

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07465

研究課題名（和文）単球系細胞から捉えた全身炎症による神経変性疾患の病態進展の機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of neurodegenerative disease progression by systemic inflammation

研究代表者

竹内 英之（Takeuchi, Hideyuki）

横浜市立大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：30362213

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）：組織マクロファージと循環マクロファージを各々緑色蛍光と赤色蛍光で生体内弁別可能とするALSモデルマウスCX3CR1-GFP/CCR2-RFP/SOD1 Tgマウスを作出し、全身炎症に伴う病勢進行の機序を解析したところ、病勢進行に伴ったCCR2陽性単球の中枢神経浸潤の増加を認めた。全身炎症に伴う循環血中のCCR2陽性単球が中枢神経内へ浸潤することにより、中枢神経系の恒常性破綻を来とし、神経炎症の悪循環を介して神経変性の病態を促進させている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患が外傷や新型コロナ罹患を含む感染症などの全身炎症によって加速度的に進行することはよく知られているが、免疫系を介した詳細な機序は未解明であった。本研究によって、以上より、全身炎症に伴う循環血中のCCR2陽性単球系細胞の中枢神経浸潤が、中枢神経系の恒常性破綻を来たすことで、神経炎症の悪循環を介した神経変性の病態促進の一機序となり得ることが示唆され、治療ターゲットとしての可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of neurodegenerative disease deterioration associated with systemic inflammation, we generated CX3CR1/CCR2-reporter SOD1 Tg mice that enables distinction between microglia and CNS infiltrating macrophage. We found that systemic inflammation stimuli accelerated the disease progression accompanied by a significant increase in CNS infiltration of CCR2+ macrophage, suggesting that macrophage CNS infiltration leads to CNS environmental deterioration associated with systemic inflammation.

研究分野：神経内科学

キーワード：神経変性疾患 全身炎症 単球系細胞 ミクログリア マクロファージ

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的によく知られており、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想定されてきた。これまでに我々も、末梢における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報告してきた。そこで、神経変性疾患の病態解明においては、神経変性を神経系のみで捉えるのではなく、末梢の免疫系や兩者をつなぐ血液系の多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、病態進展における神経系・免疫系・血液リンパ系の相互連関について、その3者をつなぐ担い手である単球系細胞(循環マクロファージおよび組織マクロファージ)に注目して解明し、神経変性疾患に対する新たな診断・治療法開発への展開を図ることである。

本研究では、組織マクロファージと循環マクロファージを生体内弁別可能な ALS モデルマウスを用いて、反復傷害あるいは炎症刺激を加えた際の病態進展における神経系・免疫系・血液リンパ系の相互連関について、その3者をつなぐ担い手である単球系細胞(循環マクロファージおよび組織マクロファージ)に注目して疾患解明を目指す。

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ことが期待される。

3. 研究の方法

(1) 神経変性疾患における組織マクロファージと循環マクロファージの弁別解析

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(CX3CR1^{GFP} 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(CCR2^{RFP} 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蛍光細胞として、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蛍光細胞として、生体内分別や分離採取が可能となる。神経変性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。我々は、これらのマウスの交配によって、組織マクロファージと循環マクロファージを各々緑色蛍光と赤色蛍光で体内弁別可能な ALS モデルマウスである CX3CR1^{GFP}/CCR2^{RFP}/SOD1 Tg マウスを世界に先駆けて作出した(Komiyama ら, Mol Brain 2020)。CX3CR1^{GFP}/CCR2^{RFP}/SOD1 Tg マウスに対して、発症以降(12週齢以降)での反復炎症刺激(4週毎のリポ多糖あるいは poly(I:C)腹腔内投与)による病態進展と病理学的変化について経時的に解析する。本マウスの発症早期(16週齢)・中期(20週齢)・末期(24週齢)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(緑色蛍光細胞)と組織浸潤マクロファージ(赤色蛍光細胞)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) 単球系細胞由来の恒常性調節因子の同定

前述の結果から、単球系細胞由来の中枢神経系の恒常性を変化させる候補因子を抽出し、*in vitro*および*in vivo*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。

さらに、横浜市立大学附属病院神経内科・脳卒中科において採取・保存された患者血清・髄液(AD・ALS各30例)さらに、患者末梢血マクロファージから作成したミクログリア様 iMG 細胞を用いて、これまでの実験によって同定された候補因子について、病勢に応じた比較検討を行う。

以上の結果をもとに、単球系細胞由来の恒常性制御因子のフィードバック検証と先制医療を可能とする疾患バイオマーカーの同定を図るとともに、神経変性疾患の新たな治療戦略開発への展開へ繋げる。

4 . 研究成果

CX3CR1^{GFP}/CCR2^{RFP}/SOD1Tg マウスに対して、sublethal な投与量での大腸菌由来リポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、poly(I:C)あるいは生理食塩水を、病初期である12週齢から15週齢まで週1回・4週連続投与を行い、臨床経過および経時的な病理学的解析を行った。LPS投与群に比して、poly(I:C)投与群においては、有意な病勢悪化と運動ニューロン減少を認め、脊髄へのCCR2陽性単球系細胞の浸潤増加と相関していた。以上より、全身炎症に伴う循環血中のCCR2陽性単球系細胞の中枢神経浸潤が、中枢神経系の恒常性破綻を来たすことで、神経炎症の悪循環を介した神経変性の病態促進の一機序となり得ることが示唆され、治療ターゲットとしての可能性が示された。

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 5件）

1. 著者名 Kawamoto Yuko, Tada Mikiko, Asano Tetsuya, Nakamura Haruko, Jitsuki-Takahashi Aoi, Makihara Hiroko, Kubota Shun, Hashiguchi Shunta, Kunii Misako, Ohshima Toshio, Goshima Yoshio, Takeuchi Hideyuki, Doi Hiroshi, Nakamura Fumio, Tanaka Fumiaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Phosphorylated CRMP1, axon guidance protein, is a component of spheroids and is involved in axonal pathology in amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 994676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2022.994676	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 Ogasawara Akihiro, Takeuchi Hideyuki, Komiya Hiroyasu, Ogawa Yuki, Nishimura Koki, Kubota Shun, Hashiguchi Shunta, Takahashi Keita, Kunii Misako, Tanaka Kenichi, Tada Mikiko, Doi Hiroshi, Tanaka Fumiaki	4. 巻 184
2. 論文標題 Anti-inflammatory effects of siponimod on astrocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 38~46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2022.08.003	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 Tetsuya, Nakamura Haruko, Kawamoto Yuko, Tada Mikiko, Kimura Yayoi, Takano Hiroshi, Yao Ryoji, Saito Hiroya, Ikeda Takuya, Komiya Hiroyasu, Kubota Shun, Hashiguchi Shunta, Takahashi Keita, Kunii Misako, Tanaka Kenichi, Goshima Yoshio, Nakamura Fumio, Takeuchi Hideyuki, Doi Hiroshi, Tanaka Fumiaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Inhibition of Crmp1 Phosphorylation at Ser522 Ameliorates Motor Function and Neuronal Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 0133-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0133-22.2022	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, 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 -

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	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 Kubota Shun, Doi Hiroshi, Koyano Shigeru, Tanaka Kenichi, Komiya Hiroyasu, Katsumoto Atsuko, Ikeda Shingo, Hashiguchi Shunta, Nakamura Haruko, Fukai Ryoko, Takahashi Keita, Kunii Misako, Tada Mikiko, Takeuchi Hideyuki, Tanaka Fumiaki	4. 巻 14
2. 論文標題 SGTA associates with intracellular aggregates in neurodegenerative diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00770-1	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14件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 池田拓也, 高橋慶太, 橋口俊太, 國井美紗子, 田中健一, 多田美紀子, 土井宏, 竹居光太郎, 竹内英之, 田中章景
2. 発表標題 LOTUS, an Nogo receptor antagonist, improves phenotypes of ALS.
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川本裕子, 浅野徹也, 中村治子, 多田美紀子, 橋口俊太, 高橋慶太, 國井美紗子, 田中健一, 五嶋良郎, 竹内英之, 土井宏, 中村史雄, 田中章景
2. 発表標題 Axonal accumulation of phosphorylated CRMP1 in human ALS spinal cords.
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅野徹也, 中村治子, 川本裕子, 多田美紀子, 木村弥生, 高野洋志, 八尾良司, 橋口俊太, 高橋慶太, 國井美紗子, 田中健一, 五嶋良郎, 中村史雄, 竹内英之, 土井宏, 田中章景
2. 発表標題 Ser522-phosphorylation of CRMP1 modulates the motor function of amyotrophic lateral sclerosis mice.
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小笠原陽大, 竹内英之, 古宮裕泰, 小川有紀, 高橋慶太, 橋口俊太, 國井美紗子, 多田美紀子, 田中健一, 土井宏, 田中章景
2. 発表標題 Anti-inflammatory effects of siponimod on astrocyte.
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅野徹也, 中村治子, 川本裕子, 多田美紀子, 木村弥生, 高野洋志, 八尾良司, 橋口俊太, 高橋慶太, 國井美紗子, 田中健一, 五嶋良郎, 中村史雄, 竹内英之, 土井宏, 田中章景
2. 発表標題 Ser522-phosphorylation of CRMP1 modulates the motor function of amyotrophic lateral sclerosis mice.
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 / 第65回日本神経化学会大会 / 第32回日本神経回路学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小笠原陽大, 竹内英之, 古宮裕泰, 小川有紀, 高橋慶太, 橋口俊太, 國井美紗子, 多田美紀子, 田中健一, 土井宏, 田中章景
2. 発表標題 Anti-inflammatory effects of siponimod on astrocyte.
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 / 第65回日本神経化学会大会 / 第32回日本神経回路学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古宮裕泰, 竹内英之, 小笠原陽大, 高橋慶太, 田中健一, 多田美紀子, 土井宏, 田中章景
2. 発表標題 ミクログリアに対するインフラマソームを介したシボニモドの抗炎症作用
3. 学会等名 第34回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅野徹也, 中村治子, 川本裕子, 多田美紀子, 木村弥生, 高野洋志, 八尾良司, 橋口俊太, 高橋慶太, 國井美紗子, 田中健一, 五嶋良郎, 中村史雄, 竹内英之, 土井宏, 田中章景
2. 発表標題 CRMP1のリン酸化阻害は筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの生存期間, 運動機能の改善をもたらす
3. 学会等名 第40回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田拓也, 高橋慶太, 橋口俊太, 田中健一, 土井宏, 竹居光太郎, 竹内英之, 田中章景
2. 発表標題 Nogo受容体の内因性アンタゴニストであるLOTUSIはALSモデルマウスの症状を改善する
3. 学会等名 第40回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ogasawara A, Takeuchi H, Komiya H, Ogawa Y, Takahashi K, Doi H, Tanaka F.
2. 発表標題 CCR2 is localized in microglia and neurons, as well as infiltrating monocytes, in the lumbar spinal cord of ALS mice.
3. 学会等名 Pan-Asia Consortium for Treatment and Research in ALS (国際学会)
4. 発表年 2021年

1 . 発表者名 Komiya H, Takeuchi H, Ogasawara A, Ogawa Y, Takahashi K, Doi H, Tanaka F.
2 . 発表標題 Ablation of interleukin-19 improves motor function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.
3 . 学会等名 Pan-Asia Consortium for Treatment and Research in ALS (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Ozdemir E, Yamasaki R, Nagata S, Yamaguchi H, Masaki K, Kira JI, Takeuchi H, Isobe N.
2 . 発表標題 Astroglial connexin 43 Is a novel therapeutic target for a chronic multiple sclerosis model.
3 . 学会等名 15th International Society of Neuroimmunology Congress (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Ogasawara A, Takeuchi H, Komiya H, Ogawa Y, Takahashi K, Doi H, Tanaka F.
2 . 発表標題 Anti-inflammatory effects of siponimod on astrocyte.
3 . 学会等名 15th International Society of Neuroimmunology Congress (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Komiya H, Takeuchi H, Ogawa Y, Ogasawara A, Takahashi K, Doi H, Tanaka F.
2 . 発表標題 Ablation of interleukin-19 improves motor function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.
3 . 学会等名 15th International Society of Neuroimmunology Congress (国際学会)
4 . 発表年 2021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
---------	---------