

令和 4 年 4 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07963

研究課題名(和文) 運動ニューロン病の末梢神経からのCCR2陽性細胞によるミスフォールド蛋白除去療法

研究課題名(英文) Misfold protein removal therapy with CCR2-positive cells from peripheral nerves in motor neuron disease

研究代表者

山崎 亮 (Yamasaki, Ryo)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：10467946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症は脳・脊髄の運動神経細胞が選択的に脱落し、全身の筋萎縮が進行して発症から2-3年で四肢麻痺・呼吸不全に至る難病である。疾患メカニズムが不明であり有効な治療法はない。私達は患者および疾患モデルマウスの末梢神経に浸潤する貪食細胞(マクロファージ)に着目し、これらの細胞が神経保護性が障害性を判定するため、遺伝子改変動物を用いて貪食細胞の末梢神経への浸潤をブロックすることによる影響を検討した。その結果、貪食細胞浸潤抑制したモデルマウスは通常よりも寿命が短縮し、神経細胞脱落も進行してしまった。つまり、末梢神経に浸潤した貪食細胞は疾患保護的であることを世界で初めて証明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋萎縮性側索硬化症は脳と脊髄の病気と考えられ、末梢神経はこれまで注目されていなかった。末梢神経に浸潤する貪食細胞の疾患病態への関与についても全く不明であった。今回の研究で、末梢神経に浸潤する貪食細胞が異常蛋白を除去する作用を介して中枢神経(脊髄の運動神経)細胞を保護することがわかった。この仕組みはこれまで解明されておらず、画期的な発見であった。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis is an intractable disease in which brain and spinal cord motor neurons are selectively shed. Muscle atrophy of the whole body progresses, leading to limb paralysis and respiratory failure 2-3 years after the onset. The disease mechanism is unknown, and there is no effective treatment. We focused on phagocytic cells (macrophages) that infiltrate the peripheral nerves of patients and disease model mice and used genetically modified animals to determine whether these cells are neuroprotective or harmful. We investigated the effects of blocking macrophage infiltration into the peripheral nerves. As a result, the model mice in which phagocytic cell infiltration was suppressed had a shorter lifespan than usual, and neuronal loss also progressed. In other words, we found for the first time that phagocytic cells infiltrating peripheral nerves are disease-protective.

研究分野：神経科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 マクロファージ 末梢神経 異常蛋白 モデルマウス 変異SOD1 CCR2

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は全身の運動神経細胞の選択的な細胞死により四肢・体幹の筋力低下、筋萎縮を呈する原因不明の難病である。ALS患者の10%は家族性で、そのうち30%では原因遺伝子が同定されている。それらのうち最も多いのは、フリーラジカルスカベンジャー蛋白の一つであるSOD1遺伝子変異によるALS1で、家族性ALSの20%を占める。次いでFUS/TLN1、TARDBP(TDP-43)遺伝子異常が家族性ALSの4-9%で報告されている。これらの変異遺伝子産物である変異SOD1、TDP-43、FUSの共通する特徴は、ミスフォールド蛋白である点である。ミスフォールド蛋白は不安定で凝集体を作りやすく、細胞内に蓄積し細胞小器官の機能異常を来すと考えられている。これらの変異遺伝子を導入したモデル動物の一つにヒト変異SOD1遺伝子トランスジェニックマウス(mSOD1-Tgマウス)がある。mSOD1-TgマウスでもヒトALSでも末梢神経軸索変性で始まるdying back axonopathyから運動ニューロン死に至る(Fisher 2004)。そこで、私たちがmSOD1-Tgマウスの末梢神経(坐骨神経)を詳細に観察したところ、以下の結果を得た。すなわちmSOD1-Tgマウスでは、生後4週頃から、脊髄に先んじて末梢神経にmSOD1蛋白の蓄積を認める、これらの異常蛋白は、「軸索」「軸索と髄鞘の間」「間質」に順次蓄積する、これらの末梢神経には末梢血由来のマクロファージを主体とする炎症細胞浸潤が生後8週から顕著に見られる、これらの浸潤マクロファージは異常蛋白を貪食している。さらに申請者は、ALS患者髄液中のマクロファージ遊走因子(MCP-1)の増加を報告している(Tateishi, 2010)。これらの結果から、マクロファージの遊走・浸潤は、ALSおよびそのモデル動物の病態において重要な役割を持つことが強く示唆された。そこで、マクロファージの浸潤抑制が疾患進行に及ぼす影響を検討するため、マクロファージの遊走因子(ケモカイン)受容体であるCCR2遺伝子欠損マウスとmSOD1-Tgマウスを交配してCCR2<sup>-/-</sup>mSOD1-Tgマウスを作成し経過を観察した。結果は予想と全く異なり、CCR2<sup>-/-</sup>mSOD1-Tgマウスは早期発症かつ急速進行性であった。同マウスでは通常のmSOD1-Tgマウスに比し坐骨神経への疾患早期の炎症細胞浸潤が著減していたが、末梢神経への変異SOD1蛋白沈着はCCR2欠損マウスの方が顕著だった。以上より末梢血由来CCR2陽性マクロファージが変異SOD1蛋白の末梢神経でのクリアランスに寄与していると考えた。したがって、本研究の学術的な問いは「ALSの病態形成にマクロファージの貪食機能が関与しているか」、「末梢神経に浸潤しているマクロファージが、ミスフォールド蛋白貪食によるクリアランス作用で神経保護的に働いているか」、「貪食機能を増強することで疾患発症や進行を抑制できるか」である。

## 2. 研究の目的

本研究では、ALSモデルマウス末梢神経に生後8週から末梢血由来マクロファージが浸潤するメカニズムの解明、特に末梢神経からのマクロファージによる異常蛋白のクリアランスの意義の解明、これらの結果をもとにした実際のALS患者血液由来マクロファージの貪食能解析、さらにマクロファージの機能修飾による新規治療法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) ALSモデルマウス末梢神経浸潤マクロファージのキャラクター解析とメカニズム解明

mSOD1-Tgマウス末梢神経へのマクロファージ浸潤は、神経組織、特にシュワン細胞から産生・放出される細胞遊走因子(MCP-1)と、炎症細胞表面に発現するその受容体(CCR2)の相互作用により誘導される。私たちの予備実験でもCCR2を欠損させることで疾患早期の末梢神経への炎症細胞浸潤が抑制された。しかしながら、進行期にはCCR2欠損マウスでも浸潤を認めたことから、CCR2の他にも重要な細胞遊走因子が関与し、さらに浸潤のみならず細胞の種類にも影響を及ぼしている可能性が高い。末梢神経軸索に蓄積した変異SOD1蛋白を貪食・除去する機能がもっとも高いマクロファージサブpopulationを同定し、その細胞集団の浸潤を阻害して疾患進行促進が見られるか検証することで、治療標的をより明確にする。

### 2) 同マウスにおける浸潤炎症細胞の異常蛋白クリアランス機能増強による神経保護

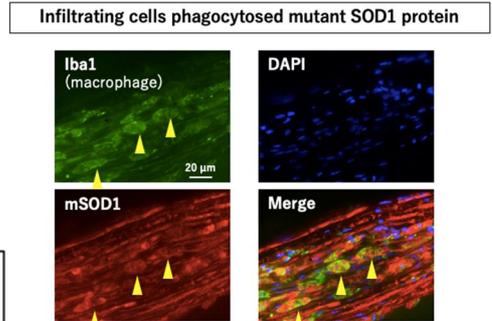
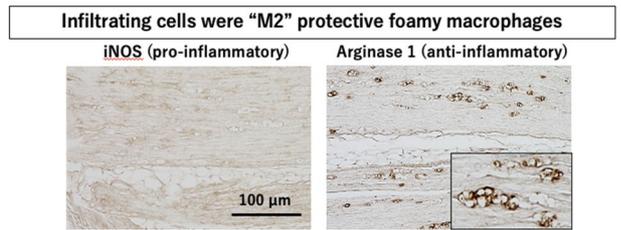
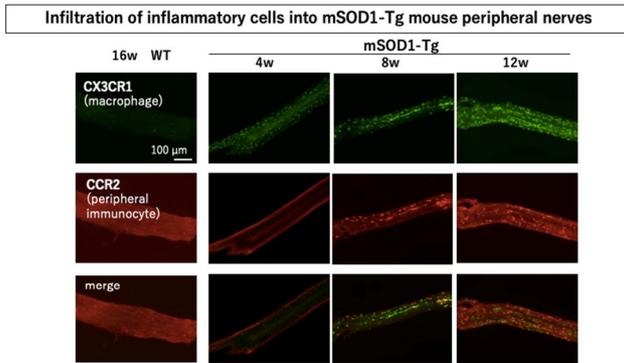
CCR2欠損マウスでは、炎症細胞の末梢神経浸潤が抑制されることで症状の悪化が見られたことから、浸潤の促進と異常蛋白のクリアランス(貪食)促進が新たな治療手段となる。浸潤促進、及び貪食促進を達成するために、CD33欠損マウスの骨髄移植を行う。CD33は単球系細胞に発現し、貪食機能を抑制する。生後8週のmSOD1マウスに全身放射線照射を行うことで骨髄細胞を死滅させ、CD33欠損マウス骨髄を移植するとともに血液神経関門を脆弱化させ、貪食能が亢進しているCD33欠損単球の神経浸潤を容易にし、変異蛋白クリアランス促進による神経保護効果及び疾患発症・進行抑制を試みる。加えて抗CD33抗体による機能阻止の効果を検証する。

### 3) ALS患者末梢血由来マクロファージの機能解析と修飾による治療法開発

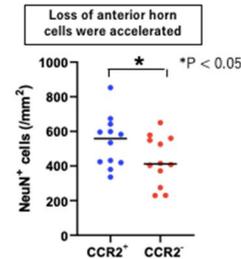
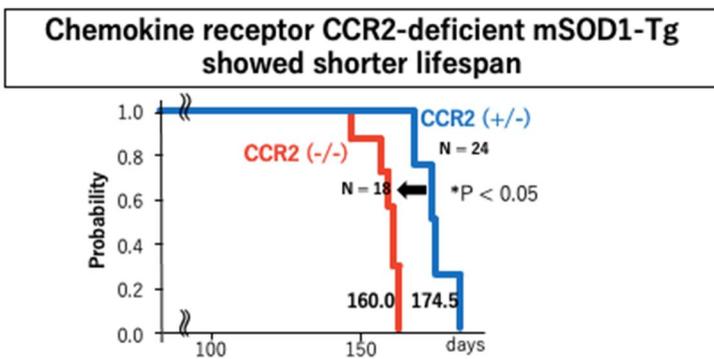
ALS患者では髄液中のマクロファージ遊走因子MCP-1が増加していることから、何らかのマクロファージの機能異常を来している可能性が高い。患者末梢血から単球をセルソーターで分離し、サブタイプ解析を行なうとともに、siRNAを用いたCD33のsilencingを行い、貪食能に与える影響を健常対象と比較検討し、貪食能亢進治療法を開発する。

#### 4. 研究成果

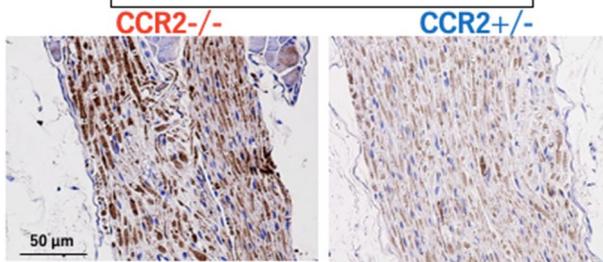
(1) マクロファージは ALS モデルマウス(mSOD1-Tg)末梢神経に疾患早期から浸潤し、神経保護的に活性化し、異常蛋白を貪食していた。



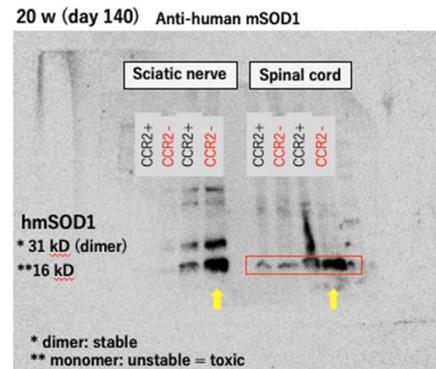
(2) CCR2 欠損マウスでは寿命が短縮し、前角細胞が脱落し、末梢神経および脊髄への異常蛋白蓄積が増加した。



**Misfold mSOD1 protein accumulation were accelerated**

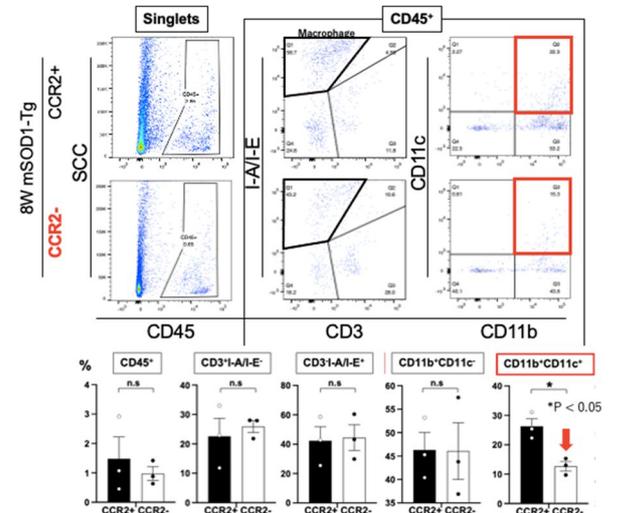


**SOD1 monomer was increased in mSOD1-Tg mice spinal cord and sciatic nerve**



(3) 末梢神経に浸潤するマクロファージは、CCR2 遺伝子欠損によりその数が減少し、貪食能も不十分な未熟な細胞であった。

以上、(1)-(3)より、ALS モデルマウスの末梢神経に浸潤するマクロファージは CCR2 受容体を介したシグナルにより活性化し、異常蛋白を貪食除去することにより末梢神経だけでなく脊髄の神経細胞も保護していることが明らかとなった。



\*治療介入に関しては、期間と資金不足のため達成に至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shiraishi Wataru, Yamasaki Ryo, Hashimoto Yu, Ko Senri, Kobayakawa Yuko, Isobe Noriko, Matsushita Takuya, Kira Jun-ichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Clearance of peripheral nerve misfolded mutant protein by infiltrated macrophages correlates with motor neuron disease progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16438
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-96064-6	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Wataru Shiraishi, Ryo Yamasaki, Yuko Kobayakawa, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 CCR2-positive peripheral blood macrophages play protective roles in ALS mouse model
3. 学会等名 60th Annual Meeting of The Japanese Society of Neurology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 亮、白石 渉、小早川 優子、松瀬 大、吉良潤一
2. 発表標題 末梢神経浸潤C-Cケモカイン受容体2(CCR2)陽性マクロファージは運動神経細胞を保護する
3. 学会等名 令和元年度神経変性疾患領域における基盤的調査研究班班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎亮、白石渉、橋本侑、江千里、小早川優子、磯部紀子
2. 発表標題 Clearance of peripheral nerve misfolded mutant protein by infiltrated macrophages correlates with motor neuron disease progression
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎亮、白石渉、橋本侑、江千里、磯部紀子
2. 発表標題 C-C chemokine receptor2+ macrophages in nerves ameliorate motor neuron disease model mice
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会（国際学会）
4. 発表年 2022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
研究分担者	山口 浩雄  (Yamaguchi Hiroo)  (00701830)	九州大学・大学病院・特任講師    (17102)	
研究分担者	藤井 敬之  (Fujii Takayuki)  (30822481)	九州大学・医学研究院・助教    (17102)	
研究分担者	立石 貴久  (Tateishi Takahisa)  (50423546)	九州大学・医学研究院・共同研究員    (17102)	
研究分担者	緒方 英紀  (Ogata Hidenori)  (90778838)	九州大学・大学病院・助教    (17102)	

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
---------	---------