

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07831

研究課題名(和文) 老化・病態脳における炎症血管の包括的解析と変質の分子メカニズム

研究課題名(英文) High dimensional analysis of neurovasculature to reveal molecular mechanism of aged or neurodegenerative brain

研究代表者

福原 武志 (Fukuhara, Takeshi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：20359673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は病態を司るメカニズムを明らかにする目的で、末梢免疫系と脳の相互作用に着目し、特に脳血管およびグリア細胞の細胞間相互作用を解析することを当初の目的としていた。関連研究として代表者は、シアル化されたタンパク質を認識するトマトレクチンをプローブが、血管のみならず炎症性細胞(CD68陽性)を検出することを神経疾患病態モデルマウス(ALS、ニーマンピックC型)において見出していた(学会報告済み)。しかしながら老化やパーキンソン病における共通性については不明であったため、様々な既報より報告された脳内炎症が慢性炎症性の免疫系細胞と炎症血管を介在したメカニズムに基づく可能性を追究したいと着想した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病は根治法のない神経変性疾患であり、家族性および孤発性のいずれにおいても対処療法しか治療がない。このため、疾患修飾療法としての先制医療が期待されている。近年では脳内炎症に限らず、腸管をはじめとした末梢臓器の炎症がパーキンソン病の進行に寄与していると考えられる報告があり、注目を集めている。本研究は、脳と末梢臓器をつなぐ脳血管に着目し、炎症血管マーカーなどを検索した。老化に対する治療法やパーキンソン病の治療作用点として妥当性の検証が必要となるが、老化に連動して発現上昇するC4bやLyz2を分子標的とした創薬探索が今後期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to unravel the underlying mechanism of Parkinson's disease, especially at the viewpoint from neurovascular-immune interaction. To do this, various inflammatory markers of vasculature or myeloid cells were tested in aged mice cohort as well as PARK2-deficient cohort. Due to the progressive phenotype of PARK2 mutation in patient, the responsible mice mutant was employed in this study for further analysis. Besides immunohistochemical analysis, RNA-seq analysis of brain was performed against 16 or 28 months old cohort. Although there are no prominent genes expressed between wildtype or PARK2 mutant, aging itself forced to increase a few marker including C4b that are one of complement factors. In PARK2 mutant background, we observed age from 16 to 28 months with increased expression of GFAP (astrocyte marker) and Lyz2 (myeloid marker). These dataset suggest that a subtle change in glia promoted age-related chronic inflammation.

研究分野：神経免疫学

キーワード：パーキンソン病 炎症 免疫 アストロサイト 老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

疾患の治療法を開発する目的で、病態脳を 1 細胞レベルで包括的かつ構成的に理解することを目指してきた。例えばマイクログリア M1/M2 に代表される細胞亜集団(サブセット)解析を、血管内皮細胞に適用して老化や病的なサブセットならびにシグナル経路の解明を追究していた。脳血管内皮細胞については、近年の scRNA-seq 解析による報告がなされるまで、基本サブセットの詳細は不明であった。申請者は独自の抗体探索技術を活用して細胞表面分子に対する機能性抗体を多数樹立し、機能解析を進めるだけでなく、マルチカラー多次元 FACS 解析 (HiD FACS) により脳血管を規定し、老化やストレス応答に特有の内皮サブセットを見出していた。

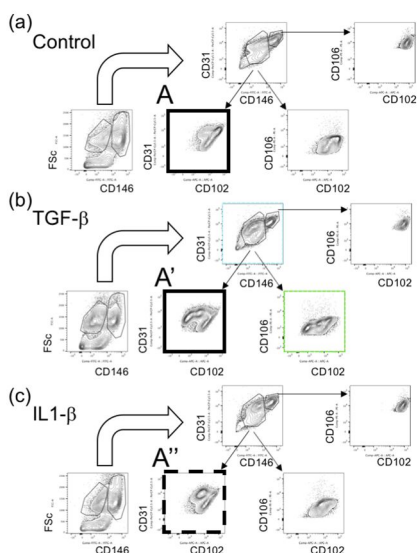
2. 研究の目的

本研究では老化およびパーキンソン病モデルマウスに着目して、「老化・病態の進行とともに、脳血管はいかに変化するか」を課題として、(1)病態特異的な脳血管サブセットの同定 (2)サブセットのトランスクリプトーム解析と異常シグナル経路の同定により、(3)病的細胞の分子メカニズムや病理的意義を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *In vitro* 解析として、血管内皮細胞株を炎症性サイトカイン (IL1 β 等) で刺激し、複数の血管内皮細胞表面マーカーを用いて多次元蛍光フローサイトメトリー解析を行った。(2) *In vivo* 解析として、所属するグループでは、Synucleinopathy モデルマウスの開発が進められており、最近では シヌクレイン凝集体の脳室内投与モデル (Okuzumi A et al., 2018) などを報告している。本研究では既に論文報告された PARK2 欠損マウス (Sato S et al., 2006) を材料として、ヘテロ欠損マウス同士をかけあわせてコホートを形成した。これらのマウスは異なる飼育期間においてサンプリングを行い、脳を含む複数臓器の病理組織解析、ならびに脳特定領域について RNA-seq 解析を行った。

4. 研究成果

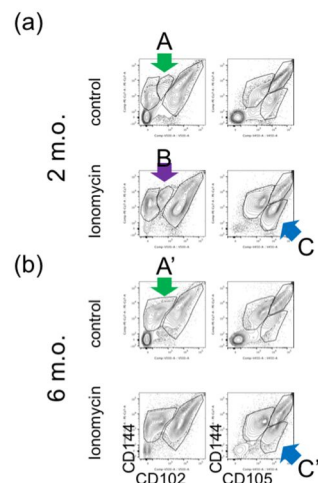


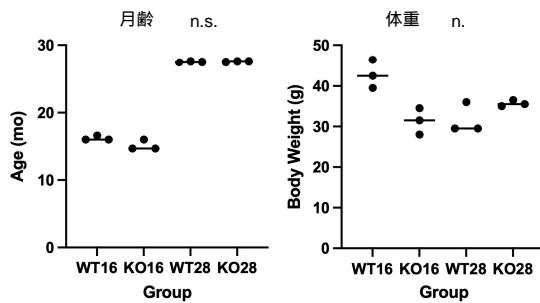
In vitro で刺激した血管内皮細胞株のマルチカラー解析から、刺激に依存した細胞亜集団が形成されることが示唆されていた。特に TGF- β あるいは IL-1 β 処理した細胞では、コントロール(A)に比較して、CD102 および CD31 で規定される特異な亜集団(A', A'')を生じた。免疫組織化学染色ではこの差を見出すことは難しいが、定量的サブセット解析では亜集団を規定することができた(左図)。

次に *In vivo* 解析として 2 または 6 ヶ月齢のマウス全脳から酵素処理と Percoll 分離によって調製した細胞に対してマルチカラー解析を行ったところ、ionomycin 処理した際に形成されるサブセットに変化が見られた。無刺激で 2 ヶ月齢に比べ 6 ヶ月齢に見られるサブセット(A, A') および、ionomycin 処理した際に形成されるサブセット(C, C') に差が生じており、CD102 あるいは CD144 マーカーによって定量的に規定される亜集団が存在した(右下図)。

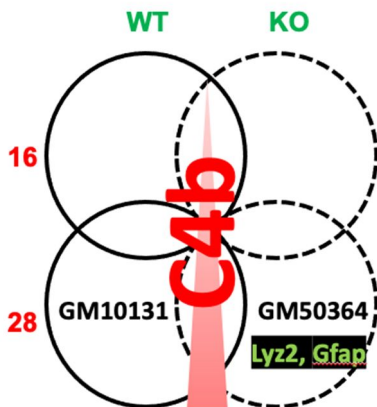
また *In vivo* 解析として野生型および PARK2 欠損マウスの脳切片を作成して免疫組織化学染色を行い、CD54, CD102, CD106, CD321 の抗体で染色したが、試した月齢のマウスに対して、いずれも顕著な差を認めなかった。

RNA-seq 解析を行う目的で、老化コホート(オス、15-17 ヶ月、25-30 ヶ月)の野生型および PARK2 欠損マウスの各 3 匹(合計 4 群 12 匹)をサンプリングし、Bregma から 4mm 厚の半脳スライスを作成し、バイオマッシャー I で遠心破砕後に Direct-Zol RNA Miniprep Plus(ZYMO Research)をもちいて RNA 抽出を行った。ライブラリ作成は QIaseq UPX3' Transcriptome Kit を利用し、NGS 解析を行うとともに、データ解析は Qiagen RNA-seq Analysis Portal (RAP) を利用して行った。





高発現する遺伝子



マウスの月齢群および体重について、16ヶ月齢ではKOマウスで若干の体重減少傾向が見られたが統計的有意差は示さなかった(左図)。得られた結果を様々なシナリオで解析し、野生型およびPARK2欠損マウスの脳では、変化を示した遺伝子は数個(平均16ヶ月齢ではHbb-bsのみ、平均28ヶ月齢で、GM10131, GM50364)であり大半の遺伝子に発現量の変化を認めなかった。一方で、野生型あるいはPARK2欠損マウスそれぞれについて、16ヶ月齢から

28ヶ月齢にかけて老化とともに変化する遺伝子を解析したところ、ごく少数の遺伝子について発現変化が同定された。特に加齢とともに発現上昇する因子として補体C4bが野生型およびPARK2欠損マウスのいずれにおいても共通に発現増強されることが明らかとなった。老化因子と考えられた。また興味深いことにPARK2欠損マウスにおいては、16から28ヶ月齢へ老化する過程でLyz2およびGfap遺伝子の発現上昇が確認された。それぞれマイクログリア、アストロサイトに発現するマーカーと考えられることから、SPF飼育環境においてPARK2欠損の遺伝的背景においてグリア細胞の増生が示唆される結果が得られた。また本コホートでは、RNA-seq解析において老化とともに統計的に有意な変化を示す血管内皮細胞マーカーは検出されなかった。

以上の解析から、老化とともに変化する遺伝子マーカーとして補体C4b遺伝子の発現上昇がキーとなり、補体経路の活性化が示唆された。当該遺伝子を発現する細胞種については未解明であり、今後の解析が必要である。また野生型では検出されなかったLyz2やGfapの28ヶ月齢コホートにおける発現上昇は、本PARK2欠損マウスの異常メカニズムを解明する鍵となることが示唆された。既報から、Enhanced Exerciseなど運動負荷をかけた場合にPARK2欠損マウスがSTING経路を介した顕著な炎症応答を示すことが報告(Sliter DA et al., 2018)されているが、自然老化における補体系の惹起を中心とした応答とは異なるメカニズムであることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 A Okuzumi, T Hatano, G Matsumoto, S Nojiri, S-I Ueno, Y Imamichi-Tatano, H Kimura, S Kakuta, A Kondo, T Fukuhara, Y Li, M Funayama, S Saiki, D Taniguchi, T Tsunemi, D McIntyre, JJ Gerardy, M Mittelbronn, R Kruger, Y Uchiyama, N Nukina, N Hattori	4. 巻 in press
2. 論文標題 Propagative α -synuclein seeds as serum biomarkers for synucleinopathies.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature medicine	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41591-023-02358-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shogo Moriya, Michiko Hanazono, Takeshi Fukuhara, Katsuro Iwase, Nobutaka Hattori, Masaki Takiguchi	4. 巻 79
2. 論文標題 A53T mutant α -synuclein fibrils formed in macrophage are spread to neurons.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and molecular life sciences	6. 最初と最後の頁 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-022-04263-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okuzumi Ayami, Hatano Taku, Fukuhara Takeshi, Ueno Shinichi, Nukina Nobuyuki, Imai Yuzuru, Hattori Nobutaka	4. 巻 2322
2. 論文標題 Seeding Assay Using	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 3~16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1495-2_1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yin Enzhi, Fukuhara Takeshi, Takeda Kazuyoshi, Kojima Yuko, Fukuhara Kyoko, Ikejima Kenichi, Bashuda Hisashi, Kitaura Jiro, Yagita Hideo, Okumura Ko, Uchida Koichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Anti-CD321 antibody immunotherapy protects liver against ischemia and reperfusion-induced injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-85001-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hamamichi Shusei, Fukuhara Takeshi, Umeda Izumi O., Fujii Hirofumi, Hattori Nobutaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel method for screening functional antibody with comprehensive analysis of its immunoliposome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84043-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shusei Hamamichi, Takeshi Fukuhara, Nobutaka Hattori	4. 巻 12
2. 論文標題 Immunotoxin screening system: A rapid and direct approach to obtain functional antibodies with internalization capacities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins12100658	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shusei Hamamichi, Takeshi Fukuhara, Izumi O Umeda, Hirofumi Fujii, Nobutaka Hattori	4. 巻 4625
2. 論文標題 Novel method for screening functional antibody with comprehensive analysis of its immunoliposome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84043-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Enzhi Yin, Takeshi Fukuhara, Kazuyoshi Takeda, Yuko Kojima, Kyoko Fukuhara, Kenichi Ikejima, Hisashi Bashuda, Jiro Kitaura, Hideo Yagita, Ko Okumura, Koichiro Uchida	4. 巻 6322
2. 論文標題 Anti-CD321 antibody immunotherapy protects liver against ischemia and reperfusion-induced injury.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-85001-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeshi Fukuhara, Taku Hatano, Nobutaka Hattori	4. 巻 9
2. 論文標題 Demon slayer? Targeting myeloid cells for modulating neuroinflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bio clinica	6. 最初と最後の頁 153-155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kinjo T, Ito M, Seki T, Fukuhara T, Bolati K, Arai H, Suzuki T.	4. 巻 1723
2. 論文標題 Prenatal exposure to valproic acid is associated with altered neurocognitive function and neurogenesis in the dentate gyrus of male offspring rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Res.	6. 最初と最後の頁 146403-146411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2019.146403	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Valentine MNZ, Hashimoto K, Fukuhara T, Saiki S, Ishikawa KI, Hattori N, Carninci P.	4. 巻 6
2. 論文標題 Multi-year whole-blood transcriptome data for the study of onset and progression of Parkinson's Disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Data	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41597-019-0022-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto H, Yoshimatsu Y, Tomizawa T, Kunita A, Takayama R, Morikawa T, Komura D, Takahashi K, Oshima T, Sato M, Komai M, Podyma-Inoue KA, Uchida H, Hamada H, Fujiu K, Ishikawa S, Fukayama M, Fukuhara T, Watabe T	4. 巻 9
2. 論文標題 Interleukin-13 receptor 2 is a novel marker and potential therapeutic target for human melanoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-39018-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 福原武志、Yin Yi、濱道修生、服部信孝
2. 発表標題 マイクログリアを標的としたイムノリポソームアッセイの開発と抗体の性状解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshi Fukuhara
2. 発表標題 Novel method for screening functional antibody and its application toward generating drug delivery modality.
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福原武志、濱道修生、服部信孝
2. 発表標題 薬物送達能を示す機能性抗体の探索技術とイムノリポソーム開発による機能解析
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福原武志、濱道修生、服部信孝
2. 発表標題 脳血管内皮細胞の多次元解析による老化に特徴的な垂集団の同定
3. 学会等名 Neuro2019, 第42回日本神経科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥住文美、波田野琢、福原武志、常見泰司、貫名信行、服部信孝
2. 発表標題 alpha-synucleinの伝播抑制因子の探索と複合療法を開発
3. 学会等名 MSDJ2019, パーキンソン病運動障害疾患コンgres
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Ohgoe, T. Fukuhara, N. Miyata, T. Yaguchi, A. Homma, and K. Hirakuri
2. 発表標題 Effects of foreign element contents on functional a-C:H film structure for biomedical applications
3. 学会等名 7th International Symposium on Surfaces and Interfaces for Biomaterials (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Fukuhara
2. 発表標題 Screening technology and application of functional antibody for brain diseases
3. 学会等名 13th International Symposium on Nanomedicine, ISNM2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Enzhi Yin, Takeshi Fukuhara, Kazuyoshi Takeda, Hisashi Bashuda, Koichiro Uchida
2. 発表標題 CD321 mAb (90G4) protects liver via inhibiting neutrophil infiltration in murine hepatic ischemia reperfusion model
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤智尋、北村成史、徳永正之、濱田庸、鳩山恵一郎、高野真由美、福原武志、今井陽介、権田幸祐
2. 発表標題 血管新生阻害剤に対する薬剤耐性を回避する新たな腫瘍兵糧攻め療法の開発
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高山莉那、岡本勇人、吉松康裕、富澤泰志、国田朱子、高橋和樹、井上 カタジナアンナ、深山正久、福原武志、渡部徹郎
2. 発表標題 悪性黒色腫の血管新生及び腫瘍形成能におけるIL13R 2の役割
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------