

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659221

研究課題名(和文) オプトジェネティクスによる新たな疾患モデルの提案

研究課題名(英文) Proposal of a disease model by optogenetics

研究代表者

村上 正晃 (Masaaki, Murakami)

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：現在までに光感受性イオンチャンネルをThy1プロモーターの下流にて発現させたトランスジェニックマウスを用いて、第五腰髄の交感神経節付近に光ファイバーを導入して刺激した。光刺激により第五腰髄背側血管にてケモカインの発現が有為に増強された。さらに光刺激の強度、時間とケモカインの発現強度が相関することが分かった。次に自己抗原(MOG)を認識するヘルパーT細胞を静脈内投与して光刺激を行うと、その刺激依存的に病気が誘導されることが明らかとなった。これは神経活性化により病態が誘導されたことを示しており、今後の病態解析において重要なモデルを提唱することができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have stimulated nerves in sympathetic ganglia around the fifth lumbar cord by using light stimulation in Thy1 channel rhodopsin transgenic mice. This stimulation induced the increment of chemokine expression in dorsal vessels in the fifth lumbar cord. Furthermore, an intensity of chemokine expression was correlated with intensity and times of light stimulations. And we could induce the development of EAE by using light stimulations for sympathetic ganglia in MOG reactive T cell transferred mice. This result indicated that regional neural activation could induce the development of EAE and put forward a new model to analysis of autoimmune diseases including multiple sclerosis.

研究分野：免疫学

キーワード：神経活性化 炎症回路 炎症反応

1. 研究開始当初の背景

オプトジェネティクスは、K.Deisseroth 博士らが、細胞株にて光と光感受性のイオンチャンネルによって、神経を人為的に刺激できることを示して始まった学問分野である。その後光感受性のイオンチャンネルを細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウスや、部位特異的に発現させるためのウイルスベクターを用いて生体内でも神経活動を人為的に活性化/抑制するなど制御できるようになった。特に光ファイバーを用いた方法にて脳の特定の制御野に刺激を入れながら飼育することで、精神活動(不安等)の制御も可能になった。しかし現在までにオプトジェネティクスを免疫学/炎症学の分野に応用した事例が無かった。我々は近年、1型コラーゲン陽性細胞に STAT3 と NF- κ B の協調的な活性化が生じると大過剰量のケモカインや IL-6 等の炎症誘導因子を発現させて局所的に炎症を誘導する機構「炎症回路」が、定常状態において第五腰椎の背側血管の血管内皮細胞において交感神経末端から分泌される神経伝達物質ノルアドレナリンにより有為に増強され、過剰なケモカインを産生していること、さらにその部位が免疫細胞の中樞神経系への侵入口であり、多発性硬化症のマウスモデル EAE において病態の形成に重要であることが明らかになっていた。

2. 研究の目的

本研究提案では、ストレスなどによって誘導される神経の局所的な活性化が、どのように自己免疫疾患/炎症性疾患を誘導するのかを説明するために、血管内皮細胞の活性化と神経刺激に注目して「オプトジェネティクスの手法」を用いて、「免疫細胞の中樞神経系への侵入口」を人為的に制御できるか、さらに中樞神経系疾患だけでなく、様々な一般臓器の血管部位にも人為的に免疫細胞の侵入口を形成できるかについても検証する。もしこの技術が開発できれば、血中に自己反応性 T 細胞を移入し、様々な臓器特異的に CD4 陽性 T 細胞/MHC2 依存性の自己免疫疾患/慢性炎症疾患を誘導できるかを動物モデルにて検証する。このモデルを自己反応性 T 細胞の血中への移入 + 特定臓器の血管内皮細胞の神経刺激依存性の活性化を『自己免疫疾患の 2 コンディショナルモデル』として発表する。その後様々な炎症性疾患の患者にて、臓器に分布している自律神経/感覚神経の活性化状態や血管内皮細胞の状態を解析する。これにより新規の分子機構を提唱し、新規治療法、治療薬の創出への新たな道を開くことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究提案は、スタンフォード大学の Deisseroth 博士らが開発した光刺激によって神経を人為的に活性化もしくは抑制化することができる最新技術であるオプトジェネ

ティクスを用いて、神経活動と免疫反応のリンクを詳細に証明し、臓器特異的な自己免疫疾患/炎症性疾患の原因の 1 つとして過剰な神経活性化が存在することを分子生物学的に説明することを目指す。この目的を達成するために光受容体であるロドプシンを発現するトランスジェニックマウスを用いて、神経の活性化を興奮性/抑制性に制御し各種実験を行う。具体的には、光受容体特異的な波長のレーザー光を、光ファイバーを通じて目的の神経部位へ照射することによって神経の活性化/抑制化を行う。本研究では、まず後根神経節を刺激することで、多発性硬化症モデル EAE の病態が変化するかについて解析を行う。さらに脳内の各種神経野/神経核や腹腔神経節などの各神経節を刺激し、どの臓器で炎症回路が活性化するかについて免疫染色法を用いて解析する。さらに炎症回路が顕著に活性化している臓器において自己免疫疾患を誘導できるかについて解析する。

4. 研究成果

Duke 大学から導入した光感受性イオンチャンネルを神経細胞特異的に発現させるために、Thy1 プロモーターの下流にて強制発現させたトランスジェニックマウスを用いて、我々が発見した EAE 病態の初発部位である第五腰椎近傍の交感神経節あるいは交感神経幹付近に光ファイバーを導入してそれらの神経を光刺激した(光ファイバーは頭部から皮下に挿入し目的の部位まで移行させた後に固定し、マウスの行動ができるだけ制限されないようにした)。この光刺激により第五腰椎背側血管にてケモカインの発現が有為に増強された。我々は、ふくらはぎのヒラメ筋への電気刺激によって第五腰椎近傍交感神経節を介した第五腰椎背側血管におけるケモカイン産生の上昇を以前に報告していることから、今回の光刺激によって、我々が発見した「ゲートウェイ反射」を再現できることが判明した。さらに光刺激の強度、時間とそのケモカインの発現強度が正の相関を示すことが分かった。次に EAE を発症させる中樞神経系の自己抗原(ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質)を認識する活性化ヘルパー T 細胞を静脈内投与して、それと同時に光刺激を行うと、その刺激強度依存的に病気が誘導されることが明らかとなった。これは神経の活性化により病態を誘導できることが明らかとなったとともに、他の神経活性化によりこの病態形成を抑制することができることや、中樞神経系だけではなく、他の一般臓器への T 細胞集積を誘導できることを強く示唆しており、今後の病態解析において重要なモデルを提唱することができたと考えられる。

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 21 件)

1. Maeda, K., T. Kosugi, W. Sato, H. Kojima, Y. Sato, D. Kamimura, N. Kato, N. Tsuboi, Y. Yuzawa, S. Matsuo, M. Murakami, S. Maruyama, K. Kadomatsu. CD147/Basigin limits lupus nephritis and TH17 cell differentiation by inhibiting the IL-6/STAT3 pathway. *Arthritis Rheumatol.* 2015 In press. doi: 10.1002/art.39155 査読有り
2. Kamimura, D., A. Stofkova, N. Nishikawa, T. Atsumi, Y. Arima, M. Murakami. Immune Cell Gateways in the CNS Regulated by Regional Neural Stimulations. *Clin Exp Neuroimmunol.* 2015 In press. doi: 10.1111/cen3.12198 査読有り
3. Harada, M., D. Kamimura, Y. Arima, H. Kohsaka, Y. Nakatsuji, M. Nishida, T. Atsumi, J. Meng, H. Bando, R. Singh, L. Sabharwal, J.-J. Jiang, N. Kumai, N. Miyasaka, S. Sakoda, K. Yamauchi-Takahara, H. Ogura, T. Hirano and M. Murakami. Temporal Expression of Growth Factors Triggered by Epiregulin Regulates Inflammation Development. *J. Immunol.* 194(3):1039-46, 2015, doi: 10.4049/jimmunol.1400562 査読有り
4. Sabharwal, L., D. Kamimura, J. Meng, H. Bando, H. Ogura, C. Nakayama, J.-J. Jiang, N. Kumai, H. Suzuki, T. Atsumi, Y. Arima and M. Murakami. The Gateway Reflex, which is mediated by the inflammation amplifier, directs pathogenic immune cells into the CNS. *J. Biochem.* 156(6):299-304, 2014, doi: 10.1093/jb/mvu057. 査読有り
5. Hojyo S., T. Miyai, H. Fujishiro, M. Kawamura, T. Yasuda, A. Hijikata, B-H Bin, T. Irié, J. Tanaka, T. Atsumi, M. Murakami, M. Nakayama, O. Ohara, S. Himeno, H. Yoshida, H. Koseki, T. Ikawa, K. Mishima, and T. Fukada. Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 controls humoral immunity by modulating B-cell receptor signal strength. *Proc Natl Acad Sci USA* 12;111(32):11786-91, 2014, doi: 10.1073/pnas.1323557111. 査読有り
6. Atsumi, T., R. Singh, L. Sabharwal, H. Bando, J. Meng, Y. Arima, M. Yamada, M. Harada, J.-J. Jiang, D. Kamimura, H. Ogura, T. Hirano, and M. Murakami. Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer Research* 74(1): 8-14, 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2322 査読有り
7. Ogura, H., T. Atsumi, H. Bando, L. Sabharwal, M. Yamada, J.-J. Jiang, A. Nakamura, Y. Arima, D. Kamimura, and M. Murakami. The reverse-direction method links mass experimental data to human diseases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 62(1): 41-45, 2014, doi: 10.1007/s00005-013-0255-9 査読有り
8. Mori, Y, M. Murakami#, Y. Arima, D. Zhu, Y. Terayama, Y. Komai, Y. Nakatsuji, D. Kamimura, and Y. Yoshioka (#, correspondence) Early pathological alterations of lower lumbar cords detected by ultra-high field MRI in a mouse multiple sclerosis model. *Int Immunol.* 26(2): 93-101, 2014, doi: 10.1093/intimm/dxt044 査読有り
9. Kamimura, D., M Yamada, M Harada, L. Sabharwal, J Meng, H Bando, H Ogura, T Atsumi, Y Arima, M. Murakami. The gateway theory: bridging neural and immune interactions in the CNS. *Front. Neurosci.* doi: 10.3389/fnins.2013.00204 査読有り
10. Singh, R., T Atsumi, H Bando, M Harada, A Nakamura, M Yamada, J-J Jiang, H Suzuki, K Katsunuma, T Nodomi, D Kamimura, H Ogura, M. Murakami. Reverse direction method: A possible tool to link animal models with corresponding human diseases and disorders. *Int. J. Genomic Med.* 1:106. doi: 10.4172/ijgm.1000106, 2013 査読有り
11. Kamimura, D., M Yamada, L Sabharwal, H Ogura, Y Okuyama, A Nakamura, T Atsumi, Y Arima, M. Murakami. The Gate Theory Explains Regional Neural Regulation of Activated T cells Entering the Central Nervous System. *Journal of Clinical & Cellular Immunology* 4:156 doi: 10.4172/2155-9899.1000156 査読有り
12. Murakami M#, M Harada, D Kamimura, H Ogura, Y Okuyama, N Kumai, A Okuyama, R Singh, J Jiang, T Atsumi, S Shiraya, Y Nakatsuji, M Kinoshita, H Kohsaka, M Nishida, S Sakoda, N Miyasaka, K Yamauchi-Takahara, T Hirano# (#, correspondence) Disease-Association Analysis of an Inflammation-Related Feedback Loop. *Cell Reports.* 3: 946-959, 2013, doi: 10.1016/j.celrep.2013.01.028 査読有り

13. Sasaki M, A Tojo, Y Okochi, N Miyawaki, D Kamimura, A Yamaguchi, M Murakami, Y Okamura. Autoimmune disorder phenotype in HVCN1-deficient mice. *Biochem. J.* 450: 295-301, 2013, doi: 10.1042/BJ20121188. 査読有り
14. Lee J, T Nakagiri, D Kamimura, M Harada, T Oto, Y Susaki, Y Shintani, M Inoue, S Miyoshi, E Morii, T Hirano, M Murakami#, M Okumura. (#, correspondence) IL-6 amplifier activation in epithelial regions of bronchi after allogeneic lung transplantation. *Int Immunol.* 25: 319-332, 2013, doi: 10.1093/intimm/dxs158 査読有り
15. Kusu T, H Kayama, M Kinoshita, S Gyu-Jeon, Y Ueda, Y Goto, R Okumura, H Saiga, T Kurakawa, K Ikeda, Y Maeda, J Nishimura, Y Arima, K Atarashi, K Honda, M Murakami, J Kunisawa, H Kiyono, M Okumura, M Yamamoto, K Takeda. Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 7 Controls Th17 Cell Responses through Regulation of Luminal ATP in the Small Intestine. *J Immunol.* 190: 774-783, 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1103067. 査読有り
16. Arima Y, D. Kamimura, L. Sabharwal, M. Yamada, H. Bando, H. Ogura, T. Atsumi and M Murakami. Regulation of Immune Cell Infiltration into the CNS by Regional Neural Inputs Explained by the Gate Theory. *Mediators of Inflammation.* vol. 2013, Article ID 898165, 8 pages, 2013. doi:10.1155/2013/898165 査読有り
17. Ogura H, Y. Arima, D. Kamimura, and M Murakami. The Gate Theory: How Regional Neural Activation Creates a Gateway for Immune Cells via an Inflammation Amplifier. *Biomedical J.* 36(6): 269-273, 2013, doi: 10.4103/2319-4170.113187. 査読有り
18. Lee J, T Nakagiri, T Oto, M Harada, E Morii, Y Shintani, M Inoue, Y Iwakura, S Miyoshi, M Okumura, T Hirano, M Murakami. IL-6 Amplifier, NF- κ B-Triggered Positive Feedback for IL-6 Signaling, in Grafts Is Involved in Allogeneic Rejection Responses. *J Immunol.* 189: 1928-1936, 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1103613. 査読有り
19. Kayama H, Y Ueda, Y Sawa, SG Jeon, JS Ma, R Okumura, A Kubo, M Ishii, T Okazaki, M Murakami, M Yamamoto, H Yagita, K Takeda. Intestinal CX3C chemokine receptor 1high (CX3CR1high) myeloid cells prevent T-cell-dependent colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109: 5010-5015, 2012, doi: 10.1073/pnas.1114931109. 査読有り
20. Murakami M#, T Hirano. (#, correspondence) The Molecular Mechanisms of Chronic Inflammation Development *Front. Immunol.* 07 October 2012 | doi: 10.3389/fimmu.2012.00323 査読有り
21. Murakami M#, T Hirano. The pathological and physiological roles of IL-6 amplifier activation. (#, correspondence) *Int. J. Biol. Sci.* 8: 1267-1280. 2012, doi: 10.7150/ijbs.4828 査読有り

〔学会発表〕(計6件)

1. 第39回日本リンパ学会総会(招待講演)
2015年3月27日 お茶の水ソラシティーカンファレンスセンター(東京都千代田区)

村上正晃

炎症回路の神経制御とリンパ球に与える影響

2. 第120回日本解剖学会・第92回日本生理学会合同大会(招待講演)
2015年3月22日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

村上正晃

炎症回路と慢性炎症

3. Cytokines Down Under 2014: From Bench to Beyond(招待講演)
2014年10月26日~29日 Melbourne Convention & Exhibition Center(オーストラリア、メルボルン)

村上正晃

Regional neural regulation of inflammation amplifier

4. 理研IMS-日本免疫学会合同国際シンポジウム2014(招待講演)
2014年6月26日~27日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

村上正晃

Local neural activation enhances inflammation responses

5. 第41回日本免疫学会学術集会（招待講演）
2012年12月5日～7日 神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

村上正晃

Local neural activation enhances IL-6 amplifier in the CNS

6. 第40回日本臨床免疫学会総会（招待講演）
2012年9月27日 京王プラザホテル（東京都品川区）

村上正晃

IL-6 amplifier and chronic inflammation

〔図書〕（計 1 件）

1. Kamimura, D., Y. Arima, T. Hirano, H. Ogura, and M. Murakami. IL-6 and inflammatory diseases. Cytokine Frontiers: Regulation of Immune Responses in Health and Disease. Springer, 396 pages (53-78 pages), 2013, ISBN-13: 978-4431544418 査読有り

〔その他〕

ホームページ等

北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野

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

6 . 研究組織

(1)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