

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19490

研究課題名(和文) C型レクチンMincleの中樞脱髄疾患エフェクター相での役割に基づいた治療法開発

研究課題名(英文) Investigating the role of mincle in the effector phase of central nervous system autoimmunity

研究代表者

篠田 紘司 (Shinoda, Koji)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：70747998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト健常者および多発性硬化症(MS)患者の末梢血単核細胞において、Mincleの発現は確認されなかった。ナイーブC57BL/6マウスの脳組織では、ミクログリアと少数のオリゴデンドロサイトのみ発現していた。EAEによる麻痺がピークの時期にはミクログリアに加えて、オリゴデンドロサイトや血管周囲に浸潤した炎症細胞へ、EAE慢性期にはオリゴデンドロサイト、ミクログリア、血管周囲の炎症細胞細胞へ発現するようになった。MS患者剖検脳標本では、脱髄病変周囲に広範に、形態上オリゴデンドロサイトに発現が確認された。2D2マウスを用いた受動的EAEは解析を継続中である。

研究成果の概要(英文)：We could not find any expression of Mincle on peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients and healthy controls. The pathological analysis of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)-induced mice showed that Mincle was expressed mainly on microglia and oligodendrocytes in part in naive C57BL/6 mice and that the expression changed over time after the induction of EAE. The expression of Mincle was increased on microglia, oligodendrocytes and infiltrating cells around vessels at the peak disease phase of EAE. Subsequently, the expression was decreased at the chronic phase of EAE. The pathological investigation using postmortem brain sections revealed the weak expression of Mincle on oligodendrocytes around vessels. The immunological analysis using passive EAE is currently ongoing.

研究分野：神経免疫学

キーワード：多発性硬化症 Mincle 自然免疫 実験的自己免疫性脳脊髄炎

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎(neuromyelitis optica, NMO)では、抗 aquaporin 4 (AQP4)抗体が補体介在性にアストロサイト障害を惹起するとの機序が提唱されている。一方、私たちは多発性硬化症(multiple sclerosis, MS)の最重症亜型である Baló 病の脳病巣では、抗 AQP4 抗体陰性で免疫グロブリンや補体沈着がなく glial fibrillary acidic protein (GFAP)が保たれているにも関わらず、AQP4 が脱髄巣でも非脱髄巣でも広汎に脱落していることを報告した(Masaki et al. *Acta Neuropathol* 2012)。さらに日本人 MS 及び NMO 剖検例でも、抗体非依存性に AQP4 やグリアのコネクションが広汎に脱落していることを見出した(Matsuoka et al. *Brain Pathol* 2011)。このことから抗 AQP4 抗体非依存性の未知なグリア障害機序の存在が示唆された。

そこで私たちはパターン認識受容体を介した自然免疫に着目した。特定の蛋白や抗原を認識して記憶する獲得免疫と異なり、パターン認識受容体は病原体関連分子パターンあるいは自己組織損傷により遊離されるダメージ関連分子パターンを普遍的に感知するもので、Toll 様受容体、Nod 様受容体、RIG 様受容体、C 型レクチン受容体の存在が知られている。このうち C 型レクチン受容体 macrophage inducible C-type lectin (Mincle)に注目した。なぜなら Mincle ノックアウトマウスは MS モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)を全く発症しないからである(Ishikawa et al. *J Exp Med* 2009)。Mincle は Fc 受容体 鎖と会合し、死細胞から分泌される核蛋白 SAP130 を特異的に結合し、損傷自己組織を認識して炎症性サイトカインの産生を促し、好中球遊走を起こすことが示されていた(Yamasaki et al. *Nat Immunol* 2008)。EAE には、中枢神経抗原を免疫賦活物質と懸濁して免疫して起こす能動的 EAE と、中枢神経抗原に対して活性化したリンパ球を移入することで誘導する受動的 EAE がある。上記の報告は、能動的 EAE についての成績であり、これは、末梢での獲得免疫成立段階で、Mincle が免疫賦活物質に含まれる結核死菌のトレハロースジミコール酸を認識するためであるが、同報告では、中枢神経炎症・脱髄のエフェクター相における役割については検討していない。多発性硬化症では、既に自己反応性 T 細胞が出現した状態にあるため、このエフェクター相における役割の解析がより重要であり、これを選択的に評価できる受動的 EAE による解析が必要となる。そして最近、重要なことにマウス脳梗塞モデルの虚血部にて CD11b 陽性細胞に Mincle が発現し、その病態形成に関与していることが報告された(Suzuki et al. *Sci Rep* 2013)。したがって、末梢血由来の単球あるいは中枢神経に常駐するミクログリ

アの何れかあるいは双方に Mincle が発現し、中枢神経脱髄の病態に関与している可能性が高い。また、今まではこれら 2 種類の細胞を明確に区別することは困難であったが、私たちのグループは Ccr2^{flp}::Cx3cr1^{flp} ダブルノックインマウスにより単球とミクログリアを明確に区別し、EAE の脱髄病変において異なる役割を果たすことを報告しており(Yamasaki et al. *J Exp Med* 2014)、このマウスを用いることでさらに深い病態解明が可能となる。

以上より、私たちはヒトの中枢神経脱髄疾患、MS と NMO に共通する機序として、Mincle により自己組織損傷が感知され、炎症が増幅され、アストロサイト障害や脱髄に重要な役割を果たすという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、多発性硬化症(MS)と視神経脊髄炎(NMO)の病態における、損傷した自己組織に対する自然免疫の役割を C 型レクチン受容体を解析することにより明らかとし、病因解明と新規治療の確立を目指す。本研究では MS、NMO 患者において、(1) 末梢血の単球・マクロファージへの C 型レクチンの発現、(2) 剖検脳での C 型レクチンの発現パターンを解析すると共に、(3)マウス実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)モデルを用い、中枢神経内の単球、ミクログリアにおける C 型レクチン受容体の発現と病態への関与を明らかにする。

3. 研究の方法

<MS 患者および健常対照群の末梢血単核細胞における Mincle 発現>

MS 群、および健常対照群の末梢血から単核細胞を分離し、多重蛍光染色フローサイトメトリー解析によって、リンパ球および CD14 陽性単球計細胞上の Mincle 発現を検討した。

<剖検脳における Mincle 発現>

MS 患者剖検脳切片およびその対照として、中枢神経に異常がないとされる重症筋無力症の脳切片を利用して Mincle の免疫染色を実施した。

<マウス実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)における Mincle 発現とその役割の解析>

MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを用いた EAE において、経時的に脳および脊髄切片を作成し、経時的に Mincle 発現の変化を検討した。

<2D2 マウス由来 CD4 T 細胞を用いた受動的 EAE による Mincle の役割解析>

MOG₃₅₋₅₅ ペプチド抗原特異的 T 細胞受容体を有する 2D2 マウスの脾臓からセルソーターを用いて naïve CD4 T 細胞を単離し、in vitro にて様々なサイトカイン存在下で刺激した後に WT あるいは Mincle ノックアウト

マウスに移入し、麻痺スコアの推移、経時的な中枢神経浸潤細胞の変化を検討する。

4. 研究成果

まず、ヒト健常者および MS/NMOSD 患者の末梢血における Mincle 発現を様々な抗体を用いて検討したが、発現は確認されなかった。

マウス中枢神経における発現は、MS 動物モデルである EAE を用いて、病理学的な検討を行った。様々な抗体の染色性評価の結果、ウサギポリクローナル Mincle 抗体を用いることによって Mincle の発現が明らかとなった。ナイーブ C57BL/6 マウスではミクログリアと少数のオリゴデンドロサイトにのみ発現していた。EAE による麻痺がピークの時期には、ミクログリアに加えて、オリゴデンドロサイトや血管周囲に浸潤した炎症細胞への発現が明らかとなり、EAE 慢性期にはオリゴデンドロサイト、ミクログリア、血管周囲の炎症細胞細胞へ発現するようになった。

ヒト病理による検討では、抗ヒト Mincle 抗体は生体防御医学研究所分子免疫学より提供頂いた clone 13D、Abcam 社による clone AT16E3、LSBio 社製の clone 2A8、Sigma Aldrich 社製の rabbit polyclonal 抗体を用いて染色性を検討した。MS 患者剖検脳サンプルでは、13D clone は染色性が確認されず、AT16E3 および rabbit polyclonal 抗体にて、脱髄病変周囲に広範に、形態上オリゴデンドロサイトに発現が確認された。

これらの役割を検討するため、2D2 マウスを用いた受動的 EAE を実施し、現在解析を継続中である。

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〕(計 10 件)

1) Hashimoto Y, Shinoda K, Tanaka E, Uehara T, Matsushita T, Yamasaki R and Kira JI. Re-emergence of a tumefactive demyelinating lesion after initiation of fingolimod therapy. *J Neurol Sci* 2017, in press. (査読有り)

2) Shinoda K, Matsushita T, Nakamura Y, Masaki K, Yamasaki R, Yamaguchi H, Togao O, Hiwatashi A, Kira JI. HLA-DRB1*04:05 allele is associated with intracortical lesions on 3-dimensional double inversion recovery images in Japanese patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2017, in press. (査読有り)

3) Song ZY, Nakamura Y, Yamasaki R, Kawano Y, Shinoda K, Guzailiyi M, Yamaguchi H, Matsushita T, Kira JI.

Peripheral blood T-cell subset characteristics of multiple sclerosis in remission phase correlate with annualized relapse rates.

Clin Exp Neuroimmunol 2016; 7: 346–352. (査読有り)

doi: 10.1111/cen3.12321

4) Shinoda K, Iwata T, Nakamura Y, Masaki K, Matsushita T, Yamasaki R, Kira JI. Minocycline-induced human herpesvirus-6 encephalomyelitis with drastically disseminated contrast-enhanced lesions.

Eur J Neurol 2016; 23: e76–e77. (査読有り)

doi: 10.1111/ene.13190

5) Shinoda K, Murai H, Akutagawa N, Ochi H and Kira JI.

Recurrent cerebellitis associated with primary Sjogren syndrome.

Clin Exp Neuroimmunol 2016; 7: 183–184. (査読有り)

doi: 10.1111/cen3.12297

6) Shinoda K, Sun X, Oyamada A, Yamada H, Kira J-I, Yoshikai Y. Requirement of CD30 expression on CD4 T cells in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis.

J Neuroimmunol 2016; 291: 39-45. (査読有り)

doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.12.005

7) Shinoda K, Yoshikai Y.

CD30 ligand could be a new therapeutic target for central nervous system autoimmunity.

Clin Exp Neuroimmunol 2015; 6: 111–112. (査読有り)

doi: 10.1111/cen3.12204

8) Shinoda K, Sun X, Oyamada A, Yamada H, Muta H, Podack ER, Kira JI, Yoshikai Y. CD30 ligand is a new therapeutic target for central nervous system autoimmunity

J Autoimmun 2015; 57: 14-23. (査読有り)

doi: 10.1016/j.jaut.2014.11.005

9) Shinoda K, Uehara T, Miyoshi K, Suzuki S, Iwaki T, and Kira JI.

Multiphasic acute disseminated encephalomyelitis associated with atypical rubella virus infection - response to the letter from Wu et al.

Mult Scler 2015; 21: 1089. (査読有り)

doi: 10.1177/1352458514567730

10) Shinoda K, Asahara H, Uehara T, Miyoshi K, Suzuki S, Iwaki T, and Kira JI.

Multiphasic acute disseminated encephalomyelitis associated with atypical rubella virus infection.

Mult Scler 2015; 21: 252–254. (査読有り)

doi: 10.1177/1352458514533845

〔学会発表〕（計 18 件）

- 1) 第 114 回日本内科学会学術集会
(2017.04.14-16 東京)
日本人多発性硬化症における皮質病巣数は HLA-DRB1*04:05 により規定される
篠田 紘司, 松下 拓也, 中村 優理, 眞崎 勝久, 梶尾 理, 樋渡 昭雄, 吉良 潤一

- 2) 第 217 回 日本神経学会九州地方会
(2017.3.11 福岡)
脳幹病巣により頭部自律神経症状を伴う短時間持続性片側神経痛様頭痛発作 (SUNA) を呈した抗 AQP4 抗体陽性視神経脊髄炎の一例
水野 裕理, 篠田 紘司, 渡邊 充, 山崎 亮, 吉良 潤一

- 3) 厚生労働省難治性疾患（神経免疫疾患）政策および実用化研究班平成 27 年度合同班会議. (2017.1.18-19 東京)
3D-double inversion recovery 法により明らかとなった日本人多発性硬化症における皮質病巣の意義と HLA-DRB1*04:05 との関連
篠田 紘司, 松下 拓也, 中村 優理, 眞崎 勝久, 山崎 亮, 吉良 潤一

- 4) The 9th Congress of the Pan-Asian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (PACTRIMS)
(2016.10.27-29, バンコク, タイ)
Distinct Repertoires of CD4 and CD8 T Cells in Multiple Sclerosis Patients with and without Deletion-type Copy Number Variations.
Guzailiayi M, Shinoda K, Nakamura Y, Masaki K, Matsushita T, Yamasaki R, Yoshikai Y, Kira JI.

- 5) The 9th Congress of the Pan-Asian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (PACTRIMS)
(2016.10.27-29, バンコク, タイ)
The Effects of the HLA-DRB1*04:05 Allele on Intracortical Lesions Detected by 3-Dimensional Double Inversion Recovery Imaging in Japanese Patients with Multiple Sclerosis.
Shinoda K, Matsushita T, Nakamura Y, Masaki K, Yamasaki R, Togao O, Hiwatashi A, Kira JI.

- 6) 第 28 回日本神経免疫学会学術集会
(2016.9.29-30 長崎)
3D-DIR 法によって明らかとなった日本人多発性硬化症における皮質病巣の意義
篠田 紘司, 松下 拓也, 中村 優理, 眞崎 勝久, 樋渡 昭雄, 吉良 潤一

- 7) The 32nd congress of European Committee for Treatment and Research in Multiple

- Sclerosis (ECTRIMS) (2016.09.14-17, ロンドン, イギリス)
Detection of cortical lesions by 3D-double inversion recovery imaging in Japanese patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder.
Shinoda K, Matsushita T, Nakamura Y, Masaki K, Hiwatashi A, Kira JI.
- 8) 第 44 回日本臨床免疫学会学術集会
(2016.9.8-9 東京)
T 細胞受容体領域に欠失型 copy number variation を有する多発性硬化症の免疫学的解析
篠田 紘司, グザリアイ・ママティジャン, 中村 優理, 佐藤眞也, 眞崎 勝久, 松下 拓也, 山崎亮, 吉開泰信, 吉良 潤一

 - 9) 第 57 回日本神経学会学術大会
(2016.5.18-21 神戸)
3D-double inversion recovery 法を用いた多発性硬化症における皮質病巣の検討
篠田 紘司, 松下 拓也, 中村 優理, 樋渡 昭雄, 吉良 潤一

 - 10) 第 57 回日本神経学会学術大会
(2016.5.18-21 神戸)
T 細胞受容体領域に欠失型コピー数多型を有する多発性硬化症の臨床的・免疫学的解析
Guzailiayi, Maimaitijiang, 中村 優理, 篠田 紘司, 宋 子夜, 佐藤 眞也, 松下 拓也, 山崎 亮, 吉良 潤一

 - 11) 第 57 回日本神経学会学術大会
(2016.5.18-21 神戸)
Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice with induced conditional connexin 43 knock-out
宇根 隼人, 山口 浩雄, Zhao Yinan, 篠田 紘司, 眞崎 勝久, Götz Magdalena, 山崎 亮, 吉良 潤一

 - 12) 第 57 回日本神経学会学術大会
(2016.5.18-21 神戸)
日本人多発性硬化症・視神経脊髄炎の脊髄レベルによる脊髄萎縮と重症度の逆相関
劉 志文, 中村 優理, 篠田 紘司, 松下 拓也, 樋渡 昭雄, 吉良 潤一

 - 13) 第 57 回日本神経学会学術大会
(2016.5.18-21 神戸)
Clinical and genetic factors associated with disability in Japanese patients with multiple sclerosis

松下 拓也, 佐藤 眞也, 山本 健, 莊 景聡,
劉 志文, 中村 優理, 篠田 紘司, 樋渡 昭
雄, 吉良 潤一

(2)研究分担者
なし

14) 第 213 回日本神経学会九州地方会
(2016.3.12.福岡)
頸部振戦が著明で脳深部刺激療法が有効で
あったジストニアの一例
辻本 篤志, 篠田 紘司, 上原 平, 山下 謙
一郎, 村井 弘之, 宮城 靖, 吉良 潤一

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし

15) 厚生労働省難治性疾患(神経免疫疾患)
政策および実用化研究班平成 27 年度合同
班会議.(2016.1.20 東京)
T 細胞受容体遺伝子領域に欠失型 copy
number variation を有する多発性硬化症患者
の臨床像と T 細胞サブセットの解析.
篠田 紘司, 中村 優理, グザリアイ・ママテ
イジャン, 佐藤 眞也, 松下 拓也, 山崎 亮,
吉良 潤一.

16) 第 212 回日本神経学会九州地方会
(2015.12.12 北九州)
舞踏運動を合併した facial onset sensory and
motor neuropathy(FOSMN)症候群の 1 例.
永田 諭, 近藤 大祐, 篠田 紘司, 上原 平,
村井 弘之, 吉良 潤一

17) 第 212 回日本神経学会九州地方会
(2015.12.12 北九州)
Creutzfeldt-Jakob 病様の頭部 MRI 所見を
呈した抗 VGKC 抗体陽性辺縁系脳炎の 1
例.
岡留 敏樹, 篠田 紘司, 上原 平, 山下 謙
一郎, 村井 弘之, 吉良 潤一

18) 第 211 回日本神経学会九州地方会
(2015.09.26 長崎)
進行性の外眼筋麻痺を呈した FGD4 遺伝
子の新規遺伝子変異を有する
Charcot-Marie-Tooth 病の一例
近藤 大祐, 篠田 紘司, 山下 謙一郎, 岩城
徹, 橋口 明大, 高嶋 博, 吉良 潤一

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

篠田 紘司 (SHINODA Koji)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号: 70747998