

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20875

研究課題名(和文) 全身炎症によるALS病勢促進の機序解明

研究課題名(英文) The mechanism of ALS pathogenic acceleration by systemic inflammation

研究代表者

古宮 裕泰 (KOMIYA, Hiroyasu)

横浜市立大学・附属病院・指導診療医

研究者番号：90794553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：ALSモデルマウスであるSOD1 Tgマウスと、組織マクロファージと循環マクロファージを弁別可能なCX3CR1-EGFP/CCR2-RFPマウスとを交配し、CX3CR1GFP/CCR2RFP/SOD1 Tgマウスを作出した。本マウスにリポ多糖あるいはpoly(I:C)を腹腔内へ反復投与することで慢性全身炎症を惹起し、生存解析・運動機能解析・組織学的解析を行った。生存期間、運動機能解析は、poly(I:C)投与群で、有意な生存期間短縮と運動機能低下を認めた。一方LPS投与群では、有意差を認めなかった。また、20週齢マウスの腰髄で、poly(I:C)投与群で有意な運動ニューロンの減少をみとめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、感染・外傷などに惹起される全身炎症にともなう神経変性疾患の病勢進行において、神経系・免疫系・血液系をつなぐ担い手である単球系細胞が大きな役割を果たしていることが証明できれば、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、また、本研究における新規病勢マーカーや新規治療標的の同定によって、神経細胞のみに留まっている既存のALS治療戦略を越えた、新規の治療戦略を提示し得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We generated CX3CR1-GFP/CCR2-RFP/SOD1 Tg mice by crossing SOD1 Tg mice, a mouse model of ALS, with CX3CR1-EGFP/CCR2-RFP mice. Chronic systemic inflammation was induced by repeated intraperitoneal administration of lipopolysaccharide or poly(I:C), and we evaluated survival, motor function, and histological analyses.

There were significant survival shortening and worsening of motor function in the poly(I:C) treated group compared to the wild type. In addition, we detected significant motor neuron reduction in the lumbar spinal cord of poly(I:C)-treated mice at 20 weeks.

研究分野：神経科学

キーワード：ミクログリア マクロファージ ALS

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、進行性かつ不可逆な運動神経細胞の変性・脱落を特徴とした難病であり、病態機序として神経細胞自体の機能不全や細胞死が注目されてきた。その一方で、外傷や感染などの全身炎症に伴い病態が加速度的に進行することが臨床的に知られている。本研究では、全身の各臓器の自然免疫と恒常性維持を担う単球系細胞に注目し、全身炎症による ALS 病勢促進の機序解明を目指す。ALS モデルマウスに対し、細菌感染やウイルス感染を模した炎症を惹起し、単球系細胞 (循環マクロファージおよび組織常在マクロファージ) の神経保護、神経傷害作用の両側面から病態への関与を検討する。同時に、単球系細胞に注目した新規の治療ターゲットの探索を行う。

### 2. 研究の目的

ALS 患者では、肺炎などの感染症、侵襲性の高い手術後、外傷後といった全身炎症の惹起が想定される状況において、急性炎症の改善後も ALS の病状が加速度的に進行することを実臨床でよく経験する。しかし、その機序は不明であった。

申請者は、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弁別可能な ALS モデルマウス (CX3CR1<sup>GFP</sup>/CCR2<sup>RFP</sup>/SOD1 Tg マウス) を用いた行動解析や病理学的解析を通じ、骨髄由来循環マクロファージの中枢神経内浸潤が病態形成に関与している可能性を見出した (Komiya, et al. Mol Brain, 2020) (図 1)。

そこで、この知見と全身炎症との関係を明らかにするために、全身炎症を上記マウスに惹起し、骨髄由来循環マクロファージを活性化させる本研究を立案した。これにより、ALS の病態を神経系のみで捉えるのではなく、末梢の免疫系や血液系との臓器連関の視点から総合的に理解する必要性についての根拠を提示し得ると考えた。

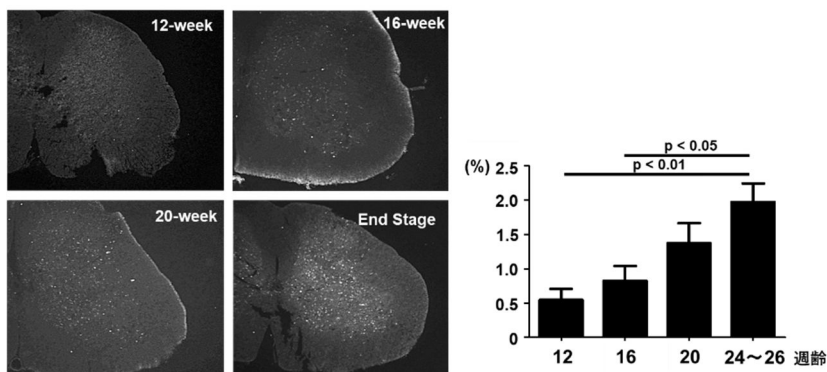


図 1. SOD1 Tg マウス腰髄における CCR2 陽性細胞

### 3. 研究の方法

本研究は、ALS モデルマウスを用いて、神経変性疾患の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・治療への展開を図ることを目的としている。研究期間内には以下のことを明らかにする。

疾患モデルマウスから、神経系・免疫系・血液系の組織マクロファージと循環マクロファージを経時的にソーティングし、遺伝子発現およびタンパク発現プロファイルの網羅的解析・機能解析を行う。そして、全身炎症の有無によるマクロファージの神経傷害性因子・神経保護因子の動きを比較し、病態形成における単球系細胞の役割を解析する。

解析結果から単球系細胞の毒性転換に関わる因子を抽出・同定する。

上記の成果を用いて、神経変性疾患の新たな診断・治療戦略への展開を目指す。

#### < 実験内容 >

ALS モデルマウスであるヒト superoxide dismutase 1 G93A 変異トランスジェニックマウス (SOD1 Tg) と、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として生体内で弁別可能な CX3CR1-EGFP/CCR2-RFP ノックインマウス (CX3CR1<sup>GFP</sup>/CCR2<sup>RFP</sup> マウス) とを交配し、CX3CR1<sup>GFP</sup>/CCR2<sup>RFP</sup>/SOD1 Tg マウスを作成する。本マウスにリボ多糖あるいは poly(I:C) を腹腔内へ 4 週毎に反復投与することで、各々細菌感染あるいはウイルス感染を模した慢性全身炎症を惹起し、以下の実験を行う。

生存解析・運動機能解析 (Rotarod 試験・wire hang 試験)・組織学的解析によって、慢性全身炎症に伴う単球系細胞の変化による表現型悪化、病態促進への影響を検討する。

炎症に伴い神経組織・脾臓・末梢血・脳脊髄液中へ浸潤・増殖している単球系細胞を、経時的に FACS セルソーターやレーザーマイクロダイセクションで分離採取し、細胞傷害性/細

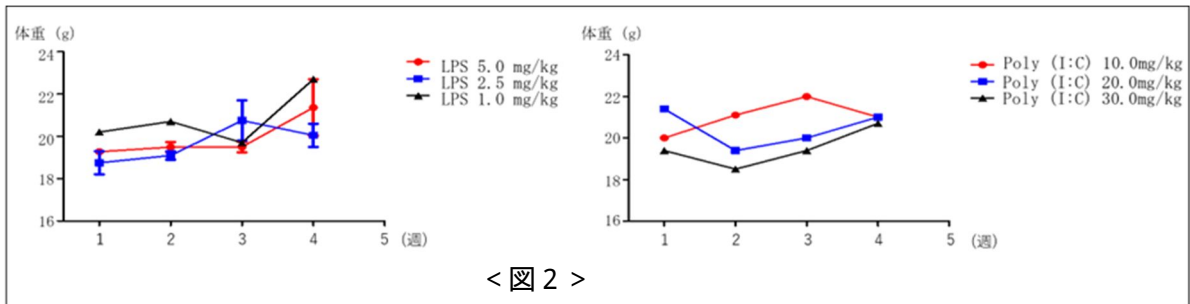
胞保護性・貪食能・抗原提示能などの解析に加え、質量分析やRNAseqを用いた表面抗原プロファイル解析・網羅的遺伝子発現プロファイル解析などを行う。これにより、単球系細胞が神経傷害性ないしは神経保護性に働く候補因子を抽出する。

の候補因子について、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を培養細胞やSOD1 Tgマウスに加え、フィードバック検証を行うことで、単球系細胞の「毒性転換」制御因子を標的とした疾患治療法開発への基盤を確立する。

#### 4. 研究成果

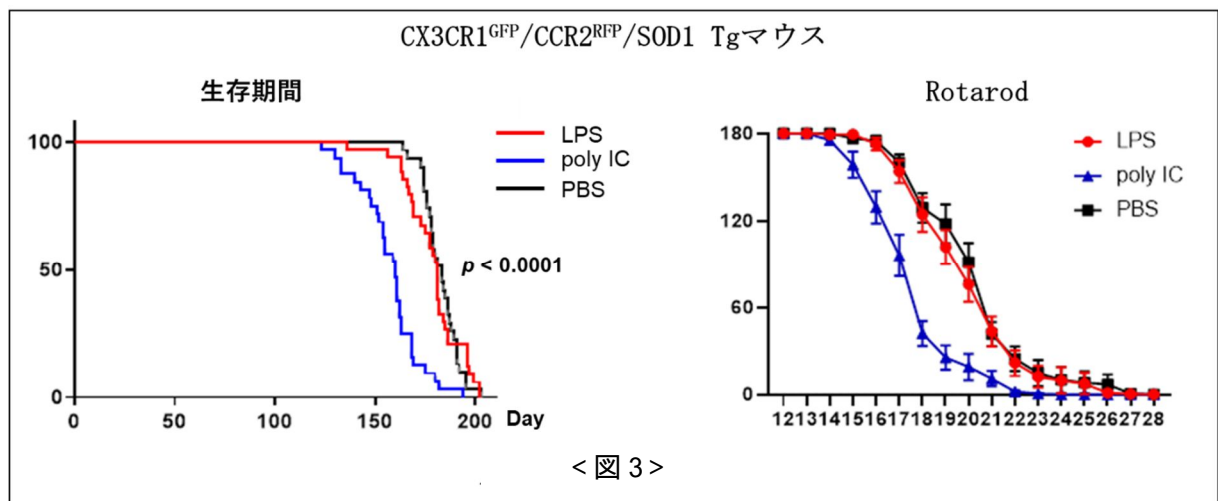
本研究に必須である組織マクロファージと循環マクロファージを生体内弁別可能なALSモデルマウスであるCX3CR1<sup>GFP</sup>/CCR2<sup>RFP</sup>/SOD1 Tgマウスは既に作出済みである(Komiya, et al. Mol Brain 2020)。

また、すでに成体マウスの脳脊髄組織をシングルセル化するプロトコルを確立しており、セルソーターを用いて、1細胞レベルでの解析可能な、細胞分取のプロトコルの準備もできている。加えて、本研究では、上記マウスにリポ多糖あるいはpoly(I:C)を腹腔内へ反復投与することで細菌感染あるいはウイルス感染による全身炎症を模したモデルを作成し、反復炎症刺激の閾値検討による条件設定をおこなった(図2)。



< 図 2 >

また、同マウスに対し、リポ多糖あるいはpoly(I:C)を腹腔内に投与し、全身炎症を起こすことによるマウスの生存期間解析、運動機能解析をすでに終えており、poly(I:C)投与群において、生存期間短縮や運動機能悪化など予想通りの結果を得ている(図3)。



< 図 3 >

現在は上記マウスを使用し、全身炎症にともなう、グリア細胞の形態変化や神経細胞死などにつき病理学的解析を行っている。また、単球系細胞を中心とした生化学的解析も順次進行中であり、poly(I:C)投与にともなう、生存期間短縮や運動機能悪化に寄与する因子の詳細な解析と抽出を現在行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------