

平成 21 年 6 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591710

研究課題名（和文） 脳および神経幹細胞における TLR 分子の発現解析

研究課題名（英文） Expression analysis of TLR molecules in brain and neural stem cells

研究代表者

有田 憲生（ARITA NORIO）

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：80159508

研究成果の概要：

ヒト成人脳組織、胎児由来性神経幹細胞および各種分化誘導因子による神経系細胞、星細胞系細胞における TLR2、TLR4 分子の発現は確認されず、中枢神経系正常発生における上記 2 分子の果たしている役割は明らかにされなかった。ヒト脳腫瘍摘出組織を用いた TLR 分子の発現解析では神経膠腫、脳原発性悪性リンパ腫ともに TLR 分子の有意な発現を明らかに同定できず、これら疾患における関与も明らかにされなかった。マウス正常脳、脳 stab wound 損傷マウスを用いた研究でも損傷に対する組織反応、治癒機転どの時期においても reactive astrocyte と TLR 分子発現の相関を明瞭に示す知見は得られなかった。悪性脳腫瘍に対する免疫療法と自然免疫の関係を調べるため、まず WT1 腫瘍抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞（ヘルパー T 細胞（Th））の役割を以下のように明らかにした。(1)MHC class II 拘束性にマウス WT1 特異的 CD4 陽性 T 細胞を誘導できるマウス WT1 エピトープを同定し、in vivo で class II 拘束性 WT1 特異的 CD4 陽性 T 細胞による WT1 特異的 CTL の誘導活性化に対する影響およびそのメカニズム解析を行い、複数の HLA タイプに対して特異的 CD4 陽性 T 細胞の反応が誘導されることを確かめた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：Toll like receptor, 自然免疫, 脳腫瘍, WT1, 免疫療法

1. 研究開始当初の背景

TLR 研究の展開

無脊椎動物や植物において Toll like receptor (TLR) が自然免疫担当分子として重要な役割を演じていることが判明した。TLR には 10 種以上が存在し、それぞれが最近壁

成分のペプチドグリカン、DNA ウイルスの CpG モチーフなどを特異的に認識して感染に対抗することも明らかになった。TLR はヒトを含むほ乳類にも存在することも証明され、研究開始時には TLR の機能解析が急速に展開していた。その結果、TLR が自然免疫担当分子としての感染防御を担う以外にサイトカインネットワークを介した肝臓切除後の肝臓

修復、再生や動脈硬化、虚血耐性など想像以上に多彩な機能を有していることが示されつつあり、多様な疾患や病態に関与している可能性が示唆されていた。

中枢神経系と自然免疫

研究開始当初、上記に関する研究報告はきわめて少なく以下の様な報告が散見されるのみであったが、中枢神経系においても自然免疫が機能している可能性やTLRが疾患の予防や発生に関与している可能性を強く示唆するものであると考えられた。

(1) ヒト培養 astrocyte は TLR3 (RNA ウィルスにより産生される 2 重鎖 RNA を認識する) を発現している。対応するリガンドで刺激されると astrocyte は T リンパ球および B リンパ球の遊走因子を産生した。TLR3 が中枢神経系のウイルス感染に対する初期反応に関わっている可能性がある。

(2) TLR2 遺伝子の特定の polymorphism と単純ヘルペス脳炎発症との間に関連性がある。

(3) MyD88 は TLR の細胞内シグナル伝達に関与する共通の分子である。MyD88 ノックアウトマウスでは、マクロファージの浸潤が減少し、動脈硬化性病変の進行が抑制される。脳血管障害の発症リスクに TLR が関与している可能性がある。

(4) 実験動物において TLR シグナル伝達を抑制すると、脳虚血に対する耐性を高めることができる。TLR が脳虚血による中枢神経系細胞障害に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 神経幹細胞や正常脳組織における TLR の発現を調べ、その発現様式や分布などの特徴を明らかにすること。

中枢神経系の発生過程における TLR の発現やシナプス形成など神経ネットワークが成立する過程で自然免疫が関わっているか、関わっているとしたりどの段階かなどといった点や、TLR が中枢神経系組織のどの部位やどの細胞に発現しているかどうかといった基本的な点についても明らかになっている点はほとんど無い。そこで、正常の発生過程や成熟組織における TLR の発現を調べ、上記の様な基本的な面を明らかにする。

(2) 中枢神経系疾患における自然免疫の関与を明らかにする。

神経組織は無脊椎動物の中でも昆虫など複雑な脈管系を持たない原始的生物においても見られる。これらの生物では自然免疫が中心的役割を果たしていることから神経系疾患の免疫に自然免疫が関与しているか可

能性は高い。また、代表的な悪性脳腫瘍である膠芽腫は、腫瘍細胞の遊走能や浸潤能が高いこと、髄膜播種を頻繁におこすという特徴を有するにもかかわらず、他臓器の悪性腫瘍に比べて極めて遠隔臓器転移が少なく、リンパ節転移は皆無であるという事実がある。リンパ組織をもたない中枢神経内で発生する悪性リンパ腫は高齢者や AIDS 患者など免疫機能が低下した集団に好発する。これらの点は悪性脳腫瘍の発生や転移の予防に免疫機構が関与していることを示唆するものだが、現在までその機序は明らかになっていない。外傷、炎症、感染といった原始的生物にも共通する病態、さらに脳血管障害、腫瘍といった疾患において TLR が発現しているかどうか、その発現様式や発現時期を調べ、明らかにする。中枢神経系疾患に自然免疫が関与していることを確認できれば、新たな分野の研究や新たな治療法の開発などにつながると(3)期待できる。

(3) 臨床的マーカーとしての有用性を探る。現在、悪性神経膠腫に対しても癌ワクチンや樹状細胞療法といった免疫療法が試みられ一定の成果をあげている。これらの治療は有害事象が少ないことが大きな利点であるが、同時に抗腫瘍効果を予測する方法は確立していない。免疫療法と TLR の発現との相関性を明らかにすることができれば予後予測の有用な指標として活用することができる。さらに治療効果を高める方法の開発へとつながる可能性がある。がんワクチン療法において抗腫瘍免疫反応の主体となるのは CD8 陽性 CTL (細胞障害性 T リンパ球) なので、その効果的な活性化や抗腫瘍作用が重要であり、これらの機構には CD4 陽性のヘルパー T 細胞 (Th) の関与が重要であることがわかっている。自然免疫による抗腫瘍免疫の関与、増強について調べる前段階として WT1 腫瘍抗原に対する腫瘍抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 正常脳組織、神経幹細胞における TLR 分子の発現検討

マウス正常脳、神経幹細胞を用いて免疫組織化学的に TLR の発現を調べる。ついで各種分化誘導因子で神経幹細胞を処理し、分化発生段階における TLR 分子の発現様式を調べる。免疫組織化学で発現が確認された分子については western blotting を用いて定量的にも検討する。これらの研究で得られた知見をもとにヒト脳組織やヒト胎児由来神経幹細胞を用いて同様の検討を行う。

(2) 脳損傷モデルマウスを用いた自然免疫と

病態の関連の検討。

脳 stab wound :マウスの脳に刺傷を作成し、経時的に損傷部位での TLR 分子発現を調べる。特に reactive astrocyte がどのように行動しているかを検討する。

放射線照射後脳：放射線被曝による神経幹細胞の影響を TLR 分子発現と関連づける。

脳炎モデル：マウス脳室内に α -トキシン、リポポリサッカライドなど、実際にヒトでも髄膜炎、脳炎で重要な物質を投与し、細菌性髄膜炎の状態を作成する。炎症初期、極期、回復期などの経過における TLR 分子の発現を調べる。脳内でも他臓器同様の自然免疫反応が賦活されているか、特に側脳室上皮下層に存在する神経幹細胞の振る舞いに注目して解析する。

(3)脳腫瘍摘出標本を用いた検討

悪性神経膠腫、脳原発悪性リンパ腫の手術摘出標本を用いて TLR 分子の発現を解析する。特に、膠芽腫は組織学的に多彩な形態、遺伝子変異を有している細胞なので、これらとの関連についても調べる。神経膠腫の悪性度や組織学的相違で差があるか、悪性リンパ腫との相違などについても検討する。また、これらの研究結果を神経幹細胞やその分化誘導細胞で得られた知見と比較し、腫瘍化過程と正常分化課程における TLR 分子の発現の差についても検討する。

以上、(1)～(3)の研究は免疫組織化学、western blotting をもちいてタンパクレベルで数的、量的、時間的、空間的な解析を行う。

(4)My88 ノックアウトマウスを用いた検討

TLR にリガンドが結合すると、MyD88 分子により細胞内にシグナルが伝達される。学内共同研究者が既に所有している MyD88 ノックアウトマウスを用いて(1)～(3)と同様の検討を行い、中枢神経内での自然免疫の振る舞いを正常マウスと比較するとともに、他の臓器で得られている知見についても比較し、神経系内外で差があるかどうかを調べる。

(5)脳腫瘍に対するがんワクチン療法における自然免疫の関与

マウス WT1 特異 CD4 陽性 T 細胞の in vitro での機能解析さらに MHC class II 拘束性 WT1 ペプチドの同定。WT1 特異的 CD4 陽性 T 細胞を誘導できる MHC class II 拘束性マウス WT1 ペプチドをアンカーモチーフから解析し、候補を検討する。また、MHC class II 拘束性の WT1 特異的 CD4 陽性 T 細胞株、クローンを樹立する。クローン樹立後、そのクローンが Th1 タイプか Th2 タイプかを検討し、次にそのクローンが WT1 特異的 CTL 誘導にどのような影響を及ぼすかを検討する。さらに、ここで同定した MHC Class II 拘束性の WT1 ペプチド

特異的な免疫応答が、悪性グリオーマ患者中および健常人中でどの程度生じているかを比較検討する。

4. 研究成果

TLR2、4、に対する抗体を用いた免疫組織化学をヒト成人脳組織に対して行った。しかしながら再現性のある客観的なデータは得られなかった。現時点では、ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片でも十分使用できる抗体が限られているため条件決定などが困難であったこと、脳腫瘍摘出時に得られた非腫瘍部を用いたことによる腫瘍の影響も加わった結果であると考えられた。

ヒト胎児由来神経幹細胞に分化誘導因子を加え、神経細胞や星細胞へと分化誘導した培養細胞を用いて TLR 分子の発現を細胞組織化学的に検討したが、分化マーカー発現との間に有意な相関は見られなかった。分化段階での時間的な推移や分化誘導法についてさらに詳細な検討や工夫が必要と考えられたため、抗体を変更したり実験系を改良して行ったが、劇的な改善はみられなかった。

マウス正常脳組織を用いて TLR2、4 の発現を免疫組織化学法で検討した。ヒト組織での実験同様にその発現に有意な、再現性のよい結果は得られなかった。以上のように正常な状態や発生段階の中枢神経系における TLR 分子の発現は解明できなかった。

脳 stab wound マウスでも TLR2、TLR 4 の発現を免疫組織化学、western blotting を用いて検討したが上記実験同様客観的な知見は得られなかった。

上記のような結果のため、それ以上の疾患モデルマウスや MyD88 ノックアウトマウスを用いた検討は行わなかった。

WT1 特異的 CD4 陽性 T 細胞を誘導できる MHC class II 拘束性マウス WT1 ペプチドを同定した。マウス WT1 のアンカーモチーフを用いてコンピュータ解析を行い、2種類の候補を選択し、MHC class II 拘束性にマウス WT1 特異的 CD4 陽性 T 細胞を誘導できる 15mer のマウス WT1 エピトープを同定することができた。次いで MHC class II 拘束性の WT1 特異的 CD4 陽性 T 細胞をフローサイトメトリーで分離し、培養株を樹立した後その培養株から細胞をクローニングしクローン細胞を樹立した。細胞培養環境下で WT1 特異的 CD4 陽性 T 細胞は、WT1₃₃₂ の刺激によりサイトカインのうちインターフェロニン γ を産生したが IL-4 や IL-10 は誘導されなかった。これらの結果から WT1₃₃₂ 特異的 CD4 陽性 T 細胞は Th1 タイプのプロファイルを持つことが明らかになった。MHC class II 拘束性 WT1 特異的免疫応答の解析は本研究期間内にできなかった。

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 Yamamoto A, Shofuda T, Kanemura Y, et al: ABCB1 is predominantly expressed in human fetal neural stem/progenitor cells at an early development stage. J Neurosci Res (in Press), 2009, 査読有.
- ② 泉本修一, 他: グリオーマに対する最新の免疫療法; Current Organ Topics: 脳腫瘍-グリオーマ. 癌と化学療法 35(6): 926-930, 2008, 査読有.
- ③ Izumoto S, et al: Phase II clinical trial of Wilms tumor 1 peptide vaccination for patients with recurrent glioblastoma multiforme. J Neurosurg 108: 963-971, 2008, 査読有.
- ④ Nakano A, Kanemura Y, Mori K, Arita N, et al: Expression of the neural RNA-binding protein Musashi1 in pediatric brain tumors. Pediatr Neurosurg 43(4): 279-284, 2007, 査読有.

[学会発表] (計2件)

- ① Izumoto S, et al: WT1(Wilms tumor gene) peptide vaccination for patients with recurrent glioblastoma. The 17th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, 2008. 6. 9-12, Hakodate.
- ② 金村米博, 正札智子, 他: ヒト神経幹細胞/前駆細胞およびその分化細胞における遺伝子発現特性の検討. 第5回幹細胞シンポジウム, 2007. 5. 17, 淡路市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有田 憲生 (ARITA NORIO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 80159508

(2) 研究分担者

泉本 修一 (IZUMOTO SHUICHI)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 40324769

森 鑑二 (MORI KANJI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50360269

金村 米博 (KANEMURA YONEHIRO)

独立行政法人国立病院機構(大阪医療センター臨床研究センター)・EBM 先進医療研究開発部・再生医療研究室・室員

研究者番号: 80344175

正札 智子 (SHOFUDA TOMOKO)

独立行政法人国立病院機構(大阪医療センター臨床研究センター)・EBM 先進医療研究開発部・再生医療研究室・研究補助者

研究者番号: 40450895