



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15917
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92194
Type	doctoral thesis
File Information	MATSUYAMA_Shiina.pdf



学 位 論 文

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)

2024 年 3 月

北 海 道 大 学

松 山 詩 菜

学 位 論 文

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)

2024 年 3 月

北 海 道 大 学

松 山 詩 菜

目 次

発表論文目録および学会発表目録 1 頁

要旨 2 頁

略語表 5 頁

第一章 GM-CSF が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に与える影響の解析

緒言 7 頁

方法 12 頁

結果 18 頁

考察 50 頁

第二章 神経発達異常を有するマウスにおける実験的自己免疫性脳脊髄炎の検討

緒言 53 頁

方法 55 頁

結果 58 頁

考察 64 頁

結論 65 頁

謝辞 66 頁

利益相反	67 頁
引用文献	68 頁

【発表論文目録および学会発表目録】

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1.

著者：Shiina Matsuyama, Reiji Yamamoto, Kaoru Murakami, Nobuhiko Takahashi, Rieko Nishi, Asuka Ishii, Junko Nio-Kobayashi, Nobuya Abe, Kumiko Tanaka, Jing-Jing Jiang, Tadafumi Kawamoto, Toshihiko Iwanaga, Yuta Shinohara, Takeshi Yamasaki, Izuru Ohki, Shintaro Hojyo, Rie Hasebe, Shimpei I Kubota, Noriyuki Hirata, Daisuke Kamimura, Shigeru Hashimoto, Yuki Tanaka, Masaaki Murakami

タイトル：GM-CSF Promotes the Survival of Peripheral-Derived Myeloid Cells in the Central Nervous System for Pain-Induced Relapse of Neuroinflammation

掲載紙：Journal of Immunology, 211 巻・34-42 ページ, (2023 年)

本研究の一部は以下の学会で発表した。

1.

著者:Shiina Matsuyama, Nobuhiko Takahashi, Shintaro Hojyo, Daisuke Kamimura, Masaaki Murakami

タイトル：A survival factor of blood-derived MHC class II^{hi} cells in the CNS, which is critical for pain-mediated EAE relapse

学会：日本免疫学会(第 50 回日本免疫学会学術集会), 2021 年 12 月 8-10 日・奈良

要旨

【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。具体的には、四足歩行のマウスもヒトと同様に重力が主にヒラメ筋で感知されるが、EAE マウスは末梢免疫細胞がヒラメ筋による神経刺激が入力する第 5 腰髄周辺で集積していることに着目し、この関連を明らかにした。重力刺激の入力で活性化された神経は第 5 腰髄でノルアドレナリンを産生する。このノルアドレナリンの存在により第 5 腰髄の背側血管内皮細胞で局所的な炎症の場が形成され、血液脳関門の機能が破綻、自己反応性の末梢免疫細胞が中枢神経領域に侵入し髄鞘への攻撃などが発生することを実験的に示したのである。そして、この一連の機構を「重力ゲートウェイ反射」と名付けた。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。本研究ではそれら細胞表面の受容体発現の特徴から、フローサイトメトリーなどを用いて「末梢由来骨髄系細胞」を単離し、詳しく解析した。そして、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。また、「末梢由来骨髄系細胞」はミクログリア細胞と比べて抗アポトーシスに関与する B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL)を多く発現しており、GM-CSF は「末梢由来骨髄系細胞」が中枢神経領域で存在するために重要であり、抗アポトーシス作用が亢進している可能性が示唆された。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。もともと、GM-CSF は骨髄系細胞の分化や生存で重要な機能をもつことが知られているが、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ており、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。

【略語表】

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ACC	Anterior cingulate cortex
APC	antigen presenting cell
APP	Amyloid precursor protein
ATP	adenosine triphosphate
aEAE	active EAE
BBB	blood brain barrier
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
Bcl-2	B-cell/CLL lymphoma 2
BEC	Blood endothelial cell
BSA	Bovine serum albumin
CD	Cluster differentiation
cDNA	complementary DNA
CFA	Complete Freund's adjuvant
CHD	chromodomain helicase DNA-binding
CNS	Central Nervous System
CSF	cerebrospinal fluid
CX3CL1	C-X3-C Motif Chemokine Ligand
DN	other neuronal cells
DNA	deoxyribonucleic acid
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum
FRC	Fibroblastic reticular cells
GM-CSF	Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor
GM-CSFR	GM-CSF Receptor
IL	Interleukin
Ig	immunoglobulin
L5	5 th lumber spinal cord
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOG	Myelin Oligodendrocyte Glicolipid

mRNA	messenger RNA
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
NAd	noradrenalin
NFkB	nuclear factor kappa B
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDPN	podoplanin
PFA	Paraformaldehyde
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PTx	Pertussis Toxin
RNA	ribonucleic acid
SCA	Spinocerebellar Ataxia
SCEM	Super cryoembedding medium
SD	Standard deviation
SEM	Standard error of the mean
STAT	signal transducer and activator of transcription
tEAE	transfer EAE
TCR	T cell receptor
TBS-T	Tris Buffered Saline with Tween 20

第一章 GM-CSF が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に与える影響の解析

緒言

多発性硬化症は、慢性の炎症性脱髄を主徴とする中枢神経系(Central Nervous System; CNS)の自己免疫性疾患である。病原性 CD4+ T 細胞の関与が遺伝学的に示されている(International Multiple Sclerosis Genetics et al., 2011)。患者の約八割は再発寛解型とされ、中枢神経領域で時間的、空間的に病変が多発する(Compston and Coles, 2008; Consortium, 2011; Ransohoff and Engelhardt, 2012; Steinman, 2009)。多発性硬化症の炎症性病変部では様々な種類の末梢由来の免疫細胞が認められ、血液脳関門(blood brain barrier; BBB)の障害に続いて脱髄や神経機能調節障害が生じていることが示唆される(Gold et al., 2006; McFarland and Martin, 2007; Siffrin et al., 2010; Sospedra and Martin, 2005; Steinman, 2014)。

Experimental autoimmune encephalomyelitis(EAE)マウスは中枢神経組織由来のペプチドなどを免疫することで誘導される自己免疫疾患モデルであり、多発性硬化症と多くの病態を共有することが知られている。我々の研究室では、この EAE マウスを用いて重力刺激が特定血管領域で免疫細胞と協調し、血液脳関門を破綻させることを実験的に証明した(Arima et al., 2012)。

日常的な動作による重力刺激は、四足歩行のマウスもヒトと同様にヒラメ筋で主に感知され、その刺激で活性化された特異的な感覚神経を起点となり、交感神経と協調して第 5 腰髄周辺でノルアドレナリンを産生する。このノルアドレナリンは、第 5 腰髄近傍に存在する血管内皮細胞に働いて、nuclear factor kappa B(NFkB)を活性化し、ケモカインの過剰産生機構である Interleukin-6 (IL-6)アンプを活性化する(Ogura et al., 2008a)。その際ミエリン抗原を認識する病原性自己反応性 Cluster differentiation(CD)4+ T 細胞を血中に移入した transfer EAE(tEAE)マウスのように、一定数以上の病原性 CD4+ T 細胞が末梢血中に存在すると第 5 腰髄の背側血管周辺から脊髄内に侵入し、血液脳関門の機能が破綻する。その結果、末梢免疫細胞が中枢神経領域に侵入して病態が生じる(Arima et al., 2012)。我々はこの機構を「重力ゲートウェイ反射」と名付けた(図 1)。

さらに、重力ゲートウェイ反射の発見から十年ほどで、痛み、ストレス、光など計六種の環境刺激を起点に引き起こされる特異的な神経回路活性化も報告した。それぞれ、刺激に反応した神経回路の活性化により種々

の臓器で特定の血管部位に IL-6 アンブを誘導し病原性 CD4+ T 細胞を含む免疫細胞が組織に侵入する経路を生じさせることが明らかになった(Arima *et al.*, 2012; Arima *et al.*, 2015a; Arima *et al.*, 2017; Hasebe *et al.*, 2022; Stofkova *et al.*, 2019)。

その中でも、痛みは実際の多発性硬化症患者の再発要因として臨床的にも重要視されており、多発性硬化症の活動性を決定する一つの要因とされている(Ehde *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2010)。我々の研究室では一度寛解状態となった EAE マウスでも痛み刺激を加えると神経症状が再燃し、中枢炎症が誘導されることを発見した(Arima *et al.*, 2015b)。病原性 CD4+ T 細胞を野生型マウスに移植し病態を誘導する tEAE マウスは、移入後、多彩な末梢免疫細胞が重力刺激で活性化される神経の主な入力先である第 5 腰髄の背側血管周囲に集積する。そこで生じた局所炎症が BBB を破綻させ、中枢神経領域に末梢免疫細胞が侵入し一過性に神経症状を呈し、徐々に症状が消退し寛解に至る。それに伴い第 5 腰髄近傍で集積した免疫細胞も減少するが、Major Histocompatibility Complex(MHC) classII受容体と CD11b 受容体を発現する一部の骨髄系細胞が寛解後も長期にわたり第 5 腰髄周囲に存在した(Arima *et al.*, 2015b)。パラビオーシス実験により、これら MHC classII^{Hi} CD11b+細胞は活性化したミクログリア細胞ではなく末梢由来の単球様の細胞であることを明らかにし、この細胞を「末梢由来骨髄系細胞」と名付けた(Arima *et al.*, 2015b)。この寛解期 tEAE マウスに痛み刺激が加わると、感覚神経が活性化し前帯状回から第 5 腰髄腹側にある 2 本の血管に投射する交感神経が活性化する。この交感神経終末からノルアドレナリンが産生されると、当該部位でケモカインの過剰産生機構である IL-6 アンブが第 5 腰髄腹側の 2 本の血管内皮細胞で活性化し C-X3-C Motif Chemokine Ligand(CX3CL1)といったケモカインが産生される。これにより「末梢由来骨髄系細胞」が第 5 腰髄の腹側血管部の周辺に集積し、MOG 抗原を提示、血管内に存在する病原性 CD4+ T 細胞を活性化する。その結果、血管周囲で局所炎症が起こり、BBB が破綻、末梢血中の様々な免疫細胞がさらに集積し、中枢炎症症状の再燃を認める(Arima *et al.*, 2015b)(図 2)。

これらの実験事実から、第 5 腰髄周囲の中枢神経系で長期にわたって存在する局所炎症を誘導する可能性を持つ「末梢由来骨髄系細胞」が、EAE の痛み刺激依存性の再発病態を誘導する重要な要因であると考えられた。そのため、この細胞が中枢炎症減退後の寛解期でも中枢神経領域で存在し続ける機序を明らかにすることは、難治である多発性硬化症の新たな治療的アプローチにつながると期待した。

この研究は、中枢神経領域の血管内皮細胞(Blood endothelial cell; BEC)が発現する Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor(GM-CSF)が、「末梢由来骨髄系細胞」の長期生存に重要であることを示したものである。さらに、抗 GM-CSF 抗体を投与して中枢神経領域から GM-CSF 分子を除去することで、「末梢由来骨髄系細胞」の数が減少し、痛み刺激を加えても症状再燃を認めないことも明らかにした。これらの発見は中枢領域における GM-CSF 経路の人為的な阻害が、多発性硬化症を含む再発性難治の中枢炎症性疾患の新たな治療ターゲットとなる可能性を示唆している。

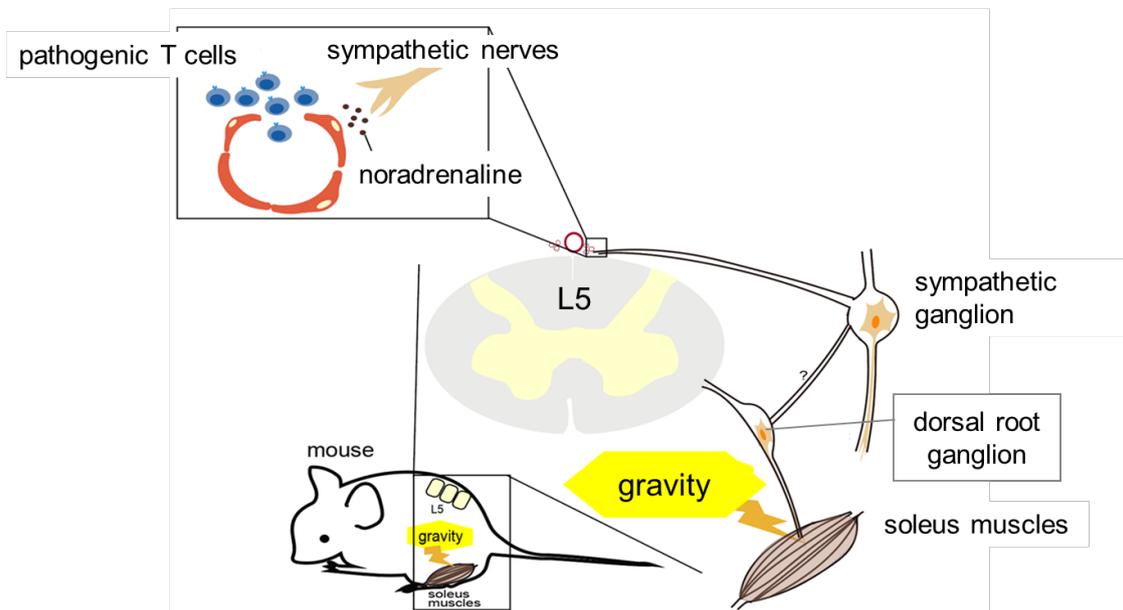


図 1. 重力刺激を起点に誘導された感覚神経と交感神経の働きが EAE 発症に重要である

四足歩行のマウスもヒト同様、重力刺激は主にヒラメ筋で感知されている。重力刺激により感覚神経回路が活性化されると、近傍の交感神経回路を活性化させて第 5 腰髄の背側血管部でノルアドレナリンを産生する。ノルアドレナリンは当該部位の血管内皮細胞で **signal transducer and activator of transcription(STAT3)**と **NFkB** の同時刺激で生じる **IL-6** アンプを活性化し、ケモカインを過剰産生させる。血液中に一定数以上のミエリン分子を認識する病原性 **CD4+ T** 細胞が存在すると、第 5 腰髄の背側血管周囲で局所的な炎症の場を形成し、血液脳関門の機能を一部破綻させ中枢炎症が生じる。これを当研究室が実験的に証明し、一連の分子機構を「重力ゲートウェイ反射」と名付けた(Arima *et al.*, 2012)。

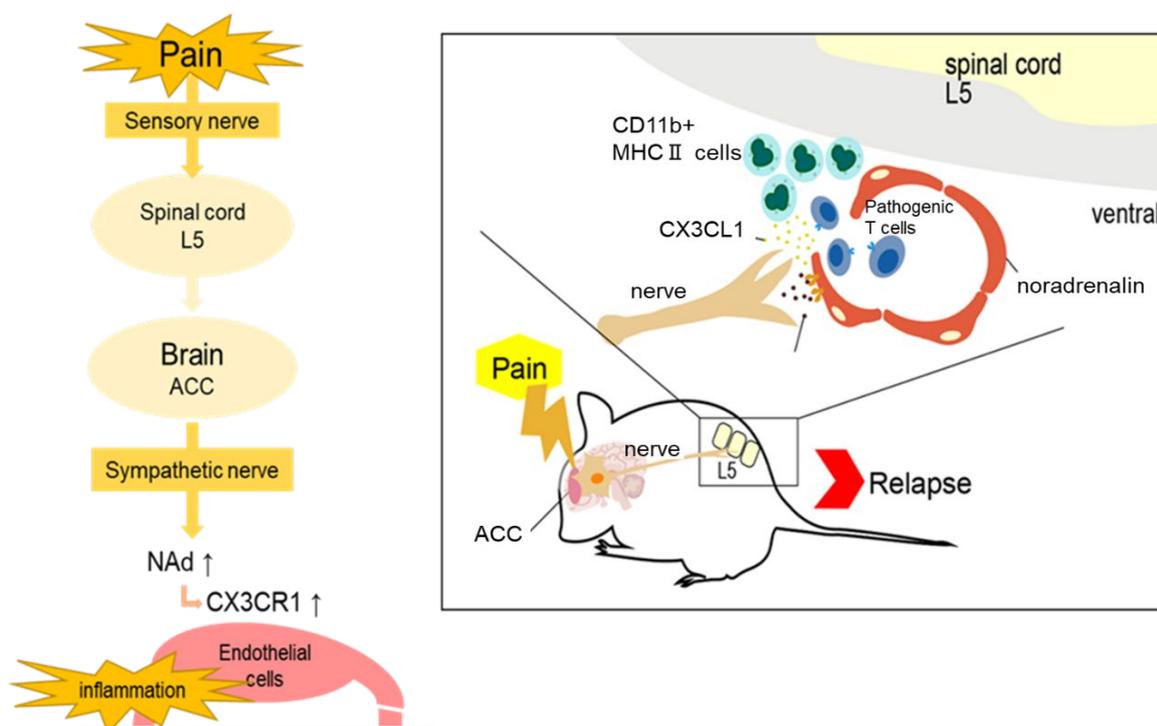


図 2. 痛み刺激を起点に誘導される感覚神経と交感神経のクロストークが EAE 症状を再燃する

tEAE マウスはミエリン分子を認識する病原性自己反応性 CD4+ T 細胞移入後、約 1-2 週間程度の麻痺症状を呈したのち症状が消退する。通常であれば無症状のまま寛解期が維持されるが、痛み刺激が加わると一過性に中枢炎症症状が再燃する。その機序を当研究室で解析し、「痛みゲートウェイ反射」と名付けた。具体的には、痛み刺激は感覚神経を介して脳の前帯状回 (Anterior cingulate cortex; ACC) で認識されたのち、下行性に脊髓腹側部の 2 本の血管部に投射する交感神経が活性化し、神経終末でノルアドレナリン (noradrenalin; NAd) が産生される。このノルアドレナリンは第 5 腰髄背側部血管で IL-6 アンプを活性化し、CX3CL1 などのケモカインを産生する。これに第 5 腰髄周囲に残存していた「末梢由来骨髄系細胞」が反応して、第 5 腰髄腹側血管に集積し、血中の病原性 CD4+ T 細胞に抗原提示して局所炎症を起こし血液脳関門を破綻させる。その結果、様々な末梢免疫細胞が動員され EAE 症状が再燃するのである (Arima *et al.*, 2015b)。

方法

1. マウス

C57BL/6 マウス 6-8 週齢は日本 SLC 株式会社（静岡、日本）より購入したものを使用した。動物の取り扱いについては「北海道大学動物実験に関する規程」に則り、北海道大学の動物実験倫理審査の承認を受けて行った。実験は、動物実験倫理及び動物福祉の基本概念である 3R(Replacement, Reduction, Refinement)の原則に基づき適正に実施した。本研究で使用した動物実験は、北海道大学機関内動物飼育使用委員会の承認を得ている。

2. tEAE モデル

C57BL/6 の各々6-8 週齢のマウスを使用した。古典的な EAE は主に active EAE(aEAE)と呼ばれるマウスを直接免疫する手法だが、この第一章の研究ではすべて transfer EAE(tEAE)と呼ばれる病原性自己免疫性 CD4+ T 細胞を移植して発症させる手法を用いて作成したマウスで実験を行った。tEAE はまず aEAE と同様、C57BL/6 マウス 1 匹あたり百日咳毒(Pertussis Toxin; PTx) (Sigma)0.2-0.4 μ g を静脈投与し、ミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白 (Myelin Oligodendrocyte Glycolipid; MOG) (Sigma)200-400 μ g 皮下注射、並びに Freuds adjuvant(Sigma)10ml に結核菌パウダー(Sigma)200-400mg を混合した Complete freund's adjuvant(CFA)をマウスの尾の付け根部分に 50-100 μ l 皮下注射し、免疫を行った。初日(day0)に PTx と MOG、CFA を投与後、day2, day7 にそれぞれ同量の PTx を再度投与した。9 日目に、抗 CD4 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて、免疫化マウスから脾臓をサンプリングし、Homogenization、NH₄Cl による赤血球除後、Microbeads CD4(Miltenyi Biotec) と混合し氷上で 30 分安置したのち MS カラム(Miltenyi Biotec)へ通した。カラムを通過した APC は別個回収し照射(35Gy)した。カラムは 3 回洗浄後、カラムに吸着している CD4+ T 細胞をフラッシュして回収した。以上の工程はすべて MACS バッファーを用いて細胞液の希釈、洗浄、回収を行った。回収した CD4+ T 細胞と antigen presenting cell(APC)はそれぞれ 1 シャーレあたり 4 x 10⁷ 細胞、1 x 10⁸ 細胞を播種し、リコンビナント IL-23 (R&D systems、1ng/mL)、MOG ペプチド (Sigma Aldrich、25 μ g/mL) を添加して 24 時間培養した。培養後、細胞を回収して再度抗 CD4 マイクロビーズと混合し、氷上で 30 分アンチしたのち MS カラムで濾過、純化した CD4+ T 細胞のみを回収した。移植はマウス 1 匹あたり 1.5 x 10⁷ 細胞となるよう生理食塩水で希釈し静脈注射した。

EAE マウスは EAE Clinical score を用いて重症度をモニターし、各日評価した(Huseby et al., 2012)。

EAE Clinical score: 0, 正常; 1, 尾下垂; 2, 歩行が不安定、下肢軽度麻痺; 3, 下肢麻痺; 4, 両上下肢麻痺; 5, 死亡(Arima et al., 2012; Arima et al., 2015b; Ogura et al., 2008b)

3. 痛み刺激

実験の前に、使用するマウスを 3 日間実験環境に慣れさせた。手術はインフルランを用いた麻酔下で行われた。右側臥位で固定したマウスの頬部分で 1 cm 程度皮膚切開し、血管を傷つけないようにしながら右三叉神経中枝を露出させ、6-0 吸収糸 (ELmelt, 秋山製作所) で緩く結紮した (Thygesen et al., 2009)。対照群は、同様の手順で三叉神経を露出させたのち、縫合糸での結紮をしないものとした。

4. 免疫組織化学染色

EAE を発症したマウスの脳や脊髄を凍結切片で免疫染色した。マウスに Pentobarbital(共立製薬)を腹腔内投与し深昏睡させたのち、Phosphate-buffered saline(PBS)で経心腔的に灌流を行って可及的に血液除去し脳と脊椎を採取した。第 5 腰椎を中心に脊椎を矢状断で切断し、Super cryoembedding medium(SCEM)コンパウンド(SECTION-Lab Co. Ltd.) にブロック状で包埋し急速冷凍させた(Kawamoto and Kawamoto, 2021)。組織ブロックは川本フィルム (Cryofilm) (SECTION-LAB Co.Ltd.)に貼付し、ミクロトーム装置 CM3050 (Leica Microsystems) を用いて凍結切片 (10-20 μ m) を作成した。100%エタノールに 2 秒つけたのち乾燥させ、4% Paraformaldehyde(PFA)に 10 分漬けた。PBS に 10 分つける方法で 3 回洗浄した。その後、PBS または 2% Bovine serum albumin(BSA)(Sigma-Aldrich) を含む Tris Buffered Saline with Tween 20(TBS-T)でブロックし、Fc 受容体ブロックのために抗 CD16/CD32(2.4G2) の存在下で一次抗体につけ、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置した。一次抗体は、抗 MHC class II (eBioscience、M5/114.15.2) および抗リン酸化 c-Fos (Cell Signaling Technology) を使用した。翌日 PBS 洗浄 3 回したのち Hoechst33342 (Life Technologies) を 1/2000 希釈した抗体液で核を染色した。30 分後に再度 3 回洗浄して顕微鏡観察(BZ-X, Keyence)を行った。

5. ホールマウント染色

マウスを Pentobarbital(共立製薬)で麻酔し、生理食塩水で経心腔的に灌流し

たのち、0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) 中の 4%Paraformaldehyde(PFA)で処理した。脊髄を含む椎弓を解剖し、5% ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)に2-3 週間浸漬して脱灰した。第 5 腰椎を解剖し、矢状断で切断した。その後、PBS で洗浄し、0.03% Triton X 含有 PBS (Triton-PBS) に入れ、4°C で 2 時間放置した。組織を Triton-PBS で 1 : 2 に希釈したブロックエース (DS ファーマバイオメディカル株式会社、大阪、日本) で 2 時間ブロックし、Triton-PBS で希釈したラット抗 MHC class II抗体 (eBioscience、M5/114.15.2) およびウサギ抗コラーゲン IV 型抗体 (アブカム、ab19808) とともに 3-5 日間 4°C に放置した。組織を、Triton-PBS で希釈した Cy3 標識抗ラット IgG および AlexaFluor 488 標識抗ウサギ IgG とともに暗所で 4 時間、室温で放置した。染色した脊髄の髄膜側を上にしてスライドグラスに載せ、共焦点レーザー顕微鏡 (FV300 ; Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。

6. 中枢神経系初代細胞培養

EAE を発症したマウスの脳や脊髄を凍結切片で免疫染色した。マウスに Pentobarbital を腹腔内投与し深昏睡させたのち、PBS で経心腔的に灌流を行って可及的に血液除去したのち脳と脊椎を採取した。脊椎の椎弓を切断し、脊髄を露出させて採取した。脳および脊髄を Homogenization したのち、10% Fetal Calf Serum(FCS) (Thermo Fisher Scientific) および Dispase I (Wako, 1500 U/mL) を含む RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) で酵素処理し、30%Percoll (GE Healthcare) を加え、2500rpm で 15 分間遠心分離し、ミエリンを除去した。10%FCS を含む RPMI1640 で 96 ウェルプレートに播種し、36 時間培養を行った。ゴルジプラグ (BD Bioscience) を添加し、さらに 12 時間培養した。CD4+ T 細胞を刺激するために、培養終了 6 時間前に Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 1 μ g/mL) と ionomycin (1 μ g/mL) を添加した。

7. 脳組織からの細胞分離、フローサイトメトリー、セルソーティング

ウスに Pentobarbital(共立製薬)を腹腔内投与し深昏睡させたのち、PBS で経心腔的に灌流を行って可及的に血液除去し脳と脊椎を採取した。脊椎の椎弓を切断し、脊髄を露出させて採取した。第 5 腰髄周辺のみを用いる場合は、第 5 腰髄周囲の第 4 腰髄から第 1 仙髄領域で脊髄を採取した。採取した脊髄、あるいは脳および脊髄は Homogenization したのち、10%FCS と Dispase I を含む RPMI1640 を用いて酵素処理をした。細胞を以下の 1/200-1/500 希釈した抗体で染色した：抗 CD4-APC (Biolegend、RM4-5)、抗 CD4-PE (Biolegend、RM4-5)、抗 CD4-PacificBlue (eBioscience、RM4-5)、

抗 CD8a-PE/シアニン 7 (Biolegend、53-6. 7)、抗 CD11b-FITC (Biolegend、M1/70)、抗 CD11b-PE (Biolegend、M1/70)、抗 CD11b-PerCP (Biolegend、M1/70)、抗 CD19-BB421 (Biolegend、6D5)、抗 CD19-APC (Biolegend、6D5)、抗 Ly-6C-APC (Biolegend、HK1. 4)、抗 GM-CSFR α -PE (R&D systems、698423)、抗 common α 鎖-ビオチン (Miltenyi Biotec、REA193)、抗 CD45-PE (BD Pharmingen、30-F11)、抗 MHC class II-APC (Biolegend、M5/114.15.2)、抗 MHC class II-FITC (eBioscience、M5/114.15.2)、抗 CD31-APC (Biolegend、390)、抗 TCR(T cell receptor) β -FITC (eBioscience、H57-597)、抗 TCR β -PE (Biolegend、H57-597)、抗 TCR β ビオチン (eBioscience、H57-597)、抗 $\gamma\delta$ TCR ビオチン (eBioscience、eBioGL3) 抗 IgD ビオチン (biolegend、11-26c. a)、抗ポドプラニン (Podoplanin; PDPN)-ビオチン (Biolegend、NC-08)、ストレプトアビジン-BV421 (Biolegend)、Rat Immunoglobulin(Ig)G2a-PE (eBioscience、eBR2a)、Human IgG1-ビオチン (Ancel) である。細胞内染色は、細胞を表面染色し、Cytotfix/Cytoperm (BD Bioscience) を用いて氷上で 10 分間固定した。固定後、Perm/Wash buffer (BD Bioscience) で希釈した抗 Bcl-xL-PE (CST、54H6)、抗 B-cell/CLL lymphoma 2(Bcl-2)-PE (Biolegend、BCL/10C4)、抗 GM-CSF-FITC (Biolegend、MP1-22E9) 抗体を氷上で 1 時間染色した。解析には、Cyan Flow Cytometry (Beckman Coulter) を使用した。細胞を精製するために Moflo Cell sorters (Beckman Coulter) を使用した。細胞の純度は常に 98%を超えていた。データは FlowJo ソフトウェア (Tree Star Inc) を用いて解析した。

8. サイトカイン測定

マウスはイソフルラン(Pfizer)吸入麻酔して実施した。約 20 μ L の脳脊髄液を cisterna magna からガラスキャピラリーで採取した。GM-CSF は、Milliplex cytokine/chemokine magnetic bead panel (Merck Millipore)を用いて、製品説明書に従って測定された。一部の実験では、細胞培養上清中の GM-CSF 分子濃度を、酵素結合免疫吸着法 (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay; ELISA) キット (BD Biosciences) を用いて、製品に付属するプロトコールに従って測定した。検出範囲は 15.625~1000pg/ml であった。濃度は、製造元から提供された特定の標準物質で作成した標準曲線を用いて算出した。各サンプルは二回以上測定を実施した。

9. レーザーマイクロダイセクション

凍結切片を作成し、Tissue FIX 容器 (PAXgene, Qiagen) を用いて数分間固定した。生理食塩水で洗浄後、マイクロダイセクションデバイス 6000B (Leica Microsystems) を用いて第 5 腰髄の実質領域および髄膜下領域を採取した。採取した組織は、RNA 抽出のため、RNeasy Micro Kit (Qiagen) の試薬で直ちに溶解した。

10. リアルタイム Polymerase chain reaction(PCR)

RNeasy Micro Kit を用いて Total RNA を抽出し、DNase I (Qiagen) 処理後、M-MLV 逆転写酵素 (Promega) を用いて complementary deoxyribonucleic acid(cDNA)を合成した。リアルタイム PCR は KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (KAPA Biosystems) または KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (KAPA Biosystems) を用いた。使用したプライマーは以下の通りである。Hprt プロブ、5'-FAM-ATCCAACAAAGTCTGGCCTGTATCCAAC-TAMRA3'、5'-AGCCCCAAAATGTTAAGGTTG および 5'-CAAGGGCATCCAACAACAAAC3'; Gm-csf プロブ、5'-FAM-CGCCCTTGAGTTTGTGAAATTGCC-TAMRA3'、5'-CCTCAAGAAGCTAACATGTG-3'、5'-GGGCAGTATGTCTGTAGTG-C3'。Hprt sybr、5'-GATTAGCGATGATGAACCAGGTT-3' および 5'-CCTCCCATCTCCTTCATGACA-3'; GM-CSFR α sybr, 5'-CTGCTTCTCCACGCTACTG-3' and 5'-GAGACTCGCCGTGTATCC-3'; および common β chain sybr、5'-AAAAACAGCCAGTGTCTG-3' および 5'-GATGCTGACGTTCTTGGGAAG-3'。リアルタイム PCR の条件は以下の通りである。95°C で 3 秒、60°C で 30 秒のサイクルを 40 回 (probe)、または 95°C で 5 秒、60°C で 1 分のサイクルを 40 回行った (sybr)。

11. サイトカインおよび抗体の髄腔内注入

マウスはイソフルラン吸入麻酔下で手術を行った。20 μ g の抗 GM-CSF 抗体 (R&D systems, MP122E9)、20 μ g の Rat IgG2a (BioLegend, RTK2758)、または 0.2 μ g の GM-CSF (Peprotech) を 10 μ L の生理食塩水で希釈した。注射は 30G の針がついたマイクロシリンジを使って髄腔内投与を行った。注射部位は腰髄と仙髄の間とした。硬膜内腔への試薬の注入は 5 分以上行った。一部の実験では、抗 GM-CSF 抗体または Rat IgG2a の髄腔内投与に浸透圧ポンプ (Alzet, CA) を使用した (注入速度: 0.5 μ L/h、20 μ g/day) (Abe et al., 2022)。浸透圧ポンプ (Azlet) の体内埋入術も、イソフルラン (Pfizer) 吸入麻酔下に行った。麻酔後、頭部皮膚を縦切開し頭蓋骨を露出した。脳定位固定

装置を用いて頭蓋骨を保定し、座標は Bregma から 0.5 mm 尾側、1.1 mm 外側、深さ 2.5 mm (Sarah et al. 2013) の脳室内に浸透圧ポンプに接続した Bain infusion kit III (Azlet) を刺入し、歯科技工用瞬間接着剤 (ビーエスエーサクライ) で固定した。縫合は 6-0 吸収糸 (ELmelt, 秋山製作所) を使用した。

12. 統計解析

2 群間の差の統計解析には、スチューデント t 検定 (両側) を使用した。3 群以上の場合は、one-way ANOVA 検定を用いた。0.05 未満の P 値を統計的に有意であるとみなした。

結果

1. 中枢神経領域に残る「末梢由来骨髄系細胞」は GM-CSF 受容体が高発現である

典型的な EAE 症状は MOG 特異的自己反応性 CD4⁺ T 細胞（病原性 CD4⁺ T 細胞）移植後約 1 週間後から認め、2 週間頃にピークを迎え、3 週間程度で寛解する（図 3）。

これまでの研究で、寛解期 tEAE マウスの第 5 腰髄周辺に多く存在する「末梢由来骨髄系細胞」はミクログリア細胞を含むほかの骨髄系細胞と比較して、MHC classII および CD11b 受容体を高発現することがわかった。そのため、まず tEAE 発症前後の第 5 腰髄周辺で「末梢由来骨髄系細胞」や他の免疫細胞が増加するかを改めて確認した。実験の結果、病原性 CD4⁺ T 細胞移植前の健康なマウス（野生型マウス）では、MHC classII^{Hi} CD11b⁺細胞をはじめ、CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、CD19 陽性である B 細胞などの末梢免疫細胞はいずれも第 5 腰髄周囲にほとんど存在しなかった。しかし、tEAE 移植後、症状のピークである 2 週間後には様々な免疫細胞が中枢神経領域で増加した。寛解期に至った tEAE マウスでは中枢神経領域に増加した免疫細胞がすべて減少していたが、他の免疫細胞に比べて MHC classII^{Hi} CD11b⁺細胞が比較的多く残存している印象であった（図 4）

次に、過去の研究を参考に MHC classII と CD11b を細胞表面マーカーとして中枢神経からミクログリア細胞と「末梢由来骨髄系細胞」を分離し、サイトカイン受容体の発現を調べた(Grassivaro et al., 2020)。「末梢由来骨髄系細胞」とミクログリア細胞の分離で用いた代表的なフローサイトメトリー結果を図 5 に示す。

その結果、GM-CSF 受容体を構成するに分子である GM-CSF α 、Common β chain がミクログリア細胞と比較して「末梢由来骨髄系細胞」で高発現をすることがわかった（図 5、6）。さらに、リアルタイム PCR でこれら分子の messenger RNA(mRNA)を測定したところ、同様に高発現であることが確認できた（図 7）。

また、GM-CSF が病原性 CD4⁺ T 細胞の移植の前後で変化しているかを調べるために、寛解期 tEAE マウスと野生型マウスの脳脊髄液を採取し、GM-CSF 分子の濃度を測定した。その結果、寛解期 tEAE マウスと野生型マウスで GM-CSF 分子濃度に有意な差は認めず、野生型マウスでも定常的に脳脊髄液中に存在すると考えられた（図 8）。

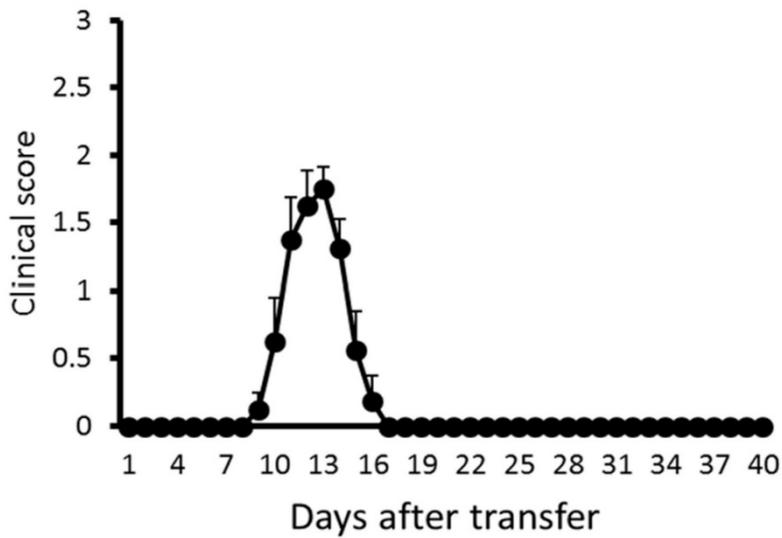


図 3. 典型的な t EAE マウスの EAE Clinical score 推移

健康な C57BL/6 マウス(野生型マウス)に、MOG ペプチドで免疫したマウスから単離した病原性 CD4+ T 細胞を経静脈的に投与し、EAE を誘導した。病原性 CD4+ T 細胞を投与後、EAE Clinical score を評価し 40 日までの推移を図に示した。典型的な tEAE マウスでは、臨床症状は約 1 週間後から出現し、2 週間頃にピークを迎え、その後症状は消退し寛解期に至ることがわかる (1 群につき n=5-6)。

EAE Clinical score: 0, 正常; 1, 尾下垂; 2, 歩行が不安定、下肢軽度麻痺; 3, 下肢麻痺; 4, 両上下肢麻痺; 5, 死亡

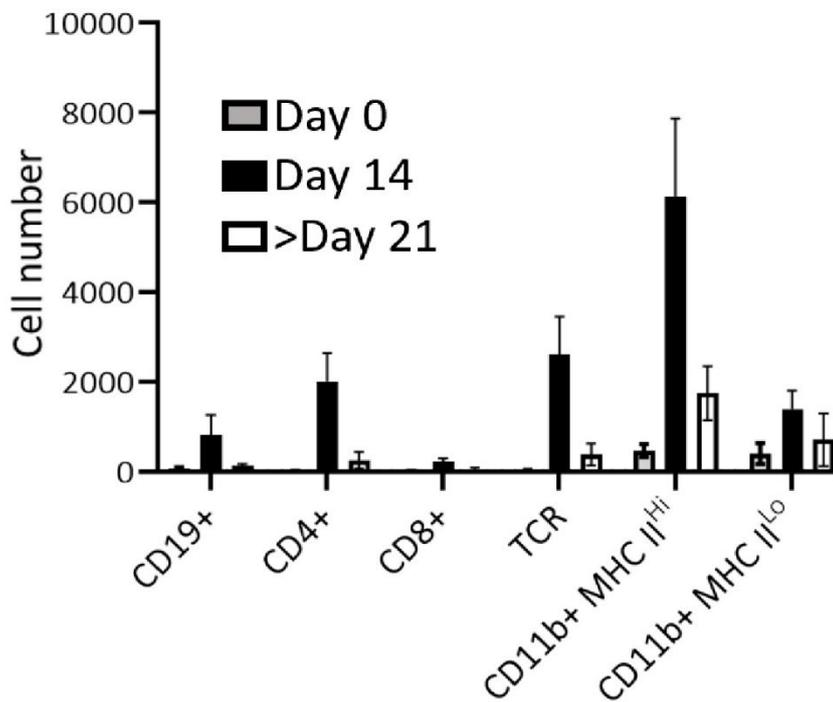


図 4. tEAE 発症前後における第 5 腰髄周囲の免疫細胞動態
 病原性 CD4+ T 細胞を移植する以前の正常な C57BL/6 マウス (0 日目) と、移植後 14 日目および 21 日目以降の tEAE マウスからそれぞれ、第 5 腰髄周辺 (第 4 腰髄から第 1 仙髄領域) の脊髄を採取した。採取した脊髄をホモジェナイズし、フローサイトメトリーで細胞液中の CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞、CD19+細胞、CD11b+ MHC class II^{Lo} 細胞および CD11b+ MHC class II^{Hi} 細胞のそれぞれの個数を調べた (1 群 5-6 匹)。いずれの免疫細胞も 0 日目である病原性 CD4+ T 細胞移植前は第 5 腰髄周辺にほとんど存在しなかった。症状のピークとなる 14 日目時点ではすべての細胞群で細胞数増加を認め、その後減少した。ほかの細胞群と比べ CD11b+ MHC class II^{Hi} 細胞は寛解期 (21 日目) 以降でも比較的細胞数が多く、中枢神経領域に残存しやすい印象であった。

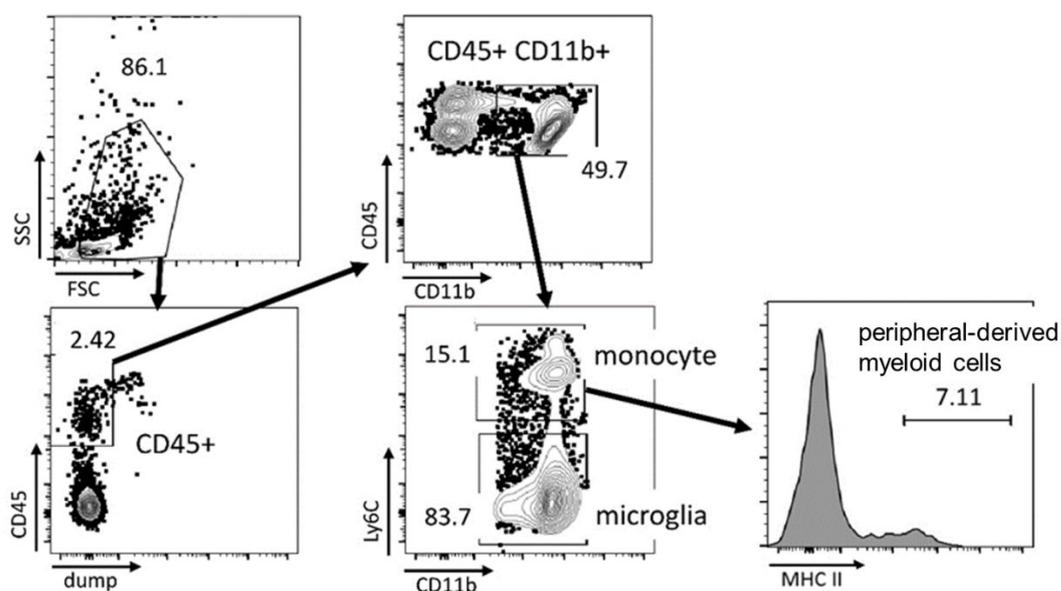


図 5. 「末梢由来骨髄系細胞」とミクログリア細胞を分離する代表的なフローサイトメトリー

寛解期 tEAE マウスを麻酔下で灌流し、脳および脊髄を採取した。ミエリンを除去し、抗体液につけ、フローサイトメトリーに流した。先行研究を参考に「末梢由来骨髄系細胞」およびミクログリア細胞をフローサイトメトリーで決定した(Grassivaro *et al.*, 2020)。図に示されたデータは、少なくとも3つの独立した実験の代表である。

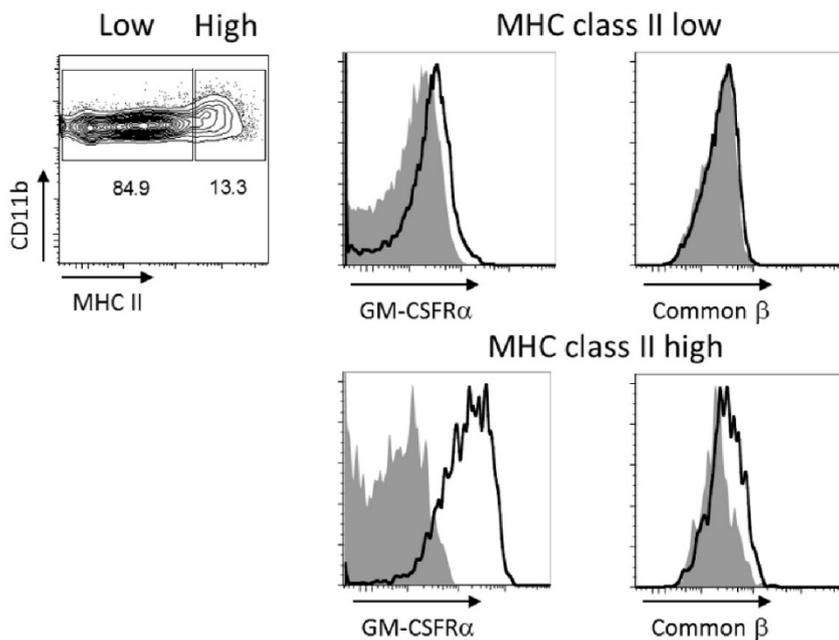


図 6. 「末梢由来骨髄系細胞」はミクログリア細胞と比べて、GM-CSF 受容体が高発現である

病原性 CD4⁺ T 細胞移植後 32 日の寛解期 tEAE マウスの脳および脊髄を採取、ミエリンを除去し MHC class II^{Lo} CD11b⁺ミクログリア細胞および MHC class II^{Hi} CD11b⁺「末梢由来骨髄系細胞」の GM-CSF receptor(GM-CSFR) α および Common β chain の発現をフローサイトメトリーで調べた。グレー斜線部はアイソタイプコントロール染色を示す (1 群 5-6 匹、代表的データを提示)。この結果から、「末梢由来骨髄系細胞」はミクログリア細胞と比べて細胞表面の GM-CSF 受容体の構成分子を高発現に認めることが明らかになった。

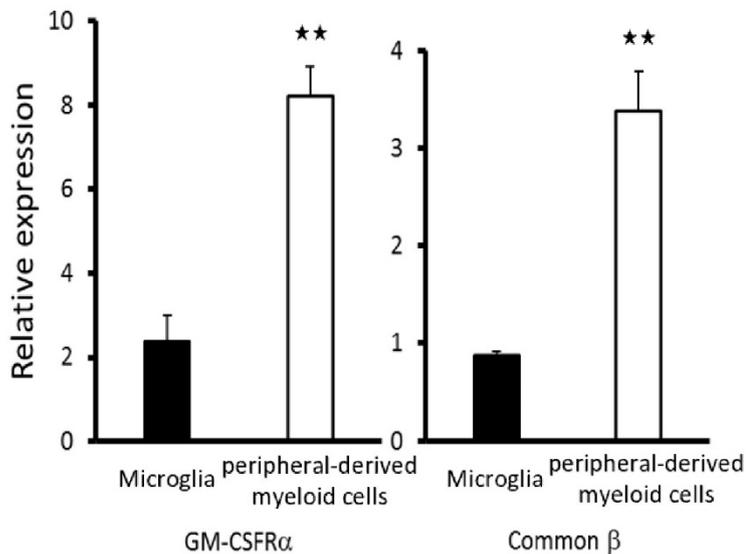


図 7. 「末梢由来骨髄系細胞」はミクログリア細胞と比べ GM-CSF 受容体分子の mRNA が高発現である

病原性 CD4+T 細胞移植し、寛解期 tEAE マウスをから脳および脊髄を採取した。採取後、ミエリンを除去して抗体液につけ「末梢由来骨髄系細胞」とミクログリア細胞をセルソーターで分離した。GM-CSFR α と Common β chain 発現量を比較するために、分離した細胞ごとに DNA を合成し、mRNA の発現をリアルタイム PCR で測定した (1 群 5-6 匹)。結果、GM-CSFR α と Common β chain いずれの mRNA もミクログリア細胞と比べて「末梢由来骨髄系細胞」で高発現であることが示唆された。

示したデータは少なくとも 3 つの独立した実験の代表であり、平均+SEM を示す。★★は $p < 0.01$ を示す。スチューデントの t 検定 (両側) を用いた。

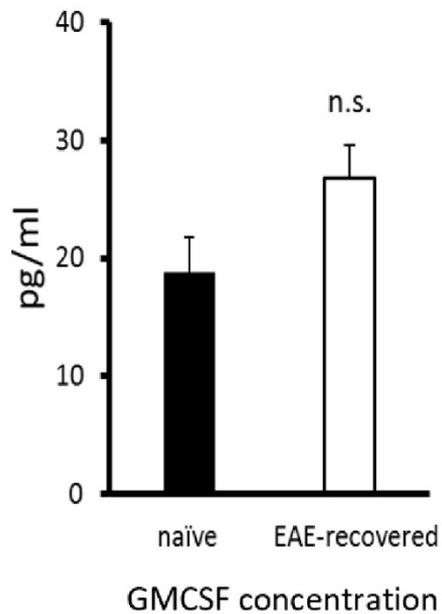


図 8. 脳脊髄液中の GM-CSF 分子濃度は EAE 誘導前後で変化しなかった野生型マウス (naïve) と寛解期 tEAE マウス(EAE-recovered)の脳脊髄液を採取し、GM-CSF 分子濃度を比較した。GM-CSF 分子濃度は、サイトカインマルチプレックス分析によって測定された (1 群 5-6 匹)。この結果、病原性 CD4+ T 細胞移植前後で GM-CSF 分子濃度は変化していないことがわかった。そのため、マウスの中枢神経領域では tEAE 誘導の有無に関わらず一定量の GM-CSF が定常的に分泌されていると考えられた。示したデータは少なくとも 3 つの独立した実験の代表であり、平均+SEMを示す。n.s.は有意差なしを示す。スチューデントの t 検定 (両側) を用いた。

2. 「末梢由来骨髄系細胞」維持に GM-CSF 分子が必要である

過去に、aEAE の誘導には GM-CSF が必要であること (McQualter et al., 2001) や、GM-CSF 欠損 CD4+ T 細胞の移植では aEAE が誘導できないこと (Codarri et al., 2011; El-Behi et al., 2011) が報告されており、aEAE の発症には活性化 CD4+ T 細胞からの GM-CSF が重要な因子であるとされている。今回着目した「末梢由来骨髄系細胞」は GM-CSF 受容体分子が高発現しており、GM-CSF シグナルは「末梢由来骨髄系細胞」が長期にわたり中枢神経領域に存在する機序にも重要な意味を持つのではないかと考えた。そこで、GM-CSF が「末梢由来骨髄系細胞」に及ぼす機能的意義を調べることにした。

はじめに、寛解期 tEAE マウスにリコンビナント GM-CSF 分子を髄腔内投与し中枢神経領域における細胞動態を調べた。この結果、寛解期 tEAE マウスの「末梢由来骨髄系細胞」数が野生型マウスと比較して有意に増加していることがわかった (図 9)。この理由は、定常状態で「末梢由来骨髄系細胞」の GM-CSFR α の発現がミクログリア細胞よりも高いためではないかと考えた。

また、抗アポトーシス因子 Bcl-xL は GM-CSF 分子の処理によって「末梢由来骨髄系細胞」に誘導されたが (図 10A)、Bcl-2 は変化を認めなかった (図 10B)。

GM-CSF 分子に対する中和抗体の髄腔内注射は、「末梢由来骨髄系細胞」数を有意に減少させたが (図 11A)、ミクログリア細胞数はほとんど影響がみられなかった (図 11B)。

さらに、GM-CSF のほか、Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) も骨髄系細胞の生存、増殖、分化を増強することが知られている (Stanley and Chitu, 2014) ため、M-CSF でも同様の実験を行った。しかし、リコンビナント M-CSF 分子や抗 M-CSF 受容体抗体の髄腔内注射では、「末梢由来骨髄系細胞」数にほとんど影響を与えなかった (参照データなし)。これらの結果は、GM-CSF シグナルが寛解期 tEAE マウスの「末梢由来骨髄系細胞」の生存に重要であることを示唆している。

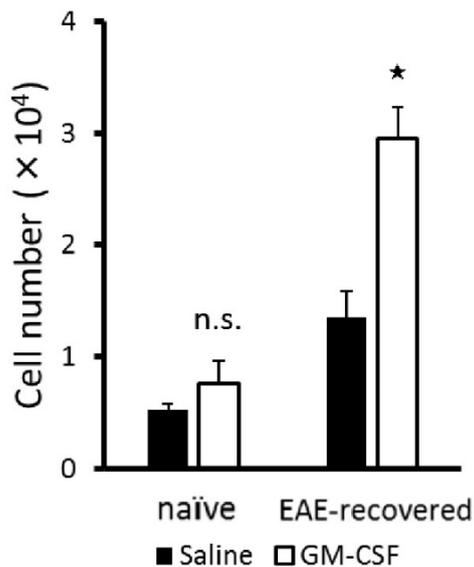


図 9. GM-CSF 分子髄腔内投与による中枢神経領域の「末梢由来骨髄系細胞」数の変化

病原性 CD4+ T 細胞移植後 27-31 日目にリコンビナント GM-CSF 分子を連日髄腔内投与した。野生型マウス (naïve) および移植後 32 日目の寛解期 tEAE マウス (EAE-recovered) の脳および脊髄を採取し、ミエリンを除去後、抗体液につけ、フローサイトメトリーでそれぞれの中枢神経領域に含まれる「末梢由来骨髄系細胞」数を計測した。野生型マウスの中枢神経領域に存在する「末梢由来骨髄系細胞」数はリコンビナント GM-CSF 分子投与によって変化しなかった。一方、寛解期 tEAE マウスの中枢神経領域に存在する「末梢由来骨髄系細胞」数はリコンビナント GM-CSF 分子の投与によって増加した。(各群 n=5-6)

示したデータは少なくとも 3 つの独立した実験の代表であり、平均+SEM を示す。★は、 $p<0.05$; n.s.は有意差なしを示す。スチューデントの t 検定 (両側) を用いた。

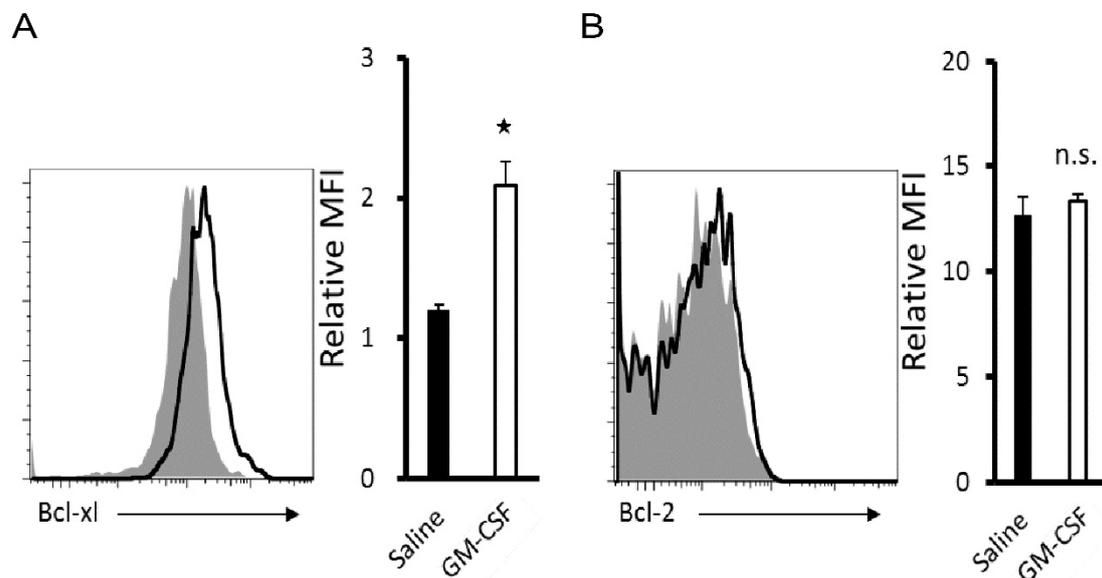


図 10. リコンビナント GM-CSF 分子投与による「末梢由来骨髄系細胞」の細胞内抗アポトーシス因子の変化

病原性 CD4+ T 細胞移植後 27-31 日目に、組換え GM-CSF 分子および対照群として生理食塩水を髄腔内投与した。その後、移植後 32 日目に寛解期 tEAE マウスの脳および脊髄を採取し、ミエリンを除去した。その後、細胞膜に透過性処理を実施し、抗体液につけ、フローサイトメトリーで Bcl-xL (A) および Bcl-2 (B) の発現を調べた。グレー斜線部は生理食塩水投与群を示す。MFI;平均蛍光強度 (各群 n=5-6)。抗アポトーシス因子 Bcl-xL は、GM-CSF 処理によって末梢由来の骨髄系細胞に誘導された (A) が、Bcl-2 では変化がみられなかった (B)。

示したデータは少なくとも 3 つの独立した実験の代表であり、平均+SEM を示す。★は、 $p < 0.05$; n.s.は有意差なしを示す。スチューデントの t 検定 (両側) を用いた。

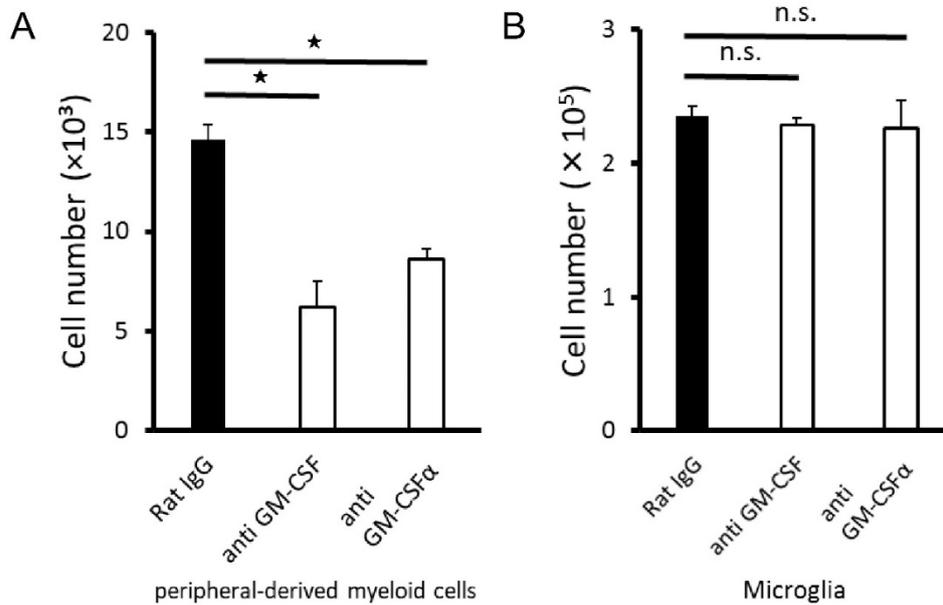


図 11. GM-CSF シグナルの阻害による「末梢由来骨髄系細胞」数の変化
 病原性 CD4+ T 細胞移植後 25-31 日目に抗 GM-CSF 抗体および抗 GM-CSF α 受容体抗体、対照群として Rat IgG 分子を連日髄腔内投与した。移植後 32 日目に脳および脊髄を採取し、ミエリンを除去、抗体液につけ、フローサイトメトリーで中枢神経領域に存在する「末梢由来骨髄系細胞」の数 (A) およびミクログリア細胞 (B) の細胞数を測定した (各群 n=5-6)。「末梢由来骨髄系細胞」は抗 GM-CSF 抗体を投与による GM-CSF の中和、抗 GM-CSF α 抗体による GM-CSF シグナル伝達の阻害いずれの場合も細胞数が減少していた (A)。一方、ミクログリア細胞数はいずれの場合も変化がみられなかった (B)。

示したデータは少なくとも 3 回の独立した実験の代表であり、平均+SEM を示す。★は $p < 0.05$ 、n.s.は、有意差なしを示す。one-way ANOVA 検定を用いた。

3. 「末梢由来骨髄系細胞」の維持に重要な GM-CSF 供給源の検討

一連の実験から、GM-CSF の有無が第 5 腰髄の「末梢由来骨髄系細胞」の生存に影響を及ぼすことが示されたため、寛解期 tEAE マウスにおける GM-CSF の供給源を検証した。

過去の研究で、活性化 CD4⁺ T 細胞を含む CD45⁺ 骨髄由来細胞は GM-CSF 分子を分泌することが報告されている(Codarri *et al.*, 2011; El-Behi *et al.*, 2011)。そのため、まず寛解期 tEAE マウスの第 5 腰髄周辺に存在する CD45⁺ 細胞と CD45⁻ 細胞の細胞集団でそれぞれ分離し、GM-CSF mRNA 発現量を調べた。その結果、CD45⁺細胞は CD45⁻ 細胞と比べ GM-CSF mRNA レベルを高く発現していることがわかった (図 12)。

次に、どの CD45⁺ 細胞集団が主に GM-CSF mRNA を発現しているか、CD45⁺ 細胞集団をさらに細かい分画にして調べた。その結果、主に GM-CSF mRNA を発現しているのは CD4⁺ T 細胞であり、CD45^{Med} CD11b⁺のマイクログリア細胞や「末梢由来骨髄系細胞」ではなかった (図 13)。しかし、寛解期 tEAE マウスの中樞神経領域から単離した CD4⁺ T 細胞ではほとんど GM-CSF は検出されず、*in vitro* で再活性化後した場合のみ GM-CSF が産生された (図 14)。さらに、抗 CD4 抗体を投与して中樞神経領域で CD4⁺ T 細胞を枯渇させても、寛解期 tEAE マウスの末梢由来骨髄系細胞を減少させなかった (図 15)。そのため、CD4⁺ T 細胞が産生する GM-CSF は、「末梢由来骨髄系細胞」の生存にほとんど影響しないと考えられた。

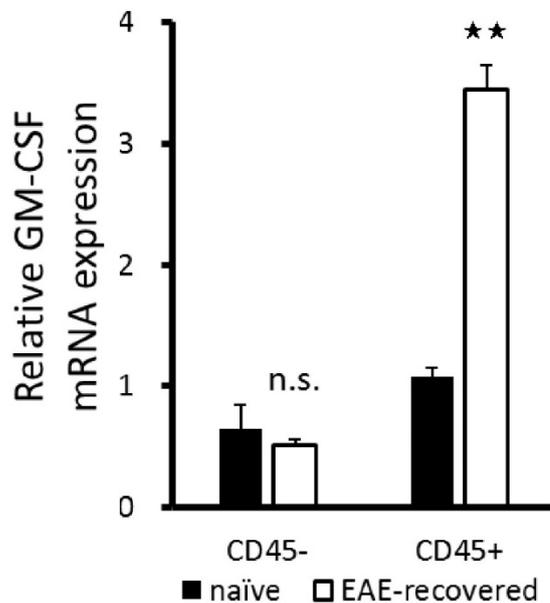


図 12. CD45+ 細胞と CD45- 細胞における GM-CSF mRNA 発現量比較
 野生型マウス (naïve) および病原性 CD4+ T 細胞移植後 32 日目の寛解期 tEAE マウス(EAE-recovered)の脳および脊髄を採取し、ミエリンを除去、抗体液につけたのち、CD45- 細胞および CD45+ 細胞をセルソーターで単離した。単離後、細胞ごとに DNA を合成し、GM-CSF mRNA の発現をリアルタイム PCR で測定した (各群 n=5-6)。その結果、野生型マウスでは CD45+ 細胞と CD45- 細胞における GM-CSF mRNA 発現量に有意な差はみられなかったが、寛解期 tEAE マウスの CD45+ 細胞は CD45- 細胞と比べて GM-CSF mRNA 発現が高いことがわかった。
 示したデータは少なくとも 3 回の独立した実験の代表であり、平均+SEM を示す。★★は $p<0.01$ 、n.s.は有意差なしを示す。スチューデントの t 検定 (両側) を用いた。

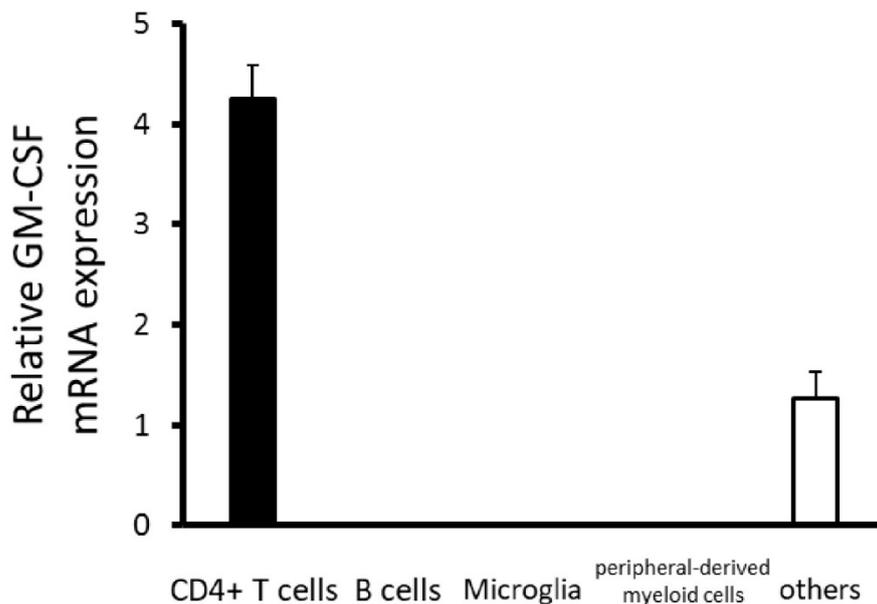


図 13. 寛解期 tEAE マウスの中中枢神経領域に存在する免疫細胞における GM-CSF mRNA 発現量の検討

CD45+ 細胞のうち、GM-CSF mRNA の発現量が高い細胞を検討するため、野生型マウスおよび病原性 CD4+ T 細胞の移植後 32 日目の寛解期 tEAE マウスの脳および脊髄を採取し、ミエリンを除去、抗体液につけたのち、CD4+ T 細胞、B 細胞、ミクログリア細胞、「末梢由来骨髄系細胞」およびその他の CD45+ 細胞を、セルソーターを用いて単離した。単離後、細胞集団ごとに DNA を合成し、GM-CSF mRNA の発現をリアルタイム PCR で測定した（各群 n=5-6）。その結果、B 細胞、ミクログリア細胞、「末梢由来骨髄系細胞」ではほぼ GM-CSF mRNA 発現量を認めず、CD4+ T 細胞がほかの細胞集団と比較して GM-CSF mRNA の発現が高いことがわかった。示したデータは少なくとも 3 回の独立した実験の代表であり、平均+SEM を示す。

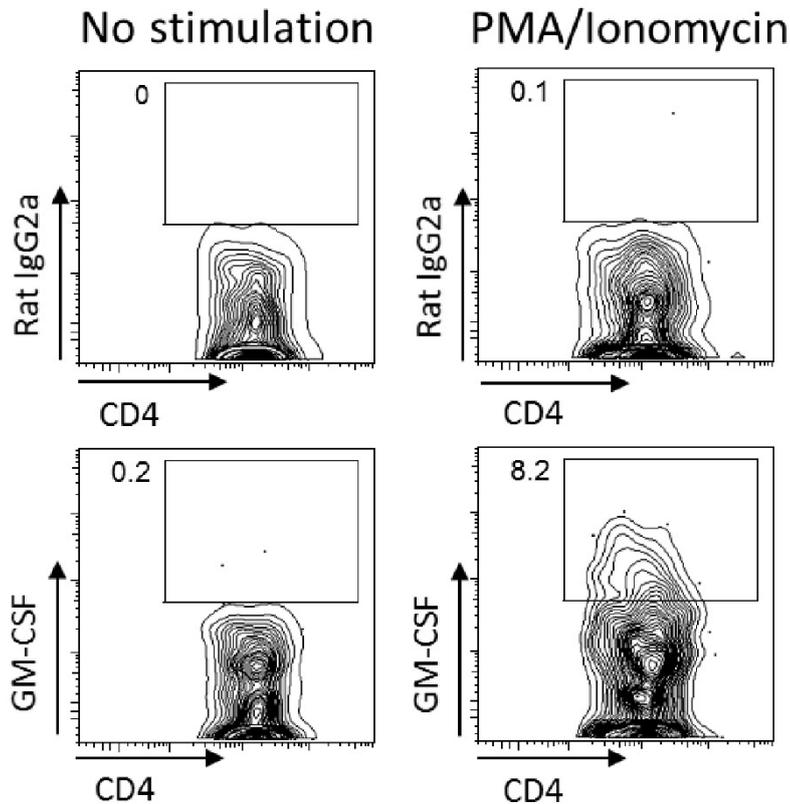


図 14. CD4+ T 細胞の GM-CSF 分泌に関する検討

実際に CD4+ T 細胞が GM-CSF を分泌しているかを検討するため、野生型マウスおよび病原性 CD4+ T 細胞の移植後 32 日目の寛解期 tEAE マウスの脳および脊髄を採取し、ミエリンを除去して細胞を回収した。回収した細胞の細胞数を計測後、同細胞数に調整し 10%FCS を加えた RPMI1640 で 96 ウェルプレートに播種し、36 時間培養を行った。その後、ゴルジプラグを添加し、さらに 12 時間培養したのち、培養終了 6 時間前に Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 1 μ g/mL) と ionomycin (1 μ g/mL) を添加し CD4+ T 細胞を刺激し、活性化した。抗体液につけ、CD4+ T 細胞の細胞内 GM-CSF の発現をフローサイトメトリーで決定した。図中の 0.2 および 8.2 は抗体陽性細胞のパーセンテージである。活性化前の CD4+ T 細胞では GM-CSF がほとんど検出されず、活性化後に検出された。このことから、CD4+ T 細胞が刺激を受けて活性化していない状況では、GM-CSF が産生されず、供給源とならないことが示唆された。示したデータは少なくとも 3 つの独立した実験の代表である。

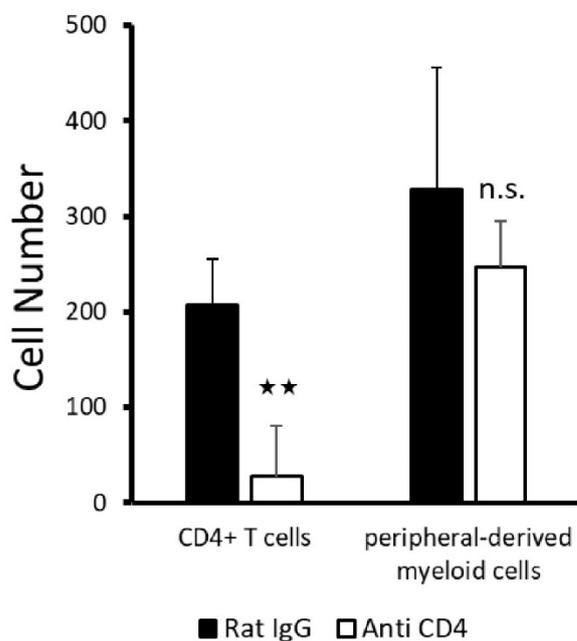


図 15. CD4+ T 細胞の枯渇による「末梢由来骨髄系細胞」への影響
 寛解期 tEAE マウスの第 5 腰髄において、CD4+ T 細胞の存在が「末梢由来骨髄系細胞」の生存に重要であるかを調べるために、病原性 CD4+ T 細胞移植後 25-31 日目に抗 CD4 を枯渇させる抗体を髄腔内投与した。その後、32 日目にマウスの第 5 腰髄およびその前後の脊髄（第 4 腰髄から第 1 仙髄の領域）を採取し、抗体液につけ、「末梢由来骨髄系細胞」および CD4+ T 細胞の数をフローサイトメトリーにより決定した（各群 n=5-6）。抗 CD4 枯渇抗体の投与によって第 5 腰髄近傍の CD4+ T 細胞数の減少は認められたが、「末梢由来骨髄系細胞」数は変化しなかった。
 示したデータは少なくとも 3 回の独立した実験の代表であり、平均+SEM を示す。★★は $p < 0.01$ 、n.s.は有意差なしを示す。スチューデントの t 検定（両側）を用いた。

3. 中枢神経領域の主な GM-CSF 供給源は血管内皮細胞である

検討を始めた当初、CD4+ T 細胞が GM-CSF の供給源ではないかと予想した。しかし、実験をすすめるうちに GM-CSF を産生するのは活性化状態の CD4+ T 細胞であり、寛解期の L5 領域では CD4+ T 細胞は GM-CSF を産生しないと考えられた。定常状態でも「末梢由来骨髄系細胞」が維持されている状況から、改めて寛解期 tEAE マウスの第 5 腰髄領域で GM-CSF の供給源を検討しなおすことにした。そこで、先行研究を参考に CD45- 細胞を 3 つの細胞分画に分けて GM-CSF mRNA の発現を調べた(Cupovic et al., 2016)。脊髄領域の CD45- 細胞は CD45-PDPN+CD31- 線維芽細胞 (Fibroblastic reticular cells; FRC)、CD45-PDPN-CD31+ 血管内皮細胞 (Blood endothelial cell; BEC)、CD45-PDPN-CD31- その他の神経細胞 (other neuronal cells; DN) という 3 つの細胞集団に分類した(Cupovic et al., 2016) (図 16)。

BEC 集団は寛解期 tEAE マウスまたは野生型マウスで GM-CSF mRNA の発現を認めたが、FRC および DN 細胞分画では発現を認めなかった (図 17)。活性化後に GM-CSF を発現する CD4+ T 細胞 (図 14) とは対照的に、BEC は活性化の有無にかかわらず GM-CSF を構成的に発現しており、定常的に GM-CSF を分泌していることが示唆された (図 18)。

中枢神経領域における BEC の数は、CD45+ 細胞よりはるかに多いため (図 19A)、GM-CSF mRNA レベルを発現量と細胞数を掛け合わせて補正すると、野生型マウスおよび寛解期 tEAE マウスのいずれの場合も他の細胞集団と比較して BEC 分画に GM-CSF mRNA が多く含まれていると考えられた (図 19B)。これらの観察と一致して、脳脊髄液中の GM-CSF タンパク質の濃度は、野生型マウスと寛解期 tEAE マウスの間で有意な差はなかったが (図 8)、野生型マウスの中枢神経領域で CD4+ T 細胞を含む CD45+ 細胞は著しく少なかった (図 19A)。

さらに、中枢神経領域の CD31+ 細胞と CD31- 細胞を磁気標識したビーズを用いて分離し、一晚培養したのち ELISA で GM-CSF タンパク質濃度を測定した結果、CD31+ 細胞集では GM-CSF タンパク質の分泌が認められたが、CD31- 細胞集団では GM-CSF タンパク質が検出されないことが明らかになった (図 20)。これらの結果から、BEC が寛解期 tEAE マウスにおける「末梢由来骨髄系細胞」の維持に必要な GM-CSF を供給する主要な細胞集団であることが示唆された。

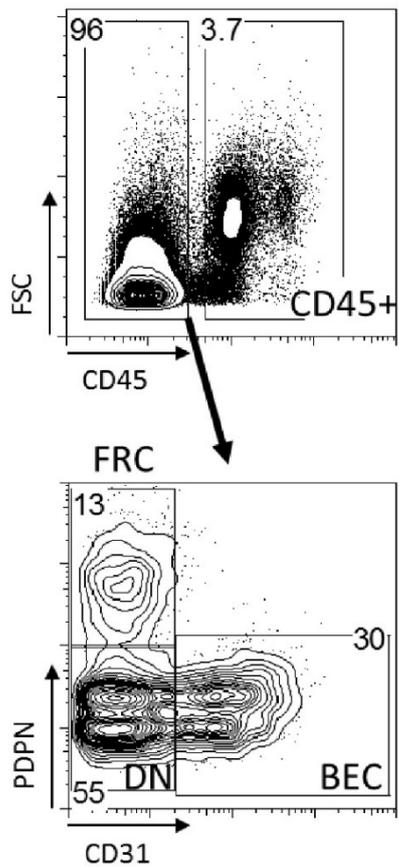


図 16. BEC、FRC、DN を分離する代表的なフローサイトメトリー
 病原性 CD4+ T 細胞移植から 32 日目に寛解期 tEAE マウスから脳および脊
 髄を採取し、ミエリンを除去、抗体液につけ、CD45-PDPN-CD31+ 細胞 (BEC)、
 CD45-PDPN+CD31- 細胞 (FRC) および CD45-PDPN-CD31- 細胞 (DN) をフ
 ローサイトメトリーで決定した。図に示されたデータは少なくとも 3 つの
 独立した実験の代表である。

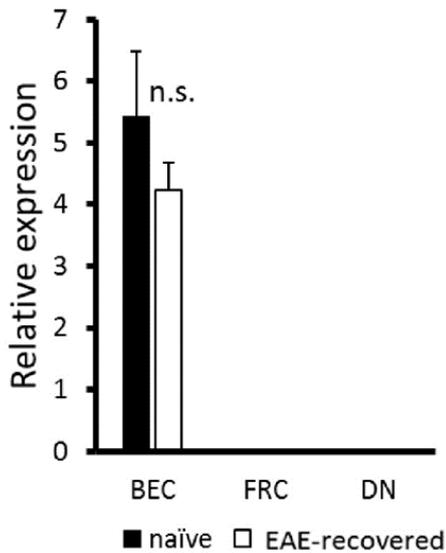


図 17. BEC と他の細胞の GM-CSF mRNA の発現量比較

寛解期 tEAE マウス(EAE-recovered)と野生型マウス (naïve) の脳および脊髄を採取し、ミエリンを除去、抗体液につけ、CD45-PDPN-CD31+ 細胞(BEC)、CD45-PDPN+CD31- 細胞 (FRC) および CD45-PDPN-CD31- 細胞 (DN) をセルソーターで単離した。単離したそれぞれの細胞集団の DNA を合成し、GM-CSF mRNA の発現をリアルタイム PCR により決定した (各群 n=5-6)。その結果、BEC 分画がほかの細胞分画に比べて GM-CSF mRNA の発現が高く、寛解期 tEAE マウスと野生型マウスで発現量に有意な差が認められなかった。示したデータは少なくとも 3 つの独立した実験の代表である。平均+SEM を示す。n.s は有意差なしを示す。スチューデントの t 検定 (両側) を用いた。

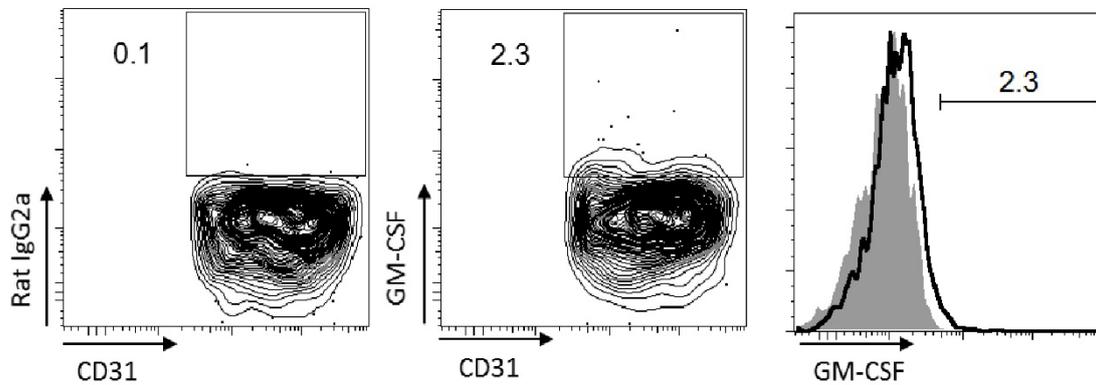


図 18. CD31+ 細胞の GM-CSF タンパク質分泌に関する検討

寛解期 tEAE マウスの脳および脊髄を採取し、ミエリンを除去したのち、回収した細胞の細胞数を計測後、同細胞数に調整し 10%FCS を加えた RPMI1640 で 96 ウェルプレートに播種し 36 時間培養を行った。ゴルジプラグを添加し、さらに 12 時間培養したのち、培養終了 6 時間前に Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 1 μ g/mL) と ionomycin (1 μ g/mL) を添加し CD4+ T 細胞の刺激を行った。抗体液につけ、CD31+ 細胞の細胞内 GM-CSF 発現をフローサイトメトリーで決定した。図中の 0.1 および 2.3 は抗体陽性細胞のパーセンテージである。活性化後に GM-CSF を発現する CD4+ T 細胞（図 14）とは対照的に、CD31+ 細胞では GM-CSF タンパク質を構成的に発現した。これらの結果から、BEC が中枢神経領域で定常的な GM-CSF の分泌源であることが示唆された。示したデータは少なくとも 3 つの独立した実験の代表である。

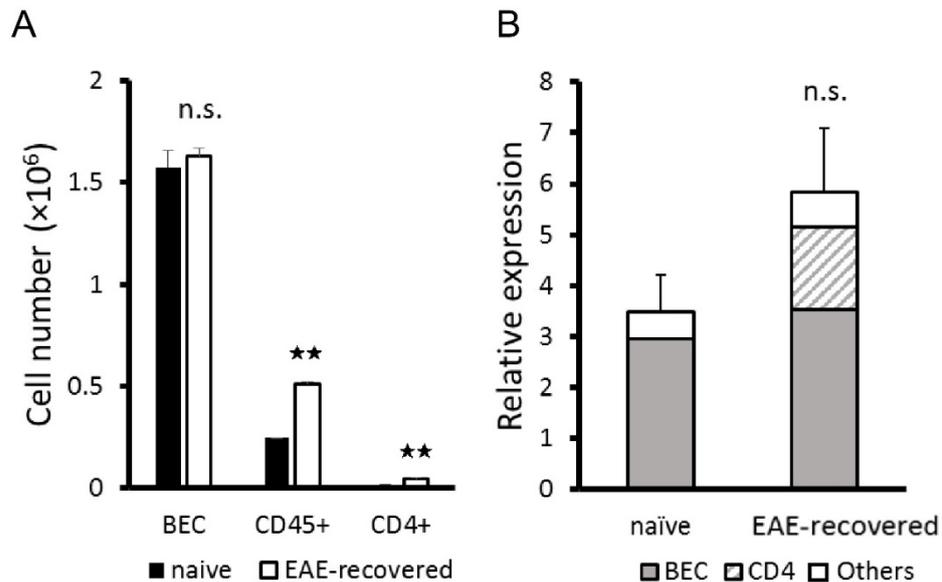


図 19. BEC、CD4+ T 細胞、CD45+ 細胞の GM-CSF 発現量を推定
 野生型マウス (naïve) および寛解期 tEAE(EAE-recovered)マウスの脳および
 脊髄を採取し、ミエリンを除去、抗体液につけたのち、BEC、CD45+ 細胞、
 CD4+ T 細胞の各細胞数をフローサイトメトリーで決定した (A)

さらに各々の細胞集団の細胞数と 1 個の細胞が発現する GM-CSF mRNA の
 量から GM-CSF 転写物の総発現量を推定した (B)。

これらの結果から、中枢神経領域で BEC と比べて CD45+ 細胞や CD4+ T
 細胞といった免疫細胞はわずかであり、全体で考慮すると GM-CSF mRNA
 の発現は主に BEC で認められると考えられた。示されたデータは少なくと
 も 3 つの独立した実験の代表であり、平均+SEM を示す。★★は $p < 0.01$ 、
 n.s.は有意差なしを示す。スチューデントの t 検定 (両側) (A) および one-
 way ANOVA (B) をそれぞれ用いた。

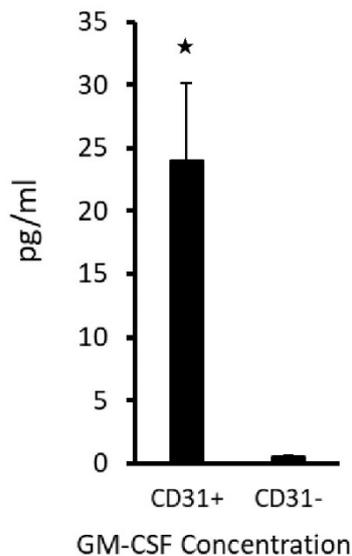


図 20. CD31+ 細胞と CD31- 細胞の GM-CSF タンパク質濃度の比較

野生型マウスから脳および脊髄を採取し、ミエリンを除去した。回収した細胞を磁気標識 CD31 ビーズで吸着して 30 分間放置し、ビーズに吸着された CD31+ 細胞と非吸着の CD31- 細胞で分離した。分離した細胞集団をそれぞれ 96 穴プレートに播種し、細胞培養上清中の GM-CSF 濃度を酵素結合免疫吸着法 (ELISA) キットで測定した。実験は製品に付属するプロトコールに従って行い、検出範囲は 15.625-1000pg/ml であった。濃度は、製造元から提供された特定の標準物質で作成した標準曲線を用いて算出した。各サンプルは二回以上測定を実施した。CD31+ 細胞集団および CD31- 細胞集団を比較した結果、CD31+ 細胞集団で GM-CSF タンパク質濃度が高く、CD31- 細胞集団では GM-CSF 分子の分泌がほとんど認めなかった。(各群 n=3)。示されたデータは少なくとも 3 つの独立した実験の代表であり、平均+SEM を示す ★は $p < 0.05$ 、n.s.有意差なしを示す。スチューデントの t 検定 (両側) を用いた。

4. 「末梢由来骨髄系細胞」は主に GM-CSF を発現する血管に局在する。

寛解期 tEAE マウスで GM-CSF を発現する細胞をさらに検証するため、第 5 腰髄における「末梢由来骨髄系細胞」の局在を免疫組織化学染色で確認した。第 5 腰髄のホルマウント免疫組織化学染色画像から、「末梢由来骨髄系細胞」は主にくも膜下腔に局在し、実質には存在しないこと（図 21A）、IV 型コラーゲン+血管の近くに存在すること（図 21B）が明らかになった。さらに、「末梢由来骨髄系細胞」の一部は、血管上に直接局在していた（図 21B）。

GM-CSF mRNA の発現量を比較した結果でも、第 5 腰髄実質領域に比べて、BEC、髄膜細胞、くも膜細胞を含む髄膜下領域でより GM-CSF mRNA の発現量を多く認め、免疫組織化学染色で観察された局在と一致していると考えられた（図 22）。GM-CSF mRNA の髄膜下発現量は野生型マウスと寛解期 tEAE マウスで変わらず、定常状態でも GM-CSF が構成的に発現していることが示唆された（図 22）。これらの結果から、寛解期 tEAE マウスでは「末梢由来骨髄系細胞」が主に GM-CSF タンパク質分子を発現する血管付近のくも膜下腔に局在していることが示唆された。

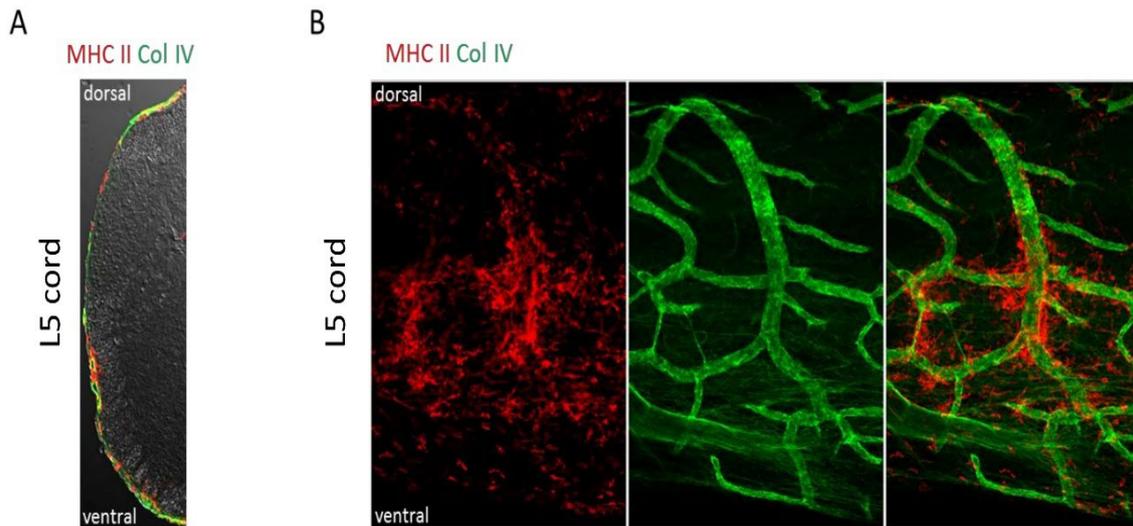


図 21. 第 5 腰髄周辺のホールマウント染色

寛解期 tEAE マウスの第 5 腰髄を、病原性 CD4+ T 細胞移植の 32 日後に採取し、脱灰した。パラフィン切片を作成し、抗 MHC class II 抗体、ウサギ抗コラーゲン IV 型抗体とともに 3-5 日間 4°C に放置した。組織を、Triton-PBS で希釈した Cy3 標識抗ラット IgG および AlexaFluor 488 標識抗ウサギ IgG とともに暗所で 4 時間、室温に放置した。染色した脊髄の髄膜側を上にしてスライドガラスに載せ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。第 5 腰髄の MHC class II (赤) および IV 型コラーゲン (緑) に対するホールマウント染色を示す。IV 型コラーゲンは血管基底膜を示す。この画像により、MHC class II+ 細胞が血管基底膜周辺に局在していることがわかった。

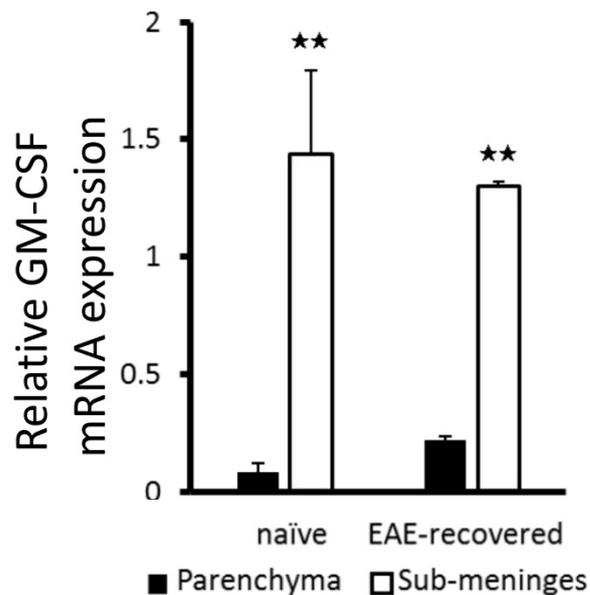


図 22 第 5 腰髄実質領域とくも膜下腔領域の GM-CSF mRNA 発現量の比較

野生型マウスおよび寛解期 tEAE マウスの第 5 腰髄を採取し凍結切片を作成し、マイクロダイセクションデバイス DM6000B を用いて第 5 腰髄の実質領域および髄膜下領域を採取した。採取した組織から DNA を合成しリアルタイム PCR によって GM-CSF mRNA 発現を測定した (各群 n=5-6)。その結果、野生型マウス、寛解期 tEAE マウスいずれの場合も GM-CSF の mRNA は実質領域と比較してくも膜下腔領域で発現が高いことがわかった。示したデータは少なくとも 3 回の独立した実験の代表であり、平均+SEM を示す。

★★は p<0.01 を示す。スチューデントの t 検定 (両側) を用いた。

5. 中枢神経領域の GM-CSF 除去は、「末梢由来骨髄系細胞」の蓄積と痛み刺激後の tEAE 再発を抑制する

先に触れたように、我々の研究室では過去に痛み刺激を加えることにより寛解期の tEAE マウスの EAE 症状が再燃し、第 5 腰髄の腹側血管周辺で「末梢由来骨髄系細胞」が集積することを発見し報告した。同時に、クロドロネートリポソームの中枢神経系への注入によりこれらの細胞を枯渇させると、再発が抑制されることも明らかにしている(Arima *et al.*, 2015b)。今回、「末梢由来骨髄系細胞」が寛解期中枢神経領域で維持されるには、GM-CSF 分子の存在が重要であることが示唆された。そこで、GM-CSF 分子の阻害あるいは中和が tEAE マウスの臨床的症状に影響を与えるかを改めて検討することにした。

寛解期 tEAE マウスに抗 GM-CSF 抗体または Rat IgG (対照群) を髄腔内注射したのち、三叉神経中枝を結紮して痛み刺激を加え、tEAE 症状の再発を誘導した(Arima *et al.*, 2015b)。結紮する部位を三叉神経としたのは、過去の研究から純粋な感覚神経が構成するとされ、純粋な痛み刺激として検討するために最適であると考えたからである。

この結果、抗 GM-CSF 抗体を加えた状態では寛解期 tEAE マウスに痛み刺激を加えても症状の再燃がみられず、第 5 腰髄の腹側血管における「末梢由来骨髄系細胞」の集積抑制も認めた(図 23)。また、痛み刺激を加えた後に抗 GM-CSF 抗体を投与することで EAE 再燃症状の抑制、第 5 腰髄周辺の MHC class II⁺ 細胞数の減少を認めた(図 25、26)。これらの結果から、GM-CSF シグナル伝達の遮断が EAE 再燃症状への治療効果を持つことが示唆された。

一方で、抗 GM-CSF 投与は前帯状皮質における c-fos 発現で観察される EAE 再発に重要な脳体性感覚領域である前帯状皮質を介した感覚-交感神経クロストークを抑制しなかった(Arima *et al.*, 2015b) (図 27)。つまり、痛み刺激の信号は脳で認識されるものの、それが本来誘導するはずの病変部位での免疫細胞の活性化を引き起こさなかったことが示唆される。寛解期 tEAE マウスの中枢神経領域における GM-CSF シグナル伝達の遮断は、「末梢由来骨髄系細胞」数を減少させることで EAE 症状の再燃を抑制するのではないかと考えられた。

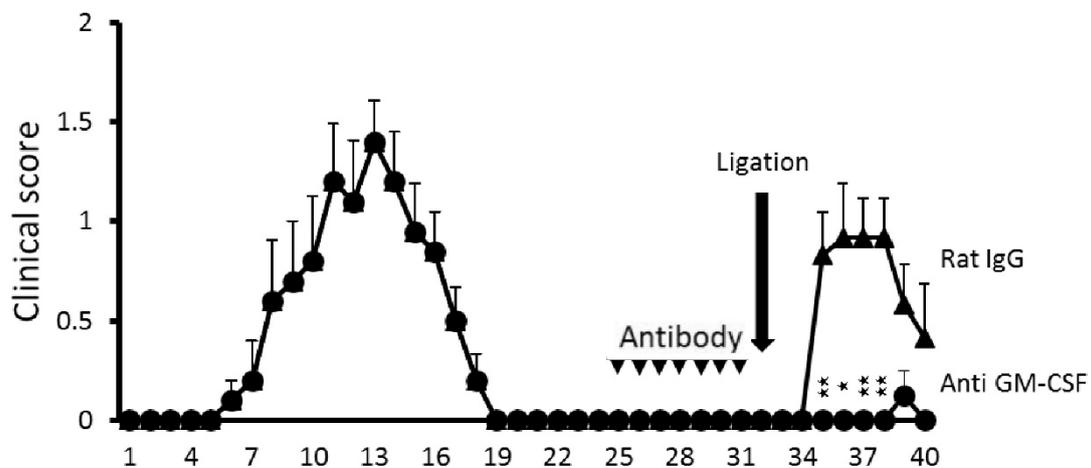


図 23. GM-CSF シグナル伝達遮断による EAE 症状の検討

病原性 CD4+ T 細胞移植で EAE を誘導し、EAE Clinical Score が上昇後、0 となるのを確認した。寛解期に至ったと判断できたのち、移植後 25 日目から 7 日間連続して 20 μ g の抗 GM-CSF 抗体分子 (●) と対照群として 20 μ g の Rat IgG2a 分子 (▲) を 10 μ L の生理食塩水で希釈し髄腔内投与した。その後、第 32 日目に三叉神経を結紮して痛み刺激を加えた。図は病原性 CD4+ T 細胞移植後から 40 日までの EAE Clinical Score を評価したものであり、太い矢印は疼痛誘導、矢頭は抗体処理の時点を示す。抗 GM-CSF 抗体を投与した群では、痛み刺激誘導後の EAE Clinical Score 上昇を認めなかった。また、図中に示していないが 20 μ g の抗 GM-CSF 抗体分子と 20 μ g の Rat IgG2a 分子を 10 μ L の生理食塩水で希釈し髄腔内投与したのち、三叉神経を露出する処置を行い、神経結紮をしない群も作成し観察したが、EAE Clinical Score の上昇は認めなかった (no data)。(各群 n=5-6) データは少なくとも 3 回の独立した実験の代表であり、平均+SEM を示す ★は p<0.05、★★は p<0.01、n.s.は有意差なしを示す。スチューデントの t 検定 (両側) を用いた。

EAE Clinical score: 0, 正常; 1, 尾下垂; 2, 歩行が不安定、下肢軽度麻痺; 3, 下肢麻痺; 4, 両上下肢麻痺; 5, 死亡

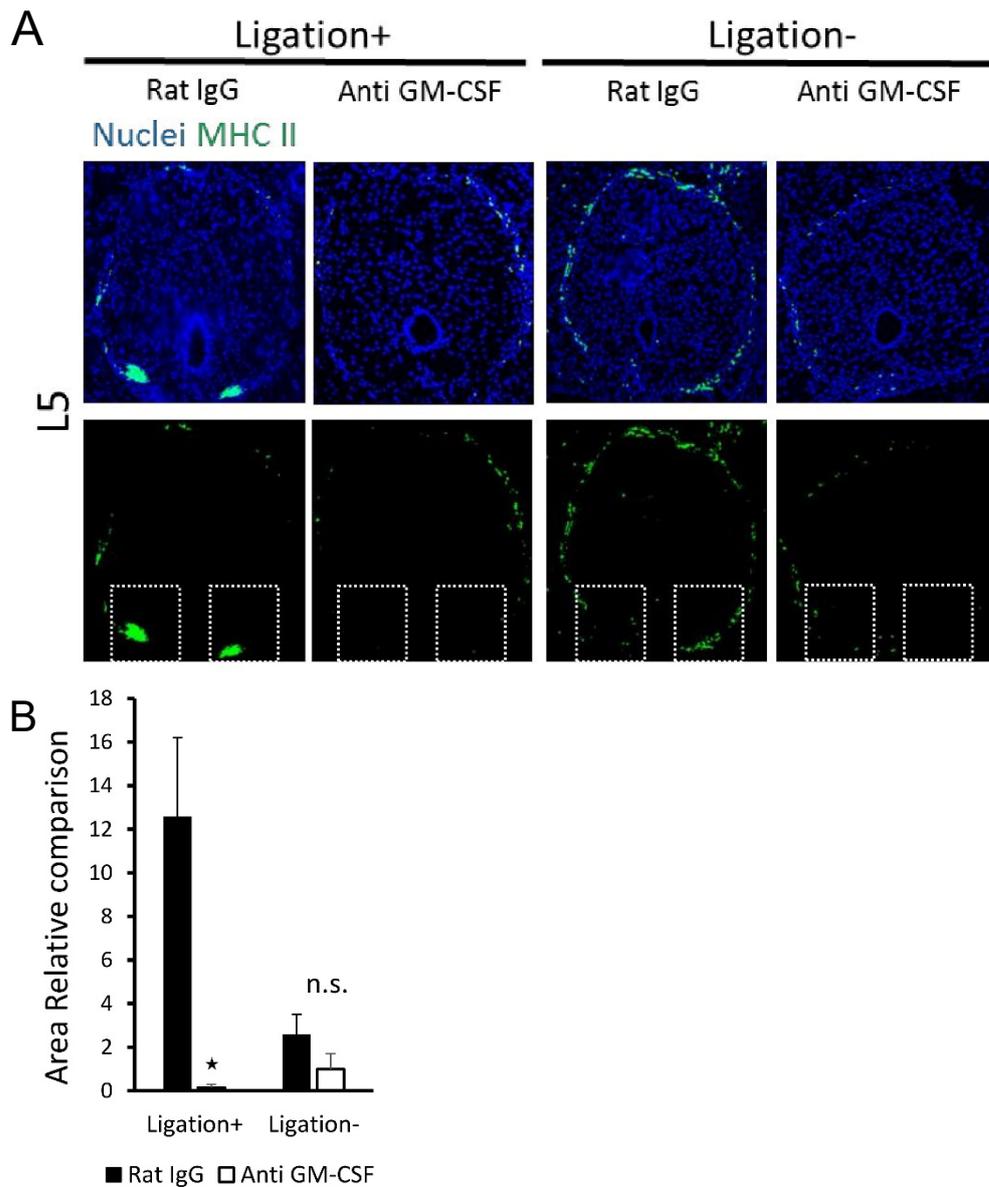


図 24. 抗 GM-CSF 抗体投与後の痛み刺激誘導をした第 5 腰髄腹側血管周辺の検討

図 23 で示した経過をたどった病原性 CD4+ T 細胞移後 40 日目のマウスから第 5 腰椎を採取して凍結切片を作成し、免疫化学組織染色を行った。一次抗体には抗 MHC class II 抗体を使用し Hoechst33342 で核を染色した。A はその画像であり、MHC class II (緑) および核染色 (青) を示す。神経結紮後の寛解期 tEAE マウスの第 5 腰髄では、通常腹側血管周辺で MHC class II+ 細胞の集積を認めるが、抗 GM-CSF 抗体を投与した状態ではその変化が見られなかった (A)。また、A の画像の白枠中に存在する MHC class II 抗体で染まる領域 (緑) を定量化し、相対比較したものを示した (B)。データは少な

くとも 3 回の独立した実験の代表であり、平均+SEM を示す。★は $P<0.05$ 、n.s.は有意差なしを示す。スチューデントの t 検定（両側）を用いた(B)。

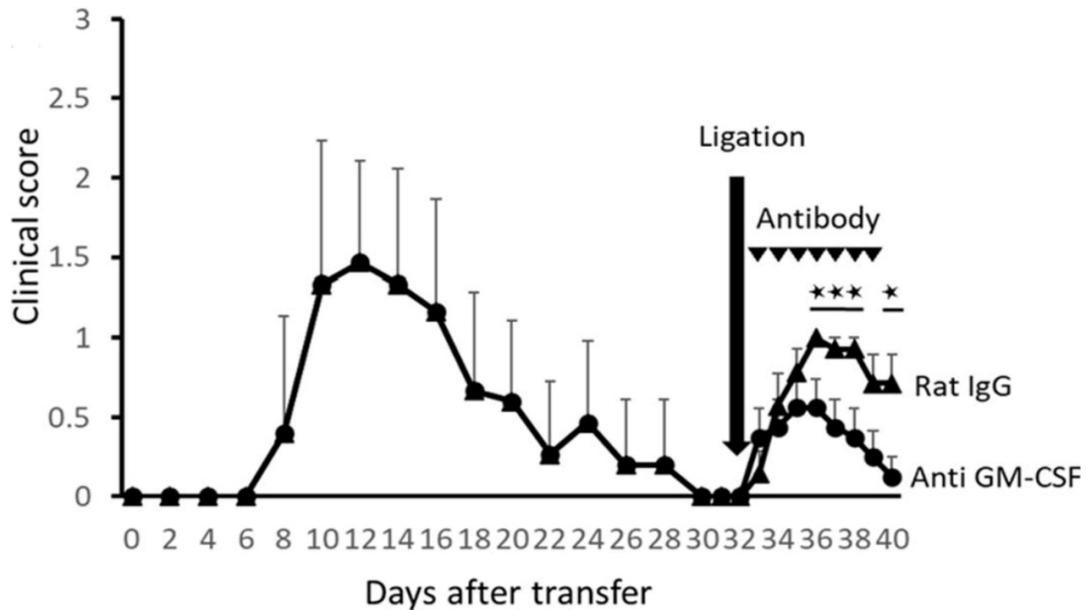


図 25. 痛み刺激後の GM-CSF シグナル伝達を遮断効果の検討

病原性 CD4+T 細胞移植後 32 日目に神経結紮を行い、33-39 日目に 20 μ g の抗 GM-CSF 抗体分子(●)と 20 μ g の Rat IgG2a 分子(▲)を 10 μ L の生理食塩水で希釈し髄腔内投与し比較した。病原性 CD4+ T 細胞移植後から 40 日目までの EAE Clinical Score を評価したものを図に示した。太い矢印は痛み刺激である神経結紮の実施、矢頭は抗体投与を示す (各群 n=5-6)。痛み刺激を加えたのち抗 GM-CSF 抗体を投与した群は、対照群のマウスと比べて EAE スコアが低く推移しており、EAE 再燃症状が軽減していると考えられた。示したデータは少なくとも 3 回の独立した実験の代表であり、平均+SEM を示す ★は p<0.05、n.s.は有意差なしを示す。スチューデントの t 検定 (両側) を用いた。

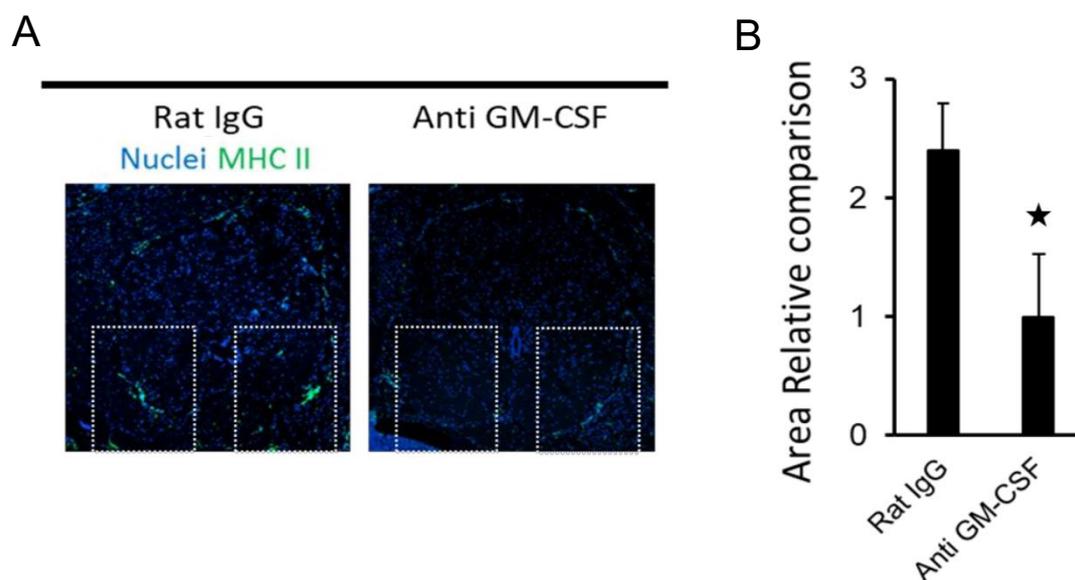


図 26. 痛み刺激後の抗 GM-CSF 抗体投与による第 5 腰髄側血管周辺の免疫細胞集積の検討

図 25 で示した経過をたどったマウスの第 5 腰椎を移植後 40 日目に採取し、凍結切片を作成して免疫化学組織染色を行った。一次抗体は抗 MHC class II 抗体を使用し、Hoechst33342 で核を染色した。A はその画像であり、MHC class II (緑) および核染色 (青) を示す。痛み刺激を加えた tEAE マウスの第 5 腰髄では通常腹側血管周辺で MHC class II⁺ 細胞の集積が認められるが、抗 GM-CSF 抗体を投与した個体ではその変化を認めなかった (A)。また、A の画像の白枠中に存在する MHC class II⁺ 細胞の領域を定量化し、相対比較したものを示す (B)。抗 GM-CSF 抗体を投与した群では、免疫細胞の集積が抑制されることがわかった。

示したデータは少なくとも 3 回の独立した実験の代表であり、平均+SEM を示す ★は $p < 0.05$ 、n.s.は有意差なしを示す。スチューデントの t 検定 (両側) を用いた(B)。

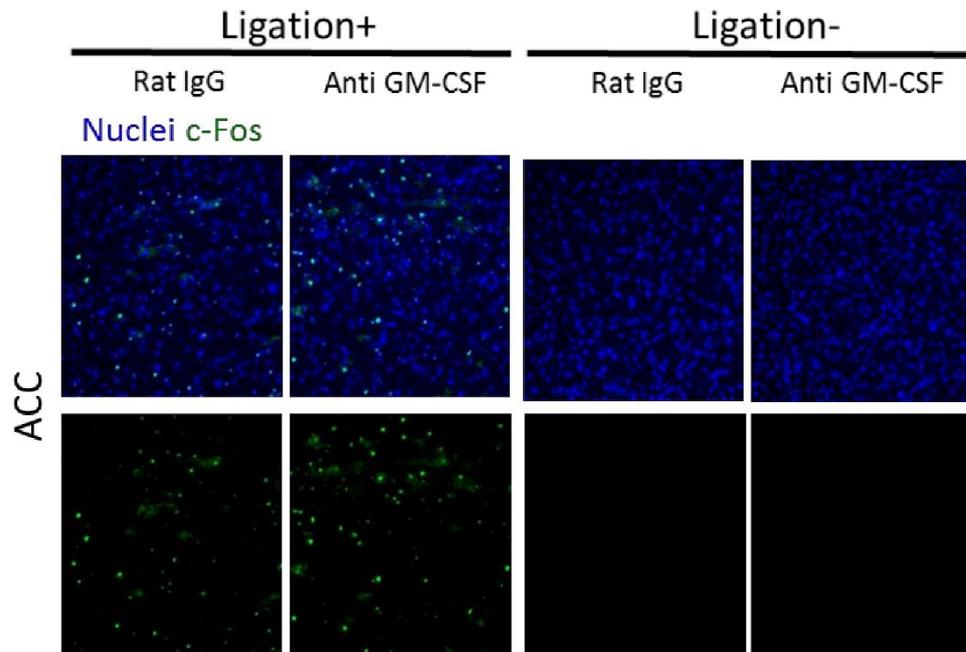


図 27. 寛解期 tEAE マウスの前帯状皮質における c-Fos 発現
 病原性 CD4+ T 細胞移植後、寛解期となった 25-31 日目に生理食塩水で希釈した抗 GM-CSF 抗体あるいは Rat IgG の髄腔内投与を行い 32 日目に三叉神経を結紮して痛み刺激を加えた。40 日目に脳を採取して凍結切片を作成し、免疫化学組織染色を行った。一次抗体は、抗リン酸化 c-Fos 抗体を使用し、Hoechst33342 で核を染色した。神経活性化マーカー c-Fos (緑) および前帯状皮質の核 (青) を示す。画像から、痛み刺激が加えられた前帯状皮質は抗 GM-CSF 抗体投与の有無にかかわらず c-Fos の発現が認められた。そのため、抗 GM-CSF 抗体投与下でも脳では痛み刺激そのものは認識されているが、その後 EAE 症状を再燃させる炎症誘導が抑制されていると考えられた。データは少なくとも 3 回の独立した実験の代表である。

考察

我々の研究室ではこれまで、多発性硬化症のモデルマウスである EAE マウスを用いた研究を行い、いくつかの発見をした。はじめに、EAE マウスの病状は末梢免疫細胞が第 5 腰髄背側部の血管で重力刺激の神経活性化と協調して局所炎症を起こし、中枢神経領域に侵入することを明らかにした (Arima *et al.*, 2012)。さらに、第 5 腰髄周辺に末梢由来の免疫細胞が長期にわたって存在しており、一度寛解した後も痛み刺激で症状が再燃するのに重要な細胞因子であることも見出した。この末梢由来の骨髄系の免疫細胞は中枢神経領域に存在する骨髄系免疫細胞であるミクログリア細胞などと比較して MHC class II 受容体や CD11b 受容体が高発現であるという特徴をもつことも併せて報告している (Arima *et al.*, 2015b)。しかし、再燃にかかわる重要な細胞群を特定したものの、なぜ末梢由来の骨髄系の免疫細胞である「末梢由来骨髄系細胞」が長期に中枢神経領域に存在できるのかは不明であった。そのため今回、その分子機序の検証を行うことにした。

まず、「末梢由来骨髄系細胞」の機能的な細胞表面マーカーを解析した。その結果、MHC class II^{Lo} CD11b⁺ ミクログリア細胞と比べ、GM-CSFR α 、Common β chain を高レベルで発現していることがわかった。もともと、GM-CSF は顆粒球や生存や分化に重要な働きを持ち、多くの自己免疫疾患と関与することが知られている。EAE 関連の研究でも、GM-CSF を産生できない T 細胞をもつマウスは EAE が誘導されないといった先行研究もあり、GM-CSF の存在は EAE の病態形成に重要であると考えられている (Codarri *et al.*, 2011; El-Behi *et al.*, 2011)。実際、多発性硬化症のヒト患者を対象にした臨床研究で GM-CSF のヒトモノクローナル抗体である MOR103 が試された結果、有意な再発抑制効果があることが示された (Constantinescu *et al.*, 2015)。

多発性硬化症は再発と寛解を繰り返し進行する難治性疾患あり、根治的な治療が確立されていない。今回、中枢神経領域に侵入した末梢由来の免疫細胞が寛解後も維持される再発に GM-CSF の働きが寄与するかを明らかにすることは多発性硬化症の新たな治療的アプローチ確立への意義が大きいと考えられた。そのため、GM-CSF の阻害による「末梢由来骨髄系細胞」の生存および EAE 再燃症状の変化を検討した。

まず、GM-CSF 分子の投与および GM-CSF の中和やシグナル伝達の阻害で寛解期 EAE マウスの第 5 腰髄周辺に存在する「末梢由来骨髄系細胞」の生存数に変化が生じるかを実験した。寛解期 tEAE マウスに GM-CSF 分子を

投与すると、MHC class II+ CD11b+の「末梢由来骨髄系細胞」が増加した。一方、GM-CSF 受容体シグナルの阻害や抗 GM-CSF 抗体による中和では当該細胞数は減少した。これらの結果から、再燃に重要な「末梢由来骨髄系細胞」が長期に存在するには GM-CSF の働きが必須であると考えられた。GM-CSF シグナル伝達を遮断しても「末梢由来骨髄系細胞」の枯渇が完全でなかったが、その理由として抗体濃度が最適ではない、「末梢由来骨髄系細胞」は不均一で集団の一部だけが GM-CSF シグナル伝達に依存している、あるいは「末梢由来骨髄系細胞」の生存は GM-CSF のみならず他の因子によっても依存しているといった理由が考えられた。

また、GM-CSF 分子の供給源の特定も試みた。当初は CD4+ T 細胞が産生しているのではないかと推測したが、検証をすすめ、活性化した状態でのみ GM-CSF 分子産生する CD4+ T 細胞より、中枢神経系で定常的に産生する細胞が EAE の病態を形成するうえで重要である可能性が高いと考えられた。そのため、中枢神経領域に存在する細胞数の構成などを考慮すると、血管内皮細胞である BEC 主な GM-CSF 分泌源である可能性が高いと考えられた。免疫組織化学染色による画像的な評価でも末梢由来骨髄系細胞は、GM-CSF 分子の産生源と考えられる BEC が存在するくも膜下腔に主に局在することが確認された。これらの結果から、BEC が GM-CSF 分子の分泌源であることは、進化的に、中枢神経系全体でミクログリア細胞などの生存のための機能であるという仮説も考えられた。Tabula Muris Senis プロジェクト (<https://tabula-muris-senis.ds.czbiohub.org/>) によるシングルセル RNAseq 解析から、CD31+細胞で一細胞あたりの量自体は少ないものの GM-CSF mRNA 発現を認めた。CD31+細胞数はほかの細胞集団と比較して細胞数が多いため、小脳、大脳皮質、海馬、線条体などいくつかの中枢神経系領域の総量と同程度の GM-CSF mRNA 発現を示すと考えられた。

最後に、抗 GM-CSF 抗体による「末梢由来骨髄系細胞」の減少が実際に tEAE 症状再燃を抑制するかを実験的に確かめた。その結果、抗 GM-CSF 抗体が投与されたマウスでは痛み刺激を加えても EAE 症状の再燃が認められなかった。また、実際の治療を考えたプロトコールとして、痛み刺激後であっても、抗 GM-CSF 抗体を加えると EAE の再燃症状が軽減されることも確認した。これらの結果から、GM-CSF 分子を阻害することは多発性硬化症患者の再発抑制につながるの可能性が考えられた。この発見は、GM-CSF 分子の処理が多発性硬化症の再燃抑制などの観点から新たな治療的アプローチに寄与することが期待できる重要な知見であるといえる。

近年、感染部位に長期間留まり同じ病原体に再び遭遇した際に第一線の防

御者となる記憶 T 細胞のサブセットであるレジデント記憶 T 細胞が存在することが報告されている(Iijima and Iwasaki, 2014; Mueller and Mackay, 2016; Park and Kupper, 2015)。同様に、我々の報告した「末梢由来骨髄系細胞」は、一度中枢神経系に侵入したのち寛解期にいたっても長期間中枢神経領域で存在し、特定の神経シグナルによって神経炎症再燃の引き金となることが確認されている(Arima *et al.*, 2015b)。今回の研究により、寛解期 tEAE マウスにおけるこれら「末梢由来骨髄系細胞」は、BEC から分泌される GM-CSF と相互に作用して再発を繰り返し炎症の慢性化を促進することが示唆された。今後、さらに解析を進め、より機能的に再発を予防するアプローチの確立が期待される。

第二章 神経発達異常を有するマウスにおける実験的自己免疫性脳脊髄炎の検討

緒言

統合失調症などの精神疾患では、古くから脳内の慢性炎症が病態に関与する可能性が指摘されている(Shi et al., 2022; Ting et al., 2020; Williams et al., 2022)。統合失調症やうつ病の患者脳内でミクログリア細胞が活性化している割合が高いこと(Marques et al., 2019; Wang et al., 2022)や統合失調症のリスク因子として母親の妊娠中の感染症イベントとの関連の指摘(Brown and Derkits, 2010; Khandaker et al., 2013)、抗炎症薬が統合失調症の症状への改善効果があるといった研究(Cakici et al., 2019; Muller et al., 2015)など、脳内炎症との関連を示唆する報告は多い。

しかし、脳内炎症と統合失調症の関連が指摘されているものの、その詳しい要因についてはわかっていない。脳内炎症が誘発されやすい、あるいは第一章の痛みゲートウェイ反射のように一度起きた炎症が組織の変容を引き起こし炎症が再燃しやすい状態となるなど、様々な可能性が考えられるが、それら機序の解明はほとんどされていないのが現状である。

現在最も広く受け入れられている統合失調症の病態発症仮説は「神経発達障害仮説」である。これは初期発達段階から遺伝的な背景や母体感染などの環境ストレスが加わることで炎症を含め脳内に微小な障害が起きることで「神経脆弱性」を有し、成長過程でさらにストレスが加わった結果統合失調症を発症するというものである。この仮説から、先天的な神経発達異常が何らかの慢性的な炎症を引き起こす要因となるのではないかと考えた。

元々、血液脳関門の働きにより脳内には末梢由来の免疫細胞が侵入できないとされる。しかし最近では、統合失調症やうつ病患者の画像研究などで血液脳関門の働きが低下しているといった報告も増えている(Greene et al., 2020; Williams et al., 2022)。当研究室ではこれまでに多発性硬化症のモデルマウスとして知られる実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) マウスを用いて重力や光、痛み、ストレスなど環境刺激を引き金とする特異的な神経回路の活性化が特定血管部位の透過性を変化させ、末梢血中の活性化病原性 T 細胞を含む免疫細胞が中枢神経系に侵入して炎症を誘導していることを突き止めた。

重力や痛みについては第一章でも解説したが、ストレスが脳内炎症に関与する機序についてここで簡単に説明する。病原性 CD4+ T 細胞が移植された

マウスでは通常、重力刺激により活性化された神経が入力する第 5 腰髄近傍で血管周囲に炎症を起こし、末梢性の免疫細胞を中枢領域に侵入させる（重力ゲートウェイ反射）。しかし、慢性的な睡眠不足あるいは床敷に水分を含ませマウスの居心地を悪くするなどの、ストレスのかかる環境のマウスでは病原性 CD4+ T 細胞が第 5 腰髄だけではなく脳内の特定血管部（第 3 脳室、視床、海馬に囲まれた間質部）から直接脳内に侵入し、血管周囲に炎症を誘導し、神経回路の変容を介して EAE マウスの急死を引き起こす（ストレスゲートウェイ反射）(Arima *et al.*, 2017)。これらの事実は、末梢血中の病原性 CD4+ T 細胞存在下のストレスが特定血管周囲の脳内炎症の起点となることを実験的に示している。

今回、我々は初期発達段階で神経発達異常をもつような「神経脆弱性」を有するマウスは、ストレスゲートウェイ反射の「ストレス環境」が加わったマウスのように、脳内炎症が誘導されやすいのではないかという仮説を考えた。そこで、先天性神経発達異常を有するマウスで病原性 CD4+ T 細胞を持つ EAE を誘導し、正常なマウスとの比較を行うこととした。

具体的には、当研究室で飼育していた CHD(chromodomain helicase DNA-binding)8 ハプロ不全マウス(Katayama *et al.*, 2016)、15q11-13 重複マウス(Nakatani *et al.*, 2009)、軸索変性を起こす Wald マウス、アルツハイマー型認知症のモデルマウス(Saito *et al.*, 2014)、脊髄小脳失調症モデルマウス(Watase *et al.*, 2002)の五種類のマウスなどを用いて直接免疫を行い、active EAE を誘導して正常なマウスと異なる病態を生じるかを検討した。

aEAE 誘導で正常なマウスとの異なる結果が示唆された二つのマウス系統（CHD8 ハプロ不全マウス、15q11-13 重複マウス）はさらに、病原性自己反応性 T 細胞を移入される transfer EAE(tEAE)を誘導し、野生型マウスとの比較を行った。その過程で得られた異常所見や免疫細胞の動態などを検討した。

方法

1. マウス

C57BL/6 マウス 6-8 週齢は日本 SLC 株式会社（静岡、日本）より購入したものを使用した。また、神経発達異常を有するマウスとして使用したマウスを以下に概説する。

①CHD8 ハプロ不全マウス (CHD8LKO マウス)

自閉症スペクトラム障害の発症にかかわるとされる遺伝子のうち、最も高頻度に変異しているとされている *Chd8* 遺伝子をヘテロで欠損するよう作成されたトランスジェニックマウスである。自閉症スペクトラム様の行動異常を示す(Katayama *et al.*, 2016)。Chd8 遺伝子のホモ欠損では胎生致死となる。実験にはハプロ不全の雄マウスを使用した。理化学研究所バイオリソース研究センターから入手した。

②15q11-13 重複マウス(15q11-13 マウス)

ヒトでの Prader-Willi 症候群と Angelman 症候群の原因遺伝子部位である第 15 番染色体長腕 (15q11-q13) と相同の染色体領域を重複させるよう遺伝子導入を行ったトランスジェニックマウスである。重複領域をもつ遺伝子を父方由来に受け継いだマウスでは、自閉症様の社会性行動異常をとることが確認されている(Nakatani *et al.*, 2009)。実験には父性由来重複遺伝子をもつ雄マウスのみを使用した。理化学研究所バイオリソース研究センターから入手した。

③アルツハイマー型認知症モデルマウス(AG-NF マウス)

アルツハイマー型認知症患者の脳内では、初期病理としてアミロイド前駆体タンパク質から細胞外へ切り出されたアミロイド β ペプチド (Amyloid β peptide; $A\beta$) が凝集し、蓄積すると考えられている。Amyloid precursor protei(APP) をコードする *App* 遺伝子に家族性アルツハイマー型認知症の原因遺伝子変異を導入することで APP の過剰発現に依存しないアルツハイマー型認知症モデルとして作成された(Saito *et al.*, 2014)。進行性の認知機能障害を呈する。実験には雄マウスを使用した。国立精神神経センター 神経研究所から入手した。

④軸索変性異常マウス(Wald マウス)

ビタミン B3 から nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)を合成する反応に関与する酵素を神経細胞内の異なる部位であるミトコンドリアに発現する自然発症変異のマウスである。軸索破壊メカニズムが通常より著しく遅くなり、ミトコンドリアにおいては adenosine triphosphate(ATP)産生能力が向上して

いることが確認された。実験には雄マウスを使用した。国立精神神経センター 神経研究所から入手した。

⑤ 脊髄小脳失調症モデルマウス(SCA-1 マウス)

変異体アタキシン 1 転写物を過剰発現し、CAG リピート領域に異常伸長をもつトランスジェニックマウスである。プルキンエ細胞の喪失と加齢に伴う海馬シナプス機能不全を生じ、進行性の神経障害を呈する(Watase *et al.*, 2002)。運動調整不全、認知障害、早期死亡を特徴とする。ヒトの脊髄小脳失調症 (Spinocerebellar Ataxia; SCA) のモデルとされる。実験には雄マウスを使用した。国立精神神経センター 神経研究所から入手した。

これらのマウスはすべて C57BL/6 マウスをもとに作成されている。動物の取り扱いについては「北海道大学動物実験に関する規程」に則り、北海道大学の動物実験倫理審査の承認を受けて行った。実験は、動物実験倫理及び動物福祉の基本概念である 3R(Replacement, Reduction, Refinement)の原則に基づき適正に実施した。本研究で使用した動物実験は、北海道大学機関内動物飼育使用委員会の承認を得ている。

2. EAE モデル

各々6-8 週齢のマウスを使用し実験を行った。発症様式は、active EAE(aEAE) と transfer EAE(tEAE)の二つの手法で行った(Arima *et al.* 2012)。aEAE は、マウス 1 匹あたり百日咳毒 (Pertussis Toxin; PTx) (Sigma)0.2-0.4 μ g を静脈投与し、ミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白 (Myelin Oligodendrocyte Glycolipid; MOG) (Sigma)200-400 μ g 皮下注射、並びに Freuds adjuvant(Sigma)10ml に結核菌パウダー(Sigma)200-400mg を混合した Complete freund's adjuvant(CFA)をマウスの尾の付け根部分に 50-100 μ l 皮下注射し、免疫を行った。初日(day0)に PTx と MOG、CFA を投与後、day2, day7 にそれぞれ同量の PTx を再度投与した。

tEAE は、まず C57BL/6 マウスの 6-8 週齢で aEAE と同様の処置を行い、9 日目に抗 CD4 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて、免疫化マウスから脾臓をサンプリングし、Homogenization、NH₄Cl による赤血球除後、Microbeads CD4(Miltenyi Biotec)と混合し氷上で 30 分安置したのち MS カラム(Miltenyi Biotec)へ通した。カラムを通過した APC は別個回収し照射 (35Gy)した。カラムは 3 回洗浄後、カラムに吸着している CD4+ T 細胞をフラッシュして回収した。以上の工程はすべて MACS バッファーを用いて細胞液の希釈、洗浄、回収を行った。回収した CD4+ T 細胞と antigen presenting cell(APC)はそれぞれ 1 シャーレあたり 4 x 10⁷ 細胞、1 x 10⁸ 細胞を播種し、

リコンビナント IL-23 (R&D systems, 1ng/mL)、MOG ペプチド (Sigma Aldrich、25 µg/mL) を添加して 24 時間培養した。培養後、細胞を回収して再度抗 CD4 マイクロビーズと混合し、氷上で 30 分安置したのち MS カラムで濾過、純化した CD4+ T 細胞のみを回収した。回収した CD4+ T 細胞は標的となるマウスに 1 匹あたり 1.5×10^7 細胞となるよう生理食塩水で希釈し静脈注射した。

EAE マウスは EAE Clinical score を用いて重症度をモニターし、各日評価した (Huseby *et al.*, 2012)。

EAE Clinical score: 0, 正常; 1, 尾下垂; 2, 歩行が不安定、下肢軽度麻痺; 3, 下肢麻痺; 4, 両上下肢麻痺; 5, 死亡 (Arima *et al.*, 2012; Arima *et al.*, 2015b; Ogura *et al.*, 2008b)

3. 免疫組織化学染色

EAE を発症したマウスの脳や脊髄、眼球およびその周囲組織を凍結切片で免疫染色した。マウスに Pentobarbital (共立製薬) を腹腔内投与し深昏睡させたのち、Phosphate-buffered saline (PBS) で経心腔的に灌流を行って可及的に血液除去し脳と脊椎、眼球およびその周囲組織を採取した。第 5 腰椎を中心に脊椎は矢状断で切断し、Super cryoembedding medium (SCEM) コンパウンド (SECTION-Lab Co. Ltd.) にブロック状で包埋し急速冷凍させた (Kawamoto and Kawamoto, 2021)。組織ブロックは川本フィルム (Cryofilm) (SECTION-LAB Co. Ltd.) に貼付し、マイクローム装置 CM3050 (Leica Microsystems) を用いて凍結切片 (10-20µm) を作成した。100%エタノールに 2 秒つけたのち乾燥させ、4% Paraformaldehyde (PFA) に 10 分漬けた。PBS に 10 分つける方法で 3 回洗浄した。その後、PBS または 2% Bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) を含む Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBS-T) でブロックし、Fc 受容体ブロックのために抗 CD16/CD32 (2.4G2) の存在下で一次抗体につけ、4°C で一晩放置した。一次抗体は、抗 MHC class II (eBioscience, M5/114.15.2) および抗リン酸化 c-Fos (Cell Signaling Technology) を使用した。翌日 PBS 洗浄 3 回したのち Hoechst33342 (Life Technologies) を 1/2000 希釈した抗体液で核を染色した。30 分後に再度 3 回洗浄して顕微鏡観察 (BZ-X, Keyence) を行った。

4. 統計解析

2 群間の差の統計解析には、スチューデント t 検定 (両側) を使用した。

結果

1. 複数の疾患モデルマウスで EAE を誘導し野生型マウスと比較した

複数の神経発達異常を持つマウスおよび C57BL/6 マウスをそれぞれ 6-8 週齢で aEAE を誘導し比較した。その結果を図 28 に示す。自閉症様社会行動異常を示す 2 系統である CHD8 ハプロ不全マウス (CHD8LKO マウス) と 15q11-13 重複マウス (15q11-13 dup マウス) で野生型マウスと aEAE 誘導の結果に差異を認めた。具体的には、CHD8 ハプロ不全マウスは EAE の症状が出始めるのが野生型マウスに比べてやや早く、14 日目の EAE Clinical Score で両群に有意差を認めた (図 28A)。15q11-13 重複マウス (15q11-13 dup) では、EAE 症状のピークを過ぎた時期である 28 日目で野生型マウスより EAE Clinical Score が低い傾向がみられた (図 28B)。その他のアルツハイマー型認知症モデルマウス (NG-AF マウス)、軸索変性異常マウス (Wald マウス)、脊髄小脳失調症モデルマウス (SCA-1 マウス) では野生型マウスと有意な違いを認めなかった (図 28C,D,E)。

aEAE は直接標的のマウスを免疫する手法である。マウス体内で強い炎症反応が誘導され、身体的侵襲が大きい。そのため、より自己反応性病原性 T 細胞の影響に限局した状態である tEAE を誘導し、反応の違いを検討することにした。aEAE において野生型マウスと差異を認めた CHD8 ハプロ不全マウスと 15q11-13 重複マウスの二つの系統で tEAE を誘導しそれぞれの同腹仔である野生型マウスと比較した。tEAE を誘導した CHD8 ハプロ不全マウスは、野生型マウスと EAE Clinical Score では有意差を認めなかったが、EAE Clinical Score に反映されない特異的な症状を認めた。具体的には、主に EAE 症状が出現する 6-9 日目 (図 29 の緑色で示した時期) に「体の後ろ、あるいは横方向に傾いて転ぶ」「直進できず徐々に斜めに体が傾ぐ」といった症状である。小脳失調など通常の EAE マウスで見られる麻痺とは異なる運動失調などが疑われた。この特徴は tEAE を誘導したすべての CHD8 ハプロ不全マウスで見られたが、数日以内に症状が消失した (no data)。

次に、15q11-13 重複マウスでも同様に tEAE を誘導し野生型マウスと比較した (図 30)。15q11-13 重複マウスは症状のピークが過ぎた 26-28 日目に EAE Clinical Score が野生型比べて高い傾向を認めた (図 30A)。また、病原性 T 細胞移植後 6-10 日目 (図 30A の黄色部分で示した時期) では野生型マウスと比較して EAE Clinical Score の違いや発症時期のずれは認めなかったが、83.3% (5/6) の 15q11-13 重複マウスで眼脂の出現や眼球周囲の腫脹など眼球周囲に異常がみられた (図 30B)。

現在、15q11-13 重複マウスに tEAE 誘導を起こした際に認める眼球周囲の異常に着目し、症状が出現する時期のマウスで眼球およびその周辺の皮膚組織などを採取し、免疫組織化学染色を行い免疫細胞の動態についてさらなる解析を行っている。

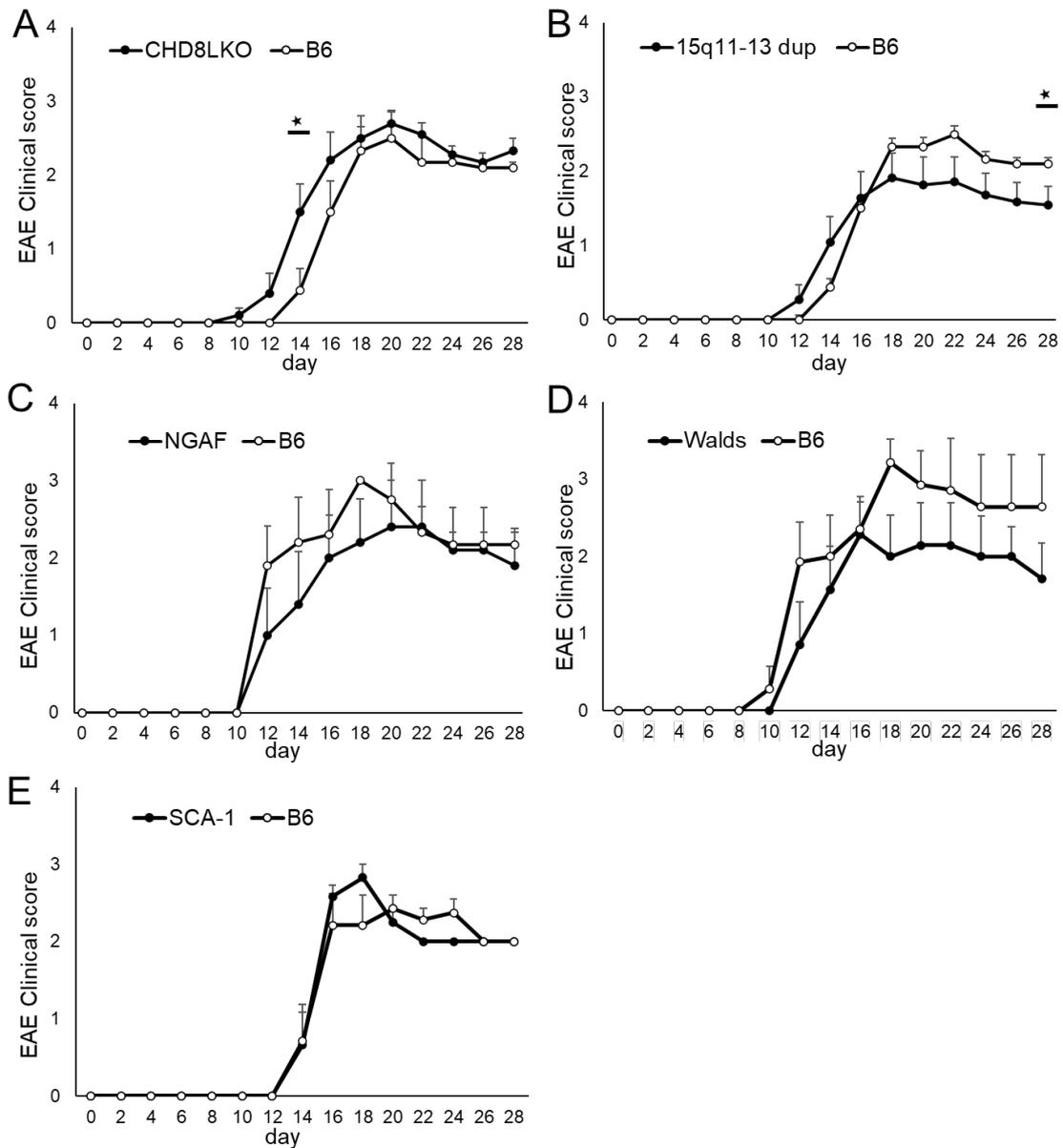


図 28. 神経発達異常を有するマウスと野生型マウスの aEAE 結果の比較
 健康な C57BL/6 マウスと神経発達異常を有する複数のマウス系統の 6-8 週
 齢の雄マウスにそれぞれ MOG ペプチドと CFA で免疫及び PTx の投与を行
 い、aEAE を誘導した。免疫を行った日を 0 日目とし連日 EAE Clinical
 Score を評価し 28 日目までの推移を図に示した。
 図中の B6 は C57BL/6 マウス、CHD8LKO は CHD8 マウス(A)、15q11-13
 dup は 15q11-13 重複マウス(B)、NG-AF はアルツハイマー型認知症モデル
 マウス(C)、Wald は軸索変性マウス(D)、SCA-1 は脊髄小脳失調症モデルマ
 ウスを表す(E)。

CHD8 ハプロ不全マウスは 14 日目で C57BL/6 マウスと EAE Clinical Score に有意差を認め(A)、15q11-13 重複マウスでは 28 日目に有意差を認めた (B)。そのほかの 3 系統のマウスでは有意差を認めなかった。(1 群につき n=5-6)。

EAE Clinical score: 0, 正常; 1, 尾下垂; 2, 歩行が不安定、下肢軽度麻痺; 3, 下肢麻痺; 4, 両上下肢麻痺; 5, 死亡

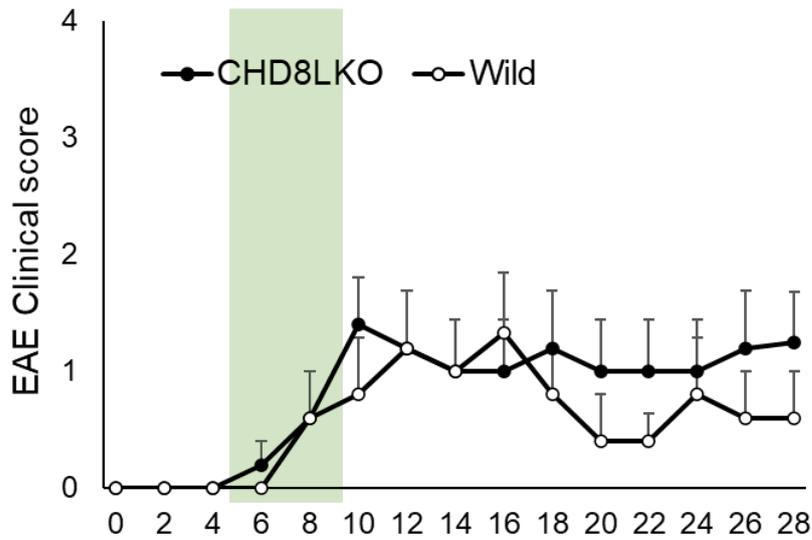


図 29. CHD8 ハプロ不全マウスと野生型マウスの tEAE 誘導結果
 健康な C57BL/6 マウス aEAE を誘導したのち病原性自己反応性 T 細胞を採取し、CHD8 ハプロ不全マウスと野生型マウスにそれぞれ同細胞数移植し EAE を誘導した。移植した日を 0 日目とし連日 EAE Clinical score を評価し 28 日目までの推移を図に示した。
 図中の CHD8LKO は CHD8 ハプロ不全マウス、Wild は野生型マウスを表す。両群で EAE Clinical Score の差異を認めなかったが、CHD8 ハプロ不全マウスでは緑色で示した時期にすべての個体でふらつきや歩行の異常など、特異的な症状を認めた。(各群 n=5-6)

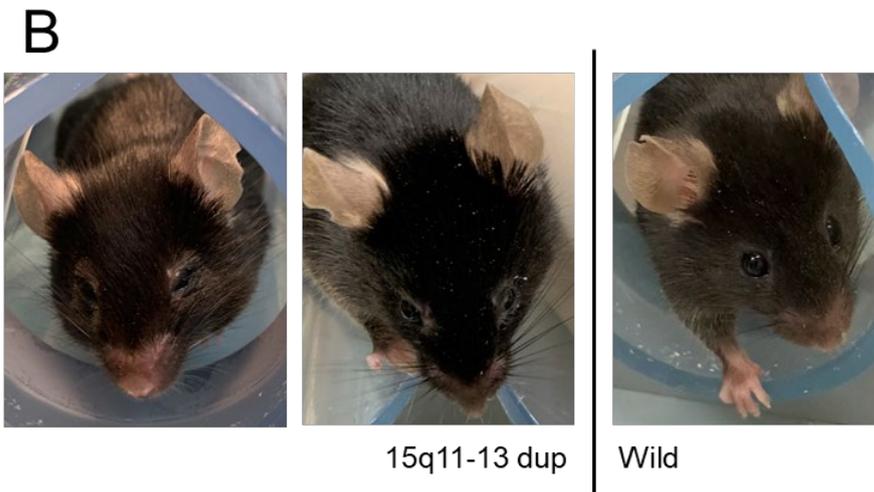
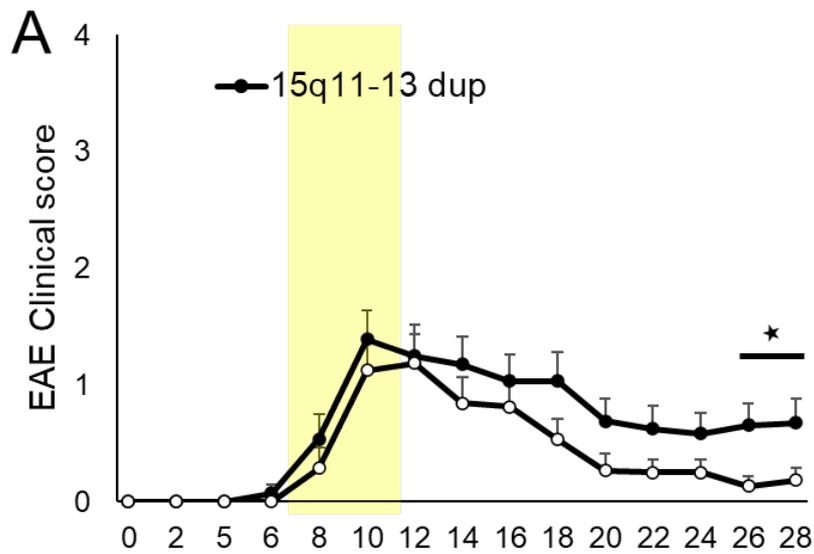


図 30. 15q11-13 重複マウスと野生型マウスの tEAE 誘導結果
 健康な C57BL/6 マウス aEAE を誘導したのち病原性自己反応性 T 細胞を採取し、15q11-13 重複マウスと野生型マウスにそれぞれ同細胞数移植し EAE を誘導した。移植した日を 0 日目とし連日 EAE Clinical score を評価し 28 日目までの推移を図に示した。図中の 15q11-13 dup は 15q11-13 重複マウス、Wild は野生型マウスを表す。26-28 日目で 15q11-13 重複マウスは野生型マウスよりも EAE Clinical Score が高い傾向があり、15q11-13 重複マウスでは黄色で示した時期に眼球周囲の炎症を疑う異常を認めた (A)。図中の画像は眼球周囲が腫脹している時期の 15q11-13 重複マウスと同時期の野生型マウスのものである (B)。

考察

我々の研究室では、長年多発性硬化症のモデルマウスである EAE マウスを用いて末梢免疫細胞が中枢神経領域に侵入し病態を形成する様々な機序を解明した。

その中でもストレスゲートウェイと名付けた経路は、睡眠不足や居心地の悪い環境という、そのみでは致命的な影響にはならないはずの慢性的なストレスでも、その環境下で EAE を誘導すると末梢由来の免疫細胞が通常と異なる部位である脳内の特定血管で微小炎症を起こし、神経回路が変容して急死を引き起こすという脳内炎症を起点とした病態誘導メカニズムを明らかにした。

今回、精神疾患などの要因として脳内炎症が引き起こされるメカニズムを検討するために、先天的な神経発達異常を有する疾患モデルマウスを複数使用し EAE の誘導を行った。その中でも、特に自閉症スペクトラム障害に似た社会性行動異常の特徴をもつ二つの系統で通常のマウスと異なる症状を呈することが確認された。

CHD8 ハプロ不全マウスは小脳失調様の異常、15q11-13 重複マウスでは眼球周囲の炎症を疑う異常であり、それぞれ特徴は異なるが、いずれも正常のマウスでは通常みられない中枢神経領域の異常が示唆された。これは神経発達異常を有するマウスで EAE を誘導すると、移植された自己反応性 CD4+ T 細胞が通常のマウスと異なる中枢神経系領域で炎症を誘導し神経回路を変容する可能性を示しているといえる。

現在、この原因についてさらなる解析をすすめるため、組織の免疫組織化学染色などを行い検討など続けている。先天的な神経発達異常が末梢免疫細胞の動態に影響を与える可能性が明らかになれば、統合失調症やうつ病といった精神疾患など、脳内炎症の可能性が指摘されているものの、機序が不明である疾患の病態解明や新たな治療法の確立につながることを期待できる。

第二章の研究は、まだ初期段階であり、さらなる多くの実験アプローチが必要な状況であるが、この研究をすすめる精神疾患などの新たな治療アプローチにつながるよう目指す予定である。

結論

- ・寛解期 tEAE マウスの痛み刺激による EAE 症状再燃には MHC class II^{Hi} CD11b+の「末梢由来骨髄系細胞」が関与する
- ・「末梢由来骨髄系細胞」はミクログリア細胞と比べ GM-CSF 受容体分子が高発現である
- ・中枢神経領域での GM-CSF の増減に伴い「末梢由来骨髄系細胞」も増減する
- ・中枢神経領域での「末梢由来骨髄系細胞」維持に、GM-CSF が必要である
- ・GM-CSF 分子は中枢神経領域に存在する血管内皮細胞(BEC)から分泌される
- ・GM-CSF を阻害すると tEAE 症状再燃が抑制される
- ・GM-CSF の機能的ノックダウンは多発性硬化症の再発抑制による治療的効果が期待できる

本研究は、多発性硬化症モデルの EAE マウスを用いて痛み刺激による症状再燃に重要な「末梢由来骨髄系細胞」が中枢神経領域で長期間維持される要因を検証した。「末梢由来骨髄系細胞」はミクログリア細胞と比較して GM-CSF 受容体分子が高発現であり、GM-CSF 分子を中枢神経領域で中和することでその数が減少することが分かった。つまり、長期に「末梢由来骨髄系細胞」が中枢神経領域で存在するには GM-CSF 分子の存在が必要であると考えられる。実際、GM-CSF 分子の中和および抗 GM-CSF 抗体の投与で EAE 再燃症状の抑制が認められた。また、中枢神経領域における定常的な GM-CSF 供給源は血管内皮細胞(BEC)であることが実験結果から示唆された。

多発性硬化症は慢性炎症疾患であり、再燃を繰り返して症状が進行する。臨床的にも痛みなどの日常的な刺激が症状増悪因子となることも知られている。今回の研究により、寛解期の tEAE マウスの中枢神経領域で残存する「末梢由来骨髄系細胞」と血管内皮細胞(BEC)が供給する GM-CSF 軸を介した相互作用が再発を繰り返し炎症の慢性化を促進することが示唆された。この研究結果から、再燃を抑制する新たな治療的アプローチとして、GM-CSF の機能的ノックダウンが期待できると考えられた。

謝辞

本研究の遂行にあたり、研究所の使用を許可いただき、また研究の立案から方向性、実験内容についてまでご指導を頂きました北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野 村上正晃教授に深く感謝の意を表します。また、研究の機会を与えてくださいました北海道大学大学院医学研究院神経病態学分野精神医学教室 久住一郎教授に深謝いたします。実験手技など直接的なご指導を賜りました同研究所 田中勇希先生、長谷部理恵先生に厚く感謝申し上げます。

利益相反

日本語： 開示すべき利益相反状態はない。

英語： The author declares no conflict of interest.

引用文献

- Abe, N., Tarumi, M., Fujieda, Y., Takahashi, N., Karino, K., Uchida, M., Kono, M., Tanaka, Y., Hasebe, R., Kato, M., et al. (2022). Pathogenic neuropsychiatric effect of stress-induced microglial interleukin 12/23 axis in systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases* *81*, 1564-1575. 10.1136/ard-2022-222566.
- Arima, Y., Harada, M., Kamimura, D., Park, J.H., Kawano, F., Yull, F.E., Kawamoto, T., Iwakura, Y., Betz, U.A., Marquez, G., et al. (2012). Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell* *148*, 447-457. 10.1016/j.cell.2012.01.022.
- Arima, Y., Kamimura, D., Atsumi, T., Harada, M., Kawamoto, T., Nishikawa, N., Stofkova, A., Ohki, T., Higuchi, K., Morimoto, Y., et al. (2015a). A pain-mediated neural signal induces relapse in murine autoimmune encephalomyelitis, a multiple sclerosis model. *Elife* *4*. 10.7554/eLife.08733.
- Arima, Y., Kamimura, D., Atsumi, T., Harada, M., Kawamoto, T., Nishikawa, N., Stofkova, A., Ohki, T., Higuchi, K., Morimoto, Y., et al. (2015b). A pain-mediated neural signal induces relapse in murine autoimmune encephalomyelitis, a multiple sclerosis model. *eLife* *4*, e08733. 10.7554/eLife.08733.
- Arima, Y., Ohki, T., Nishikawa, N., Higuchi, K., Ota, M., Tanaka, Y., Nio-Kobayashi, J., Elfeky, M., Sakai, R., Mori, Y., et al. (2017). Brain micro-inflammation at specific vessels dysregulates organ-homeostasis via the activation of a new neural circuit. *Elife* *6*. 10.7554/eLife.25517.
- Brown, A.S., and Derkits, E.J. (2010). Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *Am J Psychiatry* *167*, 261-280. 10.1176/appi.ajp.2009.09030361.
- Cakici, N., van Beveren, N.J.M., Judge-Hundal, G., Koola, M.M., and Sommer, I.E.C. (2019). An update on the efficacy of anti-inflammatory agents for patients with schizophrenia: a meta-analysis. *Psychol Med* *49*, 2307-2319. 10.1017/S0033291719001995.
- Codarri, L., Gyulveszi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T., and Becher, B. (2011). ROR γ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* *12*, 560-567. 10.1038/ni.2027.
- Compston, A., and Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet* *372*, 1502-1517. 10.1016/S0140-6736(08)61620-7.
- Consortium, I.M.S.G. (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune

mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* *476*, 214-219.

Constantinescu, C.S., Asher, A., Fryze, W., Kozubski, W., Wagner, F., Aram, J., Tanasescu, R., Korolkiewicz, R.P., Dirnberger-Hertweck, M., Steidl, S., et al. (2015). Randomized phase 1b trial of MOR103, a human antibody to GM-CSF, in multiple sclerosis. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation* *2*, e117. 10.1212/NXI.0000000000000117.

Cupovic, J., Onder, L., Gil-Cruz, C., Weiler, E., Caviezel-Firner, S., Perez-Shibayama, C., Rulicke, T., Bechmann, I., and Ludewig, B. (2016). Central Nervous System Stromal Cells Control Local CD8(+) T Cell Responses during Virus-Induced Neuroinflammation. *Immunity* *44*, 622-633. 10.1016/j.immuni.2015.12.022.

Ehde, D.M., Gibbons, L.E., Chwastiak, L., Bombardier, C.H., Sullivan, M.D., and Kraft, G.H. (2003). Chronic pain in a large community sample of persons with multiple sclerosis. *Mult Scler.* *9*, 605-611.

El-Behi, M., Ciric, B., Dai, H., Yan, Y., Cullimore, M., Safavi, F., Zhang, G.X., Dittel, B.N., and Rostami, A. (2011). The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature immunology* *12*, 568-575. 10.1038/ni.2031.

Gold, R., Lington, C., and Lassmann, H. (2006). Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* *129*, 1953-1971. 10.1093/brain/awl075.

Grassivaro, F., Menon, R., Acquaviva, M., Ottoboni, L., Ruffini, F., Bergamaschi, A., Muzio, L., Farina, C., and Martino, G. (2020). Convergence between Microglia and Peripheral Macrophages Phenotype during Development and Neuroinflammation. *J Neurosci* *40*, 784-795. 10.1523/JNEUROSCI.1523-19.2019.

Greene, C., Hanley, N., and Campbell, M. (2020). Blood-brain barrier associated tight junction disruption is a hallmark feature of major psychiatric disorders. *Transl Psychiatry* *10*, 373. 10.1038/s41398-020-01054-3.

Hasebe, R., Murakami, K., Harada, M., Halaka, N., Nakagawa, H., Kawano, F., Ohira, Y., Kawamoto, T., Yull, F.E., Blackwell, T.S., et al. (2022). ATP spreads inflammation to other limbs through crosstalk between sensory neurons and interneurons. *J Exp Med* *219*. 10.1084/jem.20212019.

Huseby, E.S., Huseby, P.G., Shah, S., Smith, R., and Stadinski, B.D. (2012). Pathogenic CD8 T cells in multiple sclerosis and its experimental models. *Front Immunol* *3*, 64. 10.3389/fimmu.2012.00064.

- Iijima, N., and Iwasaki, A. (2014). T cell memory. A local macrophage chemokine network sustains protective tissue-resident memory CD4 T cells. *Science* *346*, 93-98. 10.1126/science.1257530.
- International Multiple Sclerosis Genetics, C., Wellcome Trust Case Control, C., Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C.C., Patsopoulos, N.A., Moutsianas, L., Dilthey, A., Su, Z., et al. (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* *476*, 214-219. 10.1038/nature10251.
- Katayama, Y., Nishiyama, M., Shoji, H., Ohkawa, Y., Kawamura, A., Sato, T., Suyama, M., Takumi, T., Miyakawa, T., and Nakayama, K.I. (2016). CHD8 haploinsufficiency results in autistic-like phenotypes in mice. *Nature* *537*, 675-679. 10.1038/nature19357.
- Kawamoto, T., and Kawamoto, K. (2021). Preparation of Thin Frozen Sections from Nonfixed and Undecalcified Hard Tissues Using Kawamoto's Film Method (2020). *Methods Mol Biol* *2230*, 259-281. 10.1007/978-1-0716-1028-2_15.
- Kei Watase, E.J.W., Bisong Xu., and Barbara Antalffy, L.Y.-P., Kouichi Hashimoto, Masanobu Kano, Richard Atkinson, Yaling Sun, Dawna L. Armstrong, J. David Sweatt, Harry T. Orr, Richard Paylor, and Huda Y. Zoghbi (2002). A Long CAG Repeat in the Mouse Sca1 Locus Replicates SCA1 Features and Reveals the Impact of Protein Solubility on Selective Neurodegeneration. *Neuron* *34*, 905-919.
- Khandaker, G.M., Zimbron, J., Lewis, G., and Jones, P.B. (2013). Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: a systematic review of population-based studies. *Psychol Med* *43*, 239-257. 10.1017/S0033291712000736.
- Marques, T.R., Ashok, A.H., Pillinger, T., Veronese, M., Turkheimer, F.E., Dazzan, P., Sommer, I.E.C., and Howes, O.D. (2019). Neuroinflammation in schizophrenia: meta-analysis of in vivo microglial imaging studies. *Psychol Med* *49*, 2186-2196. 10.1017/S0033291718003057.
- McFarland, H.F., and Martin, R. (2007). Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature immunology* *8*, 913-919. 10.1038/ni1507.
- McQualter, J.L., Darwiche, R., Ewing, C., Onuki, M., Kay, T.W., Hamilton, J.A., Reid, H.H., and Bernard, C.C. (2001). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine* *194*, 873-882.
- Mueller, S.N., and Mackay, L.K. (2016). Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nature reviews. Immunology* *16*, 79-89. 10.1038/nri.2015.3.
- Muller, N., Weidinger, E., Leitner, B., and Schwarz, M.J. (2015). The role of inflammation in schizophrenia. *Front Neurosci* *9*, 372. 10.3389/fnins.2015.00372.

Nakatani, J., Tamada, K., Hatanaka, F., Ise, S., Ohta, H., Inoue, K., Tomonaga, S., Watanabe, Y., Chung, Y.J., Banerjee, R., et al. (2009). Abnormal behavior in a chromosome-engineered mouse model for human 15q11-13 duplication seen in autism. *Cell* *137*, 1235-1246. 10.1016/j.cell.2009.04.024.

Ogura, H., Murakami, M., Okuyama, Y., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Kanamoto, M., Nishihara, M., Iwakura, Y., and Hirano, T. (2008a). Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. *Immunity* *29*, 628-636. 10.1016/j.immuni.2008.07.018.

Ogura, H., Murakami, M., Okuyama, Y., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Kanamoto, M., Nishihara, M., Iwakura, Y., and Hirano, T. (2008b). Interleukin-17 Promotes Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback Loop via Interleukin-6 Induction. *Immunity*. *29*, 628-636.

Park, C.O., and Kupper, T.S. (2015). The emerging role of resident memory T cells in protective immunity and inflammatory disease. *Nat Med* *21*, 688-697. 10.1038/nm.3883.

Ransohoff, R.M., and Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature reviews. Immunology* *12*, 623-635. 10.1038/nri3265.

Saito, T., Matsuba, Y., Mihira, N., Takano, J., Nilsson, P., Itoharu, S., Iwata, N., and Saido, T.C. (2014). Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* *17*, 661-663. 10.1038/nn.3697.

Shi, Y., Wei, B., Li, L., Wang, B., and Sun, M. (2022). Th17 cells and inflammation in neurological disorders: Possible mechanisms of action. *Front Immunol* *13*, 932152. 10.3389/fimmu.2022.932152.

Siffrin, V., Radbruch, H., Glumm, R., Niesner, R., Paterka, M., Herz, J., Leuenberger, T., Lehmann, S.M., Luenstedt, S., Rinnenthal, J.L., et al. (2010). In vivo imaging of partially reversible th17 cell-induced neuronal dysfunction in the course of encephalomyelitis. *Immunity* *33*, 424-436. 10.1016/j.immuni.2010.08.018.

Sospedra, M., and Martin, R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* *23*, 683-747. 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707.

Stanley, E.R., and Chitu, V. (2014). CSF-1 receptor signaling in myeloid cells. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *6*. 10.1101/cshperspect.a021857.

Steinman, L. (2009). A molecular trio in relapse and remission in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. *9*, 440-447.

Steinman, L. (2014). Immunology of relapse and remission in multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* *32*, 257-281. 10.1146/annurev-immunol-032713-120227.

- Stofkova, A., Kamimura, D., Ohki, T., Ota, M., Arima, Y., and Murakami, M. (2019). Photopic light-mediated down-regulation of local alpha1A-adrenergic signaling protects blood-retina barrier in experimental autoimmune uveoretinitis. *Sci Rep* *9*, 2353. 10.1038/s41598-019-38895-y.
- Thompson, A.J., Toosy, A.T., and Ciccarelli, O. (2010). Pharmacological management of symptoms in multiple sclerosis: current approaches and future directions. *Lancet Neurol.* *9*, 1182-1199.
- Ting, E.Y., Yang, A.C., and Tsai, S.J. (2020). Role of Interleukin-6 in Depressive Disorder. *Int J Mol Sci* *21*. 10.3390/ijms21062194.
- Wang, H., He, Y., Sun, Z., Ren, S., Liu, M., Wang, G., and Yang, J. (2022). Microglia in depression: an overview of microglia in the pathogenesis and treatment of depression. *J Neuroinflammation* *19*, 132. 10.1186/s12974-022-02492-0.
- Williams, J.A., Burgess, S., Suckling, J., Lalouis, P.A., Batool, F., Griffiths, S.L., Palmer, E., Karwath, A., Barsky, A., Gkoutos, G.V., et al. (2022). Inflammation and Brain Structure in Schizophrenia and Other Neuropsychiatric Disorders: A Mendelian Randomization Study. *JAMA Psychiatry* *79*, 498-507. 10.1001/jamapsychiatry.2022.0407.

参考 WEB サイト

- Tabula Muris Senis プロジェクト

<https://tabula-muris-senis.ds.czbiohub.org/>

アクセス日 : 2023 年 3 月 20 日