったことから、炎症タイプミクログリアを誘導するためには IFN シグナルの亢進以外の要因も必要であると考えられた。今後、同マウスの脳機能の異常について、行動解析により明らかにする。

<引用文献>

1. Taniguchi T, Takaoka A. A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2, 2001,378-386.
2. Baruch K, Deczkowska A, David E, Castellano JM, Miller O, Kertser A, Berkutski T, Barnett-Itzhaki Z, Bezalel D, Wyss-Coray T, Amit I, Schwartz M. Aging. Aging-induced type I interferon response at the choroid plexus negatively affects brain function. *Science.* 346,2014,89-93.
3. Lieb K, Engelbrecht MA, Gut O, Fiebich BL, Bauer J, Janssen G, Schaefer M. Cognitive impairment in patients with chronic hepatitis treated with interferon alpha (IFNalpha): results from a prospective study. *Eur Psychiatry.* 21,2006,204-210.
4. Popescu A, Kao AH. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Curr Neuropharmacol.* 9,2011,449-457.
5. Sato T, Onai N, Yoshihara H, Arai F, Suda T, Ohteki T. Interferon regulatory factor-2 protects quiescent hematopoietic stem cells from type I interferon-dependent exhaustion. *Nat Med.* 15,2009,696-700.
6. Sato T, Ishikawa S, Asano J, Yamamoto H, Fujii M, Sato T, Yamamoto K, Kitagaki K, Akashi T, Okamoto R, Ohteki T. Regulated IFN signalling preserves the stemness of intestinal stem cells by restricting differentiation into secretory-cell lineages. *Nat Cell Biol.* 22,2020,919-926.
7. Deczkowska A, Matcovitch-Natan O, Tsitsou-Kampeli A, Ben-Hamo S, Dvir-Szternfeld R, Spinrad A, Singer O, David E, Winter DR, Smith LK, Kertser A, Baruch K, Rosenzweig N, Terem A, Prinz M, Villeda S, Citri A, Amit I, Schwartz M. Mef2C restrains microglial inflammatory response and is lost in brain ageing in an IFN-I-dependent manner. *Nat Commun.* 8,2017,717.
8. Moore Z, Mobilio F, Walker FR, Taylor JM, Crack PJ. Abrogation of type-I interferon signalling alters the microglial response to A 1-42. *Sci Rep* 10,2020,3153.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Minamide Kana, Sato Taku, Nakanishi Yusuke, Ohno Hiroshi, Kato Tamotsu, Asano Jumpei, Ohteki Toshiaki	4. 巻 10
2. 論文標題 IRF2 maintains the stemness of colonic stem cells by limiting physiological stress from interferon	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14639
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-71633-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Taku, Ishikawa Shun, Asano Jumpei, Yamamoto Hirona, Fujii Masayuki, Sato Toshiro, Yamamoto Kouhei, Kitagaki Keisuke, Akashi Takumi, Okamoto Ryuichi, Ohteki Toshiaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Regulated IFN signalling preserves the stemness of intestinal stem cells by restricting differentiation into secretory-cell lineages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 919 ~ 926
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-020-0545-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Taku, Sase Miwako, Ishikawa Shun, Kajita Mihoko, Asano Jumpei, Sato Toshiro, Mori Yoshiyuki, Ohteki Toshiaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Characterization of radioresistant epithelial stem cell heterogeneity in the damaged mouse intestine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8308
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-64987-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asano Jumpei, Sato Taku, Ohteki Toshiaki	4. 巻 2171
2. 論文標題 Autophagy Detection in Intestinal Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 115 ~ 125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0747-3_7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Taku Sato, Toshiaki Ohteki.
2. 発表標題 Regulated IFN-signal preserves stemness of intestinal stem-cells.
3. 学会等名 The 14th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taku Sato, Toshiaki Ohteki
2. 発表標題 Regulated IFN-signal preserves stemness of intestinal stem-cells by restricting
3. 学会等名 第16回幹細胞シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------