

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18590933

研究課題名（和文） 炎症性脱髄におけるミッドカインファミリーの役割

研究課題名（英文） The role of midkine family in inflammatory demyelination

研究代表者

水野 哲也 (MIZUNO TETSUYA)

名古屋大学・環境医学研究所・准教授

研究者番号：70335008

研究成果の概要：多発性硬化症、自己免疫性脳脊髄炎などの炎症性脱髄において、ミッドカインが、自己免疫を調節している調節性 T 細胞や調節性樹状細胞の機能を抑制することによりその発症に関与していることを明らかにした。さらに、抗体よりも優れた結合力和特異性をもつ RNA アプタマーを用いたミッドカイン機能の制御によって、自己免疫性脳脊髄炎の発症を効果的に抑制することができた。本研究は、ミッドカイン抑制を標的とした炎症性脱髄疾患の新規治療法の可能性を示すものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：ミッドカイン、炎症性脱髄、調節性 T 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系において、脱髄による神経障害を引き起こす多発性硬化症の病因、病態は未だ明らかでなく、また確実な治療や再発予防の方法は確立していない。病巣に浸潤する CD4 陽性の I 型ヘルパー T 細胞、マクロファージおよびミクログリアの産生する種々のサイトカイン、ケモカイン、活性酸素、一酸化窒素等の分子が病態の形成に関与していると考えられている。ミッドカインは

Muramatsu らにより発見された成長因子で、従来、がん患者血清で増加しているため、腫瘍マーカーとして用いられている。さらに、炎症性細胞の遊走を促進し炎症を促進すること、アポトーシスを抑制する作用が知られている。また、アルツハイマー病の老人斑に沈着していることから、神経傷害に際して産生される可能性も示されているが、詳細は不明である (Muramatsu, J. Neurochem. 132:359-371, 2002、村松喬、蛋白核酸酵素

47:1259-1267, 2002)。ミッドカインの免疫系における作用は現在のところ不明であるが、最近リウマチのモデルであるアジュバント関節炎がミッドカイン欠損動物で起こりにくいことが示され (Maruyama et al, Arthritis Rheum 50:1240, 2004)、ミッドカインが自己免疫発現に何らかの役割を担っている可能性が考えられた。

2. 研究の目的 ミッドカインの役割を明らかにし、それを標的として、炎症細胞の機能を調節することによって、多発性硬化症のみならず、種々の自己免疫疾患の新たな治療法の開発が期待される。ミッドカインと免疫系との関係はこれまで研究されておらず、本研究により、ミッドカインの免疫系での新たな位置づけを明らかにしうるものと考えられる。

### 3. 研究の方法

中枢神経系におけるミッドカインの役割について各種培養細胞を用いて検討した。

- (1) 培養ミクログリア、アストロサイトに對するミッドカインの作用
- (2) 培養神経細胞、オリゴデンドロサイトに對するミッドカインの作用

次に、自己免疫性脳脊髄炎(EAE)発症におけるミッドカインの役割を明らかにするとともに、自己免疫を調節している CD4、CD25 陽性調節性 T 細胞に対するミッドカインの役割を検討した。

- (3) EAE における血中、脊髄病巣中のミッドカインの動態の検討

まず、CD4、CD25 陽性細胞の分化・増殖およびその動態におけるミッドカインの役割をミッドカインノックアウトマウスを用いて検討した。さらに抗体よりも優れた結合力と特異性をもつ RNA アプタマーによりミッドカイン機能を抑制することによる EAE の症状改善について検討した。

### 4. 研究成果

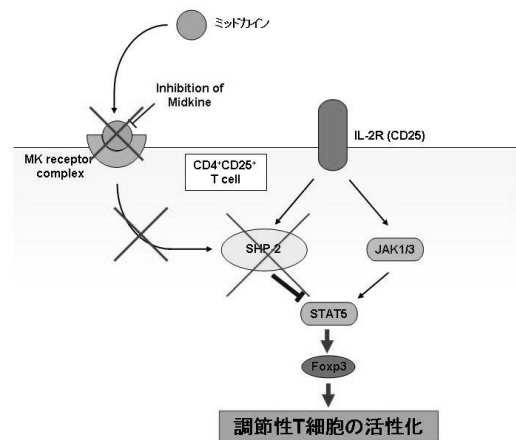
- (1) 培養ミクログリア、アストロサイトに對するミッドカインの作用

ミクログリアのサイトカイン、ケモカイン、神経栄養因子、一酸化窒素産生、および、抗原提示関連分子(MHC-class II、CD40、B7-1、B7-2)産生に及ぼすミッドカインの効果について検討したが、有意な変化は認められなかった。アストロサイトに対しても有意な変化は認められなかった。

- (2) 培養神経細胞、オリゴデンドロサイトに對するミッドカインの作用

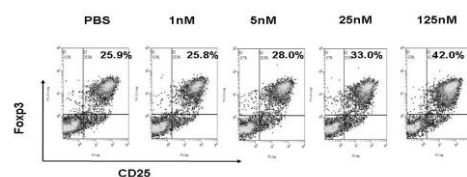
ミッドカインの直接的な神経細胞傷害に対する作用を、培養大脳皮質神経細胞を用いて検討したが、神経細胞傷害は認められなかった。ミッドカインの神経細胞への直接的な作用はないものと考えられた。同様にオリゴデンドロサイトの株化細胞に対しても細胞傷害作用は認められなかった。

(3) ミッドカインノックアウトマウスに誘導した EAE は、CD4、CD25 陽性調節性 T 細胞の増加を介してその症状が抑制されることが明らかとなった。その詳細な機序は、ミッドカイン抑制により CD4+T 細胞での SHP-2 発現が低下し、STAT5 リン酸化を介した Foxp3 の発現増加とそれに伴う抗原特異性調節性 T 細胞活性化が誘導されるためである(下図)。

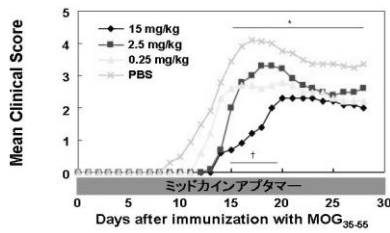


これらのことから、自己反応性 Th1/Th17 細胞の免疫反応の抑制および中枢神経系の炎症細胞浸潤が抑制されることにより、EAE の発症が抑制されるものと考えられた。そこで、多発性硬化症の新規治療法開発を目指して、抗ミッドカイン RNA アプタマーを用いたミッドカイン阻害による EAE 抑制効果について検討を行ったところ、抗ミッドカイン RNA アプタマー投与群では、濃度依存的に調節性 T 細胞を増加させ、臨床症状を有意に改善した。さらに、EAE 発症後に、抗ミッドカイン RNA アプタマーを投与したところ、有意に神経症状の改善が認められた。(下図)。

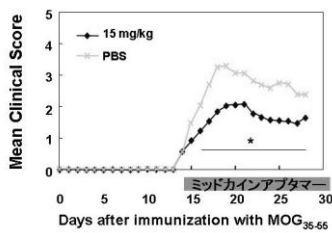
ミッドカインアプタマーによる調節性T細胞の増加



ミッドカインアプタマーはEAEを濃度依存的に抑制する

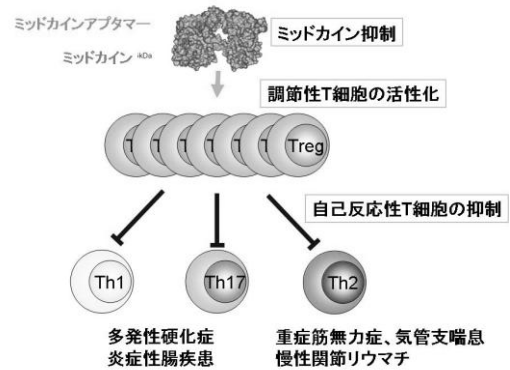


ミッドカインアプタマーはEAE発症後に投与しても有効である



以上のことから、RNA アプタマーを用いてミッドカイン抑制を標的とすることは、多発性硬化症をはじめとした自己免疫疾患に対する新たな治療法となりうることを示された。

また、ミッドカインがT細胞機能制御作用を持つ調節性樹状細胞に対してもその機能を抑制していることを明らかにし、ミッドカイン RNA アプタマーが調節性樹状細胞の機能を回復することも確かめられた。さらに、炎症性脱髄における脳脊髄血管内皮細胞の傷害において IL-25 が低下することが明らかとなり、この障害に対するミッドカイン RNA アプタマーの有用性も確かめられた。脳脊髄血管内皮細胞傷害は、EAE 病初期より認められることからミッドカイン RNA アプタマーの早期投与は、炎症性脱髄疾患の早期治療薬として有用であることが示唆された。これらの成果を踏まえ、ミッドカイン RNA アプタマーの多発性硬化症への治験も 2010 年に予定されており、多発性硬化症の新たな治療薬として実用化に向けて進捗している。下図に示すように、ミッドカイン RNA アプタマーは種々の自己免疫疾患の治療薬としての可能性を有している。



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 8 件)

- ① Liang J, Mizuno T, Suzumura A 他(11人 10 番目). Excitatory amino acid transporter expression by astrocytes is neuroprotective against microglial excitotoxicity. *Brain Research* 1210:11-19 2008 査読有
- ② Sonobe Y, Mizuno T, Suzumura A 他(7人 6 番目). Microglia express a functional receptor for interleukin-23. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 370:129-133 2008 査読有
- ③ Mizuno T, Suzumura A 他(10人 1 番目). Interferon- $\gamma$  directly induces neurotoxicity through a neuron specific, calcium-permeable complex of IFN- $\gamma$  receptor and AMPA GluR1 receptor. *FASEB Journal* 22:1797-1806 2008 査読有
- ④ Kawanokuchi J, Mizuno T, Suzumura A 他(7人 5 番目) Production and functions of IL-17 in microglia *Journal of Neuroimmunology* 194:54-61 2008 査読有
- ⑤ Wang J, Takeuchi H, Sonobe Y, Mizuno T 他(12人 5 番目). Inhibition of midkine alleviates experimental autoimmune encephalo-myelitis through the expansion of regulatory T cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105: 3915-3920 2008 査読有
- ⑥ Sonobe Y, Jin S, Takeuchi H, Mizuno T 他(7人 6 番目). Chronological changes of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subsets in the experimental autoimmune encephalo-myelitis, a mouse model of multiple sclerosis. *Tohoku Journal of*

Experimental Medicine 213: 329-339  
2007 査読有

- ⑦ Suzumura A, Takeuchi H, Zhang G, Kuno R, Mizuno T. Role of glia-derived cytokines on neuronal degeneration and regeneration. Annals of New York Academy of Science 1088:219-229 2006 査読有
- ⑧ Kawanokuchi J, Mizuno T, Takeuchi H, Kato H, Wang J, Mitsuma N, Suzumura A. Production of interferon- $\gamma$  by microglia Multiple Sclerosis 12:558-564 2006 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

- ① 片岡邦夫、水野哲也、錫村明生 中枢神経系におけるインターロイキン-25 の発現とその機能 第 20 回神経免疫学会学術集会 2008 年 4 月 17 日 新潟
- ② 菌部佳史 抗体及び aptamer を用いた Midkine 阻害に基づく多発性硬化症の新規治療法開発 第 19 回日本神経免疫学会学術集会 2007 年 4 月 12 日 金沢
- ③ 竹内英之、王金岩、水野哲也、錫村明生: Midkine 欠損マウスでは制御性 T 細胞の増加により EAE の発症が抑制される。第 47 回日本神経学会総会, 2006 年 5 月 11 日 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水野 哲也 (MIZUNO TETSUYA)  
名古屋大学・環境医学研究所・准教授  
研究者番号: 70335008