

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 ~ 2008
 課題番号：19590996
 研究課題名 (和文) 低分子量 GTPase 阻害剤による多発性硬化症の新規治療法の開発
 研究課題名 (英文) Rho-kinase inhibitor: a novel therapeutic approach for multiple sclerosis
 研究代表者
 三野原 元澄 (MINOHARA MOTOZUMI)
 九州大学・大学病院・講師
 研究者番号：70398113

研究成果の概要：

我々は、Rho-kinase 阻害剤である fasudil が、多発性硬化症 (MS) の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) に対して、予防的効果や治療的効果があることを報告している。さらに、実験的自己免疫性神経炎 (EAN) においても同様の効果が認められており、自己反応性 T 細胞はいずれも Th1 への分化が抑制されていた。Rho-kinase 阻害剤は P38 のリン酸化を増大させることで、Th2 へのシフトを誘導することが示された。Rho-kinase 阻害剤である fasudil は、既に我が国では「くも膜下出血術後の脳血管攣縮およびこれに伴う脳虚血症状」に対して使用されている薬剤であり、その安全性は確立している。以上のことから、Rho-kinase 阻害薬は MS の新規治療法として効果が期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：多発性硬化症、Rho-kinase、低分子量 GTPase、実験的自己免疫性脳脊髄炎、fasudil

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) は、ミエリン蛋白を自己抗原とした自己反応性 T 細胞の関与する自己免疫疾患であり、IFN- γ を産生する Th1 優位な疾患と考えられている。また、最近の研究では、従来

の Th1/Th2 に加え、IL-17 を産生する Th-IL17 がその発症に強く関与することが示唆されている。これらヘルパー T 細胞の分化には、様々なシグナル伝達分子が関与する。近年、3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA)還元酵素阻害剤

であるスタチン系薬剤が、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) の発症を抑制したり、重症化を抑制することが報告され (Aktas et al., 2003; Greenwood et al., 2000; Nath et al., 2004; Stanislaus et al., 1999; Youssef et al., 2002)、最近の検討では、simvastatin による MS への効果として、MRI での新しい病巣の数が有意に低下したと報告されている (Vollmer et al., 2004)。スタチン系薬剤はメバロネート経路を阻害し、コレステロールの産生を抑制する。メバロネート経路の中間に位置する、geranyl-pyrophosphate や farnesyl-pyrophosphate は、低分子量 GTPase をプレニル化することにより機能的蛋白に誘導するため、スタチン系薬剤の MS に対する効果は、これら低分子量 GTPase の阻害による効果が大きいと考えられている (Dunn et al., 2006)。実際に低分子量 GTPase のプレニル化を行う prenyltransferase 阻害剤は EAE の発症前より投与した場合、重症度の軽減が認められる (Walters et al., 2002)。

Rho、Rac、Cdc42 などの低分子量 GTPase は、GDP 結合型の不活性体と GTP 結合型の活性体の間を行き来して、さまざまな細胞反応の分子スイッチとして働いている。サイトカインやケモカインなどの細胞外からの刺激に対して、これらの分子スイッチはアクチン骨格系の再編成を時間的・空間的に制御し、細胞分裂、接着、走化などの応答を支配している。最近、私どもの研究室では、Rho の下流に位置する Rho-kinase の特異的阻害剤である fasudil を EAE に投与することにより、その発症が抑制されること、発症後の治療的投与においても再発が抑制されることを報告した

(Sun et al. J Neuroimmunol. 2006)。この抑制効果には、自己反応性 T 細胞の Th2 へのシフトが関与し、Th1 や Th-IL17 が強く抑制されていることが大きく貢献していることを解明した。一方で、Rho-kinase 阻害剤は神経細胞に対して軸索の伸張や再ミエリン化を誘導するなどの、神経再生にも関与することが報告されている (Hiraga et al., 2006)。つまり、低分子量 GTPase の一つである Rho の下流に位置する主要なエフェクター分子である Rho-kinase の選択的阻害は、MS の新規治療薬としての役立つことが示された。

2. 研究の目的

MS は免疫性神経疾患のなかで最も頻度が高く、かつ重篤な後遺症を残す代表的な神経難病である。本研究では Rho-kinase 阻害剤による EAE 抑制のメカニズムの解明を行い、MS の新規治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

実験的自己免疫性神経炎 (EAN) の誘導：7～8 週齢の雄ルイスラットに、P0 p180-199 を免疫し EAN を誘導。

投与方法：浸透圧ポンプを皮下に植え込み、持続投与を行った。予防的投与では P0 ペプチドで免疫する 2 日前 (day-2) より投与を開始した。Fasudil の投与量は 100 mg/kg/day とし、コントロールでは PBS を投与した。治療的投与では、免疫後 13 日目 (day13) より投与を開始した。

評価：体重と clinical score の測定 (連日)。

病理学的評価：予防的投与では免疫後 18 日目、治療的投与では 35 日目の坐骨神経を HE 染色、抗 myelin basic protein (MBP) 抗体、抗 neurofilament (NF) 抗体を用いた免疫染色により評価した。

P0 ペプチド反応性 T 細胞の解析: 予防的投与において、day10 のリンパ節細胞を P0 ペプチドにて刺激し、増殖応答、上清中のサイトカインの測定を行った。更に day10 のリンパ節において、stat-3, -4, -6 のリン酸化をウェスタンブロット法を用いて検討した。

MAP kinase への影響: ラット脾臓細胞に対して抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体による刺激を行い、Rho-kinase 阻害剤の有無で増殖応答の検討、並びに MAP kinase のリン酸化を検討した。

4. 研究成果

予防的投与: Fasudil 投与群では、コントロール群と比べ重症度の有意な低下が認められた (図 1)。onset は fasudil 投与群は PBS 投与群に比べ有意に遅れ (15.0 vs. 12.1, $p=0.0004$)、最大 clinical score も有意に低下した (0.94 vs. 2.45, $p=0.003$)。免疫後 18 日目の坐骨神経では、fasudil 投与群では炎症細胞浸潤の程度の有意な低下や脱髄巢の有意な縮小が認められた ($p=0.042$, $p=0.036$)。免疫後 10 日目のリンパ節細胞において、P0 ペプチド反応性 T 細胞の増殖応答は fasudil 投与群はコントロール群に比べ低下していた。この時の上清中に産生されたサイトカインの測定では、fasudil 投与群において IFN- γ 産生は著明に低下し、IFN- γ /IL-4 比の低下が認められた (図 2)。リンパ節を用いた STAT のリン酸化の検討では、STAT-6 のリン酸化の割合が fasudil 投与群で有意に上昇していた ($p=0.012$) (図 3)。

治療的投与: 免疫後 13 日目より fasudil を投与した群において、免疫後 18 日目以降で重症度の有意な低下が認められた (図 4)。35 日目の坐骨神経の免疫染色では、fasudil 投与群で有意な脱髄巢の縮小が認められ ($p=0.009$)、軸索変性の程度も軽度であった。

Rho-kinase 阻害剤である fasudil は、EAN

に対して予防的投与では軽症化させ、治療的投与においても早期に重症度を改善させることが示された。予防的投与での効果は、自己反応性 T 細胞の分化や増殖により規定されていると考えられた。過去の報告では、Rho/Rho-kinase 経路の遮断は T 細胞に対して IFN- γ や IL-2 などの Th1 サイトカインの産生を著明に低下させることが報告されている。また、T 細胞のプライミングには免疫学的シナプスの形成が必要であるが、Rho はこの形成にも関わる。さらに、Rho-kinase 阻害剤は T 細胞に対し IKK の活性化を抑制することが示されている。これにより I κ B の degradation は抑制され、NF- κ B の核内への移動が阻害される。これらの機序により自己反応性 T 細胞の Th2 へのシフトや増殖抑制が誘導されると推察される。また、Rho-kinase 阻害剤は T 細胞の migration を抑制するため、神経炎惹起性 T 細胞が誘導された後の fasudil の投与 (治療的投与) においても効果が認められた。

本研究では更に、ラット脾臓細胞に対して抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体による刺激を行い、Rho-kinase 阻害剤の有無で増殖応答を検討したところ、Rho-kinase 阻害剤の濃度に依存して増殖応答の低下が認められた。Rho-kinase の下流にある MAP kinase のリン酸化を検討した結果、p38 のリン酸化は fasudil を加えた場合で上昇していた。P38 のリン酸化の上昇は、T 細胞に対して Th2 へのシフトを誘導する、或いは p38 のリン酸化をブロックすることで Th2 サイトカインの産生が低下することが報告されている。つまり以上のような理由により、Rho-kinase 阻害剤である fasudil は Th2 への分化や Th2 サイトカイン産生を増大させ、Th1 や ThIL17 への分化を阻害していると考えられた。

一方で、Rho-kinase の阻害はニューロンの軸索伸張を誘導したり、シュワン細胞によるミエリン化を促進させることが報告されており、近年、神経系の再生の面でも期待されている。fasudil は我が国においては、既に「くも膜下出血術後の脳血管攣縮およびこれに伴う脳虚血症状」に対して使用されている薬剤であり、その安全性は確立している。以上のことから、Rho-kinase 阻害薬は MS の新規治療法として効果が期待される。

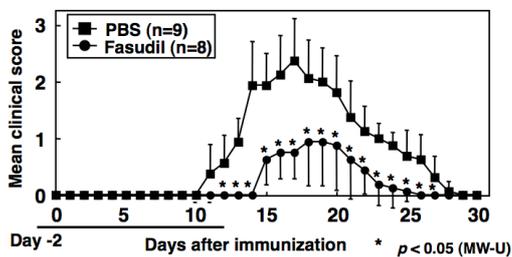


図1 Rho-kinase 阻害剤の予防的投与

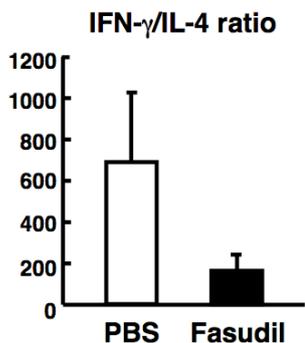


図2 Rho-kinase 阻害剤による Th1 反応抑制

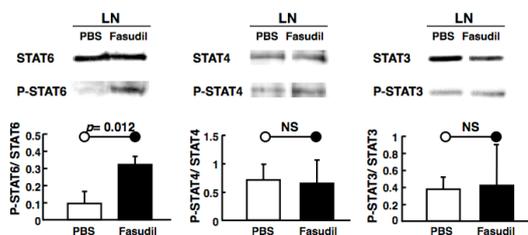


図3 Rho-kinase 阻害剤による STAT リン酸の変化

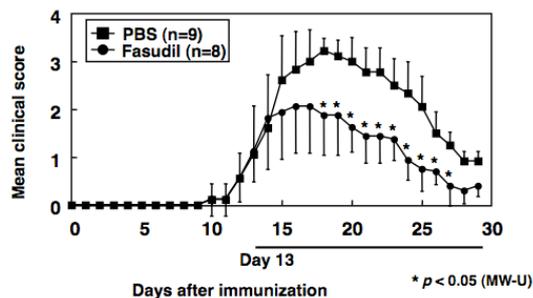


図4 Rho-kinase 阻害剤の治療的投与

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 12 件) (全て査読有り)

- 1) Li W, Minohara M, Su JJ, Matsuoka T, Osoegawa M, Ishizu T, Kira J: Helicobacter pylori is a potential protective factor against conventional type multiple sclerosis in the Japanese population. J Neuroimmunol 184: 227-231, 2007
- 2) Matsuoka T, Matsushita T, Kawano Y, Osoegawa M, Ochi H, Ishizu T, Minohara M, Kikuchi H, Mihara F, Ohyaig Y, Kira J: Heterogeneity of aquaporin-4 autoimmunity and spinal cord lesions in multiple sclerosis in Japanese. Brain 130: 1206-1223, 2007
- 3) Matsushita T, Matsuoka T, Ishizu T, Kikuchi H, Osoegawa M, Kawano Y, Mihara F, Ohyaig Y, Kira J: Anterior periventricular linear lesions in optic-spinal multiple sclerosis: a combined neuroimaging and neuropathological study. Multiple Sclerosis 14: 343-53, 2008
- 4) Matsuoka T, Matsushita T, Osoegawa M, Ochi H, Kawano Y, Mihara F, Ohyaig Y, Kira J: Heterogeneity and continuum of multiple sclerosis in Japanese according to magnetic resonance imaging findings. J Neurol Sci 266: 115-25, 2008
- 5) Kira J, * Isobe N, * Kawano Y, Osoegawa M, Ohyaig Y, Mihara F, Murai H: Atopic myelitis with focal amyotrophy: a possible link to Hopkins syndrome. J Neurol Sci 269: 143-51, 2008 *Equal contribution.

- 6) Matsuoka T, Matsushita T, Osoegawa M, Kawano Y, Minohara M, Mihara F, Nishimura Y, Ohyagi Y, Kira J: Association of the HLA-DRB1 alleles with characteristic MRI features of Asian multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 14: 1181-1190, 2008
- 7) Tanaka M, Matsushita T, Tateishi T, Ochi H, Kawano Y, Mei F-J, Minohara M, Murai H, Kira J: Distinct CSF cytokine/ chemokine profiles in atopic myelitis and other causes of myelitis. *Neurology* 71: 974-981, 2008
- 8) Tanaka M*, Ishizu T*, Ochi H, Kawano Y, Ohyagi Y, Kira J: Intrathecal upregulation of IFN- γ and MIP-I β in juvenile muscular atrophy of the distal upper extremity. *J Neurol Sci* 275: 74-77, 2008 *Equal contribution.
- 9) Shi N, Kawano Y, Matsuoka T, Mei F-J, Ishizu T, Ohyagi Y, Kira J: Increase of CD4⁺ TNF α ⁺ IL-2⁻ T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis* 15: 120-123, 2009
- 10) Doi H, Matsushita T, Isobe N, Matsuoka T, Minohara M, Ochi H, Kira J: Hypercomplementemia at relapse in patients with anti-aquaporin-4 antibody. *Multiple Sclerosis* 15: 304-310, 2009
- 11) Matsushita T, Matsuoka T, Isobe N, Kawamura Y, Minohara M, Shi N, Nishimura Y, Ochi H, Kira J: Association of the HLADPB1*0501 allele with anti-aquaporin-4 antibody positivity in Japanese patients with idiopathic central nervous system demyelinating disorders. *Tissue Antigens* 72: 171-176, 2009
- 12) Matsushita T, Isobe N, Matsuoka T, Shi N, Kawano Y, Wu X-M, Yoshiura T, Nakao Y, Ishizu T, Kira J: Aquaporin-4 autoimmune syndrome and anti-aquaporin-4 antibody-negative optico spinal multiple sclerosis in Japanese. *Multiple Sclerosis* (in press)

[学会発表] (計 19 件)

- 1) 三野原元澄、松下拓也、松岡健、小副川学、村井弘之、吉良潤一：日本人多発性硬化症における抗 CLNDND1 抗体の意義；第 19 回日本神経免疫学会学術集会 2007 年 4 月 12 日（金沢）
- 2) 松岡健、三野原元澄、松下拓也、小副川学、越智博文、吉良潤一：自験多発性硬化症患者の画像所見と HLA との関連：連続 121 例の解析結果；第 19 回日本神経免疫学会学術集会 2007 年 4 月 12 日（金沢）
- 3) 松下拓也、河野祐治、松岡健、小副川学、三野原元澄、吉良潤一；日本人多発性硬化症における抗 aquaporin-4 抗体陽性率と陽性例と陰性例との臨床像の比較；第 48 回日本神経学会総会 2007 年 5 月 16 日（名古屋）
- 4) 松岡健、松下拓也、河野祐治、小副川学、三野原元澄、吉良潤一：臨床型と抗 aquaporin-4 (AQP4) 抗体からみた日本人多発性硬化症の長大な脊髄病巣の解析；第 48 回日本神経学会総会 2007 年 5 月 16 日（名古屋）
- 5) 三野原元澄、松岡健、松下拓也、小副川学、越智博文、吉良潤一：日本人多発性硬化症における MRI 所見と HLA クラス II 遺伝子多型との相関；第 48 回日本神経学会総会 2007 年 5 月 16 日（名古屋）
- 6) Minohara M, Matsuoka T, Matsushita T, Kawamura N, Kira J. Serum autoantibodies to claudin domain containing 1 protein in Japanese patients with multiple sclerosis. *Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis*. Oct. 2007. (Prague)
- 7) 松岡健、松下拓也、河野祐治、三野原元澄、吉良潤一：抗 AQP4 抗体価からみた日本人多発性硬化症患者の病像・画像所見の特徴：抗 AQP4 抗体の役割について；第 20 回日本神経免疫学会学術集会 2008 年 4 月 17 日（新潟）
- 8) 河野祐治、松下拓也、松岡健、史楠、三野原元澄、吉良潤一：抗 aquaporin-4 (AQP4) 抗体価による多発性硬化症の免疫学的・遺伝学的背景の差異；第 20 回日本神経免疫学会学術集会 2008 年 4 月 17 日（新潟）

- 9) 河野祐治、松下拓也、松岡健、史楠、河村信利、三野原元澄、吉良潤一：FACS を用いた高感度抗 AQP4 抗体検出法の開発；第 20 回日本神経免疫学会学術集会 2008 年 4 月 17 日（新潟）
- 10) 河村信利、松下拓也、三野原元澄、河野祐治、吉良潤一：多発性硬化症における conformational に AQP1 を認識する抗体の検索；第 20 回日本神経免疫学会学術集会 2008 年 4 月 17 日（新潟）
- 11) 三野原元澄、松下拓也、松岡健、河村信利、吉良潤一：抗 CLDN1 抗体陽性多発性硬化症と抗 AQP4 抗体との関連；第 20 回日本神経免疫学会学術集会 2008 年 4 月 17 日（新潟）
- 12) 史楠、河野祐治、梅風君、松岡健、三野原元澄、越智博文、吉良潤一：MS 髄液における CD4⁺TNF α ⁺IL2⁻T 細胞サブセット異常；第 20 回日本神経免疫学会学術集会 2008 年 4 月 17 日（新潟）
- 13) 河野祐治、松下拓也、松岡健、河村信利、三野原元澄、吉良潤一：FACS による抗 native AQP4 抗体の高感度検出法の開発；第 49 回日本神経学会総会 2008 年 5 月 15 日（横浜）
- 14) 松岡健、松下拓也、河野祐治、三野原元澄、吉良潤一：抗体価と臨床像からみた抗 aquaporin-4 (AQP4) 抗体の意義；第 49 回日本神経学会総会 2008 年 5 月 15 日（横浜）
- 15) Kira J, Tanaka M, Matsushita T, Matuoka T, Tateishi T, Minohara M. Distinct cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in opticospinal multiple sclerosis, atopic myelitis and other causes of myelitis. WORLD CONGRESS ON TREATMENT AND RESEARCH IN MULTIPLE SCLEROSIS. 2008/9/17 (Montreal, Canada)
- 16) Doi H, Matsushita T, Isobe N, Matsuoka M, Minohara M, Ochi H, Kira J. Hypercomplementemia at Relapse in Patients with Anti-Aquaporin-4 Antibody. PACTRIMS for Treatment and Research in Multiple Sclerosis.

2008/11/21 (Kuala Lumpur)

- 17) 吉村怜、越智博文、三野原元澄、吉良潤一：末梢免疫担当細胞における brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 産生能と多発性硬化症 (MS) 病態との関連；第 21 回日本神経免疫学会学術集会 2009 年 3 月 12 日（大阪）
- 18) 磯部紀子、河野祐治、松下拓也、松岡健、河村信利、三野原元澄、吉良潤一：FACS を用いた高感度抗 AQP4 抗体の検出：サブクラス解析を含めて；第 21 回日本神経免疫学会学術集会 2009 年 3 月 12 日（大阪）
- 19) 三野原元澄、李巍、松下拓也、松岡健、磯部紀子、吉良潤一：多発性硬化症におけるヘリコバクターピロリ感染の影響；第 21 回日本神経免疫学会学術集会 2009 年 3 月 12 日（大阪）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/neuro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三野原 元澄 (MINOHARA MOTOZUMI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：70398113

(2) 研究分担者

河村 信利 (KAWAMURA NOBUTOSHI)
九州大学・医学研究院・学術研究員
研究者番号：00432930

(3) 連携研究者

該当なし