

氏名	なかの ようすけ <b>中野 洋輔</b>
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第984号
学位授与の日付	令和3年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 バイオテクノロジー専攻
学位論文題目	<b>Toll-like receptor 4-dependent neuroinflammation in the circumventricular organs of the adult mouse brain</b> (成体マウス脳室周囲器官における Toll 様受容体 4 を介した神経炎症応答)
審査委員	(主査)教授 宮田清司 教授 伊藤雅信 教授 片岡孝夫

### 論文内容の要旨

人類は、長い歴史の中で細菌やウイルスなどの感染症と闘ってきた。ワクチンや医薬品の開発は、感染症の脅威を著しく低下させ、人類は感染症との闘いに終止符を打ったと錯覚していたが、コロナウイルスの出現により依然として感染症との闘いが続いていることを再認識させられた。哺乳類は、細菌やウイルスの固有構成成分を **danger signal** として認識し炎症応答が誘導される。細菌やウイルス特有の構成成分は、**pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)** と呼ばれ、**pattern-recognition receptors (PRRs)** によって認識される。PRRs による自然免疫系の発動は、サイトカインの産生と放出を促し、最終的には脳の自律神経系、免疫系、内分泌系を活性化し全身性の炎症となる。しかし、驚くべくことに末梢から脳への感染情報の伝達経路についての全様は明らかになっていない。本論文では、グラム陰性菌の PAMPs である **lipopolysaccharide (LPS)** を用いたマウスの炎症実験系を用いて、LPS の PRRs である **Toll-like receptor 4 (TLR4)** に着目して脳の神経炎症応答経路についての研究をまとめた。

本申請論文は、序論、第1章「マウス脳室周囲器官における LPS-TLR4 シグナリングを介したアストロサイト STAT3 シグナリング活性化」、第2章「脳室周囲器官における LPS-TLR4 シグナリングの発熱に対する負の制御作用」から構成されている。序論では、感染時に生体が PAMPs を認識し末梢感染情報が脳に伝わることで様々な炎症応答が生じることを解説している。特に、脳室周囲器官(**circumventricular organs; CVOs**)が、血液と脳のバリアである血液脳関門を欠く有窓性血管を有し、血液中分子を直接認識するセンサー受容体が多数発現していること、さらに脳内免疫系の活性化に重要な部位であることを解説している。第1章では、脳室周囲器官のアストロサイトなどに LPS を認識する TLR4 が発現し、TLR4 が LPS により直接的に活性化されることで STAT3 シグナリングが生じることを解説している。第2章では、脳室周囲器官のアストロサイトなどに発現している TLR4 を介して NF- $\kappa$ B シグナリングが生じ体温調節に関与していることを解説している。

第1章では、マウスを用いて脳内の TLR4 発現細胞を免疫組織化学により調べ、CVOs のアス

トロサイトと上衣細胞に TLR4 が発現していることを示した。一方、免疫担当細胞であるミクログリアには TLR4 がほとんど発現していないことが分かった。CVOs は、血液脳関門を欠いており血液に存在する分子が直接作用することが知られている。そこで、脳に存在する TLR4 が直接 LPS を受容している可能性を検討した。LPS を末梢投与すると、アストロサイトと上衣細胞で STAT3 がリン酸化され、2 時間後に核に移行することが分かった。次に、脳内に LPS を投与し STAT3 の活性化を調べたところ、STAT3 の活性化が観察され、CVOs の TLR4 が LPS を直接受容しアストロサイトと上衣細胞にシグナリングを引き起こしていることが分かった。一方、ミクログリアの活性化阻害剤ミノサイクリンを前投与し、LPS 投与による CVOs における STAT3 活性化を調べると、LPS 30 と 300 ng/kg の脳室内投与は、ミノサイクリン前投与による STAT3 活性化を CVOs のすべての部位において顕著に抑制した。一方、LPS 末梢投与では部位と濃度により抑制作用に違いがあった。よって、LPS-TLR4 を経由するアストロサイトと上衣細胞の STAT3 活性化には、ミクログリアが部分的に関与していることが明らかになった。以上の結果は、CVOs の TLR4 はグラム陰性菌の PAMPs である LPS を直接認識し、脳の神経炎症を引き起こしていることを示している。

第 2 章では、LPS により誘導される CVOs の TLR4 を起点とした炎症応答経路をより明らかにするために、STAT3 シグナリングよりも上流に位置する NF- $\kappa$ B が CVOs の TLR4 を介して、脳の神経炎症を引き起こす経路について調べた。マウスに LPS を末梢投与すると、CVOs で TLR4 を発現しているアストロサイトと上衣細胞に、NF- $\kappa$ B の活性化があることが分かった。さらに、TLR4 の antagonist を脳内に前投与すると、末梢投与した LPS によるアストロサイトと上衣細胞の NF- $\kappa$ B 活性化が阻害されるが、発熱を増強することが分かった。

LPS により誘導される TLR4 の炎症応答は、自然免疫系で初めて明らかにされたシステムで、最もよく研究されている炎症のモデル系である。本研究では、血液中のサイトカインとは別に、脳の CVOs に存在するアストロサイトと上衣細胞の TLR4 が LPS を直接的に受容することで神経炎症を引き起こす新しい経路があることを明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

哺乳類では、細菌やウイルスの固有構成成分である PAMPs を PRRs が認識して自然免疫の炎症応答が誘導される。PRRs による自然免疫系の活性化は、サイトカインの産生と放出を促し、最終的には脳の自律神経系、免疫系、内分泌系を活性化し全身性の炎症となる。軽微な炎症は発熱を生じ免疫系を活性化することで、病原体を駆逐しようとするが、重症化すると敗血症になり死に至る場合もある。コロナウイルスも重症化した場合サイトカインシンドロームを生じ敗血症になり死に至ると考えられている。末梢の炎症情報は脳へ伝えられ神経炎症を生じることで、自律神経系、情動系、免疫系が活性化される。しかし、末梢から脳への感染情報の伝達経路については未解明な部分が多い。申請者はグラム陰性菌の PAMPs である LPS を用いた炎症実験系を用いて、脳の炎症応答経路について研究を行った。

第 1 章では、成体マウスを用いて脳内の TLR4 発現細胞を免疫組織化学により調べたところ、CVOs のアストロサイトと上衣細胞に TLR4 が発現していることが分かった。さらに、LPS の末

梢および中枢投与により、TLR4 を発現しているアストロサイトと上衣細胞に STAT3 のリン酸化が生じることを明らかにした。次に、ミクログリアの活性化阻害剤ミノサイクリンを前投与した後、LPS の脳室内投与をすると、STAT3 活性化が CVOs のすべての部位において顕著に抑制された。一方、LPS 末梢投与では部位と濃度により抑制作用に違いがあった。以上の結果は、CVOs に存在するアストロサイトと上衣細胞に発現している TLR4 は、LPS を直接的に受容し、その下流では脳の神経炎症を開始する経路があることが示された。一方、LPS-TLR4 を介した炎症においては、脳の免疫担当細胞であるミクログリアは間接的な働きをしていることが示された。

第2章では、STAT3 シグナリングよりも上流に位置する NF- $\kappa$ B に着目し、CVOs の TLR4 を介した脳の神経炎症を引き起こす経路と体温の関係について調べた。マウスに LPS を末梢投与すると、CVOs で TLR4 を発現しているアストロサイトと上衣細胞に、NF- $\kappa$ B の活性化があることが分かった。TLR4 の antagonist である LPS-RS を前投与すると、末梢投与した LPS によるアストロサイトと上衣細胞の NF- $\kappa$ B 活性化が阻害されるが発熱は増強されることが分かった。これらの結果は、CVOs の TLR4 は LPS を直接認識し脳の神経炎症を引き起こすとする第1章の結果をさらに支持するものである。さらに、CVOs の LPS-TLR4 経路が体温調節にも関与している可能性を示している。

LPS-TLR4 経路により誘導される炎症応答は、最もよく研究されてきている動物の炎症モデル系である。本論文では CVOs のアストロサイトと上衣細胞に発現している TLR4 が LPS を直接的に受容し神経炎症を引き起こしている経路があることを初めて明らかにした。この結果は、ミクログリアが末梢炎症情報を最初に脳で受容するという従来の概念を覆すものである。よって、本研究は感染時における末梢から脳への炎症情報伝達機構に新しい経路があることを示したもので学術的意義が非常に高い研究である。また、これらの研究は、医学・薬学的意義も大きく、感染によって生じる疾病の原因解明に貢献する可能性がある。

学位論文の内容は、申請者が筆頭著者のものを含む、査読制度の確立されている下記の国際科学雑誌 2 編に掲載されている。

[公表論文]

- 1). Yousuke Nakano, Eriko Furube, Shoko Morita, Akio Wanaka, Toshihiro Nakashima, Seiji Miyata. Astrocytic TLR4 expression and LPS-induced nuclear translocation of STAT3 in the sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 278, pp. 144-158, 2015.
- 2). Shiori Muneoka, Saki Murayama, Yousuke Nakano, Seiji Miyata. TLR4 in circumventricular neural stem cells is a negative regulator for thermogenic pathways in the mouse brain. *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 331, pp. 58-73, 2019.

参考論文として、以下の国際科学雑誌 5 編に掲載されている。

[参考論文]

- 3). Keigo Kohara, Akitoshi Inoue, Yousuke Nakano, Hirokazu Hirai, Takuya Kobayashi, Masato Maruyama, Ryosuke Baba, and Chiho Kawashima. BATTLE: Genetically Engineered Strategies for Split-Tunable Allocation of Multiple Transgenes in the Nervous System. *iScience*, Vol. 23, 101248, 2020.
- 4). Ryoichi Iwata, Joo Hyoungh Lee, Mikio Hayashi, Umberto Dianzani, Kohei Ofune,

Masato Maruyama, Souichi Oe, Tomoki Ito, Tetsuo Hashiba, Kunikazu Yoshimura, Masahiro Nonaka, Yousuke Nakano, Lyse Norian, Ichiro Nakano, Akio Asai. ICOSLG-mediated regulatory T-cell expansion and IL-10 production promote progression of glioblastoma. *Neuro-Oncology*, Vol. 22, pp. 333-344, 2020.

- 5). 岩田亮一, 丸山正人, 大舟晃平, 中野洋輔, 大江総一, 林美樹夫, 吉村晋一, 埜中正博, 浅井昭雄. 転移性脳腫瘍とがん幹細胞との関連. *Cytometry Research*, Vol. 28, pp. 13-18, 2018.
- 6). Shohei Takagi, Eriko Furube, Yousuke Nakano, Mitsuhiro Morita, Seiji Miyata. Microglia are continuously activated in the circumventricular organs of mouse brain. *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 331, pp. 74-86, 2019.
- 7). Ryoichi Iwata, Masato Maruyama, Tomoki Ito, Yousuke Nakano, Yonehiro Kanemura, Taro Koike, Souichi Oe, Kunikazu Yoshimura, Masahiro Nonaka, Shosaku Nomura, Tetsuo Sugimoto, Hisao Yamada & Akio Asai. Establishment of a tumor sphere cell line from a metastatic brain neuroendocrine tumor. *Medical Molecular Morphology*, Vol. 50, pp. 211-219, 2017.