

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07379

研究課題名(和文) 中枢神経炎症性脱髄疾患におけるReelinによる神経再生機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of nerve regeneration by Reelin in inflammatory demyelinating disease of the central nervous system

研究代表者

有光 なぎさ (Arimitsu, Nagisa)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40408688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：寛解と再発を繰り返す中枢神経系の自己免疫性脱髄性疾患である多発性硬化症(MS)では運動障害などの発症前の炎症性免疫細胞が血管を乗り越えて神経組織へ侵入する起点が重症化への重要な局面である。そこで、本研究では中枢神経での生体イメージングシステム(BIVS)を用いて生きた中枢神経組織での疾患発症メカニズムの解明を目指した。MSモデルマウス(EAEマウス)において発症早期の細胞動態に關与する候補因子として分泌性因子複数種を見出した。候補因子を欠損させたマウスでMS病態を誘発すると、野生型マウスに比べて運動機能障害が起きにくいことや血管からの免疫細胞の流出が抑制されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
今回見出した免疫細胞の遊走を抑える因子をターゲットとすることで、従来の治療よりも副作用が比較的少ない新たな免疫抑制療法の開発につながると期待される。また、移植により損傷神経を再生することができれば慢性期においても治療効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：In multiple sclerosis (MS), an autoimmune demyelinating disease of the central nervous system with repeated remissions and relapses, the starting point of severe disease is the critical phase when inflammatory immune cells from the blood vessels and into the nervous tissue and invade nervous tissue before the pathophysiology of MS is recognized. before the onset of a condition such as paralysis of the legs is a critical phase in the development of severe disease. In this study, using the central nervous system bioimaging system (BIVS) to elucidate the pathogenesis mechanism in living central nervous system tissues, we found several secreted factors as candidate factors involved in cellular dynamics in the early phase of pathogenesis in MS model mice (EAE mice). When MS disease was induced in mice lacking the candidate factors, we found that motor dysfunction was less likely to occur and immune cell efflux from blood vessels was suppressed compared to wild-type mice.

研究分野：神経科学

キーワード：中枢神経疾患

1. 研究開始当初の背景

運動機能や認知機能が損なわれる脳・脊髄の病気 (MS やアルツハイマー病) では、慢性的な炎症が神経組織 (ミエリン鞘やニューロン) の損傷を引き起こし、疾患を憎悪化することが知られている。MS では、脳や脊髄への免疫細胞の動員が神経炎症とその後のミエリン脱髄の一因と言われている。慢性炎症性疾患であるため炎症の制御による治療が期待されたが、合併症などの副作用があるため開発が進んでいない。一方で、中枢神経の損傷に着目し、脱髄によって損傷した神経細胞の再生を目指した再生医療技術の開発が注目される。

我々は脳皮質損傷モデルマウスの神経損傷箇所にて Reelin が発現することに着目し、神経細胞移植による損傷の回復において Reelin が神経幹・前駆細胞の動員を促すことが損傷神経の再生に繋がることを見出した (Arimitsu N et al., *Exp Neurol.* 2019.)

Reelin は巨大な分泌性タンパク質で発生過程において大脳皮質の最表層 (辺縁帯) で発現し神経幹・前駆細胞遊走を制御し、皮質 6 層構造の形成に関与する。Reelin 受容体 (ApoE/VLDL 受容体) に結合する細胞内アダプター分子 Dab1 のリン酸化が Reelin の機能を制御する。Dab1 リン酸化部位により遊走と層形成、接着因子の活性化、細胞軸索伸長とシナプス形成の 3 シグナル経路が進行する (Wasser ら, *J.Biol.Chem.* 2017 他)。Reelin シグナル伝達異常により、胎生期での神経細胞の遊走異常と大脳皮質層形成異常が見られ、運動機能異常さらには離乳期に致死になる。成体においても Reelin 発現が見られ、発現減少による統合失調症、自閉症、認知症などとの関連も知られる (Ishii ら, *Front. Cell Neurosci.* 2016 他)。また、脳神経組織以外に、肝臓も Reelin を分泌する。血中の Reelin は免疫細胞数に影響する (Green Johnson ら, *Brain Behav Immun.* 1995)。実際に、自己免疫疾患である再発寛解型多発性硬化症患者の再発時に Reelin 血中濃度が亢進することから Reelin レベルと重症度に相関があること (Calvier ら, *Sci.Trans.Med.* 2020) が示され、血中の体循環性 Reelin は、炎症を誘発する免疫細胞の一種である循環単球を捕捉する血管壁の接着分子の産生を調節し、血管へ作用し炎症性細胞を血管外へ遊走させる機能がある可能性が示唆された。

自己免疫性疾患である多発性硬化症 (MS) モデル (EAE モデルマウス) では、病態が認識される前に中枢神経組織内において炎症性免疫細胞が血管を乗り越えて神経組織へ侵入することが炎症と損傷の起点となる。免疫細胞の遊走は体内へ侵入した病原体を駆除するために重要な生体防御機構であり、この制御機構は臓器毎に異なるケモカイン等の chemoattractant (CA) 分子により厳密に制御されている。しかし、この制御機構が破綻すると免疫細胞が異常に組織へ侵入し自己免疫疾患等の慢性炎症を発症する。

2. 研究の目的

我々が構築した生体内脳内インビボイメージングシステムを用いて生きたマウスの組織で細胞動態を可視化することで、固定後サンプルを解析する従来の形態学・組織学的手法とは違う時系列に沿った生きた状態での免疫細胞遊走メカニズムや関連因子の同定、免疫細胞、治療後の再生過程における細胞の微小環境下での動態を明らかにすることを目指した。さらに神経細胞移植による MS 治療法の構築を目指した、MS モデルマウスへの神経細胞移植における Reelin の役割の解明を目的に本解析を行った。

3. 研究の方法

中枢神経損傷 MS での動物モデル(実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルマウス)として、自己免疫性ペプチドと細菌性ペプチドにより免疫する一般的な方法を用いた。損傷測定は、尾のトーンス低下からはじまる下肢運動機能を基にした臨床スコアにて判断する。重症度は下肢運動機能を基にした臨床スコアにて判断した。

BIVS により内在性神経幹細胞や損傷組織周辺の炎症性細胞の遊走など周辺環境の細胞動態との関係性を調べる。血管内免疫細胞の染色は、各種表面抗原マーカーに対する蛍光標識抗体を用いて染色し流出細胞の種類を同定した。抗体候補として CD45 陽性細胞(全免疫細胞陽性)、CD11b 陽性細胞(単核球であり、単球、マクロファージ、NK 細胞、顆粒球陽性)、Ly6G 陽性細胞(好中球陽性)、CD4,8(T 細胞)、B220 (B 細胞)である。損傷前後において血管外に流出する細胞の種類を調べ、免疫細胞の挙動をみるのに適している抗体を選別した。また、細胞動態の解析は Zen, IMARIS ソフトを用いた。

損傷部位は蛍光デキストランの血管外への流出、Evans blue による血管透過性解析を用いて可視化した。BIVS に加えて、局所性の分泌性因子発現量を定量するために、組織の領域毎に分画し、組織学的解析、遺伝子発現解析の発現解析を併せて行った。さらに、機序の比較のために、野生型 (WT) マウスだけでなく、ターゲット因子のリガンド欠損マウス、下流シグナル変異マウスを比較検討した。それぞれのマウス脳を疾患誘導時より経時的に解剖し、組織を採取した。

定量 PCR について

3 種混合麻酔を行ったマウスに対して心臓より 50ml PBS(-)を灌流し脳組織を摘出し RNA 抽出、定量 PCR を行った。PCR 条件は、50 2分 95 10 分に引き続き 95 15 秒 60 1 分の 2 ステップを 40 サイクルで行い、95 15 秒 60 15 秒にて dissociation curve を測定した。18S リボソーム RNA を内在性コントロールとし、解析は、CT 法を用いて処置なし野生型マウス組織の各臓器部位の発現量を 1 として、数値化した。その結果、各病態 (特に MS モデルマウス、片麻痺マウス)早期に発現の上昇が見られる因子を複数同定した。その中には、神経細胞に対する機能未知な因子も含まれた。

組織解析について

病態に即した組織切片を作製し、各種免疫細胞の表面抗原マーカー、脳組織特有の神経細胞、ミクログリアに対する免疫染色を行い神経組織への免疫細胞の浸潤を解析した。

疾患早期に発現誘導が見られる因子による病態への関与

見出した因子に対する自作抗体の作製では早期に発現増加が見られ、また、機能が不明であり、機能阻害可能な市販抗体がない因子に着目し、因子 X に対する特異抗体を定石に従い作製した。使用した抗原域はヒト - マウス相同性の高い領域をピックアップし、さらに受容体が結合すると予想される領域についてペプチド抗原を合成した (Sigma による委託合成)

損傷モデルマウスへのマウス由来 NS/PC の移植と生体内動態

BIVS により移植細胞局在、軸索など形態変化を調べつつ、移植細胞とレシピエント組織間に神経回路形成や血管形成が見られるかについて経時的にモニターした。そして見出した神経保護性、遊走性因子について、関連遺伝子改変マウスを用いて、通常状態での免疫細胞動態が MS 病態誘導時の動態において変化があるかについて調べた。また、移植細胞を野生型から、シグナル経路変異マウス由来神経細胞に変えることで移植の効果が消失するかについて調べた。

4. 研究成果

構築された中枢神経における細胞ダイナミクスを解析可能な生体イメージングシステム (BIVS)を用いて、MS モデルマウス脳内の血管内外への免疫細胞の動態を測定し、病態の解明につなげることを目的に解析を行った。

血管内免疫細胞の染色は、各種表面抗原マーカーに対する蛍光標識抗体を用いて染色し流出細胞の種類を同定する。抗体候補として CD45 陽性細胞 (全免疫細胞陽性)、CD11b 陽性細胞 (単核球であり、単球、マクロファージ、NK 細胞、顆粒球陽性)、Ly6G 陽性細胞 (好中球陽性)、CD4,8 (T 細胞)、B220 (B 細胞) である。損傷前後において血管外に流出する細胞の種類を調べた結果、CD45, CD11b, Ly6G 陽性細胞が特に損傷操作前後に動態変化を示し、免疫細胞の挙動をみるのに適していた。また、細胞動態の解析は Zen, IMARIS ソフトを用いた。今回は、まず全免疫細胞を一括に判定するため、CD45 陽性細胞の挙動を観察することにした。生体イメージングの結果、MS モデルマウス病態に特有の免疫細胞の挙動の変化を見出した。そこでは、後肢麻痺という器質異常が生じる前から標的臓器である中枢神経組織の血中内外の細胞ダイナミクスの異常が生じていた (図 1)。

[In vivo imaging]

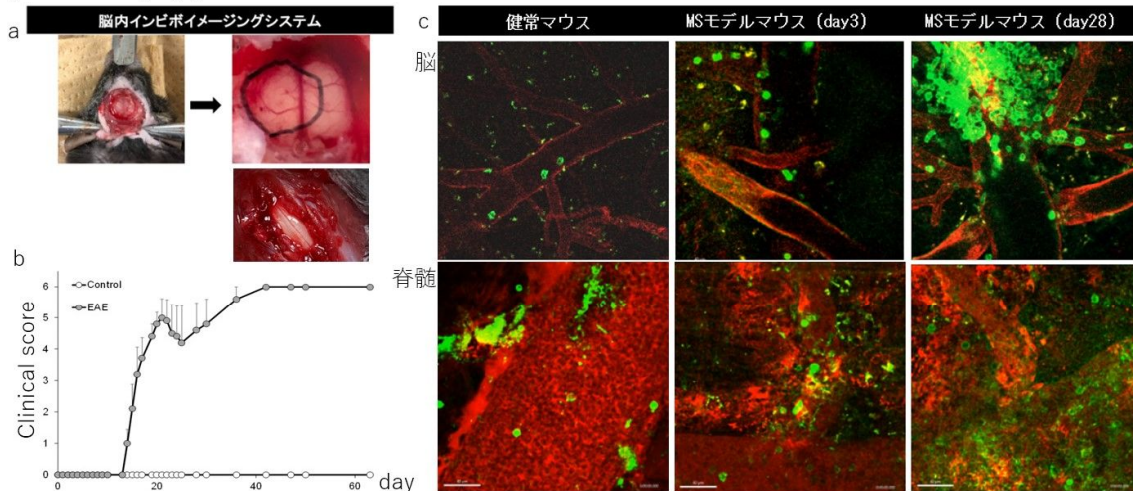


図 1. MSモデルマウス (EAEマウス) における脳イメージング

a. 生体マウスの骨を除去し、脳・脊髄内の細胞動態をリアルタイムに解析する。

b. 使用したMSモデルマウスのclinical score

c. BIVSにて脳、脊髄血管内 (ラベル：赤) を免疫細胞 (ラベル：緑) が移動していく様子が観察され、特に脳において病態が明瞭であるday28以前のday3においても免疫細胞の集約と異常な遊走が見られた。

また、今回、MS モデルマウス (EAE マウス) を用いて、発症早期の細胞動態に関与する候補因子の探索を行い、Reelin を含む候補因子を見出した。

候補因子の一つの欠損マウスに対して自己抗原により MS 病態を誘発すると野生型での病態に対し運動機能障害が起きにくいこと、シグナル経路ヘテロ欠損マウスでは逆に MS 症状が重症化することを見出した (図 2a)。脳血管内外の細胞動態に及ぼす作用を BIVS により観察すると血管内免疫細胞の血管外への遊走が抑えられている様子が観察された (図 2 b)。

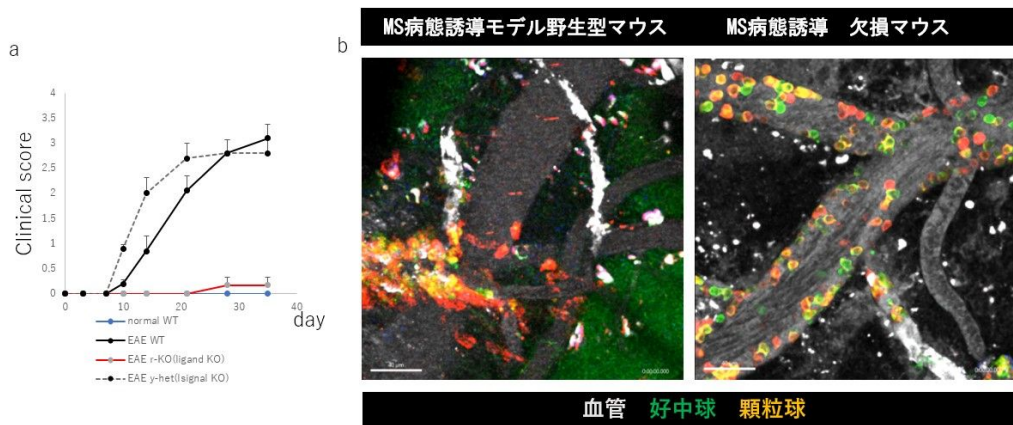


図2. 欠損マウスにおけるMS病態誘導時の脳イメージング

a. 使用したMSモデルマウス（野生型、リガンド欠損、顆粒シグナル欠損マウス）のclinical score

b. BIVSにて脳血管内（ラベル：白）を野生型免疫細胞（ラベル：緑、橙）の血管外への異常な遊走が欠損マウス内では減少した。

神経損傷に対して移植による再生を試み、再生過程をモニターすると神経障害部位への細胞遊走を観察し、移植細胞が損傷部位に対し定着し、樹状突起のような形状を示した。イメージングの手法を用いて生体内における移植細胞の動態を観察すると、損傷箇所に着した移植細胞が軸索を周辺組織に進展する様子をとらえることができた。

以上の結果より、今回見出した免疫細胞の遊走を抑える因子をターゲットとすることで、従来の治療よりも副作用が比較的少ない新たな免疫抑制療法の開発につながると期待される。また、移植により損傷神経を再生することができれば慢性期においても治療効果が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shimizu J, Murayama MA, Mizukami Y, Arimitsu N, Takai K, Miyabe Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Innate immune responses in Bechet disease and relapsing polychondritis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 1055753
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmed.2023.1055753	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 Murayama MA, Takada E, Takai K, Arimitsu N, Shimizu J, Suzuki T, Suzuki N.	4. 巻 17
2. 論文標題 Nicotine treatment regulates PD-L1 and PD-L2 expression via inhibition of Akt pathway in HER2-type breast cancer cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plos one	6. 最初と最後の頁 e0260838
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0260838	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 Arimitsu N, Mizukami Y, Shimizu J, Takai K, Suzuki T, Suzuki N.	4. 巻 112
2. 論文標題 Defective Reelin/Dab1 signaling pathways associated with disturbed hippocampus development of homozygous yotari mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 103614
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mcn.2021.103614	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 Murayama MA, Arimitsu N, Shimizu J, Fujiwara N, Takai K, Okada Y, Hirotsu C, Takada E, Suzuki T, Suzuki N.	4. 巻 70
2. 論文標題 Dementia model mice exhibited improvements of neuropsychiatric symptoms as well as cognitive dysfunctions with neural cell transplantation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp. Anim.	6. 最初と最後の頁 387-397
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.21-0008	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 Murayama MA, Arimitsu N, Shimizu J, Fujiwara N, Takai K, Okada Y, Hirotsu C, Takada E, Suzuki T, Suzuki N.	4. 巻 70
2. 論文標題 Female dominance of both spatial cognitive dysfunction and neuropsychiatric symptoms in a mouse model of Alzheimer's disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp. Anim.	6. 最初と最後の頁 398-405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.21-0009	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 有光 なぎさ, 村山 正承.	4. 巻 41
2. 論文標題 多発性硬化症における免疫病態と疾患モデルマウス (Immunopathology in Multiple Sclerosis and the experimental models).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床.	6. 最初と最後の頁 1208-1211
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 -

〔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 中田・有光 なぎさ.
2. 発表標題 生体イメージング技術を用いた中枢性神経疾患の病態解明.
3. 学会等名 聖マリアンナ医科大学・明治大学共同研究会
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	村山 正承 (Murayama Masanori) (60737675)	関西医科大学・医学部・講師 (34417)	

6. 研究組織（つづき）

	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	廣津 千恵子 (Hirotzu chieko) (90647174)	聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員 (32713)	

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