

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07540

研究課題名(和文) ミクログリアに着目したライフスパン縦断的神経免疫反応におけるDOCK2の機能解析

研究課題名(英文) Microglia based analysis of DOCK2 in longitudinal neuro-immune response through life span

研究代表者

坂田 大治 (SAKATA, Daiji)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：70456870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は免疫細胞特異的な細胞骨格制御分子であるDOCK2に着目し、脳内ミクログリアの生理機能の分子基盤を明らかにすることであり、各ライフステージの段階に応じて異なる役割を演じるミクログリアを解析するため、ライフステージ早期とライフステージ後期に分け、それぞれMIAによる自閉症モデル(妊娠中に感染などで母体の免疫系が活性化すると、産仔では脳の発達異常が起こり自閉症様の表現型を示すことが知られる)とアルツハイマー病モデルを用いた研究を行なったが、新型コロナウイルス感染症の流行に伴う研究の中断など不測の事態も起こり、研究実施期間内に当初予定していたような成果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミクログリアは脳内免疫細胞の一種とされるがその生理的もしくは病態生理的な役割は十分に解明されていない。ミクログリアは脳内でダイナミックな動きをすることで、脳内異物の除去などを行い、脳内の恒常性維持に重要な役割を果たすと考えられている。ミクログリアのダイナミックな動きを制御する分子の一つがDOCK2だと考えられるが、その役割は明らかでない。自閉症やアルツハイマー病は、いずれも脳に異常をきたす病気であるが、このような病気にもミクログリアが関与すると考えられ、このような疾患でのミクログリアの役割が明らかとなれば、学術的にも社会的にも大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify a physiological role of brain microglia focused on immune cell specific cytoskeleton regulatory molecule, DOCK2. To analyze microglia which has different role in different life stage, I divided timing of analysis into two stage, early life stage and late life stage, and analyzed role of microglia in each stage by applying MIA (Maternal Immune Activation) and Alzheimer's disease mouse model, respectively. However, unfortunately, I didn't have significant output within the planning period because of unexpected situation such as interrupt of this study due to pandemic of COVID-19.

研究分野：神経免疫学

キーワード：ミクログリア MIA アルツハイマーモデル 妊娠免疫 神経免疫 DOCK2 自閉症 炎症反応

## 1. 研究開始当初の背景

DOCK2 は免疫細胞特異的に発現する細胞骨格制御分子 ( Rac 活性化因子 ) であり、これまでリンパ球や樹状細胞などの遊走や活性化の制御に中心的な役割を果たすことが示されている。ミクログリアは脳内免疫細胞の一種と位置付けられ、脳の発達初期段階では、過剰に作られた神経シナプスを刈り込む ( pruning ) ことで正常な神経回路の構築に寄与する。一方で、ライフステージ後期では、加齢に伴い脳内に蓄積したアミロイドβ ( Aβ ) などの異常タンパク質や死細胞の除去を行うことで恒常性の維持に関与する。DOCK2 はミクログリアにも発現が認められるが、その役割については明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

前述のように、ミクログリアはライフステージの様々な場面で、多彩な役割を果たしているが、そのような役割を果たすためには、細胞骨格再編成を伴うダイナミックな動態制御が必要であると考えられる。DOCK2 は免疫細胞特異的に発現する細胞骨格制御分子 ( Rac 活性化因子 ) であり、ミクログリアにも発現が認められるが、その役割については明らかではなかった。本研究の目的は、主に DOCK2 分子に着目し、ライフステージ早期と後期の各ステージ毎に多彩な役割を果たすミクログリアの生理機能について、その分子基盤を明らかにすることであった。

## 3. 研究の方法

本研究の目的は免疫細胞特異的な細胞骨格制御分子である DOCK2 に着目して、脳内ミクログリアの生理機能の分子基盤を明らかにすることであったが、ミクログリアは各ライフステージの段階や環境に応じて異なる役割を演じるため、ライフステージの早期と後期の二つのステージに分けて解析を行うこととした。ライフステージ早期については、MIA ( Maternal Immune Activation ) による自閉症モデル ( 妊娠中に感染や細菌・ウイルス成分への曝露などが起こることによって母体の免疫系が活性化すると、産仔では脳の発達異常が起こり自閉症様の表現型を示すことが知られる ) を用い、ライフステージ後期についてはアルツハイマー病 ( AD: Alzheimer's Disease ) モデルを用いることで、それぞれのステージのミクログリアの生理機能における DOCK2 の役割を明らかにしようとした。特に、自閉症モデルでは自閉症発症にミクログリアの関与が示唆されているものの ( *Nature commun* 5:5748, 2014 ) 詳細は明らかではなく、この点を解明できれば、神経-免疫クロストークの研究分野に新たな知見をもたらせるものと考えた。AD 病態でのミクログリアの役割については、すでに複数の報告があるが、モデルによって病態を抑制するとともに亢進させるとも報告され、統合的な理解には至っていない。本研究では、研究開始当初もっともヒトの病態を反映するモデルマウスの一つとされる APP NL-G-F マウス ( ヒト化した APP ( Amyloid precursor protein ) 遺伝子に家族性 AD 患者に見られる 2 種類の遺伝子変異を導入したマウス、*Nat. Neurosci* 17:661, 2014 ) を用いてミクログリアでの DOCK2 の役割について解析することとした。

具体的には、野生型及び DOCK2 欠損マウスを上記二つのモデル ( MIA 及び AD モデル ) に供し、行動実験 ( MIA モデルに関しては、USV ( 超音波発声 )、ビー玉隠し試験、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、3 チャンバーを用いたソーシャルインタラクション試験、プレパルスインヒビション試験、等の評価、AD モデルに関しては、バーンズ迷路試験、放射状迷路試験、新規物質認識試験、等の評価 ) を行うことで個体レベルでの DOCK2 の役割について検討

することとした。

また、それぞれのモデルに供した野生型及び DOCK2 欠損マウスの脳組織を取り免疫染色等を行うことで脳の構造異常や発達異常の有無を評価すると共に、脳内ミクログリアを MACS 等により分離し、フローサイトメトリーや real-time PCR 等の手法により、その表現型を解析することで細胞レベルでの DOCK2 の役割について明らかにしようとした。

#### 4 . 研究成果

ライフステージ早期については、DOCK2 (-/-または+/+)の雄マウスと DOCK2(+/, +/+, または -/-)の各雌マウスとを交配させ、得られた妊娠雌マウスに PolyI:C や CpG といった異なる TLR (Toll-like receptor)リガンドを投与することにより MIA を惹起し、その後生まれてきた各遺伝子型の仔マウスの表現型について、前述の各種行動解析 (USV (超音波発声)、ビー玉隠し試験、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、3 チャンバーを用いたソーシャルインタラクション試験、プレパルスインヒビション試験、等の評価)を行うことにより評価した。行動解析については、PolyI:C 及び CpG の投与量や投与タイミング等、いくつかの条件検討を行い、ビー玉隠しテストやオープンフィールドテストで DOCK2 の遺伝子型によって表現型に差が出るなど実験データも蓄積されていたが、実験系によっては実験条件によって全く逆の結果が出るなど、統一的な結果は得られていない。また DOCK2<sup>+/+</sup>と DOCK2<sup>-/-</sup>マウスとで自閉症様表現型を示すマウスと示さないマウスそれぞれから脳内ミクログリアを分離し、フローサイトメトリーによる表現型解析を行ったが、現在までのところ、これらのサンプル間で有意な差が見られるような結果は得られていない。さらに、それぞれのマウスから脳組織を取り、免疫染色を行うことで脳の構造異常や発達異常の有無を評価したが、2群のマウス間で明確な違いは認められていない。

ライフステージ後期についてはアルツハイマー病(AD : Alzheimer's Disease)モデルを用いた解析を行うため、AD モデルマウス(APPNL-GF マウス)と DOCK2<sup>-/-</sup>マウスとの掛け合わせを進め、研究実施期間の中盤以降に、概ね AD 症状を発症するとされる月齢のマウスが得られ始めた。これらのマウスを用いて認知・学習行動を解析するための行動実験(バーンズ迷路試験、放射状迷路試験、新規物質認識試験、等の評価)の立ち上げを行い、実験系は概ね動くようになったが、その後、研究代表者の異動等があり、十分なデータを得るに至っていない。

また、本研究については、実施期間の途中で COVID-19 の感染拡大に伴う研究の中断(実験そのものの中断や飼育マウス数の削減等)等があり、全体的に研究が遅れることとなった。

## 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 6件）

1. 著者名 Matsubara Keisuke, Kunimura Kazufumi, Yamane Nana, Aihara Ryosuke, Sakurai Tetsuya, Sakata Daiji, Uruno Takehito, Fukui Yoshinori	4. 巻 559
2. 論文標題 DOCK8 deficiency causes a skewing to type 2 immunity in the gut with expansion of group 2 innate lymphoid cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 135 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.04.094	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 Kamikaseda Yasuhisa, Uruno Takehito, Kunimura Kazufumi, Harada Akihito, Saiki Kuniko, Oisaki Kounosuke, Sakata Daiji, Nakahara Takeshi, Kido-Nakahara Makiko, Kanai Motomu, Nakamura Seiji, Ohkawa Yasuyuki, Furue Masutaka, Fukui Yoshinori	4. 巻 148
2. 論文標題 Targeted inhibition of EPAS1-driven IL-31 production by a small-molecule compound	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 633 ~ 638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2021.03.029	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 Tatsuguchi Takaaki, Uruno Takehito, Sugiura Yuki, Sakata Daiji, Izumi Yoshihiro, Sakurai Tetsuya, Hattori Yuko, Oki Eiji, Kubota Naoto, Nishimoto Koshiro, Oyama Masafumi, Kunimura Kazufumi, Ohki Takuto, Bamba Takeshi, Tahara Hideaki, Sakamoto Michiie, Nakamura Masafumi, Suematsu Makoto, Fukui Yoshinori	4. 巻 -
2. 論文標題 Cancer-derived cholesterol sulfate is a key mediator to prevent tumor infiltration by effector T cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxac002	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 Tatsuguchi T, Uruno T, Sugiura Y, Oisaki K, Takaya D, Sakata D, Izumi Y, Togo T, Hattori Y, Kunimura K, Sakurai T, Honma T, Bamba T, Nakamura M, Kanai M, Suematsu M, Fukui Y.	4. 巻 8:609
2. 論文標題 Pharmacological intervention of cholesterol sulfate-mediated T cell exclusion promotes antitumor immunity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 183-188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.04.035.	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 Kunimura K, Akiyoshi S, Uruno T, Matsubara K, Sakata D, Morino K, Hirotsani K, Fukui Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 DOCK2 regulates MRGPRX2/B2-mediated mast cell degranulation and drug-induced anaphylaxis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2023.01.029.	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 Morino K, Kunimura K, Sugiura Y, Izumi Y, Matsubara K, Akiyoshi S, Maeda R, Hirotsani K, Sakata D, Mizuno S, Takahashi S, Bamba T, Uruno T, Fukui Y.	4. 巻 17;14:
2. 論文標題 Cholesterol sulfate limits neutrophil recruitment and gut inflammation during mucosal injury.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 1131146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2023.1131146.	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Daiji Sakata, Yusuke Nomoto, Masahiro Yamamoto, Chisa Nakashima, Kenji Kabashima, Hiroki Yoshida, Takuro Kanekura and Hiromitsu Hara
2. 発表標題 Suppression of itch sensation by IL-27
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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