

令和元年5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19537

研究課題名(和文)宇宙実験と地上実験による宇宙免疫学の創成

研究課題名(英文)Creation of Space Immunology by space and ground experiments

研究代表者

村上 正晃(Murakami, Masaaki)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：00250514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、重力刺激が局所神経の活性化を誘導し、特定血管に変容をもたらすことで末梢血中の免疫細胞の中核への侵入口を形成する「ゲートウェイ反射」を明らかにした。本研究では、重力と炎症性疾患との関係を宇宙実験および地上実験との組み合わせで明らかにし、宇宙免疫学の研究領域を切り開くことを目的とした。これまでに、病原性T細胞のクローン樹立、マウスの回収までのタイムラグの克服や過重力や衝撃によるゲート位置への影響などのフィジビリティスタディは順調に完了した。最終年度内に打ち上げの予定だったが、延期となり、2019年中の実施が予定されている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球の重力は、地上生物にとって避けられない刺激であり、進化的にも保存された何らかの免疫学的な応答機構が存在する可能性が高く、それらを研究することは、重力と言う環境要因が我々の健康へどのように関連するのを探る点でも、さらに、将来的な宇宙開発を進める点でも重要な意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：We have reported that gravity stimulation induces regional neural activations to create an immune cell gateway to the CNS via alteration of specific vessels, a phenomenon called the gateway reflex. In this study, we aimed to study a relation between gravity and inflammatory diseases by a combination of ground and space experiments, and develop a research field of the space immunology. We have performed feasibility studies including the establishment of pathogenic T cell clones, overcome of time lag till sampling, and effects of over-gravity and impact during launch, with successful results. Although the space experiment was originally scheduled within the research term, it was postponed, which will be conducted in 2019.

研究分野：免疫学、炎症学、神経免疫学

キーワード：炎症 ゲートウェイ反射 宇宙 重力

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球の重力は、我々地上生物にとって避けられない刺激であり、進化的にも保存された何らかの免疫学的な応答機構が存在する可能性が高く、それらを解明することは、重力という環境要因が我々の健康へどのように関連するのを探る点でも、さらに、将来的な宇宙開発を進める点でも重要な意義をもつ。

本提案では、重力と炎症性疾患誘導との関係を世界初の宇宙実験に加え、方法論的に確立した地上実験との組み合わせで明らかにし、「重力免疫学」研究領域を切り開くことを目的とする。我々は、2012年に、その一端を世界に先駆けて明らかにし、研究を継続してきた。しかし、この「重力免疫学」の領域の詳細は、未だ不明な点が非常に多く、本研究提案は、挑戦的かつ萌芽的要素が強い。

一連の研究から、我々は、マウスを用いた実験にて、重力に対抗する抗重力筋“ヒラメ筋”を介する感覚神経の活性化が、第5腰髄(L5)側の後根神経節の活性化を誘導して近傍の交感神経節にて特にL5背側血管部位に配位する交感神経が活性化され、ノルアドレナリンを局所発現、内皮細胞から過剰量のケモカインを誘導し、中枢神経系(CNS)への免疫細胞の侵入口(重力ゲート)を形成することを見出した。もし、血中にCNS抗原を認識する自己反応性の病原性T細胞が存在すれば、この「重力ゲート」からCNSに侵入し活性化後、サイトカイン発現を介してさらに免疫細胞を集積させ炎症性病変を誘導する。この成果は、宇宙航空研究開発機構(JAXA)にも評価され、国際宇宙ステーションの日本実験棟「きぼう」内での免疫病誘導マウスを使用した実験を行う世界で初めての機会を得た。これにより地球上では実施が難しい、微小重力下におけるマウス個体を用いた炎症応答の解析が可能となった。今回、当該宇宙実験および地上実験を萌芽研究申請として応募した。

具体的な実験概要は以下の通りである。重力刺激の減少によって、どのように重力ゲートの位置が変化し、多発性硬化症モデルの発症に影響を及ぼすのか、起因する神経活性化経路やその分子機構について *in vivo* および *in vitro* にて解析する。本提案は、宇宙空間でのマウス個体を用いた実験という非常に希少かつ挑戦的な計画を含む。「きぼう」内での微小重力下、さらに、地上での尾部懸垂および遠心飼育機による2G負荷状態下など、重力刺激を変化させた際の重力ゲートの形成をマウス生体内にて解析する。宇宙空間で実施可能な実験方法やサンプリング手技については、ロケットの打ち上げ前までにJAXAと共同で最適化する。重力ゲートの位置の検出は、血液内に移入したコンジェニックマーカーで識別したCNS抗原特異的自己反応性T細胞の免疫染色をマウス全身切片に対して行うことで網羅的に探索する。局所神経、中枢神経の活性化状態の変化は、神経活性化マーカーcFosの発現状態を免疫染色で検出することによって行う。

本提案は、重力と免疫応答の関係性を、2つの疾患モデルを用いた宇宙空間実験と地上実験で解き明かす挑戦的萌芽研究課題である。さらに、本研究によって、全く新しい学問領域「重力免疫学」が形成される。また、パーキンソン病、筋ジストロフィーを含む神経筋疾患では、筋肉からの神経刺激が減弱して、血管ゲートが変化して病状が出現するという、病態に対する理解が進む可能性がある。そのため、本研究は、将来的にこのような地球上での神経筋疾患を含む中枢神経系疾患の病態理解にも繋がる萌芽的研究である。

2. 研究の目的

地球の重力は、地上生物にとって避けられない刺激であり、進化的にも保存された何らかの免疫学的な応答機構が存在する可能性が高く、それらを解明することは、重力と言う環境要因が我々の健康へどのように関連するのを探る点でも、さらに、将来的な宇宙開発を進める点でも重要な意義をもつ。しかし、宇宙空間にて、実際に免疫病と重力刺激の関係を解析した事例はなく、「重力免疫学」と言うべき学問領域も形成されていない。

本研究提案では、不明な点が多い重力と炎症性疾患の誘導の関係を明らかにするために、疾患モデルと宇宙実験・地上実験を組み合わせで詳細に解析し、世界に先駆けて「重力免疫学」を学問領域として確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1). 宇宙実験とその準備のための地上実験

病原性T細胞クローンの樹立

宇宙へのロケットの打ち上げは、機器の調整、気象影響などため度々スケジュール変更が引き起こされる。そのため、MOG抗原を免疫したマウスから、毎回、病原性T細胞を単離するのは非現実的である。打ち上げのスケジュール変更に対応するために、病原性T細胞のクローン化を予め行って持続的な細胞培養を可能にする。

尾部懸垂法によるタイムラグ影響の確認

宇宙実験では、地上に帰還後に、我々の手にて安楽死させ解析する予定である。帰還宇宙船が着水してからマウスの回収、安楽死まで最大2日ほど必要な場合がある。そのため、微小重力でのゲート形成に対する影響が、個体帰還後の1G重力下でどのくらいの期間持続するか予備検討を行う。そのために、地上にてマウスの尾部懸垂モデルを行う。マウスを尾部懸垂から開放し、後肢に1G負荷がかかるようにしてから経時的に安楽死させ、L5背側血管を採取し、ケモ

カインの発現上昇を qPCR によって測定する。1G 飼育マウスのケモカインレベルに到達する日数を明らかにし、軌道上から帰還後のタイムラグの影響を検討する。この実験で微小重力の影響が帰還中に減弱する恐れのある場合は、宇宙ステーション内の 1G 飼育装置を利用して、マウスを飼育し、微小重力群の対照とする。

(2). 地上実験

過剰重力によるゲート形成部位の解析 宇宙空間での微小重力下におけるゲート形成の探索に加えて、地上にて 2G 過剰重力下におけるゲート位置とそれに引き続く病態発症機構を解析する。具体的には、JAXA との共同研究にて、JAXA に設置されている大型遠心飼育装置を用いて 2G の重力をマウスに負荷する。宇宙実験と同様に病原性 T 細胞移入後に 2G 負荷し、サンプリングする。病原性 T 細胞浸潤部位を決定する。2G 負荷では L5 ゲートの解放は増大すると考えられるが、他の部位にもゲートが形成されるのかを詳しく検討する。他の部位のゲート形成が認められた場合は、どのような神経経路によってそれが形成されるかを、神経活性化マーカーの発現を指標に、マウス全身透明化および全身連続切片による免疫染色を行うことで解析する。全身透明化技術は、東京大学医学部の上田博士、田井中博士との共同研究で、すでに導入済みである。

重力刺激と関節炎病態との関連の解析 マウスを 2G 環境下にて飼育した時に、関節炎モデルの炎症状態が悪化する予備的な結果を得ている。この悪化メカニズムを、過剰重力によるゲート形成の見地から解析する。逆に、尾部懸垂法にて後肢から重力刺激を除去した場合に後肢関節での炎症病態が減弱するか、もしすれば関与する分子機構も解析する。これらの実験から決定した関節炎病態に関連する神経経路の外科的および薬理的な抑制・増強による関節炎の直接的な病態変化を明らかにして、当該神経経路の機能的関与を証明する。また、重力刺激と病態変化の関連について導入済みのアルツハイマー病モデルマウスを用いて、症状の発症時期に合わせて 2G 飼育を行い、過剰重力の認知病態の進行に与える影響も解析する。

4. 研究成果

地球の重力は我々地上の生物にとって避けられない刺激であり、進化的にも保存された何らかの免疫学的な応答機構が存在する可能性が高い。これを解明することは、重力という環境要因が我々の健康へどのように関連するのかを研究すること、また、将来的に宇宙開発を進める点でも重要な意義をもつ。我々は、重力刺激が局所神経の活性化を誘導し、特定血管に変容をもたらすことで末梢血中の免疫細胞の中核への侵入口を形成する「ゲートウェイ反射」を明らかにした。本研究では、重力と炎症性疾患との関係を宇宙実験および地上実験との組み合わせで明らかにし、宇宙免疫学の研究領域を切り開くことを目的としている。これまでに、国際宇宙ステーション内での微小重力下での実験を可能にするため、JAXA と共同でフィージビリティスタディを行ってきた。通常、病原性 T 細胞は CNS 抗原を免疫したマウスから実験を行うたびに調製を行うが、ロケットの打ち上げは度々スケジュール変更が行われるため、病原性 T 細胞のクローン樹立を行い、スケジュール変更に対応可能にした。さらに、CNS の MOG に対する病原性 T 細胞に加え、網膜抗原に対する病原性 T 細胞のクローンを樹立した。2 種の T 細胞クローンを同時投与することで、CNS と網膜の 2 つの部位を宇宙実験で解析することが可能になった。宇宙から帰還するマウスは、海に着水後、解析までに時間を要し、その間は地球上の 1G に晒される。そこで、このタイムラグが生じてゲートの位置が持続するかを検討した。地上にてマウスの尾部懸垂モデルを用いることで、L5 に対する重力ゲートウェイ反射を減弱できる。尾部懸垂終了後、1 日で L5 背側血管のケモカイン産生が正常レベルに回復してしまっていたことから、タイムラグによってケモカイン産生を指標とすることは難しいことがわかった。しかし、我々が以前に見出した CNS 中で長い寿命をもつ末梢由来 MHC クラス II 高発現モノサイトを指標とすることで、ゲート位置の痕跡が検出でき、少なくとも数日間のタイムラグは解析に影響しないことが判明した。さらに、打ち上げや帰還時などの過重力を大型遠心飼育装置で模倣したり、飼育中に衝撃や振動を与えたりすることによってもゲート位置には大きな影響が無いことが分かり、予定していた宇宙実験に向けたフィージビリティスタディは順調に完了した。最終年度内にロケットの打ち上げ予定だったが、事故や NASA 側の事情で 2 度延期となり、2019 年 4 月の実施が予定されている。その後、2019 年秋ごろに地上対照実験を行い、これらを併せて、重力と炎症性疾患との関係を宇宙実験および地上実験から検証する。

これらと並行して、ゲートウェイ反射とその分子基盤である炎症回路のメカニズムについて検討を行った。慢性ストレスや光によってもゲートウェイ反射が生じることが分かり、これまで明らかにした重力、電気刺激や痛み以外にも内外からの様々な刺激による神経活性化が、ゲートウェイ反射を介して炎症応答を司ることがマウスの実験で分かってきた。光刺激では、網膜の視神経細胞から分泌されたアドレナリンがその受容体の発現を減少、炎症を減弱、病態を収束させた。また、ストレスでは脳内の特定血管に血管ゲートが形成され、それを起点に新たな神経回路が活性化し、胃や心臓といった末梢の臓器の機能不全に陥ることがわかった。さらに、ゲートウェイ反射の分子基盤として、血管内皮細胞を含む非免疫細胞においてサイトカイン、増殖因子、神経伝達物質などの刺激にて NF- κ B と STAT3 の同時活性化を介し、過剰な NF- κ B 活性化が生じ、ケモカイン、サイトカインなどが局所産生して炎症を誘導する機構「炎症回路」を以前に同定し、すでに、正の制御分子、標的分子群をゲノムワイドスクリーニングにて報告し、炎症病態の誘導、収束の解析を進めている。炎症回路は、ノルアドレナリンや ATP などの

神経伝達物質によって NF- κ B 活性化が増強し、ケモカイン局所発現を介して CNS 血管にゲートを形成させ、ゲートウェイ反射を媒介している。この炎症回路について、Rbm10、Bmi1、プレセニリン-1 が、それぞれこれまで知られていなかった機能で、NF- κ B 活性化に關与していることを見出した。これらの炎症回路の分子機構は、将来的なゲートウェイ反射の人為的制御のための理論的基盤になる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Fujita, M., Y. Yamamoto, J-J. Jiang, T. Atsumi, Y. Tanaka, T. Ohki, N. Murao, E. Funayama, T. Hayashi, M. Osawa, T. Maeda, D. Kamimura, and M. Murakami. NEDD4 is involved in inflammation development during keloid formation. **J Invest Dermatol.** 139, 333-341, 2019. DOI: 10.1016/j.jid.2018.07.044 (査読有)
2. Stofkova, A., D. Kamimura, T. Ohki, M. Ota, Y. Arima, and M. Murakami. Photopic light-mediated down-regulation of local 1A-adrenergic signaling protects blood-retina barrier in experimental autoimmune uveoretinitis. **Sci Rep.** 9, Article number: 2353, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-38895-y (査読有)
3. Kamimura, D., T. Ohki, Y. Arima, and M. Murakami. Gateway reflex: neural activation-mediated immune cell gateways in the central nervous system. **Int Immunol.** 30(7), 281-289, 2018. DOI: 10.1093/intimm/dxy034. (査読有)
4. Okuyama, Y., Y. Tanaka, J-J. Jiang, D. Kamimura, A. Nakamura, M. Ota, T. Ohki, D. Higo, H. Ogura, N. Ishii, T. Atsumi and M. Murakami. Bmi1 regulates I κ B α degradation via association with the SCF complex. **J Immunol.** 201(8):2264-2272, 2018. DOI: 10.4049/jimmunol.1701223 (査読有)
5. Tanaka, Y., L. Sabharwal, M. Ota, I. Nakagawa, J-J. Jiang, Y. Arima, H. Ogura, M. Okochi, M. Ishii, D. Kamimura and M. Murakami. Presenilin 1 regulates NF- κ B activation via association with breakpoint cluster region and casein kinase II. **J Immunol.** 201(8):2256-2263, 2018. DOI: 10.4049/jimmunol.1701446. (査読有)
6. Murakami, M. Recent advances in neuroimmune interactions. **Clin Exp Neuroimmunol.** 8: 3-4, 2017. DOI: 10.1111/cen3.12382 (査読有)
7. Tanaka, Y., Y. Arima, K. Higuchi, T. Ohki, M. Elfeky, M. Ota, D. Kamimura and M. Murakami. EAE Induction by Passive Transfer of MOG-specific CD4+ T Cells. **Bio-protocol.** 7(13), 7/5/2017, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2370> (査読有)
8. Elfeky, M., D. Kamimura, Y. Arima, M. Murakami and L. Steinman. Targeting molecules involved in immune cell trafficking to the central nervous system for therapy in multiple sclerosis. **Clin Exp Neuroimmunol.** 8(3), 183-191, 2017. DOI: 10.1111/cen3.12399 (査読有)
9. Arima, Y., T. Ohki, N. Nishikawa, K. Higuchi, M. Ota, Y. Tanaka, J. Nio-Kobayashi, M. Elfeky, R. Sakai, Y. Mori, T. Kawamoto, A. Stofkova, Y. Sakashita, Y. Morimoto, M. Kuwatani, T. Iwanaga, Y. Yoshioka, N. Sakamoto, A. Yoshimura, M. Takiguchi, S. Sakoda, M. Prinz, D. Kamimura, and M. Murakami. Brain micro-inflammation at specific vessels dysregulates organ-homeostasis via the activation of a new neural circuit. **eLife** 6: e25517, 2017. DOI: 10.7554/eLife.25517 (査読有)
10. Tanaka, T., Y. Arima, D. Kamimura, and M. Murakami. The gateway reflex, a novel neuro-immune interaction for the regulation of regional vessels. **Front Immunol.** 8:1321, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01321 (査読有)
11. Atsumi, T., H. Suzuki, J-J. Jiang, Y. Okuyama, I. Nakagawa, M. Ota, Y. Tanaka, T. Ohki, K. Katsunuma, K. Nakajima, Y. Hasegawa, O. Ohara, H. Ogura, Y. Arima, D. Kamimura, and M. Murakami. Rbm10 regulates inflammation development via alternative splicing of Dnmt3b. **Int Immunol.** 29(12):581-591, 2017. DOI: 10.1093/intimm/dxx067 (査読有)

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 村上正晃、特異的神経回路による炎症誘導機構:ゲートウェイ反射、第 16 回 Osteoimmunology Forum (招待講演)、2019 年
2. 村上正晃、Specific neural activations establish gateways for autoreactive T cells to enter the CNS、第 47 回日本免疫学会学術集会 (招待講演)、2018 年
3. 村上正晃、局所神経免疫相互作用の新しい基盤「ゲートウェイ反射」、第 41 回日本分子生物学会年会 (招待講演)、2018 年

4. 村上正晃、Neural Stimulations Modulate the Formation of Immune Cell Gateways into the CNS、Keystone Symposia (招待講演)(国際学会)、2018年
5. 村上正晃、微生物の中枢神経系への侵入経路およびその分子機構の解明、公益財団法人発酵研究所 第11回助成研究報告会、2017年
6. 村上正晃、新しい神経免疫系連関のコンセプト「ゲートウェイ反射」とは?、第28回日本生体防御学会学術総会(招待講演)、2017年
7. 村上正晃、Gateway reflexes, a new paradigm of neuro-immune crosstalk、GI-CoRE GSQ, GSB, & IGM JOINT SYMPOSIUM: Quantum, Informatics, Biology, & Medicine、2017年
8. 村上正晃、ゲートウェイ反射による炎症性疾患の制御、日本筋学会第3回学術集会(招待講演)、2017年
9. 村上正晃、新しい神経-免疫のクロストーク:ゲートウェイ反射による疾患抑制、TEN TOPICS IN RHEUMATOLOGY 2017、2017年
10. 村上正晃、Gateway Reflex, a new paradigm of neuro-immune crosstalk、AMED-ライブニッツ協会主催国際ワークショップ The German-Japan joint workshop on Neuroimmunology(招待講演)(国際学会)、2017年
11. 村上正晃、ゲートウェイ反射による慢性炎症および臓器の機能連関の制御、第97回北海道医学大会病理系分科会(第50回北海道病理談話会)(招待講演)、2017年
12. 村上正晃、“病は気から”の分子メカニズム キラーストレスはどのようにして消化管疾患や突然死をもたらすか?、第72回日本大腸肛門病学会学術集会、2017年
13. 村上正晃、Gateway Reflex, a New Concept of Neuroimmunology、第46回日本免疫学会学術集会(招待講演)、2017年
14. 村上正晃、Gateway Reflex, a Novel Concept of Neuro-Immune Cross Talk、2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年
15. 村上正晃、Gateway Reflex, a Novel Concept of Neuro-Immune Cross Talk、International Symposium on Geriatrics and Gerontology (ISGG)(招待講演)、2017年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: ストレス負荷が関与する疾患を予防及び/又は治療するための医薬

発明者: 村上正晃、上村大輔

権利者: 国立大学法人北海道大学

種類: 特許

番号: 特願 2018-164092

出願年: 2018年

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/neuroimmune/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：上村 大輔

ローマ字氏名：Daisuke Kamimura

研究協力者氏名：有馬 康伸

ローマ字氏名：Yasunobu Arima

研究協力者氏名：白川 正輝

ローマ字氏名：Masaki Shirakawa

研究協力者氏名：芝 大

ローマ字氏名：Dai Shiba

研究協力者氏名：湯元 茜

ローマ字氏名：Akane Yumoto

研究協力者氏名：上田 泰己

ローマ字氏名：Hiroki Ueda

研究協力者氏名：田井中 一貴

ローマ字氏名：Kazuki Tainaka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。