

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07531

研究課題名(和文) 生体恒常性センサーである単球系細胞の制御に基づく神経変性疾患の画期的な治療法開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic strategy against neurodegenerative diseases by modulation of monocyte-lineage cell

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：活性化ミクログリアからのネガティブフィードバック因子IL-19が、アストロサイトからのGDNFの放出惹起により、SOD1 Tgマウスの症状改善に寄与していることを見出した。また、IL-19欠損下でのEAEの著明な増悪と、IL-19補充による症状の有意な軽減を認め、IL-19がミクログリアによる抗原提示能の抑制を介して、Th1細胞・Th17細胞による自己免疫および神経炎症を抑制することを解明した。さらに、SOD1 Tgマウスの病勢進行に伴ったCCR2陽性単球の中枢神経浸潤の増加と、ミクログリアや神経細胞におけるCCR2の発現誘導が、神経炎症の悪循環を惹起し、病態を促進させている可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単球系細胞のネガティブフィードバック因子であるIL-19が、神経免疫疾患や神経変性疾患といった病態の違いに応じて、神経保護作用・神経障害作用の二面性を示しうることを明らかにした。また、ALSモデルマウスの病勢進行に伴ったCCR2陽性単球の中枢神経浸潤の増加と、ミクログリアや神経細胞におけるCCR2の発現誘導が、神経炎症の悪循環を惹起し、ALSの病態形成の一機序を担っている可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：IL-19 acts as a negative-feedback regulator to limit proinflammatory response of macrophages/microglia. We showed that IL-19 deficiency aggravates EAE and IL-19-treatment significantly abrogated it. IL-19 suppresses MS pathogenesis by inhibiting macrophage antigen presentation. IL-19-deficient SOD1 Tg mice exhibited significant improvement of motor function accompanied by upregulating microglial TNF- and subsequent astrocytic GDNF, indicating that inhibition of IL-19 signaling may alleviate ALS symptoms. Then, we generated CX3CR1/CCR2-reporter SOD1 Tg mice that enables distinction between microglia and CNS infiltrating macrophage. We found that microglia and neurons partially expressed CCR2, but not astrocytes, associated with an increase in CNS infiltrating CCR2+ macrophage as disease progression, suggesting that macrophage CNS infiltration leads to CNS environmental deterioration due to toxic conversion of microglia and neurons.

研究分野：神経内科学

キーワード：単球系細胞 ミクログリア マクロファージ アストロサイト 神経炎症 IL-19

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患では、神経細胞死とともに、グリア細胞の機能異常や神経外からの炎症性細胞・因子の流入による慢性の神経炎症が惹起され病勢が進行するが、外傷や感染などの度に病状が階段状に悪化することも臨床現場でよく経験され、神経外の炎症による神経恒常性破綻も重要な病態機序であることが予想されてきた。これまで我々も、末梢での炎症抑制によって中枢神経系の慢性炎症を抑制し得ることを見出ししてきた。そこで、未だ解決していない神経変性疾患の病態解明には、神経変性を神経系のみで捉えるのではなく、末梢の免疫系や両者をつなぐ血液系の3臓器連関の視点から統合的に理解する必要性を考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経変性疾患モデルマウスを用いて、病態における神経系・免疫系・血液系の単球系細胞の役割を明らかにし、新たな診断・治療法開発への展開を図ることである。

これまで、神経疾患における単球系細胞の神経系への浸潤は、神経系の恒常性破綻に続発すると考えられ、単球系細胞自体の制御異常が、「非自律性」に神経系の恒常性破綻や病態に寄与する可能性は考慮されてこなかった。本研究を通じて、単球系細胞が、一臓器を越えた「非自律性」の機序による個体全体の恒常性維持に寄与し、それらの機能変調が神経疾患の病態の新たな規定因子であることを証明できれば、単球系細胞が生体の「恒常性調節」細胞であるという機能的再定義を通じ、神経変性疾患を「全身病」として捉える疾患理解のパラダイムシフトをもたらすことが期待される。そして、本研究成果に基づき、神経変性疾患に対する新規の治療戦略創出におけるブレイクスルーを提示できれば、難病に苦しむ患者・家族に対する福音につながり得る。

3. 研究の方法

(1) 神経疾患における神経系・免疫系・血液系の単球系細胞の弁別可視化計測

組織マクロファージに緑色蛍光を発現させる CX3CR1-EGFP ノックインマウス (Jung ら, Mol Cell Biol, 2000) と、骨髄由来マクロファージに赤色蛍光を発現させる CCR2-RFP ノックインマウス (Saederup ら, PLoS One, 2010) を、神経変性疾患モデルマウスと交配することで、ミクログリアなどの組織マクロファージは緑色細胞として、炎症などの病態下で組織浸潤する骨髄由来マクロファージは赤色細胞として、生体内分別や分離採取が可能となる。疾患モデルマウスとしては、ALS モデルとして国際的に汎用されているヒト superoxide dismutase1 G93A 変異トランスジェニックマウス (SOD1-Tg) を用いる。モデルマウスの発症早期・中期・末期の各病期において、神経組織、脾臓、末梢血、脳脊髄液を採取し、FACS セルソーターを用いて組織マクロファージ (緑色細胞) と組織浸潤マクロファージ (赤色細胞) として分離採取し、細胞機能および遺伝子発現解析を行う。

(2) 単球系細胞における「毒性転換」制御因子の同定

上記の結果で得られた、単球系細胞の「毒性転換」を制御する候補因子をマウス初代培養ミクログリアおよび脾臓マクロファージで増減させることで、組織障害性/組織保護性への効果を確認し、最終的に組織恒常性を制御する、あるいは、破綻させる因子を同定する。in vitro 実験で選別・同定された「毒性転換」制御因子を標的とした疾患治療の有効性について、SOD1-Tg マウスに対する作働剤、阻害剤、レンチウイルスベクターを用いた因子の増減によって、フィードバック検証を行う。

4. 研究成果

活性化ミクログリアからネガティブフィードバック因子として放出される抗炎症性サイトカイン interleukin-19 (IL-19) を同定し、SOD1 Tg マウスを用いて検討したところ、IL-19 欠損下では運動麻痺症状の軽減を認めた。マウス腰髄および初代培養を用いた解析によって、IL-19 がミクログリアやアストロサイトからの tissue necrosis factor- (TNF-) 放出を増加させ、TNF- のオートクライン/パラクライン作用によって、アストロサイトからの glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) の放出を惹起させることで、SOD1 Tg マウスの症状改善に寄与していることを見出した。(Mol Brain 14:74 2021)。さらに、免疫性神経疾患モデルとして実験的自己免疫性脳脊髄炎マウス (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) を用いて、IL-19 欠損下における、ミクログリアとリンパ球連関を検討したところ、IL-19 欠損下での症状の著明な増悪と、IL-19 補充による症状の有意な軽減を認めた。Ex vivo および初代培養を用いた in vitro 解析によって、IL-19 がミクログリアによる抗原提示能の抑制を介して、Th1 細胞・Th17 細胞による自己免疫および神経炎症を抑制することを解明した (Front Immunol. 12:615898, 2021) 以上から、IL-19 は、神経免疫疾患や神経変性疾患といった病態の違いに応じて、神経保護作用・神経障害作用の二面性を示しうることを明らかにした。

さらに、神経変性疾患の病態形成におけるミクログリアを含む単球系細胞の役割を解明するため、組織マクロファージと循環マクロファージを各々緑色と赤色で生体内分別可能な ALS モデルマウス (CX3CR1GFP/CCR2RFP/SOD1 Tg マウス) を世界で初めて作出した。そして本マウスを用

いて ALS の病態進行に中枢神経常在マクロファージであるミクログリアの関与のみならず、骨髄由来の循環マクロファージが大きく関与する可能性を初めて示した。また同時に免疫組織学的検討を行い、骨髄由来の循環マクロファージに発現する CCR2 は、ALS モデルマウスの病勢進行にともない CX3CR1 陽性ミクログリアや神経細胞にも認められたが、アストロサイトには認めないことを見出した。以上の発見から ALS モデルマウスの病勢進行に伴った CCR2 陽性単球の中枢神経浸潤の増加と、ミクログリアや神経細胞における CCR2 の発現誘導が、神経炎症の悪循環を惹起し、ALS の病態形成の一機序を担っている可能性を示した (Mol Brain. 13:64,2020)。

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 4件）

1. 著者名 Komiya Hiroyasu, Takeuchi Hideyuki (責任著者)、Ogawa Yuki, Hatooka Yuki, Takahashi Keita, Katsumoto Atsuko, Kubota Shun, Nakamura Haruko, Kunii Misako, Tada Mikiko, Doi Hiroshi, Tanaka Fumiaki	4. 巻 13
2. 論文標題 CCR2 is localized in microglia and neurons, as well as infiltrating monocytes, in the lumbar spinal cord of ALS mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00607-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katsumoto Atsuko, Takeuchi Hideyuki (責任著者)、Tanaka Fumiaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Tau Pathology in Chronic Traumatic Encephalopathy and Alzheimer's Disease: Similarities and Differences	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2019.00980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horiuchi Hiroshi, Parajuli Bijay, Komiya Hiroyasu, Ogawa Yuki, Jin Shijie, Takahashi Keita, Azuma Yasu-Taka, Tanaka Fumiaki, Suzumura Akio, Takeuchi Hideyuki (責任著者)	4. 巻 12
2. 論文標題 Interleukin-19 Abrogates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Attenuating Antigen-Presenting Cell Activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 615898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.615898	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Komiya Hiroyasu, Takeuchi Hideyuki (責任著者)、Ogawa Yuki, Suzuki Kosuke, Ogasawara Akihiro, Takahashi Keita, Azuma Yasu-Taka, Doi Hiroshi, Tanaka Fumiaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Ablation of interleukin-19 improves motor function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00785-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹内英之
2. 発表標題 シンポジウム「神経免疫疾患の病態解明への多面的アプローチ」・グリア細胞からのアプローチ.
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内英之
2. 発表標題 Gap junction/hemichannel blockers ameliorate a mouse model of neuropathic pain.
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 竹内英之
2. 発表標題 日本神経学会 / 日本神経化学会ジョイントシンポジウム「免疫細胞とグリアの相互作用からみた神経疾患の病態」・グリアを標的とした神経疾患の治療法開発
3. 学会等名 第61回日本神経化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内英之
2. 発表標題 シンポジウム「神経免疫と認知症・精神疾患」・神経免疫と精神・神経疾患
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020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	土井 宏 (DOI Hiroshi) (10326035)	横浜市立大学・医学部・准教授 (22701)	
研究分担者	田中 章景 (TANAKA Fumiaki) (30378012)	横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701)	

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
---------	---------