

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B)（特設分野研究）

研究期間：2018～2021

課題番号：18KT0023

研究課題名（和文）臓器連関に基づく脳血管傷害の予測と医療応用

研究課題名（英文）Identification of biomaker of vascular barrier dysruption

研究代表者

村松 里衣子（Muramatsu, Rieko）

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・部長

研究者番号：90536880

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,300,000円

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症は重篤な神経変性を呈する指定難病である。現時点で認可されている薬剤の効果は限定的で、病態形成の理解とそれに立脚する新しい薬剤の開発が切望されている。本研究では、病巣以外の環境変化が神経変性を誘導するという新しいメカニズムの有無を検証するため、病態モデルマウスを用いて、特に血管系の破綻と血中に備わる疾患関連分子の探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は筋萎縮性側索硬化症の病態形成に病巣より遠位の臓器が関わることを示すもので、見出された神経変性作用をもつ分子は、薬剤開発のターゲット分子になるポテンシャルを有する。本研究では筋萎縮性側索硬化症を対象として解析を進めるが、確立するコンセプトは神経免疫が関連する疾患や末梢性疾患の理解につながるもので、幅広い疾患に対して新しい方向性を提示するものである。

研究成果の概要（英文）：This study showed that the systemic environment regulates disease progression in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We identified the key factor that promotes neurodegeneration in ALS mice.

研究分野：神経科学

キーワード：血液脳関門 神経細胞 運動機能

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症は、上位および下位の運動ニューロンが進行性に変性する神経疾患であり、筋力の低下や萎縮を主徴として、認知機能障害など様々な症状を呈する指定難病である。治療薬として認可された薬剤はあるものの、数カ月での延命効果にとどまり、さらなる治療薬の開発が切望されている。筋萎縮性側索硬化症には家族性と孤発性があるが、家族性に関してはその病態関連遺伝子が複数同定され、原因遺伝子の中でも、家族性筋萎縮性側索硬化症患者で最も変異が多いといわれる Cu/Zn superoxidedismutase (SOD1) に関しては、SOD1 遺伝子の変異をマウスに導入することでヒトの筋萎縮性側索硬化症の病態を反映することから、病態解明研究に広く用いられている。特に、筋萎縮性側索硬化症が運動ニューロン変性疾患であることから、運動ニューロン内因性および運動ニューロンと周辺細胞(グリア細胞)との相互作用に着目し、その原因遺伝子による変性誘導のメカニズムの解析が進んでいる。

筋萎縮性側索硬化症を含め神経疾患の研究は、病態の本体となる神経系における変容に着目した研究が主流であるが、近年の脳腸相関研究などから、神経系の機能変化が神経系以外のシステムにより強力に制御される機序が備わることがわかってきた。研究代表者らもこれまでに中枢神経傷害による神経回路の破綻や自然修復を対象として、神経系以外のシステムの関わりを検討した。特に、通常は脳内に流入しない末梢臓器由来の液性因子が、中枢神経傷害による血管系の破綻に伴い脳内に流入する点に着目し、流入する分子の一部に中枢神経系細胞に直接作用し、神経回路の修復を促進させる作用を発揮することを見出してきた(Kuroda et al, *J Clin Invest*, 2017; Hamaguchi et al, *eLife*, 2019; Ito et al, *Nat Aging*, 2021)。この研究を進めていく中で、末梢臓器由来の液性因子が中枢神経系に到達する際には、まず中枢神経系の血管の強固なバリア機能が破綻する必要があると考えた。

筋萎縮性側索硬化症を含め多くの中枢神経疾患では血管のバリア機能の破綻が検出され、SOD1 変異マウスにおいては組織学的に神経変性が検出されるより前の段階で、血管透過性の著しい亢進が検出される(Zhong et al, *Nat Neurosci*, 2008)。血管の透過性制御は、一般的に内因性の機序と外因性の機序から成り立つため、SOD1 マウスで血管を構成する血管内皮細胞の自律的な機能変化かあるいは周囲環境による作用によるものか、2つの可能性が考えられる。そこで本研究では、SOD1 変異マウスで認められる血管のバリア機能の亢進のメカニズムについて検討することを一つの目標とした。さらに、血管のバリア機能の亢進に伴い血液が病巣に流入することでどのように神経変性が誘導されるか検討することで、血中の神経変性分子の同定を試みた。

2. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスを用いて、同マウスにおける血管の透過性亢進の外因性の機序の有無を検討した。特に筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子の発現が病巣以外でも幅広く検出されること、また一般的に特定の分子の発現は二次的に様々な分子の発現に影響することを踏まえ、病巣以外の組織に由来する液性因子の寄与を想定し、その可能性を検討した。また、血管透過性亢進に伴う神経変性のメカニズムとして、透過性が亢進した血管より流入する分子の中に変性を誘導するものが含まれると想定し、その分子の同定とその発現制御のメカニズムを探索することを目的とした。

3. 研究の方法

コントロールマウスとして C57BL/6J マウス(日本エスエルシー)を、筋萎縮性側索硬化症モデルマウスとして SOD1^{G93A} マウス(Jackson Laboratory より購入)を用いた。SOD1^{G93A} マウスの全身環境が野生型マウスに与える作用を検討するため、コントロールマウスと SOD1^{G93A} をパラバイオーシスさせた。パラバイオーシスの条件検討のため、コントロールマウスおよび Green Fluorescent Protein (GFP)(C57BL/6-Tg[CAG-EGFP]、日本エスエルシー)を用いてコントロール側で循環する GFP 陽性細胞の比率の経時変化を検討し、パラバイオーシス 2 週間後にキメリズムが成立することを確認した。コントロールと SOD1^{G93A} の同種および異種結合させた個体における脊髄での血管透過性を評価するため、各マウスに蛍光色素を付加したカペオリンを尾静脈投与し、還流固定した個体から脊髄組織を摘出し、凍結切片を作成して Isolectin 4 で染色し、血管と漏れ出る血液を可視化した。

血液に含まれ血管系および神経系に影響する分子を網羅的に探索するため、SOD1^{G93A} マウスおよび同週齢の野生型マウスから血漿を回収し、血中の代謝物およびサイトカイン量を網羅的に計測した。SOD1^{G93A} マウスは、症状発症前、発症直後、症状進行後の 3 つの群よりサンプルを調整した。メタボローム解析には MetaboAnalyst を用いた。サイトカイン発現は発現比率と P 値を基にした分子の選定を行った。選抜した分子と SOD1 遺伝子の遺伝子間相互作用を解析するため、選抜した分子の発現を制御する転写因子を ChiP-Atlas を基に探索し、in vitro で当該転写因子による選抜した分子の発現への作用を検討した。

本研究は所属機関の各種委員会による承認を受けたのちに実施した。

4. 研究成果

SOD1^{G93A} マウスの全身性的環境変化が野生型における血管透過性の亢進に関わるか検討するため、8週齢の野生型マウスとSOD1^{G93A} マウスを用いて同種および異種結合を施した。その後5週間結合を継続し、脊髄における血管透過性を評価した(図1)。通常、コントロールマウスでは尾静注した蛍光色素は脊髄でほぼ検出されないが、SOD1マウスでは蛍光色素が脊髄の実質で検出され、SOD1マウスでは脊髄の血管の透過性が高まっている様子が観察された。また、異種結合したマウスにおいては、コントロールおよびSOD1マウスのどちらにおいても脊髄実質で蛍光色素が検出された。このことから、SOD1マウスの循環系には、野生型マウスの脊髄の血管透過性も亢進させる機序が備わることが示唆された。

循環系の暴露による影響には、細胞成分と液性成分の2つの機序が考えられる。細胞成分は循環中の免疫系細胞であるが、SOD1マウスは病態形成の初期で旺盛な炎症性細胞の浸潤は認められず、血管透過性の変化には液性因子が関わる可能性を考えた。そこで、SOD1マウスおよび野生型マウスの血中に含まれる分子を比較するため、代謝物とサイトカインの発現を網羅的に比較した。一部の代謝物およびサイトカインの含有量に群間の差が認められ、それは症状が現れる前から持続するものであった。このことから、SOD1マウスの循環系成分は症状が現れるよりかなり早い段階で、コントロールと異なることが示唆された。また、変動した代謝物を対象としてKEGG pathway解析を行った

結果、β-alanine経路など複数の経路の変動が検出された。サイトカイン含有量についても同様の解析を行い、SOD1マウスの血中で有意に含有量が多いあるいは少ない分子が複数同定された。正常と異なる血中レベルを示す分子が、SOD1マウスの変性に寄与する可能性を検討するため、候補分子の働きを抑制する処置をSOD1マウスに施し、神経変性への作用を検討した。その結果、一部の分子(特許出願準備中)に関しては、その機能を中和する抗体を末梢から投与した個体で、神経筋接合部の変性が抑制された。このことから、SOD1マウスの血液に豊富な分子の働きにより、神経変性が誘導される機序が存在することが示唆された。当該分子の発現の制御機構を探索するため、その分子のプロモーター領域に結合する転写因子をデータベースより探索し、5つの候補分子を見出した。各転写因子とSOD1遺伝子をChip assayで検討し、候補となる転写因子としてNrf2の関与が示された。そこでNrf2が同定した神経変性誘導因子の発現を制御するかをin vitroで検討し、Nrf2の活性化により当該分子の発現が抑制されることがin vitroで示された。

続いて、当該神経変性分子の生体内での発現様式をSOD1マウスを用いて検討した。全身の臓器を摘出し、各臓器におけるmRNAレベルを計測した。その結果、各臓器のコントロール群と比較し、SOD1マウスの小腸で当該遺伝子の発現が高い様子が検出された。腸組織における免疫染色の結果、特に腸の血管構造物で顕著に当該神経変性分子の発現が豊富である様子が観察された。これらの結果から、SOD1変異による腸血管の機能変化が、神経変性分子の発現を誘導し、循環を介して神経筋接合部の変性を導く可能性を推察した。

見出したリガンドは、インテグリン経路を介して受けて側の細胞の機能を調節することが、免疫系細胞を用いた検討から示されている。そこで当該神経変性分子の作用にもインテグリン経路を介した可能性を考え、当該受容体を発現する変性部位周囲の細胞を探索したところ、一部のマクロファージで受容体発現が認められた。マクロファージは栄養因子を共有することで神経筋接合部の恒常性を維持すると考えられており、見出した神経変性因子はマクロファージの機能を調節することで神経変性を誘導すると推察された。今後、見出した神経変性誘導分子の作用

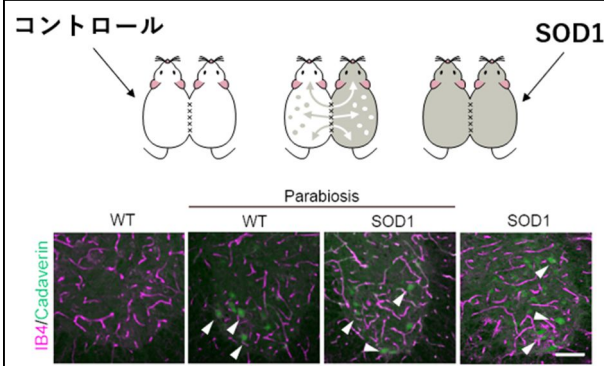


図1：脊髄における血管透過性の亢進
 上段に示す組み合わせで結合させた個体に対して、蛍光色素(Alexa fluor 488-Cadaverin、緑)を尾静注し、注入2時間後に組織を摘出した。SOD1マウスと結合されたコントロールマウス(WT)では、通常は認められない蛍光色素が検出される。矢頭：脊髄実質に漏出した蛍光色素。IB4: Isolectin B4(血管マーカー、紫)。Scale bar, 100 μm.

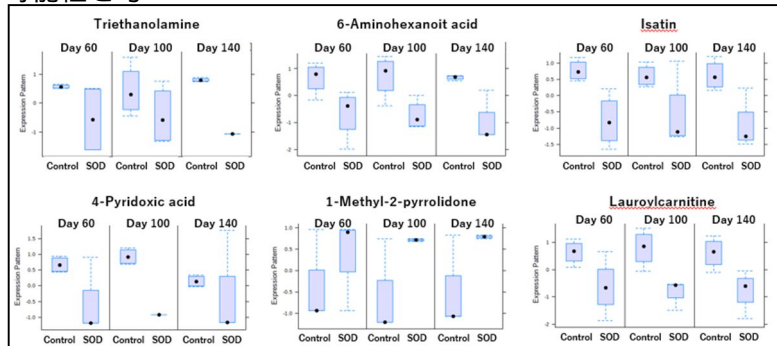


図2：変動した血中代謝物の抜粋
 SOD1マウスの症状発症前(60日齢)、発症直後(100日齢)、進行期(140日齢)の血漿のメタボローム解析を行い、群間で有意な差(P<0.05)が検出された代謝物を示す。

機序として、変性部位のマクロファージの関与とそのメカニズムを解明することで、筋萎縮性側索硬化症における全身性の病態形成機構の理解を深めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamiya Miwako, Tanabe Shogo, Muramatsu Rieko	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 Takarada-Iemata Mika, Westenskow Peter D., Muramatsu Rieko	4. 巻 129
2. 論文標題 Neurovascular interaction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104506 ~ 104506
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2019.104506	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 該当する

1. 著者名 Yamamiya Miwako, Tanabe Shogo, Muramatsu Rieko	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Rieko Muramatsu
2. 発表標題 Systemic environment regulates central nervous system homeostasis.
3. 学会等名 第43会日本分子生物学会ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村松里衣子
2. 発表標題 脳神経組織のホメオスタシス維持を担う生体システム
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村松里衣子
2. 発表標題 血管系を介した脳神経回路の再生制御
3. 学会等名 次世代薬理学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Muramatsu Rieko
2. 発表標題 Systemic milieu regulates central nervous system regeneration
3. 学会等名 ONO Neurology Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村松里衣子
2. 発表標題 脳の組織修復を担う生体システム
3. 学会等名 長崎大学大学院医歯薬総合研究科大学院セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019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
---------	---------