

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07515

研究課題名(和文) 多発性硬化症の再髄鞘化障害におけるB細胞が果たす役割の解明

研究課題名(英文) The role of B cells in remyelination impairment of multiple sclerosis

研究代表者

能登 大介 (Noto, Daisuke)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10598840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)では、脱髄巣での再髄鞘化障害の存在が知られている。我々の研究により、脱髄を誘導した脳切片培養系では、B細胞が産生する免疫グロブリンが再髄鞘化を促進することが示された。また髄鞘を形成するオリゴデンドロサイト前駆細胞(oligodendrocyte precursor cells: OPC)を用い、免疫グロブリンがOPCの分化および髄鞘化を促進することを明らかにした。さらにB細胞欠損マウスでは、脱髄が悪化することが分かった。免疫グロブリンがOPCに作用し、分化、髄鞘化を促進し、脱髄を軽減することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、中枢神経系を構成する神経細胞やグリア細胞と免疫系との関連に注目が集まっている。しかしながら、髄鞘を形成するグリア細胞であるオリゴデンドロサイトと免疫細胞との関連については未だ明らかではない。また、MSにおけるB細胞の役割について注目されているが、脱髄や再髄鞘化とB細胞との関連については未だ知られていない。今回の我々の研究により、B細胞が産生する免疫グロブリンがオリゴデンドロサイトの前駆細胞であるOPCの分化と髄鞘化を促進することが明らかとなり、今後MSの新たな治療法の開発につながる成果であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In multiple sclerosis (MS), remyelination impairment are known to exist in demyelinating lesions. Our study showed that immunoglobulin produced by B cells promotes remyelination in demyelination-induced organotypic brain slice cultures. Using culture system of oligodendrocyte precursor cells (OPCs), which form myelin sheaths, we showed that immunoglobulin promotes OPC differentiation and myelination. Furthermore, demyelination was found to be exacerbated in B cell-deficient mice. These results suggested that immunoglobulins act on OPCs to promote differentiation and myelination, and to reduce demyelination.

研究分野：神経免疫

キーワード：多発性硬化症 再髄鞘化 免疫グロブリン B細胞 オリゴデンドロサイト

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS)は中枢神経系 (central nervous system: CNS)にリンパ球浸潤、抗体沈着、補体活性化などを伴う脱髄巣が多発し、多様な神経症状を呈する中枢性炎症性脱髄疾患である。MSにおける genome-wide association study (GWAS)の結果、疾患感受性遺伝子の多くが、CD4+ヘルパーT細胞の分化や活性化、増殖に関与する分子であることから、MSの病態形成において、T細胞を中心とする自己免疫機序が強く関与していることが示唆された。CNSへのT細胞の侵入を阻害する抗VLA-4抗体が再発寛解型MS (relapse-remitting MS: RRMS)の再発防止に非常に奏功することも、MS病態におけるT細胞の役割を裏付けている。一方で、再発緩解型から進行性の経過をたどり運動障害が進行してしまう二次性進行型MS (secondary progressive MS: SPMS)においては、T細胞を標的とした治療が奏功せず、脱髄巣での再髄鞘化の障害、神経変性が見られることから、異なる病態が関与していることが示唆される。しかし、再髄鞘化障害のメカニズムは明らかになっておらず、その解明が、MS、特に現在有効な治療法がないSPMSの新たな治療の開発につながると考えられる。

MSは本邦において患者数が増加しているが、その原因の一つとして、食生活の欧米化による腸内細菌叢の変化が疑われている。近年、MSのみならずパーキンソン病・アルツハイマー病などの変性疾患、自閉症などの精神疾患においても腸内細菌との関連が報告されているが、その分子機序はほとんどわかっていない。一方、脳内の恒常性維持において、外界の変化を感知し対応するグリア細胞の重要性が認識され始め、神経・精神疾患の病態においても注目されている。ミクログリアやアストロサイトについては、腸内細菌やその代謝産物との関連が報告されているが、髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトと腸内細菌の関連については未だ報告がなく不明である。我々は、腸内細菌と脱髄、オリゴデンドロサイトの関連を明らかにするために、免疫非介入性脱髄モデルであるCuprizone投与マウス可逆的脱髄モデルを使用し、抗生剤投与により腸内細菌を変化させると、脱髄が悪化し再髄鞘化が遅延することを明らかにした(Chen et al. J Neuroinflammation 2019)。さらに、腸内細菌とCNSとの関連を明らかにするために、抗生剤を経口投与したマウス脳のトランスクリプトーム解析を行ったところ、免疫グロブリン関連遺伝子、および髄鞘関連遺伝子の発現が変動することを見いだした。免疫グロブリンはB細胞、およびB細胞が分化した形質細胞によって産生されるが、B細胞とオリゴデンドロサイトの関連については、B細胞由来の液性因子がオリゴデンドロサイトや神経細胞に悪影響を与えると報告がある一方で、マウス発生時においてB細胞と免疫グロブリンが髄鞘形成に促進的な役割を果たしていることを示唆する報告や、髄膜のB細胞の浸潤が免疫制御的に作用するとする報告もあり、中枢神経系、とくに脱髄、再髄鞘化障害とB細胞との関連には不明な点が多く残されている。我々の結果と併せて、MSにおける脱髄、再髄鞘化障害にB細胞とB細胞が産生する免疫グロブリンが関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、MSにおける脱髄、再髄鞘化障害にB細胞が影響をあたえているのではないかとする仮説をもとに、CNS脱髄モデルや試験管内モデルを用いてMSの再髄鞘化障害機序におけるB細胞の関与について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

Cuprizoneによる脱髄誘導

8週齢の雄B細胞欠損マウス(B6.129S2-Ighmtm1Cgn/J; Jackson Laboratory)および同腹の野生型マウスに対し0.2% cuprizone (bis-cyclohexanone oxalaldihydrazone; Sigma-Aldrich)を配合した餌を3週間与え、脱髄を誘導した。

脳切片の作成

マウスをイソフルラン(ファイザー)の吸入により麻酔した後、胸腔を切開し4% paraformaldehyde/PBS (4% PFA, Wako)を用い、心臓から灌流固定を行った後、脳を摘出した。4% PFAにて24時間固定した後、スクロース溶液にて置換し、O.C.T. compound(サクラファインテック)を用い包埋、凍結した。凍結包埋した脳はbregma 0.0mmおよびbregma -0.60mm部位において、20 μm厚に薄切した。

髄鞘染色

Black-Gold II myelin staining kit (Millipore)を用い、プロトコールに従い髄鞘を染色した。蛍光顕微鏡BZ-X710 (KEYENCE)を用い、画像を撮像し、Image J software(NIH)を用い脳梁における髄鞘化面積を測定した。

脳切片培養の作成

生後9-10日のC57BL/6Jマウスを断頭した後、小脳を摘出し、McIlwain ティッシュチョッパ

ー(The Mickle Laboratory Engineering)を用い300 mm厚に薄切した。薄切した小脳切片をミリセルカルチャーインサート上におき、切片培養用培地[49% Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific), 25% Hank's balanced salt solution (Thermo Fisher Scientific), 25% heat-inactivated horse serum, 5 mg/ml D-glucose (Wako Chemicals, Tokyo, Japan), and 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific)]を用いて培養した。6日間培養したのち、0.5mg/mlのlyssolecithin(LPC)を添加し脱髄を誘導、24時間後に培地を交換しマウスIgG(Merck)、IgA(BD Biosciences)、またはIgM(Merck)をそれぞれ10 µg/mlの濃度で添加、さらに7日間培養後に4% PFAを用いて固定した。2% ウシ血清アルブミンにてブロッキングした後、抗 myelin basic protein(MBP)抗体(BioLegend)、抗 neurofilament-200(NF200)抗体(Sigma-Aldrich)を4℃で16時間反応させた後、2次抗体としてFITC donkey Anti-mouse IgGおよびrhodamine donkey anti-rabbit IgG(Jackson ImmunoResearch)を室温で1時間反応させ、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories)を用いマウントした。レーザー共焦点顕微鏡FV-100(Olympus)を用いて画像を撮像し、ImageJ softwareを用いて myelination index (MI : MBP-NF200 共染色面積/NF200 染色面積)を算出した。

OPC 単独培養による成熟解析

生後3-5日のC57BL/6Jマウスを断頭、脳を摘出し髄膜を取り除いた後、細かく破碎、2.5% trypsin(Thermo Fisher Scientific)にて15分間処理した後、10% fetal calf serum (Thermo Fisher Scientific)、1% penicillin/streptomycinを含むDMEM培地(Thermo Fisher Scientific)内にて7日間培養した。その後、0.25% trypsinを用いて細胞を回収し、CD140a(PDGFR α) MicroBead Kit(MyLtenyi Biotec)を用いてOPCを単離した。単離したOPCをIgG、IgA、またはIgMをそれぞれ10 µg/mlの濃度で加えたB-27サプリメント(Thermo Fisher Scientific)添加DMEM培地にて7日間培養し、4% PFAを用いて固定した。2% ウシ血清アルブミンにてブロッキングした後、抗MBP抗体(Merck)を4℃で16時間反応させた後、2次抗体としてFITC donkey Anti-rat IgG (Jackson ImmunoResearch)を室温で1時間反応させ、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories)を用いマウントした。蛍光顕微鏡BZ-X710を用い、画像を撮像しMBP染色陽性面積を計測した。

4. 研究成果

免疫グロブリンが再髄鞘化に与える影響の解析

我々が行った抗生剤投与マウスにおける中枢神経系のトランスクリプトーム解析において髄鞘関連遺伝子と免疫グロブリン遺伝子の変化を認めたことから、B細胞が産生する免疫グロブリンが髄鞘形成に影響を与える可能性を考えた。そこで、マウス脳切片培養系を用いて、試験管内での脱髄からの再髄鞘化に免疫グロブリンが与える影響について解析を行った。マウス脳薄切培養系を作成、LPCにて脱髄を誘導し、24時間後からIgG、IgA、IgMをそれぞれ添加、7日後に免疫組織学的解析をおこない、脱髄の程度について解析を行った。LPC単独群では、コントロール群と比較して、有意に脱髄の増悪を認めた。一方、IgG投与群、IgA投与群、IgM投与群ではいずれの群においても、LPC単独群と比較して、脱髄の改善が認められた。このことから、免疫グロブリンが髄鞘形成に促進的に作用し、脳切片培養系でのLPC誘導脱髄からの再髄鞘化に寄与している可能性が考えられた。

OPC 成熟分化に与える免疫グロブリンの影響の解析

マウス脳薄切培養系は、オリゴデンドロサイトだけではなく、神経細胞、アストロサイト、ミクログリアなど様々な細胞を含んでいる。そのため、免疫グロブリンがオリゴデンドロサイトもしくはその前駆細胞であるOPCに直接作用したのかどうかを検証するため、OPC単独培養を作成して免疫グロブリンの効果について解析を行った。マウス脳より混合グリア培養を作成、抗CD140a(PDGFR α)ビーズをもちいてOPCを単離し、IgG、IgA、IgMをそれぞれ添加した培地により7日間培養した。7日後に免疫組織化学染色を行い、オリゴデンドロサイトの成熟マーカーであるMBPの発現を染色陽性となっている面積を計測することで評価した。コントロール群と比較して、IgG、IgA、IgM投与群のいずれの群においても、有意にMBP陽性面積が大きくなっており、免疫グロブリンの添加によりOPCのオリゴデンドロサイトへの分化が促進されることが明らかとなった。この結果により、免疫グロブリンがOPCに直接作用し、その分化を促す可能性があることが示唆された。また、免疫グロブリンがOPCの増殖に与える影響を解析するため、OPCをIgG、IgA、IgMをそれぞれ添加した増殖培地で培養、BrdUを添加し核内への取り込みを抗BrdU抗体を用いて評価した。コントロール群と比較してIgG、IgA、IgM投与群のいずれの群においてもOlig2染色陽性細胞中におけるBrdU染色陽性細胞の比率は有意な差を認めず、免疫グロブリンはOPCの増殖については影響を与えないと考えられた。さらに髄鞘形成への効果を評価するため、マイクロファイバーの存在下にOPCを培養し、髄鞘形成能を評価したところ、免疫グロブリン添加群において有意に髄鞘長の延長が認められた。これらの結果から、免疫グロブリンがOPCの分化および髄鞘形成を促進する作用があることが示唆された。

B細胞欠損マウスにおけるcuprizone誘導脱髄の増悪

B 細胞が脱髄に与える影響を解析するため、B 細胞欠損マウスおよび同腹の野生型マウスに cuprizone 脱髄モデルを誘導した。cuprizone 投与開始 3 週間後にマウスから脳を摘出し髄鞘染色(Black-Gold II 染色)を行い、脱髄の程度について検討を行った。脳梁の髄鞘化面積を解析したところ、B 細胞欠損マウス群では、野生型マウス群と比較して脳梁全体の面積に対する髄鞘化面積が有意に小さく、脱髄が増悪していることが明らかとなった。このことから B 細胞が cuprizone 誘導脱髄を抑制する役割があることが示唆された。

まとめ

今回の我々の研究により、B 細胞の欠損により cuprizone 誘導脱髄が増悪すること、また培養系を用いた解析により免疫グロブリンが LPC 誘導脱髄からの再髄鞘化を促進すること、さらに免疫グロブリンが OPC に直接作用しその分化を促進する可能性があることが示された。B 細胞が産生する免疫グロブリンがオリゴデンドロサイトの前駆細胞である OPC の分化と髄鞘化を促進することが明らかとなり、今後 MS の新たな治療法の開発につながる成果であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三宅 幸子 (Miyake Sachiko) (50266045)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関