



Title	GM-CSFは痛み刺激で誘発されるEAE再燃症状に関係する末梢由来骨髄系細胞を中枢神経領域に維持する働きがある [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	松山, 詩菜
Description	配架番号 : 2851
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15917号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92193
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	MATSUYAMA_Shiina_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 松山 詩菜

学位論文題名

GM-CSF は痛み刺激で誘発される EAE 再燃症状に関係する末梢由来骨髄系細胞を中枢神経領域に維持する働きがある

(GM-CSF promotes the survival of peripheral-derived myeloid cells in the Central Nervous System for pain-induced relapse of neuroinflammation)

【背景と目的】中枢神経領域は通常、血液脳関門で末梢免疫系から隔離されている。しかし、多発性硬化症のモデルとして広く用いられている実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) マウスは、ミエリンを抗原として認識する自己反応性 Cluster differentiation (CD) 4⁺ T 細胞が中枢神経領域に侵入することで病態を形成する。我々の研究室では EAE マウスで病原性の末梢免疫細胞が中枢神経領域に侵入するためには重力刺激による神経活性化が必要なことを証明した。さらに、類似した機構の解析をすすめ、EAE マウスでも寛解後に痛み刺激を加えると第 5 腰髄に残存する末梢免疫細胞が活性化し、症状が再燃することを見出した。しかし、なぜ末梢由来の免疫細胞が長期間中枢神経領域に存在し、刺激によって活性化する状態が維持されるのかは不明であった。この機序の解明は多発性硬化症の症状再燃抑制など慢性的な炎症疾患の新たな治療的アプローチの確立に重要であると考え、中枢神経領域に残存する細胞集団を「末梢由来骨髄系細胞 (peripheral-derived myeloid cells)」として、さらなる検証をすることにした。

【対象と方法】自己反応性の CD4⁺ T 細胞を移植された transfer EAE (tEAE) マウスは、一過性に麻痺などの神経症状を呈したのち症状が消退する。このような寛解期に至った tEAE マウスを用いて、中枢神経領域に残存する末梢由来の免疫細胞を解析した。2015 年の我々の研究結果から、この末梢由来の免疫細胞は中枢神経領域の免疫細胞であるミクログリア細胞と比較して Major Histocompatibility Complex (MHC) class II 受容体の発現が高く、また、CD11b 受容体も高発現であることがわかった。これを「末梢由来骨髄系細胞」と命名し他の細胞と区別した。ミクログリア細胞と比較して見られた Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF) 受容体発現の違いに着目し、受容体の違いやその受容体シグナル伝達が長期に残存する要因となりうるかを検証した。また、中枢神経領域における GM-CSF の供給源の検討も行った。さらに、実際に痛み刺激によって起きる tEAE 症状の再燃が GM-CSF 受容体シグナル阻害によって変化するかを検討した。

【結果】まず tEAE を誘導する前後で病巣の主座となる第 5 腰髄に存在する末梢由来の免疫

細胞の動態を確認した。tEAE 誘導後、症状のピークである二週間後には様々な末梢性免疫細胞が第 5 腰髄でみられたが、症状の寛解後は主に「末梢由来骨髄系細胞」が他の免疫細胞より多く残存していた。「末梢由来骨髄系細胞」の細胞表面分子がミクログリア細胞と比較し GM-CSF 受容体複合体を構成する分子が高発現であることに注目し、中枢神経領域で GM-CSF を中和したところ、寛解期 tEAE マウスの第 5 腰髄周辺に存在する「末梢由来骨髄系細胞」の細胞数が減少した。さらに、GM-CSF がどのようにして中枢神経領域で存在するか、GM-CSF の分泌源を検証した。中枢神経領域の細胞集団をセルソーターでいくつかの分画にわけて GM-CSF の messenger ribonucleic acid (mRNA) や濃度を測定した結果、寛解期の tEAE マウスでは、血液内皮細胞 (Blood endothelial cell; BEC) が主たる発現細胞であることが示唆された。第 5 腰髄の免疫化学組織染色の画像から、「末梢由来骨髄系細胞」は BEC とくも膜下領域にて共局在していることも認められた。また、中枢神経領域に抗 GM-CSF 抗体を投与することで GM-CSF シグナル伝達を阻害した状態にすると痛み刺激を加えても EAE 症状が再燃しないことが明らかになった。さらに、痛み刺激を加えた後に抗 GM-CSF 抗体を投与しても再燃症状が抑制された。

【考察】 tEAE マウスの中枢神経領域に長期にわたり存在する「末梢由来骨髄系細胞」はミクログリア細胞と比べて GM-CSF 受容体分子の発現が高く、GM-CSF の中和で細胞数が減少した。過去の研究で GM-CSF シグナル伝達は EAE 発症に重要な因子であることも報告されている (Codarri et al., 2011; El-Behi et al., 2011)。今回、ミクログリア細胞と比較して「末梢由来骨髄系細胞」は GM-CSF 受容体分子が高発現であることに着目し GM-CSF は EAE の慢性化にも重要である可能性を疑い実験を行った。その結果、GM-CSF のシグナル伝達を阻害すると痛み刺激後も EAE 症状が再燃をしないことがわかった。また、寛解期 tEAE マウスでは BEC が GM-CSF の主たる発現細胞である可能性が示唆された。最近、ヒト患者を対象とした多発性硬化症の臨床研究で抗 GM-CSF モノクローナル抗体が使用され、再発抑制効果を認めたと報告されている (Constantinescu et al., 2015)。今回の研究結果は、中枢神経領域における GM-CSF シグナル伝達系の阻害が多発性硬化症患者の再発の繰り返しによる増悪を抑制する可能性を示唆し、GM-CSF 抗体による多発性硬化症の治療効果を論理的に補強するものである。

【結論】 過去の研究で、tEAE マウスは痛み刺激によって症状が再燃するが、それは「末梢由来骨髄系細胞」が第 5 腰髄に残存し、痛みを起点とする神経回路の活性化に反応して中枢炎症を誘導した結果であることがわかった。しかし本来、末梢免疫細胞は中枢神経領域に存在しないとされている。そのため tEAE マウスで「末梢由来骨髄系細胞」と名付けた末梢由来の特定の細胞集団が長期にわたって第 5 腰髄に存在する要因は不明であった。この研究により、GM-CSF 分子が再発維持に重要な因子であり、GM-CSF シグナル伝達の阻害が EAE 症状の再燃を抑制することが明らかになった。多くの自己免疫疾患は根治的な治療が難しく、容易に症状が再燃することで患者の日常生活に多大な損失をもたらす。今回の発見は、再発予防という新たな治療アプローチの確立に重要な知見であると考えられる。