

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：35302  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2016～2019  
課題番号：16K00408  
研究課題名（和文）シグナル伝達系の挙動に基づく神経系・免疫系の調節機構のシミュレーション法の確立  
  
研究課題名（英文）Development of simulation method of neuro-immune regulation mechanism based on signal transduction pathway  
  
研究代表者  
山田 訓（Yamada, Satoshi）  
  
岡山理科大学・工学部・教授  
  
研究者番号：20393506  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ゲートウェイ反射を題材に、シグナル伝達系パスウェイの挙動に基づき細胞内反応と細胞群の挙動を同時に計算して、神経系・免疫系の相互作用を計算する手法を確立した。血管内皮細胞の炎症アンブと呼ばれるIL-6/STAT3経路とNFkB経路からなる細胞内反応系をモデル化し、Th17細胞がケモカインで誘引され、血管内皮細胞内側に移動し、サイトカインを産生し、脊髄内に移動する過程をモデル化した。F759マウスと呼ばれるIL-6レセプタの突然変異マウスと野生型マウスの違いをシミュレーションし、実験結果と定性的に一致した。感受性分析により、IL-6/STAT3経路に関わる反応の方が影響が大きいことが分かった。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性硬化症の発症モデルとなりうるコンピュータモデルを構築できたので、このモデルを用いて多発性硬化症の発症メカニズムの解析が可能になり、生物学実験を減らすことができる。また、新規薬物や新規治療法の候補をモデルを使って提案することが可能になる。また、このモデルは炎症一般のモデルにも拡張可能であるので、種々の疾患の原因となる慢性炎症のモデル構築につなげることができる。慢性炎症がモデル化できれば、多くの疾患の発症メカニズムをモデルを使って分析できるようになる。

研究成果の概要（英文）：The computer model which contains the neural system and immune system and simultaneously calculates intra-cellular reactions and the population of cell groups was developed by constructing a model of the gateway reflex. The model contained the inflammation amplifier of IL-6/STAT3 and noradrenaline/NFkB pathways in endothelial cells, and the movement of Th17 around the endothelial cells. The model mimicked the infiltration of Th17 across the blood-brain barrier. The model predicted the differences between F759 mice and the wild-type mice. The differences were consistent with the experimental results. The sensitivity analysis of the model suggested that IL-6/STAT3 pathway is more important than noradrenaline/NFkB pathway.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：ゲートウェイ反射 シミュレーション 炎症アンブ IL-6 NFkB F759マウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫系の破綻により多くの疾患が発症する。新しい治療法を検討するためには、各疾患の発症メカニズムを解明することが必要である。免疫系には非常に多種類の細胞が含まれ、互いに影響を与えつつ、そのバランスの変化によって免疫系全体の応答が変化するという複雑なシステムである。さらに、免疫系内では、多種類のサイトカインが産生され、各サイトカインは様々な免疫系の細胞に働きかけ、各細胞の活動が変化する。さらに、各疾患では、免疫系の細胞が発症部位の細胞に働きかけ、その細胞が変化的ことが発症の重要なステップになるので、免疫系の細胞だけでなく、他の細胞との相互作用も考慮する必要がある。体内各部の免疫系の働きと体全体での調節のメカニズムを理解することが必要である。

シグナル伝達系パスウェイは細胞外の状況変化を感知し、適切な細胞応答をするための細胞内反応系である。各細胞は周囲にあるサイトカインを結合し、別の細胞に分化する、細胞数を変化させる、サイトカインを産生する、など多様な反応を引き起こす。各細胞はその変化を受けて細胞自身が変化するとともに、他の細胞に対しても何らかの影響を与え、他の細胞はその影響によってさらに変化を起こす。これらの一連の反応を理解するためには、シグナル伝達系パスウェイの挙動と細胞群の挙動を同時に計算する必要がある。疾患には免疫系の細胞だけでなく、他の細胞も関与しているので、免疫系の細胞群だけでなく、多種類の細胞群の挙動を同時に計算する必要がある。体内全体の調節を検討できるシステムを構築するためには、免疫系の細胞と臓器の細胞の相互作用を検討するだけでなく、神経系と臓器との相互作用を検討する必要がある。

我々は、未感作 T 細胞(Th0)内の転写因子活性化と相互作用をシミュレーションしつつ細胞群の挙動をシミュレーションするシステムを構築した。さらに、自己免疫疾患の一つであるリウマチの発症メカニズムを解明するために、関節部での滑膜細胞の細胞内シグナル伝達系パスウェイの反応を計算しつつ、免疫系の細胞群(Th17 と macrophage)との相互作用をシミュレーションするシステムを構築した。このシステムは免疫系と臓器細胞との相互作用を計算するシステムであり、神経系と免疫系や臓器細胞との相互作用を計算するシステムではなかった。従って、神経系と免疫系による体内調節機構をモデル化する準備は整っている。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内シグナル伝達系の挙動に基づき、神経系と免疫系による体内調節機構(臓器細胞の挙動の変化)をシミュレーションするシステムを構築することを目的とする。確立したモデルを用いると、疾患の発症過程を解析できるようになり、新規治療法や創薬につなげることができると考えられる。神経系と免疫系の相互作用のモデル化の題材として、多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎を用いて、交感神経の活性化により、脊髄において免疫細胞の中樞神経への侵入口を形成する「ゲートウェイ反射」を用いた。神経系の活性化により、免疫系が活性化され、血液脳関門を破るゲートを形成する反応で、神経系と免疫系の相互作用を分析する題材としてふさわしいと考えられる。ゲートウェイ反射を題材として、シグナル伝達系パスウェイの挙動に基づく、神経系・免疫系の細胞群の挙動を模擬するシミュレーションシステムの構築を行うことを目的とする。

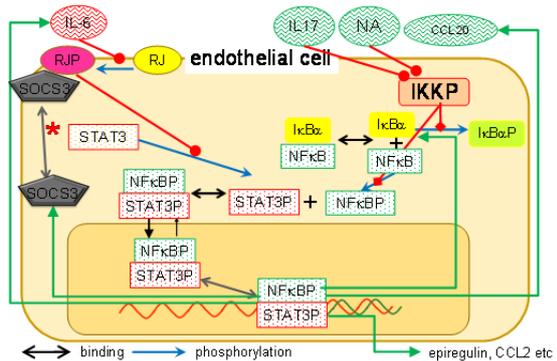


図1 血管内皮細胞のモデル

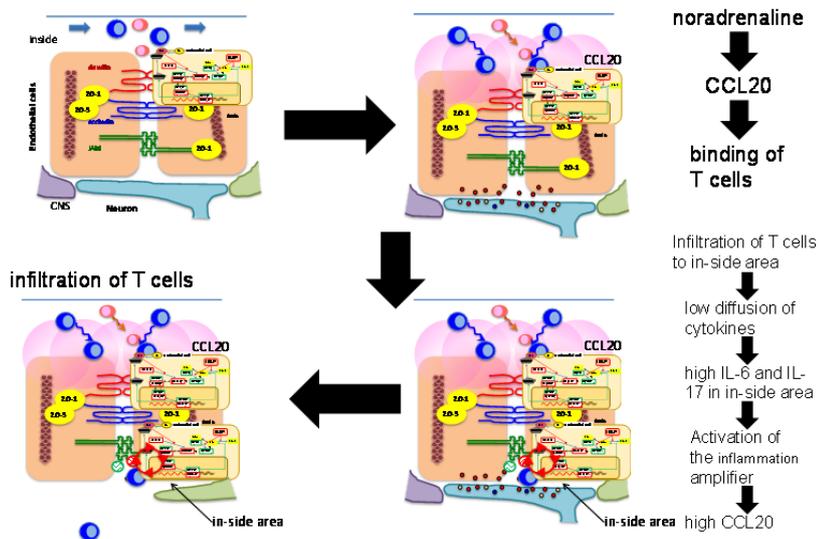


図2 ゲートウェイ反射のモデル

3. 研究の方法

ゲートウェイ反射では、各種の刺激により交感神経が活性化し、特有の位置の脊髄等の中枢神経に作用して血液脳関門を破るゲート

を形成する。ゲートウェイ反射では血管内皮細胞内の IL-6/STAT3 シグナル伝達系パスウェイとノルアドレナリン/NFκB シグナル伝達系パスウェイで構成される炎症アンプと呼ばれる細胞内反応系の活性化が重要であると考えられている。重力刺激は下肢のヒラメ筋に刺激を与え、交感神経を活性化し、第5腰椎付近の血管内皮細胞にノルアドレナリンを放出する。交感神経は神経伝達物質としてノルアドレナリンを放出するが、血管内皮細胞には NFκB シグナル伝達系パスウェイを活性化させるサイトカインとして作用する。サイトカインを大量に産生し、ゲート形成を行うためには、炎症アンプを活性化させる必要がある。図1は血管内皮細胞内の炎症アンプのモデルである。NFκB シグナル伝達系パスウェイは交感神経から放出されるノルアドレナリンで活性化されるが、IL-6/STAT3 シグナル伝達系パスウェイの活性化も炎症アンプの活性化には必要である。交感神経の活動電位によって、シナプス小胞から放出されて血管内皮細胞近傍で濃度が上昇する過程をモデル化し、交感神経の活動電位列によるノルアドレナリンの濃度変化をモデル化した。これにより、交感神経の発火パターンを入力としてシミュレーションできるようになる。血管内皮細胞がケモカインの一つであるCCL20を産生することにより、Th17細胞がゲートを通って脊髄内部に蓄積する様子をモデル化した。CCL20を大量に産生するためには、炎症アンプの活性化が必要であり、IL-6/STAT3 シグナル伝達系パスウェイの活性化が必要である。そのためには、IL-6が血管内皮細胞近傍で高濃度になることが必要である。そこで少量のCCL20によって誘導され血管内皮細胞の内側に入り込んだTh17がIL-6やIL-17を産生し、局所的に高濃度になるのではないかと仮定しモデル化した(図2)。IL-6やIL-17が局所的に高濃度になることにより、炎症アンプが活性化され、CCL20が高濃度になり、ゲートが形成される。モデルのパラメータは共同研究者である北海道大学村上が行った生物学実験結果に適合するように設定した。

#### 4. 研究成果

神経細胞のシナプスでは神経伝達物質はシナプス小胞中に蓄えられ、活動電位がシナプスに到達すると、細胞膜と融合して神経伝達物質をシナプス間隙に放出する。放出された神経伝達物質は再吸収などにより、

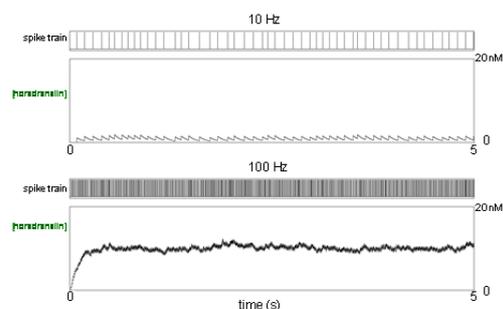


図3 シナプスにおけるノルアドレナリン放出

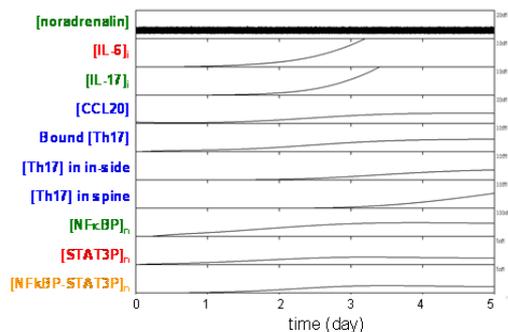


図4 モデルの時間経過

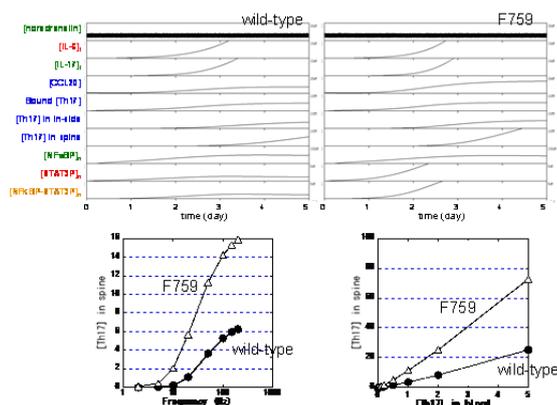


図5 モデルの発火頻度依存性とTh17濃度依存性の野生型とF759マウスの違い

#### Experimental results (stained by the antibody against MHCII)

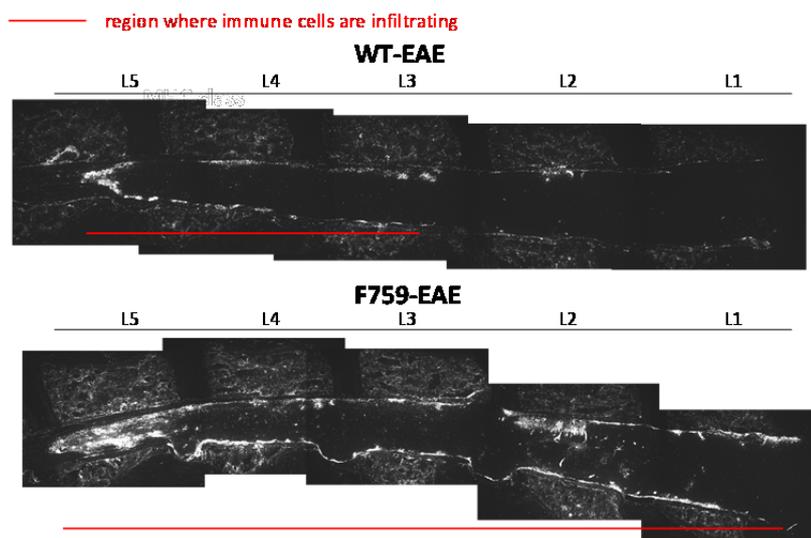


図6 第5腰椎付近に侵入した免疫細胞の顕微鏡写真

比較的速く濃度は減衰する。この過程をモデル化し、交感神経の活動電位列を入力することにより、血管内皮細胞近傍でのノルアドレナリン濃度の時間変化をシミュレーションできるようにした。図3は平均発火頻度10Hzと100Hzの場合の濃度変化を示している。交感神経では、約10Hzが平常時の発火頻度で、興奮すると発火頻度が増加し100Hz程度になると考えられる。10Hzではあまり高濃度にならないが、100Hzで高濃度になるようにパラメータを設定した。

図4はシミュレーションで得られた時間経過である。2番目と3番目は、血管内皮細胞の内側の空間でのIL-6とIL-17の濃度で、内側に入り込んだTh17細胞や血管内皮細胞によりサイトカインが産生され、内側に蓄積されていっている。産生されたCCL20により、Th17は血管内皮細胞に結合し、血管内皮細胞内側に移動し、形成されたゲートを通して脊髄内に移動し、脊髄内に蓄積している。

IL-6レセプタであるgp130の点突然変異で759番目のチロシンがフェニールアラニンに置換したF759マウスがある。リン酸化した759番目のチロシンはIL-6/STAT3シグナル伝達系パスウェイの抑制蛋白質であるSOCSの結合部位であるため、F759マウスではIL-6/STAT3シグナル伝達系パスウェイにSOCSによる抑制が働かないため、過剰に活性化され、活性化が持続する。図1のモデルで、SOCSとIL-6レセプタとの結合反応を除外することにより、F759マウスのモデルを構築した。野生型とF759マウスの両方で、刺激である交感神経の発火頻度依存性と血液中の自己免疫Th17細胞の濃度依存性をシミュレーションすると図5のようになった。F759マウスの方が、脊髄の侵入量が増加していることがわかる。さらに、平常時の10Hzにおいても少量ではあるが脊髄に侵入していることがわかる。下肢ヒラメ筋への重力による刺激は定常的に与えられているので、発火頻度の時間変化はあまりないと考えられる。しかし、第5腰椎の周辺では、第5腰椎よりも発火頻度が下がるが、少し上昇した状態ではないかと考えられる。図5の結果から、F759マウスの方が野生型マウスより、第5腰椎の周辺の広い範囲で免疫細胞の侵入が観察され、侵入した細胞も多いと予想される。図6は第5腰椎付近で脊髄に侵入した免疫細胞を顕微鏡で観察した結果である。F759マウス(下)の方が野生型マウス(上)より広い範囲に多数の細胞が侵入していることがわかり、シミュレーション結果と定性的に一致する結果が得られた。

構築したゲートウェイ反射モデルで、ある一つのパラメータの値だけを変化させ、そのパラメータ変化による全体の挙動の変化(今回は脊髄に侵入したTh17細胞の量)を調べるという感受性分析を行った。各反応のところに表示した四角内の曲線が、そのパラメータを変化させたことによる侵入したTh17細胞の量の変化を表している。変化量の大きいグラフを示すパラメータは、この反応系全体に対し大きな影響を持つ反応であると考えられる。その結果、図7の結果が得られた。Th17細胞の吸着や移動に関するパラメータやCCL20産生に関するパラメータは大きな変化を示したが、IL-6/STAT3シグナル伝達系パスウェイに含まれる反応のパラメータの方がNFκBシグナル伝達系パスウェイの反応のパラメータより影響が大きいことが分かった。この結果で影響の大きい反応は、新規薬物や新規治療法の候補となるのではないかと考えられる。

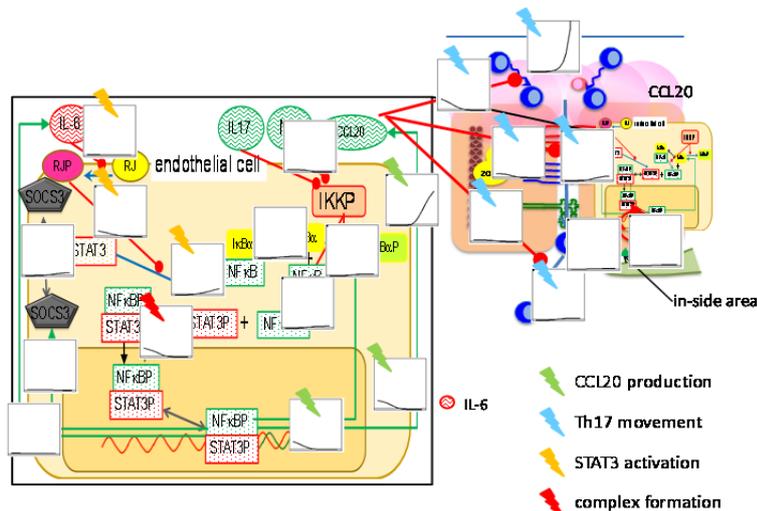


図7 ゲートウェイ反射モデルの感受性分析結果

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1 . 発表者名 Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura, Daisuke Kamimura, Masaaki Murakami
2 . 発表標題 Computer model of a gateway of immune cells across blood-brain barrier
3 . 学会等名 Cytokines 2019 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura, Daisuke Kamimura, Masaaki Murakami
2 . 発表標題 Computer model of a gateway of immune cells across blood-brain barrier
3 . 学会等名 第 4 8 回日本免疫学会学術集会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura, Daisuke Kamimura, Masaaki Murakami
2 . 発表標題 Computer model of a gateway of immune cells across blood-brain barrier
3 . 学会等名 第 4 7 回日本免疫学会総会・学術集会
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura, Yasunobu Arima, Masaaki Murakami
2 . 発表標題 Computer model of a gateway of immune cells across blood-brain barrier
3 . 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 ( 第 4 0 回日本分子生物学会 )
4 . 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura, Yasunobu Arima, Masaaki Murakami
2. 発表標題 Computer model of a gateway of immune cells across blood-brain barrier
3. 学会等名 第46回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura, Toru Atsumi, Masaaki Murakami
2. 発表標題 Computer model analysis of the difference between F759 and wild type mice in rheumatoid-like arthritis emergence
3. 学会等名 16th International Congress of Immunology (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山田訓、吉村昭彦、有馬康伸、村上正晃
2. 発表標題 血液脳関門に存在する免疫細胞の侵入口形成のコンピュータモデル
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Satoshi Yamada, Akihiko Yoshimura, Yasunobu Arima, Masaaki Murakami
2. 発表標題 Computer model of a gateway of immune cells across blood-brain barrier
3. 学会等名 第45回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2016年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----