

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2015～2016
課題番号：15H06372
研究課題名(和文) 中枢神経疾患におけるミトコンドリアDNA放出機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of mitochondrial DNA release in the CNS

研究代表者

榊原 佳織 (Sakakibara, Kaori)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：40621280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアDNA (mtDNA) は自然免疫を活性化することが知られているが、本研究ではアクアポリン4抗体陽性視神経脊髄炎(NMO)において髄液中のmtDNAとその放出機構、病態への関連について検討した。NMO急性期における髄液mtDNAはNMOSD寛解期、MS急性期、その他神経疾患群と比較してそれぞれ有意に上昇していた。またNMOSD患者血清をアストロサイト培養に添加したところmtDNAは増加した。NMOSD急性期では髄液mtDNAは増加し、炎症性サイトカインの産生を促進する可能性が示唆された。NMOSDにおいて、mtDNAが炎症の促進など病態に関与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial DNA (mtDNA), one of damage-associated molecular patterns, has been reported to stimulate innate immunity. Recent studies suggest that activation of innate immunity occurs in the acute phase of NMOSD. We measured mtDNA levels in cerebrospinal fluid of NMOSD and compared to these of multiple sclerosis and other neurological diseases (ONDs) using quantitative PCR. We stimulated mouse primary astrocyte cultures with AQP4-Ab and measured the level of mtDNA in the supernatant. We added DNA fraction from the culture supernatant to microglia cultures, and measured IL-1 in the supernatants. The level of mtDNA was significantly higher in patients with acute NMOSD than remission NMOSD, acute MS, and ONDs. mtDNA level was increased in the supernatant of astrocyte cultures stimulated with AQP4-Ab. We also demonstrated that mtDNA promoted IL-1 secretion from microglia.

AQP4-Ab promotes mtDNA release from astrocytes. Our results suggest that mtDNA might be involved in NMOSD pathogenesis.

研究分野：神経免疫学

キーワード：ミトコンドリアDNA 視神経脊髄炎 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

近年ミトコンドリア DNA が炎症機転に関与することが明らかになってきている。ミトコンドリア DNA は核 DNA と異なりメチル化されていないため細菌やウイルスの DNA と同様に Toll like receptor 9 (TLR9) や cGAS-Sting などの自然免疫系の受容体により認識され、炎症を引き起こす (West et al. 2015, Nature)。これまで外傷や心不全でミトコンドリア DNA が炎症機転に関与し病態を悪化させること、オートファジー障害が炎症を促進することが報告されてきたが (Ota et al. 2012, Nature, Saito et al. 2008, Nature) その詳細なメカニズムは明らかではなく、また神経系での関与は報告されていなかった。申請者らはミトコンドリア呼吸鎖阻害剤であるロテノンで、マウスのニューロン及びアストロサイト初代培養にミトコンドリア障害を誘発したところ、細胞死が起きていない条件にもかかわらずミトコンドリア DNA が培養上清中に大量に放出されることを見出した。ミトコンドリア障害依存性のミトコンドリア DNA 放出はマウス胎児線維芽細胞 (MEF) や HEK293 細胞、COS 細胞、ヒト末梢血単核球では観察されず、神経系細胞特異的な現象と考えられる。さらに興味深いことにアストロサイトが自己免疫のターゲットとなり、視神経と脊髄に激しい炎症が起きる NMO 患者の急性期脳脊髄液においてミトコンドリア DNA の定量 PCR をおこなったところ、他神経疾患に比べて顕著な増加を認めた。NMO では髄液中の IL-1 が増加している一方で (Kitic et al. 2013, Acta Neuropathol Commun)、ミトコンドリア DNA はインフラマゾーム活性化を通じて活性化 IL-1 の産生を促進すると報告されている (Nakahira et al. 2011, Nature Immunology)。したがって申請者らは中枢神経系でもミトコンドリア DNA が炎症環境下で

細胞外に放出され、インフラマゾーム依存性に活性化型 IL-1 の産生を促進していると予測している。

2. 研究の目的

近年炎症機転をミトコンドリア DNA が促進することが明らかになってきている。ミトコンドリア DNA は重篤な外傷が起きたときに血液中に放出されて免疫細胞を活性化し、病態を重症化することが報告されている (Zhang et al. 2010, Nature)。これまで申請者はミトコンドリアの選択的なオートファジーであるミトファジーに関する基礎研究を行ってきたが、研究の過程でミトコンドリア障害を誘発したニューロンやアストロサイトからミトコンドリア DNA が放出されること、更にこの炎症機転はミトファジー促進因子 Parkin により抑制されることを見出した。また代表的な中枢神経炎症性疾患である視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica, NMO) 患者の急性期脳髄液でミトコンドリア DNA が増加していることも見出している。本研究ではこれらの知見に基づき、中枢神経系におけるミトコンドリア DNA 放出とその炎症への関与に焦点を当て、NMO をはじめとする中枢神経疾患における新たな炎症機転の解明を目指す。

3. 研究の方法

NMO ではアストロサイトに発現するアクアポリン 4 に対する自己抗体 (AQP4 抗体) により、アストロサイトに対する補体依存性細胞障害 (CDCC) と抗体依存性細胞障害 (ADCC) が起きている。まず補体存在下及び非存在下でマウスアストロサイト初代培養に AQP4 抗体を加えてミトコンドリア DNA が培地に増加する

か検討する。補体存在下ではネクローシスが起きるため増加が予想されるが ADCC によってもミトコンドリア障害が誘発されて増加する可能性を考えている。また AQP4 抗体と補体のマウス線条体内注入により NMO 患者で認められる IL-1 の増加、アストロサイト障害及びニューロン障害が再現できるが (Saadoun et al. 2010 Brain)、ASC KO、MyD88/TRIF KO、TLR9 KO、Parkin KO マウスで脳内注入モデルを作成し、IL-1、APP 及び GFAP の免疫染色を行い IL-1 の増加とニューロン及びアストロサイト障害が改善するかどうか検討する。最終的には NMO 患者の髄液のミトコンドリア DNA が含まれる分画を単独あるいは AQP4 抗体と共に脳内注入し、NMO の病態が再現できるかどうか検討する。

4. 研究成果

急性期 NMO 患者髄液中でミトコンドリア DNA が増加していることを見出した。ミトコンドリア DNA はアストロサイトあるいは AQP4 強制発現 HEK293 細胞に AQP4 抗体を添加した際に培地中に増加した。また NMO 髄液中の DNA 分画はミクログリアからの IL-1 を増加させること、その増加はインフラマゾームの阻害剤で阻害されることを見出した。NMO においては AQP4 抗体が中枢神経系でミトコンドリア DNA を増加させ、インフラマゾームの活性化を介して中枢神経系の炎症増幅に関与している可能性が推定される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(2 件)

1. Kimura T, Nada S, Takegahara N, Okuno T, Nojima S, Kang S, Ito D, Morimoto K, Hosokawa T, Hayama Y, Mitsui Y,

Sakurai N, Sarashina-Kida H, Nishide M, Maeda Y, Takamatsu H, Okuzaki D, Yamada M, Okada M, Kumanogoh A. Polarization of M2 macrophages requires Lamtor1 that integrates cytokine and amino-acid signals. Nat Commun. 2016; 7: 13130

2. Morimoto K, Baba Y, Shinohara H, Kang S, Nojima S, Kimura T, Ito D, Yoshida Y, Maeda Y, Sarashina-Kida H, Nishide M, Hosokawa T, Kato Y, Hayama Y, Kinehara Y, Okuno T, Takamatsu H, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Kurosaki T, Toyofuku T, Kumanogoh A. LRRK1 is critical in the regulation of B-cell responses and CARMA1-dependent NF-κB activation. Sci Rep. 2016; 6: 25738

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 2016.8.21-26 Kaori Sakakibara, Tatsusada Okuno, Yuji Nakatsuji, Hideki Mochizuki, Atsushi Kumanogoh Elevation of serum Sema4A in neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD)

16th International Congress of Immunology, Melbourne, Australia 2016

2. 榎原佳織, 奥野 龍禎, 甲田 亨, 宮崎雄生, 新野正明, 宮本勝一, 楠進, 深沢俊行, 熊ノ郷淳, 望月 秀樹 中辻 裕司.

NMOsd において血中 Sema4A は増加する

第 28 回 日本神経免疫学会学術集会、2016 年 9 月 29 日 ~ 30 日、長崎

3. 甲田 亨, 奥野 龍禎, 中辻 裕司, 宮崎雄生, 新野正明, 深沢俊行, 南波明子, 山下 和哉, 清水幹人, 熊ノ郷淳, 佐古田三郎, 望月 秀樹. 多発性硬化症治療選択バイオマーカー S e m a 4 A ~ フィンゴリモドとの相関について第 28 回 日本神経免疫学

会学術集会、2016年9月29日～30日、長崎

4. 南波明子 奥野龍禎 ,甲田亨 ,宮崎雄生 ,新野正明 ,宮本勝一 ,楠進 ,熊ノ郷淳 ,中辻裕司 ,望月秀樹 . 多発性硬化症患者における血清 Sema4A 高値群の臨床的特徴と、IFN- 開始後 5 年間の NEDA 達成率 . 第 28 回日本神経免疫学会学術集会 平成 28 年 9 月 29 日 長崎

5. 奥野 龍禎、甲田 亨、宮崎雄生、新野正明、宮本勝一、楠進、深沢俊行、熊ノ郷淳、望月 秀樹、中辻 裕司 . NMOsd において血中 Sema4A は増加する
第 57 回 日本神経学会学術大会、平成 28 年 5 月 18 日～21 日、神戸

6. 南波 明子 ,山下 和哉 ,甲田 亨 奥野 龍禎 ,熊ノ郷 淳 ,中辻 裕司 ,望月 秀樹 . 多発性硬化症患者における血清 Sema4A 値高値群の臨床的特徴 第 57 回日本神経学会学術大会 平成 28 年 5 月 19 日 神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

本研究も含め大阪大学神経内科の神経免疫グループの業績は

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/neurology/myweb6/group03.html>

にて公開している。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

榊原 佳織 (SAKAKIBARA Kaori) 大阪大学医

学系研究科 特任研究員

研究者番号 : 40621280

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

奥野 龍禎 (Tatsusada Okuno) 大阪大学医学系研究科 助教

研究者番号 : 00464248

(4)研究協力者

()