

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19473

研究課題名(和文) アストロサイト障害に起因する髄鞘脱落機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of demyelination mechanism caused by astrocyte injury

研究代表者

高井 良樹 (Takai, Yoshiki)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：40725743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アストロサイトに関わる2種類の病態に着目して解析を行った。一つは視神経脊髄炎関連疾患に代表されるアストロサイトの破壊、消失に伴う髄鞘への影響であり、もう一つは、多発性硬化症などで生じる反応性アストロサイトが引き起こす組織障害である。結果として、アストロサイトの破壊そのものによる脱髄への影響は限定的であり、反応性アストロサイトにより産生される炎症性サイトカインが、特殊な髄鞘障害パターンを引き起こすきっかけとなっている事を見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on two types of different pathology related to astrocytes injury. One is the effect on the myelin sheath caused by destruction and disappearance of astrocytes which typified by neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD), and the other is a tissue damage caused by reactive astrocytes seen in multiple sclerosis and other inflammatory demyelinating disease. As a result, the influence of astrocyte destruction itself is limited. On the other hand, we found inflammatory cytokines produced by reactive astrocytes exhibit a special pattern of myelin sheath damage.

研究分野：神経免疫学

キーワード：アストロサイト 脱髄 視神経脊髄炎 アクアポリン4 炎症性サイトカイン 虚血性組織障害

1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎 (Neuromyelitis Optica: NMO) は、重度の視神経炎と3椎体を超える長大な脊髄炎を臨床的特徴とし、歴史的に多発性硬化症 (Multiple sclerosis: MS) の類縁疾患として、中枢性炎症性脱髄疾患の範疇で捉えられてきた。しかし、本疾患に特異的な自己抗体が発見され、その対応抗原がアストロサイト足突起に発現するアクアポリン4 (AQP4) であることが同定されたことから (Lennon et al. JEM, 2005)、NMO の一次的な病態がアストロサイトの破壊である事が判明した。一方で、Baló 病など特殊な炎症性脱髄疾患においては、広範な AQP4 の消失が病理学的に見出され、アストロサイト障害に由来する髄鞘脱落及び神経変性のメカニズムを解明する事が、脱髄疾患の病態解明に寄与するものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アストロサイト障害に伴う二次的な脱髄機序の解明である。特に、NMO において認められるアストロサイトの破壊及び消失と、MS に代表される炎症性脱髄疾患において認められる反応性アストロサイトがオリゴデンドロサイト及び髄鞘障害に与える影響について解明し、髄鞘障害の本質的な病態を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルを用いた検討 (抗マウス AQP4 モノクローナル抗体のマウス脳実質直接注入モデル)

申請者が共同研究先と共に開発した、抗マウス AQP4 モノクローナル抗体 (AQP4-mAb) をヒト補体と同時にマウス脳に注入することによって、NMO 様のアストロサイト障害を起こし、その後二次的な髄鞘脱落を生じさせるモデルを作成する。このモデルマウスにおいて生じたアストロサイトと髄鞘の経時変化を解析する。特にアストロサイト障害に伴って生じる髄鞘脱落に関与する因子を、補体の活性化及びアストロサイトの機能蛋白の変化という両面から検討する。

病変が生じたマウス脳は、4%パラホルムアルデヒドで環流固定され、凍結あるいはパラフィンブロックとなった後、薄切を経て各種染色が施され、その後スキャナーによって画像化され、障害部位面積が定量化される。病変の評価は、ヘマトキシリン・エオジン染色、ルクソール・ファストブルー染色を含む一般染色及び抗 AQP4 抗体・抗 GFAP 抗体・抗 Cx 抗体・抗 EAAT2 抗体・抗 MBP 抗体・抗 MAG 抗体・抗 MOG 抗体・抗 CD68 抗体等の、アストロサイト・髄鞘・炎症細胞マーカーによる免疫染色を行うことによって、免疫組織学的に行う。

(2) ヒト検体を用いた検討

NMO 及び MS 類縁疾患症例における生検及び剖検検体を用いて、アストロサイト破壊あるいは

反応性アストロサイトに起因する髄鞘及び組織障害に及ぼす影響を明らかにする。モデルマウスで観察された因子を臨床的側面から同時に解析することで、NMO 及び MS 類縁疾患における脱髄機序、更には炎症性脱髄疾患の根本的な機序を明らかにする。方法は動物モデルを用いた研究と同様に免疫組織学的に行う。

4. 研究成果

(1) AQP4-mAb マウス脳実質直接注入モデルの確立

ガラスマイクロキャピラリーを用いて、AQP4-mAb 1ug 及び補体としてヒト血清 0.1ul を、全量 1ul ~ 2ul に混合希釈し、B6J マウス内包後脚に対し注入することで、アストロサイト障害を生じさせる事が可能であった (図1参照)。

アストロサイトは、AQP4-mAb 注入直後に約 1.4mm² 程度の範囲で破壊され消失し、注入後 3-4 日程度で再生が開始された。2 週間後には 0.1mm² 程度まで範囲が縮小した。一方で、髄鞘の脱落は注入後約 3-4 日で始まり、0.56mm² 程度まで拡大した後、徐々に範囲が縮小してくる事が判明した。

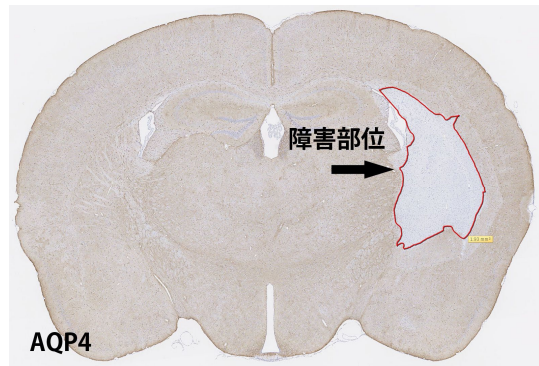


図1. マウス脳におけるアストロサイト障害病変 (AQP4 染色)

(2) アストロサイト機能蛋白及び炎症細胞浸潤と脱髄の関係

NMO における脱髄の原因として Excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2) の関与が指摘されていたことから、EAAT2 の発現と脱髄の変化を経時的に確認した。EAAT2 の脱落は、AQP4-mAb 注入後 14 日目まで持続していたが (図2参照) 脱髄の範囲は拡大傾向を示さず、EAAT2 と脱髄面積の比は AQP4-mAb 注入後 7 日をピークに減少した (図3参照)。一方で、アストロサイト障害後に浸潤するマクロファージの量と脱髄範囲には比例関係が見出され、また補体分解産物である C5a を同時に脳内へ注入することにより、組織へ浸潤するマクロファージの量が増大し、脱髄面積も拡大する事を見出した。この事実は、アストロサイト破壊そのものではなく、その後に生じる組織の炎症が脱髄に寄与することを示唆していると考えられた。

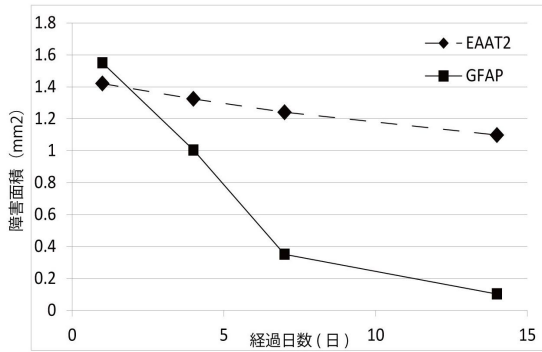


図2 . アストロサイトマーカーの経時的変化

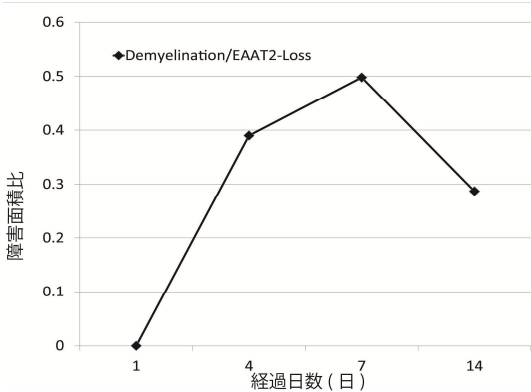


図3 . EAAT2 脱落病変に占める脱髄範囲の経時的変化

(3) Baló 病における同心円状脱髄病巣形成に対する虚血性組織障害とグリア細胞の関与

Baló 病は同心円状脱髄病巣を特徴とする、中枢性炎症性脱髄疾患であり、虚血により誘導される Preconditioning によって、一部のオリゴデンドロサイトが障害抵抗性を示すことで、同心円状脱髄が形成される「Preconditioning 病態仮説」が提唱されていた(Stadelmann et al. Brain, 2005)。一方で、同心円状脱髄病巣を形成する因子は不明であった。

再発性 Baló 病症例における生検組織を用いた検討では、脱髄最外層の更に外側において、低酸素誘導因子(HIF-1^{*1})の発現亢進が確認され、その多くが肥大化したアストロサイトに発現していることが見出された。これらのアストロサイトは HIF-1 によって誘導され脱髄に関与するサイトカイン(CCL2^{*2}、IL-1^{*3})を発現しており、脱髄層に浸潤している炎症細胞には、CCL2 に対するレセプター(CCR2^{*4})の発現が認められた。この事実は、Baló 病における同心円状脱髄病巣の形成に対し、虚血性組織障害による Preconditioning とグリア細胞に由来する炎症性サイトカインとの相互作用が重要な役割を果たしている事を示唆していると考えられた。

^{*1}Hypoxia Inducible Factor, ^{*2}C-C motif chemokine 2, ^{*3}Interleukin-1, ^{*4}C-C chemokine receptor type 2

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計6件)

Takai Y, Misu T, Nishiyama S, Ono H, Kuroda H, Nakashima I, Saito R, Kanamori M, Sonoda Y, Kumabe T, Mugikura S, Watanabe M, Aoki M, Fujihara K. Hypoxia-like tissue injury and glial response contribute to Baló concentric lesion development. 査読あり. Neurology. 2016 Nov 8;87(19):2000-2005.

Miyazaki-Komine K*, Takai Y*, Huang P, Kusano-Arai O, Iwanari H, Misu T, Koda K, Mitomo K, Sakihama T, Toyama Y, Fujihara K, Hamakubo T, Yasui M, Abe Y. High avidity chimeric monoclonal antibodies against the extracellular domains of human aquaporin-4 competing with the neuromyelitis optica autoantibody, NMO-IgG. 査読あり. Br J Pharmacol. 173(1): 103-14, 2016. *authors with same contribution.

Huang P*, Takai Y*, Kusano AO, Ramadhanti J, Iwanari H, Miyauchi T, Sakihama T, YanHan J, Aoki M, Hamakubo T, Fujihara K, Yasui M, Abe Y. The binding property of a monoclonal antibody against the extracellular domains of aquaporin-4 directs aquaporin-4 toward endocytosis. 査読あり. Biochemistry and Biophysics Reports. 7: 77-83, 2016. *authors with same contribution.

Kurosawa K, Misu T, Takai Y, Sato DK, Takahashi T, Abe Y, Iwanari H, Ogawa R, Nakashima I, Fujihara K, Hamakubo T, Yasui M, Aoki M. Severely exacerbated neuromyelitis optica rat model with extensive astrocytopathy by high affinity anti-aquaporin-4 monoclonal antibody. 査読あり. Acta Neuropathol Commun. 3: 82, 2015.

高井 良樹, 藤原 一男, 安井 正人. アクアポリンの機能と抗体. 自己免疫性脳炎-抗原・抗体は何をしている?(解説/特集). 査読なし. Clinical Neuroscience. Vol 33: 76-79, 2015.

高井 良樹, 三須 建郎, 黒沢 和大, 高橋 利幸, 中島 一郎, 黒田 宙, 西山 修平, 藤原 一男, 青木 正志. NMO モデルマウスにおけるアストロサイト障害に伴う二次性脱髄機序の解明(会議録). 査読なし. 神経免疫学 Vol.20(1): 96, 2015.

(学会発表)(計8件)

Takai Y. Hypoxia-like tissue injury and glial response contribute to the

development of Balo's concentric demyelination. 9th Congress of the Pan-Asian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis. 2016年10月27-29日. Bangkok (Thailand).

高井 良樹. Balo病における同心円状脱髄病巣形成に対する虚血性組織障害とグリア細胞の関与. 第28回日本神経免疫学会学術集会. 2016年9月29-30日. 長崎ブリックホール (長崎).

Takai Y. Temporal changes of pathological features in NMO Spectrum Disorders with aquaporin4 antibody. 32nd Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis. 2016年9月14-17日. London (United Kingdom).

高井 良樹. Chronological change is the main cause of histopathological diversity in neuromyelitis optica with anti-AQP4 antibody. 第57回日本神経学会学術大会. 2016年5月18-21日. 神戸コンベンションセンター (神戸).

Takai Y. Astrocyte injury and secondary demyelination induced by intracerebral injection of AQP4-IgG and complement in mouse brain. 8th Congress of the Pan-Asian committee for research and treatment of multiple sclerosis. 2015年11月19-21日. seoul (south korea).

Takai Y. Astrocyte injury and secondary demyelination induced by intracerebral injection of AQP4-IgG and complement in mouse brain. 31st Congress of the european committee for treatment and research in multiplesclerosis, 2015年10月7-10日. Balcelona (Spain).

高井 良樹. NMOモデルマウスにおけるアストロサイト障害に伴う二次性脱髄機序の解明. 第27回日本神経免疫学会学術集会. 2015年9月15-16日. 長良川国際会議場 (岐阜).

高井 良樹. Astrocyte injury and secondary demyelination in intracranial injection mouse model of NMO. 第56回日本神経学会学術大会. 2015年5月20-23日. 新潟コンベンションセンター (新潟).

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2016/10/press20161017-03.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高井 良樹 (Takai Yoshiki)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：40725743