

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830046

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症における免疫細胞による活性化グリア細胞制御機構の解明

研究課題名(英文)The mechanism for regulating activated glial cells by immune cells in amyotrophic lateral sclerosis mice.

研究代表者

小峯 起 (KOMINE, Okiru)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：00456211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫TRIF経路欠損、及び個体レベルで特定の免疫細胞を増減させた筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデルマウス解析から、ALSモデルマウスで同定した異形の活性化アストロサイトの細胞死誘導機構は、浸潤免疫細胞を介したFas経路ではなく、細胞自律的なTRIF経路により制御されている可能性が示唆された。一方で、末梢免疫のバランスを変化させた2種類のALSモデルマウスの比較解析から、末梢免疫バランスの変化により、病態及びミクログリアの細胞数に変化が起こることが判明し、ALS病態における末梢免疫環境の関与を示唆するデータが得られた。

研究成果の概要(英文)：From our analyses of innate immune TRIF-pathway deficiency and increase or decrease in number of specific infiltrating immune cells in ALS model mice, it was suggested that the induction of cell-death in dysmorphic activated astrocytes was regulated by not immune cell mediated Fas-pathway but cell-autonomous TRIF-pathway in ALS model mice. Meanwhile, from comparative analyses between two strains of ALS model mice that have distinct genetic backgrounds in peripheral immune responses, we found that the peripheral immune response might affect to a disease course and a microglia number in ALS model mice. These results suggest that peripheral immune system contributes to a disease course of ALS.

研究分野：基礎医学 薬理学一般

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 自然免疫 グリア細胞 免疫細胞

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系は免疫学的特権部位とされているが、運動神経の変性を特徴とする神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病巣において免疫細胞の浸潤が観察されており、近年、ALS モデルマウスを用いた解析により、浸潤した免疫細胞が、病態の進行過程に関与していることが明らかにされ、非常に注目されている。一方で、ALS では脊髄損傷と異なり、グリア細胞の活性化が終息せずに慢性的に持続することが知られており、活性化グリア細胞が増加し、神経傷害性に機能することが、神経細胞死を誘導する一因であると考えられている。しかしながら、ALS において、浸潤免疫細胞が、細胞傷害性の活性化グリア細胞を排除することにより神経保護機能を発揮する可能性を検証した研究は未だ報告されていない。

自然免疫に関わる主要な分子である Toll-like 受容体 (TLR) からシグナルを伝達する TRIF (TLR3、TLR4 の下流に位置するアダプター分子) 経路を遮断した TRIF 欠損 ALS モデルマウスの解析から、疾患進行速度が加速すること、ミクログリアからのケモカイン発現低下に伴う細胞傷害性 T 細胞 (CD8T)、ナチュラルキラー細胞 (NK)、ナチュラルキラー T 細胞 (NKT) といった細胞性免疫を担う免疫細胞の脊髄内浸潤の減少に加え、異常な形態をもつ活性化アストロサイトが脊髄内で増加していることから、これらの細胞性免疫を担当する免疫細胞が、活性化アストロサイトに細胞死を誘導することにより排除し、神経保護的に機能している可能性が示唆された。実際に、細胞性免疫細胞が標的細胞に細胞死を誘導する際に発現する Fas リガンド (FasL) の受容体である Fas の発現及び細胞死について調べたところ、ALS モデルマウスにおいては、異常の活性化アストロサイトにおいて、Fas の発現の上昇が見られ、細胞死が誘導されていたが、TRIF 欠損 ALS モデルマウスにおいては、異常の活性化アストロサイトで同様に Fas の発現の上昇は見られたものの、細胞死はほとんど誘導されていなかった。これらの知見から、浸潤免疫細胞によって、神経傷害性の活性化アストロサイトが排除され、神経保護的な環境が形成されていることが予想された。

2. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) モデルマウスにおける自然免疫経路 (TRIF 経路) 遮断により、病態の進行が加速し、ミクログリアからのケモカイン発現低下に伴う免疫細胞の脊髄内浸潤の減少に加えて、異常な形態をもつ活性化アストロサイトが増加することから、これらの免疫細胞が、活性化アストロサイトを排除し、神経保護的に機能している可能性が示唆された。これまで、神経変性疾患研究において、活性化グリア細胞が増加し、神経傷害性

に機能することが、神経細胞の細胞死を誘導する一因であるとされているが、活性化グリア細胞の排除による神経保護について検証した研究は報告されていなかった。そこで本研究は、ALS における免疫細胞による活性化グリア細胞排除機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

まず、脊髄浸潤免疫細胞における FasL の発現についてフローサイトメトリー (FACS) 解析を行った。

次に、抗体やサイトカインの腹腔内投与により、これらの浸潤免疫細胞を欠損又は増加させた ALS モデルマウスを作成し、ALS の病態及び異形の活性化アストロサイト数に変化がみられるか個体レベルで解析を行った。さらに、末梢免疫組織との連関を明らかにするため、ALS モデルマウスの遺伝的背景を細胞性免疫優位な C57BL/6 (B6) から液性免疫優位な BALB/c へと戻し交配することにより、末梢免疫組織において液性免疫優位環境へと変化させた ALS モデルマウスを作成し、ALS の病態及び脊髄病巣内の浸潤免疫細胞やグリア細胞に変化が見られるか解析を行った。

4. 研究成果

まず、FACS 解析により、これらの脊髄内浸潤免疫細胞は FasL を発現していることが判明した (図 1)。

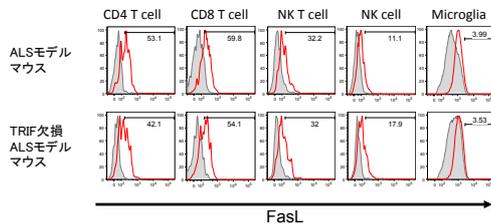


図1. 浸潤免疫細胞におけるFasLの発現解析 (FACS)

次に、抗体やサイトカインの腹腔内投与により、関与が予想される脊髄内浸潤免疫細胞を個体レベルで増加及び減少させた ALS モデルマウスを作成し、これらのマウスの生存期間及び異形の活性化アストロサイト数及び細胞死について解析を行ったところ、対照群と比較し、ほとんど変化が見られなかった (図 2, 3)。

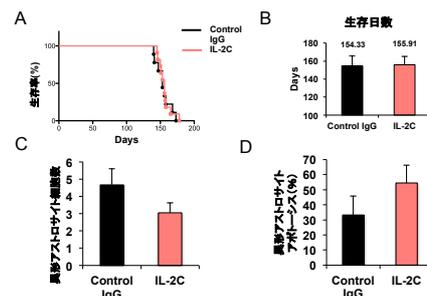


図2. IL-2 complex (IL-2C)投与により、NKT細胞、NK細胞を増加させたALSモデルマウスの解析

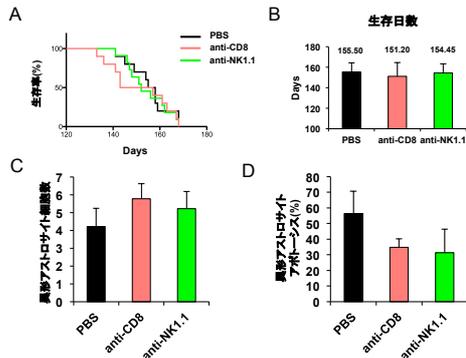


図3. anti-CD8、anti-NK1.1抗体投与により、CD8T細胞、NKT細胞、NK細胞を減少させたALSモデルマウスの解析

以上の結果及び、TRIF 欠損により異形の活性化アストロサイトの細胞死が減弱することから、ALS モデルマウスで同定した異形の活性化アストロサイトの細胞死誘導機構は、浸潤免疫細胞を介した Fas 経路ではなく、細胞自律的な TRIF 経路により制御されている可能性が示唆された。

さらには、末梢免疫組織との連関を明らかにするため、ALS モデルマウスの遺伝的背景を細胞性免疫優位な C57BL/6(B6)マウスから液性免疫優位な BALB/c(Balb)マウスに戻し交配することによって変化させた ALS モデルマウス(G93A(B6)、G93A(Balb))を作成したところ、生存期間の短縮がみられること、浸潤免疫細胞数及びミクログリアに変化が見られることが判明した(図 4)。

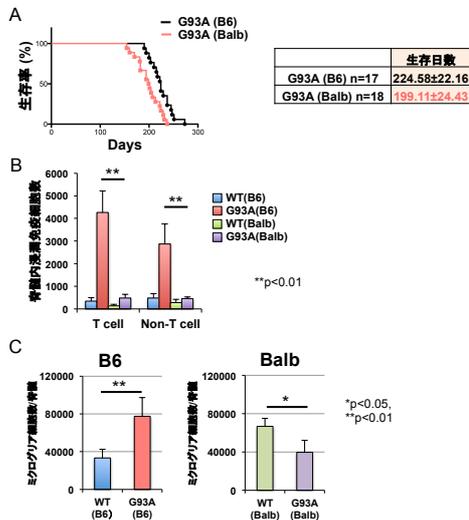


図4. 末梢の免疫学的背景の異なる2種類のALSモデルマウスの解析

以上のことから、ALS 病態において、末梢免疫環境が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Seiji Watanabe, Hristelina Ilieva, Hiromi Tamada, Hanae Nomura, Okiru Komine, Fumito Endo, Shijie Jin, Pedro Mancias, Hiroshi Kiyama, Koji Yamanaka.

Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in SIGMAR1- and SOD1-linked ALS. *EMBO Molecular Medicine*, 2016 Dec 1;8(12):1421-1437 査読有

② Jurate Lasiene, Okiru Komine (equal contribution with first author), Noriko Fujimori-Tonou, Berit Powers, Fumito Endo, Seiji Watanabe, Jin Shijie, John Ravits, Philip Horner, Hidemi Misawa, Koji Yamanaka.

Neuregulin 1 confers neuroprotection in SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis mice via restoration of C-boutons of spinal motor neurons. *Acta Neuropathologica Communications*. 2016 Feb 18;4:15 査読有

③ Fumito Endo, Okiru Komine, Noriko Fujimori-Tonou, Masahisa Katsuno, Shijie Jin, Seiji Watanabe, Gen Sobue, Mari Dezawa, Tony Wyss-Coray, Koji Yamanaka.

Astrocyte-Derived TGF- β 1 Accelerates Disease Progression in ALS Mice by Interfering with the Neuroprotective Functions of Microglia and T Cells.

Cell Reports. 2015 Apr 28;11(4):592-604 査読有

④ Seiji Watanabe, Natsumi Ageta-Ishihara, Shinji Nagatsu, Keizo Takao, Okiru Komine, Fumito Endo, Tsuyoshi Miyakawa, Hidemi Misawa, Ryosuke Takahashi, Makoto Kinoshita and Koji Yamanaka.

SIRT1 overexpression ameliorates a mouse model of SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis via HSF1/HSP70i chaperone system.

Molecular Brain, 2014 Aug 29;7:62 査読有

[学会発表] (計 19 件)

招待講演

小峯 起、山下博史、藤森典子、森脇康博、三澤日出巳、山中宏二。

筋萎縮性側索硬化症における浸潤免疫細胞の機能解明

第 37 回日本神経科学大会、脳内環境の恒常性破綻とグリア疾患、シンポジウム講演、2014 年 9 月 (横浜)

国際学会

① Okiru Komine, Jurate Lasiene, Noriko Fujimori-Tono, Berit Powers, Fumito Endo,

Seiji Watanabe, Jin Shijie, John Ravits, Philip Horner, Hidemi Misawa, Koji Yamanaka.

Neuregulin 1 confers neuroprotection in SOD1-linked ALS mice via restoration of C-boutons of spinal motor neurons.

The 27th International Symposium on ALS/MND, 2016. 12月 Dublin

②Fumito Endo, Okiru Komine, Shijie Jin, Seiji Watanabe, Masahisa Katsuno, Gen Sobue, Tony Wyss-Coray, Koji Yamanaka.

Astrocyte-derived TGF- β 1 accelerates disease progression in ALS mice by interfering with neuroprotective functions of microglia and T cells.

26th International Symposium on ALS/MLD, 2015.12月 Orlando, USA

③Fumito Endo, Okiru Komine, Tony Wyss-Coray, Koji Yamanaka.

Astrocyte-derived TGF- β 1 accelerates disease progression in ALS mice by interfering with neuroprotective functions of microglia and T cells.

25th International Symposium on ALS/MND. 2014. 12月 Brussels, Belgium

④Okiru Komine, Hirofumi Yamashita, Noriko Fujimori-Tonou, Yasuhiro Moriwaki, Fumito Endo, Seiji Watanabe, Hidemi Misawa and Koji Yamanaka.

The role of the infiltrating immune cells attracted by activated microglia in amyotrophic lateral sclerosis mice.

Neuroscience 2014 Annual Meeting, 2014. 11月 Washington DC, USA

⑤Okiru Komine, Hirofumi Yamashita, Noriko Fujimori-Tonou, Yasuhiro Moriwaki, Fumito Endo, Seiji Watanabe, Hidemi Misawa and Koji Yamanaka.

The role of the infiltrating immune cells attracted by activated microglia in amyotrophic lateral sclerosis mice.

9th Brain Research Conference. 2014. 11月 Washington DC, USA

⑥Fumito Endo, Okiru Komine, Tony Wyss-Coray, Koji Yamanaka.

Astrocyte-derived TGF- β 1 accelerates disease progression in ALS mice by interfering with neuroprotective functions of microglia and T cells.

9th Brain Research Conference. 2014. 11月 Washington DC, USA

⑦Fumito Endo, Okiru Komine, Tony Wyss-Coray, Koji Yamanaka.

Astrocyte-derived TGF- β 1 accelerates

disease progression in ALS mice by interfering with neuroprotective functions of microglia and T cells.

9th FENS Forum of Neuroscience. 2014. 7月 Milan, Italy

国内学会

①大沼周平、小峯 起、山中宏二.

ALS病態における末梢免疫の役割.

第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学学会大会合同年会, 2016. 9月 福岡

②小峯 起、大沼周平、池田早織、山中宏二.

ALSモデルマウスにおける末梢免疫の役割.

第39回日本神経科学大会, 2016. 7月 横浜

③星野友則、山下博史、田代善崇、三澤日出

巳、小峯 起、山中宏二、漆谷 真、高橋良輔.
ユビキチン・プロテアソームシステム機能障害による運動ニューロン神経変性機序.

第39回日本神経科学大会, 2016. 7月 横浜

④遠藤史人、小峯 起、金世杰、渡邊征爾、山中宏二.

アストロサイト由来 TGF- β 1 は ALS の疾患進行を規定する.

第27回日本神経免疫学会学術集会, 2015. 9月 岐阜

⑤山中宏二、遠藤史人、小峯 起、金 世杰、渡邊征爾.

Astrocyte-derived TGF- β 1 accelerates disease progression in ALS mice by regulating the neuroprotective inflammatory response of microglia and T cells.

第58回日本神経化学学会大会, 2015.9月 大宮

⑥小峯 起、山下博史、藤森典子、森脇康博、三澤 日出巳、山中宏二.

ALSモデルマウスにおける自然免疫 TRIF 経路の役割.

第38回日本神経科学大会, 2015. 7月 神戸

⑦星野友則、山下博史、田代善崇、三澤日出巳、小峯 起、山中宏二、高橋良輔.

運動ニューロン特異的 26S プロテアソームノックアウトマウスを用いた運動ニューロンの網羅的遺伝子発現解析.

第38回日本神経科学大会, 2015. 7月 神戸

⑧遠藤史人、小峯 起、金 世杰、勝野雅央、祖父江 元、山中宏二.

ALS マウスの疾患進行におけるアストロサイト由来 TGF- β 1 の役割.

第38回日本神経科学大会, 2015. 7月 神戸

⑨遠藤史人、小峯 起、金 世杰、山中宏二.

Astrocyte-derived TGF- β 1 accelerates disease progression in ALS mice.

第 56 回日本神経学会学術大会. 2015. 5 月
新潟

⑩遠藤史人、小峯 起、山中宏二.
ALS マウスの疾患進行におけるアストロサイ
ト由来 TGF- β 1 の役割.
第 37 回日本神経科学大会, 2014. 9 月 横浜

⑪山下博史、小峯 起、藤森典子、伊藤秀文、
井口洋平、熱田直樹、田中章景、祖父江元、
高橋良輔、山中宏二.
細胞特異的トランスクリプトームを用いた、
孤発性 ALS 患者脊髄の DNA マイクロアレイに
よる解析.
第 37 回日本神経科学大会, 2014. 9 月 横浜

〔図書〕(計 6 件)

①小峯 起、山中宏二.
アストロサイト.
脳内環境事典(メディカルドゥ)18-19, 2017.

②小峯 起、山中宏二.
免疫性神経疾患の基礎科学--神経科学の立
場から.
Modern Physician(新興医学出版社)7月号
免疫性・炎症性神経疾患一病態解明から疾患
修飾薬開発まで. 36(7): 619-623, 2016.

③Fumito Endo, Okiru Komine, Koji Yamanaka.
Neuroinflammation in motor neuron disease.
*Clinical and Experimental
Neuroimmunology*, 2016; 7(2): 126-138.

④小峯 起、山中宏二.
ALS とミクログリア.
*Clinical Neuroscience 「ミクログリ
ア」*, 33(12), 1405-1408, 2015. 12. 1

⑤ Okiru Komine, Koji Yamanaka.
Neuroinflammation in motor neuron
disease.
Nagoya Journal of Medical Science,
2015 77(4), 537-549

⑥小峯 起、山中宏二.
グリア-末梢免疫組織連関からみた神
経変性機序の解明 -筋萎縮性側索硬化
症を中心として-.
メディカルドゥ 遺伝子医学 MOOK 26
号: 84-89, 2014

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :

出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/mnd/index.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
小峯 起 (KOMINE, Okiru)
名古屋大学・環境医学研究所・助教
研究者番号 : 00456211

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
()

研究者番号 :

(4) 研究協力者
()