

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14851

研究課題名（和文）二次進行型多発性硬化症におけるミクログリアの細胞浸潤制御機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of immune cell infiltration caused by microglia in secondary progressive multiple sclerosis

研究代表者

田辺 章悟（Tanabe, Shogo）

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 神経薬理研究部・室長

研究者番号：40772166

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：二次進行型多発性硬化症（Secondary Progressive Multiple Sclerosis: SPMS）は進行性の四肢の麻痺、視覚障害を主徴とする中枢神経系の自己免疫疾患である。本研究では、SPMSにおける中枢神経系の免疫系細胞であるミクログリアの役割の解明に取り組んだ。SPMSモデル動物からミクログリアを除去すると、二次進行の増悪や浸潤する免疫系細胞が増加、特にT細胞の過剰な活性化が観察された。以上の結果から、ミクログリアは炎症性T細胞の増殖を抑制することで二次進行を抑制していることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにSPMSに対する治療法は確立されておらず、その病態メカニズムも不明な点が多かった。他の脳神経疾患においてはミクログリアは炎症を増悪する細胞として知られていた。しかし、SPMSにおいては、ミクログリアはT細胞の活性化を妨げることで二次進行を抑制する機能があることがわかった。ミクログリアは炎症を増悪するのみでなく、病態によっては炎症を抑制することもあることが明らかになり、学術的に意義深い知見であると考えられる。ミクログリアにより炎症抑制の分子メカニズムが解明されることで、SPMSの二次進行を抑制する新規治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Secondary progressive multiple sclerosis (SPMS) is a progressive autoimmune disease characterized by limbs deficits and visual problems. In this study, we investigated the role of microglia, which are immune cells in the central nervous system, in SPMS pathology. After depletion of microglia in SPMS model mice, progressive motor deficits were exacerbated, and the number of immune cells infiltrating to the spinal cord increased. In addition, T cells in the spinal cord were activated after microglia depletion in SPMS model mice. These results suggest that microglia play crucial roles in inhibiting the secondary progression by suppressing the activation of inflammatory T cells in SPMS model mice.

研究分野：分子神経科学

キーワード：二次進行型多発性硬化症 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

多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS)は四肢の麻痺、視覚障害を主徴とする中枢神経系の自己免疫疾患である。中枢神経系の各所に炎症性の病変が形成され、脱髄や軸索変性を来すことで神経症状を呈する。MS は神経症状の再発と寛解を繰り返す特徴があるが、約半数の患者は 10 年以内に進行性の経過を辿る二次進行性多発性硬化症 (Secondary progressive multiple sclerosis: SPMS)に移行する。再発寛解型の MS には免疫抑制剤が再発予防の目的で使われているが、SPMS に対しては治療効果を持たず、他に有効な治療薬も開発されていない。以上のような問題点から、SPMS の二次進行の病態解明と新規治療法の開発が求められている。

中枢神経系に常在する免疫系細胞であるミクログリアは、末梢の免疫系細胞と密接に相互作用することで様々な病態形成に関与する。MS では、多量の免疫系細胞が末梢から中枢神経系に浸潤することから、ミクログリア-末梢免疫系細胞の相互連関という形で病態に関与していると考えられるが、SPMS におけるミクログリアの役割は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、SPMS のモデル動物を用いて二次進行期におけるミクログリアの役割とその作用メカニズムを解明する。SPMS モデル動物の二次進行の症状経過、浸潤する免疫系細胞の量やサブタイプを解析し、ミクログリアが二次進行に与える影響とそのメカニズムを解析する。

3. 研究の方法

SPMS のモデル動物として、NOD (Non-Obese Diabetic)バックグラウンドのマウスにミエリンタンパク質である MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) を免疫して二次進行性の脳脊髄炎を誘導した (NOD-EAE: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis)。ミクログリアは、PLX3397 と呼ばれる CSF-1R 阻害剤を含んだ餌を二次進行期に給餌して除去し、病態の経過を観察した。浸潤する免疫系細胞の量とサブタイプをフローサイトメトリーで解析するとともに、脱髄や軸索変性への影響を組織学的に解析した。

4. 研究成果

(1) PLX3397 投与時の二次進行の症状経過

NOD マウスに対して EAE を誘導し、急性炎症が寛解する誘導 20 日後から PLX3397 を給餌し、ミクログリアを除去して、症状経過を 60 日間に渡って観察した。その結果、PLX3397 を給餌した NOD-EAE マウスでは、二次進行の著しい劇症化が観察された。また、誘導 60 日までの生存率も増悪する結果が得られた。その一方で、二次進行が発症する日数に変化は観察されなかった。これらの結果から、ミクログリアは NOD-EAE の二次進行を抑制する役割を担っていることが示唆される。

(2) 二次進行における組織学的な解析

ミクログリアが二次進行を抑制するメカニズムを解明するために組織学的な解析を行った。脳脊髄炎が増悪する際には、炎症性免疫系細胞の浸潤、脱髄、軸索変性が作用点として考えられる。NOD-EAE の誘導 30 日目の脊髄からヘマトキシリン・エオジン染色を行ったところ、免疫系細胞の大幅な浸潤が観察された。また、誘導 40 日目における脊髄から、免疫組織化学法で脱髄と軸索変性を観察した。PLX3397 によって MBP 抗体で染色される髄鞘化領域が減少し、SMI-32 で染色される変性した軸索数も増加が見られた。一方で、血中の炎症性サイトカインの放出量や脾臓、リンパ節に存在する免疫系細胞数に変化は観察されなかったことから、PLX3397 が全身性の免疫応答に直接影響した可能性は低い。これらの結果から、ミクログリアは免疫系細胞の中枢神経系への浸潤を妨げることで脱髄、軸索変性を抑制し、二次進行を抑制する機能を持つことが示唆される。

(3) ミクログリアによる血液脳関門の保護効果

ミクログリアが免疫系細胞の浸潤を抑制するメカニズムとして、ミクログリアが血液脳関門の保護に関わっている可能性を検証した。血中に青色色素であるエバンスブルーを注入し、脊髄に漏出した色素量を定量した。しかし、PLX3397 を給餌した NOD-EAE 群と比較して差は観察されなかった。以上の結果から、ミクログリアは血液脳関門を保護することで免疫系細胞の浸潤を抑制しているのではないと考えられる。

(4) ミクログリアによる T 細胞の分化と増殖促進効果

PLX3397 によって脊髄に浸潤する免疫細胞の種類を同定するため、フローサイトメトリーによる細胞同定解析を行った。PLX3397 投与群では、CD4 陽性 T 細胞の浸潤量が大きく増加するという結果が得られた。一方、CD8 陽性 T 細胞、CD45R 陽性 B 細胞、CD11b 陽性マクロファージ量に大きな変化は観察されなかった。ミクログリアには血液脳関門の保護効果はないことから、ミクログリアは T 細胞が脊髄に浸潤した後にその機能を制御している可能性が考えられる。脊髄の組織学的な解析から、Ki67 で染色される増殖性の T 細胞の割合が PLX3397 で増加していることが明らかとなった。更に、脊髄から T 細胞を採取し、MOG に対する免疫応答性を BrdU の取り込み実験で検証したところ、PLX3397 投与群から採取した T 細胞は免疫応答性が高いと

いう結果が得られた。これらの結果から、ミクログリアは CD4 陽性 T 細胞の増殖性を抑制することで NOD-EAE の二次進行を抑制することが示唆される。CD4 陽性 T 細胞はインターフェロン γ を産生する Th1, IL-17A を産生する Th17, 免疫応答を抑制する制御性 T 細胞などのサブタイプに分類される。脊髄に浸潤した CD4 陽性 T 細胞のサブタイプを同定するため、フローサイトメトリーにより検証したところ、PLX3397 を投与した NOD-EAE マウスでは、制御性 T 細胞の割合が減少していた。以上の結果から、ミクログリアは炎症性 T 細胞の増殖を抑制するとともに、制御性 T 細胞の分化を促進することで二次進行を抑制することが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanabe, S., Saitoh, S., Miyajima, H., Itokazu, T., Yamashita, T.	4. 巻 67
2. 論文標題 Microglia suppress the secondary progression of autoimmune encephalomyelitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 1694-1704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23640.	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 Yamamiya, M., Tanabe, S., Muramatsu, R.	4. 巻 513
2. 論文標題 Microglia promote the proliferation of neural precursor cells by secreting osteopontin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 841-845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.076	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 Tanabe, S., Yamashita, T.	4. 巻 139
2. 論文標題 B lymphocytes: crucial contributors to brain development and neurological diseases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 37-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2018.07.002.	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 Tanabe, S., Yamashita, T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Function of lymphocytes in oligodendrocyte development.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscientist	6. 最初と最後の頁 74-86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1073858419834221.	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 Tanabe, S., Fujita, Y., Ikuma, K., Yamashita, T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Inhibiting repulsive guidance molecule A suppresses secondary progression in mouse models of multiple sclerosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 1061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-018-1118-4	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 Tanabe, S., Yamashita, T.	4. 巻 30
2. 論文標題 The role of immune cells in brain development and neurodevelopmental diseases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 437-444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy041	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4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田辺章悟
2. 発表標題 脳内免疫システムによる脳発達制御機構とその破綻
3. 学会等名 第1回PHILOSOPHY
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田辺章悟
2. 発表標題 Neuroimmune system associated with brain development and degeneration.
3. 学会等名 Neuro2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田辺章悟
2. 発表標題 脳内免疫システムによる脳発達の制御機構
3. 学会等名 東京都医学総合研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田辺章悟、山宮美和子、村松里衣子
2. 発表標題 Microglia promote the proliferation of neural precursor cells by secreting osteopontin
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 田辺章悟	4. 発行年 2020年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 2
3. 書名 Clinical Neuroscience	

1. 著者名 田辺章悟、村松里衣子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本薬理学会	5. 総ページ数 1
3. 書名 日本薬理学雑誌	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----