

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09694

研究課題名(和文) アストログリアコネクシンの脳内免疫系賦活作用の抑制による多発性硬化症治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic options for multiple sclerosis by suppression of CNS immune system augmentation due to the malfunction of astroglia connexin

研究代表者

山崎 亮 (Yamasaki, Ryo)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：10467946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、二次進行形多発性硬化症(SPMS)における治療薬開発のため、動物モデルを用いた原因究明を行っている。SPMS患者剖検脳組織では、グリア細胞の活性化と、それらが発現するギャップ結合蛋白(=コネクシン、Cx)の増加を認める。ここに着目し、私達はグリア細胞のCx機能解析を試みた。Cx30やCx43はアストログリアに主に発現している。Cx30欠損マウスに多発性硬化症モデルの病態(EAE)を誘導すると、野生型マウスと比較し慢性期の症状が改善した。また、Cx43のアストログリア特異的欠損マウスでも同様に、EAEの軽症化を認めた。このことから、Cx機能抑制による新規治療法開発の可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性硬化症(MS)は若年女性に好発する中枢神経脱髄性疾患で、従来は欧米に多かったが、食生活の多様化やグローバル化により本邦でも患者数は増加傾向にある。MSの発症初期は再発寛解型の経過を取るが、十年以上経過すると二次進行形となり、現時点で治療方法がない。私達は、二次進行形MSにおけるグリア炎症に着目し、この時期の疾患メカニズム解明を目的とした。今回の研究で判明したコネクシンの疾患メカニズムにおける重要性は、同蛋白の機能阻害による二次進行形MSの新規治療薬創薬の足がかりとなる。

研究成果の概要(英文)：Our main purpose of this project is to investigate the cause of secondary-progressive multiple sclerosis (SPMS) using animal model for the development of new therapeutic options. In brain autopsied sample of SPMS patients, activation of glial cells and increase of gap junction proteins (= connexin, Cx) are observed. Focusing on this, we tried to analyze functions of Cxs on glial cells. Cx30 and Cx43 are mainly expressed in astroglia. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) which is known as an animal model for MS, in Cx30 deficient mice resulted in amelioration of chronic phase signs compared to wild type mice. In addition, in Cx43 astroglia-specific deficient mice, EAE was also ameliorated. From these findings, we found the clue for the development of new drugs for SPMS through the functional modification of Cxs.

研究分野：神経科学、神経免疫学

キーワード：多発性硬化症 実験的自己免疫性脳脊髄炎 コネクシン アストログリア 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(Multiple Sclerosis, MS)は再発寛解を繰り返す代表的な自己免疫性神経疾患である。世界での患者数は230万人(2013年)、日本では9,900人(2004)と言われていた。しかし食生活の欧米化などによりアジア地域でも患者数は増加傾向である。本疾患は若年女性に多く、患者数の増加は社会的影響も大きい。疾患のメカニズムとして、発症当初は再発寛解型MS(RRMS)といって一過性の神経症状をきたすが自然寛解する。しかし、発症後20年経つと二次進行形MS(SPMS)に移行し、以後は症状が徐々に進行する。

RRMS に対する症状軽減治療、および再発予防治療についてはこれまで確立されているが、SPMS に対する治療法はほとんどない。その原因の多くは、RRMS に比べて SPMS の疾患メカニズムが不明であることに起因する。RRMS は末梢の免疫反応が要因であるのに対し、SPMS は中枢神経系の細胞が疾患メカニズムを形成する。特に中枢グリア細胞(ミクログリア、アストログリア、オリゴデンドログリア)は重要な役割を担っている。しかし、これらの細胞がMSの病態にどの程度関わっているのかは不明である。グリア細胞同士は同種および異種細胞間でギャップ結合を形成し、物質の交換を行っている。これらはおもにコネキシンと呼ばれる分子が互いに結合してチャネル形成される。また、コネキシンは単独でもヘミチャネルを形成し、細胞内外で物質の交換を行う。MSの病変では、細胞脱落を来していなくてもこれらのコネキシンの発現が低下しており、病態への関与が強く示唆されていた。

2. 研究の目的

MSの病態メカニズムにおけるアストログリアの関与を明らかにする。MS病変部で発現低下しているアストログリアコネキシンが脳内免疫反応に及ぼす影響を解明する。

3. 研究の方法

アストログリアはコネキシン30(Cx30)とCx43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2種類を作成した。すなわちGlast-CreERT2;Cx43fl/fl (conditional grey matter astroglia-specific Cx43 ablated mice)およびGFAP-CreERT1;Cx43fl/fl (conditional white matter astroglia-specific Cx43 ablated mice)により、GFAP陽性アストログリア特異的Cx43欠損マウスおよびGLAST陽性アストログリア特異的Cx43欠損マウスを作成した。これらの3系統の遺伝子改変マウス(Cx30KO、GLAST-Cx43icKO、GFAP-Cx43icKO)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に瑞祥蛋白(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

①Cx30KO EAE

Cx30の全身欠損マウスを用いたEAEでは、慢性期のEAE

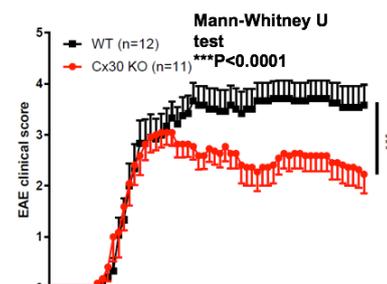


図1 Cx30欠損マウス EAE

症状の軽症化を認めた(図 1)。同マウスではミクログリアの炎症性活性化が抑制され、抗炎症性マーカーである Arginase1 の発現が亢進していた。アストログリアは活性化していたが、やはり抗炎症性マーカーである S100A10 を、特に慢性期で強く発現していた(図 2)。これらの結果から、Cx30 の発現低下はアストログリアの神経保護的活性化を誘導し、ミクログリアの炎症性活性化を抑制するとともに抗炎症性活性化を促進することで、急性期でなくおもに慢性期の EAE 症状を軽減することを世界で初めて見出した。

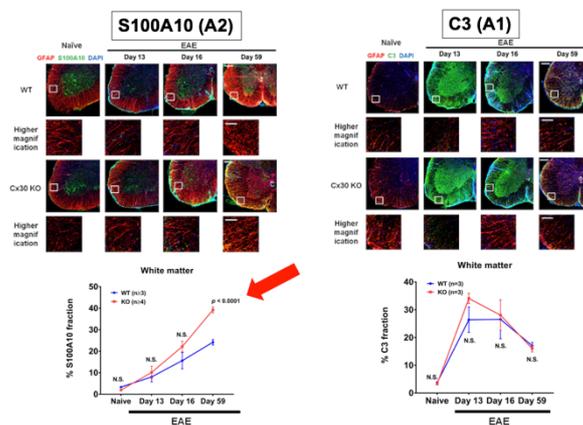


図 2 A2(保護的アストログリア)の増加

②GLAST-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。

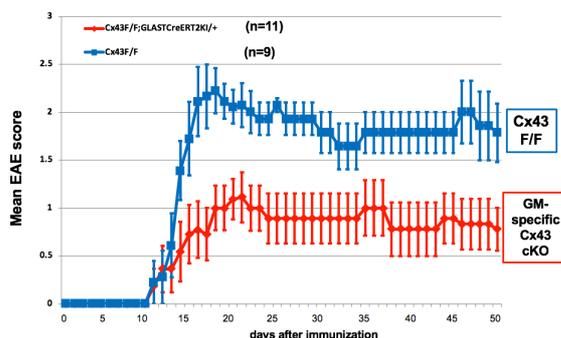


図 3 GLAST-Cx43 欠損マウス EAE

③GFAP-Cx43icKO EAE

GFAP 発現アストログリア特異的 Cx43 欠損マウスの EAE について、研究当初は GLAST-Cx43icKO と同様に、EAE 誘導前にタモキシフェンにより GFAP 発現アストログリアにおける Cx43 の発現抑制を期待したが、結果として対照マウスと比較し臨床経過および組織学的に全く有意差がみられなかった。これは、GFAP が活性化アストログリアにおいて強発現することに起因し、活性化していない段階でタモキシフェンを投与しても効果的な Cx43 の発現低下を誘導できなかった可能性が示唆された。このため、研究計画を見直し、EAE 誘導後にアストログリアが活性化し、GFAP の発現が十分亢進し、かつ EAE 発症前の段階でタモキシフェンを投与し、その後の経過を比較した。その結果、急性期症状に変化はなかったものの、慢性期において EAE の症状軽減を認めた(図 5)。組織学的にも Arginase-1 陽性の保護的マクローファージ・ミクログリアの病変部における増加を認めたことから、GFAP-Cx43icKO による炎症性環境の阻害により慢性炎症を抑制できた可能性が示唆された。現在も詳細を解析中である。

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

Time course comparison	naive vs p10 (Elevated)		naive vs p17 (Elevated)		p10 vs p17 (Elevated)	
	fl/fl	icKO	fl/fl	icKO	fl/fl	icKO
A1	0.038 (p10)	0.684	0.004(p17)	0.001(p17)	0.885	0.093
A2	0.011 (p10)	0.556	0.284	0.010(p17)	0.024(p10)	0.122
pan	0.0016 (p10)	0.392	0.008(p17)	0.057(p17)	0.225	0.025(p17)
pro-inf	0.13	0.409	0.018(p17)	0.029(p17)	0.329	0.030(p17)
anti-inf	0.726	0.131	0.522	0.330	0.612	0.355

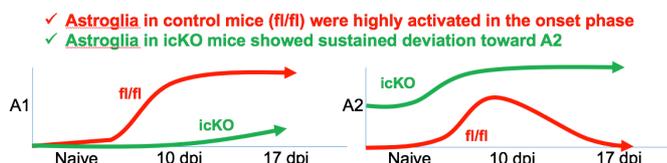


図 4 GLAST-Cx43 欠損マウスは A2 優位

今回の動物モデルを用いた研究により、これまで全く不明であった慢性期における末梢免疫を介さない中枢炎症遷延の原因として、アストログリアが大変大きな役割を担っていることが初めて明らかになった。アストログリアは Cx からなるギャップ結合により

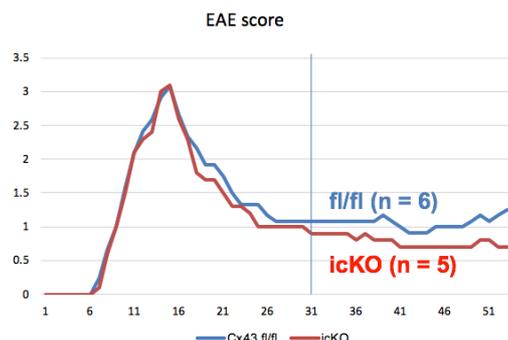


図 5 GFAP-Cx43 欠損マウス EAE

細胞同士が連絡しているが、Cx は相手の細胞がない場合、ヘミチャネルとして働き、細胞外へサイトカインや ATP などの生理活性物質を放出することが知られている。実際の MS 患者病変においてもアストログリアの Cx は急性期に発現低下する一方慢性期には発現が亢進する。これらのアストログリアの作用について、これまで明らかにされていなかったが、今回の研究によりアストログリアコネクシンは少なくとも慢性期中枢炎症維持に重要であることが明らかとなった。

現在、SPMS の治療薬はシポニモドやオザニモドといった薬剤が承認されているが、これらはいずれも末梢リンパ組織からのリンパ球遊出を阻害するとともにグリア細胞の活性化を抑制する可能性が示唆されているが、後者のメカニズムについては明らかにされていない。今後の SPMS 治療薬開発におけるグリア細胞機能解明の重要性はますます増加し、コネクシンを介する機能修飾はその一翼を担う重要事項である。コネクシンの機能修飾作用をもつ薬剤は甘草の誘導体である CBX およびその脳内移行性を改善させた INI0602 等、実用化に向けて開発が進行中である。これらの薬剤を実用化するためにも、コネクシンが疾患メカニズムに与える影響の解析は大変重要な研究課題である。今後もこのテーマについて継続的に研究に取り組む必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

1: Fang M, Yamasaki R, Li G, Masaki K, Yamaguchi H, Fujita A, Isobe N, Kira JI. **Connexin 30** deficiency attenuates chronic but not acute phases of experimental autoimmune encephalomyelitis through induction of neuroprotective microglia. *Front Immunol.* 2018 Nov 7;9:2588. doi: 10.3389/fimmu.2018.02588.

2: Fujita A, Yamaguchi H, Yamasaki R, Cui Y, Matsuoka Y, Yamada KI, Kira JI. **Connexin 30** deficiency attenuates A2 astrocyte responses and induces severe neurodegeneration in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride Parkinson's disease animal model. *J Neuroinflammation.* 2018 Aug 13;15(1):227. doi: 10.1186/s12974-018-1251-0.

3: Li G, Yamasaki R, Fang M, Masaki K, Ochi H, Matsushita T, Kira JI. 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 Jan 31;8(1):1933. doi: 10.1038/s41598-018-20390-5.

〔学会発表〕 (計 8 件)

(海外)

- ① Yamasaki R, Fang M, Yamaguchi H, Kira J: "Functional analysis of connexin 30 in experimental autoimmune encephalomyelitis", American Neurological Association 141th Annual Meeting 2016. 10. 16-18, Baltimore, MA, USA.
- ② Yamasaki R, Zhao Y, Yamaguchi H, Kira J: "Oligodendroglia-specific Connexin 47 deletion induced relapse-remitting EAE model mice", Pan-Asian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis 10th Annual Meeting.2017. 11. 23-25, Ho Chi Minh, Vietnam.
- ③ Yamasaki R, Zhao Y, Wijering M, Yamaguchi H, Kira J: " A novel secondary progressive multiple sclerosis model by oligodendroglia-specific inducible conditional knockout of connexin 47", 14th international congress of neuroimmunology. 2018. 8.31, Brisbane, Australia.

(国内)

シンポジウム

- ④ 山崎亮: 「Astroglial (Cx30, Cx43) and oligodendroglial (Cx47) connexins modulate acute and chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)」, 第 4 回 MS サマーカレッジ, 2017.8.5-6, 兵庫。(教育委員会委員長賞受賞)
- ⑤ Yamasaki R: Revisiting glia; as a mother and guardian of central nervous system. 59th annual meeting of the JSN, 2018. 5.23-26, Sapporo, Japan.
- ⑥ 山崎亮, 趙奕楠, Marion Wijering, 方梅, 宇根隼人, 山口浩雄, 吉良潤一: 「ギャップ結合蛋白コネクシンが多発性硬化症モデルマウスの病態に及ぼす影響の解析」, 第 40 回日本生物学的精神医学会, 第 61 回日本神経化学会大会合同年会, 2018.9.6-8. 神戸. 一般口演
- ⑦ 山崎亮, 方梅, 李広瑞, 藤田篤史, 宇根隼人, 山口浩雄, 吉良潤一: 「Connexin 30 欠損マウスにおける慢性進行期 EAE の軽症化」, 第 29 回日本神経免疫学会学術集会.

2017.10.6-7. 北海道.

- ⑧ Yamasaki R, Zhao Y, Wijering M, Yamaguchi H, Kira J: " Oligodendroglia-specific Connexin 47 deletion produces a secondary-progressive multiple sclerosis model", 59th annual meeting of the JSN, 2018. 5.23-26, Sapporo, Japan.

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

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：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：医学研究院

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：90612903

※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。