

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15341

研究課題名(和文) グリア特異的コネクシンコンディショナルノックアウトによる巨大同心円状脱髄巢の誘導

研究課題名(英文) Induction of concentric demyelinating lesion in glia-specific connexin conditional deficient mice.

研究代表者

吉良 潤一 (Kira, Jun-ichi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：40183305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、多発性硬化症の患者さんで、大脳に巨大病変を認める一群の病変部で、非神経細胞であるグリア細胞という細胞同士を繋ぐ「コネクシン」というタンパク質が早期に脱落することを発見した。しかし、このコネクシンの脱落がどうやって多発性硬化症病変を作るのか、そのメカニズムは不明であった。コネクシン欠損マウスは胎生期に死亡するため、これまでコネクシンの解析は困難だったが、グリア細胞特異的に、かつ時期を決めてコネクシンの発現を抑制する方法を考案し、その遺伝子改変マウスを用いて多発性硬化症の発症機序におけるコネクシンの機能解析を行った。

研究成果の概要(英文)：We previously published paper about the relationship between early loss of connexin and the mechanisms of multiple sclerosis. Thus we wanted to analyze how connexin loss affect to the pathology of MS. The animal model of inducible conditional connexins(Cx43 and 47) knockout mice were successfully developed and used for the analysis. We induced EAE on these mice and found significant differences between these cKO mice and WT controls. These data clearly indicated the importance of connexins as new therapeutic targets.

研究分野：神経科学

キーワード：多発性硬化症 コネクシン ミクログリア アストログリア オリゴデンドログリア

## 1. 研究開始当初の背景

私たちは、多発性硬化症(MS)の中でも、Balo 同心円硬化症や tumefactive MS(大きな病巣をもつ MS)では、中枢神経系において神経細胞の働きを助けるグリア細胞と呼ばれる非神経細胞同士を連結し血液と脳とのバリアを形成するのに重要な「コネクシン」と呼ばれるギャップ結合構成蛋白が広範囲に脱落し、グリア細胞同士の連絡(=グリアアセンブリ)が破綻していることを発見し、報告した(Masaki et al., Early disruption of glial communication via connexin gap junction in multiple sclerosis, Balo's disease and neuromyelitis optica. Neuropathology 2015)。しかしながら、このコネクシンの脱落が、多発性硬化症の病態生理に及ぼすメカニズムは未解明であった。コネクシン 43 は中枢神経系ではアストログリアに発現しているが、Cx43 欠損マウスは胎生期に死亡するため、機能解析が困難であった。また、実際の患者においても、Cx43 の脱落は病変形成の前に起こると考えられていることから、生下時からの欠損は実際の患者における病態を反映しているとは言えない。

## 2. 研究の目的

本研究では、アストログリアのコネクシン 43(Cx43)及びオリゴデンドログリアの Cx47 発現を細胞選択的かつ時期選択的に抑制できる inducible conditional knockout マウスをそれぞれの Cx について作成し、同マウスに実験的自己免疫性脊髄炎(EAE)を誘導することで、それぞれの細胞特異的な Cx 発現低下が疾患に及ぼす影響の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) アストログリア特異的・時限特異的 Cx43 欠損マウスの作成と EAE 誘導: Cx43<sup>f1/f1</sup> マウスと GFAP-Cre-ER マウスを交配し、Cx43<sup>f1/f1</sup>;GFAP-Cre-ER<sup>+/-</sup> マウスを作成した。同マウスにタモキシフェンを投与することにより、大脳灰白質、小脳皮質の Cx43 発現を低下させる。その上で髄鞘構成蛋白である myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG 蛋白を用いて能動的 EAE を誘導し、神経学的所見の推移を野生型と比較検討した。

(2) オリゴデンドログリア特異的・時限特異的 Cx47 欠損マウスの作成と EAE 誘導: Cx47<sup>f1/f1</sup> マウスと Plp-Cre-ER マウスを交配し、Cx47<sup>f1/f1</sup>;Plp-Cre-ER<sup>+/-</sup> マウスを作成した。同マウスでは中枢神経白質の Cx47 が脱落する。このマウスにおいても、と同様に EAE を誘導し、臨床経過を野生型と比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) アストログリア特異的 Cx43 脱落

Cx43<sup>f1/f1</sup>;GFAP-Cre-ER<sup>+/-</sup> (以下 Cx43cKO) マウスにタモキシフェンを投与し、Cx43 の脱落を確認したところ、大脳皮質、小脳皮質における遺伝子組み換え(X-gal で染色されている部位)を確認した(図 1)。

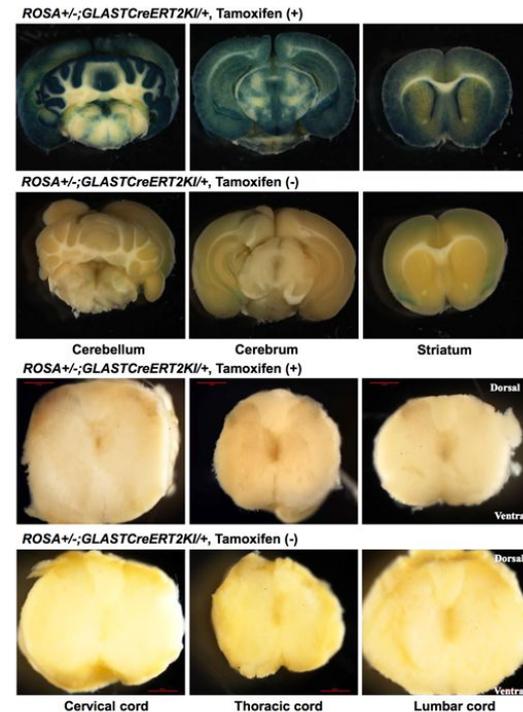


図 1 : X-galによるCx43cKOマウスにおけるCx43欠損部位の確認

驚いたことに、脊髄では X-gal による染色が確認できなかったことから、GFAP は主に大脳皮質、小脳皮質に強く発現していることが示唆された。

EAE 誘導 7 日前からタモキシフェンにより Cx43 の発現を抑制した上で、Day0 に EAE を誘導し、その後の経過を野生型と比較したところ、発症までの日数はほぼ同等であったが、その後の重症度は Cx43cKO マウスで有意に軽症化していた(図 2)。

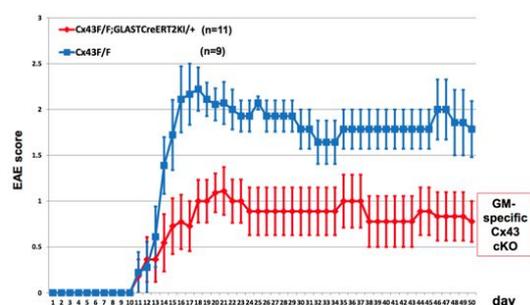


図 2 : Cx43cKOマウスにおけるEAEの軽症化

同マウスに脊髄では炎症細胞の浸潤や脱髄が有意に抑制されていた。現在そのメカニズムを解析中である。Cx43の脱落は脳で主に起こっているが、脊髄の炎症を軽減させたことについては、EAEの病態において脳から脊髄への何らかの信号伝達機構が存在し、Cx43cKOマウスではその信号伝達が阻害されているおかげで症状の軽減につながったことが考えられた。近年、グリア細胞間のギャップ結合が脳内のリンパ液還流 (glymphatic flow) に重要な役割を果たすという報告があり (Iiliff et al., A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. Science translational medicine, 2012)、本マウスにおいてはその機構の破綻もしくは機能障害をきたしている可能性も検討している。

(2) オリゴデンドログリア特異的Cx47脱落

Cx47fl/fl;Plp-Cre-ER+/- (以下 Cx47cKO) マウスにタモキシフェンを投与し、Cx47の脱落範囲をX-Gal染色で確認したところ、こちらは脳、脊髄を含む中枢神経系の白質に広範な染色 (=脱落) を認めた。やはりEAE誘導7日前からタモキシフェンによりCx47を白質特異的に脱落させ、Day0にEAEを誘導したところ、Cx43cKOとは逆に、発症後の重症度が悪化した(図3 緑線)。

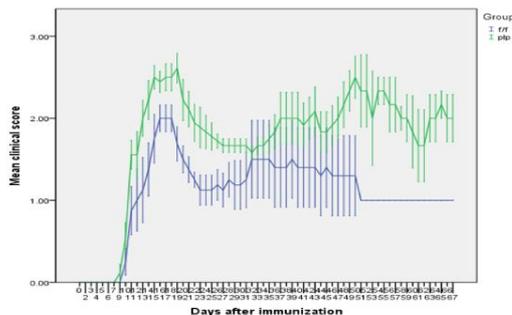


図3 : Cx47cKOマウスにおけるEAEの重症化

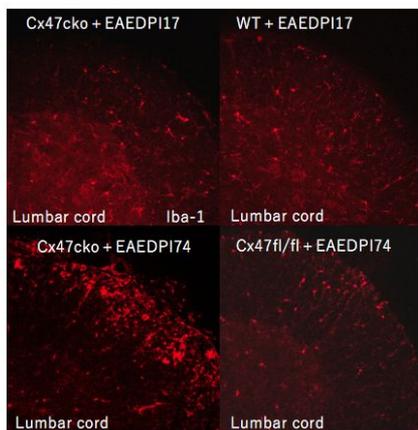


図4 : Cx47cKOマウスEAE病変におけるミクログリアの活性化と炎症細胞浸潤 (Iba1: マクローファージ・ミクログリア)

Cx47cKO マウス EAE の脊髄ではアストログリアの活性化や強い炎症細胞浸潤を認めた(図4)。再髄鞘化に關与するオリゴデンドログリアの解析は現在進行中である。

上記2点の結果は、グリア細胞特異的・時限特異的なコネクシン脱落モデル作成、および同モデルを用いたコネクシンの機能解析を可能にしたことや、同マウスにおける臨床症状の変化を認めたことによる新規治療法開発の手がかりを得た点で、大変貴重な発見である。今後も同マウスの解析を進め、多発性硬化症の疾患メカニズムの解明と分子標的両方の開発を目指す。

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](計0件)

[学会発表](計2件)

1) Hayato Une, Hiroo Yamaguchi, Yinan Zhao, Koji Shinoda, Katsuhisa Masaki, Magdalena Götz, Ryo Yamasaki and Jun-ichi Kira. Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice with induced conditional connexin 43 knock-out (Cx43cKO). 9th Pan Asian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (PACTRIMS)(Thailand) 2016.

2) Hayato Une, Hiroo Yamaguchi, Yinan Zhao, Koji Shinoda, Katsuhisa Masaki, Magdalena Götz, Ryo Yamasaki, Jun-ichi Kira. Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice with induced conditional connexin 43 knock-out (Cx43cKO). 第57回日本神経学会(兵庫)2016.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

吉良 潤一 (KIRA, Jun-ichi)  
九州大学・大学院医学研究院神経内科学・  
教授

研究者番号：40183305

### (2)研究分担者

山口 浩雄 (YAMAGUCHI, Hiroo)

九州大学病院・講師

研究者番号：00701830

渡邊 充 (WATANABE, Mitsuru)

九州大学病院・医員

研究者番号：30748009

真崎 勝久 (MASAKI, Katsuhisa)

九州大学病院・助教

研究者番号：90612903