

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22905

研究課題名（和文）遺伝子発現制御法を用いた多発性硬化症の成因解明

研究課題名（英文）Elucidation of etiology of multiple sclerosis by gene expression control method

研究代表者

中里 祐毅（Nakazato, Yuki）

宮崎大学・医学部・医員

研究者番号：90885972

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：胸髄限局型EAEマウスの病変部脊髄に神経活動を抑制するDREADDを発現させた。神経活動抑制により病変部のCXCL10 mRNAの発現が減少した。DREADDにより神経活動を抑制した胎生期皮質神経細胞とEAEの脾臓由来CD4陽性細胞をin vitroで反応させると、神経細胞におけるCXCL10 mRNAの発現低下とCD4陽性細胞の遊走能の減弱を認めた。EAEマウスへのグレリンアゴニスト アナモレリンの腹腔内投与は、神経症状を軽減し、病変部脊髄へのリンパ球の浸潤低下傾向を示した。EAEの脾臓由来CD4陽性細胞へのアナモレリン投与は、炎症性サイトカインの発現を減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、多発性硬化症において神経細胞の免疫学的作用は十分に解明されていなかった。申請者らは多発性硬化症の病態形成期において、神経細胞がCXCL10を介して、病原性CD4陽性細胞の遊走能を亢進させることを明らかにした。多発性硬化症における神経細胞の免疫細胞的作用の解明の一端となる。グレリンの低分子アゴニストであるアナモレリンが免疫細胞に対する直接的な抗炎症作用により多発性硬化症の病態を改善させることを明らかにした。多発性硬化症における新規治療薬となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Inhibitory DREADD was expressed on neurons in the thoracic spinal cord lesions of EAE mice. Neuronal silencing by inhibitory DREADD reduced CXCL10 mRNA expression in the spinal cord lesions. In in vitro migration assay, the expression of neuronal CXCL10 mRNA and migration activity of splenic CD4+ cells toward cultured embryonic cortical neurons were reduced by neuronal silencing. Intraperitoneal anamorelin, an agonist for the ghrelin receptor, administration to EAE mice mitigated their neurological severity, tended to reduce the number of lymphocytes migrated in the spinal cord lesions. Inflammatory cytokines expressed in splenic CD4+ cells from EAE mice were decreased by anamorelin treatment.

研究分野：神経免疫

キーワード：多発性硬化症 ケモジェネティクス ケモカイン グレリン アナモレリン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症は中枢神経系の自己免疫疾患で、免疫細胞による炎症とそれに続く脱髄、軸索および神経細胞の変性を主たる病態とする。従来、多発性硬化症において中枢神経系の神経細胞は、免疫細胞から傷害される標的細胞と考えられてきた。

申請者は、多発性硬化症のモデル動物の1つである胸髄限局型の実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)マウスの病変部脊髄に、人工的G蛋白共役型受容体を介して興奮性神経細胞の活性化を抑制するDesigner Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs(DREADD)をアデノ随伴ウイルス9型(AAV9)を用いて発現させた。これにより自由行動下モデルマウスの神経細胞の機能解析を可能にした。抑制性DREADDによる病変部脊髄の神経活動抑制により、多発性硬化症の臨床像(下肢麻痺)が軽症化すること、組織学的に炎症が軽減すること、神経学的回復が早まることを報告した(Nakazato Y, et al., Sci Rep. 2020)。さらに神経細胞由来のケモカインCCL2がCD4陽性細胞の病巣への遊走を促すことを立証した。しかし、CCL2を完全に抑制しても病変部局所の炎症は完全には消失せず、神経障害も完全寛解には至らなかった。このことから神経細胞由来の他のケモカイン系が多発性硬化症病態へ関与していることが示唆された。

胃から分泌される生体内ペプチド グレリンは、多発性硬化症モデルマウスにおいて病態抑制効果が立証されている(Theil MM., et al. J Immunol. 2009, Souza-Moreira L., et al. Brain Behav Immun. 2013, Liu F., et al. Front Pharmacol. 2019)。2021年にがん悪液質の経口治療薬としてグレリンの低分子アゴニストであるアナモレリンが承認されている。

### 2. 研究の目的

(1) 神経細胞では、炎症に伴い種々のケモカイン類の発現が上昇することが知られている。申請者は先行研究で、CCL2に着目して多発性硬化症の病態形成における神経細胞と病原性リンパ球の相互作用を明らかにした。神経細胞から発せられる他のケモカインを介した本症の病態形成への関与を検討し、神経細胞の持つ免疫細胞的機能を解明することを目的とする。

(2) 多発性硬化症モデルマウスを用いて、アナモレリンの治療効果について検討する。具体的には、アナモレリン投与による神経症状の変化、組織学的変化、分子生物学的変化を検討し、作用機序について明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

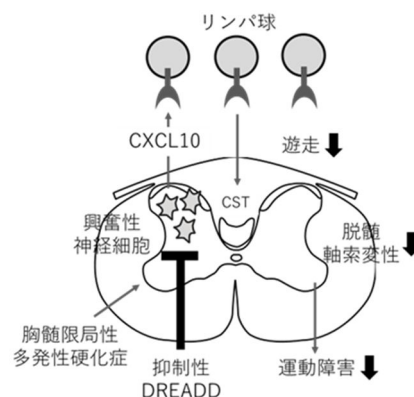
(1) 多発性硬化症モデルマウスにおけるCCL2/CCR2以外の神経細胞由来ケモカイン系の解析  
モデルマウスにおいて発現が増加することが知られているCXCL10-CXCR3をはじめとしたケモカイン類について、モデルマウスの病変部脊髄における遺伝子発現変動を、定量PCR法と*in situ* hybridization法により検討する。抑制性DREADDを用いて神経活動を抑制した初代培養胎児大脳皮質神経細胞とモデルマウスの脾臓から単離した活性化CD4陽性細胞を用いた*in vitro*遊走試験を行う。モデルマウスの病変部脊髄で発現が亢進したケモカイン系について定量PCR法を用いて、培養神経細胞におけるケモカイン、活性化CD4陽性細胞におけるケモカイン受容体の発現変動を検討する。

(2) 多発性硬化症モデルマウスにおけるアナモレリンの治療効果の検討  
モデルマウスにアナモレリンを投与し、EAEスコアを用いて神経症状の変化を評価する。病変部脊髄や所属リンパ節、脾臓における免疫組織化学法やフローサイトメトリー法による組織学的解析、定量PCR法を用いた炎症性および抗炎症性サイトカインの分子遺伝学的解析を行う。アナモレリンの免疫細胞に対する直接作用を検討するために、モデルマウスより採取した脾臓由来の活性化CD4陽性細胞にアナモレリンを添加し、定量PCR法を用いて炎症性および抗炎症性サイトカインについて発現変動を解析する。

### 4. 研究成果

(1) 多発性硬化症モデルマウスにおけるCCL2/CCR2以外の神経細胞由来ケモカイン系の解析

胸髄限局型EAEマウスの病変部脊髄にAAV9を用いて抑制性DREADDを発現させ、神経活動を抑制した。病態形成期の脊髄を用いた定量PCR法により、ケモカイン類の発現変動を検討した。EAE誘導により病変部で発現が亢進したCXCL10の発現は、神経活動抑制により顕著に減少した。抑制性DREADDを用いて神経活動を抑制した初代培養皮質神経細胞とトランスウェルに添加したEAEマウス脾臓由来のCD4陽性細胞を反応させる*in vitro*遊走試験を行ったところ、神経活動抑制未処理群に比べ、神経活動抑制処理群において、CD4陽性細胞の遊走は阻害され、神経細胞におけるCXCL10 mRNAの発現が減少した。このことから多発



性硬化症において、神経細胞は CXCL10 を介して病原性 CD4 陽性細胞の遊走能を亢進させ、病態形成に促進的に作用しうることを明らかにした。今後は機能欠損実験による神経細胞由来の CXCL10 の作用の検討や RNA-seq を用いた神経細胞から発出されるケモカイン類の網羅的解析を進めたい。

#### (2) 多発性硬化症モデルマウスにおけるアナモレリンの治療効果の検討

本研究における EAE マウスは、極期には重度の後肢麻痺を呈したが、アナモレリンを投与すると、軽度の歩行障害を呈する程度まで神経症状が軽減した。アナモレリン投与により組織学的に脊髄における炎症巣は減少し、病変部の TNF $\alpha$  mRNA の発現が抑制された。フローサイトメトリー法による解析では、脊髄内へ浸潤する病原性 CD4 陽性細胞は減少傾向となった。EAE マウス脾臓由来の活性化 CD4 陽性細胞にアナモレリンを添加すると、活性化 CD4 陽性細胞における炎症性サイトカインの TNF $\alpha$  mRNA、IFN $\gamma$  mRNA の発現が減少し、抗炎症性サイトカインの 1 つである TGF $\beta$  mRNA の発現は変化しなかった。このことから、アナモレリンは CD4 陽性細胞に対して直接的に抗炎症作用を発揮し、多発性硬化症病態を軽症化させることが考えられた。またアナモレリン投与によりモデルマウスの所属リンパ節における B 細胞数は減少した。今後 *in vitro* 実験系を用いて、アナモレリンの B 細胞に対する直接的な作用を検討する。またグレリン受容体欠損マウスを用いて EAE を誘導し、アナモレリン投与による行動評価や組織学および分子遺伝学的解析を行うことで、本剤の作用メカニズムがグレリン依存的であるかを検証したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中里祐毅
2. 発表標題 遺伝子発現制御法を用いた多発性硬化症の成因解明と治療探索研究
3. 学会等名 細胞間情報伝達研究科
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中里祐毅、中里雅光
2. 発表標題 Therapeutic effect of anamorelin on experimental autoimmune encephalomyelitis
3. 学会等名 第63回 日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------