

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26870117

研究課題名(和文)新規ナルコレプシー感受性遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of Ccr3 associated with narcolepsy

研究代表者

豊田 裕美 (Toyoda, Hiromi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・客員研究員

研究者番号：90637448

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)：ナルコレプシーは代表的な過眠症であり、日中の覚醒レベルが低下すると共に夜間睡眠の断片化が認められる。オレキシン細胞の脱落がその原因と考えられているが、脱落の機序は不明である。研究代表者は、以前に報告したナルコレプシー感受性遺伝子CCR3の役割を検証し、Ccr3 KOマウスの休息期の睡眠が断片化していること、休息期の睡眠覚醒パターンが体内の免疫応答の活性化による影響を受けやすいことを明らかにした。Ccr3 KOマウスのオレキシン細胞数が野生型マウスより少ないこともわかった。本成果は、免疫関連遺伝子として知られるCcr3が、睡眠覚醒制御に関与することを示した最初の報告として学術誌に発表した。

研究成果の概要(英文)：Narcolepsy is caused by the loss of hypocretin (Hcrt) neurons. Although abnormalities in immunity are suggested to be involved in the etiology of narcolepsy, no decisive mechanism has been established. I previously reported CCR3 as a novel susceptibility gene for narcolepsy. This study investigated sleep-wake patterns of Ccr3 KO mice to understand the role of CCR3 in the development of narcolepsy. Ccr3 KO mice exhibited fragmented sleep patterns in the resting phase. Intraperitoneal injection of LPS promoted wakefulness and suppressed both REM and NREM sleep in the resting phase in both Ccr3 KO and WT mice. These LPS-induced changes in sleep patterns were larger in Ccr3 KO compared to WT mice. Furthermore, Ccr3 KO mice had fewer Hcrt neurons in the lateral hypothalamus compared to WT mice. We propose that impaired function of Ccr3 causes fragmented sleep that can contribute to vulnerability to developing narcolepsy in an inflammatory context induced by environmental triggers.

研究分野：遺伝学

キーワード：ナルコレプシー 睡眠 Ccr3 ケモカイン受容体 オレキシン細胞

1. 研究開始当初の背景

ナルコレプシーは代表的な過眠症であり、日中の強い眠気、夜間の睡眠の断片化、入眠時レム睡眠の出現、情動脱力発作(驚く等の強い感情を契機とした脱力)などを主徴とする。これまでに、

90%以上の患者の脳髄液中で、覚醒状態を維持する神経ペプチドであるオレキシンが顕著に減少していること

患者の脳内視床下部でオレキシンを産生する神経細胞(オレキシン細胞)が消失していること

患者の9割以上(日本人患者はほぼ100%)がHLA(human leukocyte antigen; ヒト白血球型抗原)-DQB1*0602 対立遺伝子を有すること

が明らかになっている。既知の多くの自己免疫疾患は様々なHLA遺伝子と強い関連を示す。また、オレキシン細胞を欠損させたマウスは、ヒトナルコレプシー様の表現型を示す。これらのことから、ナルコレプシーは、オレキシン細胞が自己免疫の標的となることにより破壊された結果発症するという仮説が強く示唆されてきた。しかしながら、詳細な病態発症機序は未だ解明されていない。

ナルコレプシー発症には遺伝的要因と環境要因の両方が関わっていることが明らかになっている。最も発症リスクの高い遺伝的要因は、前述したHLA-DQB1*0602対立遺伝子を有することであるが、これだけでは発症を説明できない。現在までにHLA以外の感受性遺伝子が10種類近く報告されているが、遺伝的リスクを十分説明するに至っていない。一方、疫学的研究により、ナルコレプシー発症と相関を示す環境要因も複数報告されてきたが、近年注目されているのは、感染症との相関である。ナルコレプシー発症3年以内の患者は、A群溶連菌の抗体価が高いことが報告されている。さらに、2009年の新型インフルエンザ(A/H1N1)のパンデミックの際に、AS03アジュバント添加ワクチンPandemrixの接種を受けた子供が、接種後6ヵ月以内にナルコレプシーを発症するリスクが6-8倍に増大したことが明らかとなった。これらのことから、免疫系に影響を与える外的要因がナルコレプシー発症の引き金になることが強く示唆されている。

これまでに、研究代表者は、日本人ナルコレプシー患者425名、日本人健常者1626名を用いてゲノムワイド関連解析を行い、rs3181077というSNP(Single Nucleotide Polymorphism;一塩基多型)がナルコレプシーと強い関連を示すことを明らかにした。rs3181077は、chemokine(C-C motif) receptor 3(CCR3)遺伝子の近傍に位置しているため、CCR3遺伝子の発現量をRT-PCRにより調べたところ、ナルコレプシー患者の末梢血のCCR3遺伝子の発現量が、健常者よ

り有意に低いことが明らかになった。CCR3はケモカイン受容体の一種であり、Th2細胞等の免疫細胞に発現し、ケモカインに反応して免疫反応の起点となることがよく知られている。また、最近、CCR3が顔面運動神経損傷時の神経細胞生存の維持に必須であることが報告されており、免疫応答以外にも役割を担っていることがわかってきている。しかし、CCR3と睡眠・覚醒制御や睡眠障害との関わりを示した報告はない。

以上の知見により、研究代表者は、ナルコレプシー感受性遺伝子CCR3の発現量の低下によりオレキシン細胞が生存しづらくなっている状態で、何らかの外的要因を受けることにより、オレキシン細胞の脱落が引き起こされた結果、ナルコレプシーが発症するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、動物モデルを用いて、ナルコレプシー感受性遺伝子として同定したCCR3が、実際にナルコレプシーのなりやすさに寄与するかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

上記の仮説を検証するため、以下の研究を行った：

・Ccr3ノックアウト(KO)マウスの睡眠・覚醒パターンの解析：

10週齢の野生型およびCcr3 KOマウスの頭部に脳波・筋電図測定電極を外科的手術により装着し、72時間脳波測定を行い、睡眠覚醒パターンを解析した。ヒトナルコレプシー様表現型の判定は、脳波解析による入眠時レム睡眠の出現および睡眠の断片化の確認、情動脱力発作の確認により行った。

・Ccr3 KOマウスは、炎症誘発によりナルコレプシーを発症するかを検証：

と同様の手法で睡眠・覚醒パターンを解析した。環境要因による炎症応答の模倣には、LPS(lipopolysaccharide; リポ多糖)を用いた。脳波測定開始前に全マウスに生理食塩水を腹腔内投与し、24時間脳波測定後、全マウスにLPSを腹腔内投与した。投与後48時間脳波測定を行い、ナルコレプシー様の表現型を示すか検証した。

・Ccr3 KOマウスのオレキシン遺伝子発現量およびオレキシンペプチド量の定量：

暗期(覚醒期)および明期(休息期)に、10週齢の野生型およびCcr3 KOマウスから脳を取り出して視床下部領域を切り出し、オレキシン前駆体遺伝子のmRNA発現量をRT-PCRにより定量した。また、同様に、オレキシンペプチド量をELISA法により定量した。さらにLPSを投与したマウスについても同様の定量を行った。

・ Ccr3 KO マウスに、オレキシン細胞数の減少は認められるか：

10 週齢の野生型および Ccr3 KO マウスを、暗期(覚醒期)を反映する ZT0、明期(休息期)を反映する ZT5 に、各々パラホルムアルデヒドを用いて固定し、オレキシン細胞を含む視床下部切片を作成した。それに対し、抗オレキシン抗体を用いて免疫染色を行い、全オレキシン細胞数をカウントした。同時に抗 c-fos 抗体を用いて二重染色し、活性化オレキシン細胞数も算出した。

・ 炎症誘発前後でのケモカインの定量：

と同様の方法で LPS 投与前後の野生型および Ccr3 KO マウスの視床下部試料を調整し、サイトカインおよびケモカインをマルチプレックスシステムにより定量した。

4. 研究成果

・ Ccr3 KO マウスは明期(休息期)の睡眠が断片化している：

Ccr3 KO マウスの暗期(覚醒期)の睡眠覚醒パターンは野生型マウスと同様に正常であった。一方、明期においては、Ccr3 KO マウスの覚醒時間の総量は野生型マウスより有意に多く、ノンレム睡眠およびレム睡眠時間の総量は野生型マウスより有意に少なかった。さらに、明期の覚醒時間・ノンレム睡眠時間・レム睡眠時間の各長さ回数と回数をカウントしたところ、Ccr3 KO マウスの覚醒回数は野生型マウスよりも多い一方で、ノンレム睡眠の長さが短く、その回数が多くなっていることがわかった。また、Ccr3 KO マウスは野生型マウスよりも各ステージ間の移行回数も多く、休息期睡眠が断片化していることが明らかになった。

・ Ccr3 KO マウスの睡眠パターンは、野生型マウスよりも炎症誘発による影響を受けやすい：

LPS 投与により炎症応答を誘発し、睡眠覚醒パターンを観察したところ、LPS 投与前と同様、暗期の Ccr3 KO マウスの睡眠パターンは野生型マウスと同様であった。明期においては、LPS 投与により、Ccr3 KO マウス、野生型マウス両者とも、投与前と比較して覚醒時間の総量が増加し、ノンレム睡眠の総量が減少した。しかしながら、LPS 投与により引き起こされたこの変化は、野生型マウスより Ccr3 KO マウスの方が大きかった。また、有意差はなかったものの、LPS 投与後、Ccr3 KO マウスは野生型マウスと比較して、明期の睡眠がより断片化している傾向にあった。LPS 投与後の Ccr3 KO マウスがヒトナルコレプシー様表現型を示すことはなかった。

・ Ccr3 KO マウスのオレキシン前駆体 mRNA 量およびオレキシンペプチド量は野生型マウスと同等である：

Ccr3 KO マウス視床下部内オレキシン前

駆体遺伝子の、暗期および明期の mRNA 発現量を定量したところ、野生型マウスと同程度であった。同様に、オレキシンペプチド量についても野生型マウスと同程度であった。LPS 投与により、オレキシン前駆体 mRNA およびオレキシンペプチド量は減少したが、両マウス間に有意差はなかった。

・ Ccr3 KO マウスは、野生型マウスよりオレキシン細胞数が少ない：

免疫染色により、Ccr3 KO マウスのオレキシン細胞数は、野生型マウスと比較して約 10%少ないことがわかった。活性化しているオレキシン細胞の割合も同時に算出したが、両マウス間に有意差はなかった。

・ LPS 投与により、視床下部内の CCL11 ケモカインが増加する：

マウス視床下部のサイトカインやケモカインを定量したところ、Ccr3 KO マウスの CCL11 量が野生型マウスより有意に多いことがわかった。さらに、LPS 投与により、CCL11 量は両マウスとも増加したが、Ccr3 KO マウスの方が有意に大きく増加した。CCL11 は CCR3 のリガンドのひとつである。

本研究により、Ccr3 KO マウスは明期(休息期)の睡眠が断片化していることが明らかになった。これは、ヒトナルコレプシーの夜間睡眠の断片化に似ている。また、Ccr3 KO マウスの明期の睡眠覚醒パターンは、野生型マウスよりも LPS 投与による影響をより強く受けることがわかった。これは、Ccr3 KO マウスの明期睡眠が、体内の免疫が活性化することによる影響を受けやすいことを示唆する。Ccr3 は休息期にノンレム睡眠を促進しており、Ccr3 の機能が低下している状態で外的な刺激を受けると、ノンレム睡眠の維持が難しくなり睡眠が断片化しやすくなるのではないかと考えている。Ccr3 が実際にノンレム睡眠を促進しているかどうかは、Ccr3 が睡眠中枢である腹側外側視索前野で機能しているかどうかなどを今後の研究で詳細に検討する必要があるだろう。

さらに本研究では、Ccr3 KO マウスのオレキシン細胞数が野生型マウスよりも少ないことがわかった。前述したように、Ccr3 が神経細胞の生存を維持する役割を担っていることが報告され始めていることから、オレキシン細胞の生存維持においても同様の役割を担う可能性がある。今後は、炎症誘発時における Ccr3 KO マウスのオレキシン細胞の脆弱性および睡眠覚醒パターンへの影響を長期的に観察して検討することで、ナルコレプシー発症への寄与を解明する必要がある。

本研究成果は、免疫関連遺伝子として知られる Ccr3 遺伝子が、睡眠覚醒制御に関与することを示した最初の報告として、学術誌に発表した (Toyoda 2017)。

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7件)

- (1) Toyoda H, Honda Y, Tanaka S, Miyagawa T, Honda M, Honda K, Tokunaga K, Kodama T. Narcolepsy susceptibility gene CCR3 modulates sleep-wake patterns in mice. PLoS One (2017) 12(11):e0187888. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0187888.
- (2) Yamasaki M, Miyagawa T, Toyoda H, et al. Evaluation of polygenic risks for narcolepsy and essential hypersomnia. J Hum Genet. (2016) 61(10):873-878. (査読有) doi: 10.1038/jhg.2016.65.
- (3) Tanaka S, Takizawa N, Honda Y, Koike T, Oe S, Toyoda H, Kodama T, Yamada H. Hypocretin/orexin loss changes the hypothalamic immune response. Brain Behav Immun. (2016) 57:58-67. (査読有) doi: 10.1016/j.bbi.2016.06.009.
- (4) Toyoda H, Miyagawa T, Koike A, et al. A polymorphism in CCR1/CCR3 is associated with narcolepsy. Brain Behav Immun. (2015) 49:148-55. (査読有) doi: 10.1016/j.bbi.2015.05.003.
- (5) Tanaka S, Toyoda H, Honda Y, Seki Y, Sakurai T, Honda K, Kodama T. Hypocretin/orexin prevents recovery from sickness. Biomed Rep. (2015) 3(5):648-650. (査読有) doi: 10.3892/br.2015.491.
- (6) Tanaka S, Honda M, Toyoda H, Kodama T. Increased plasma IL-6, IL-8, TNF-alpha, and G-CSF in Japanese narcolepsy. Hum Immunol. (2014) 75(8):940-4. (査読有) doi: 10.1016/j.humimm.2014.06.023.
- (7) Yamasaki M, Miyagawa T, Toyoda H, et al. Genome-wide analysis of CNV (copy number variation) and their associations with narcolepsy in a Japanese population. J Hum Genet. (2014) 59(5):235-40. (査読有) doi: 10.1038/jhg.2014.13.

[学会発表](計4件)

- (1) Hiromi Toyoda, Taku Miyagawa, Asako Koike, Seik-Soon Khor, Makoto Honda, Katsushi Tokunaga. A polymorphism in CCR1/CCR3 is associated with narcolepsy. International Congress of Human Genetics 2016. 2016年4月. 京都、国立京都国際会館
- (2) 豊田裕美、宮川卓、Khor Seik Soon、小池麻子、本多真、徳永勝士. A polymorphism in CCR1/CCR3 is

associated with narcolepsy. 第27回日本神経免疫学会学術集会 2015年9月. 岐阜、長良川国際会議場

- (3) 豊田裕美、宮川卓、Khor Seik Soon、小池麻子、本多真、徳永勝士. A polymorphism in CCR1/CCR3 is associated with narcolepsy. 日本人類遺伝学会 第60回大会. 2015年10月. 東京、京王プラザホテル
- (4) 豊田裕美、宮川卓、Khor Seik Soon、川嶋実苗、山崎茉莉亜、小池麻子、田中進、本多裕、本多真、徳永勝士. 新規ナルコレプシー疾患感受性遺伝子の探索. 日本人類遺伝学会 第59回大会. 2014年11月. 東京、タワーホテル船堀

[図書]
該当なし

[産業財産権]
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
豊田 裕美 (TOYODA, Hiromi)
東京大学・大学院医学系研究科・客員研究員
研究者番号: 90637448

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
本多 芳子 (HONDA, Yoshiko)
児玉 亨 (KODAMA, Tohru)
田中 進 (TANAKA, Susumu)
宮川 卓 (MIYAGAWA, Taku)