

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08525

研究課題名(和文) 神経免疫炎症における異物除去蛋白質AIMの役割の解析

研究課題名(英文) The role of AIM in immuno-inflammation

研究代表者

坂田 大治 (SAKATA, DAIJI)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：70456870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：異物除去蛋白質であるAIM (Apoptosis inhibitor of macrophage)の神経免疫炎症での役割を解明すべく、マウスのアルツハイマー病(AD)モデルを立ち上げた。ADモデルとしてヒトの家族性AD患者に見られる遺伝子変異のうち、AD発症に重要な役割を果たすと考えられているAPP(Amyloid precursor protein)遺伝子上に4つの変異を導入したトランスジェニックマウスを作成し、実際に脳でのA $\beta$ の蓄積が認められることを確認した。今後、これらのマウスの解析によりAIMのAD病態での役割が明らかになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of AIM (Apoptosis inhibitor of macrophage) in neuroimmuno-inflammation, we established a mouse model of Alzheimer disease (AD). As a model of human AD, we generated APP (amyloid precursor protein) transgenic mice which have 4 different mutations on human APP gene (the mutations are originally seen in some types of human AD patients), and confirmed that those mice have A $\beta$  accumulation in their brain. We expect that those mice should be a strong tool for analyzing roles of AIM in AD pathology.

研究分野：免疫学、薬理学、神経免疫学

キーワード：免疫 炎症 神経免疫炎症 神経変性疾患 アトピー アルツハイマー 痒み

## 1. 研究開始当初の背景

近年、アルツハイマー病や脳梗塞など様々な神経関連疾患での免疫系の関与が明らかとなっている。実際、これらの病態では、異常蓄積した  $\beta$  アミロイドや血流遮断により神経細胞死が誘導され、その際に放出される DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) が周辺のミクログリアや脳に浸潤したマクロファージなどを活性化し、結果として炎症反応を引き起こす。脳には過剰な炎症反応を制御するための機構が存在すると予想されるが、詳細は不明である。AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) は組織マクロファージが分泌する蛋白質であり、癌細胞の除去などに関与することが示されている。本研究はアルツハイマー病や脳梗塞などの神経免疫炎症の場で観察される異常蛋白質や死細胞の除去がどのような機構によりなされるのか、特に AIM 蛋白質に着目し、その生理的な役割を明らかにすることを目的に開始された。

## 2. 研究の目的

近年、アルツハイマー病や脳梗塞の病態での免疫系の関与が明らかにされつつある。アルツハイマー病では  $\beta$  や高度にリン酸化したタウ蛋白質が神経細胞の内外に蓄積し、これらの異常蛋白質が細胞毒性を発揮することで神経細胞死が起こり、最終的にアルツハイマー型認知症の発症に繋がると考えられている。一方、これら傷害を受けた神経細胞からは ATP や HMGB1 などを含む様々な DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) や炎症性サイトカインが放出または産生される。これらの DAMPs や炎症性サイトカインが脳内のマクロファージとも言われるミクログリアなどの活性化・炎症反応を引き起こし、このような慢性炎症状態が更なる神経細胞死に繋がるとも考えられている。 $\beta$  については TLR (Toll-like receptor) を介して直接ミクログリアを活性化することも知られている。脳梗塞病態においても、血流遮断により傷害を受けた神経細胞から放出される DAMPs が、末梢から脳内に浸潤したマクロファージを TLR2/4 依存的に活性化し、さらには活性化マクロファージ由来の IL-23 が同じく末梢から浸潤した  $\gamma\delta$  型 T 細胞からのサイトカイン産生誘導を引き起こすことで更なる神経細胞傷害に繋がることが示されている (Shichita et al., Nat.Med., 2009, Shichita et al., Nat.Med., 2012)

上述のようにアルツハイマー病や脳梗塞の病態では、 $\beta$  のような異常蛋白質の蓄積や傷害を受けた神経細胞からの DAMPs 及び炎症性サイトカインの放出により、様々なレベルの炎症が惹起される。胸腺ではアポトーシスを起こした未成熟 T 細胞は速やかに周辺のマクロファージによって取り込まれるが、脳・神経系でも同様に死細胞や異常蛋白質を

除去する機構が存在し、このような機構が過度の炎症を抑える恒常性維持機構として元来生体に備わっていると考えられる。例えば、 $\beta$  はミクログリアが発現するスカベンジャー受容体 CD36 を介して取り込まれることが示されており、また一方で、神経傷害時の死細胞の除去機構については、プリオン病のマウスモデルで MFG8 (milk fat globule epidermal growth factor 8) がその役割を果たすことが示されている (Kranich et al., J Exp. Med., 2010)。しかしながら、このようなミクログリアによる異物除去機構は実験系やマウスの系統によって、炎症を収束させるとも、更なる炎症を惹起するとも報告され、統合的な理解には至っていない。本研究の目的は、アルツハイマー病や脳梗塞などの神経免疫炎症の場において異常蛋白質や死細胞がどのような機構により処理されるのか、特に AIM 蛋白質に着目してその役割を明らかにすることである。AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) は、スカベンジャー受容体システインリッチスーパーファミリー (SRCR-SF) に属する約 50kDa の蛋白質であり、その名の通り、マクロファージのアポトーシスを抑制する分子として当該研究者の所属研究室にて同定された (J. Exp. Med., 189;413-422, 1999)。AIM は主に組織マクロファージが発現し、分泌蛋白として血中や組織液中に放出され、ヒトやマウスでは様々な血中濃度で検出される。AIM の血中濃度および局所発現レベルは病態によって変化し、例えば、高カロリー食を与えることにより肥満を誘導したマウス血中や動脈硬化巣のマクロファージでは明らかな発現上昇が認められる。動脈硬化巣にてマクロファージが様々なアポトーシス誘導因子に暴露されているにも関わらず、長期に渡って生存し続け、慢性炎症を引き起こすのは、マクロファージ自身が産生する AIM によるアポトーシス阻害作用によることが当該研究室の AIM 欠損マウスを使った研究により示されている (Arai et al., Cell Metab., 1;201-213, 2005)。また、最近この分子が肥満や癌などといった様々な病態に関与することが明らかとなり、特に癌の病態では、病態の初期に AIM が癌細胞に結合することで、それが eat-me signal として働き、マクロファージにより速やかに癌細胞が除去されることが示された (Maehara et al., Cell Rep., 9;61-74, 2014)。この知見は、AIM が生体で異物除去分子として働くことを示唆する。事実、当該研究者らは腎臓病モデルマウスで、傷害された尿細管細胞が AIM 依存的に取り除かれることを見出し (Arai and Kitada et al., Nat Med., 2016)、このような AIM による異物除去機構は、脳を含む生体の様々な部位で普遍的に

存在する恒常性維持機構である可能性がある。

### 3. 研究の方法

本研究では、当研究室で独自に作成した AIM 欠損マウスや脳特異的に AIM を発現するマウス ( AIM-brain TG mouse ) にアルツハイマー病および脳梗塞のモデルを適用することで、以下のことを明らかにしたいと考えている。

まず神経免疫炎症の場での異物除去における AIM の役割を個体レベルで明らかにする。

リコンビナント AIM 蛋白質をこれらの疾患モデル動物に投与することで、治療効果が見られるか否か ( 場合によっては増悪作用も予想される ) を評価する。

脳スライス培養系や神経細胞とミクログリアとの混合培養の系を使い、細胞・分子レベルで脳・神経系での異物除去システムにおける AIM の役割を明らかにする。

AIM は当該研究者の所属研究室で同定した分子であり、AIM に関する様々な研究で世界をリードしている。当該研究室で見出された AIM の知見は、肥満や癌といった現代社会が直面する様々な疾患に対するインパクトから、最近、多くの注目を集めつつある。本研究では、脳・神経系での AIM の働きに着目し、脳内異物除去システムの解析を行うことで脳内炎症制御機構の一端が明らかになることが期待される。脳内の炎症や異物除去機構は未解明な点が多い一方で、この分野の研究者人口は少なく、本研究は独創性の高い研究であると考えられる。また、応募者の研究室では、AIM 欠損マウスや AIM 発現トランスジェニックマウスの作成のみならず、アルツハイマー病モデルマウスの作成やリコンビナント AIM 蛋白質の発現・精製系まで、研究に必要なツールをほぼ独自に作り上げており、このような研究体制も独創的であると言える。

AIM 欠損 ( AIMKO ) マウス、脳特異的 AIM 発現トランスジェニックマウス ( AIM-brain マウス )、自然発症型アルツハイマー病モデルマウス ( AD マウス ) およびそれぞれの系統を掛け合わせたマウス ( AIM-KO AD および AIM-brain AD ) を使い、病理学的に A $\beta$  アミロイドの蓄積の程度を評価すると共に認知・記憶機能を解析する。 *In vitro* では、各遺伝子改変マウス由来の脳スライス培養系および神経細胞とグリア細胞の共培養系を用い、外来性に添加した A $\beta$  および死細胞の除去における AIM の役割を評価する。一方、AIM-KO マウスおよび AIM-brain マウスに脳梗塞モデルを適用し、それによって誘導される細胞死と炎症の程度を各遺伝子型マウスについて組織免疫染色や FACS 等により解析する。AIM の脳内異物除去における効果については両疾患モデルで浸透圧ポンプや AIM 発現アデノウイルスなどを用いて AIM を脳内導入し

長期的な作用についても評価する。

### 4. 研究成果

異物除去蛋白質である AIM ( Apoptosis inhibitor of macrophage ) の神経免疫炎症での役割を解明すべく、マウスを用いたアルツハイマー病モデルを立ち上げた。アルツハイマー病モデルについては、ヒトの家族性アルツハイマー病患者に見られる遺伝子変異のうち、アルツハイマー病発症に重要な役割を果たすと考えられている APP ( Amyloid precursor protein ) 遺伝子上に4つの変異を導入したトランスジェニック ( TG ) マウスの作製を試み、結果として8ラインのマウスを得た。これらのうち、2ラインについては繁殖が進んだため、APP から切り出されアルツハイマー病発症の原因の一つと考えられる A $\beta$  アミロイドの脳内での蓄積を指標にスクリーニングを行ったが、ある程度の A $\beta$  蓄積が認められたのは1ラインのみであった。その後、このラインをクリーン化し、SPF環境下で繁殖を進めている段階である。他のラインについては繁殖効率が悪く十分な数が得られていないため、解析が進んでいない。また、脳での AIM の機能を解析するため、脳特異的に AIM を発現する TG マウスや、DOX ( Doxycycline ) 誘導性に脳に AIM を発現するマウス、ミクログリア特異的に AIM を発現するマウスなどを作成、スクリーニングを行い、いくつかのラインについては目的のマウスができていることを確認した。今後、これらの TG マウス等を用いた研究を続けることで神経免疫炎症での AIM の役割が明らかとなることが期待される。当該研究者は、諸事情により、研究計画期間の途中で所属研究室が変更したため、研究テーマにも一部変更が生じた。このため、上記の研究に加えて、以下に示すようにアトピー性皮膚炎における痒みの研究も行った。IL-31 はアトピー性皮膚炎における主要な痒み惹起物質の一つであり、主に、炎症部位に浸潤した CD4<sup>+</sup> T 細胞により産生されるが、その産生制御の機序は明らかではなかった。当該研究者の現在の所属研究室では DOCK ファミリー分子の一つである DOCK8 欠損マウスを AND トランスジェニック ( Tg ) マウスと掛け合わせることで、このマウスがアトピー性皮膚炎様の病態を呈し、その血中には多量の IL-31 が存在することを見出した ( Yamamura et al., *Nat. Commun.*, 2017 )。さらに、このマウスの詳細な解析により、IL-31 の産生が Epas1 と呼ばれる転写因子により誘導され、DOCK8 は Epas1 を負に制御することを明らかとしている ( Yamamura et al., *Nat. Commun.*, 2017 )。IL-31 による痒みは、皮膚などの末梢で産生された IL-31 を脊髄後根節 ( DRG ) 神経が感知することで惹起されると考えられる。即ち、IL-31 を感知した DRG 神経細胞が何らかのメディエーターを放出することで、痒みの情報が脳に伝えられると考えられるが、その詳細なメカニズムは明らかでは

ない。当該研究者はこのメカニズムの一端を明らかにすべく、アトピー性皮膚炎様病態を呈するAND Tg/DOCK8欠損マウスからDRGを単離し、マイクロアレイやReal-time PCRなどを使ったDRGでの遺伝子発現解析を行うことで、痒みシグナルを脳に伝達すると考えられる分子の同定を試み、実際に、その候補分子を同定するに至った。この分子の欠損マウスを作成し、IL-31誘導性の搔破行動を解析した結果、野生型マウスと比較して、有意に搔破行動が低下していた。今後は、作成したこの候補分子の欠損マウスを用い、IL-31による痒みの誘導メカニズムを明らかにする予定である。

#### 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 3 件)

(1)Ushijima M., Uruno T., Nishikimi A., Sanematsu F., Kamikaseda Y., Kunimura K., Sakata D., Okada T., Fukui Y.

The Rac Activator DOCK2 Mediates Plasma Cell Differentiation and IgG Antibody Production.  
Front. Immunol., 9:243, (2018), 1-14

(2)Tomino T., Tajiri H., Tatsuguchi T., Shirai T., Oisaki K., Matsunaga S., Sanematsu F., Sakata D., Yoshizumi T., Maehara Y., Kanai M., Cote JF., Fukui Y., Uruno T.

DOCK1 inhibition suppresses cancer cell invasion and micropinocytosis induced by self-activating Rac1P29S mutation.  
Biochem Biophys Res Commun., 497(1), (2018), 298-304

(3)Shiraishi A., Uruno T., Sanematsu F., Ushijima M., Sakata D., Hara T., Fukui Y.  
DOCK8 Protein regulates Macrophage Migration Through Cdc42 Protein Activation and LRAP35a Protein Interaction.  
J. Biol. Chem., 292, (2017), 2191-2202

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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

該当なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

坂田 大治 (SAKATA Daiji)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号: 70456870

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし