

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	神経変性疾患における免疫依存性細胞障害機序の解析
Title(English)	
著者(和文)	高橋文緒
Author(English)	Fumio Takahashi
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12266号, 授与年月日:2022年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:林 宣宏,本郷 裕一,一瀬 宏,長田 俊哉,中村 信大,大木 伸司
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12266号, Conferred date:2022/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

2022 年度 博士論文

「神経変性疾患における免疫依存性細胞障害機序の解析」

東京工業大学 生命理工学研究科

生体システム専攻

高橋 文緒

指導教員 林 宣宏 教授

## 目次

### 略語一覧

1 章	序論	6
1-1	神経変性疾患とは	
1-2	現在の神経変性疾患研究の問題点	
1-3	神経変性疾患に共通する特徴的な事象	
1-3-1	細胞周期の亢進	
1-3-2	転移因子群の発現抑制の解除	
1-3-3	制御性 T 細胞の関与	
1-4	長鎖散在反復配列とは	
1-5	神経変性疾患における L1 活性化	
1-5-1	神経変性疾患に付随するイベントとしての L1 発現量の亢進	
1-5-2	L1 の発現亢進による神経変性の可能性	
1-6	免疫依存性細胞障害	
2 章	EAE における免疫依存性神経変性病態の解析	22
2-1	目的	
2-2	結果	
2-2-1	ミクログリアの MHC class II 発現亢進と IFN- I signature	
2-2-2	CNS 浸潤 Th 細胞のプロトタイプ抗原としての ORF1	
2-2-3	EAE マウス脊髄神経細胞における L1 活性化	
2-2-4	EAE マウス脊髄神経細胞における L1 脱抑制の分子機序の解析	
2-2-5	反作用としての premature polyadenylation による L1 活性化の制御	
2-3	考察	

3 章	神経変性モデルマウスにおける免疫依存性神経変性病態の解析	43
3-1	目的	
3-2	結果	
3-2-1	神経変性モデルの中枢神経系への eomes 陽性 Th 細胞の浸潤	
3-2-2	mSOD1 マウス脊髄神経細胞における L1 活性化	
3-2-3	mSOD1 マウス脊髄神経細胞における L1 脱抑制の分子機序の解析	
3-2-4	mSOD1 マウスの脊髄神経組織内における L1 レトロ転位の解析	
3-3	考察	
4 章	神経変性モデルマウスにおける免疫依存性神経細胞障害機序の成立とその意義の 解明	63
4-1	目的	
4-2	結果	
4-2-1	ORF1 による中枢神経系由来 Th 細胞の活性化とグランザイム B 放出	
4-2-2	中枢神経系由来 Th 細胞による神経細胞障害の誘導	
4-2-3	L1 活性化阻害剤の病態改善効果と神経細胞障害性 Th 細胞の抑制	
4-3	考察	
5 章	総括と今後の展望	77
6 章	材料と方法	83
	参考文献	89
	報文目録	97
	謝辞	98

## 略語一覧

1-MT	1-Methyltryptophan
3TC	Lamivudine
AD	Alzheimer's disease (アルツハイマー型認知症)
AHR	Aryl Hydrocarbon Receptor
ALS	Amyotrophic lateral sclerosis(筋萎縮性側索硬化症)
APCs	Antigen presenting cell (抗原提示細胞)
A $\beta$	Amyloid beta
BMDCs	Bone marrow-derived dendritic cells (骨髄由来樹状細胞)
C9ORF72	Chromosome 9 open reading frame 72
CNS	Central nerve system (中枢神経組織)
DAM	Disease associated microglia
DCs	Dendric cells
DNMT1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1
EAE	Experimental autoimmune encephalomyelitis (実験的自己免疫性脳脊髄炎)
FTD	Frontotemporal dementia (前頭側頭型認知症)
Fcrls	Fc receptor-like S, scavenger receptor
Foxa1	Forkhead box protein A1
HD	Huntington's disease (ハンチントン病)
Htt	Huntingtin
IFN-1	Type1-interferon ( I 型インターフェロン)
IVT	Invitro translation system
Ido	Indoleamine 2,3-dioxygenase
KAP1	KRAB-associated protein 1
LINE1/L1	Long interspersed nuclear element 1
LTR	Long terminal repeat retrotransposon
MHC	Major Histocompatibility Complex
MS	Multiple sclerosis
MeCP2	Methyl CpG binding protein 2
NK 細胞	Natural killer cell
NuRD	nucleosome remodeling and deacetylase
P2ry12	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12

PD	Parkinson's disease (パーキンソン病)
Par-1	Protease activated protein-1
RNP	Ribonucleoprotein
RTE	Retrotransposable element
Rb1	Retinoblastoma 1
ROS	Reactive oxygen species
SINE	Short interspersed nuclear element
SPMS	Secondary-progressive multiple sclerosis
TCR	T cell receptor
TDP-43	TAR DNA-binding Protein of 43kDa
TE	Transposable element
TLR	Toll-like receptor
Tdo	Tryptophan 2,3-dioxygenase
Treg	Regulatory T cell
Trex1	Three prime repair exonuclease 1

# 第 1 章

## 序論

## 1-1 神経変性疾患とは

「神経変性疾患」は、神経組織の構造的・機能的異常を伴う進行性神経疾患の総称である(Przedborski et al., 2003)。低酸素脳症、代謝異常、外傷など原因が特定できる外因性の神経細胞障害や、髄鞘障害など神経細胞以外の神経組織障害を伴う神経疾患は、神経変性疾患には含まれない。アルツハイマー型認知症(AD)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、パーキンソン病(PD)などに代表される神経変性疾患は、中枢神経系の特定の部位に生じる神経細胞死を伴う神経障害と萎縮を特徴とし、障害部位はそれぞれの疾患における臨床症状と相関している。ADでは、海馬や大脳皮質の神経変性により記憶障害が生じ(Dubois et al., 2021)、PDでは、中脳黒質領域のドーパミン作動性神経の欠落によって特徴的な運動障害を引き起こす(Simon et al., 2020)。さらに成人発症の神経変性疾患の中でも、特に重篤な症状を呈するALSは、脳脊髄に分布する上位・下位運動ニューロンが選択的に障害され、徐々に進行する上行性の麻痺により、その多く

は数年から十数年で死に至る疾患である(Masrori and Van Damme, 2020)。神経変性疾患は、いずれも臨床症状が重篤で、場合によっては人間の尊厳さえも冒す深刻な疾患であるにもかかわらず、いまだに発症原因が解明されておらず、有効な治療法も開発には至っていない。

[代表的な神経変性疾患]	
アルツハイマー病	内側側頭葉 (海馬)
パーキンソン病	中脳黒質
レビー小体型認知症	多様 (大脳皮質・中脳黒質)
多系統萎縮症	小脳、中脳黒質、自律神経
筋萎縮性側索硬化症	運動野、脳幹、脊髄前角 (運動ニューロン)
前頭側頭型認知症	前頭葉、側頭葉
大脳皮質基底核変性症	大脳皮質と皮質下神経核 (中脳黒質・淡蒼球)
進行性核上性麻痺	淡蒼球、視床下核、小脳歯状核、赤核、黒質、脳幹被蓋
プリオン病 (クロイツェルフェルト・ヤコブ病)	

表 1 代表的な神経変性疾患

神経変性疾患に共通して認められる特徴的な病理的所見として、細胞内外に生じるタンパク質の異常凝集が広く知られている。例えば、ADでは不溶性のアミロイド繊維タンパク質であるA $\beta$ 陽性の老人斑の形成、PDでは $\alpha$ -シヌクレイン陽性のレビー小体の形成、ALS

では TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)を含む特徴的な凝集体形成といったように、各疾患の患者死後脳では特徴的な細胞内凝集タンパク質が観察され、神経変性部位とも一定の相関がある(Noor et al., 2021)。また、一部の神経変性疾患患者では、これらの凝集体タンパク質をコードする遺伝子に変異が生じており、遺伝性(家族性)の神経変性疾患における家系解析から、これまでに複数の遺伝子変異が同定されたことから、病態発症機序と変異タンパク質との関連が着目されてきた。しかしながら、これらの異常凝集タンパク質や遺伝子変異解析から得られる知見は、発症機序解明への寄与率があまり高いとは言えない。異常凝集タンパク質の病原性は、その多くが剖検脳サンプルの所や培養細胞を用いた解析の結果が根拠とされ、タンパク質凝集が生体内で神経細胞死を引き起こす長期の神経変性過程を生体で捉えることの難しさが根底にある。また遺伝性の患者は全体の約1割程度に留まる上、各変異の浸透率は様々で、変異=発症とはならないことが多いため、因果関係の解析が困難であるケースが多い。一方で、全体の約9割を占める孤発性の患者においては、その地域や時期特異的な患者集団の存在から、環境要因の関与が議論されることが多い(Tomiyama et al., 2008)。グアム島や紀伊半島で多発する ALS は風土病とも呼ばれ、例えばソテツ科植物の実に含まれる興奮性神経毒の関与が報告されてきた(Garruto, 2009)。しかしながら、これらの患者はいずれも、特定の地域に生じる少数例にとどまるため、神経変性疾患患者全体の発症原因の手がかりを得るには不十分であった。さらに、大規模な疫学調査によっても発症と相関のある環境要因を特定するには至っていないことから、孤発性の患者においては遺伝的要因(背景因子)と環境要因が相互に影響しあい、より複雑な発症機序を生み出している可能性が考えられる。

## 1-2 現在の神経変性疾患研究の問題点

前述のように遺伝子変異を伴う神経変性疾患は全体の約1割にとどまり、9割の患者が孤発性とされる。さらに神経変性疾患の発症部位が中枢神経系の内部であり、病態に関連した

イベントを生きたままで外部から観察することは極めて困難である。そのため神経変性疾患の原因究明には、剖検脳の観察や（代替手段として）培養神経細胞を用いた解析が主となるが、生体内における経時的な発症機序の再現には至っていないため、関連遺伝子・タンパク質の病態への直接的な関与を示すことはできていない。例えば TDP-43 タンパク質の異常凝集は ALS 患者全体の 95%で観察されるが、TDP-43 遺伝子変異を伴う ALS 患者はごく少数にとどまっており、遺伝子変異によらない TDP-43 の病態に関連した特性は、いまだに不明である。

さらに現在の神経変性疾患の分類には、いわゆる二重基準が存在している。歴史的には、神経変性疾患は、大脳、大脳基底核、小脳、脊髄、末梢神経といった臨床病理学的な病変部位の特徴により、異なる疾患として疾患名が定義、分類されてきた。その後、前述の通り神経細胞内に凝集するタンパク質に基づいて、同一の病原タンパク質が共通の病態を引き起こす前提のもと、プロテオパチーという新たな概念に基づいて、神経変性疾患は分類されるようになった。ただし最初に呈する症状は個人間で差が大きく、また疾患によっては生前の鑑別診断が困難なケースが少なからず存在するため、患者全体の約 1/4 は剖検脳の解析

によって、死後に確定診断がなされているのが現状である。さらに凝集タンパク質を基準としたプロテオパチーが発症要因であると考えられる分類では、タウオパチー、 $\alpha$ シヌクレイノパチー、TDP-43 プロテオパチー、FUS プロテオパチーなどが知られている。このように神経変性疾患の定義・分類は、臨床病理学的な基準と病原因子に基づいた基準が混在している。そして

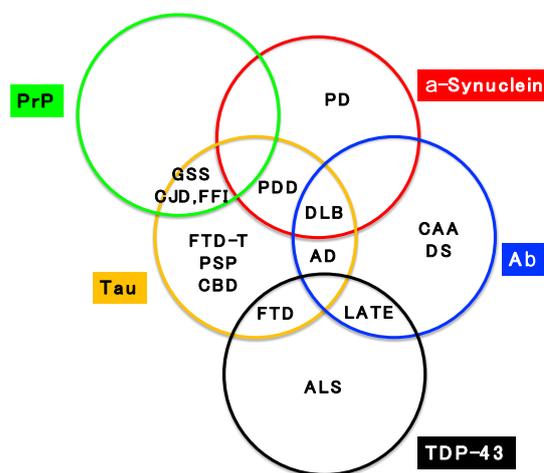


図 1-1 神経変性疾患で報告されている病態関連タンパク質

臨床的に見た病変部位と検出される凝集タンパク質も、完全に一対一対応するわけではなく、多数の境界例が存在することが明らかとなってきた(図 1-1)。最近の大きな話題として

は、例えば AD 患者の約 1/3 が、TDP-43 の凝集を特徴とする Late (大脳辺縁系優位型老年期 TDP-43 脳症) という別の疾患単位である可能性や、前頭側頭型認知症(FTD)の患者では、神経変性部位におけるタウタンパク質の蓄積に加えて、TDP-43 の異常凝集を伴う症例も報告されている。このように臨床病理学的な特徴に基づいて分類された各神経変性疾患の間で、凝集タンパク質のオーバーラップが認められることから、診断名を基準とした神経変性疾患の分類と、凝集タンパク質の種類に基づくプロテオパチーを統一的に解釈することができる、共通した神経変性機序が各神経障害部位に存在する可能性が考えられる。

さて神経変性疾患が発見されてから長い間、神経細胞の自律的な機能異常が主な発病原因と考えられており、上記に示した所見以外にも、ミトコンドリアの機能異常や、細胞内酸化ストレスの亢進、オートファジー機能異常、ユビキチン-プロテアソーム系の異常などが明らかとなってきた(Ilieva et al., 2009)。しかしながら近年、神経変性疾患の研究は、神経細胞自身に原因を求める傾向から、神経細胞周囲の非神経細胞(アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト)などが関与する、いわゆる神経炎症反応が、神経細胞障害機序に深く関連するという考え方へと広がりつつある。例えばオリゴデンドロサイトは、生理的条件下では軸索伸長の補助と神経栄養因子の分泌を介した神経細胞維持機能を持つが、病態下では自然免疫系を活性化することで病原性ミクログリアの活性化を促す(Vahsen et al., 2021)。さらに CNS の外部の要素による神経変性疾患の修飾作用も注目を集めつつある。例えば免疫系は、生体防御と恒常性の維持に必須の全身性のシステムである。通常 CNS には免疫細胞はほとんど検出されないが、一旦神経炎症反応が生じると大量の免疫細胞が CNS 内に集積する。興味深いことに神経炎症に直結する自然免疫系の免疫細胞の関与のみならず、T 細胞などの獲得免疫系の病態に関連した変化も数多く報告されており、神経細胞非自律的な神経障害における免疫細胞の関与が注目されつつある(Seol et al., 2020; Van Harten et al., 2021)。しかしながら、既存の疾患関連遺伝子や凝集タンパク質と CNS 内の免疫反応との関係はほぼ不明であり、さらにプロテオパチーによる自律的神経細胞死が

広く受け入れられている現状では、CNS 内に散らばった免疫細胞の関与を実験的に証明し、関連のコミュニティにその意義を受け入れてもらうことは容易ではなく、免疫異常による直接的な神経変性機序が存在するかどうかは、不明のままである

### 1-3 神経変性疾患に共通する特徴的な事象

#### 1-3-1 細胞周期の亢進

増殖する細胞は、1 回分裂するごとに細胞周期が一回転する。一方、成熟神経細胞や心筋細胞など高度に分化が進んだ細胞は、一般的に細胞分裂しない post-mitotic な細胞であると考えられている。ところが特定の条件の元で、成熟神経細胞（大脳皮質の興奮性神経細胞）が分裂できることが示され(Oshikawa et al., 2013)、成熟神経細胞は増殖能を失っているのではなく、ブレーキが厳密にかけられていることが分かった。そして、あまり知られていない神経変性疾患に共通した病態変化の一つに、成熟神経細胞の細胞周期の異常亢進がある。例えば、AD を始めとする様々な神経変性疾患の患者サンプル、およびモデルマウスの解析から、神経細胞の細胞周期の異常亢進と関連タンパク質の発現変化が数多く報告されている。細胞周期が亢進した神経細胞は G0 期を離れ、G1/S 期から細胞分裂前の G2 期まで進行しており、それらの細胞の染色体は  $2n \sim 4n$  の間の異数性 (aneuploidy) を示す(Kingsbury et al., 2005)。神経細胞の細胞周期亢進は病変部位に強く生じており、病態進行度ともよく相関することから、神経変性病態の形成過程との関連が疑われる(Arendt et al., 2010)。細胞周期の制御に関与するタンパク質の多くは、病態の変化に伴う、神経細胞のエピジェネティックな遺伝子制御の変動の影響を受けやすく、DNA ダメージなどにも応答して再活性化することが知られている(Park et al., 1998)。このような成熟神経細胞の細胞周期の異常な亢進は、長期に渡る正常な細胞機能の維持を難しくし、最終的にアポトーシスの誘導による細胞死を引き起こす。この細胞応答は、神経組織の保護システムとして働き、正常な機能が維持できない神経細胞の排除に有効と考えられているが、細胞死を生じる細胞の頻度や、その分子

機序の詳細は不明である。神経変性病態下では、疾患関連タンパク質が、細胞周期関連遺伝子の発現変化を引き起こし、神経細胞死を引き起こす可能性が示されている (Ippati et al., 2021)。すなわち、AD における  $A\beta$ 、ALS における TDP-43 や C9ORF72、HD における Htt などの疾患関連タンパク質は、酸化ストレスによって誘導された ROS が DNA ダメージを引き起こすことで、細胞周期の亢進を誘導すると考えられている。しかしながら、神経変性疾患に関連したこのような細胞変化と発症の因果関係を、in vivo で明確に示した報告はほとんどなく、一連の病態機序の多くは推測によって成り立っている。従って、神経変性病態下における異常な細胞周期亢進が、神経変性機序の原因と結果のいずれであるかはまだ不明であり、in vivo の詳細な解析が必要であると考えられる。

### 1-3-2 転移因子群の発現抑制の解除

上にも述べた通り、神経変性疾患においては、神経炎症に伴うエピジェネティックな遺伝子制御の変動によって細胞の形質が変化するが、このような形質の変化は老化と対比されることが多い。実際、老化は神経変性疾患の最重要なリスク因子であり、神経変性疾患患者の多くは、高齢になってから発症するケースが多い。老化した細胞では、厳密な遺伝子発現制御システムが徐々に劣化していき、例えば、細胞の機能に不要あるいは有害な遺伝子の発現を抑え込むためのゲノム構造変化であるヘテロクロマチン化の精度が、著しく低下する。その結果生じたヘテロクロマチンの弛緩によって、いわゆる“ジャンク DNA”に相当する遺伝子群の発現抑制が解除され、老化に伴う様々な異所性遺伝子の発現が生じる。ジャンク DNA の中には、トランスポゾン、レトロトランスポゾンや non-coding RNA などが含まれ、特に転移因子としても知られるレトロトランスポゾンは、老化細胞のみならず、AD、PD、ALS をはじめとする様々な神経変性疾患において広く認められる (Saleh et al., 2019)。さらに中枢神経組織内における発現量亢進は、病態と相関することが示されており、神経変性疾患とレトロトランスポゾン活性化の強い相関を示している (Savage et al., 2020)。神経細胞内に

おける内在性レトロウイルスの活性化は、それ自身が樹状突起の伸長やシナプス形成を阻害することが分かっているが、L1 による明らかな細胞障害に関する報告はない。また、孤発性 AD 患者においてもレトロトランスポゾンの活性化が報告されており、エンドヌクレアーゼと逆転写酵素活性による神経細胞障害の可能性が示唆されているが、詳細な細胞障害機序は明らかにされていない。L1 を始めとするレトロトランスポゾンは、DNA 損傷による細胞障害や、後述するレトロ転位による遺伝子の発現変動や破壊との関連が着目されることが多いが、異常な活性化による L1 由来核酸の過剰産生は、それ自身が核酸センサーを刺激して、神経炎症を引き起こすことは容易に想像でき、また L1 由来タンパク質の活性についても不明な点が多いことから、L1 と神経細胞障害との関連については、さらに広い視点で解析することが必要であると考えられる。

### 1-3-3 制御性 T 細胞の関与

神経変性疾患の多くでは、末梢血あるいは中枢神経組織内における T 細胞数の変動が多く報告されており、病態発症機序と獲得免疫系の関与が着目されている (Amor and Woodroffe, 2014)。浸潤した T 細胞は病変部位に高頻度に観察されることから、病態環境下で活性化した T 細胞が産生する炎症性サイトカインによる神経細胞障害の可能性が予想されているが、その分子機序や病態形成への寄与の程度はよくわかっていない。PD 関連の報告の中には、患者由来 T 細胞が  $\alpha$ -Syn タンパク質に反応性を示すことから、何らかの自己免疫反応に関連した細胞応答が、発症機序の一部を担う可能性が指摘されている (Allen Reish and Standaert, 2015)。これには、キラー T 細胞による直接的な神経細胞障害と、ヘルパー T 細胞による炎症性サイトカイン産生を介した神経炎症の遷延化など、いくつかの機序が想定されている。ただし生体内に常在するタンパク質に対しては、通常免疫寛容が成立し、T 細胞が反応しうる条件は限られているため、PD が自己免疫疾患に似た機序によって発症するとは考えられないことから、広範な神経変性疾患の発症機序の全てを説明しうる

ものではないと思われる。

その一方で、神経変性疾患のモデルマウスを用いた解析から、制御性 T 細胞の病態改善効果が数多く報告されている (Machhi et al., 2020)。また神経変性疾患患者の末梢血でも、Treg 細胞の有意な増加が示されており、Treg 細胞の細胞移植による神経変性疾患治療を試みる臨床治験が、アメリカで進行中である。Treg 細胞が、神経変性疾患の病態を改善する分子機序は必ずしも明らかではないが、一般的に Treg 細胞は、ナイーブ T 細胞が抗原刺激を受けて活性化し、特定の細胞機能を獲得するように分化したエフェクター T 細胞の働きを制御する免疫細胞である。よって Treg 細胞が神経変性疾患の病態制御に関与すると仮定すれば、Th1 細胞や Th17 細胞といった既存のエフェクター Th 細胞による神経細胞障害を想定せざるを得なくなるが、この場合、先に述べた自己免疫応答との関係を説明することが困難になる。したがって、各種神経変性疾患における Treg 細胞の関与を考える限りにおいては、免疫学的に定義され、正常な免疫応答の担い手として働く Th1 細胞や Th17 細胞に囚われることなく、実際の病変部位に集積した Th 細胞の性状解析をより詳細に行い、上記の議論の全てを矛盾なく説明できるような新しい分子機序を探っていく必要があると考えられる。

#### 1-4 長鎖散在反復配列とは

約 31 億塩基対からなるヒトゲノムの中で、タンパク質をコードする配列はわずか 2%にも満たず、機能がわからない、または機能を持たない配列がゲノムの大部分を占めていることは驚きに値する。な

かでもゲノム上を移動する特性を持った塩基配列をトランスポゾン (転移因子、TE) と総称する

が、これは実にゲノム全体の 46%にも及ぶ。TE は、DNA トランスポゾンと RNA トラン

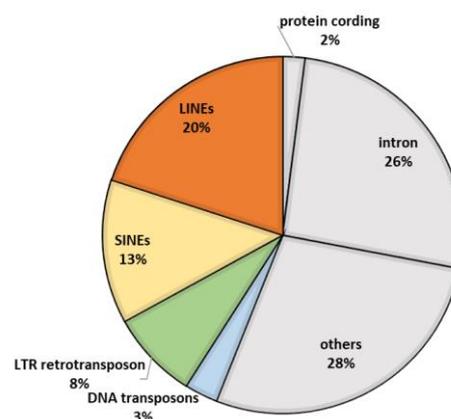


図 1-2 ヒトゲノム中に占めるトランスポゾン

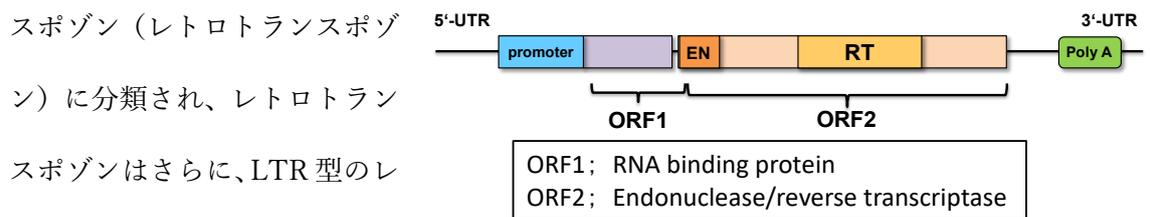


図 1-3 長鎖散在反復配列 (long interspersed nuclear element, LINE)

スポン (レトロトランスポゾン) に分類され、レトロトランスポゾンはさらに、LTR 型のレトロトランスポゾン (内在性レトロウイルス) と、非 LTR 型の長鎖散在反復配列 (long interspersed nuclear element, LINE)、および短鎖散在反復配列 (short interspersed nuclear element, SINE) の 3 種類に分けることができる (Burns and Boeke, 2012)。DNA トランスポゾンが cut-and-paste 様式でゲノム内を移動するのに対して、レトロトランスポゾンは copy-and-paste 様式を用いるため、レトロトランスポゾンが移動する度にゲノムサイズが増加する。非 LTR 型のレトロトランスポゾンは、自律的に転移できる LINE と、それらの仕組みに依存して転移する非自律的な SINE に分けられる。LINE-1(L1) は、非 LTR 型のレトロトランスポゾンの中で自律的に増幅できる唯一の TE であり、約 500,000 コピーの L1 を含むヒトゲノムは、その約 20% を L1 が占めており、単一配列としては最もコピー数が多い (図 1-2)。ただし、それらの L1 遺伝子の大半は部分的な欠損などにより転位能を失っており、転位能をもった L1 はヒトでは 100 個程度、マウスでは 3000 個程度と見積もられている。L1 遺伝子は、プロモーター配列を含む 5'UTR 領域、2 つのタンパク質 (ORF1, ORF2) をコードする領域と poly A 配列を含む 3'UTR から成る (図 1-3)。ORF1 タンパク質は RNA 結合活性を持ち、ORF2 タンパク質はエンドヌクレアーゼと逆転写酵素の活性を有している。転写された L1 mRNA に、細胞質で翻訳された ORF1 と ORF2 が結合してリボヌクレオタンパク質 (RNP) を形成したのちに、再度核に移行する。核内に移行した L1 RNP は、ORF2 のエンドヌクレアーゼ活性によって 5'TTTT/AA3' という特定の配列を切断し、露出した poly-T 鎖を primer として、ORF2 の逆転写酵素活性により、自身のコピー配列をゲノム内に逆転写する (target primed reverse transcription; TPRT)。L1 のゲノム内転位は、ヒト進化の過程で多様性や新

規機能の獲得に重要な役割を担ってきたと考えられるが、個体レベルでは遺伝子変異やゲノムの不安定性を招く危険因子にもなりうる。そのため通常の体細胞では、DNA のメチル化やヒストン修飾などによって発現が強く抑制されている。一方、胚の発生段階でクロマチン構造がダイナミックに変化するときや、細胞の老化あるいはがん化により発現抑制機構が破綻した際、L1 の脱抑制が生じることが知られている。特に老化に伴う L1 の活性化は最近着目されるようになり、様々な疾患との関連性も示唆され始めており (De Cecco et al., 2019)、エピジェネティックな L1 の抑制機序については、様々な報告がある。例えば、L1 5'UTR の CpG 領域は、発生初期に DNA メチル化酵素 DNMT1 によってメチル化され、さらにここに MeCP2 が結合することで L1 遺伝子を不活化する (Deniz et al., 2019)。また、NuRD 複合体のプロモーター領域結合によって、Rb や E2F などヒストン脱アセチル化酵素誘引因子の結合を促し、発現抑制を行う仕組みも存在する。H3K9me3 は L1 のヘテロクロマチン化の維持に重要なヒストンメチル化として知られ、KAP1 はその中心的な役割を担う足場タンパク質である。このように高度に発達した発現抑制機構にもかかわらず、老化に伴って L1 発現が増加すること確認されており、特に脳を含む特定の臓器で特に発現量が高くなる傾向がある (Li et al., 2013)。ショウジョウバエでは、ヘテロクロマチン化の維持に関わる遺伝子の過剰発現により TEs の発現を抑制すると、生存期間が延長することが報告されており、ヘテロクロマチン構造の変化に伴う L1 の発現上昇が、細胞老化に大きく寄与すること、さらに中枢神経組織においてはそのような細胞老化が、神経細胞障害機序の一端を担っていることが予想される。

## 1-5 神経変性疾患における L1 活性化

### 1-5-1 神経変性疾患に付随するイベントとしての L1 発現量の亢進

神経細胞のヘテロクロマチン構造の変化と、それに伴う TE の高発現は、神経変性動物モデル動物や神経変性疾患患者で複数報告されている。興味深いことに TE の高発現は、神経変

性疾患の種類によらず普遍的に認められることが知られている。例えば、AD 患者の死後脳における TEs の発現量亢進や(Grundman et al., 2021)、変異 tau 遺伝子を導入したモデルマウスでは、老化に伴う中枢神経組織内での TEs の高発現が誘導されることが確認されている(Ramirez et al., 2022)。PD モデルマウスでは、ドーパミン作動性の神経細胞特異的に L1 の発現量亢進と、並行して生じる神経障害が報告されている(Blaudin de Thé et al., 2018)。さらに、ALS/FTD の病態への関連性が最も強いとされる TDP-43 は、L1 を始めとする TE 由来の転写産物に直接結合して、その発現制御を担っていることが示され、ALS/FTD の臨床所見の一つである TDP-43 の核外喪失によって生じる L1 の脱抑制と、ALS/FTD の病態形成との関連が注目されている(Liu et al., 2019)。また、ALS/FTD 患者の死後脳のうち約 20%が TEs 高発現の痕跡を示すことから(Tam et al., 2019)、神経変性疾患と TE 脱抑制の間に何らかの因果関係が予測されるが、死後脳解析から得られる情報には限界があり、病態の発症や進行との関連性はいまだ明らかにされていない。神経変性疾患における L1 脱抑制機序は、上に述べたクロマチン構造変化のほかにも、オートファジー機能の異常による RTE RNA の残存や、ミトコンドリア機能異常による TE 活性化の可能性が示唆されており、老化における TE 活性化機構との相違点を含めた、詳細な神経変性疾患の発症機序と TE 脱抑制の関連を明らかにする研究が、新たな発症機序解明の糸口として注目されている。

#### 1-5-2 L1 の発現亢進による神経変性の可能性

前述のとおり、神経変性疾患に伴う TE の脱抑制に関しては、多くの報告がある。しかしながら、TE の発現亢進による神経細胞障害の機序には諸説あり、明確な発症機序の解明には至っていない。TE の高発現が神経細胞障害を引き起こす機序の一つに、レトロ転位によるゲノム不安定化が挙げられる。AD モデルマウスでは、以前から注目されている酸化ストレスによる DNA ダメージに加え、L1 の ORF2 タンパク質が持つエンドヌクレアーゼ活性が、発現上昇に伴って DNA ダメージを引き起こすことが報告されている(El Hajjar et al.,

2019)。TE の高発現による神経細胞障害機序のもう一つの可能性として、標的細胞の遺伝子発現パターンの変化が報告されている。ヒトの発達期には、TE 領域のエピジェネティックな制御がホストゲノムの転写にも影響することが分かっており、成体ではヒストンメチル化を中心としたクロマチン構造の制御によって TE の発現が強く抑制されていることが、正常な転写機構の維持に重要な役割を担っている。一方で、老化や神経変性疾患においては、L1 の活性化を引き起こす L1 遺伝子周囲のエピジェネティック制御の低下により、近傍の遺伝子発現パターンにも影響が及ぶことや、mRNA がホストゲノム内に挿入されることでスプライシング異常やフレームシフトによる転写異常を引き起こすことが知られている (Faulkner et al., 2009)。しかしながら、これらの遺伝子発現パターンの異常が、直接神経細胞障害を引き起こすという明確な証拠はまだ得られておらず、神経変性疾患の発症機序との関連は不明である。さらに、TEs の異常活性化は炎症反応を惹起する特性があり、結果として生じる慢性神経炎症が、神経細胞障害に関与する可能性が示唆されている。神経炎症は、老化や神経変性疾患で共通に認められる特徴的な所見であるが、その根本原因は必ずしも明らかではない。最近の報告によれば、ミトコンドリアストレスによってミトコンドリア由来の mtDNA 断片や RNA が細胞質に流出することにより、cGAS-STING 経路や TLR 経路などの自然免疫系の核酸センサーが活性化し、その結果産生される I 型インターフェロン (IFN-I) による神経炎症反応が報告されている (Sliter et al., 2018; West and Shadel, 2017)。特に二重鎖 RNA や cDNA による cGAS-STING pathway の活性化に依存した炎症反応は、IFN-I を始めとしたさまざまなサイトカインの発現を誘導し、間接的に神経細胞障害を引き起こすと考えられる。L1 の活性化に伴って、細胞質内に L1 由来核酸が大量に蓄積した場合、同様に核酸センサーが活性化されると考えられ、老化細胞の場合には、そのような IFN-I の過剰産生が細胞炎症反応を引き起こし、老化そのものを促進するという報告もある (Kerur et al., 2018)。

## 1-6 免疫依存性神経細胞障害

近年、神経変性疾患における様々な免疫細胞の興味深い動態が報告されるようになり、その病態との関連が注目され始めている(Schwartz and Deczkowska, 2016)。特に獲得免疫系の代表的な免疫細胞である T 細胞のうち CD8 陽性のキラー T 細胞は、ウイルス感染細胞やがん細胞を障害する活性を有しており、神経炎症下で MHC クラス I 分子上に提示された何らかの抗原を認識して、神経細胞を直接障害することが考えられる。例えば  $\alpha$ -Syn に対する T 細胞応答については複数の報告があるが、自己免疫疾患とは明確に異なる神経変性疾患において、この T 細胞応答がどのような意義を持つのか、さらには免疫抑制剤の投与により神経変性疾患の病態が改善するのか、といった根本的な情報が欠けており、神経変性病態への免疫細胞の寄与の程度はいまだ不明である。

さて T 細胞が中心的な役割を果たす自己免疫性の中樞神経疾患として知られる多発性硬化症(MS)は、ミエリン抗原に対する自己免疫応答による髄鞘の破壊が原因となる脱髄疾患であり、この 20 年余りの間に病態解明が著しく進んだことで、近年治療の選択肢が大きく広がっている。典型的な MS は、炎症性の脱髄と再髄鞘化が繰り返され、臨床的には再発と寛解が交互に出現するが、長期に罹患した患者の多くが、神経変性病態を伴う緩徐進行性の二次進行型多発性硬化症(SPMS)に移行することが知られている(Rovaris et al., 2006)。私が所属している NCNP 神経研究所の免疫研究部では、長年にわたる研究から T 細胞特異的 NR4A2 マウスに MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を誘導した際に、遅れて生じる病態(後期 EAE)が SPMS に相当する病態であることを発見していた(Raveney et al., 2013)。さらにこの SPMS のマウス病態モデルを用いた解析から、後期 EAE マウス

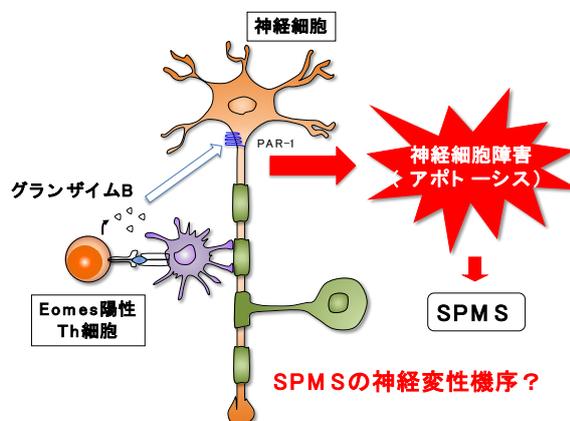


図 1-4 免疫依存性神経細胞障害機序仮説

の中樞神経組織由来の Th 細胞を移入したマウスは明らかな症状を呈することがわかり、中樞神経組織に浸潤した Eomes 陽性ヘルパーT(Th)細胞が、神経変性病態を引き起こす病原性細胞であることを明らかにした(Raveney et al., 2015)。その後、患者サンプルを用いた詳細な解析からも、Eomes 陽性 Th と SPMS の関連については多くのことが明らかとなっている。例えば、SPMS 患者の末梢血 Eomes 陽性 Th 細胞が選択的に増加することが示されており、同細胞の頻度が神経変性病態を反映する SPMS 患者の障害進行度と極めてよく相関することから、Eomes 頻度が SPMS の疾患バイオマーカーとして有用であることが示された。さらに SPMS 患者剖検脳を用いた解析から、中樞神経系の極めて広範な領域に Th 細胞が大量に浸潤しており、そのほとんどが Eomes 陽性でグランザイム B を発現する細胞であることがわかっている(Raveney et al., 2021)。

Eomesodermin (Eomes)は、細胞障害性のキラーT 細胞やナチュラルキラー(NK)細胞に選択的に発現する転写因子であり、Eomes 陽性 Th 細胞も、CD4 陽性のヘルパーT 細胞でありながら、細胞障害性 T 細胞の表現型を獲得している。すなわち細胞障害性プロテアーゼであるグランザイム B を貯蔵し、刺激に伴って脱顆粒を起こすことが確認され、条件を整えばキラーT 細胞や NK 細胞と同様に、標的細胞を直接攻撃する能力を持っていると考えられる。T 細胞の一種である Eomes 陽性 Th 細胞の細胞障害性は、抗原提示細胞が発現する MHC クラス II 上に提示された外来性抗原を認識し、活性化することで発揮されると考えられ、CD 8 陽性 T 細胞が内在性抗原の提示を受けて活性化し、細胞障害性を発揮する機序とは本質的に異なる。興味深いことに、中樞神経組織内において神経細胞死により生じた死細胞の取り込みを担うミクログリアは、神経炎症に伴い活性化して MHC II 分子の発現が増強することが知られており、病態下において Eomes 陽性 Th 細胞の活性化に重要な役割を果たす可能性がある。活性化した Eomes 陽性 Th 細胞が放出したグランザイム B は、拡散することで周囲の神経細胞をまとめて障害し、局所的に起きる神経細胞障害をより広範囲に拡大していくと予想され、一般的な神経変性病態の臨床症状を反映した分子機序

となりうる。

SPMS の神経変性病態は、先行する脱髄性の MS 病態に遅れて発症し、その間には長期にわたる神経炎症の持続がある。そしてこの神経炎症が、CNS 内における Eomes 陽性 Th 細胞の生成に重要な役割を果たすことも明らかとなっている。そこで共に神経炎症を伴い、神経変性病態を呈する典型的な神経変性疾患においても、Eomes 陽性 Th 細胞が関与する可能性が大いにあり、この免疫依存性の神経細胞障害機序を示すことができれば、神経変性疾患に対する画期的な治療法確立に向けた新たな突破口が開けると考えられる。このような背景を受けて、本研究では神経変性疾患に共通する病態機序として、Eomes 陽性 Th 細胞による免疫依存性神経細胞障害に着目し、その分子機序を解明することを目的として研究を行なった(図 1-5)。

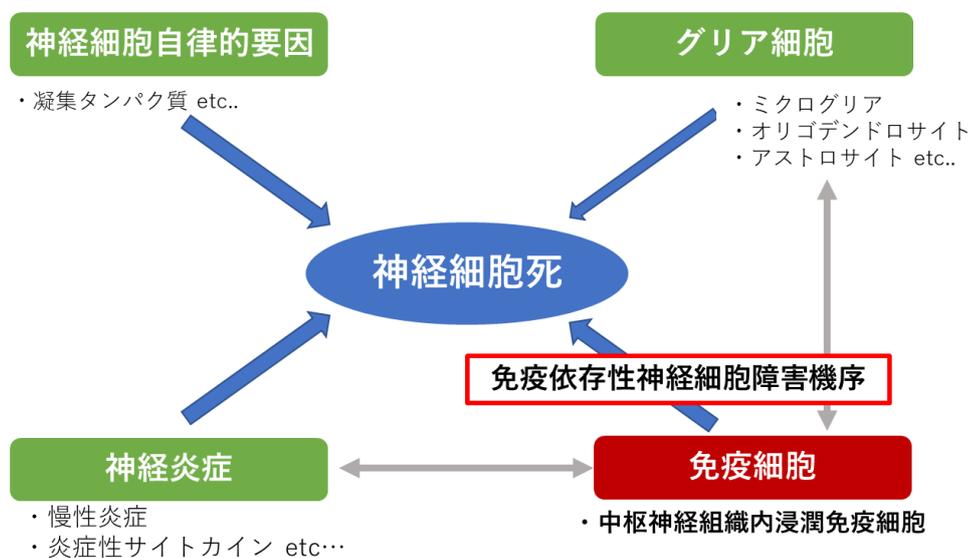


図 1-5 神経変性疾患の発病原因における免疫依存性神経細胞障害機序の位置付け

## 第2章

### EAEにおける免疫依存性神経変性病態の解析

## 2-1. 目的

神経変性は、アルツハイマー型認知症(AD)、パーキンソン病(PD)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などに代表される神経変性疾患に広く共通して認められる病態であるが、神経障害部位やそれに起因して出現する臨床症状は多岐にわたる。進行性の神経変性病態は、神経細胞の萎縮や細胞死を伴って引き起こされるため、結果的に生じる不可逆的な神経変性病態は重篤な症状に直結し、その克服のために神経細胞を対象とした疾患発症メカニズムの解明が精力的に行われてきた。しかしながら、患者の神経変性の経過を直接観察することは極めて困難なことから、ヒト剖検脳、疾患モデル動物、培養細胞による研究が中心となって進められてきており、長期にわたる病変部位の細胞内変化を正確にとらえることはいまだに実現していない。これまでに、神経変性疾患に共通してみられる異常タンパク質の凝集という特徴的な現象を発症機序解明の糸口として、凝集タンパク質の loss of function、あるいは gain of function による発症機序が長年注目されてきた。しかしながら、疾患間で凝集タンパク質の種類がオーバーラップしていることなどが徐々に明らかとなり、タンパク質の凝集自体が発症の二次的な変化である可能性も含めて、単一タンパク質の機能異常の解析という単純なアプローチだけでは、神経変性病態の全容解明には不十分ではないか、という共通認識が徐々に広がりつつある。

よって神経変性疾患の発症機序解明には、自律的な神経細胞死の分子メカニズムのみならず、慢性炎症環境下の中枢神経組織内全体における神経細胞非自律的な変化を捉えることが重要であると考えられる。中枢神経組織では、主に3種類のグリア細胞が神経細胞の間隙を埋めており、通常は、神経細胞の機能や恒常性の維持に関わっている。一方、今までに報告されている神経細胞非自律的な神経細胞障害機序は、中枢神経組織内のグリア細胞による炎症性サイトカインの分泌や、これにともなう非特異的な神経炎症

を指摘したものが主流であり、神経変性疾患の本体である神経細胞障害メカニズムとの関連を説明するには不十分であった。最近になり、アルツハイマー型認知症の病態に関連したミクログリアの変化が報告され、脳内免疫細胞としてのミクログリアの機能が注目されるとともに、ミクログリアによる T 細胞の活性化が神経変性病態に関与する可能性が考えられるようになった(Deczkowska et al., 2018)。炎症反応が持続している組織には、免疫細胞が非特異的に集積するが、神経変性疾患も例外ではなく、神経細胞の周辺に分布するグリア細胞の仲介によって、神経細胞障害性の免疫反応が惹起される可能性は十分に考えられる。

そもそも一般的な神経変性病態は、典型的な神経変性疾患に限局するわけではなく、慢性炎症を伴う多くの中枢神経疾患でも生じ得る。多発性硬化症(MS)は、主に炎症性の自己免疫性脱髄疾患であるが、罹患期間が長期にわたる患者の多くが、神経変性病態を伴う二次進行型多発性硬化症(SPMS)に移行することが知られている(Rovaris et al., 2006)。私が所属している NCNP の研究室では、SPMS に相当する病態マウスモデルを確立し、中枢神経組織に浸潤する Eomes 陽性 Th 細胞が、その病原性細胞であることを発見した(Raveney et al., 2015)。SPMS の神経変性病態との関連については、SPMS 患者の末梢血と中枢神経組織内で選択的に Eomes 陽性 Th 細胞が増加すること、特に末梢血中の Eomes 陽性 Th 細胞頻度は、神経変性病態を反映する障害進行度と極めてよく相関する。さらに SPMS 患者の剖検脳の解析から、脳内の広域に Eomes 陽性 Th 細胞が高頻度に分布し、そのほとんどが細胞障害性因子グランザイム B を保有する細胞であることを明らかにしている(Raveney et al., 2021)。Eomes 陽性 Th 細胞は、刺激に伴って脱顆粒を起こすことが確認され、グランザイム B による直接的な神経細胞障害の関与が強く示唆されている。

## 2-2 結果

### 2-2-1 ミクログリアの MHC class II 発現亢進と IFN-I signature

第一章にまとめた通り、免疫依存性神経細胞障害機序においては、Eomes 陽性 Th 細胞の活性化に伴って放出されるグランザイム B が、直接的な神経細胞死を引き起こすという分子機序を想定している。一般的に、樹状細胞(Dendritic Cells, DCs)などの抗原提示細胞(Antigen-presenting cells, APCs)が細胞表面に発現した抗原提示分子(Major histocompatibility complex, MHC) の上に、10~25 アミノ酸程度の長さのペプチドが提示され、T 細胞受容体(T cell receptor, TCR)との特異的な相互作用の結果として T 細胞は活性化する(抗原特異的活性化)。そして、CD4 陽性の Th 細胞の活性化には、MHC クラス II 分子上に提示された抗原が必要である。中枢神経系内で MHC クラス II 分子を発現する常在性 APCs としては、ミクログリアが知られている。神経変性疾患とミクログリアの関連は以前から指摘されていたが、様々な活性化状態をとるミクログリアの不均一性から、詳細な解析はされていなかった。シングルセル RNA-Seq 解析が普及した最近になって、網羅的なミクログリアの機能解析が可能となり、神経変性疾患患者の中枢神経組織には、disease-associated microglia(DAM)と呼ばれる活性化ミクログリアが存在することが明らかとなった(Deczkowska et al., 2018)。特にアルツハイマー型認知症(AD)モデルマウス由来の DAM が示す特徴的な表現型として、MHC クラス II 分子の選択的な発現亢進と、炎症性サイトカインの一つである I 型インターフェロン(type I interferon, IFN-I)の応答遺伝子(IFN signature)の発現亢進が知られている。これらの変化はいずれも脳内の免疫応答に影響を及ぼすことが予想されるため、病態下に MHC クラス II 分子の発現が亢進したミクログリアが、中枢神経系に集積した Eomes 陽性 Th 細胞を含む Th 細胞の活性化に関わるかどうかを調べることにした。

EAE マウスの中枢神経組織内の炎症反応と免疫細胞活性化機序解明の足掛かりとして、

未処理マウス、EAE 誘導後 10-12 日目(初期 EAE)および 26-28 日目(後期 EAE)のマウス中枢神経組織から、CX3CR1 発現を指標としてミクログリアを単離し、GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。未処理ミクログリア(IM)、early phase ミクログリア(EM)、late phase ミクログリア(LM)の各サンプル間の遺伝子発現量を比較した結果、EM では MHC クラス II 遺伝子をコードする *H2-Eb1* と、少数の IFN signature 遺伝子の発現上昇が認められた (図 2-1A) のに対し、LM では変動遺伝子数の増加とともに、各遺伝子の発現量が著しく亢進していた (図 2-1B)。一方、定常状態のミクログリアが主に発現する中核遺伝子である *P2ry12*、*Fcrls* などは、LM で顕著に減少していることが明らかとなり、EAE 誘導により中枢神経系内の多くのミクログリアが活性化状態にあることも確かめられた。この結果から、SPMS モデルマウスの中枢神経組織内においても、病態の進行に伴って神経炎症反応性の DAM が出現することが分かった。

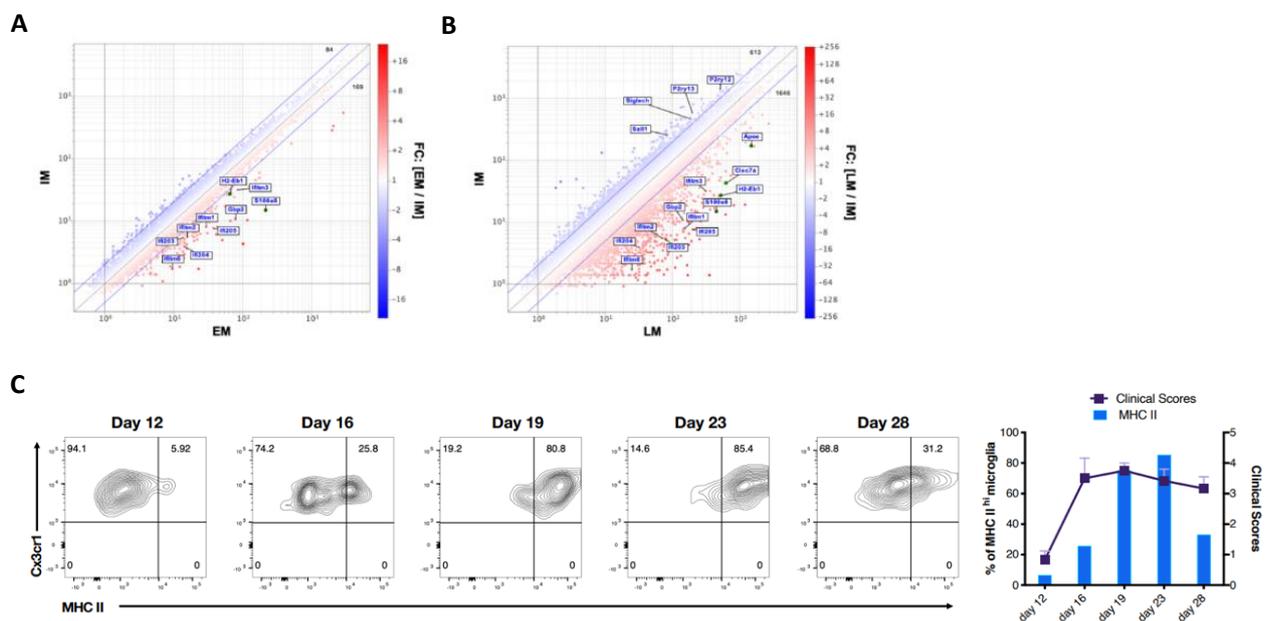


図 2-1 EAE マウス由来ミクログリアの遺伝子発現解析と MHC クラス II 発現

(A)コントロールマウス(IM)と初期 EAE マウス(EM)、または(B)コントロールマウスと後期 EAE マウス(LM)のミクログリアの遺伝子発現パターン比較解析結果。2 倍以上の発現が変動した遺伝子を表示した。(C)EAE マウスミクログリアの MHC クラス II 発現量の経時変化(左)と Clinical score との比較(右)。

本実験に用いた C57BL/6 マウスは、MHC II 領域の一部のゲノム領域の欠失により、I-E 分子の  $\alpha$  鎖を欠くため、H2-Eb1 遺伝子のみでは機能的な I-E 分子は発現しない。そこで C57BL/6 マウスが持つ機能性の MHC II 分子である I-A 分子の DAM における発現を、フローサイトメーターを用いて解析した。その結果、EAE の late phase に向かうにつれて、I-A 分子の発現が顕著に上昇することが分かった (図 2-1C)。以上の結果から、EAE 後期中枢神経組織内には、神経炎症応答と抗原提示能を併せ持ち、免疫応答賦活化の表現型を持つミクログリアが分布していることが示唆された。

### 2-2-3 CNS 浸潤 Th 細胞のプロトタイプ抗原としての ORF1

前項で、EAE マウス中枢神経組織内のミクログリアが、AD マウスの DAM と同様に、神経炎症反応の IFN signature を示すこと、および MHC クラス II が発現亢進していることを示した。そこでこの活性化ミクログリアが提示し、Eomes 陽性 Th 細胞を活性化する内在性抗原を探索することにした。まず EAE マウスの中枢神経組織内に、病態関連 Th 細胞を活性化する抗原が発現するかどうかを調べるために、中枢神経由来抗原の提示を受けた Th 細胞の反応を測定した。すなわち、EAE マウス由来の神経細胞とミクログリアそれぞれから mRNA を抽出し、in vitro translation (IVT) システムを用いて混合翻訳産物を発現させた後、別にマウス骨髄から分離培養した骨髄由来樹状細胞 (BMDCs) に添加し、取り込んだ抗原タンパク質を抗原提示させた。さらに EAE マウスの中枢神経組織から単離した Th 細胞を  $Ca^{2+}$  indicator で標識し、その後上記の BMDCs と共培養して、TCR シグナル依存性の T 細胞応答の一つである  $Ca^{2+}$  influx を、フローサイトメーターを用いて測定した。その結果、神経細胞、ミクログリアのいずれに由来する翻訳産物を添加した場合でも、Th 細胞の  $Ca^{2+}$  influx が顕著に亢進することが分かった (図 2-2A)。さらに、この反応は、共培養系への抗 MHC II 抗体の添加により減弱することから、MHC II 依存性の応であることが示された (図 2-2B)。これらの結果か

ら、EAE マウスの中枢神経組織由来の Th 細胞は、(恐らくミクログリアの) MHC II 上に提示された未知の中枢神経組織由来抗原を認識して活性化することが明らかとなった。

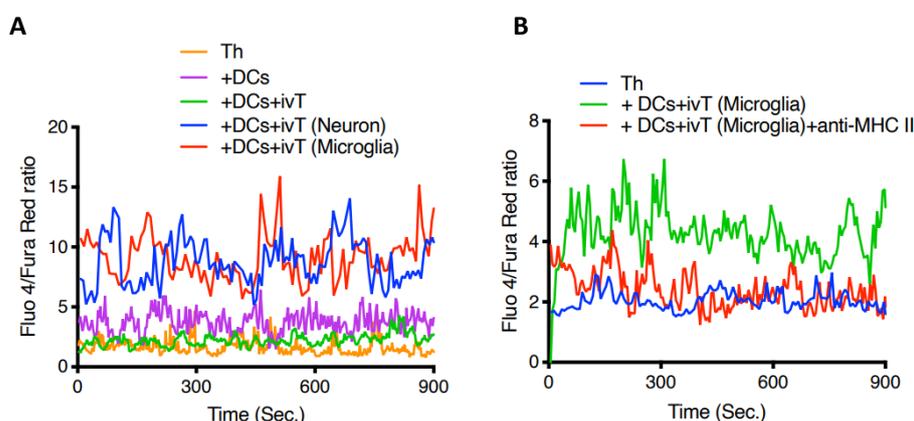


図 2-2 CNS 内発現タンパク質による後期 EAE マウス由来 Th 細胞の活性化

(A) 後期 EAE マウス CNS から単離した神経細胞またはミクログリア由来 mRNA を鋳型として、*in vitro* 翻訳したタンパク質を抗原提示した BMDCs による、CNS 由来 Th 細胞の  $Ca^{2+}$  influx。

(B) ミクログリア由来の *in vitro* 翻訳産物を抗原提示した BMDCs を、抗 MHC クラス II 抗体存在下または非存在下で CNS 由来 Th 細胞と共培養した時の  $Ca^{2+}$  influx。

そこで次に、Th 細胞の活性化抗原となりうる中枢神経組織由来の候補分子を絞り込むために、以下の考察を行なった。すなわち、別の検討から Eomes 陽性 Th 細胞は、EAE 誘導に用いる MOG<sub>35-55</sub> ペプチドには反応しないことが示されており、この実験系に他の外来抗原の混入はない。一方、生理的条件下の生体内タンパク質に対しては、いわゆる免疫寛容が成立し、通常 T 細胞応答は生じないと予想される。よって候補分子は、生理的条件下では発現せず、病態に伴う慢性炎症環境下で異所性に発現する遺伝子産物の可能性が高いと考えられた。そこで私は、通常生体内では発現が強く抑制され、慢性炎症環境下で異所性に発現が増加することが知られているレトロトランスポゾンに着目した。なかでも LINE-1(長鎖散在反復配列、long interspersed nuclear element 1, L1)遺伝子は、ORF1 と ORF2 の 2 種類のタンパク質をコードしており、抗原の供与が可能である (図 1-3)。さらに進化の過程で単一あるいはごく少数の遺伝子から増幅し、

高い相同性を持つ遺伝子群が、1ゲノム内に約50万コピーも存在することから、介入によるマクロな病態への影響が比較的容易に観察可能と判断し、以下の解析を行なった。

L1ゲノムの5'側に位置し、より効率的な発現が予想されるORF1タンパク質をプロトタイプとして、EAEマウス中枢神経組織由来のTh細胞の反応を解析した。すなわちORF1遺伝子を含むプラスミドを材料とし、*in vitro* 転写/*in vitro* 翻訳を1チューブ内で行うことで、ORF1タンパク質を取得した。先ほどと同様に、培養したBMDCsに添加した後、EAEマウス中枢神経組織から単離したTh細胞と共培養した。その結果、ORF1の存在下では、Th細胞のCa<sup>2+</sup>influxのoscillation反応が認められ、Th細胞が顕著に活性化していることが分かった。さらにこの反応は、抗MHC II抗体の添加により減弱したことから、EAEマウス由来のTh細胞が、MHC II上に提示されたORF1を抗原として認識し、活性化することが分かった(図2-3)。以上の結果から、慢性炎症環境下で異所性に発現する遺伝子産物の一つであるL1由来のORF1タンパク質が、Eomes陽性Th細胞を含むEAEマウス中枢神経系由来のTh細胞を活性化するプロトタイプ抗原であることが明らかとなった。

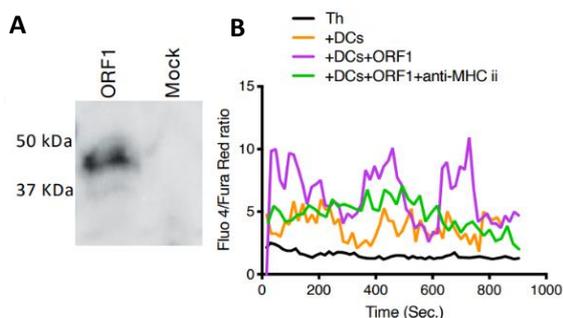


図2-3 *in vitro* translated ORF1タンパク質による後期EAEマウス由来Th細胞の活性化

(A) *in vitro* translation systemにより産生したORF1タンパク質のwestern blottingによる確認.

(ORF1: plasmidあり Mock: plasmidなし)

(B) *in vitro* translated ORF1タンパク質を取り込んだBMDCsによる、後期EAE由来Th細胞のCa<sup>2+</sup> influx解析結果。

## 2-2-4 EAE マウス脊髄神経細胞における L1 活性化

前項の解析で、Eomes 陽性 Th 細胞が ORF1 タンパク質に反応性であることが示されたため、次に EAE マウスの脊髄神経細胞における、発症前後の L1 発現量変化を q-PCR 法により解析した (図 2-4A)。転写された L1 mRNA は、細胞質と核の間を相互に移行する特性を持つことから、単離後の神経細胞をさらに核画分と細胞質画分に分けて RNA を抽出、定量した。その結果、EAE 誘導後 14 日目から、核・細胞質の両方において L1 mRNA 量が増加し、EAE 誘導後 21 日目でピークを迎えて、その後速やかに減少することが分かった (図 2-4B)。さらに ORF1 タンパク質の発現増加を確かめるために、免疫染色法を用いて脊髄神経細胞内の ORF1 発現を観察した。その結果、EAE 誘導後 21 日目の脊髄神経細胞内において、ORF1 タンパク質の顕著な発現上昇が認められた (図 2-4C 上)。複数サンプルを用いて定量した結果、21 日目の脊髄神経組織において ORF1 タンパク質を発現する神経細胞の割合が有意に増加していることが分かった (図 2-4C 下)。興味深いことに、神経細胞が分布する灰白質のみならず、

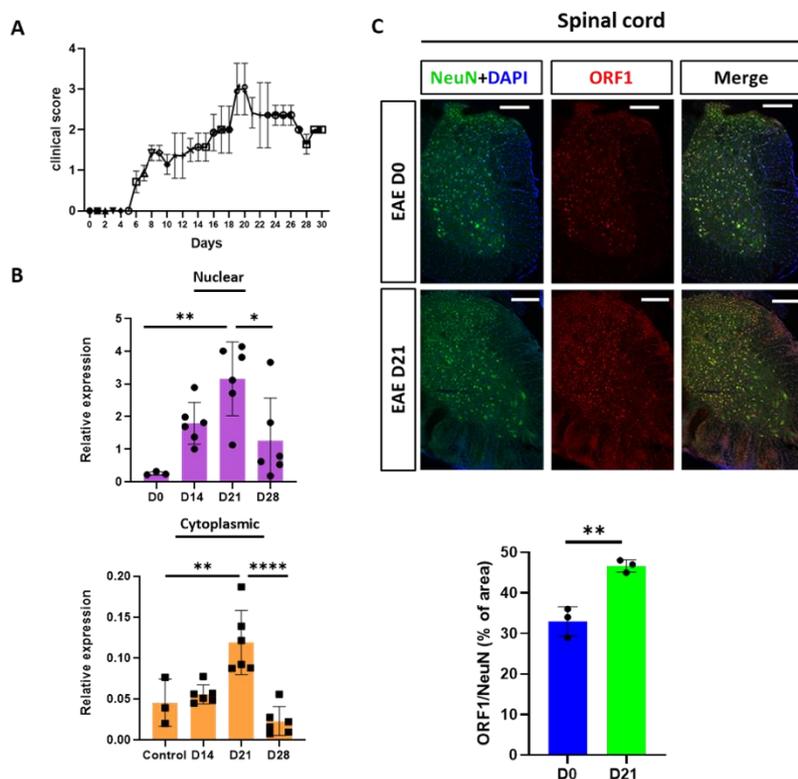


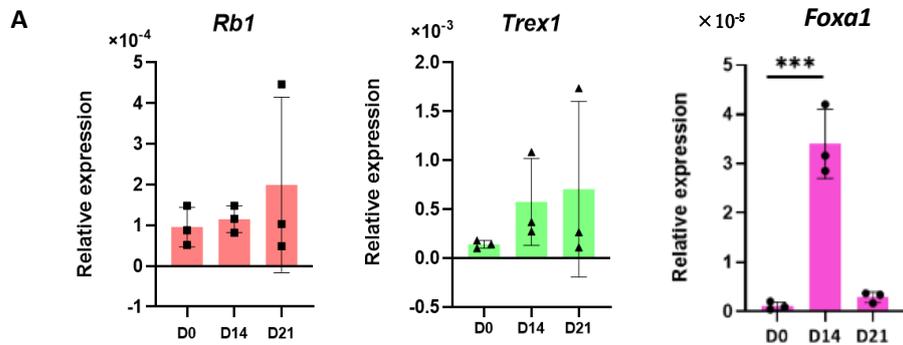
図 2-4 EAE マウス脊髄神経組織内の L1 発現量解析  
 (A) C57BL/6 マウスの EAE スコア。  
 (B) RT q-PCR 法を用いた EAE マウス脊髄神経組織由来の神経細胞の、核および細胞質における L1 の発現量変化。  
 (C) EAE 誘導後 0 日、21 日の脊髄における ORF1 タンパク質発現の免疫染色法を用いた比較解析。抗 NeuN 抗体(緑)、抗 ORF1 抗体(赤)、DAPI(青)による染色データを示す。スケールバーは 200  $\mu$ m (上段)。NeuN 陽性細胞中の ORF1 発現細胞の定量比較結果。

白質領域にも ORF1 を強く発現する細胞が多数検出され、EAE 誘導後に ORF1 タンパク質の発現が増加するグリア細胞が存在することが示された。

#### 2-2-5 EAE マウス脊髄神経細胞における L1 脱抑制の分子機序の解析

前述の通り L1 の発現は通常高度に抑制されているが、例えば細胞老化に伴う細胞内環境の変化や、外因性の誘導物質への曝露など、特定の条件下においては発現が増加することが知られている。そこでまず、細胞の老化によって引き起こされる L1 発現に関わる因子として報告されている Rb1、Trex1、Foxa1 について、EAE マウス由来神経細胞内での発現量変化を q-PCR 法により解析した。その結果、Rb1、Trex1 の発現は、経時的な増加傾向を示したものの有意な変化は見られなかった (図 2-5A)。

一方、パイオニア転写因子として知られる Foxa1 の発現が、EAE 誘導後 14 日目の神経細胞内で一過性に増強することが分かった(図 2-5A)。さらに、免疫染色法で脊髄組織内の Foxa1 タンパク質の発現量を確認したところ、脊髄前角に分布する神経細胞内で、特に強く Foxa1 が発現亢進していることが明らかとなった(図 2-5B)。次に L1 の発現制御における Foxa1 の直接の関与を示すために、EAE 誘導後 14 日目の脊髄から単離した神経細胞を、Foxa1 特異的 siRNA あるいはスクランブル RNA で処理した後に *in vitro* で培養したところ、培養 24 時間後に Foxa1 発現が有意に減少し、48 時間後には L1 発現が有意に減少することが明らかとなった(図 2-6A)。同様に、ウェスタンブロッティング法と免疫染色法を用いて Foxa1 タンパク質の発現量を比較したところ、siRNA 処理によって、神経細胞の FOXA1 発現が、タンパク質レベルでも減少していることが明らかとなった(図 2-6B,C)。



**B**

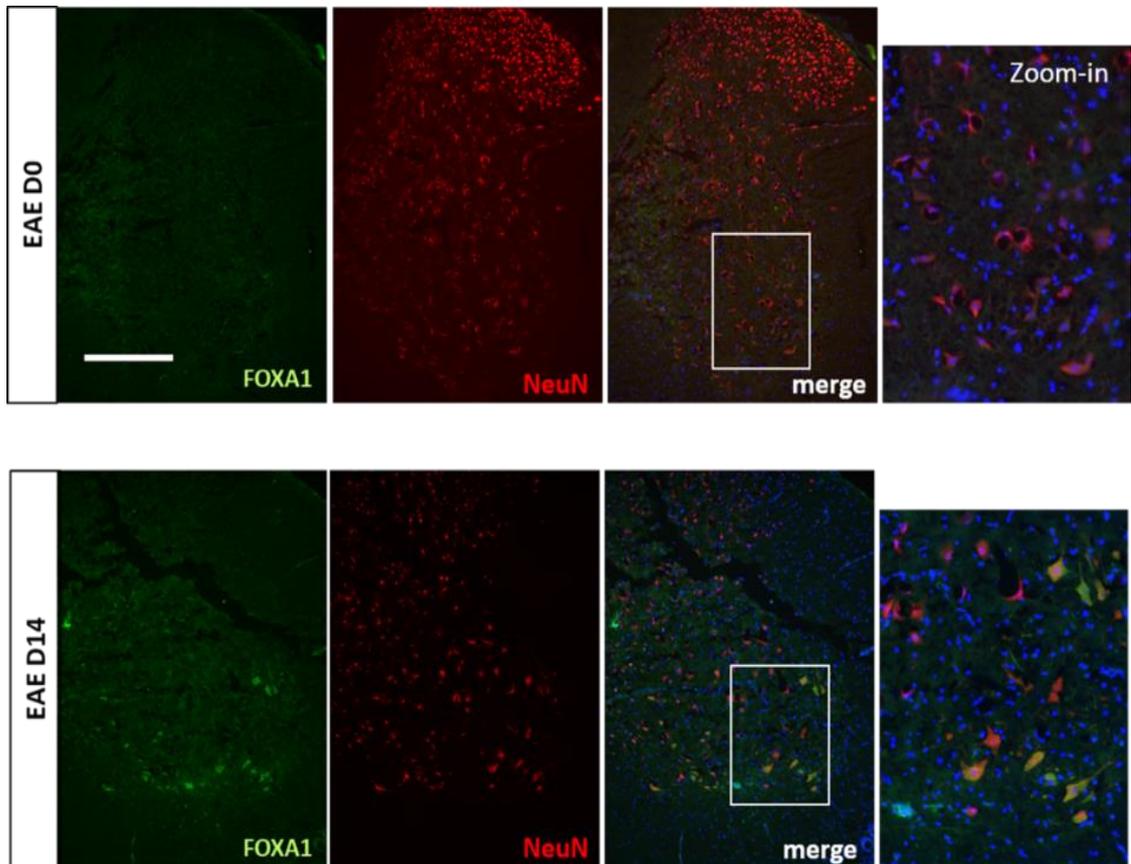


図 2-5 EAE マウス脊髄神経細胞における L1 発現制御遺伝子の発現解析

(A) RT q-PCR 法を用いた Rb1(左)、Trex1(中央)、Foxa1(右)の発現定量結果。EAE 誘導後 0、14、21 日目に分離した脊髄神経細胞を用いた結果を示す。n=3 \*\*\*P<0.001

(B) EAE 誘導後 0 日と 21 日の脊髄神経組織の免疫染色による Foxa1 タンパク質の発現パターン。抗 Foxa1 抗体(緑)、抗 NeuN 抗体(赤)、DAPI(青)による染色データを示す。スケールバーは 200  $\mu$ m。

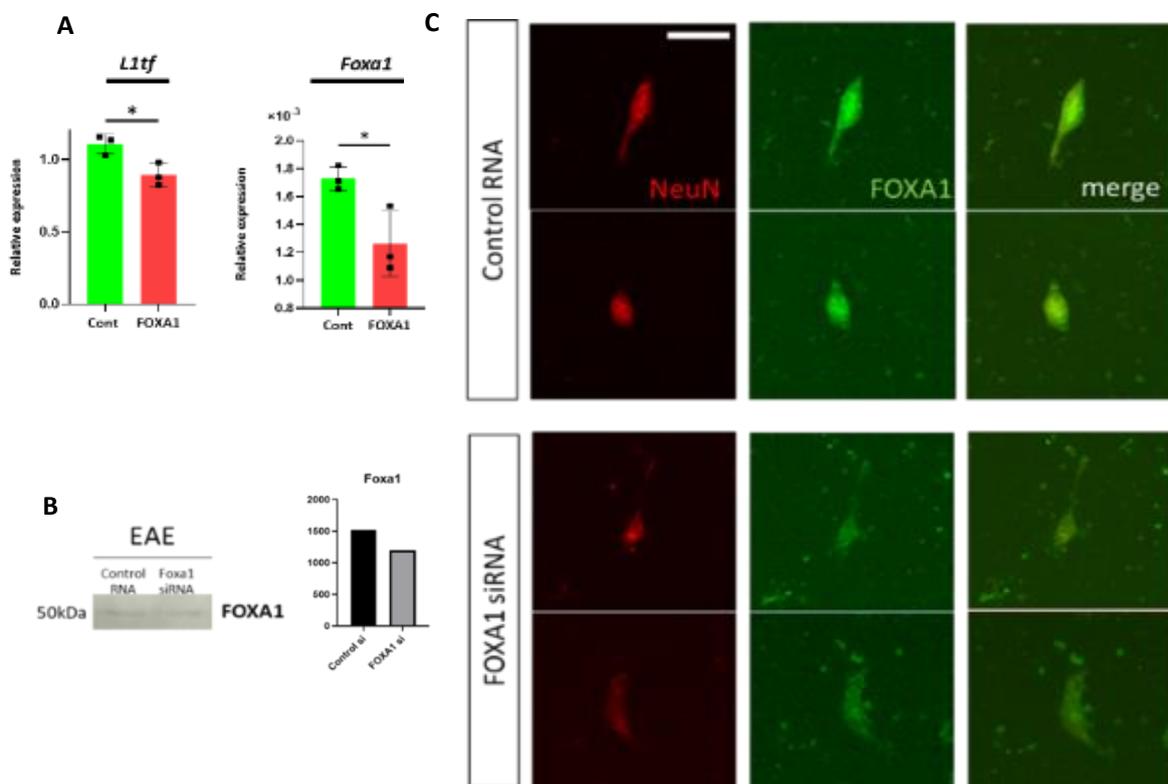


図 2-6 Foxa1 特異的 siRNA 処理による L1 の発現抑制

(A) EAE 誘導後 14 日目の成体マウス脊髄神経細胞を単離後、Foxa1 の siRNA 処理を施し、RT q-PCR 法により L1(左),Foxa1 (右)の発現量変化を解析した。n=3 \*P<0.05

(B)ウェスタンブロッティング法を用いた Foxa1 タンパク質の発現量変化。イメージ画像(上)と、ImageJ ソフトウェアを用いた定量解析結果(下)。

(C)免疫染色法による Foxa1 タンパク質の発現量変化の解析。抗 Foxa1 抗体(緑)、抗 NeuN 抗体(赤)による染色データを示す。スケールバーは 20  $\mu$ m。

これら結果から、EAE の脊髄神経細胞内では、誘導後比較的早期の 14 日目に一過性に発現増強した Foxa1 により、L1 遺伝子を多く含むゲノムのヘテロクロマチン領域が弛緩することにより、L1 遺伝子の発現促進のための環境が形成される可能性が示唆された。

さて、パイオニア転写因子である Foxa1 は、L1 遺伝子の発現促進のための環境づくりに関わるが、L1 発現を直接的に誘導することはない。そこで次に、能動的な L1 発現に関わる責任因子の探索を進めた。芳香族炭化水素に含まれる外来有毒物質の中に、L1 の発現亢進を誘導する物質が存在することが知られている (Okudaira et al., 2010)。一方、AhR の内在性リガンドとして知られるキヌレニン<sup>1</sup>は、インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ (Ido) あるいはトリプトファン-2,3-ジオキシゲナーゼ (Tdo) によるトリプトファンの代謝産物であり、EAE マウスの中枢神経組織で発現亢進することが報告されている (Kwidzinski and Bechmann, 2007; Vecsei et al., 2013)。そこで次に、芳香族炭化水素の受容体であり、外因性の有毒物質の解毒酵素の誘導に関わる芳香族炭化水素受容体 AhR を介した L1 発現に着目し、EAE マウス脊髄神経細胞内における Ido の発現変化と、それに伴って起こる AhR 経路の活性化による L1 発現制御機構の関連性を調べた。q-PCR 法を用いて、EAE マウスの脊髄神経細胞の Ido 遺伝子の発現量変化を解析したところ、EAE 誘導後の 14 日目と 21 日目で有意な増加を示した (図 2-7A 左)。確認のため、AhR 経路の下流にあり、毒性化合物の解毒に関わる Cyp1a2 の発現量を定量したところ、同様に 14 日目で有意に増加しており、AhR 経路が活性化していることが確認された (図 2-7A 右)。更に競合 ELISA 法により、脊髄組織内のキヌレニン量を定量したところ、EAE 誘導後にキヌレニン量は経時的に増加し、28 日目で有意な増加を示すことが分かった (図 2-7B)。

次に、増加したキヌレニンが、AhR の活性化を介して L1 発現を誘導するかどうかを示すために、EAE 誘導後 7 日目から 11 日目まで、マウスに Ido の競合アンタゴニストで

ある 1-メチルトリプトファン (1-MT) を腹腔内投与した。単離した脊髄神経細胞の L1 発現を定量したところ、1-MT 投与群において有意な L1 発現量の減少が認められた。

(図 2-8) これらの結果から、EAE マウスの脊髄神経細胞内では、キヌレニン産生により AhR 経路が活性化され、その結果 L1 の発現量が増加することが示された。

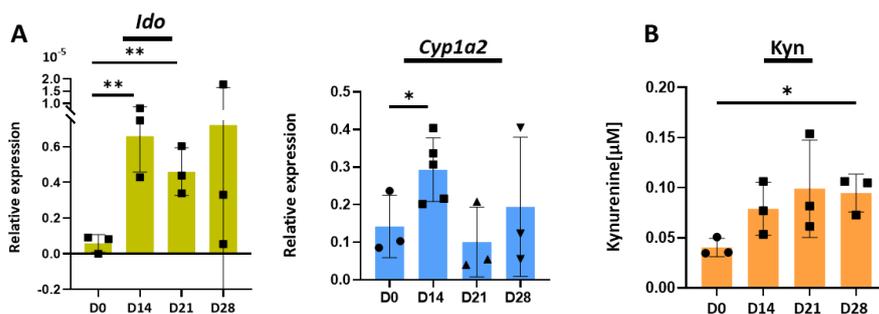


図 2-7 EAE マウス脊髄神経細胞における AhR 経路の活性化

(A) RT q-PCR 法を用いた、EAE マウス脊髄神経組織内神経細胞の *Ido* (左), *Cyp1a2* (右) の発現定量解析結果。EAE 誘導後 0 日、14、21、28 日における結果を示す。n=3 \*P<0.05, \*\*P<0.01

(B) 競合 ELISA 法を用いた EAE マウス脊髄神経細胞におけるキヌレニン(Kyn)発現定量解析結果。n=3 \*P<0.05

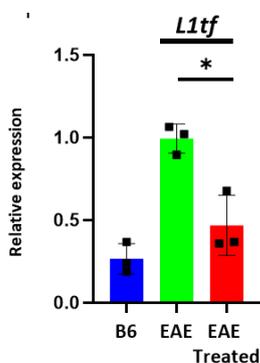


図 2-8 1-MT 腹腔内投与による EAE マウス脊髄神経細胞の L1 発現抑制

未処理 C57BL/6 マウス、EAE マウス、および EAE 誘導後 1-MT 投与を行ったマウスの 3 群の脊髄神経細胞より抽出した mRNA を用いて、RTq-PCR 法により L1 発現量を定量した。未処理 C57BL/6 マウス(左)、EAE マウス(中央)、1-MT 投与 EAE マウス(右)。n=3, \*P<0.05

#### 2-2-4 反作用としての premature polyadenylation による L1 活性化の制御

EAE マウスの神経変性病態形成に関わる Eomes 陽性 Th 細胞の、活性化に関わる異所性発現遺伝子として注目した L1 遺伝子が、実際に EAE マウスの脊髄神経細胞内で活性化し、プロトタイプ抗原である ORF1 の発現が亢進していることを確認した。通常 L1 活性化は、レトロ転位などを介してゲノムの不安定化を引き起こすが、哺乳類への進化より前からゲノム中に存在する L1 に対して、対策を講じる十分な時間があり、過剰な L1 活性化を抑制するために、私たちヒトの細胞は高度な対抗手段を備えている。よって、これまでに確認した L1 活性化が、レトロ転位の誘導が可能な L1 ゲノムの全領域に及んでいるとは限らない(図 2-9A 右上)。そこで、EAE で誘導される急激な L1 活性化が、どのような L1 転写産物の産生を伴うのかについて調べることにした。このためにここでは、L1 のプロモーター領域の 5' primer と oligo dT primer を用いて、生成される全 L1 転写産物の検出を試みた。その結果、軽度に発現した 2 本のより長いバンドと、高発現した 3 本のより短いバンドからなる計 5 本の主要な PCR 産物が検出された。このうち高発現した 3 本の PCR 産物についてシーケンス解析を行なったところ、これらはいずれも L1 由来の転写産物であることが確かめられた(図 2-9A 右下)。さらにそのうち最もサイズが大きい産物は、ORF1 領域をすべて含んだ転写産物であることが確認された(図 2-9A 左)。興味深いことに、これらの産物は 3' 末端に poly A 配列を有していたことから、L1 抑制機構の一つで L1 遺伝子内部に多数存在する cryptic な polyadenylation シグナルを使って短縮型の転写産物を誘導し、レトロ転位を阻害する premature polyadenylation により選択的に生成した転写産物と考えられた(Perepelitsa-Belancio and Deininger, 2003)。さらに高発現した PCR 産物のうち最長の産物は、ORF1 の読み枠を全て含んでおり、poly A 配列を有するこれらの産物は、細胞の翻訳機構により実際に ORF1 タンパク質発現に関わるものと考えられた。以上の結果から、EAE マ

ウスの脊髄神経細胞内で急激かつ一過性に活性化した L1 は、結果的に ORF1 領域の一部または全部を含む、短い翻訳産物を発現することが示された。premature polyadenylation による L1 活性化の抑制は、全長転写産物の顕著な抑制によるレトロ転位の阻害には有効と考えられるが、この状況下でも Eomes 陽性 Th 細胞の活性化に関わる ORF1 タンパク質の発現が十分に生じ得ることが示された。実際、5 本の PCR 産物のうちには約 6kbp の転写産物は、L1 遺伝子全長に相当するサイズを有することから、わずかとはいえ全長の L1 転写産物も生成している可能性が示された。そこで、L1 のゲノム内転位を GFP の発現として視覚的に追跡することができる L1-GFP レポーターマウスに EAE を誘導し、脊髄神経細胞における GFP 陽性細胞の検出を試みたところ、脊髄前角領域を中心として L1 レトロ転位を生じたと思われる神経細胞が分布していることが分かった(図 2-9B)。

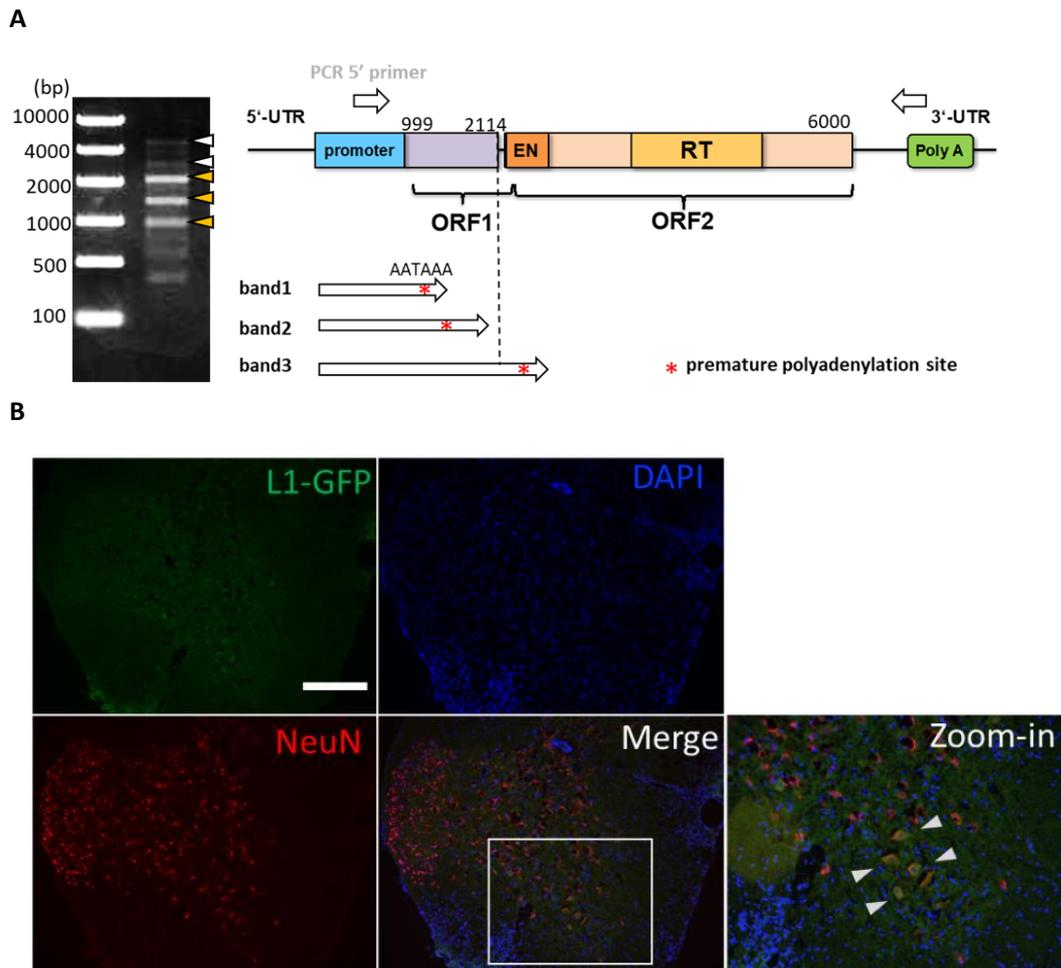


図 2-9 後期 EAE マウス脊髄神経組織内における L1 転写産物の発現解析と L1 レトロ転位

(A) L1 のプロモーター領域と相補的な 5'側の primer と oligo dT primer (白抜き矢印) を用いて行なった RT-PCR によって生成された PCR 産物 (左)。L1 遺伝子の構造 (右)。3 本の高発現バンド (黄矢印) と他のより長いバンド (白矢印) が検出された。右下では、3 本の高発現バンド (band1/band2/band3) のシーケンス解析結果から予想される転写産物の長さ、末端に検出された polyadenylation site を示している。

(B) EAE 誘導後 28 日の脊髄神経組織の免疫染色法による L1-GFP 発現パターンの解析。L1-GFP (緑)、抗 NeuN 抗体 (赤)、DAPI (青)、merge, zoom-in イメージを示した。スケールバーは 200  $\mu$ m を示す。

## 2-3 考察

本章では、神経変性病態を伴う SPMS モデルマウス(後期 EAE マウス)の中枢神経組織内において、免疫依存性の神経変性が生じるための必要条件として、慢性炎症下でのミクログリアの抗原提示能の獲得と、プロトタイプ抗原 ORF1 の供給源である L1 遺伝子の神経細胞における異所性発現亢進、およびその分子機序を明らかにした。

神経変性疾患に関わる病態関連ミクログリアは、AD 患者脳のスィングルセル RNA-Seq 解析によってその存在が報告され(Keren-Shaul et al., 2017)、脳内における免疫細胞と神経変性病態の関連性がより広く認識され始める様になった。さらに AD モデルマウスの海馬由来ミクログリアのスィングルセル RNA-Seq 解析から、MHC II の発現が亢進したミクログリアと、強い IFN signature を示すミクログリアが、病態に密接に関連したミクログリアサブセットとして報告された(Mathys et al., 2017)。炎症性サイトカインである IFN signature の亢進はそれまでも報告がある一方で、その意義は必ずしも明確ではない。またミクログリアの MHC II の発現と神経変性病態との関連についても、明確な議論はされておらず、少なくとも初期の EAE 病態にはミクログリアの MHC II 分子の関与は少ないことが示されている(Wolf et al., 2018)。本研究で示した免疫依存性神経変性機序は、MHC II 上への抗原提示を介して活性化される細胞障害性 Th 細胞の神経細胞障害を明確に示したことで、病態関連ミクログリアの MHC II 発現が、免疫依存性神経細胞障害に密接に関わる可能性を強く示唆する結果が得られた。

さて一般的に、MHC II 分子上に提示され、Th 細胞の活性化を引き起こすペプチド分子は、エンドサイトーシスにより抗原提示細胞内に取り込まれ、エンドソームを經由して MHC II 分子と会合する外因性の分子とされる。一方、Eomes 陽性 Th 細胞は、EAE の誘導に用いた MOG<sub>35-55</sub> ペプチドは認識しないことが、先行研究からわかっており、何らかの内因性ペプチドによって活性化されることが予想されるが、平時の生体内に発現するタンパ

ク質のほとんどに対しては、いわゆる免疫寛容が成立しており、Th 細胞がこれを認識して活性化することはありそうにないと思われた。この一見矛盾する現象を説明するために私は、神経変性病態の誘導に関わる Eomes 陽性 Th 細胞の活性化抗原は、内因性のタンパク質でありながら、病態に伴う慢性炎症環境下でのみ異所性に発現することで免疫寛容を回避し、通常のエンドサイトーシスを介して MHC II 上に提示される、と予想した。

先行する髄鞘の障害とそれに伴う炎症性サイトカインの持続的な分泌は、中枢神経組織内の慢性炎症環境の形成を促進する。慢性炎症に伴ってダイナミックなエピジェネティック変化が生じ、DNA メチル化やヒストンメチル化・アセチル化による転写制御や、microRNAs による mRNA の分解および翻訳の抑制などの転写後抑制機序による遺伝子発現変化が、神経変性疾患と密接に関わることは広く知られている (van den Elsen et al., 2014)。さらにメチル化 DNA に結合してこれを安定化する MeCP2 の遺伝子変異は、精神遅滞を伴うレット症候群という神経発達障害を引き起こす一方で (Rett syndrome: a surprising result of mutation in MECP2)、MeCP2 欠損マウスの神経細胞では、L1 レトロ転位が著しく増加することが知られている (Muotri et al., 2010)。したがって、DNA の脱メチル化に伴う L1 活性化と、L1 由来のタンパク質の発現上昇は、慢性炎症環境に関連した異所性抗原の産生につながる可能性がある。実際、がん細胞内で異所性に発現した L1 由来タンパク質が、がん細胞上の MHC I に抗原提示され、CD8<sup>+</sup>T 細胞が認識するがん抗原として働くことが報告されている (Ponomaryova et al., 2020)。以上の結果から、提示された L1 抗原を含む CNS 内の異所性発現抗原によって Eomes 陽性 Th 細胞が活性化し、グランザイム B 介した神経細胞障害を引き起こしている可能性が高いと判断し、抗原刺激の最も初期段階の反応として、T 細胞受容体刺激による T 細胞の Ca<sup>2+</sup> influx を測定したところ、確かに L1 抗原の提示を受けた CNS 浸潤 Th 細胞が活性化されることが確認された。

そこで次に、EAE の発症に伴ってマウスの脊髄神経細胞で L1 活性化の状態を調べたところ、病態ピークの EAE 誘導 21 日目に L1 の転写産物および翻訳産物 (ORF1) の有意な

上昇を認め、これがパイオニア転写因子 Foxa1 発現と、キヌレニン依存性の AhR 経路の活性化によることが明らかとなった。Foxa1 はヌクレオソーム構造を形成したゲノム DNA のうち、高度にメチル化された DNA 領域（ヘテロクロマチン）に高い親和性を持ち、クロマチンの高次構造を局所的に変化させる (Glont et al., 2019) ことから、パイオニア転写因子の一種として知られている。老化細胞における L1 の発現上昇にも Foxa1 が関与しており、ChIP-seq データの解析から、L1 遺伝子の 5' UTR に確かに Foxa1 の機能的な結合サイトが存在することも報告されている。一方で、AhR 経路は、ダイオキシンやベンゾピレンなどを含む発がん性の芳香族炭化水素類の解毒経路として知られるが、上記の発がん性物質や紫外線照射を受けたトリプトファンの生成物質である FICZ は、培養細胞の L1 発現上昇を引き起こすことが報告されている (Okudaira et al., 2010; Teneng et al., 2007)。またトリプトファンの代謝産物であるキヌレニンも AhR のリガンドであり、キヌレニンとその代謝酵素 Ido の発現上昇は、様々な神経疾患との関連が報告されている (Vecsei et al., 2013)。例えばキヌレニンの代謝物であるキノリン酸は、NMDA 型グルタミン酸受容体の機能調節に深くかかわるが、キヌレニンの発現上昇と中枢神経病態の発症との関連はよく分かっていない。本研究の結果から、EAE マウスの脊髄神経細胞におけるキヌレニンの産生亢進と AhR 経路の活性化が、L1 発現亢進を引き起こしたことは、脳内で生成するキヌレニンが、神経変性病態の形成過程で重要な役割を持つことを示唆している。

さて前述の通り、L1 の活性化は通常様々な抑制機構によって高度に制御されているが、EAE 病態下の急性の神経炎症に伴って、Foxa1 や AhR に依存性の急激な L1 発現上昇が誘導された場合、stochastic に L1 レトロ転位の頻度も高まることが懸念され、生体にとって望ましい反応ではない。これに対して高等生物の細胞は、L1 遺伝子の内部に多数の polyadenylation シグナル配列を導入して、premature-polyadenylation による L1 遺伝子全長の転写を妨げることで L1 レトロ転位を抑制する (Perepelitsa-Belancio and Deininger, 2003)。このシステムにより L1 転写産物の大半は短縮化され、レトロ転位能を失うと考え

られ、本研究でも EAE マウスの脊髄神経細胞における L1 転写産物の大部分が、premature-polyadenylation により短縮化されていることが確認された。その一方で、一部の転写産物が ORF1 の読み枠を含む完全な mRNA として高頻度に発現し、ORF1 タンパク質の産生を引き起こしていることが明らかとなった。すなわち premature-polyadenylation は、確かに転写産物の短縮化により L1 レトロ転位能の減弱に成功したが、副産物として産生される ORF1 タンパク質が、Eomes+Th 細胞の活性化抗原になり、免疫依存性神経細胞障害を引き起こす可能性が示された。一連のプロセスは、進化の途上で繰り返されたホストとレトロトランスポゾンのせめぎ合いの歴史を反映するものと考えられ、興味深い。最後に、上記の解析において、全長 L1 の転写産物と思われるバンドがごくわずかに検出されたことから、L1-GFP reporter マウスを用いて脊髄神経細胞における L1 レトロ転位を解析したところ、EAE 誘導後 28 日目の脊髄神経組織で L1 転位を起こした神経細胞は、脊髄前角に集中していることが示された。現時点では、神経細胞における不均一な L1 レトロ転位の意義は不明であるが、神経変性病態と L1 レトロ転位との関連についても、今後解析していく予定である。

## 第3章

# 神経変性モデルマウスにおける 免疫依存性神経変性病態の解析

### 第3章 目的

前章で示した結果から、L1 がコードするタンパク質である ORF1 の存在下で、Ca<sup>2+</sup>influx を指標とした Eomes 陽性 Th 細胞の活性化が誘導され、これが抗 MHC II 抗体で阻害されることから、ORF1 が Eomes 陽性 Th 細胞の活性化抗原として働くことが明らかとなった。さらに SPMS モデルマウスの脊髄神経細胞内で、EAE の発症に伴う L1 の活性化が確認された。この L1 活性化の過程では、premature polyadenylation による転写産物の短縮化により、全長 L1 RNA の生成が抑制されていた一方で、ORF1 タンパク質を発現しうる転写産物が相対的に増加していた。先行する神経細胞死によって供給された ORF1 タンパク質が、ミクログリアなどの抗原提示細胞に取り込まれ、活性化抗原として神経細胞障害性の Eomes 陽性 Th 細胞を活性化することにより、SPMS モデルマウスの神経変性病態に関与する可能性が示された。

すでに述べた通り、病態関連ミクログリアの MHC II 発現亢進と IFN signature の亢進は、AD などの神経変性疾患モデルマウスでも認められる所見である。さらに L1 活性化による細胞内核酸の過剰蓄積は、様々な核酸センサー分子を活性化して IFN-I 産生を増強すると予想されることから、上記の病態関連ミクログリアの所見は、本研究の仮説から十分に帰結可能と考えられる。そこで本章では、神経細胞における L1 発現量亢進と神経変性病態の関係を、典型的な神経変性疾患のモデルマウスを対象として解析することにした。種々の神経変性疾患に共通する所見としての選択的なレトロトランスポゾンの活性化については、既にいくつもの報告があり、少なくとも ALS と AD においては周知の所見の一つと言える。神経変性疾患における L1 活性化の成立機序としては、例えば、代表的な ALS の病態関連分子である TDP-43 の少なくとも一部は、通常、核内に局在して L1 mRNA に結合し、その発現を抑制しているが、発症に伴って TDP-43 が核外に移行すると、制御が外れた L1 の異常な活性化が生じる (Liu et al., 2019)。また、AD 関連分子であるタウタンパク質におい

ても、タウ関連病変と全般的なレトロトランスポゾンの活性化が有意に相関し、神経原線維変化がクロマチンの特定領域の relaxation と関連することが報告されている(Grundman et al., 2021)。以上より、神経細胞に生じた病的な L1 の高発現が、何らかの病態経路を刺激することで、広範な神経変性疾患に共通した神経変性機序となる可能性は十分に考えられる。一方、これらの報告は、いずれも患者剖検脳や培養細胞系を対象とした解析から得られている場合が多く、神経変性病態の進行に伴う L1 発現の経時的な変化や、レトロ転位による神経細胞障害の分子機序などに関する研究はほとんどなく、関連する知見はほとんどない。

レトロ転位によるゲノム不安定性の原因となる L1 の発現は、生理的条件下の生体においては強く抑制されているが、その抑制の程度には組織間で大きなばらつきがある(Larouche et al., 2020)。詳細な理由は不明であるが、正常神経細胞における L1 活性化の程度は比較的高いことが知られており、その多くはより未分化な神経幹細胞や神経前駆細胞で高頻度に認められる。この様な正常神経細胞における L1 活性化は、レトロ転位によるゲノムのモザイク化と、これに伴う神経細胞の機能的多様性を生み出す因子の一つと考えられている。一方、神経変性疾患の発症に伴う L1 の異常な高発現は、主に成熟神経細胞で生じることがわかっており、慢性炎症環境におけるエピジェネティック制御の変化と、これに伴うヘテロクロマチン構造の変化によって引き起こされる(Saleh et al., 2019)。先に述べた通り、ALS の場合、TDP-43 分子の核内消失がその一因である可能性も示唆されている(Liu et al., 2019)。さらに、L1 の活性化に伴う神経細胞障害に関しては、L1 レトロ転位による DNA 損傷が神経細胞死を引き起こす可能性もあるが、病態下における L1 の発現量亢進とレトロ転位の頻度は、神経変性病態を全て説明しうるほど高くはなく、その意義はいまだ不明である。したがって、全ての神経変性病態がレトロ転位に関連して引き起こされることは考えにくく、さらなる詳細な解析が重要である。

一方、神経変性疾患における免疫細胞の挙動については、神経変性疾患患者の末梢血や中枢神経組織内では NK 細胞などの自然免疫系に関わる細胞や、細胞障害性 T 細胞などの

獲得免疫系の免疫細胞の増加が報告されている (Amor and Woodroffe, 2014)。さらに、神経変性疾患に共通した神経細胞障害と神経変性病態の伝播を説明しうる、首尾一貫した免疫依存性の神経細胞障害機序は知られていない。すでに示した通り、少なくとも SPMS とその動物モデルにおいては、活性化した L1 が ORF1 タンパク質を介して Eomes 陽性 Th 細胞を活性化し、神経細胞障害に関与する可能性が示されている。もしこの免疫依存性神経細胞障害が、神経変性疾患に共通した普遍的な病態機序であるならば、全く異なる疾患単位である ALS と AD においても、類似した免疫細胞の挙動や L1 の活性化が観察されるはずである。そのような仮説に基づいて、本章では ALS モデルとして mSOD1 マウス、AD モデルとして 5xFAD マウスの 2 種類の神経変性疾患モデルマウスを用いて、発症に伴う CNS への Eomes 陽性 Th 細胞の集積と、神経細胞内における L1 活性化について解析を行なった。さらに、より長期の経過をたどる神経変性疾患モデルマウスにおける、慢性炎症環境の L1 発現亢進の分子機序を、前章の解析結果と対比させて詳細に解析することにした。

## 3-2 結果

### 3-2-1 神経変性モデルの中樞神経系への Eomes 陽性 Th 細胞の浸潤

神経変性病態と Eomes 陽性 Th 細胞の関係について、本研究を開始した時点で得られていた知見としては、神経変性病態を呈する EAE マウスの後期病態において、中枢神経組織内に Eomes 陽性 Th 細胞数が有意に集積すること、T 細胞特異的 Eomes 欠損により、この後期病態が有意に改善すること、神経変性を伴う SPMS 患者で末梢血中の Eomes 陽性 Th 細胞数が選択的に増加し、その細胞数が患者の障害進行度と有意に相関すること、SPMS 患者脳の大規模な領域に、大量の Eomes 陽性 Th 細胞の浸潤が認められ、そのほとんどがグランザイム B 陽性であること、などが明らかとなっていた。また研究グループ内で共有されていた知見として、NCNP 病院に通院あるいは入院している ALS 患者および AD 患者の末梢血でも、Eomes 陽性 Th 細胞数が増加している症例が複数確認されたことから、種々の神経変性疾患の病態に対して Eomes 陽性 Th 細胞が関与している可能性が高いと予想された。そこでまず、ALS のモデルマウスである mSOD1 マウスと、AD のモデルマウスである 5xFAD マウス 2 種類の神経変性疾患モデルマウスを対象として、中枢神経系への Eomes 陽性 Th 細胞の集積の有無、およびこれと病態の進行の間にどのような関連があるか解析した。

mSOD1 マウスは家族性 ALS の原因となる変異 SOD1 のトランスジェニックマウスであり、主に脊髄内の運動ニューロンに典型的な神経変性病変を生じることで発症する病態モデルである。生後 12 週齢前後から臨床症状が顕在化し、16 週齢あたりで著しい神経変性症状を呈し、その後 20~22 週齢のエンドステージではほぼ全ての個体が死亡する。そこで、16 週齢とエンドステージの mSOD1 マウスの脊髄神経組織内に浸潤した単核細胞中の、Eomes 陽性 Th 細胞の頻度を、フローサイトメーターを用いて経時的に観察した。そ

の結果、顕著な四肢の麻痺が進行する 16 週 of mSOD1 マウスにおいて、有意な Eomes 陽性 Th 細胞の浸潤を認めたが、同週齢の littermate では Eomes 陽性 Th 細胞は検出できなかった。さらにエンドステージである 20 週以降にかけて、Eomes 陽性 Th 細胞のさらなる増加傾向が認められた(図 3-1A)。一方、5xFAD マウスは、家族性 AD に関わるアミロイド前駆体タンパク質とプレセニリンの 5 種類の変異を導入したトランスジェニックマウスであり、生後 2~3 か月齢前後から検出される A $\beta$  の蓄積により徐々に認知機能障害を発症し、1 年以上に渡って病態が進行するモデルである。初期の病変は海馬周辺の比較的小さな領域にとどまり、この領域に選択的に浸潤するであろう Eomes 陽性 Th 細胞の割合を、脳全体から回収した単核細胞を分母として解析しても、十分な有意差が得られない可能性があったことから、神経変性病態がより広域に拡大する生後 6 か月齢と 12-15 か月齢の 2 点で観察を行った。その結果、6 か月齢の 5xFAD マウスの脳内において、Eomes 陽性 Th 細胞頻度はすでに増加傾向にあり、12-15 か月齢では有意な増加を認めた(図 3-

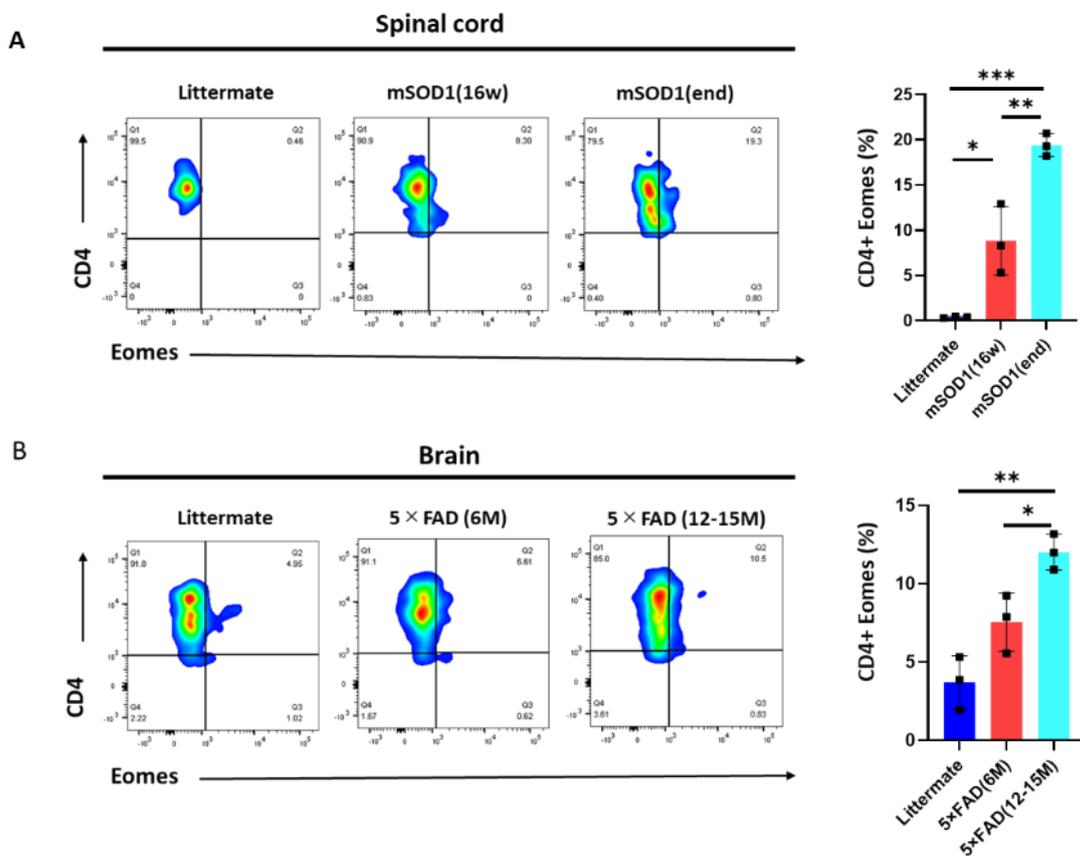


図 3-1 フローサイトメトリーを用いた神経変性疾患モデルマウス中枢神経組織内における Eomes 陽性 Th 細胞の浸潤程度の解析

(A) 16 週齢とエンドステージの mSOD1 マウス、および 16 週齢の littermate の脊髄神経組織内に浸潤した Eomes 陽性 Th 細胞頻度の比較解析結果。(左: Th 細胞の Eomes 発現の分布図、右: n=3 で統計解析を行なった結果、\*P<0.05,\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.001)

(B) 6 か月齢と 12 か月齢の 5×FAD マウス、および 12 か月齢の littermate 脳組織内に浸潤した Eomes 陽性 Th 細胞頻度の比較解析結果。(左: Th 細胞の Eomes 発現の分布図、右: n=3 で統計解析を行なった結果、\*P<0.05,\*\*P<0.01)

1B)。したがって、5xFAD マウスにおいても、病態の進行とともに中枢神経組織内の Eomes 陽性 Th 細胞浸潤が有意に増加することが明らかとなった。

さて、今回解析したいずれのマウスにおいても、Th 細胞の Eomes 発現の蛍光強度は軽度なシフトを示すに留まっており、これが確かに意味のある発現亢進であるとは断言できない。そこでこれを確認するために、さらにグランザイム B 欠損マウスと交配した 5 xFAD マウスの Eomes 発現とグランザイム B 発現を、5 xFAD マウスの中枢神経系に浸潤した Th 細胞と比較した。その結果、神経細胞障害能を持つ 5 xFAD マウスのグランザイム B 発現 Th 細胞は、その全てが Eomes 陽性であることが分かった。さらにグランザイム B を欠損

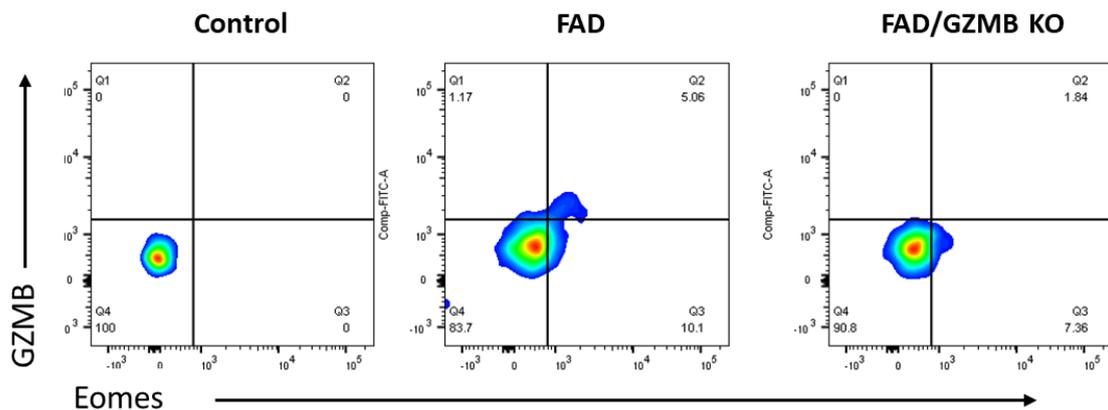


図 3-2 フローサイトメトリーを用いた 5×FAD マウス、5×FAD/GZMB KO マウスと 6 か月齢の対照マウスの脳神経組織内に浸潤した Th 細胞の Eomes 発現とグランザイム B 発現

6 か月齢の 5×FAD マウスと 5×FAD/GZMB KO マウスの脳組織内における Eomes 陽性 Th 細胞頻度を littermate と比較解析した結果。横軸に Eomes、縦軸にグランザイム B の蛍光強度を示す。

したマウスでは、この Eomes とグランザイム B 両陽性の Th 細胞は消失し、Eomes 発現のみが維持されていた (図 3-2)。したがって、5xFAD マウスの中枢神経系由来の Th 細胞における、Eomes 発現の蛍光強度がたとえ軽度なシフトにとどまっていたとしても、これらの細胞は確かに神経細胞障害性を維持した機能的な Th 細胞であることが確認された。以上の結果より、病態機序が全く異なる二種類の神経変性疾患モデルマウスの、中枢神経組織の異なる病変部位 (脊髄 vs 脳) に、発症に伴う有意な Eomes 陽性 Th 細胞の浸潤が認められ、その集積頻度は病態の進行に伴ってさらに増加する傾向にあることが示された。

### 3-2-2 mSOD1 マウス脊髄神経細胞における L1 活性化

次に、病態の程度が異なる 12 週齢、16 週齢、および 20 週齢以降 (エンドステージ) の

mSOD1 マウスの、脊髄神経組織内

における L1 の発現量変化を、q-PCR 法により解析した。その結果、核内および細胞質の L1 発現は、と

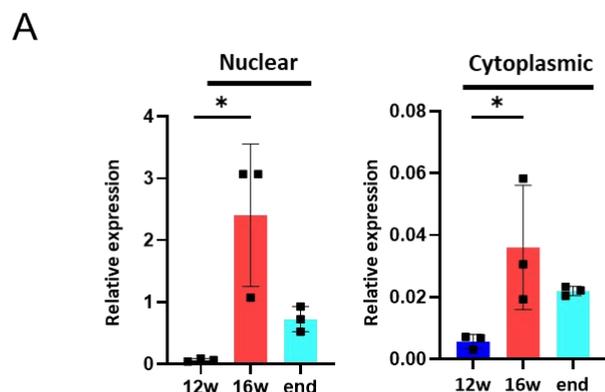


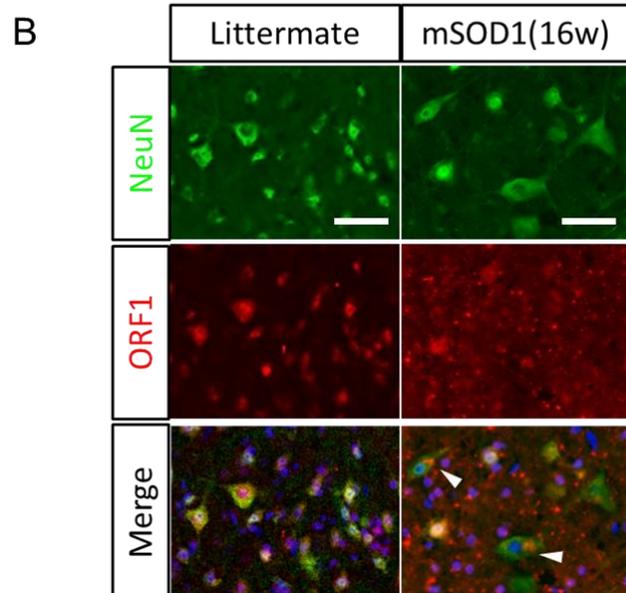
図 3-3 mSOD1 マウス脊髄神経細胞における L1 発現量変化の比較解析

(A) 12 週齢、16 週齢、エンドステージの mSOD1 マウス由来脊髄神経細胞における L1 発現量変化を RT q-PCR 法により解析した結果。(n=3) \*P<0.05

(B) mSOD1 マウス脊髄神経細胞内の L1 由来 ORF1 タンパク質の免疫染色法を用いた発現解析。

抗 NeuN 抗体(緑)、抗 ORF1 抗体(赤)、DAPI(青)による染色データを示す。スケールバーは 200 μm。

矢印：mSOD1 マウスに認められる ORF1 タンパク質の細胞質内凝集体



もに発症の境界期に相当する 12 週齢ではほとんど認められず、症状の進行が顕著な 16 週齢で発現量が急激に上昇することが分かった(図 3-3A、前ページ)。またエンドステージの脊髄神経細胞では、L1 発現が相対的に低下したが、これは多くの神経細胞が障害された後に残された生存神経細胞における発現を反映しているものと思われた。上記の L1 転写産物の発現上昇に伴って、ORF1 タンパク質の発現量も増加していることを確かめるために、免疫染色法によって脊髄神経細胞内の ORF1 の発現を観察した。その結果、L1 転写活性化がピークとなる 16 週齢の mSOD1 マウス脊髄において、神経細胞内の ORF1 の発現量が増加していることが示された(図 3-3B、前ページ)。予想どおり、同週齢の対照マウスと比較して、mSOD1 マウスの脊髄神経細胞は顕著に減少しており、ORF1 を含む細胞外凝集体が多数残存していることも確認された。さらに、残された生存神経細胞内にも、ORF1 を含む凝集体形成が観察され、mSOD1 マウスの脊髄神経細胞障害に何らかの関連をしているものと考えられた。

### 3-2-3 mSOD1 マウス脊髄神経細胞における L1 脱抑制の分子機序の解析

EAE マウスの脊髄神経細胞における L1 脱抑制機序の解析時に、L1 発現の制御因子として発現解析を行った Rb1、Trex1、Foxa1 と Ido について、mSOD1 マウスの脊髄神経細胞における発現解析を同様に行った。その結果、EAE マウスの場合と異なり、Trex1、Foxa1 と Ido に関しては有意な発現量の変化が見られず、Rb1 のみが有意に発現上昇していることが明らかとなった(図 3-4)。Rb1 は、RB-EZH2 複合体となって、H3K27 のトリメチル

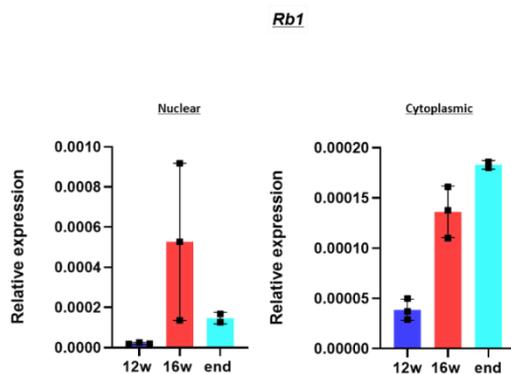


図 3-4 mSOD1 マウス脊髄神経組織内における Rb1 の発現量変化

mSOD1 マウス脊髄神経細胞内の核と細胞質に対して、RTq-PCR 法を用いた Rb1 発現量の定量解析を 12 週齢、16 週齢、およびエンドステージについてそれぞれ行った。(n=3)

化依存的に L1 の発現を抑制する作用が報告されている (Ishak et al., 2016)。一方、がん抑制遺伝子としても知られる Rb 1 は、通常転写因子 E2F に結合してその活性を抑制し、細胞周期の S 期への移行を阻害している (Sun et al.)。サイクリン D-CDK4/6 依存的に Rb1 がリン酸化されると、結合能を失ったリン酸化 Rb1 (pRb1) は E2F から解離し、サイクリン A、サイクリン E、CDK2 などの E2F の支配遺伝子の転写が促進されることにより、細胞周期が S 期へと移行する。そこで Rb1 の発現上昇が細胞周期の亢進と関連するかどうかを調べるために、mSOD1 マウスおよび対照マウスの脊髄神経細胞における pRb1 の発現量を解析した。その結果、対照マウスの脊髄神経細胞では pRb1 のシグナルは検出できなかったが、mSOD1 マウス脊髄神経細胞において pRb1 量が増加していることが分かった (図 3-5A)。mSOD1 マウス脊髄神経細胞において、細胞周期の亢進スイッチがオンになっている可能性が示された。同様に、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、ミクログリアについても

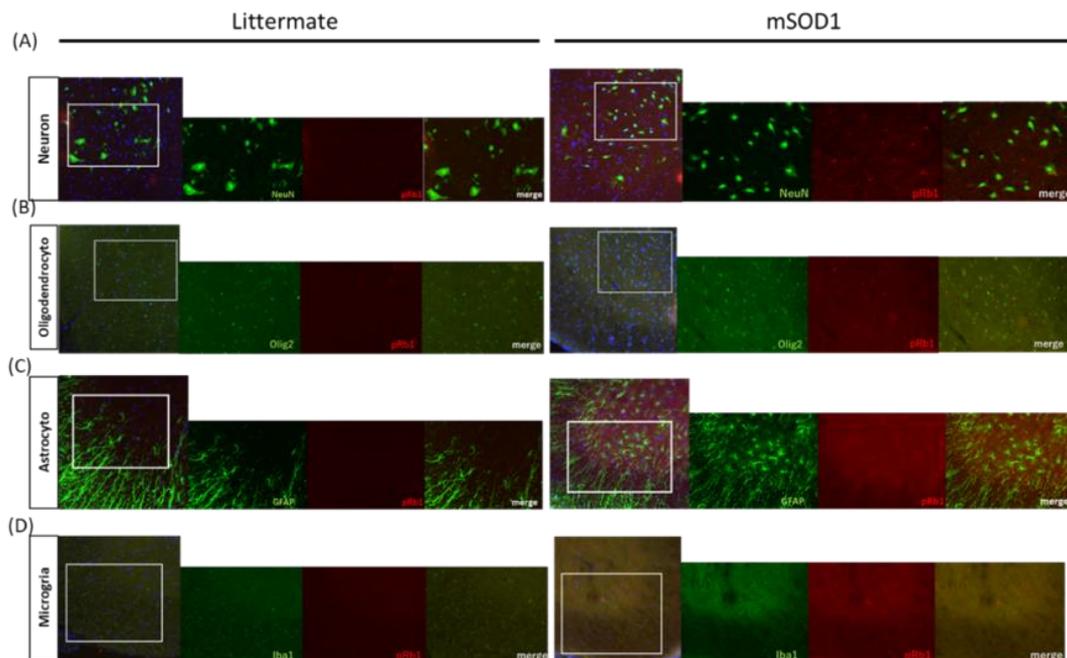


図 3-5 mSOD1 マウス脊髄神経組織内における pRb1 の発現パターンの解析

mSOD1 マウス脊髄神経組織内における神経細胞、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、ミクログリアの pRb1 発現パターンの免疫染色法を用いた解析の結果

(A) 抗 NeuN 抗体(緑) (B) 抗 Olig2 抗体(緑) (C) 抗 GFAP 抗体(緑) (D) 抗 Iba1 抗体(緑)、

(A-D)抗 pRb1 抗体(赤)、DAPI(青) による染色データを示す。

pRb1 の発現解析を行ったところ、オリゴデンドロサイトとミクログリアでは pRB1 発現の増加が認められた (図 3-5B-D)。以上の結果から、mSOD1 マウス脊髄神経細胞では、発現増加した Rb1 自身が、RB-EZH2 複合体として L1 発現をコントロールしているものと予想され、さらにそれ等の Rb1 タンパク質の一部はリン酸化されて E2F から解離することで、結果的に神経細胞の細胞周期の亢進スイッチがオンになっている可能性が示された。

さて、一般に成熟神経細胞は、細胞分化の最終段階に到達した post-mitotic な細胞と考えられている。ところが最終分化したはずの成熟神経細胞は、病的環境下において細胞周期への再突入 (cell cycle re-entry) するが、通常細胞分裂はしないため、S~G2/M の途中のどこかにとどまった状態にあることが知られている (Kingsbury et al., 2005)。特に興味深いことに、神経細胞の細胞周期への再突入は、神経変性疾患に広く共通する典型的な特徴の一つであり、種々の神経変性病態に関連したイベントであることが予想される。mSOD1 の脊髄神経細胞で認められる pRb1 の増加は、同マウスの脊髄神経細胞においても、細胞周期の亢進スイッチがオンになっていることを示唆している。そこで次に、mSOD1 マウスの脊髄神経細胞における細胞周期の状態を解析することにした。

まず、mSOD1 マウスの脊髄神経細胞の細胞周期の分布について解析を行った。後に述べる通り、細胞周期の各ステージに分布する神経細胞に対して、L1 発現の定量解析を実施することを想定しているため、生細胞の細胞周期解析を可能にする Hoechst33342 を用いて細胞染色を行った。各細胞周期の大まかな分布を把握するために、マウス脾臓細胞を Hoechst33342 染色したところ、図 3-6A に示すように、大部分の G0/G1 期細胞と少数の G2/M 期細胞、およびごくわずかな分裂中の S 期細胞から構成された、典型的な細胞周期の分布を示した。次に、12 週齢の対照マウスの脊髄神経細胞を解析したところ、S 期および G2/M 期に分布する細胞の割合が、明らかに増加していることが分かった。さらに同週齢の mSOD1 マウスの脊髄神経細胞では、G0/G1 期に分布する細胞の割合がさらに減少し、S 期および G2/M 期の細胞の割合がさらに増加することが明らかとなった (図 3-6B, C)。

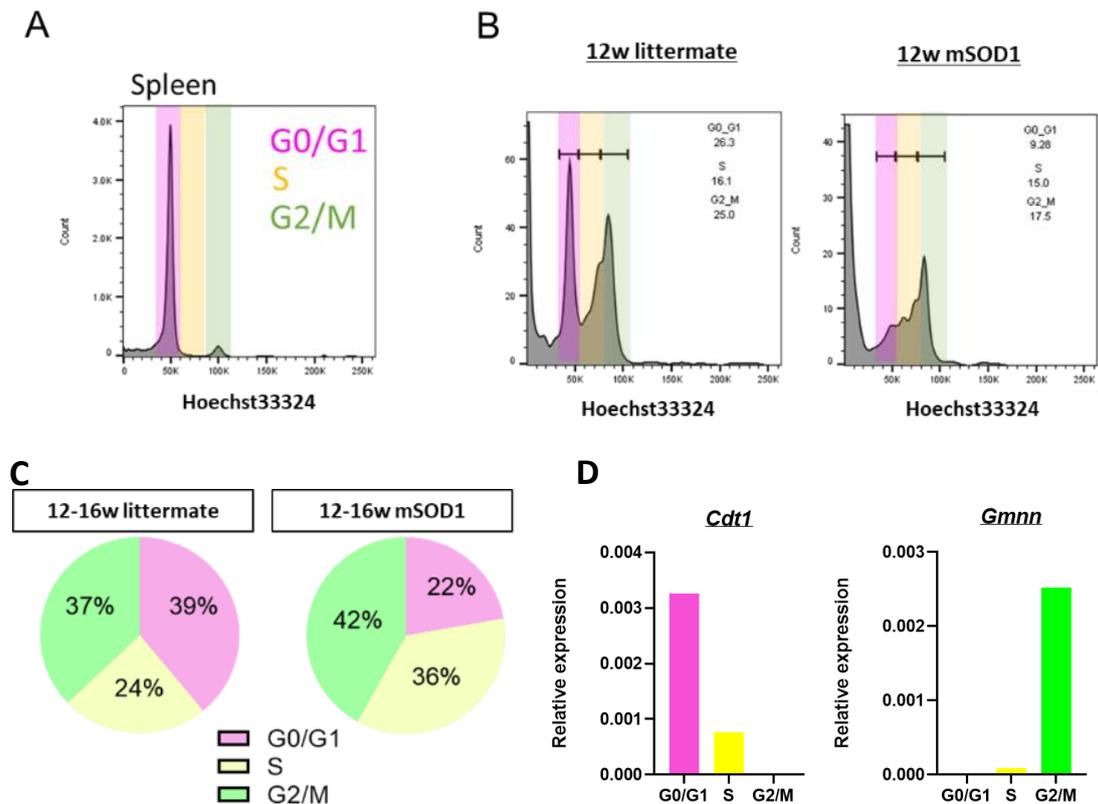


図 3-6 mSOD1 マウス脊髄神経細胞の細胞周期解析

(A) Hoechst33324 染色したコントロールマウスの脾臓細胞の細胞周期パターンフローサイトメトリーによる解析結果(横軸に Hoechst33324 の蛍光強度、縦軸に細胞数を示した)

(B) Hoechst33324 染色した 12 週齢の対照マウスと、12 週齢 mSOD1 マウス脊髄神経細胞の細胞周期パターンフローサイトメトリーによる解析結果(横軸に Hoechst33324 の蛍光強度、縦軸に細胞数を示した)

(C) B で得られた結果から、G0/G1 期(ピンク)、S 期(黄色)、G2/M 期(緑)に分布する細胞数を定量し、生細胞全体に対するそれぞれの割合を円グラフで示した。

(D) G0/G1 期(ピンク)、S 期(黄色)、G2/M 期(緑)の神経細胞をそれぞれ回収し、RTq-PCR 法により、各サンプルにおける *Cdt1* と *Geminin* の発現量を定量した結果。

神経細胞の細胞周期分布のパターンが脾臓細胞と大きく異なっていたため、細胞周期ごとに正しいサンプリングができていることを確認するために、各ステージの神経細胞における *Cdt1* と *Geminin* の発現を比較した。その結果、G0/G1 期の神経細胞では *Cdt1* の選択的な高発現が、反対に G2/M 期の神経細胞では、*Geminin* の選択的な高発現が確認された(図 3-6D)。以上の結果から、神経細胞が、細胞周期ごとに正しく分画されていることが確

かめられた。

並行して実施した免疫染色法による解析では、G0/G1 期から S 期への移行時に活性化する cyclinD 1 と CDK4 の発現増加が確認され、それらの多くが ORF1 を共発現していることも確かめられた(図 3-7)。これらの結果から、マウス脊髄では、予想外に多くの神経細胞の細胞周期が亢進しており、mSOD1 マウスではその割合がさらに高まっていることが明らかとなった。

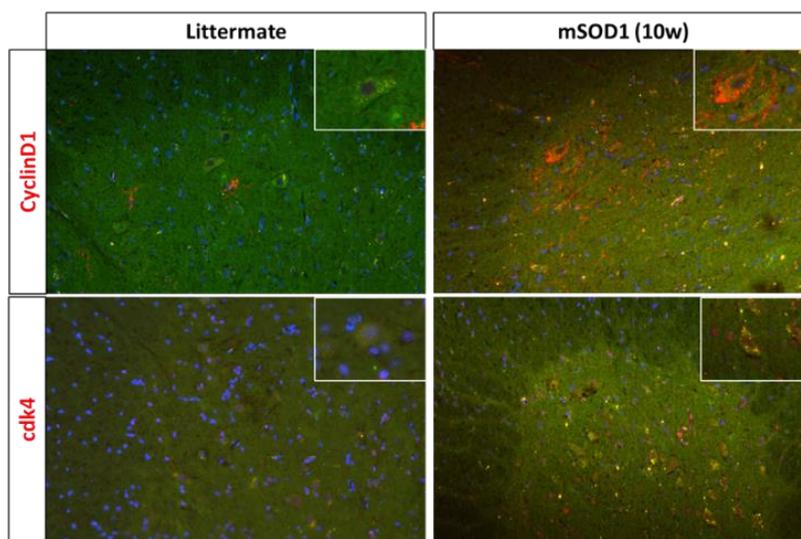


図 3-7 免疫染色法を用いた 10 週齢 mSOD1 マウス脊髄神経組織内における細胞周期関連遺伝子の発現パターン解析  
(上)抗 CyclinD1 抗体(赤)、抗 ORF1 抗体(緑)  
(下)抗 Cdk4 抗体(赤)、抗 ORF1 抗体(緑)による染色パターンを示す。各画像の右上には、代表的な染色像を拡大して表示した。

さて、これまで私が神経細胞の細胞周期解析に着目してきた理由がもう一つあり、それは培養細胞における L1 の脱抑制が、細胞周期の亢進とよく相関し、S 期から G2/M 期にかけて、顕著に L1 レトロ転位が増加するという報告の存在である(Shi et al., 2007)。前述の通り、通常の体細胞の L1 遺伝子の多くは、高度にメチル化を受けたヘテロクロマチン領域に分布している。ところが DNA 合成期に新規に複製された娘 DNA 鎖は、この時点ではメチル化されないため、L1 遺伝子の選択的な発現亢進を引き起こすのではないかと予想される。そこで、神経細胞を細胞周期ごと 3 分画に分けて回収し、それぞれの画分の L1 活性化の程度を比較定量した。その結果、G2/M に分布する mSOD1 マウスの神経細胞では、L1 の ORF 1 領域および ORF 2 領域の転写が有意に増加していることが分かった(図 3-8A)。さらにこの結果を、図 3-6C で示した各細胞周期の神経細胞数の割合を掛け合わせることで、細

細胞周期のどのステージに分布する神経細胞において、L1 発現が最も亢進しているかを比較したところ、脊髄組織内全体では G2/M 期の神経細胞において顕著に L1 由来の ORF1、ORF2 発現量が上昇していることが分かった(図 3-8B)。以上の結果から、mSOD1 の脊髄神経細胞内における L1 発現量の増加は、神経細胞の細胞周期の異常な亢進とよく相関していることが明らかとなった。

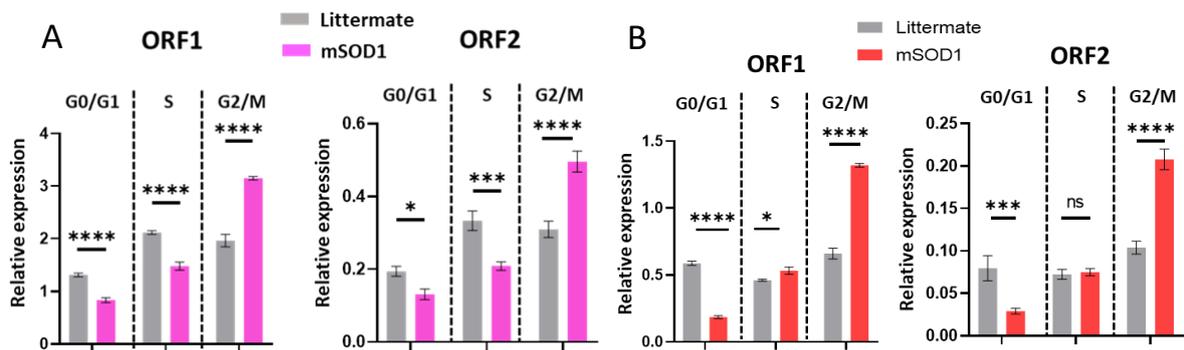


図 3-8 mSOD1 マウス脊髄神経細胞の各細胞周期における L1 遺伝子発現量の解析

(A) 図 3-6B の解析で G0/G1 期(ピンク)、S 期(黄色)、G2/M 期(緑)に分布する神経細胞をそれぞれ回収し、RTq-PCR 法により、各細胞周期における L1-ORF1 と L1-ORF2 の発現量を定量した結果。

(グレー：Littermate, ピンク：mSOD1 を示す) \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

(B) A で定量した L1-ORF1, ORF2 の発現量に図 3-6C で示した核細胞周期に分布する細胞数の割合を掛け合わせさせた結果。(グレー：Littermate, 赤：mSOD1 を示す) \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

さらに mSOD1 マウスの脊髄における Cdt1 と Geminin の発現を、蛍光免疫染色により解析したところ、発症に伴った経時的な神経細胞の Cdt1 発現の減少と、Geminin の発現亢進が確認された(データ示さず)。Geminin の発現亢進は、8 週齢の段階で顕著に亢進していたことから、神経細胞の異常な細胞周期の亢進は、神経変性病態が顕在化するよりずっと前から生じており、病態形成に何らかの役割を果たしているものと推察された。

### 3-2-4 mSOD1 マウスの脊髄神経組織内における L1 レトロ転位の解析

前項までの結果から、細胞周期が亢進した mSOD1 マウスの脊髄神経細胞内では、L1 の

発現量が有意に増加しており、神経変性疾患における神経細胞周期の亢進と L1 の発現量増加に直接的な因果関係があることが示された。さらにこの転写レベルの発現増加は、ORF1 領域のみならず ORF2 領域まで及んでおり、より急激な神経変性が起こる SPMS モデルマウスでは、premature polyadenylation による転写産物の短縮の結果、ORF 1 優位なタンパク質が生成したと対照的であった。これまでの議論から、少なくとも ORF1 分子が発現すれば、免疫依存的神経細胞障害は発動すると考えられるが、活性化した L1 が本来の生活環に則って引き起こすレトロ転位が、同様に神経細胞障害を引き起こす可能性も考えられる。L1 レトロ転位は健常人の脳にも認められ、その多くは細胞分裂が活発な発生期に集中しており、また成体脳に分布する神経幹細胞でも、顕著な L1 レトロ転位が生じる (Haig H. Kazazian, 2002)。よって神経変性疾患に対してレトロ転位を議論する場合、死後脳を用いた解析からは、検出されたレトロ転位が post-mitotic な成熟神経細胞で生じたのかどうか確定できない。したがって神経変性病態の形成過程における L1 レトロ転位の意義については、さらに検討の余地がある。そこで私は、mSOD1 マウスの脊髄神経細胞における、L1 活性化に伴う L1 レトロ転位の有無、および神経細胞障害機序との関連を調べることにした。L1-GFP レポーターマウスを mSOD1 マウスと交配して得たマウス (mSOD1/L1-GFP マウス) を用いて、脊髄神経細胞内の L1 のゲノム内レトロ転位の検出と、神経細胞障害との関連を解析した。mSOD1/L1-GFP マウス脊髄内の GFP 陽性細胞を観察した結果、発症前の 10 週齢のマウス脊髄内において、NeuN 陽性の神経細胞の一部に GFP 発現が認められ (図 3-9A)、定量解析を行なった結果、脊髄神経細胞全体の約 30%において L1 レトロ転位が起きていることが分かった (図 3-9B)。さらに脊髄内における GFP 陽性細胞の分布を解析したところ、L1 レトロ転位を生じた神経細胞は、脊髄前角においてより高頻度に認められ、cyclin D1 および CDK4 の選択的な発現上昇ともよく相関していた (図 3-7)。以上の結果から、細胞周期の亢進に伴う L1 の脱抑制の結果として生じる L1 レトロ転位が、主に運動ニューロンが分布する脊髄前角で高頻度に起きていることが示され、前出の L1-GFP マ

ウスを用いた EAE 解析の結果と一致していた (図 2-9)。以上の結果は、未知の機序による運動ニューロン選択的な L1 レトロ転位の亢進が、例えばゲノムの不安定化を介して選択的な神経細胞障害を誘導している可能性を強く示唆する。L1 レトロ転移に対する運動ニューロン選択的な脆弱性の分子機序については、GFP 陽性細胞と陰性細胞の遺伝子発現比較などを行うことにより、何らかの手がかりが得られるものと考えており、さらなる検討を行う予定である。

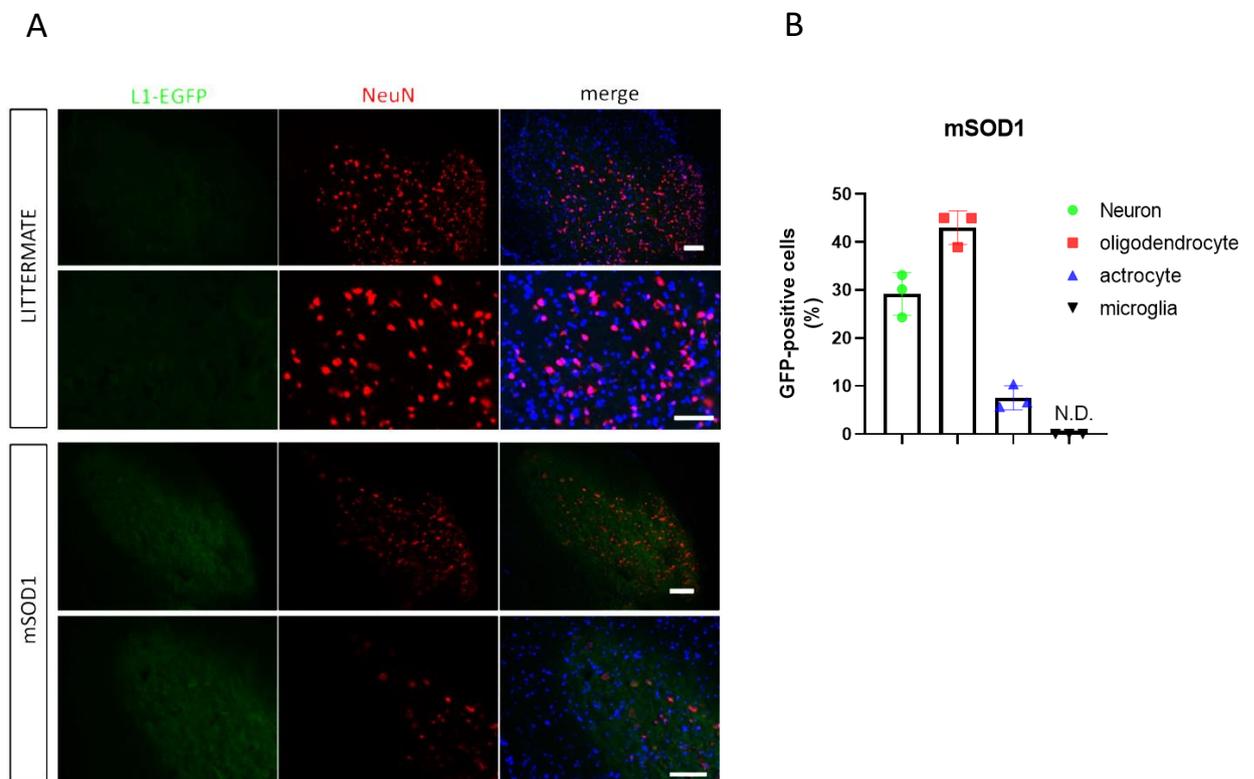


図 3-9 免疫染色法を用いた mSOD1/L1-GFP マウス脊髄神経組織内における L1-GFP 発現パターンの解析

(A) mSOD1/L1-GFP マウス脊髄神経組織内における神経細胞内の L1-GFP 発現の蛍光顕微鏡画像。L1-GFP(緑)、抗 NeuN 抗体(赤)の染色データを示す。

(B) mSOD1/L1-GFP マウス脊髄神経組織内における神経細胞、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、ミクログリアの L1-GFP 発現パターンの解析結果。

### 3-3 考察

本章で実施した一連の研究によって、発症機序を異にする2種の神経変性モデルマウス (mSOD1 マウス、5xFAD マウス) の中枢神経組織内において、前章で示した SPMS モデルマウスと同じく、免疫依存性の神経細胞障害が成立するための条件が全て整っていることが明らかとなった。一方、急性な炎症反応を伴う EAE マウスと緩徐進行性の mSOD1 マウスとの相違点として、神経細胞の L1 活性化に至る分子機序が全く異なることが明らかとなった。

まず mSOD1 マウスと 5xFAD マウスの中枢神経組織内に免疫依存性神経細胞障害機序の主体となる Eomes 陽性 Th 細胞が、病態の進行に応じて浸潤していることを、フローサイトメトリーを用いた経時的な観察により明らかにした。mSOD1 マウスは主に脊髄神経細胞が障害される ALS のモデルとして神経変性疾患の研究に広く用いられている (Morrice et al., 2018)。私の解析では、Eomes 陽性 Th 細胞浸潤の有意な増加は、mSOD1 マウスの脊髄神経組織でのみ観察され、脳組織内では有意な変化は認められなかった。一方、AD のモデルマウスとして広く用いられる 5xFAD マウスでは、生後 2~3 か月で海馬周囲のアミロイド  $\beta$  凝集と認知機能障害を伴う病態変化が生じる (Oblak et al., 2021)。脳組織全体から分離した単核細胞を用いた私の解析では、Eomes 陽性 Th 細胞の有意な浸潤増加は、生後 6 か月頃までは検出することができなかった。これは、Eomes 陽性 Th 細胞の CNS 内浸潤が、神経細胞障害部位特異的に生じている可能性を強く示唆しており、今後、その分子機序の解明を通じて、病変部位と Eomes 陽性 Th 細胞浸潤の相関を明らかにする必要がある。以上の結果から、神経変性疾患に伴う Eomes 陽性 Th 細胞の中枢神経組織浸潤は、各モデルマウスで病変部位特異的に起きており、神経変性疾患で議論される神経細胞障害部位の特異性の少なくとも一部は、Eomes 陽性 Th 細胞の選択性組織浸潤により説明可能であると考えられた。

これまでに、ヒト神経変性疾患あるいはそのマウスモデルにおいて、免疫細胞に依存した神経細胞障害が直接示された例は多くない。しかしながら、グリア細胞などの非神経細胞による間接的な神経炎症や、その他の免疫細胞の末梢血内存在量変化については様々な報告があり (Van Harten et al., 2021)、特に細胞障害性が知られている NK 細胞や CD8 陽性 T 細胞の神経変性疾患との関連性は最近注目され始めている (Amor and Woodroffe, 2014)。自己免疫疾患に関わる Th17 細胞による神経細胞障害についても報告がある (Kebir et al.) が、神経変性疾患のほとんどは自己免疫性の要因とは無縁であり、その意義は実験レベルにとどまっている。一方、過剰な Th 細胞応答の制御能を持つ制御性 T (Treg) 細胞には、神経変性疾患病態の改善効果が報告されており、Treg 細胞による病態制御を介した、神経変性疾患の臨床治験が進行中である (Machhi et al., 2020)。Treg 細胞の主な制御対象がエフェクター-Th 細胞であることを考えると、病原性の Eomes 陽性 Th 細胞が、Treg 細胞の病態制御能に関わる可能性が示唆され、興味深い。

神経変性疾患モデルマウスの CNS から分離した Eomes 陽性 Th 細胞の Eomes 発現は比較的軽度であり、その意義については論文投稿時に査読者からも指摘を受けていた。これを受けて実施した実験の結果 (図 3-2) から、5xFAD マウスではほぼすべてのグランザイム B 陽性 Th 細胞が Eomes を共発現しており、グランザイム B 欠損マウスでは Eomes 陽性 Th 細胞中のグランザイム B の発現のみが消失していることが確認された。このとき、Th 細胞の Eomes 発現レベルには差異がないことも確かめられ、5×FAD マウス中枢神経組織内で観察された Eomes 陽性 Th 細胞が、確かにグランザイム B 陽性で神経細胞障害活性を有するエフェクター-Th 細胞であることが示された。

次に前章の解析から、SPMS モデルマウスの中枢神経組織内に浸潤した Eomes 陽性 Th 細胞の活性化に必要なプロトタイプ抗原が L1 由来の ORF1 タンパク質であることが示されていたため、まず mSOD1 モデルマウス脊髄神経細胞内でも L1 の活性化が生じていることを明らかにした。一般に神経変性疾患は、神経障害部位の伸展に伴って慢性炎症が生じる

ことが知られているが(Raine, 2000)、これは中枢神経組織内の様々なエピジェネティックな変化を引き起こし、結果としてそれらの細胞の遺伝子発現パターンを大きく変化させることが予想される。代表的な例では、メチル化異常によるがん抑制遺伝子の発現抑制による発がん機序や(McCabe et al., 2009)、脱メチル化による異所性発現タンパク質の細胞毒性(Smith et al., 2019)などがある。特に罹患期間が長期にわたる神経変性疾患の場合、L1 を始めとするレトロエレメントの発現量上昇が報告されており(Terry and Devine, 2019)、中枢神経組織内のエピジェネティックな遺伝子発現変化を裏付けている。興味深いことに、ALS 病態との関連が強く示唆されているタンパク質の一つである TDP-43 は、L1 mRNA に結合してその活性化を抑制していることが報告され、さらに ALS 患者の剖検脳由来神経細胞の約3割で、L1 を含むレトロトランスポゾンの発現亢進が示されている(Tam et al., 2019)。

しかしながら、剖検脳の解析からそれらの因果関係を導き出すことは不可能であり、L1 発現亢進の意義はいまだに不明である。本研究で示した病態の進行と L1 の発現量亢進との間の相関は、相互の因果関係を明らかにするのに良いモデルと考えられ、神経細胞の細胞質に認められた ORF1 陽性の凝集体形成の意義を含めて、その意義を今後調べていく必要がある。興味深いことに、病態下の神経細胞における L1 の発現亢進の分子機序は、SPMS モデルマウスとは明らかに異なっており、Rb1 のみが有意な発現上昇を示すことが明らかとなった。Rb1 には L1 の発現抑制作用が報告されている一方で、Rb1 自体は代表的な細胞周期の制御因子の一つでもあり、mSOD1 マウスの脊髄神経組織では、発症に伴って明らかな pRB1 の発現増加が認められた。予想通り、mSOD1 の脊髄神経細胞は、post-mitotic な成熟神経細胞であるにも関わらず部分的な細胞周期の亢進が生じていた。興味深いことに、細胞周期の亢進を反映した細胞周期関連タンパク質の発現亢進は、神経変性疾患に関連した中枢神経組織内で普遍的に見られる現象であることがいくつも報告されており(Cova et al., 2010; Joseph et al., 2020)、近年では ALS 患者の運動神経特異的な細胞周期亢進を示す遺伝子の発現上昇も報告されている(Morrice et al., 2018; Ranganathan and Bowser, 2003)。この

神経細胞内における細胞周期の異常な亢進は、何らかの第二のシグナルと相まって神経細胞死を引き起こすことは想像に難くない。しかしながら、この第二のシグナルの詳細に関してはほとんど研究が進んでおらず、細胞周期異常と神経変性機序の関連は明らかになっていない。一方、細胞周期の S 期以降に L1 活性化が顕著に亢進することが報告されており (Shi et al., 2007)、DNA 複製途中のヘミメチル化 DNA などが、L1 の脱抑制を許容している可能性が考えられる。私の実験でも、mSOD1 マウス中枢神経組織から単離した神経細胞では、細胞周期の S 期以降に L1 活性化が顕著に亢進することを確認しており、mSOD1 マウス脊髄神経細胞内で起こる L1 の発現亢進は、成熟神経細胞に生じる異常な細胞周期の亢進によって引き起こされることが示された。細胞周期異常が生じた神経細胞の L1 発現亢進は、必然的に ORF1 タンパク質の発現増加を引き起こすため、本研究で示した免疫依存性神経細胞障害を底上げする可能性が示唆された。

一方、mSOD1 の脊髄神経細胞において、細胞周期の異常な亢進に付随した L1 の発現増加は、ORF2 領域の転写量増加を伴っていた。そこで、L1 配列全長の発現増強に伴う L1 転位の有無を調べたところ、脊髄前角部位において L1-GFP 陽性の神経細胞が高頻度に分布することが明らかとなった。脊髄全角は、ALS などで選択的に障害される運動ニューロンが分布する領域であることから、L1 転位の有無が神経変性疾患の部位特異性を決定している可能性が新たに浮上した。このことは同時に、L1 による免疫依存性の神経細胞障害とは別に、L1 転位の有無自体が、神経細胞障害の直接的な原因となる可能性を示唆しており、今後、詳細な解析を進める必要があることが分かった。本章の解析結果から、神経変性疾患モデルマウスにおいては、病態の発症に伴う Eomes 陽性 Th 細胞の浸潤と、細胞周期の異常な亢進による神経細胞内 L1 由来タンパク質の高発現が同時に生じていることが明らかとなり、免疫依存性の神経細胞障害機序の誘導に必要な要素が全て揃っていることが明らかとなった。次章では、各神経変性モデルマウスにおいて、これらの要素の協同作用が、実際に神経細胞障害を引き起こすかどうかについて検証を行った。

## 第 4 章

### 神経変性モデルマウスにおける免疫依存性神経細胞 障害機序の成立とその意義の解明

#### 4-1 目的

第2章および第3章の解析から、2種類の神経変性疾患モデルマウスと神経変性病態を伴う SPMS モデルマウスという、臨床症状や経過が全く異なる3種類の病態モデルマウスを用いて、慢性炎症に付随する中枢神経系への Eomes 陽性 Th 細胞の浸潤と病態の進行に伴う増加、および病変部位と関連した神経細胞の L1 活性化が、各病態モデルに共通して認められる病態に関連した変化であることを明らかにした。急性～亜急性の経過をとる SPMS モデルマウスと、より緩徐進行性の経過をたどる神経変性モデルマウスでは、L1 活性化に至る分子機序に違いがあったが、各モデルマウスの病態形成に伴って、少なくとも中枢神経系内に Eomes 陽性 Th 細胞が浸潤していること、および L1 由来の ORF1 タンパク質の発現が増強した神経細胞が存在すること、が新たに示された。以上の結果は、本研究において神経変性病態を引き起こす免疫依存性の神経細胞障害機序は、神経変性疾患の垣根を越えて、普遍的な神経細胞死の誘導に積極的に関与する可能性を強く示唆している。

獲得免疫系の活性化による標的細胞の障害とこれに引き続く排除は、生体防御と生体の恒常性維持のための免疫応答の根源的な細胞応答の一つである。一般的には、細菌やウイルスなどの微生物感染において、CD8陽性のキラーT細胞がエフェクターT細胞として働き、細菌やウイルス感染細胞の細胞障害を引き起こす。例えば、ウイルスに感染した体細胞や、これに由来するがん細胞などは、ウイルス由来タンパク質、あるいはがん化に伴うがん特異的タンパク質に由来するペプチド分子を、細胞表面に発現した MHC クラス I 分子上に抗原提示し、これをキラーT細胞が認識することで、標的細胞の細胞死を引き起こす。この時、キラーT細胞が産生するパーフォリンが、標的細胞の細胞膜を貫通する筒状の重合体を形成し、この孔を通してキラーT細胞由来のグランザイムが細胞内に侵入する。その後、カスパーゼなどの基質を分解することで標的細胞にアポトーシスが誘導される (Metkar et al., 2003)。本研究で着目した Eomes 陽性 Th 細胞は、ヘルパー細胞でありながらグランザイム

B 発現する特殊な免疫細胞である。Eomes は、グランザイム B やパーフォリンの発現を直接制御する転写因子で、CD4 陽性 T 細胞に異所性に発現した Eomes が、グランザイム B の発現を引き起こし、細胞障害性の表現型を獲得するものと考えられる。したがって Eomes 陽性 Th 細胞は、抗原提示細胞上の MHC II 分子を介した内在分子を認識してグランザイム B を放出し、周辺の標的細胞に非特異的な細胞死を引き起こす危険性がある。中枢神経組織内に浸潤した Eomes 陽性 Th 細胞が、何らかの抗原提示を受けて活性化した場合、放出されたグランザイム B の到達範囲に存在する神経細胞が連鎖的に障害されることが想定される。

第 2 章で示した通り、EAE マウスの中枢神経組織由来の Th 細胞が、ORF1 抗原の提示を受けて活性化することが、MHC II 依存性のカルシウムインフラックスの上昇の結果から示されている。以上より、3 種類の疾患モデルマウスの中枢神経細胞内において、何らかの理由で突発的な神経細胞死が生じると、死細胞を取り込んだミクログリアが神経細胞由来の ORF1 タンパク質を抗原提示し、これを認識した Eomes 陽性 Th 細胞が、グランザイム B を放出することで周辺の神経細胞をさらに障害し、病変部位を広げていくことが予想される。すなわちこの免疫依存性神経細胞障害が、3 種類の疾患モデルマウスにおける神経細胞障害と病変部位の伝播、拡大を説明する分子機序の一つであることが考えられる。そこで本章では、各疾患モデルマウスの中枢神経組織由来の Th 細胞のグランザイム B 放出が、ORF1 抗原の存在下で増強するのか、そしてこのグランザイム B 放出が実際に神経細胞障害を引き起こすか、の 2 点について実験的な証明を試みた。最後に、神経変性モデルマウスの臨床症状が、L1 の制御により改善するかどうかを調べることにより、一連の解析を通じて神経変性疾患との関連を示してきた免疫依存性の神経細胞障害機序を調べることにした。

## 4-2 結果

### 4-2-1 ORF1 による中枢神経系由来 Th 細胞の活性化とグランザイム B 放出

これまでの解析から、3種の神経変性モデルマウスにおいて、中枢神経系への Eomes 陽性 Th 細胞の浸潤と増加、および病変部位の神経細胞における L1 活性化を示してきた。さらに SPMS モデルマウスの CNS 由来の Th 細胞が、ORF1 タンパク質の抗原提示により活性化し、Ca<sup>2+</sup> influx が亢進することも明らかにした。そこで、グランザイム B 陽性の Eomes 陽性 Th 細胞を各疾患モデルマウスの中枢神経系から分離し、ORF1 抗原への曝露がグランザイム B を放出に必要な十分であるかどうかを確かめることにした。今回用いた3種の神経変性モデルマウスそれぞれの中枢神経組織から単離した Th 細胞を、ORF1 タンパク質を抗原提示した正常マウスの骨髄由来樹状細胞 BMDCs と共培養することで、Th 細胞からのグランザイム B の放出を、Enzyme-linked immune absorbent spot (ELISpot) assay を用いて定量した (図 4-1A)。その結果、3種の神経変性疾患モデルマウス由来のいずれの Th 細胞も、ORF1 抗原の提示により活性化し、グランザイム B 産生細胞のスポット数が、ORF1 非存在下と比較して増加することが明らかとなった (図 4-1B)。Eomes 陽性画分をほとんど含まない EAE マウスの脾臓 Th 細胞では、グランザイム B のスポット数自体も低値にとどまり、さらに ORF1 タンパク質の有無によるスポット数の変化も認められなかった。以上の結果から、ORF1 抗原による Eomes 陽性 Th 細胞の活性化が、確かに神経細胞障害性のグランザイム B 放出を引き起こすことが示され、さらに神経変性モデルマウスである mSOD1 マウスと 5xFAD マウスの CNS 由来 Th 細胞においても、同様の反応が認められることが分かった (図 4-1C, D)。複数の神経変性モデルマウスにおける、ORF1 抗原依存性の Eomes 陽性 Th 細胞の活性化が、グランザイム B の放出を引き起こすことが確かめられたことで、神経変性病態下の神経細胞内で起こる L1 の活性化とそれに伴う ORF1 タンパク質の発現が、Eomes 陽性 Th 細胞の活性化を引き起こし、結果的に神経細胞障害を生じる



#### 4-2-2 中枢神経系由来 Th 細胞による神経細胞障害の誘導

前項の解析結果から、複数の神経疾患モデルマウスにおいて、中枢神経系内に集積した Eomes 陽性 Th 細胞の増加が、ORF1 抗原の提示を受けて活性化し、グランザイム B の放出が増強することが示された。そこで次に、活性化した中枢神経系由来の Th 細胞が、実際に神経細胞障害を引き起こすか、さらにこの神経細胞障害がグランザイム B 依存性であるか、の 2 点について検討することにした。前項と同様に、SPMS モデルマウス、mSOD1 マウス、5xFAD マウスそれぞれの中枢神経組織から単離した Th 細胞を、正常 C57BL/6 マウス胎児 (15.5 dpc) の海馬から得た初代培養神経細胞と 3 日間共培養した後に、生存していた神経細胞の割合を比較定量した。その結果、EAE マウス中枢神経組織由来の Th 細胞は、培養神経細胞と共培養しただけでは細胞障害を引き起こすことはなく、抗 CD3 抗体の存在下でのみ、顕著な神経細胞死を引き起こすことが分かった(図 4-2A)。一方、mSOD1 マウスと 5xFAD マウス中枢神経組織由来の Th 細胞では、抗 CD3 抗体非存在下でも有意な神経細胞死が認められ、抗 CD3 抗体添加の効果は mSOD1 マウスでのみわずかに認められたが、5xFAD マウスでは認められなかった (図 4-2B,C)。以上の結果から、3 種類の神経疾患モデルマウスのいずれにおいても、中枢神経系由来の Th 細胞は神経細胞障害活性を示すことが明らかとなった。特に、今回用いた mSOD1 マウスや 5xFAD マウスでは、中枢神経系に集積した Th 細胞は、その近傍ですでに生じていると予想される神経細胞死によって、in vivo ですでに十分な活性化状態を獲得しており、緩徐進行性の病態下の神経変性疾患モデル由来の Th 細胞は、神経細胞障害には in vitro の追加の抗原刺激を必要としないのであろうと考えられた。次に、ここで示された神経細胞死の誘導が、グランザイム B 依存性の反応であることを確認するために、5xFAD マウスに加えて、同マウスをグランザイム B 欠損マウスと掛け合わせた、グランザイム B 欠損 5xFAD マウスの中枢神経系から分離した Th 細胞を用いて、先ほどと同様に神経細胞に対する障害性の比較を行なった。その結果、5xFAD マウス由来の Th 細胞との共培養により誘導された神経細胞死数は、グランザイム

B 欠損 5xFAD マウス由来の Th 細胞ではキャンセルされることが明らかとなり、CNS 由来 Th 細胞との共培養で誘導される神経細胞障害が、グランザイム B 依存性であることが確かめられた(図 4-3)。以上の解析結果から、神経疾患モデルマウスの神経細胞内で発現量増加した ORF1 抗原などに、中枢神経系に浸潤した Th 細胞が活性化し、グランザイム B の放出を介して直接的に神経細胞障害を引き起こすことが示された。

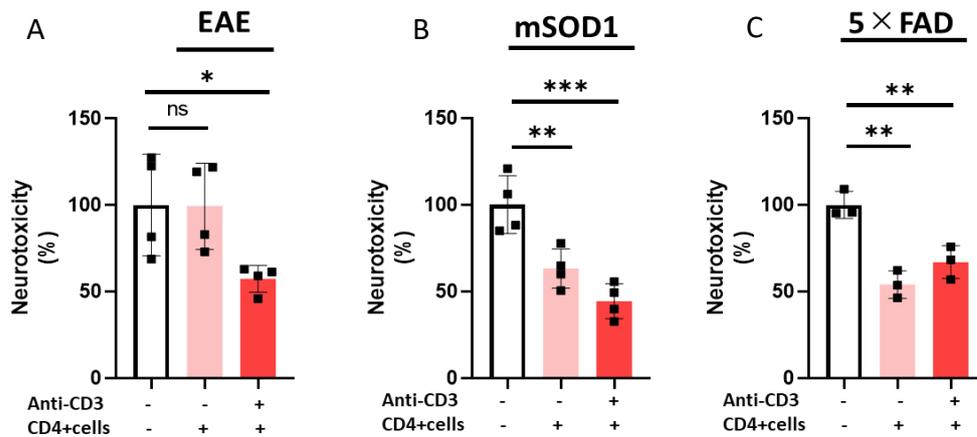


図 4-2 初代培養神経細胞を用いた神経疾患モデルマウス CNS 由来 Th 細胞の神経細胞障害性の解析  
 (A) EAE マウス CNS 由来の Th 細胞を海馬由来初代培養神経細胞と 3 日間共培養した際の神経細胞残存率を示した。n=4, \*P<0.05, ns; 有意差なし  
 (B) mSOD1 マウス (16 週齢) CNS 由来の Th 細胞を海馬由来初代培養神経細胞と 3 日間共培養した際の神経細胞残存率を示した。n=4, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001  
 (C) 5xFAD マウス (12 か月齢) CNS 由来の Th 細胞を海馬由来初代培養神経細胞と 3 日間共培養した際の神経細胞残存率を示した。n=3, \*\*P<0.01

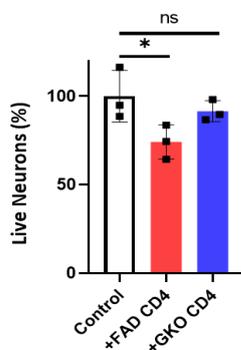


図 4-3 マウス胎児海馬由来初代培養神経細胞を用いた神経細胞障害活性のグランザイム B 依存性の解析。Control: Th 細胞非存在下 (抗 CD3 抗体のみ添加)、FAD CD4: 5xFAD マウスの CNS 由来 Th 細胞と共培養、GKO CD4: /グランザイム B 欠損 5xFAD マウスの CNS 由来 Th 細胞と共培養し、培養後 3 日目の生存神経細胞の割合を示す。n=3, \*P<0.05, ns; 有意差なし

#### 4-2-3 L1 活性化阻害剤の病態改善効果と神経細胞障害性 Th 細胞の抑制

前項までの解析から、複数の神経疾患モデルマウスの CNS 由来 Th 細胞が、活性化に伴って神経細胞障害性のグランザイム B を放出すること、および培養神経細胞に対して直接的な神経細胞障害活性を示し、この障害活性がグランザイム B 依存的であること、などが明らかとなった。一連の神経細胞障害性は、慢性炎症下に生じた Eomes 陽性 Th 細胞の CNS 内浸潤と、同時に神経細胞内で生じた異所性の L1 活性化の結果として生じると考えられることから、最後に L1 活性化を阻害する薬剤の投与により、神経変性病態の改善が得られるかどうかについて検討を試みた。まず SPMS モデルマウスの神経変性病態に対して、レトロウイルス治療剤であるヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤(NRTI)のうち、L1 の ORF2 タンパク質に対しても阻害活性を示す薬剤の一つであるラミブジン(3TC)を経口投与することにより、症状の改善が得られるかを検討した。まず SPMS モデルマウスに対して、発症時より 3TC の経口投与を行ったところ、病態の有意な改善が認められた (図 4-4A)。さらにこのとき、中枢神経組織内の Eomes 陽性 Th 細胞の集積が、3TC 投与後に対照群に比べ有意に減少していること、さらに神経細胞内における L1 由来の ORF1 発現量も減少傾向にあることが確かめられた(図 4-4B,C)。

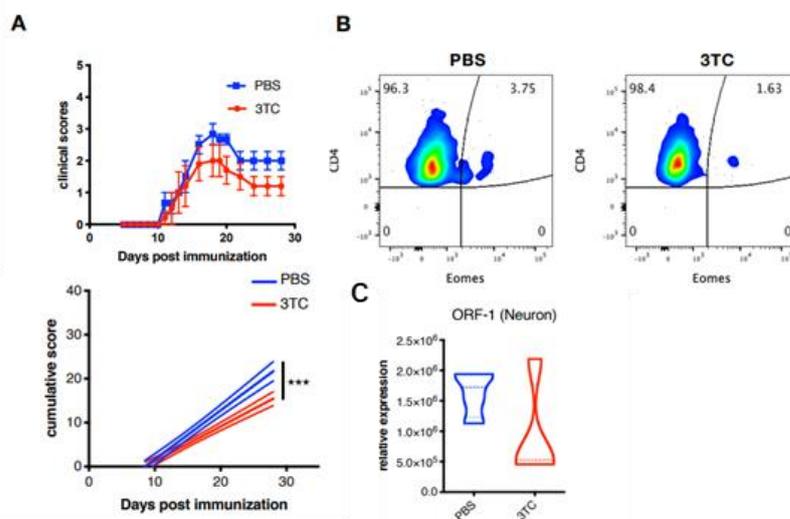


図 4-4 L1 活性化の阻害による SPMS モデルマウスの病態改善効果 (A) SPMS モデルマウスに 3TC または PBS を週 5 日間経口投与した時の臨床スコアの結果。\*\*\*,  $P < 0.001$ . (B) CNS 浸潤 Th 細胞の Eomes 発現比較の結果。\*,  $P < 0.05$ . (C) 神経細胞の ORF1 発現の比較結果。有意差なし。

同様に、神経変性疾患モデルマウスに対する 3TC の病態改善効果を検証するための実験を行った。生後 9 週齢の mSOD1 マウスに対して 3TC を経口投与し、実験終了時まで投与を継続した。グリップテストを週 1 回試行することにより神経変性による筋肉の萎縮の程度を測定し、病態進行の指標とした。その結果、筋肉強度は 3TC 投与群でより維持される傾向が認められ、ORF1 と ORF2 の発現も減少傾向が認められたが、残念ながら有意差は得られなかった (図 4-5A,B)。一方、SPMS モデルマウスの検討の場合と同様に、脊髄神経組織内への Eomes 陽性 Th 細胞の浸潤は、3TC 投与群で有意に減少することが確か

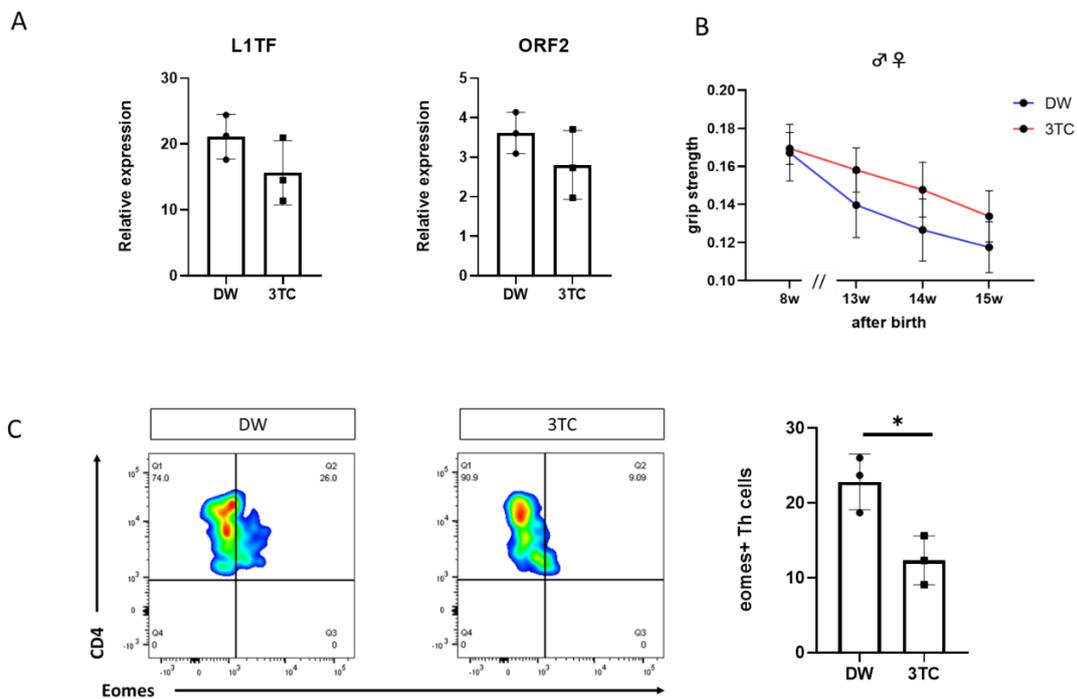


図 4-5 L1 活性化の阻害による mSOD1 マウスの病態改善効果

(A) 脊髄神経細胞における ORF1 および ORF2 領域の転写産物の発現量変化を RT q-PCR 法を用いて定量し、対照群と 3TC 投与群の間で比較解析した結果。

(B) グリップテストの経時的な解析結果。DW: 対照群 (水投与)、3TC: 3TC 投与群、 $n=8$

(C) CNS 浸潤 Th 細胞の内 Eomes 発現頻度の解析結果 (左: フローサイトメトリーによる解析画像。右: 統計解析後の結果、 $n=3$  \* $P < 0.05$ )

められた(図 4-5C)。よって今回の研究で用いた SPMS モデルマウスと mSOD1 マウスのいずれにおいても、3TC の経口投与による L1 の逆転写酵素阻害による神経変性症状の改善傾向と L1 転写の抑制傾向が認められ、同時に中枢神経系への Eomes 陽性 Th 細胞の有意な減少効果が得られた。L1 の異所性活性化が、Eomes 陽性 Th 細胞の機能制御を介して、神経変性病態の形成に関わっている可能性が示された。

### 4-3 考察

第2章および第3章の解析から、共通して神経変性病態を呈しつつも、臨床症状や経過が全く異なる3種類の病態モデルマウスにおいて、発症に伴う中枢神経系への Eomes 陽性 Th 細胞の浸潤と増加、および神経細胞の L1 活性化が、各モデルマウスに共通して認められる病態に関連した変化であることが示されたことから、本章では、L1 由来の ORF1 タンパク質が CNS 浸潤 Th 細胞の活性化抗原としてグランザイム B 産生を誘導するか、さらに活性化した CNS 由来 Th 細胞が神経細胞を直接障害する活性を示すか、の2点について検討を加え、いずれも予想通りに生じていることを確認することができた。

まず SPMS と Eomes 陽性 Th 細胞の関連については、SPMS 患者の末梢血と中枢神経組織内で、Eomes 陽性 Th 細胞が選択的に増加すること、特に末梢血中の Eomes 陽性 Th 細胞頻度は、神経変性病態を反映する障害進行度と極めてよく相関することが明らかとなっている (Raveney et al., 2021)。さらに SPMS 患者末梢血由来の Th 細胞においても、抗 CD3 抗体による活性化によってグランザイム B の放出が増強することが示されている (未発表データ)。本研究では、さらにそのプロトタイプ抗原としての ORF1 タンパク質の機能と挙動を詳細に解析し、CNS 浸潤 Th 細胞が ORF1 刺激を受けて活性化することで、グランザイム B 依存性の神経細胞障害に対して中心的な役割を果たすことが明らかとなった。

さらに今回の解析結果から、神経変性疾患モデルマウスにおいても、同様の機序が神経変性病態に共通して関与することが新たに示され、神経変性疾患患者の病態形成過程においても、類似の機序が関与する可能性が初めて示された。慢性炎症環境がもたらすエピジェネティクスの攪乱は、L1 などの非 LTR 型レトロトランスポゾン以外にも、LTR 型レトロトランスポゾンである内在性レトロウイルスの発現を亢進させることが報告されている。また、多様な non-coding RNA に含まれる 100 アミノ酸以下の短い読み枠は、そのサイズから機能的なタンパクをコードするとは見なされず、「non-coding」の名前がついたわけだが、

これらの翻訳産物も抗原提示細胞の MHC クラス II 上に提示されるペプチドのソースとしては十分意味があると予想される。今回の研究では、L1 遺伝子の構造が、進化の過程で比較的保存されていることと、約 50 万コピーという 1 ゲノム中の最大のコピー数から、3TC による介入実験などにおいて、病態との相関を示すことがより容易だろうという予測に基づいて解析を進め、L1 がコードする ORF1 がプロトタイプ抗原の一つであることを示した。上記の異所性発現遺伝子の翻訳産物の多くマクロな細胞応答としては検出できないかもしれないレベルで、類似の機序に CNS 浸潤 Th 細胞の活性化を通じて免疫依存性の神経細胞障害に関与することは十分に考えられる。今後、神経変性モデルマウス由来の神経細胞を対象としたプロテオミクス解析などを通じて、さらなる未知抗原の探索を行いたいと考えている。

さて神経変性疾患の神経細胞内に認められるタンパク質の異常凝集に対して、その凝集タンパク質が T 細胞を活性化するという報告はいくつかあり (Ciccocioppo et al., 2020)、パーキンソン病に関連した  $\alpha$ -シヌクレイン ( $\alpha$ -Syn) に対する免疫反応が最も研究が進んでいる。CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞が共に  $\alpha$ -Syn に対する反応性を示すことが報告されている (Sulzer et al., 2017)。病態下の  $\alpha$ -Syn はさまざまな分子内修飾を受けるため、それらがネオ抗原として T 細胞に認識される可能性はあるが、それらの T 細胞の反応が  $\alpha$ -Syn に対する自己免疫応答かどうかは不明であり、さらにパーキンソン病における T 細胞の活性化が、黒質緻密部の神経細胞を障害する機序もわかっていない。本研究で示した Th 細胞応答との最大の違いは自己免疫応答への依存性の有無であり、Eomes 陽性 Th 細胞の活性化は自己免疫応答とは無関係に、異所性に発現した L1 由来タンパク質をネオ抗原として認識することにより惹起される。MS などの発症においては、潜伏感染した EB ウイルス由来のタンパク質とミエリン抗原との間の交差反応によって自己反応性 T 細胞が活性化する、いわゆる「molecular mimicry (分子模倣)」という機序が知られているが、免疫依存性神経細胞障害に関わる Eomes 陽性 Th 細胞も、元々 L1 由来タンパク質に反応して増殖、分化した

とは考えにくいため、何らかの未知分子に反応性の Th 細胞が、L1 タンパク質に対する分子模倣を介して活性化している可能性もある。

さて一連の解析結果から、SPMS および 2 種の神経変性モデルマウスにおいて、

- ① 発症に伴う中枢神経組織内への Eomes 陽性 Th 細胞の浸潤増加
- ② 発症に伴う神経細胞の L1 活性化と ORF1 タンパク質の発現上昇
- ③ ORF1 反応性の CNS 浸潤 Th 細胞によるグランザイム B 依存性の神経細胞障害

がそれぞれ示された。先行研究から、グランザイム B 遺伝子の欠損マウスに SPMS 相当の病態を誘導すると、対照マウスに比べて臨床症状が有意に改善し、グランザイム B 欠損による細胞障害性の低下が、病態改善の原因であることがわかっていた。本研究ではさらに、海馬由来初代培養神経細胞と神経疾患モデルマウス由来 Th 細胞の共培養実験から、3 つの神経変性モデルマウスのすべてで、Th 細胞によるグランザイム B 依存性の神経細胞死を示すことに成功し、神経細胞死を伴うより広範な神経変性疾患に共通する免疫依存性の神経細胞障害機序の重要性が明らかとなった。

この結果を受けて最後に、L1 の活性化阻害剤による免疫依存性の神経変性病態の改善効果を検討した結果、3TC 投与群では臨床症状の改善あるいは改善傾向と、これに伴う脊髄神経細胞内の L1 発現が抑制される傾向にあり、Eomes 陽性 Th 細胞の浸潤程度も有意に低下していた。L1 の活性化が免疫依存性神経細胞障害に中心的な役割を果たすこと示す新たなデータが得られたが、今回、一部の解析においては、3TC の有意な抑制効果を示すことができなかった。今後 3TC の飲水投与に切り替えるなど投与方法を改善することにより、有意な病態改善効果を得るための解析を継続して実施していく予定である。

前述の通り 3TC は、レトロ転位に関わる逆転写酵素を標的とする逆転写酵素阻害剤であり、ORF1 タンパク質の発現が直接阻害されることは考えにくい。3TC による L1 発現抑制の可能性としては、逆転写酵素阻害によって宿主ゲノム内への転位が完了せず、細胞質内に蓄積したフリーの核酸によって cGAS-STING や RIG-I-MDA5 などの核酸センサー

が活性化する。その結果産生される I 型インターフェロン(IFN-I)の抗ウイルス作用により、L1 転写抑制と ORF1 の発現量減少、さらには Eomes 陽性 Th 細胞数の減少が生じたと考えれば説明がつく。一方、L1-GFP レポーターマウスを用いた解析から、L1 転位の頻度と分布が神経細胞選択的に異なることが明らかとなり、特に脊髄前角細胞の L1 転位の頻度が著しく高い傾向を示すことが分かった。免疫依存性神経細胞障害は、先行する自律的な神経細胞死に伴う抗原の供給に応じて発動することから、3TC が神経変性病態の抑制効果を示したという結果は、L1 転位そのものが自律的な神経細胞死の制御に関与する可能性を示している。すなわち L1 による自律的細胞死の頻度低下により免疫依存性神経細胞障害が阻害されたとすれば、ALS において運動ニューロンが選択的に障害される理由も十分に説明が可能となる。L1 が、自律的および非自律的神経細胞死の双方に関わるという新たな可能性が示されたため、神経変性疾患における L1 の役割をより包括的に解析することで、解明困難とされている神経変性疾患の発症機序の全貌を明らかにしていきたいと考えている。

## 第5章

### 総括と今後の展望

AD、PD、ALS などに代表される神経変性疾患の発症メカニズムは不明であり、根本的な治療法はいまだ開発されていない。多様な疾患名で臨床診断上は区別される神経変性疾患は、確かに神経変性が生じる部位と、それに伴う臨床症状が多様であるにも関わらず、共通したいくつかの特徴的な所見があることが知られている。神経細胞内の異常な凝集タンパク質の蓄積は、そのような特徴的な所見の一つで、例えば患者剖検脳の解析から、AD では  $A\beta$ 、PD では  $\alpha$ -Syn、ALS では TDP-43 といったように、疾患ごとに特定のタンパク質の凝集体が病変部位と相関して確認されることが多い。特に、家族性の神経変性疾患患者では、それらの凝集タンパク質をコードする遺伝子内に特定の変異が認められることから、変異タンパク質の gain of function または loss of function と神経変性疾患の病態との関連を明らかにすることが、神経変性疾患研究の主流となっている。ところが、変異遺伝子を導入したトランスジェニックマウスモデルなどが、ヒトの神経変性疾患のすべての病態を反映するとは限らないことや、遺伝子は正常な孤発性患者の大半でも特定のタンパク質の異常凝集が確認できることから、凝集タンパク質の存在そのものが病態と直接関連するかどうかについては長年議論が続いている。また凝集タンパク質の種類は疾患ごとに完全に区別されるものではなく、各神経変性疾患の間で著しいオーバーラップが認められる。したがって、現在知られているタンパク質の異常凝集自体が特定の機能を獲得あるいは喪失することで、各神経変性疾患に特徴的な病態を引き起こしている可能性と同程度に、これらのタンパク質凝集が何らかの形で働きかけることで発症が促進される、神経変性病態のより根本的な原因が各神経変性疾患に共通して存在する可能性がある。そのような原因は必ずしも神経細胞のみに求める必要はなく、本研究ではそのような各神経変性疾患に共通して存在する根本的な原因の一つとして、免疫依存性の神経細胞障害の存在を示すことにはじめて成功し、その病態機序の解明の過程で、神経変性疾患を脳全体の炎症症状と密接に関連した異常として捉えることで、神経細胞自律的・非自律的な両方の側面から、神経変性病態の全体像に迫ることができた。(次頁表)

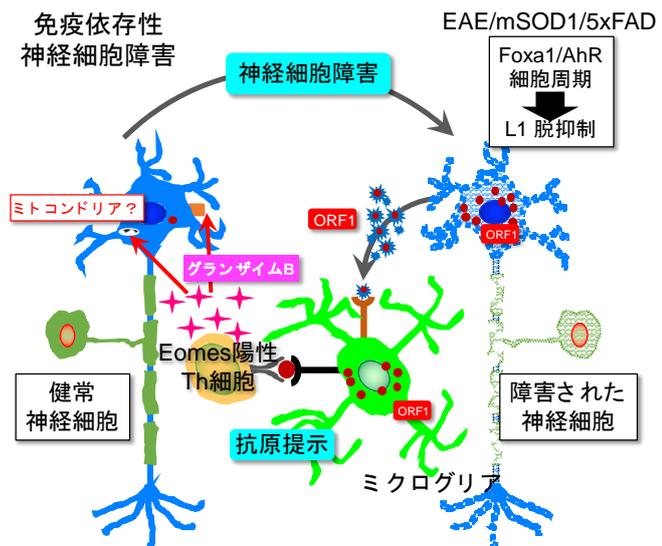
実験データから得られた成果のまとめ

モデルマウス	Eomes陽性Th細胞	LINE-1活性化	活性化抗原/細胞応答	神経細胞障害	病態抑制
SPMS	増加 (脊髄)	発現亢進	ORF1/Granzyme B放出	Yes	Eomes除去/3TC投与
ALS	増加 (脊髄)	発現亢進	ORF1/Granzyme B放出		3TC投与 (部分的抑制)
AD	増加 (CNS)	発現亢進	ORF1/Granzyme B放出	Yes	

SPMS;神経変性を伴う多発性硬化症、ALS;筋萎縮性側索硬化症、AD;アルツハイマー型認知症、3TC;逆転写酵素阻害剤 (LINE-1阻害活性有り)

神経変性疾患では、神経変性部位に慢性炎症を生じることが知られており、慢性炎症はエピジェネティックな制御を破綻させることで、異所性の遺伝子発現を誘導するとともに、Th細胞を含む様々な免疫細胞を炎症局所にリクルートする。本研究では、3種類の神経変性モデルマウスを用いて、慢性炎症環境下における神経細胞のL1の発現亢進と、これに伴うORF1タンパク質の異所性発現を示した。この際、SPMSモデルマウスではFoxa1の過性とキヌレニンによるAhRの活性化が、mSOD1マウスでは神経細胞

周期の異常な亢進が、それぞれL1の発現亢進に関与していた。さらに異所性に発現したORF1タンパク質が、抗原提示細胞に取り込まれてT細胞に抗原提示されることで、Eomes陽性Th細胞を活性化し、グランザイムB依存性の神経細胞障害を引き起こすことを明らかにした (右図)。



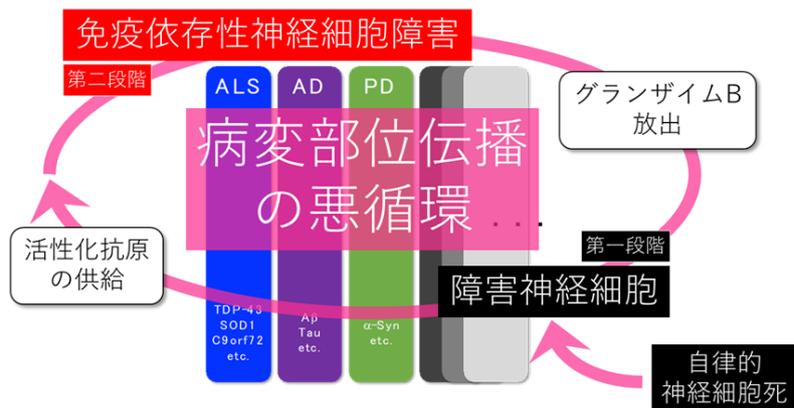
グランザイムBが神経細胞を障害する機序としては、細胞内と細胞表面の基質をそれぞれ標的とする2通りの可能性が考えられる。細胞内の主要な基質としては、カスパーゼの切断による活性化と、ミトコンドリア呼吸鎖のcomplex Iの切断があり、いずれも標的細胞のアポトーシスを直接誘導することができる。ただしグランザイムBが細胞内基質に到達するためには、通常グランザイムBとセットで働くパーフォリン分子が、標的細胞の細胞膜内

に重合体のポアが形成されることで、細胞質に取り込まれる。ところが、これまでに Eomes 陽性 Th 細胞のパーフォリン発現が明確に確認されていないことから、この経路が神経細胞のアポトーシス誘導の初期に関与するかどうかは定かではない。一方、神経細胞表面に発現するグランザイム B の基質として、Par-1 分子が知られている。Par-1 はトロンピン受容体とも言われ、トロンピンによる分子内切断により活性化するが、グランザイム B による Par-1 の切断は神経細胞死を誘導する。よって初期には Par-1 がグランザイム B の標的となり、ダメージが蓄積した神経細胞では、さらにカスパーゼやミトコンドリアが標的となって、最終的に神経細胞死を引き起こすものと考えられる。

すでに何度か述べている通り、本研究で明らかにした免疫依存性の神経細胞障害は、一般的な免疫応答による Eomes 陽性 Th 細胞の活性化を必要とするため、先行する神経細胞死と、そこから供給される抗原が必須である。現時点では、異常タンパク質の凝集が、この先行する神経細胞死を担う可能性が高いが、実際どのような機序によるかは今のところ不明であり、今後の詳細な解析が必要である。いずれにせよ先行する神経細胞死によって免疫依存性の神経細胞死が誘導されることで、新たに生じた死細胞からさらなる抗原が供給される。そして、この悪循環サイクルが複数回繰り返されることにより、より効率的な神経細胞障害を引き起こすことが予想される。本研究結果から、この神経細胞障害の二段階仮説が、

神経変性病態の伝播、拡散に重要な役割を果たすことが明らかとなった（右図）。

さて病変の伝播と、不可逆的な進行性の神経障害部位の拡散は神経変性疾患で認められる特徴の一つである。一般的に、神経細胞内外の異常凝集タンパク質の集積だけでは、この進行性の変化をうまく説明することはできない。そこで異常凝集タンパク質の多くが、



いわゆるプリオン様ドメインを持つという点に着目して、これらのタンパク質も、プリオンタンパク質と同様に細胞間を伝搬し、その結果として神経変性部位を拡大するというプリオン仮説が提唱されている。しかしながら、神経変性疾患に関わる多様なタンパク質が、プリオンタンパク質と共通の機序で異常タンパク質の拡散を引き起こすと考えるには、各タンパク質の構造に関する情報が明らかに不足しており、具体的な神経細胞障害機序自体が不明である。さらに明らかな感染性を示す病原性プリオンタンパク質と異なり、特殊な条件下においてタンパク質の構造異常が誘発されたことを示唆する痕跡の検出が中心であり、個体間の伝播についてもいまだ検証が不十分であることから、プリオン仮説のみで神経変性疾患における障害部位の伝播を説明することは困難と考えられる。本研究で主な解析対象とした Eomes 陽性 Th 細胞は、中枢神経組織内における異所性発現タンパク質由来の抗原認識を皮切りに、グランザイム B による周囲の神経細胞死と抗原提示細胞による取り込み、さらなる Eomes 陽性 Th 細胞の活性化、という悪循環サイクルを引き起こす。したがって、本研究で明らかにした免疫依存性神経細胞障害機序は、神経細胞非自律的な神経障害機序として、神経変性疾患における神経障害部位の伝播機序を、プリオン仮説にかわって説明するという点で、大変有意義であると考えられる。

繰り返しになるが、神経変性疾患の病態を引き起こす免疫依存性の神経細胞障害において、Eomes 陽性 Th 細胞の少なくとも最初の活性化には、抗原供給源として先行する神経細胞死が必須である。本研究においてその意義が完全には明らかになっていないことの一つに、SPMS モデルマウスと mSOD1 マウスの両方で、活性化に L1 の伴うレトロ転位が、脊髓神経前角部位に集中して認められたということがある。3TC 投与により mSOD1 マウスの筋萎縮が抑制される傾向にあったことや、mSOD1 マウスにおける選択的な運動ニューロンの脆弱性を考えると、L1 転位と神経細胞障害の部位選択に何らかの関連があることが示唆される。L1 レトロ転位は、宿主ゲノム内への L1 転写産物の逆転写によっておこり、転位部位はクロマチン構造の状態によっても左右される。興味深いことに、細胞周期の亢進

に伴って形成される複製フォーク近傍に、L1 がレトロ転位のためにアタックした結果として生じる異常な DNA 構造は、適当な DNA 修復機構が働かないと、合成致死による細胞死を引き起こすことが報告されている(Liu et al.; Mita et al.)。神経細胞内で起きる L1 転位が、同様の細胞死を引き起こすかどうかは、今後解析していく必要があるが、DNA 複製の異常も神経変性疾患で共通して認められる重要な所見の一つであることは注目に値する。したがって、本研究で明らかにした神経変性疾患モデルにおける成熟神経細胞の細胞周期亢進と、それに伴う L1 の活性化は、複製フォーク近傍への L1 転位を亢進させることにより、合成致死による初期の神経細胞死を引き起こす可能性は十分に考えられる。その意義についてはあまり注目されていないが、 $A\beta$  や  $\alpha$ -Syn には細胞周期を亢進させる活性があること(Liu et al.)、TDP-43 や FUS は DNA 修復過程に関与すること(Ratti and Buratti)がそれぞれ分かっており、神経変性疾患関連の各種タンパク質の病原性とも矛盾なく説明することができる可能性がある。今後は、レトロ転位を視覚的に検出できる L1-GFP マウスと、例えば神経細胞の細胞周期のステージを視覚的に解析することが可能な FUCCI マウスなどを組み合わせて解析を進めることで、神経細胞の細胞周期亢進と L1 転位の併存による細胞致死をさらに解析していくことで、初期の神経細胞障害と L1 との活性化の関連、さらには障害部位選択性に関する新しい知見が得られると考えている。

最後にまとめると、本研究は L1 由来 ORF1 抗原による免疫依存性の神経細胞障害が、グランザイム B の放出と拡散によって、初期の神経死に続く障害部位の伝播、拡大という神経変性疾患に共通する病態の未知の分子機序を明らかにしたという点で、大変有意義だと考えている。また、本研究が提唱する発症機序の二段階仮説は、神経変性疾患の病態研究にこれまでにない新しい視点をもたらし、研究分野の発展が後押しされることで、治療法の開発に役立つ新しい発見を導く手掛かりになることが期待される。今後、神経細胞における L1 の挙動をさらに詳細に解析することで、各神経変性疾患における病変部位の特異性の解明を含めた、神経変性疾患の発症機序の全貌に迫りたいと考えている。

## 材料と方法

### 実験用マウス

EAE 誘導に用いたマウスはすべて 6-8 週齢のマウスである。mSOD1 と 5xFAD マウスは 1 それぞれ生後 150 日、15 か月までに実験を行った。マウスは 12 時間ごとに明暗を繰り返す換気された室内で常温の飲水と試料を与えられ SPF 環境下で飼育された。動物実験では神経傷害による苦痛を伴うことが予想されるが、手術時には適切な麻酔薬を用い、術後管理を徹底することで可能な限り苦痛を軽減できるように努めた。また、適切なエンドポイントを設定し、実験終了後には安楽死を行った。飼育、管理は国立精神・医療研究センター動物実験委員会によって承認のもと行われた(R3-53)。

### EAE の誘導と病態評価

6-8 週齢のマウスに 1mg heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Gifco) を含んだ complete Freund's adjuvant に 100  $\mu$ g の MOG<sub>35-55</sub> ペプチドをソニケーションにより乳化したものを腋下のリンパ節付近に免疫した。EAE 導入 1 日目と 3 日目に 100ng の pertussis toxin を腹腔内投与した。病態評価は、0, no clinical signs; 0.5, tail weakness; 1, partial tail paralysis; 1.5, severe tail paralysis; 2, flaccid tail; 2.5, flaccid tail and hind limb weakness; 3, partial hind limb paralysis; 3.5, severe hind limb paralysis; 4, total hind limb paralysis; 4.5, hind and fore leg paralysis; 5, death として行った。

### フローサイトメトリー解析

それぞれの神経疾患モデルマウス中枢神経組織から単離した細胞は、RT、30 分で細胞表面染色を行った。さらに細胞内染色を行う場合は、4°C、15 分の固定後に膜透過剤中で抗体染色を行った。細胞は FACS Canto II cell analyzer (BD Biosciences) でデータ取得後、FlowJo software (BD BioSciences) で解析を行った。以下に染色に用いた抗体を示す。an Aqua

Live/Dead fixable staining reagent (Invitrogen, USA). Monoclonal antibodies (anti-CD4 (GK1.5), anti-CD8 (53-6.7), anti-CD19 (1D3/CD19), anti-CD45 (30F11), anti-Eomes (Dan11Mag), anti-TCR  $\beta$  (H57-597) and anti-GZMB (QA16A02) were obtained from BioLegend or Thermo-Fisher. 細胞周期の解析には Hoechst33342 染色液で染色した神経細胞を FACS Aria IIu cell sorter (BD BioSciences) に cell cycle phases ( $G_0/G_1$ , S, and  $G_2/M$ ) でそれぞれ分取した。

#### 成体マウス中枢神経組織由来神経細胞の培養

脊髄神経組織から神経細胞のみを単離するために、MACS adult brain dissociation kit(Miltenyi Biotech)を用い、添付のプロトコールに従って以下の実験を行った。

最初に成体マウスから脊髄神経組織を摘出し、1匹につき、付属の BufferA950  $\mu$ l を添加後、enzymeP 50  $\mu$ l と enzymeY20  $\mu$ l+enzymeA10  $\mu$ l(計 30  $\mu$ l)を添加し、GentleMACS Octo Dissociator (Miltenyi Biotech)機器を用いて ADBK\_2 プログラムにより細断した。次に、密度勾配遠心分離法により脂質を除去し、それ以外の細胞分画を non-neuron antibody-conjugated magnetic beads により標識したものを磁気カラムにより精製し、神経細胞のみを単離した。単離後の神経細胞を  $3.5 \times 10^5$  cells/mL の細胞濃度で DMEM+(Gibco)に懸濁し、poly-L-lysine(100  $\mu$ g/mL)と laminin(2.5  $\mu$ g/mL)を 37°C、4 時間インキュベートによりコーティングした 48 ウェルプレートに 200  $\mu$ l 播種した。その後 5%CO<sub>2</sub>、37°Cのインキュベータに静置し、24h 後に下記の siRNA 処理を行った。

#### siRNA 処理

培養した成体マウス中枢神経組織由来神経細胞に Foxa1 特異的 siRNA 処理を行うために、Magnetofection NeuroMag kit (OZ BIOSCIENCES)を用いた。4 種類の Foxa1 特異的 siRNA(10  $\mu$  M)とスクランブル RNA(20  $\mu$  M)を、それぞれ最終濃度 100nM になるように

200  $\mu$ l の Opti-MEM に懸濁し、さらに付属の磁気ビーズ 2.5  $\mu$ l を添加し懸濁後、室温で 20 分静置し、その後指定の磁気プレート上で室温 15 分静置した。5%CO<sub>2</sub>、37°C のインキュベーターに戻し、24 時間後と 48 時間後に細胞を回収し、350  $\mu$ l の RLT 溶液、または、100  $\mu$ l の NP-40 細胞溶解液に溶解し、直ちに -80°C に保存した。

### RNA 抽出と qRT-PCR 法

細胞からの RNA 抽出には RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用い、核・細胞質に分画した RNA 抽出には Cytoplasmic & Nuclear RNA purification Kit (Norgen Biotek) を用い、添付のプロトコールに従って実験を行った。転写産物の定量は、抽出した RNA をランダムヘキサマーを含む first-strand cDNA Kit (Takara Bio) によって cDNA 化し、SYBR Green Master mix (Roche) に混合した後、LightCycler 96 instrument (Roche Diagnostics) を用いたリアルタイム qRT-PCR 法によって行った。

### 免疫染色法

免疫染色画像取得のために成体マウスを PBS と 4% para-formaldehyde (PFA) で還流固定後、脊髄組織を摘出し、4% PFA 中で 4°C、24h 固定した。その後 PBS で RT、4 h 洗浄後、7%、15%、30% スクロールでそれぞれ 4 h、RT で置換を行った。その後、ドライアイス上で O.C.T. compound (Sakura Finetek, USA) に包埋し、-80°C に保管した。凍結切片作成には、Cryostar NX70 cryostat (Thermo Fisher Scientific) を用い、厚さ 30  $\mu$ m でスライドグラスにセクションニング後、風乾し、-80°C に保存した。染色直前に RT に戻し、よく乾燥させた後、0.2% PBS-triton、5 分で脱脂をし、PBS で 3 回洗浄後、SEA BLOCK blocking buffer で 1h、RT ブロッキングした。1 次抗体は 24h、4°C で染色後、PBS で 3 回洗浄し、2 次抗体は 4h、RT で染色した。PBS 3 回洗浄後、fluorescence mounting medium with DAPI (Southern Biotech, USA) を滴下し、カバーガラスで覆った。蛍光色素 conjugate 抗体を用い

る場合は、4h、RT で処理後、同様の方法でサンプリングした。すべての画像は BZ-X710 automated fluorescence microscope (Keyence, Japan)によって取得した。染色に用いた抗体を以下に示す。Rabbit anti-L1 ORF1p (Novusbio, USA), Alexa Fluor 488-conjugated rabbit anti-NeuN (Abcam), Alexa Fluor 647-conjugated Anti-Rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, USA), Alexa Fluor 647-conjugated rabbit anti-NeuN (Abcam)(1:200), anti-Olig2 (biorbyt)(1:50), Alexa Fluor 488-conjugated anti-Olig2 (Millipore)(1:50), Alexa Fluor 647-conjugated anti-Iba1 (Millipore, USA) (1:50), anti-IBA1 (LSBio, USA) (1:50), Alexa Fluor 647-conjugated anti-GFAP (invitrogen, USA) (1:50), Alexa Fluor 488-conjugated anti-GFAP (invitrogen, USA) (1:50), Alexa Fluor 647-conjugated anti-Rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, USA)(1:200). For cell cycle analysis, Alexa Fluor 647-conjugated anti-Geminin (Santa Cruz, USA)(1:50), Alexa Fluor 488-conjugated anti-Cdt1(Santa Cruz, USA)(1:50) and Alexa Fluor 647-conjugated anti-pRB1(Santa Cruz, USA)(1:50)

#### 競合 ELISA 法を用いたキヌレニンの定量

キヌレニンタンパク質量の定量には EAE マウス脊髄組織を摘出後、Kynurenine ELISA high sensitive kit (KR3728, IDK Germany)を用いて、添付のプロトコールに従って実験を行った。添付の buffer 内で脊髄組織を氷中でホモジナイズし、14,000g で 10 分間、4°Cで遠心した。上清のみを回収後、キヌレニンの定量を行った。

#### 細胞周期の解析

前述の手法により、成体マウス脊髄組織から神経細胞を単離後、Hoechst33342(DOJINDO, Japan)1:100 で 37°C、30 分間染色した。最後の 5 分間は Live/Dead Near-IR Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, USA)1:100 を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベータ内に静置した。細胞は FACS Aria

Ilu cell sorter によって G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>/M phase でそれぞれ分取した。

### ELISpot 解析

ORF1 タンパク質発現のために、発現プラスミド pRSET ベクター(Invitrogen)に全長の ORF1 配列を挿入し(Hohjoh and Singer, 1996; Hohjoh and Singer, 1997)、TNT T7 Quick Coupled Transcription/ Translation System (Promega)で in vitro 翻訳により ORF1 タンパク質を取得した。ORF1 タンパク質の発現確認のために Transcend tRNA(Promega)を用いて発光色素で標識された tRNA により発現させた ORF1 タンパク質を in vitro system で作製し、SDS-PAGE 法により定量した。骨髄由来樹状細胞作製のために、B6 マウスから骨髄細胞を摘出し、20ng/ml GM-CSF を含んだ DMEM 中で培養した。培養開始後 3 日目と 6 日目に半量を新鮮な medium に交換した。培養開始後 8 日目に、100ng/ml lipopolysaccharide(LPS)と 20ng/ml の IL-4 を添加し、再び CO<sub>2</sub> インキュベータの中で 24h 静置した。その後、FACS Aria Ilu cell sorter によって CD11<sub>c</sub><sup>+</sup>、MHC II<sup>hi</sup>、F4/80<sup>-</sup>細胞のみを骨髄由来樹状細胞として分取し、in vitro translation system によって取得した ORF1 タンパク質に 6-12 時間曝露した。中枢神経組織由来の Th 細胞を FACS Aria Ilu cell sorter によって分取し、ELISpot plate 上で BMDC と共培養し、72h、37°C、CO<sub>2</sub> インキュベータ内に静置した。PBS で 2 回洗浄後、抗 CD4 抗体と抗グランザイム B 抗体で標識された plate メンブレン上に残った細胞を ELISpot mouse CD4<sup>+</sup>/GranzymeB kit (R&D)に含まれる抗グランザイム抗体で染色し、そのスポット数を定量した。

### 神経細胞障害性の解析

海馬由来初代神経細胞作製のために E15.5 胎児マウス海馬由来の神経細胞を摘出し、96well plate 内で DMEM+medium 中、24h、37°Cで培養した。培養開始後 2 日目に培養液を Neurobasal Medium (Miltenyi)、NeuroBrew -21(MACS)、sodium pyruvate(Gibco)、2-

ME(Gibco)に置換した。培養開始後3日目に、培養液を Neurobasal Medium (Miltenyi)、 NeuroBrew -21(MACS)、sodium pyruvate(Gibco)に置換し、その後は3日おきに半量交換した。14日目に FACS Aria IIu cell sorter によって分取したそれぞれの神経疾患モデルマウス中枢神経組織由来 Th 細胞を加え(EAE; 5000cells/well, SOD.FAD; 2000<sup>Th</sup> cells/well)、72h、37°C、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で共培養した。PBS で2回洗浄後、CellToter-Glo 2.0(Promega)により ATP 量を定量し、残存した生細胞数の解析を行った。

## 参考文献

Allen Reish, H.E., and Standaert, D.G. (2015). Role of alpha-synuclein in inducing innate and adaptive immunity in Parkinson disease. *J Parkinsons Dis* *5*, 1-19.

Amor, S., and Woodroffe, M.N. (2014). Innate and adaptive immune responses in neurodegeneration and repair. *Immunology* *141*, 287-291.

Arendt, T., Bruckner, M.K., Mosch, B., and Losche, A. (2010). Selective cell death of hyperploid neurons in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* *177*, 15-20.

Blaudin de Thé, F.X., Rekaik, H., Peze - Heidsieck, E., Massiani - Beaudoin, O., Joshi, R.L., Fuchs, J., and Prochiantz, A. (2018). Engrailed homeoprotein blocks degeneration in adult dopaminergic neurons through LINE - 1 repression. *The EMBO Journal* *37*.

Burns, K.H., and Boeke, J.D. (2012). Human transposon tectonics. *Cell* *149*, 740-752.

Ciccocioppo, F., Bologna, G., Ercolino, E., Pierdomenico, L., Simeone, P., Lanuti, P., Pieragostino, D., Del Boccio, P., Marchisio, M., and Miscia, S. (2020). Neurodegenerative diseases as proteinopathies-driven immune disorders. *Neural Regen Res* *15*, 850-856.

Cova, E., Ghiroldi, A., Guareschi, S., Mazzini, G., Gagliardi, S., Davin, A., Bianchi, M., Ceroni, M., and Cereda, C. (2010). G93A SOD1 alters cell cycle in a cellular model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cell Signal* *22*, 1477-1484.

De Cecco, M., Ito, T., Petrashen, A.P., Elias, A.E., Skvir, N.J., Criscione, S.W., Caligiana, A., Broccoli, G., Adney, E.M., Boeke, J.D., *et al.* (2019). L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature* *566*, 73-78.

Deczkowska, A., Keren-Shaul, H., Weiner, A., Colonna, M., Schwartz, M., and Amit, I. (2018). Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell* *173*, 1073-1081.

Deniz, O., Frost, J.M., and Branco, M.R. (2019). Regulation of transposable elements by DNA modifications. *Nat Rev Genet* *20*, 417-431.

Dubois, B., Villain, N., Frisoni, G.B., Rabinovici, G.D., Sabbagh, M., Cappa, S., Bejanin, A., Bombois, S., Epelbaum, S., Teichmann, M., *et al.* (2021). Clinical diagnosis of Alzheimer's

disease: recommendations of the International Working Group. *The Lancet Neurology* 20, 484-496.

El Hajjar, J., Chato, W., Hanna, R., Nkanza, P., Tetreault, N., Tse, Y.C., Wong, T.P., Abdouh, M., and Bernier, G. (2019). Heterochromatic genome instability and neurodegeneration sharing similarities with Alzheimer's disease in old Bmi1<sup>+/-</sup> mice. *Sci Rep* 9, 594.

Faulkner, G.J., Kimura, Y., Daub, C.O., Wani, S., Plessy, C., Irvine, K.M., Schroder, K., Cloonan, N., Steptoe, A.L., Lassmann, T., *et al.* (2009). The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells. *Nat Genet* 41, 563-571.

Garruto, R.M. (2009). Contributions of isolated Pacific populations to understanding neurodegenerative diseases. *Folia Neuropathol* 47(2):149-70.

Glont, S.E., Chernukhin, I., and Carroll, J.S. (2019). Comprehensive Genomic Analysis Reveals that the Pioneering Function of FOXA1 Is Independent of Hormonal Signaling. *Cell Rep* 26, 2558-2565 e2553.

Grundman, J., Spencer, B., Sarsoza, F., and Rissman, R.A. (2021). Transcriptome analyses reveal tau isoform-driven changes in transposable element and gene expression. *PLoS One* 16, e0251611.

Haig H. Kazazian, J., 1 and John L. Goodier (2002). LINE Drive: Retrotransposition and Genome Instability. *Cell* 110, 277-280.

Hohjoh, H., and Singer, M.F. (1996). Cytoplasmic ribonucleoprotein complexes containing human LINE-1 protein and RNA. *The EMBO Journal* 15, 630-639.

Hohjoh, H., and Singer, M.F. (1997). Sequence-specific single-strand RNA binding protein encoded by the human LINE-1 retrotransposon. *The EMBO Journal* 16, 6034-6043.

Ilieva, H., Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 187, 761-772.

Ippati, S., Deng, Y., van der Hoven, J., Heu, C., van Hummel, A., Chua, S.W., Paric, E., Chan, G., Feiten, A., Fath, T., *et al.* (2021). Rapid initiation of cell cycle reentry processes protects neurons from amyloid-beta toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118.

Ishak, C.A., Marshall, A.E., Passos, D.T., White, C.R., Kim, S.J., Cecchini, M.J., Ferwati, S., MacDonald, W.A., Howlett, C.J., Welch, I.D., *et al.* (2016). An RB-EZH2 Complex Mediates

Silencing of Repetitive DNA Sequences. *Mol Cell* *64*, 1074-1087.

Joseph, C., Mangani, A.S., Gupta, V., Chitranshi, N., Shen, T., Dheer, Y., Kb, D., Mirzaei, M., You, Y., Graham, S.L., *et al.* (2020). Cell Cycle Deficits in Neurodegenerative Disorders: Uncovering Molecular Mechanisms to Drive Innovative Therapeutic Development. *Aging Dis* *11*, 946-966.

Kebir, H., Kreyborg K Fau - Ifergan, I., Ifergan I Fau - Dodelet-Devillers, A., Dodelet-Devillers A Fau - Cayrol, R., Cayrol R Fau - Bernard, M., Bernard M Fau - Giuliani, F., Giuliani F Fau - Arbour, N., Arbour N Fau - Becher, B., Becher B Fau - Prat, A., and Prat, A. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation.

Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T.K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., *et al.* (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* *169*, 1276-1290 e1217.

Kerur, N., Fukuda, S., Banerjee, D., Kim, Y., Fu, D., Apicella, I., Varshney, A., Yasuma, R., Fowler, B.J., Baghdasaryan, E., *et al.* (2018). cGAS drives noncanonical-inflammasome activation in age-related macular degeneration. *Nat Med* *24*, 50-61.

Kingsbury, M.A., Friedman B Fau - McConnell, M.J., McConnell Mj Fau - Rehen, S.K., Rehen Sk Fau - Yang, A.H., Yang Ah Fau - Kaushal, D., Kaushal D Fau - Chun, J., and Chun, J. (2005). Aneuploid neurons are functionally active and integrated into brain circuitry. *PNAS*.

Kwidzinski, E., and Bechmann, I. (2007). IDO expression in the brain: a double-edged sword. *J Mol Med (Berl)* *85*, 1351-1359.

Larouche, J.D., Trofimov, A., Hesnard, L., Ehx, G., Zhao, Q., Vincent, K., Durette, C., Gendron, P., Laverdure, J.P., Bonneil, E., *et al.* (2020). Widespread and tissue-specific expression of endogenous retroelements in human somatic tissues. *Genome Med* *12*, 40.

Li, W., Prazak, L., Chatterjee, N., Gruninger, S., Krug, L., Theodorou, D., and Dubnau, J. (2013). Activation of transposable elements during aging and neuronal decline in *Drosophila*. *Nat Neurosci* *16*, 529-531.

Liu, E.Y., Russ, J., Cali, C.P., Phan, J.M., Amlie-Wolf, A., and Lee, E.B. (2019). Loss of Nuclear TDP-43 Is Associated with Decondensation of LINE Retrotransposons. *Cell Rep* *27*,

1409-1421 e1406.

Liu, S.L., Wang, C., Jiang, T., Tan, L., Xing, A., and Yu, J.T. The Role of Cdk5 in Alzheimer's Disease.

Machhi, J., Kevadiya, B.D., Muhammad, I.K., Herskovitz, J., Olson, K.E., Mosley, R.L., and Gendelman, H.E. (2020). Harnessing regulatory T cell neuroprotective activities for treatment of neurodegenerative disorders. *Mol Neurodegener* *15*, 32.

Masrori, P., and Van Damme, P. (2020). Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *Eur J Neurol* *27*, 1918-1929.

Mathys, H., Adaikkan, C., Gao, F., Young, J.Z., Manet, E., Hemberg, M., De Jager, P.L., Ransohoff, R.M., Regev, A., and Tsai, L.H. (2017). Temporal Tracking of Microglia Activation in Neurodegeneration at Single-Cell Resolution. *Cell Rep* *21*, 366-380.

McCabe, M.T., Brandes, J.C., and Vertino, P.M. (2009). Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res* *15*, 3927-3937.

Metkar, S.S., Wang, B., Ebbs, M.L., Kim, J.H., Lee, Y.J., Raja, S.M., and Froelich, C.J. (2003). Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *J Cell Biol* *160*, 875-885.

Mita, P.A.-O., Sun, X., Fenyő, D.A.-O., Kahler, D.A.-O., Li, D., Agmon, N., Wudzinska, A., Keegan, S., Bader, J.A.-O., Yun, C., *et al.* BRCA1 and S phase DNA repair pathways restrict LINE-1 retrotransposition in human cells.

Morrice, J.R., Gregory-Evans, C.Y., and Shaw, C.A. (2018). Animal models of amyotrophic lateral sclerosis: A comparison of model validity. *Neural Regen Res* *13*, 2050-2054.

Muotri, A.R., Marchetto, M.C., Coufal, N.G., Oefner, R., Yeo, G., Nakashima, K., and Gage, F.H. (2010). L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature* *468*, 443-446.

Noor, A., Zafar, S., and Zerr, I. (2021). Neurodegenerative Proteinopathies in the Proteoform Spectrum-Tools and Challenges. *Int J Mol Sci* *22*.

Oblak, A.L., Lin, P.B., Kotredes, K.P., Pandey, R.S., Garceau, D., Williams, H.M., Uyar, A., O'Rourke, R., O'Rourke, S., Ingraham, C., *et al.* (2021). Comprehensive Evaluation of the 5XFAD Mouse Model for Preclinical Testing Applications: A MODEL-AD Study. *Front Aging Neurosci* *13*, 713726.

- Okudaira, N., Iijima, K., Koyama, T., Minemoto, Y., Kano, S., Mimori, A., and Ishizaka, Y. (2010). Induction of long interspersed nucleotide element-1 (L1) retrotransposition by 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), a tryptophan photoproduct. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 18487-18492.
- Oshikawa, M., Okada, K., Nakajima, K., and Ajioka, I. (2013). Cortical excitatory neurons become protected from cell division during neurogenesis in an Rb family-dependent manner. *Development* *140*, 2310-2320.
- Park, D.S., Morris E J Fau - Padmanabhan, J., Padmanabhan J Fau - Shelanski, M.L., Shelanski Ml Fau - Geller, H.M., Geller Hm Fau - Greene, L.A., and Greene, L.A. (1998). Cyclin-dependent kinases participate in death of neurons evoked by DNA-damaging agents.
- Perepelitsa-Belancio, V., and Deininger, P. (2003). RNA truncation by premature polyadenylation attenuates human mobile element activity. *Nat Genet* *35*, 363-366.
- Ponomaryova, A.A., Rykova, E.Y., Gervas, P.A., Cherdyntseva, N.V., Mamedov, I.Z., and Azhikina, T.L. (2020). Aberrant Methylation of LINE-1 Transposable Elements: A Search for Cancer Biomarkers. *Cells* *9*.
- Przedborski, S., Vila, M., and Jackson-Lewis, V. (2003). Series Introduction: Neurodegeneration: What is it and where are we? *Journal of Clinical Investigation* *111*, 3-10.
- Raine, C.S. (2000). Inflammation in Alzheimer's disease: a view from the periphery. *Neurobiology of Aging* *21* 437– 440
- Ramirez, P., Zuniga, G., Sun, W., Beckmann, A., Ochoa, E., DeVos, S.L., Hyman, B., Chiu, G., Roy, E.R., Cao, W., *et al.* (2022). Pathogenic tau accelerates aging-associated activation of transposable elements in the mouse central nervous system. *Prog Neurobiol* *208*, 102181.
- Ranganathan, S., and Bowser, R. (2003). Alterations in G(1) to S phase cell-cycle regulators during amyotrophic lateral sclerosis.
- Ratti, A., and Buratti, E. Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins.
- Raveney, B.J., Oki, S., Hohjoh, H., Nakamura, M., Sato, W., Murata, M., and Yamamura, T. (2015). Eomesodermin-expressing T-helper cells are essential for chronic neuroinflammation.

Nat Commun 6, 8437.

Raveney, B.J., Oki, S., and Yamamura, T. (2013). Nuclear receptor NR4A2 orchestrates Th17 cell-mediated autoimmune inflammation via IL-21 signalling. PLoS One 8, e56595.

Raveney, B.J.E., Sato, W., Takewaki, D., Zhang, C., Kanazawa, T., Lin, Y., Okamoto, T., Araki, M., Kimura, Y., Sato, N., *et al.* (2021). Involvement of cytotoxic Eomes-expressing CD4(+) T cells in secondary progressive multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A 118.

Rovaris, M., Confavreux, C., Furlan, R., Kappos, L., Comi, G., and Filippi, M. (2006). Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. The Lancet Neurology 5, 343-354.

Saleh, A., Macia, A., and Muotri, A.R. (2019). Transposable Elements, Inflammation, and Neurological Disease. Front Neurol 10, 894.

Savage, A.L., Lopez, A.I., Iacoangeli, A., Bubb, V.J., Smith, B., Troakes, C., Alahmady, N., Koks, S., Schumann, G.G., Al-Chalabi, A., *et al.* (2020). Frequency and methylation status of selected retrotransposition competent L1 loci in amyotrophic lateral sclerosis. Mol Brain 13, 154.

Schwartz, M., and Deczkowska, A. (2016). Neurological Disease as a Failure of Brain-Immune Crosstalk: The Multiple Faces of Neuroinflammation. Trends Immunol 37, 668-679.

Seol, Y., Ki, S., Ryu, H.L., Chung, S., Lee, J., and Ryu, H. (2020). How Microglia Manages Non-cell Autonomous Vicious Cycling of Abeta Toxicity in the Pathogenesis of AD. Front Mol Neurosci 13, 593724.

Shi, X., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2007). Cell divisions are required for L1 retrotransposition. Mol Cell Biol 27, 1264-1270.

Simon, D.K., Tanner, C.M., and Brundin, P. (2020). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. Clin Geriatr Med 36, 1-12.

Sliter, D.A., Martinez, J., Hao, L., Chen, X., Sun, N., Fischer, T.D., Burman, J.L., Li, Y., Zhang, Z., Narendra, D.P., *et al.* (2018). Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. Nature 561, 258-262.

Smith, C.C., Selitsky, S.R., Chai, S., Armistead, P.M., Vincent, B.G., and Serody, J.S. (2019). Alternative tumour-specific antigens. Nat Rev Cancer 19, 465-478.

Sulzer, D., Alcalay, R.N., Garretti, F., Cote, L., Kanter, E., Agin-Liebes, J., Liong, C., McMurtrey, C., Hildebrand, W.H., Mao, X., *et al.* (2017). T cells from patients with Parkinson's disease recognize alpha-synuclein peptides. *Nature* *546*, 656-661.

Sun, H., Wang Y Fau - Chinnam, M., Chinnam M Fau - Zhang, X., Zhang X Fau - Hayward, S.W., Hayward Sw Fau - Foster, B.A., Foster Ba Fau - Nikitin, A.Y., Nikitin Ay Fau - Wills, M., Wills M Fau - Goodrich, D.W., and Goodrich, D.W. E2f binding-deficient Rb1 protein suppresses prostate tumor progression in vivo.

Tam, O.H., Rozhkov, N.V., Shaw, R., Kim, D., Hubbard, I., Fennessey, S., Propp, N., Consortium, N.A., Fagegaltier, D., Harris, B.T., *et al.* (2019). Postmortem Cortex Samples Identify Distinct Molecular Subtypes of ALS: Retrotransposon Activation, Oxidative Stress, and Activated Glia. *Cell Rep* *29*, 1164-1177 e1165.

Teneng, I., Stribinskis V Fau - Ramos, K.S., and Ramos, K.S. (2007). Context-specific regulation of LINE-1.

Terry, D.M., and Devine, S.E. (2019). Aberrantly High Levels of Somatic LINE-1 Expression and Retrotransposition in Human Neurological Disorders. *Front Genet* *10*, 1244.

Tomiyama, H., Kokubo, Y., Sasaki, R., Li, Y., Imamichi, Y., Funayama, M., Mizuno, Y., Hattori, N., and Kuzuhara, S. (2008). Mutation analyses in amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula, Japan. *Mov Disord* *23*, 2344-2348.

Vahsen, B.F., Gray, E., Thompson, A.G., Ansorge, O., Anthony, D.C., Cowley, S.A., Talbot, K., and Turner, M.R. (2021). Non-neuronal cells in amyotrophic lateral sclerosis - from pathogenesis to biomarkers. *Nat Rev Neurol* *17*, 333-348.

van den Elsen, P.J., van Eggermond, M.C., Puentes, F., van der Valk, P., Baker, D., and Amor, S. (2014). The epigenetics of multiple sclerosis and other related disorders. *Mult Scler Relat Disord* *3*, 163-175.

Van Harten, A.C.M., Phatnani, H., and Przedborski, S. (2021). Non-cell-autonomous pathogenic mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Trends Neurosci* *44*, 658-668.

Vecsei, L., Szalardy, L., Fulop, F., and Toldi, J. (2013). Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat Rev Drug Discov* *12*, 64-82.

West, A.P., and Shadel, G.S. (2017). Mitochondrial DNA in innate immune responses and inflammatory pathology. *Nat Rev Immunol* 17, 363-375.

Wolf, Y., Shemer, A., Levy-Efrati, L., Gross, M., Kim, J.S., Engel, A., David, E., Chappell-Maor, L., Grozovski, J., Rotkopf, R., *et al.* (2018). Microglial MHC class II is dispensable for experimental autoimmune encephalomyelitis and cuprizone-induced demyelination. *Eur J Immunol* 48, 1308-1318.

## 報文目録

Immune-mediated neurodegenerative trait provoked by multimodal derepression of long-interspersed nuclear element-1

Fumio Takahashi, Chenyang Zhang, Hirohiko Hohjoh, Ben Raveney, Takashi Yamamura, Nobuhiro Hayashi, Shinji Oki

iScience 25, 104278, May 20, 2022

「神経変性疾患における免疫応答依存性神経細胞障害機序の解析」ポスター発表  
○高橋 文緒、張 晨陽、北條 浩彦、Ben Raveney、山村 隆、林 宣宏、大木 伸司  
第 44 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 2021/12/1-12/3

Disease-associated microglia as a pathogenic hub in immune cell-mediated neurodegeneration

「免疫依存性神経変性病態における疾患関連ミクログリアの役割」  
Shinji Oki, Ben Raveney, Fumio Takahashi, Takashi Yamamura, Chenyang Zhang  
第 64 回 日本神経化学会 奈良 2021/9/30-10/1

## 謝辞

学位論文を提出するにあたってお世話になった方々に、この場を借りて厚く御礼申し上げます。本研究は長い月日をかけて完成したものであり、非常にたくさんの方々にお力を貸していただきました。感謝の意を、所属し、お世話になった時系列順に分けて以下に記載いたしますが、東京工業大学生命理工学院教授 林 宣宏先生と国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部室長 大木 伸司先生のご指導なくしてはこの日を迎えることはありませんでした。最初に特筆するとともに、心から感謝いたします。

### 東京工業大学生命理工学院林研究室の皆様

最初に、主査を引き受けて下さった東京工業大学 生命理工学院 教授 林 宣宏先生に厚く御礼申し上げます。一度研究を諦めかけた私を研究室に温かく迎えて下さり、もう一度研究をする機会を与えて下さいました。また、所属後も何度か研究継続の危機の場面がありましたが、どのような選択をした際も、きっと大丈夫だと背中を押して下さったことは、その時の私にとって何よりも心強い声援でした。そして研究においては物理学を基礎とした生命科学の捉え方を常に忘れず、マクロな視点とミクロな視点で考える姿勢を近くで学ばせていただいた時間は、今後の研究者人生にとって宝物であると感じています。ありがとうございました。

林研究室でいつも研究を応援して下さい下さった東京工業大学 生命理工学院 林研究室 助教 傳田 公紀先生に厚く御礼申し上げます。困難な場面でいつも気にかけて下さったことは、研究生生活を続ける中でとても励みになりました。ありがとうございました。

そして、林研究室で実験手法を一から教えて下さった東京工業大学 生命理工学院 林研究室先輩の花房 慶 博士に厚く御礼申し上げます。本論文を書く上で、また生物系の研究者として必須の、実験の基礎を教えていただいたことは決して忘れません。研究室に所属したばかりで心細い中、花房さんのサポートがあり、希望をもって研究生生活を継続できました。ありがとうございました。

学生生活の様々なサポートをして下さった東京工業大学 生命理工学院 林研究室 事務支援員の金丸暁子さんに厚く御礼申し上げます。金丸さんは学生生活のみならず、育児の大先輩として研究との両立を常に励まし続けて下さいました。ありがとうございました。

国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部の皆様

研究生として迎えて下さった国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部部長の山村 隆先生に厚く御礼を申し上げます。いつもデータミーティングなどでくださったご助言は研究活動の励みとなっております。ありがとうございました。

そして、本論文作成にあたり多くの時間を割き、ご指導をしてくださった国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 室長の大木 伸司先生に心より御礼を申し上げます。研究部に迎え入れていただいた当初は、研究を最後までやり遂げることができるか不安でしたが、大木先生はどのような状況でも諦めることなく、常にポジティブな言葉掛けで励ましてくださいました。研究生生活の間には、ここに記すことができないほど、公私ともに様々な困難がありましたが、大木先生の励ましの言葉を胸に頑張ることで、いつも最後には道が開ける、そのような研究生生活でした。実験計画、実験手法、プレゼンテーションの仕方、論文の書き方、そして研究に対する心構えなど、研究に必要なことを多岐にわたり教えていただきました。大木先生のもとで学ばせていただいた研究生としての日々は何ものにも代え難い時間でした。本当にありがとうございました。

国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 研究員の張 晨阳博士には、マウス実験手技のすべてを教えていただいたこと、厚く御礼申し上げます。ありがとうございました。

国立精神・神経医療研究センター神経研究所神経薬理研究部 室長の北條 浩彦先生には、実験に関する様々なアドバイスをいただき、実験器具や実験試料を貸していただいたことに厚く御礼申し上げます。ありがとうございました。

また、免疫研究部で研究のサポートをしてくださった研究補助員の竹尾 明子さん、古藤 千春さん、井上 桐さんに厚く御礼申し上げます。未熟な研究生の私を常に励まし、サポートし、応援して下さったことは研究生生活を継続する大きな力になっていました。ありがとうございました。

そのほかの場面でお世話になった方々

研究や実験に関して困難に直面した際に、様々なアドバイス、サポートいただいた東京工業大学生命理工学院教授 一瀬 宏先生、東京工業大学科学技術創成研究院未来産業技術研究所 教授 柳田 保子先生にはこの場をお借りして厚く御礼申し上げます。

東京工業大学情報生命博士教育課程(ACLS)では、様々な支援をしていただき、特に教育院長の情報理工学院 情報工学系 教授 秋山 泰先生、情報生命博士教育課程 事務担当 岡田 知子さんを始めとする関係者の皆様に研究活動を支えていただいたことを深く感謝いたします。ACLS で得た分野を超えた知識や経験、人脈等を今後の研究生活においても大切にしていきたいと思えます。

林研究室の後輩各位、東京工業大学関係各位、国立精神・神経医療研究センター神経研究所各位にも厚くお礼を申し上げます。後輩各位におかれましては益々のご活躍を祈っております。

そして最後に、研究生活と学位取得を最後まで応援し支えてくれた父、母、叔母、そして息子の康一郎と、研究のきっかけをくれた祖父に心から感謝致します。

令和 4 年 5 月吉日 東京工業大学生命理工学院 林研究室

高橋 文緒