

令和元年6月12日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02657

研究課題名(和文)全ゲノムと免疫病理解析に基づく脱髄性疾患のグリアシンシチウム破綻機序の解明と修復

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms for destruction and fixation of glia-syncytium in demyelinating diseases by whole-genome sequencing and immunohistochemical analysis.

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) 36,400,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症患者におけるT細胞受容体配列の解析では、鎖の相補性決定領域に特異的配列を見出した。末梢血型T細胞のV1/V2比が多発性硬化症の重症度と相関した。病理学的には急性期脱髄巣でGLUT5陽性ミクログリアが集積しグリア間の輸送障害に関連した。アストログリア特異的コネキシン(Cx)43欠損マウスに実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を誘導したところ、EAEの臨床症状が軽減した。一方オリゴデンドログリア特異的Cx47欠損マウスでは逆にEAEが重症化した。これら結果から、コネキシン機能修飾によりもたらされるミクログリアの活性化状態が脱髄性疾患の病態に深く関わっていることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経炎症性疾患においてグリア細胞と免疫細胞との相互作用による神経障害機序についてその関連に関わる分子を同定した。グリアシンシチウムは中枢神経系の神経細胞以外の細胞が形成するネットワークで、ギャップ結合による直接的な結合と、液性因子による間接的なつながりが考えられるが、そのどちらにもコネキシンが深く関与している。先天性コネキシン機能異常は様々な疾患をもたらすが、一方で後天的な中枢神経系疾患においてもその異常が病態に関わることが明らかとなった。コネキシンは重要な治療標的と考えられ、これまで治療困難であった数々の中枢神経変性・脱髄性疾患に対する新規治療法開発につながる。

研究成果の概要(英文)：T cell receptor gene rearrangement analysis clarified preserved base sequence specifically in patients with multiple sclerosis (MS). V1/V2 ratio in peripheral blood T cells correlated with the severity of MS. In pathological study, GLUT5 positive microglia accumulated in acute demyelinating lesions of MS and neuromyelitis optica, suggesting that microglia induce disruption of energy transportation system and result in demyelination and axonal change. When experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) was induced in astroglia-specific connexin (Cx) 43-ablated mice, the clinical symptoms of EAE were alleviated. On the other hand, EAE became worse in oligodendroglia-specific Cx47-ablated mice. These results strongly suggest that the activation status of microglia by functional modification of connexins is deeply involved in the pathogenesis of demyelinating diseases.

研究分野：神経科学、神経免疫学

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

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症(MS)の全ゲノム関連解析により、T細胞受容体 α 鎖と γ 鎖の欠失型 copy number variation が強い遺伝リスクであることを発見した。この $\gamma\delta$ T細胞はMS患者末梢血で見出され、疾患障害度と負の相関を認めることから、神経保護的に働くと考えられている。これらの細胞は病変部におけるサイトカイン・ケモカインの発現に関与するが、詳細なメカニズムは不明である。一方、剖検病理解析より、急性病巣の leading edge で血管周囲アストログリア足突起のコネキシン(Cx)43 と monocarboxylate transporter 4(MCT4)がまず脱落し、更に脱髄巣でオリゴデンドログリアの Cx47 や Cx32 も広汎に脱落することを見出した。Cx はギャップ結合蛋白で、細胞同士にそれぞれ発現し互いに結合することでギャップ結合を形成する。また、Cx は単独でも存在し、ヘミチャンネルとして細胞内外の物質交換にも寄与している。これらの物質のなかには炎症性サイトカインやケモカイン、アデノシン三リン酸 (ATP)、Ca²⁺イオンなども含まれ、Cx を介した微小環境の変化は病巣の病態生理に重要な因子と考えられる。私達は、培養アストログリアの Cx43 発現を Th1 細胞が脱落させることを見出した。この研究結果から、活性化エフェクターT細胞がグリア細胞との異常な相互作用によりグリアシンシチウムを破綻させ、Cx43 や MCT4 の脱落による急性エネルギー供給障害により広汎な脱髄と軸索脱落を生じるとの仮説を立てた。

Cx43 は全身欠損マウスを作成しても胎内で死亡することから、生存に必須のギャップ結合蛋白であることが強く示唆される。通常は血管内皮細胞、線維芽細胞、白血球などに発現が見られる。中枢神経ではアストログリアに強い発現を認める。一方 Cx47 は中枢神経オリゴデンドログリアにほぼ選択的に発現する。MS 病巣では急性期に Cx43、Cx47 とともに発現が低下し、慢性期には Cx43 の発現が逆に亢進することが明らかであるが、中枢神経系におけるこれらの人為的発現低下が多発性硬化症モデル動物である実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の病態に及ぼす影響は明らかでない。疾患急性期には、末梢血から浸潤した T 細胞などによる発現変動、慢性期にはグリオシスによる発現変動が予想される。慢性期の病態には不明な点が多く、そのため有効な治療薬開発が遅れている。本研究により、MS 病態における末梢免疫、中枢炎症、グリア炎症のつながりを明らかにすることで、新たな治療標的分子を同定できる可能性がある。

2. 研究の目的

免疫細胞がグリアシンシチウムを破綻させる機序を解明し、免疫・グリア細胞間相互作用異常を是正しグリアシンシチウムを修復する治療法を開発する。

3. 研究の方法

1) T細胞受容体領域の遺伝子解析

MS/NMO 患者を対象に末梢血単核細胞の T細胞受容体(TCR)配列を adaptor-ligation PCR 法によるシーケンシングを行い、CNV の有無による TRA および TRG における VJ セグメント配列、TRD 欠失の違いを確認するとともに、健常者との比較で疾患に特徴的な TCR 配列を検索した。

2) 剖検 MS/NMO 標本を用いた浸潤免疫細胞・グリア細胞間相互作用分子の動態の免疫病理学的解析

MS/NMO 患者剖検標本を用いて浸潤免疫細胞とグリア細胞間の異常な GJ チャンネルの形成と Cx、MCT、GLUT 群蛋白分子の脱落の関連を、患者病理標本を用いて免疫組織化学的に検討した。特に脱髄が明らかになる前の初期病巣において、浸潤 T 細胞とアストログリアの異常な Cx43/Cx43 GJ チャンネルの形成とアストログリア足突起の MCT4 の脱落の關係に着目した。

3) 培養グリア細胞とエフェクターT細胞との免疫・グリア細胞間相互作用の解析

培養グリア細胞とエフェクターT細胞 (Th1/Th17/Th2/Treg) の細胞間相互作用の異常を解析する。各種エフェクターT細胞の培養上清をマウス培養アストログリアに添加し、Cx43 の脱落を検討した。

4) $\gamma\delta$ T細胞のMS患者における特徴と治療経過に及ぼす影響

MS 患者末梢血における $\gamma\delta$ T細胞レパトアをフローサイトメトリにより評価し、健常者と比較、また臨床所見との関連について解析した。

5) 動物モデルを用いた解析

アストログリアはコネキシン 30(Cx30)と Cx43 を発現し、オリゴデンドログリアは Cx32 と Cx47 を発現している。Cx30 欠損マウスは生存、生殖可能であるが、Cx43 および Cx47 はグリア細胞以外にも多く発現しており、全身欠損マウスは致死性である。このため、Cx30 欠損マウスと異なり Cx43 もしくは Cx47 の研究を行うためには Conditional knockout(cKO)マウスが必要となる。私たちは、Cx30 欠損マウス、アストログリア特異的 Cx43 欠損マウス、オリゴデンドログリア特異的 Cx47 欠損マウスを作成した。これらのマウスに、多発性硬化症のモデル

である EAE を誘導し、それぞれの対照群と比較した。比較項目は、臨床経過、組織学的解析、分子生物学的解析を行った。また、脳内で免疫反応を担うミクログリアを単離し、遺伝子の網羅的解析を行った。更にこれらのマウス脾臓細胞を刺激し比較することにより、Cx 機能異常が末梢免疫反応に及ぼす影響を解析した。

・ 遺伝子改変マウス

Cx30 欠損マウスは KBT オリエンタルから購入した。Cx43cKO および Cx47cKO は、タモキシフェン投与により遺伝子改変時期を選定できるよう、Flox-Cre-ERT システムを用いて、以下の 3 種類を作成した。すなわち Glast-CreERT2;Cx43fl/fl (conditional grey matter astroglia-specific Cx43 ablated mice)、GFAP-CreERT1;Cx43fl/fl (conditional white matter astroglia-specific Cx43 ablated mice)、PLP-CreERT2; Cx47fl/fl(conditional white matter specific Cx47 ablated mice)により、GFAP 陽性アストログリア特異的 Cx43 欠損マウス、GLAST 陽性アストログリア特異的 Cx43 欠損マウス並びにオリゴデンドログリア特異的 Cx47 欠損マウスを作成した。これらの 4 系統の遺伝子改変マウス(Cx30KO、GLAST-Cx43icKO、GFAP-Cx43icKO、Cx47icKO)を EAE 実験に供した。

・ EAE 誘導

生後 10 週のマウスに 5 日間(day-14 から-10)、タモキシフェンを腹腔内注射し、Day0 に髄鞘蛋白(MOG35-55)をアジュバント(CFA)とともに皮下注射してマウスを免疫した。通常これらのマウスは、免疫後 12 日で尾の脱力にて発症し、15 日で症状はピークに達する。この間、EAE 症状スコアおよび体重を記録した。また、免疫前、発症期、慢性期にマウス脊髄組織を採取し組織学的解析を行った。

・ 発現遺伝子解析

EAE の経過中にマウス脊髄組織を採取し、RNA を抽出した上で発現遺伝子を網羅的に解析した。また、濃度勾配法を用いて脊髄組織から単核細胞を採取し、セルソーターを用いてミクログリアを単離・回収した。これらのミクログリアについても RNA 抽出および発現遺伝子の網羅的解析を行った。

・ 脾臓細胞を用いた proliferation assay

EAE 経過中の末梢免疫細胞解析のため、適切な時期に脾臓から単核球を採取し、MOG35-55 ペプチドで刺激することにより、細胞増殖反応および培養上清のサイトカイン濃度を解析した。

4. 研究成果

1) T 細胞受容体領域の遺伝子解析

TCR 配列の評価では、MS との関連が示された CNV 欠失を有する患者と保有しない患者との比較で、欠失型 CNV を有する患者では TRGJ1 の発現が低下しており、 γ 鎖の同領域の利用が低下していると考えられた(図 1)。 α 鎖、 β 鎖遺伝子領域のいずれもその多様性は健常者群と比較して MS 群で高く、一方で δ 鎖、 γ 鎖領域では多様性については有意な差はなかった。 α 鎖の相補性決定領域(CDR)3 については健常者群と比較して MS では 14 アミノ酸長の配列の発現が多く、この長さの配列では 9 番目のグリシン残基が MS で健常群より保存されている傾向があった。発現 TCR 配列と HLA 情報を用いて、MS 群に特異的な発現パターンを抽出したところ HLA-DRB1*04:05 アリルを有する MS では、CMV の pp65 のペプチドに対応する T 細胞受容体(CMV-TCR)が多くみられた。

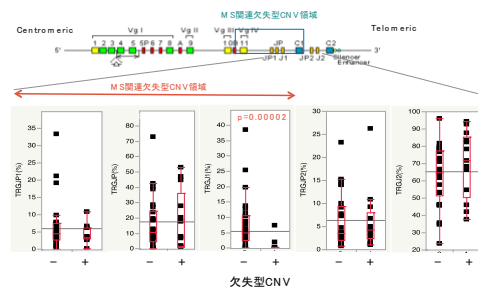


図 1 欠失型 CNV の有無による TCR γ 鎖遺伝子発現

2) 剖検 MS/NMO 標本を用いた浸潤免疫細胞・グリア細胞間相互作用分子の動態の免疫病理学的解析

MS の急性脱髄病巣ではアストロサイトの Cx43、MCT4 の発現は低下し、病巣周辺におけるミクログリアにおいて GLUT5 発現亢進を認めた(図 2)。アストロサイトにおける MCT4 の発現低下は血管からアストロサイトへのエネルギー輸送の障害を反映しており、これらの輸送障害はミクログリアの影響下にあることが示唆された。

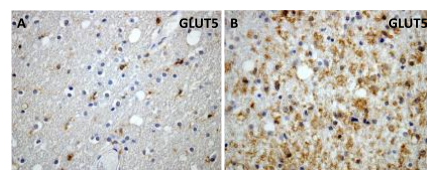


図 2 A 正常白質、B 急性期脱髄病巣。急性期病巣における GLUT5 陽性ミクログリアの集積

3) 培養グリア細胞とエフェクター T 細胞との免疫・グリア細胞間相互作用の解析

Th1 細胞由来の IFN γ がミクログリアを活性化し、活性化ミクログリアから産生された

IL-1 β を含む炎症性サイトカインがアストロサイトに作用して、Cx43 発現を低下させることが示された。そのことから Th1 優位の炎症反応により、グリア間の細胞間伝達が破綻し、中枢神経脱髄疾患の病巣形成・拡大につながることを示唆された。

4) $\gamma\delta$ T 細胞の MS 患者における特徴と治療経過に及ぼす影響

MS 患者および健常者の末梢血 $\gamma\delta$ T 細胞をフローサイトメトリにより immunophenotyping した。MS 患者では $\gamma\delta$ T 細胞中の V δ 2 陽性細胞の割合が有意に低く、また V δ 2 細胞の割合は MS の重症度と逆相関していた。また健常者においては V δ 2 細胞の割合と調節性 T 細胞の割合が相関していた。 $\gamma\delta$ T 細胞のうち、V δ 2 細胞は MS の進行を抑制すると考えられた。

5) 動物モデルを用いた解析

① GLAST-Cx43icKO EAE

GLAST 発現アストログリア特異的 Cx43 欠損マウスに EAE を誘導すると、急性期とともに慢性期も EAE の症状を軽減した(図 3)。同マウスでは初期の炎症細胞浸潤も抑制されていた。脾臓細胞を用いた Proliferation assay では対照群と比較し有意差はなかったことから、Cx43 欠損は末梢の免疫反応に影響を与えることなく EAE を軽減したと考えられた。中枢神経細胞を用いた RNA アレイアッセイでは、野生型アストログリアが炎症性活性化を示す遺伝子群 (A1) を発現するのに対し、GLAST-Cx43icKO マウスアストログリアは抗炎症性活性化を示す遺伝子群 (A2) の発現がみられた。脊髄の組織学解析でも A1 型活性化を示唆する C3 の発現が低下していた(図 4)。これらの結果から、GLAST-Cx43icKO マウスでは炎症細胞浸潤抑制とアストログリアの保護的活性化により EAE の症状軽減を来したと考えられた。

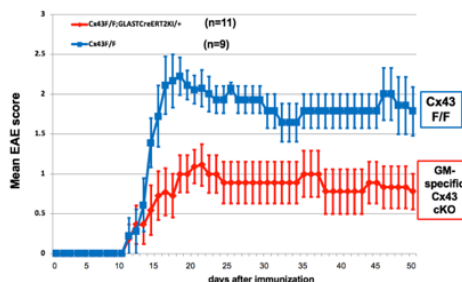


図 3 GLAST-Cx43 欠損マウス EAE

Summary of gene set enrichment analysis (p-value for each comparison)

Gene set	naive vs p10	naive vs p17	p10 vs p17
A1	0.838 (p10)	0.884	0.004(p17)
A2	0.011 (p10)	0.556	0.284
pan	0.016 (p10)	0.392	0.008(p17)
pro-inf	0.13	0.409	0.018(p17)
anti-inf	0.728	0.131	0.029(p17)

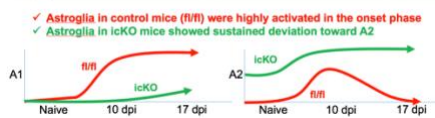


図 4 GLAST-Cx43 欠損マウスは A2 優位

② Cx47icKO EAE

本マウス(オリゴデンドログリア特異的 Cx47 欠損マウス)に EAE を誘導すると、前述までのアストログリアコネキシン発現低下とは反対に、急性期症状の顕著な増悪と慢性期の疾患進行を認めた(図 5)。これは、これまで C57Black/6 系統のマウスでは得られなかった、二次進行型 MS のメカニズムを一部再現していると考えられた。マウス脊髄では炎症細胞浸潤の増加、脱髄の進行を認めた。マウス脊髄から抽出した組織由来の RNA アレイアッセイでは、アストログリアの急性期炎症性活性化(図 6)に加え、ミクログリアの急性期炎症性活性化白血球走化因子ケモカイン発現、慢性期における炎症の遷延を認めた(図 7)。これらの結果から、Cx47icKO マウス EAE においては、急性期の炎症細胞浸潤増加、ミクログリア・アストログリアの炎症性活性化による炎症の拡大と慢性期におけるミクログリアの炎症性活性化遷延が病態悪化の原因と考えられた。

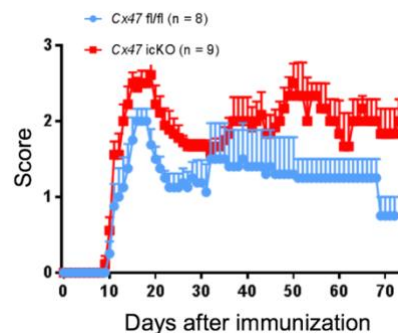


図 5 オリゴデンドログリア特異的 Cx47 欠損マウス(赤線)では EAE が悪化する

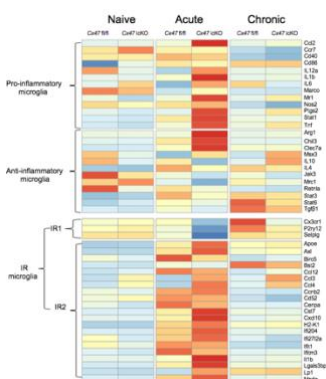


図 6 急性期におけるアストログリアの活性化

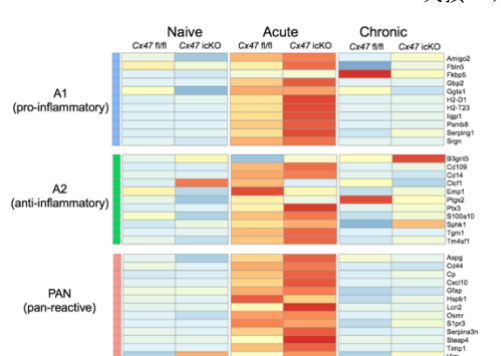


図 7 ミクログリアは急性期に活性化し、炎症は慢性期も遷延する

今回の Cx コンディショナルノックアウトマウスを用いた動物実験により、Cx が多発性硬化症モデル動物の病態に深く関わっていること、Cx の種類・発現細胞によってその作用が大きく異なること(アストログリアの Cx は神経障害性、オリゴデンドログリア

の Cx は神経保護的に働く)、グリア細胞同士の Cx を介した情報伝達(グリアシンシチウム)が病変の病態形成に大きく関与していることが明らかとなった。今後は、Cx チャンネルの選択的阻害薬やグリア炎症抑制薬を用いた、中枢神経組織そのものを標的とした創薬が、現在アンメットニーズとなっている慢性期多発性硬化症の治療開発に大変重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 5 件）

1. Fujita A, Ogata H, Yamasaki R, Matsushita T, Kira J-I. Parallel fluctuation of anti-neurofascin 155 antibody levels with clinico-electrophysiological findings in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neurol Sci.* 2018;384:107–12.
2. Fang M, Yamasaki R, Li G, Masaki K, Yamaguchi H, Fujita A, Isobe N, Kira J-I. Connexin 30 Deficiency Attenuates Chronic but Not Acute Phases of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Through Induction of Neuroprotective Microglia. *Front Immunol.* 2018;9:2588.
3. Li G, Yamasaki R, Fang M, Masaki K, Ochi H, Matsushita T, Kira J-I. Novel disease-modifying anti-rheumatic drug iguratimod suppresses chronic experimental autoimmune encephalomyelitis by down-regulating activation of macrophages/microglia through an NF- κ B pathway. *Sci Rep.* 2018;8(1):1933.
4. Maimaitijiang G, Shinoda K, Nakamura Y, Masaki K, Matsushita T, Isobe N, Yamasaki R, Yoshikai Y, Kira J-I. Association of Decreased Percentage of $V\delta 2+V\gamma 9+ \gamma\delta$ T Cells With Disease Severity in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2018;9:748.
5. Watanabe M, Masaki K, Yamasaki R, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Matsushita T, Suzumura A, Kira J-I. Th1 cells downregulate connexin 43 gap junctions in astrocytes via microglial activation. *Sci Rep.* 2016;6(1):38387.

〔学会発表〕（計 6 件）

1. Hayashida S, Masaki K, Suzuki S, Matsushita T, Yamasaki R, Suenaga T, Takahashi K, Iwaki T, Kira J-I. Focal cortical astrocytopathy with demyelination in neuromyelitis optica spectrum disorder. 第 59 回日本神経学会学術大会, 2018
2. Yamasaki R, Zhao Y, Wijering M, Yamaguchi H, Kira J-I. A novel secondary progressive multiple sclerosis model by oligodendroglia-specific inducible conditional knockout of connexin 47. International Society of Neuroimmunology Congress 2018(国際学会), 2018
3. Hayashi F, Isobe N, Nakamura Y, Matsushita T, Kira J-I. T cell receptor repertoire in multiple sclerosis patients. ECTRIMS 2018 - European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis(国際学会), 2018
4. Une H, Yamaguchi H, Zhao Y, Shinoda K, Masaki K, Götz M, Yamasaki R, Kira J-I. Experimental autoimmune encephalomyelitis is ameliorated in mice with gray matter astroglia-specific inducible connexin 43 knock-out. XXIII World Congress of Neurology (WCN2017)(国際学会), 2017
5. Hayashida S, Masaki K, Suzuki S, Matsushita T, Yamasaki R, Suenaga T, Takahashi K, Iwaki T, Kira J-I. Focal cortical astrocytopathy lesions with demyelination and inflammatory cell infiltrates in neuromyelitis optica spectrum disorder: a neuropathological study of eleven autopsied cases. 7th Joint ECTRIMS-ACTRIMS Meeting(国際学会), 2017
6. Guzailiyi M, Shinoda K, Nakamura Y, Masaki K, Matsushita T, Yamasaki R, Yoshikai Y, Kira J-I. Derangement of $\gamma\delta$ T cell subsets is associated with disease severity of multiple sclerosis. XXIII World Congress of Neurology(国際学会), 2017

〔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
なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松下拓也

ローマ字氏名：Takuya Matsushita

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院
職名：講師
研究者番号（8桁）：00533001

研究分担者氏名：山口 浩雄
ローマ字氏名：Hiroo Yamaguchi
所属研究機関名：九州大学
部局名：大学病院
職名：特任講師
研究者番号（8桁）：00701830

研究分担者氏名：山崎 亮
ローマ字氏名：Ryo Yamasaki
所属研究機関名：九州大学
部局名：大学病院
職名：准教授
研究者番号（8桁）：10467946

研究分担者氏名：山本 健
ローマ字氏名：Ken Yamamoto
所属研究機関名：久留米大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：60274528

研究分担者氏名：篠田 紘司
ローマ字氏名：Koji Shinoda
所属研究機関名：九州大学
部局名：医学研究院
職名：助教
研究者番号（8桁）：70747998

研究分担者氏名：眞崎 勝久
ローマ字氏名：Katsuhisa Masaki
所属研究機関名：九州大学
部局名：大学病院
職名：講師
研究者番号（8桁）：90612903

(2)研究協力者
なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。