

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07871

研究課題名(和文)パーキンソン病における脳内-血液免疫系細胞のクロストーク開始起点と治療可能時間域

研究課題名(英文)Starting point of immune-cell crosstalk in Brain-blood system and therapeutic time window in Parkinson's disease.

研究代表者

鈴木 秀一郎 (Syuuichirou, Suzuki)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：90532929

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)：パーキンソン病における末梢血免疫担当細胞の病態への関与を明らかにするため6-OHDA線条体導入PDラットを用いた検討を行った。遺伝子プロファイルが重複するMGと末梢マクロファージを識別可能にするため6-OHDA線条体導入GFP骨髄キメラPDラットを作成した。本ラットはこれまで報告されていたPDラットと同様の行動薬理学的特性を示し、6-OHDA投与2週目から全て1分間あたり7回転以上の回転数を示した。同ラットの患側中脳黒質領域においてにおけるGFP陽性細胞は1週間目をピークに漸減し1ヶ月後にはほぼ認めなくなっており、7nAChR刺激への治療介入には治療可能時間域がある可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PDに限らず神経変性疾患の原因は当然神経やグリアにあるとされ研究が進められてきたが、本研究の特色としてPDの病態形成を血管内の免疫細胞に着目し原因を探索することがあげられる。PDに関しては未だに根本治療のみならず進行を遅らせる疾患修飾薬も開発されていない現状がありこれまでとは異なった視点からの取り組みに学術的な意義がある。本研究で得た新知見によりPD発症前の血液バイオマーカーの発見や発症予防や早期治療の開始時期が提言できる可能性がある。本研究の着眼点と研究手法が神経変性疾患だけでなく、他の加齢性疾患の病態解明にも応用され、免疫細胞の関与が発見される可能性もあり重要な意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, 6-OHDA striatum-transgenic PD rats were used to clarify the involvement of peripheral blood immunocompetent cells in the pathogenesis of Parkinson's disease. In order to identify MG and peripheral macrophages with overlapping gene profiles, we made 6-OHDA administered striatum-transgenic GFP bone marrow chimeric PD rats. The rats exhibited behavioral pharmacological characteristics similar to previously reported PD rats, with all rats showing 7 or more rotations per minute from the second week of 6-OHDA administration. GFP-positive cells in the substantia nigra on the affected side of the rat peaked at 1 week and were almost completely absent by 1 month, suggesting that the therapeutic effect of 7nAChR stimulation may be limited to this period.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：パーキンソン病 免疫細胞 老化 神経炎症 ニコチン性アセチルコリン受容体

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)の病態形成メカニズムは複雑で十分には解明されていないがミトコンドリア機能異常、タンパク質分解異常、酸化ストレス、グリアや免疫細胞による自己免疫応答などが互いに影響しあいながら関与していると考えられている。これらはミトコンドリア機能異常やタンパク質分解異常などの神経細胞内因性の関与と、グリアや免疫細胞による神経細胞外因性の応答に大別できる。PD患者における自己免疫応答に関する最初の報告は古く、PD患者死後脳の中脳黒質でミクログリア(MG)が活性化することやリンパ球が血液脳関門を越えて脳内移行することが1988年にMcGeerらによって報告されたが(McGeer et al., *Neurology* 1988)、近年ではPETを用いた脳MGの画像化が可能となりPD病初期でも脳MGの活性化が起きていることがわかり、病態への関与が改めて注目されている。更にはCD4陽性T細胞ノックアウトマウスに対し、ドパミン神経毒であるMPTPの投与を行ってもドパミン神経障害が小さいことが報告され(Brochard et al., *J Clin Invest* 2009)、CD4陽性T細胞と活性化型MG間で抗原提示を介した直接的相互作用があること、免疫治療も治療候補になりえることが示された。しかしMGは神経やアストロサイトと相互作用する中で、炎症性サイトカインなどを産生し神経細胞死への誘導を引き起こす反面、抗炎症性サイトカインや神経栄養因子を産生し神経保護にも作用するため、PDにおけるMGの役割は単純ではない。PD患者の中脳黒質において、ミクログリア(MG)の活性化やリンパ球の脳内移行が以前より確認されているが、免疫細胞の病態形成へのメカニズムは未だ十分には解明されていない。喫煙は大規模メタ解析(Bellou et al., *Parkinsonism Relat Disord* 2016)においてPD発症リスクを最も低下させる保護因子であり、紙タバコ主成分の一つであるニコチンがドパミン神経細胞死に対してニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)を介した保護作用があることを我々は動物実験において明らかにしてきた(Takeuchi et al., *J Neurosci Res* 2012, Suzuki et al., *J Neurosci Res* 2015)。ドパミン神経毒である6-hydroxydopamine(6-OHDA)をラット中脳黒質-線条体経路に投与したPDモデルラットを用いて、ドパミン神経およびMGに発現している7ニコチン性アセチルコリン受容体(7nAChR)への刺激がドパミン神経細胞死に対し保護作用を示し、投与部位のMG活性が抑制された結果を得ている(Suzuki et al., *J Neurosci Res*, 2013)。更に別の検討では6-OHDA線条体投与PDモデルラットを用いて、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hBM-MSCs)を静脈内投与したところ行動学的、免疫組織学的に有意な改善を認め、線条体のMG活性の抑制を確認した。ところが、予想に反して静脈内投与されたhBM-MSCsの明らかな脳内移行は認められなかった(Suzuki et al., *Neurosci Lett*, 2015)。6-OHDAを線条体に投与すると進行性のドパミン神経細胞死が起きるが、その病態形成にはドパミン神経の軸索輸送障害やMGの活性化が関与すると考えられている。一方で、hBM-MSCsは障害部位への遊走能や多分化能、神経栄養因子分泌能に加え、強力な免疫調整作用を有することから炎症性疾患への臨床応用が進められており、ステロイドや免疫抑制剤抵抗性の重症急性graft versus host diseaseに対して既に臨床応用されている。hBM-MSCsが脳内移行しないにもかかわらず静脈内投与で神経保護作用を示した事実および上述のhBM-MSCsの細胞特性から、6-OHDA線条体投与による進行性のドパミン神経細胞死の病態形成には脳実質外の、特に血管内免疫細胞の関与が大きいのではないかと考えた。この仮説は前述したPD患者の死後脳を用いた免疫組織学的検討の結果にも裏付けがある。更には上述した中脳黒質-線条体経路への6-OHDA投与に対する7nAChR刺激のドパミン神経保護作用は同時投与によって得られた結果である。経過がよりPDに近い6-OHDA線条体投与PDモデルにおいて行動薬理学的特性を示した後でも7nAChR刺激がドパミン神経保護作用を示す時期に関して検討することで、PD患者に対する7nAChR刺激の治療可能時間域について推定が可能であると考えられる。

2. 研究の目的

脳に対する免疫系の影響のない6-OHDA線条体導入GFP骨髄キメラPDモデルラットの作製し、行動薬理学的評価を行い、同モデルラットのドパミン神経細胞、ミクログリア活性、末梢血免疫担当細胞(GFP陽性細胞)の時系列と免疫組織学的評価とともに治療可能時間域について検討した。またラットの神経型および筋型nAChRサブユニットのmRNA発現解析を行った。

3. 研究の方法

X線照射したSDラットにGFPトランスジェニックラットの骨髄を移植し、GFP骨髄キメララットを作製した。以下に手順を示す。

(1)放射線照射によるラット骨髄細胞の破壊

5週齢のSprague Dawley(SD)ラットを放射線照射器に置き頭部を鉛で防護した上で、骨髄死が得られる10GyでX線照射した。一部のラットは防護処置を行わず全身照射した。

(2)ドナー細胞の調整

ほぼ全身の細胞に EGFP が発現し緑色蛍光を呈する SD トランスジェニックラットの大腿骨を深麻酔下で離断し骨髄細胞を採取した。また、同ラットの脾臓を採取し、セルストレーナーを用いて脾細胞をシングルセルに分離した。各細胞数が 1×10^8 細胞/mL になるように調整した。

(3)レシピエントへの移植

X 線照射後のラットに(2)で調整したドナー細胞浮遊液を静脈内投与した。X 線を全身照射したラットに対してはレシピエント 1 匹あたり骨髄細胞 1×10^8 で投与した。頭部防護し X 線照射したラットは 2 群に分け骨髄細胞 1×10^8 、あるいは骨髄細胞 1×10^8 および脾細胞 $1 \sim 2 \times 10^8$ を静脈内投与した。

(4)プレドニゾロンの投与頭部防護照射および骨髄・脾細胞投与群は更に群分けし、プレドニゾン(PSL)を腹腔内投与した。1 回投与量はどちらも 10mg/kg とし、連日投与あるいは週 3 回投与した。

(5)フローサイトメトリーによるキメラ率の検証

感染に注意し飼育したうえで 4 週間後に尾静脈から採血し、フローサイトメトリーにてゲート内の白血球中数および GFP 陽性細胞数をカウントした。GFP 陽性白血球数/末梢血白血球数をキメラ率とした。各ラット群におけるキメラ率の検証を行った。

(6)GFP 骨髄キメラ PD ラットの作製、脳組織検証

(5)にて一定のキメラ率が得られたラットを GFP 骨髄キメララットとし、更に深麻酔下で脳定位固定装置に設置した上で、片側線条体 2 ヶ所に 6-OHDA を脳内微量投与した。更に、この GFP 骨髄キメラ PD ラットの一部を灌流固定後、脳を採取した。ラット脳組織における X 線照射の脳内 MG への影響を全身照射と脳防護照射ラットを用いて比較した。

(7)免疫組織化学染色、免疫蛍光染色にドパミン神経は抗 Tyrosine hydroxylase (TH) 抗体、ミクログリアは抗 ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1) 抗体を用い 7 nAChR の発現解析とともに評価した。

(8)解析データの統計処理

統計解析ソフトウェア JMP Pro 16.0.0 (SAS Institute, Cary, NC) を用いて行った。2 群間の平均値の差の検定は対応のない t 検定を用いて検定した。

ラットの神経型および筋型 nAChR サブユニットの mRNA 発現解析

5 週齢の Sprague Dawley (SD) 雌性ラットから全脳および後肢を採取した。試料より RNeasy kit を用い mRNA を回収後、2 ステップ RT-PCR キットを使用して逆転写酵素とオリゴ dT プライマー、ランダムプライマー-cDNA を作成した。各 nAChR サブユニットの DNA 配列情報は NCBI から得、各種遺伝子特異的なプライマーセットを作成しそれぞれのサブユニットの mRNA 発現を解析した。

4. 研究成果

6-OHDA 線条体導入骨髄キメララットにおけるメタンフェタミン誘発回旋解析(図 1)

6-OHDA 投与 1 週、2 週、3 週後の 1 分間あたりの回転数はそれぞれ 7.18 ± 1.92 、 15.16 ± 1.66 、 15.28 ± 2.07 (Mean \pm SE) であり 2 週目から全てのラットにおいて 7 回転異常の回転数を示し、PBS 投与ラット (-0.33 ± 0.30 、 -0.20 ± 0.52 、 0.7 ± 1.06) と比較していずれも優位な回転数を示した。患側中脳黒質領域における TH 陽性細胞数は、健側に比較し 6-OHDA 投与 3 日後までは差がみられなかったが 7 日後には 68% まで減少し、その後も進行性に低下し 14 日後には 38%、28 日後には 14% まで低下している一方で、GFP 陽性細胞数は健側に比較し 6-OHDA 投与 3 日後までは差を認めなかったが、7 日後には 1 日後に比較して約 25 倍上昇しピークとなり、その後は減少し 28 日後には 1 日後とほぼ同値となっており、優位な回転が得られている 1 週目が治療可能時間域となり得ることが推定された。

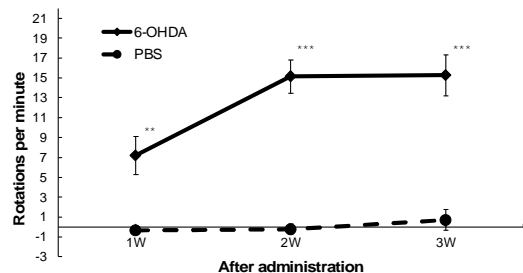


図 1 6-OHDA 線条体導入骨髄キメララットにおけるメタンフェタミン誘発回旋解析
2 週目から全ての 6-OHDA 投与ラットでは 7 回転異常の回転数を示した。

Iba-1、 7 nAChR 発現解析(図 2)

Iba-1 蛍光染色下の同ラット病側中脳黒質領域における GFP 陽性細胞の観察では細胞体の肥大化、突起の退縮を認め、活性型を示したミクログリアや胞体の肥大化が軽度なミクログリアに隣接して GFP 陽性細胞が認められた。しかしながら、Iba-1 陽性細胞の輪郭と完全一致する GFP 陽性領域は確認されなかった。

7 nAChR 蛍光染色下の同ラット病側中脳黒質領域における検討では比較的細胞質の大きな紡錘状の細胞に染色性が確認された。同細胞は GFP 陰性であり、経時的に染色強度が低下した。一方で病側中脳黒質、実質内における核の偏在した細胞の一部は 7 nAChR 陽性であった。

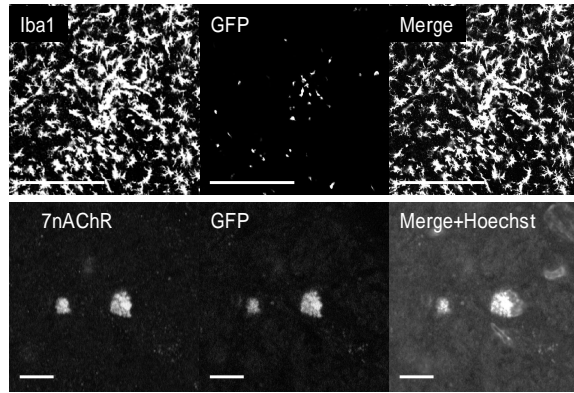
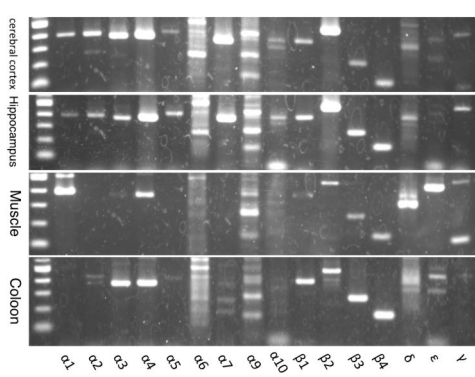


図2 GFP キメラ骨髄 PD ラット、病側中脳黒質領域の Iba-1、 7 nAChR 蛍光染色像

(上段) Iba-1 染色像。Scale bar, 50 μm,

(下段) 7nAChR 染色像。Scale bar, 10 μm,



	Forward	Reverse	bp
1	TCAATCCGGAAAGTGACCAG	ATTATGGACGCAATGACAAA	396
2	TGCTGGCTAAAGCAGGAATGG	TTCCGGTGGCAITGATAATG	392
3	CTTAGACATGGGTGTGTGTC	TCAGCGTGTGTGTACAGTAC	372
4	CCACCTGTTCTATGACGGAAGG	TAGAAGACCAGCACGGTGAGAC	375
5	ATCCTGACGATTATGGTGGG	GCCGCTTAATCACAAGGAG	414
6	TAAAGGAATGCCGCCACTGC	CACAGTTCACAAACACACAGAC	264
7	GCGCTTTGATGCCACGTTCC	TGAGTACACAAGGGATGAGC	371
9	ATCTGGTGTGGAGGGCCGGACA	GGCCGGTGAGTCCCAGGTGAT	119
10	TCTGCTGCTGCTGTTTCTCC	CCACAGGTACAAGGTCAGCA	208
1	ACCCACCAATGCCCTTTTG	ACAACCATGGCGACAAACTG	386
2	CAGCGTGTGTGCTCAATG	ACATGCCGACGGTCCCAAG	488
3	GGCAGAAGTCTCGATGAAG	TGAGAAAAGACAACCCAGG	261
4	CAGCCCATCCAACCTCTATG	CTGACACCTCTAATGCTTC	165
	ACGCCTGCAATGTGCTTGT	TGACGTCTTGGTGTGGTG	330
	CATCGACACCCGACGCTTTT	GGGGATGTGGCGTGAAGTCGT	441
	GCTGGGACCCGAAAGACTACG	ATCAGGGGACACGAGCACATT	143

図 3 ラットにおける nAChR の mRNA 発現解析表

表 1 各プライマー配列

ラット大脳皮質、海馬、後肢(筋)、腸 nAChR の mRNA 発現解析 (図 3、表 1)

ラット大脳皮質・海馬においては神経型 nAChR のサブユニットである 1、2、3、4、5、6、7、1、2、3、4 が陽性であった。9、10 は明らかでない。

骨格筋では筋型 nAChR を構成するサブユニットである 1、1、 、 、 が陽性である他、4、2、3、4 などの他の神経型 nAChR サブユニットも陽性であった。腸管では 2、3、4、5、6、7、1、2、3、4 が陽性であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 秀一郎
2. 発表標題 Immunohistological study of immunocytes in 6-OHDA-induced lesion in a rat Parkinson's disease model.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年～2021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	下濱 俊 (Shimohama Shun) (60235687)	札幌医科大学・医学部・名誉教授 (20101)	

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