

77. 細胞遊走を標的とした新規治療戦略の構築

宮部 斉重

聖マリアンナ医科大学 医学部 免疫学・病害動物学

Key words : 細胞遊走, ケモカイン, 生体イメージング

緒言

生体内において多彩な生命活動維持のために様々な細胞がそれぞれ適切な場所に適切なタイミングで遊走し、活動拠点を正確に定める事が非常に重要である。細胞遊走は時空間的に緻密にコントロールされ、各細胞が適切な時に適切な組織に存在する事で十分な機能を発揮する。この細胞遊走ネットワークは細胞・臓器毎にケモカイン、補体、脂質メディエーターなどの Chemoattractant (CA) 分子によって厳密に制御されている [1]。しかし、何らかの原因で細胞遊走ネットワークが破綻すると免疫細胞が組織へ異常遊走し、関節リウマチ (RA) などの慢性炎症性疾患を発症する。そのため、細胞遊走ネットワークの解明は、臓器特異的に細胞遊走を制御する事が可能な次世代免疫抑制療法開発につながると期待される [1]。近年、神経変性疾患であるアルツハイマー病 (AD) でも CA 分子が高発現し、その破綻が病態に関与している事が示唆されているが、その機序は全く不明である。その理由として従来の形態学的解析手法では生体内の細胞動態を解析するのが困難であった事が挙げられる。そこで、近年、我々は *in vivo* イメージング技術を様々な臓器に適用し、関節 (RA)、心臓 (血管炎)、脳 (脳性マラリア、ヘルペス脳炎) における細胞動態を解明する事に成功した [2~6]。本研究では我々が構築してきた *in vivo* イメージング技術を用いて AD における脳内の細胞遊走ネットワークを解明し、それらを標的とした新規治療法開発の基盤を構築する事を目的としている。

方法

1. 動物実験

14~16 ヶ月齢の雄性マウス (B6.Cg-Zbtb20Tg (PDGFB-APP^{SwInd})^{20Lms/2Mmjax}) をモリス水迷路で認知機能の評価した。同年齢の野生型 (wt) マウスと比べて、ゴールまでの到着が長い時間を要した個体、またはゴールに到着できなかった個体で、さらにプールの淵を回り続ける (単一行動) や、試行中に泳ぐ事をやめる (無気力) の行動が認められた個体を AD モデルマウスとして使用した。

2. RT-qPCR 法

RNA 抽出には Sepasol®-RNA I Super G を使用し、分光光度計にて濃度測定を行った。得られた RNA から High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を用いて cDNA を合成し、Thunderbird SYBR qPCR Mix を用いて各種遺伝子の mRNA 相対発現量を測定した。尚、18S リボゾーム RNA を内在性コントロールとした。Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System を用いて qPCR を施行し、 $\Delta\Delta CT$ 法を用いて野生型マウスの各臓器の発現量を 1 として、数値化した。

3. 蛍光免疫染色法

PBS 及び 4%PFA/PBS で環流固定したマウスから脳を採取し、4%PFA/PBS で 4℃一晩固定する。その後、スクロース置換を施行し、-80℃で冷却したヘキサンをを用いて凍結検体を作製する。作製した凍結脳検体はクリ

オスタットを用いて厚さ $30\mu\text{m}$ の凍結切片を作製する。切片を風乾後、Fixation/Permeabilization 溶液で室温 15 分反応させ、固定及び透過処理を施行する。PBS で 3 回洗浄後、Protein Block 溶液にて室温 15 分間ブロッキングを施行する。Protein Block 溶液を除去後、希釈した抗体と遮光下で室温 2 時間反応させる。Prolong Gold with DAPI にて封入後、共焦点顕微鏡 (LSM-800) を用いて観察する。

4. *in vivo* イメージング

麻酔したマウスへ cranial window surgery を施行する [4]。細胞及び血管を標識するため、抗体を血中へ投与し、共焦点顕微鏡 (LSM-800) を用いて *in vivo* イメージングを施行する。得られたデータは IMARIS ソフトウェアを用いて動画作成及び細胞動態の解析を施行した。

結果および考察

1. AD マウス由来脳におけるアミロイド β 沈着部位と免疫細胞の相関性

AD マウスでは wt と比べて、海馬周辺部位にアミロイド β の異常沈着が認められる。同病変部位に免疫細胞の局在が観察されるか、免疫染色を施行すると $\text{CD45}^+\text{Iba-1}^+$ ミクログリア (図 1A) 及び GFAP^+ アストログリア (図 1B) の異常集簇が観察され、AD 病態に免疫細胞の異常遊走が関与している事が示唆された。

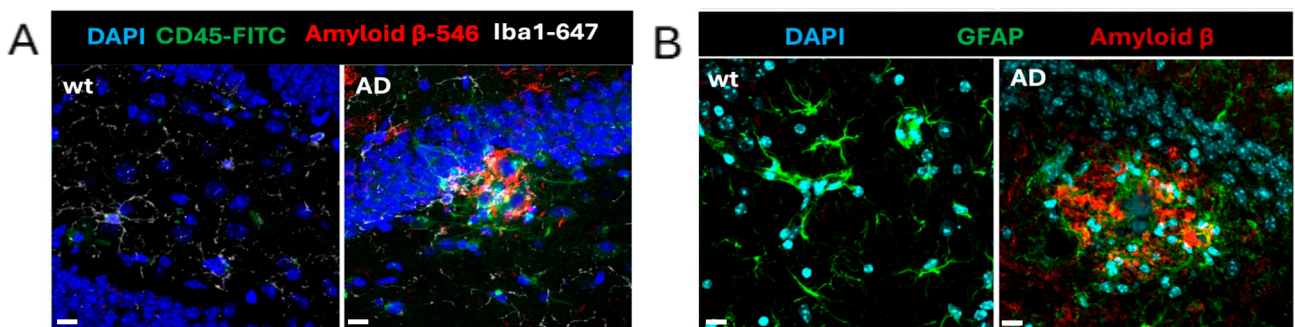


図 1. WT 及び AD マウス由来脳における免疫細胞の局在解析

A) AD マウス脳内ではアミロイド β 沈着部位に $\text{CD45}^+\text{Iba-1}^+$ ミクログリアが見られた。

B) AD マウス脳内ではアミロイド β 沈着部位に GFAP^+ アストログリアも観察された。

Bar は $10\mu\text{m}$ 。

2. 脳内に発現するケモカインの包括的解析

AD 由来脳のアミロイド β 沈着部位に多くの免疫細胞の集簇を認めた (図 1)。次にこれら免疫細胞の集簇にどのケモカインが関与しているか、qPCR で解析した。AD 由来脳では wt と比べて、ケモカイン *CCL2*、*CCL5*、*CCL8*、*CXCL10*、*CXCL13* mRNA の発現亢進が観察され、免疫細胞の集簇にケモカインが関与している事が示唆された (図 2)。

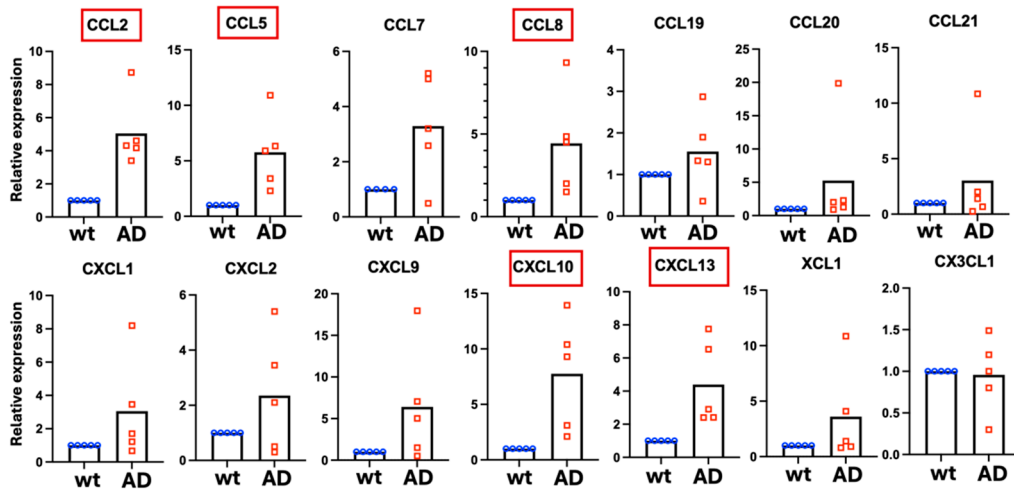


図 2. AD 及び wt マウス由来脳におけるケモカイン発現解析

AD 脳では wt と比較してケモカイン *CCL2*, *CCL5*, *CCL8*, *CXCL10*, *CXCL13* mRNA の発現が上昇していた。

3. AD 脳内におけるケモカイン及びケモカイン受容体の発現部位解析

複数のケモカインが AD 脳で高発現していることを見出したが、次にケモカイン発現局在とアミロイドβ沈着部位との相関性を解析した。ケモカイン *CCL2* (図 3A)、*CCL8* (図 3B) 共に AD マウス脳内でアミロイドβ沈着部位周辺に発現し、相関性が示唆された。また、AD マウス脳内で *Iba-1*⁺ミクログリアとケモカイン受容体 *CXCR3* の発現が一致していた (図 3C)。*CXCL10* mRNA は高発現しているが、タンパクレベルでの発現はまだ解析していないので *CXCR3*⁺ミクログリアと *CXCL10* の発現局在も解析していく。

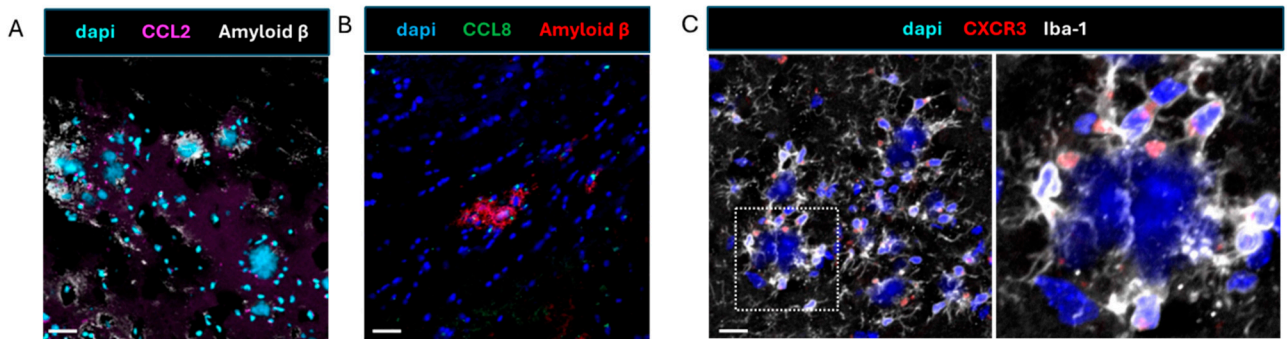


図 3. AD 脳内におけるケモカイン及びケモカイン受容体の発現局在解析

- A) AD 脳内ではアミロイドβ沈着部位周辺にケモカイン *CCL2* の発現が見られた。
 - B) A 同様、ケモカイン *CCL8* の発現もアミロイドβ沈着部位周辺に見られた。
 - C) AD 脳内で *Iba-1*⁺ミクログリアとケモカイン受容体 *CXCR3* の発現が一致していた。
- スケールバー : 20 μm (A, B)、10 μm (C)。

4. *in vivo* イメージングによる AD 脳内における細胞動態の解析

AD 及び wt マウス脳へ *in vivo* イメージングを施行し、脳内における細胞動態をリアルタイムに観察した。一般的に、免疫細胞の遊走メカニズムは血管内に接着 (arrest) し、爬行 (crawling) した後、組織へ漏出 (extravasation) する。AD マウス脳では血管内に接着及び爬行しているリンパ球が多数観察されたが wt マウス脳ではそれらは観察されなかった (図 4)。AD では arrest、crawling しているリンパ球が多く見られたことから、血管内皮細胞が活性化している事が示唆されたが AD、wt マウス脳内ともにリンパ球が脳組織へ漏出して行く様子は観察されなかった。

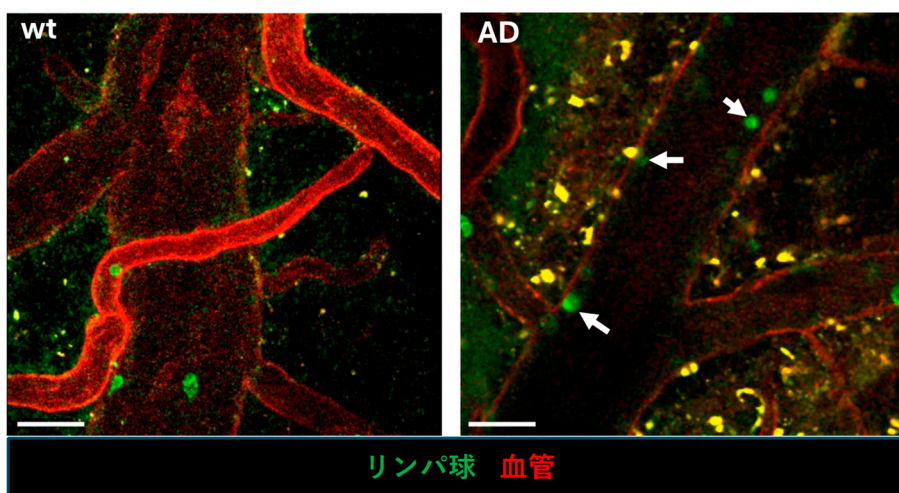


図4. *in vivo*イメージングによる脳内の細胞動態解析
ADマウス脳内ではwtと比べて非常に多くのリンパ球が血管内へ接着(arrest)し、爬行(crawling)していた(矢印)。スケールバー: 40 μ m。

5. 今後の研究方針

AD病態はアミロイドカスケード仮説が主流であったが、慢性的な脳炎症の関与も着目されており、不明な点が多い。本研究ではAD病態において複数のケモカインが高発現し、またアミロイド β 沈着部位に一致していた。さらに*in vivo*イメージングではAD脳で多数のarrest及びcrawlingしているリンパ球が見られ、何らかの機序で血管内皮細胞が活性化している事が示唆された。今後はADにおける血管内皮細胞の活性化メカニズムやケモカインによる免疫細胞の遊走メカニズムをさらに解明していく予定である。

共同研究者・謝辞

本研究を遂行する上で協力いただいた聖マリアンナ医科大学医学部免疫学・病害動物学の教室員に感謝いたします。また、最後に本研究にご支援賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に心より深謝申し上げます。

文献

- 1) Miyabe Y, Lian J, Miyabe C, Luster AD. Chemokines in rheumatic diseases: pathogenic role and therapeutic implications. *Nat Rev Rheumatol.* 2019;15(12):731-46. Epub 2019/11/11. doi: 10.1038/s41584-019-0323-6. PubMed PMID: 31705045.
- 2) Miyabe C, Miyabe Y, Bricio-Moreno L, Lian J, Rahimi RA, Miura NN, et al. Dectin-2-induced CCL2 production in tissue-resident macrophages ignites cardiac arteritis. *J Clin Invest.* 2019;129(9):3610-24. Epub 2019/06/07. doi: 10.1172/JCI123778. PubMed PMID: 31169521; PubMed Central PMCID: PMC6715376.
- 3) Michael BD, Bricio-Moreno L, Sorensen EW, Miyabe Y, Lian J, Solomon T, et al. Astrocyte- and Neuron-Derived CXCL1 Drives Neutrophil Transmigration and Blood-Brain Barrier Permeability in Viral Encephalitis. *Cell Rep.* 2020;32(11):108150. Epub 2020/09/17. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108150. PubMed PMID: 32937134; PubMed Central PMCID: PMC67548103.

- 4) Sorensen EW, Lian J, Ozga AJ, Miyabe Y, Ji SW, Bromley SK, et al. CXCL10 stabilizes T cell-brain endothelial cell adhesion leading to the induction of cerebral malaria. *JCI Insight*. 2018;3(8). Epub 2018/04/20. doi: 10.1172/jci.insight.98911. PubMed PMID: 29669942; PubMed Central PMCID: PMC5931132.
- 5) Miyabe Y, Miyabe C, Murooka TT, Kim EY, Newton GA, Kim ND, et al. Complement C5a Receptor is the Key Initiator of Neutrophil Adhesion Igniting Immune Complex-induced Arthritis. *Sci Immunol*. 2017;2(7). Epub 2017/05/23. doi: 10.1126/sciimmunol.aaj2195. PubMed PMID: 28529998; PubMed Central PMCID: PMC5436313.
- 6) Miyabe Y, Miyabe C, Mani V, Mempel TR, Luster AD. Atypical complement receptor C5aR2 transports C5a to initiate neutrophil adhesion and inflammation. *Sci Immunol*. 2019;4(35). Epub 2019/05/12. doi: 10.1126/sciimmunol.aav5951. PubMed PMID: 31076525.