

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20873

研究課題名（和文）多系統萎縮症における広汎なギャップ結合の破綻と脱髄機序の解明

研究課題名（英文）Extensive disruption of connexin gap junction in multiple system atrophy

研究代表者

林田 翔太郎（Hayashida, Shotaro）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：60907385

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：多系統萎縮症における脱髄機序を解明するため、ギャップ結合を形成するコネクシン蛋白群に着目した。多系統萎縮症剖検15例を対象とし、リン酸化 シヌクレインの蓄積がみとめられた小脳入力線維におけるコネクシンを評価した。Stage I（早期）、Stage II（中期）、Stage III（末期）に病変を病期分類し、Stage IでCx32がオリゴデンドロサイトの細胞膜から消失し、細胞質内に凝集することを見出した。Cx43はstage Iでのみ発現低下し、stage IIやstage IIIでは発現亢進していた。多系統萎縮症における早期からのコネクシン蛋白の発現異常が脱髄に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多系統萎縮症は原因不明で進行の速い難治性の神経変性疾患であり、病態解明や新規治療法開発が大きく期待されている。今回の研究成果は多系統萎縮症における脱髄や神経細胞脱落の病態を考える上で、ギャップ結合の破綻という全く新しい機序を提唱したものであり、実際に多系統萎縮症剖検例で検討したことも大きな成果である。今後はギャップ結合やコネクシンに着目した新規治療法開発を推進する。

研究成果の概要（英文）：The pathological hallmark of multiple system atrophy (MSA) is aberrant accumulation of phosphorylated α -synuclein in oligodendrocytes, forming glial cytoplasmic inclusions (GCIs). Extensive demyelination occurs in the olivopontocerebellar and striatonigral pathways. Glial connexins (Cxs) play critical roles in myelin maintenance. We investigated glial Cx changes in 15 autopsied patients with MSA. We classified lesions into three stages: early (Stage I), intermediate (Stage II), and late (Stage III) stages. Accumulation of phosphorylated α -synuclein in oligodendrocytes was frequently seen in Stage I but less frequently observed in Stages II and III. Even at Stage I, Cx32 was absent from myelin. Cx32 was re-distributed in the oligodendrocyte cytoplasm and co-localized with GCIs. Astrocytic Cx43 was down-regulated in Stage I. Early and extensive alterations of glial Cxs occur in MSA and may accelerate demyelination.

研究分野：神経病理学

キーワード：多系統萎縮症 コネクシン ギャップ結合 グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

多系統萎縮症 (multiple system atrophy: MSA) の神経病理学的所見の中核とされるオリゴデンドロサイトにおける α -synuclein (Syn) 蓄積とグリア細胞質封入体 (glial cytoplasmic inclusion: GCI) 形成が、どのような経路を介して脱髄や神経細胞死を引き起こすのか未解明な点が多い。私たちは、グリア細胞間情報伝達を担うコネクシン (Cx) 蛋白群や、ミクログリア・アストロサイトを含むグリアネットワークに着目し、Syn と脳内恒常性グリアネットワーク破綻という全く新しい視点から MSA の病態解明と新規治療法開発を推進する方針と立てた。

MSA は小脳、錐体外路、自律神経、錐体路など中枢神経系に広汎な障害をきたす難治性の神経変性疾患であり、オリゴデンドロサイトに凝集した Syn が蓄積し細胞質内に GCI を形成する。脱髄や神経細胞脱落が進行性に生じるが、発症機序は解明されておらず有効な治療法もない。オリゴデンドロサイトの骨格蛋白 TPPP/p25 が細胞膜や髄鞘から GCI とともに細胞質内に再分布することが脱髄に寄与するとの報告がある (Mavroei P, et al. Acta Neuropathol 2019)、ミクログリアやアストロサイトの関与や、神経細胞脱落に至る機序に関する分子病理学的研究は現状では少ない。オリゴデンドロサイトにおける GCI 形成を契機に、中枢神経のグリアネットワークが変化・破綻することで不可逆的な神経細胞死に至る機序を解明することを試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト MSA 剖検例を用いてオリゴデンドロサイト障害から脱髄および神経細胞脱落に至る機序を解明し、MSA モデルマウスでの検証を行った上で、グリアを標的とした新規治療を開発することである。オリゴデンドロサイトやアストロサイトに特異的に発現するコネクシン蛋白群に着目して病理学的解析を進める。Cx 蛋白はグリア細胞間でギャップ結合を形成し、中枢神経系でグリアシンチウム (グリア合胞体) の形成・維持に必須の分子であり、ノックアウトマウス実験ではコネクシン蛋白群の欠損によりオリゴデンドロサイトの脱落や脱髄が生じることが知られている (Menichella DM, et al. J Neurosci 2003; Lutz SE, et al. J Neurosci 2009)。一方、ヒト MSA において Cx 蛋白群の検討はこれまで全く報告されていない。

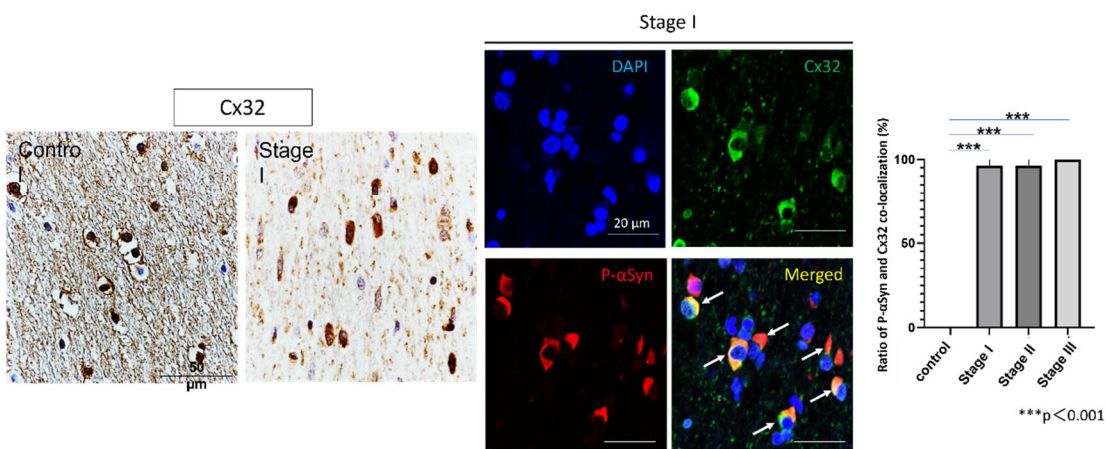
3. 研究の方法

MSA 患者 15 例の剖検標本を対象に、アストロサイトの Cx43 と Cx30、オリゴデンドロサイトの Cx32 と Cx47 の詳細な発現パターンを免疫組織化学的に評価した。更に、アストロサイトマーカーとして GFAP と AQP4、オリゴデンドロサイト・髄鞘マーカーとして MAG、MOG、TPPP、マクローファージ・ミクログリアマーカーとして CD68、パラノードマーカーとして neurofascin、Caspr、claudin-11 を使用し、病変部における発現パターンを比較検討した。病変部は Klüver-Barrera (KB) 染色により確認される脱髄の程度から Stage I (早期)、Stage II (中期)、Stage III (末期) に病期分類した。比較対象疾患として、筋ジストロフィー 4 例の剖検標本を使用した。各種蛋白に対する特異一次抗体を用い酵素抗体法、蛍光抗体法による組織免疫染色を施行した。蛍光抗体法で染色した切片は共焦点レーザー顕微鏡で評価を行った。

4. 研究成果

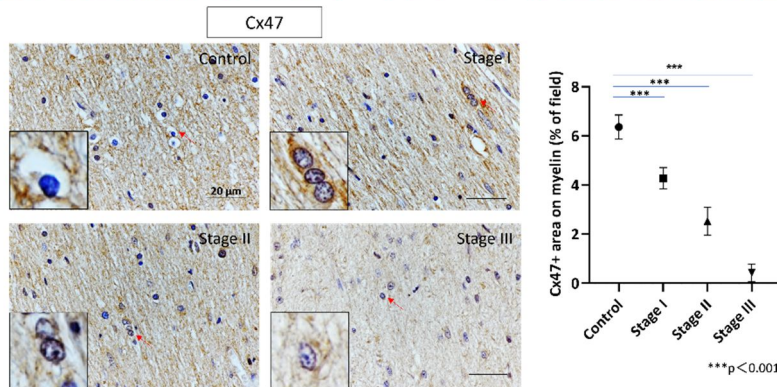
Stage I ではリン酸化 シヌクレインの発現をオリゴデンドロサイト細胞質で豊富に認め、Stage の進行とともにリン酸化 シヌクレインの発現は低下した。TPPP 陽性成熟オリゴデンドロサイト数は Stage I では保持されていたが、Stage II と Stage III では有意に低下していた。また、髄鞘染色では MOG よりも MAG の方が先行して脱落するパターンを認め、distal oligodendroglial pathology 型脱髄を呈している事を見出した。Stage I では、Cx32 がオリゴデンド

図1 MSA病変におけるオリゴデンドロサイトCx32の発現変化



ロサイトの細胞膜や髄鞘から消失し、リン酸化 シヌクレインとともに細胞質内に凝集することを見出した(図1)。パラノードに発現する neurofascin や claudin-11 は比較的保持されており、パラノードでも Cx32 が優先して発現低下していた。Cx47 は stage II からオリゴデンドロ

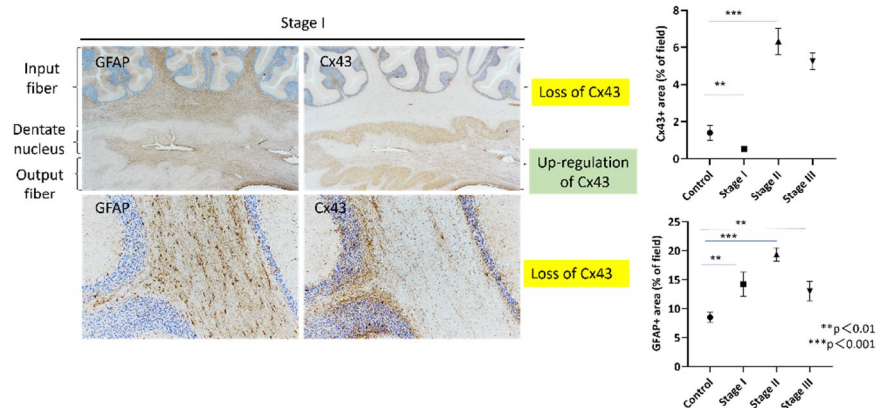
図2 MSA病変におけるオリゴデンドロサイトCx47の発現変化



サイト細胞膜や髄鞘から発現低下が観察されたが、Cx32 のようなリン酸化 シヌクレインとの凝集形成は認められなかった(図2)。アストロサイトの Cx43 は stage I でのみ発現低下しており、stage II や stage III ではアストログリオシスを反映して GFAP とともに発現亢進がみとめられた(図3)。Cx30 は灰白質でのみ発現が認められており、病変部のアストログリオシスでも発現は認められなかった。AQP4 は Stage I から全ての Stage で発現が亢進していた。Cx43-Cx47 で形成されるギャップ結合数は全ての Stage でギャップ結合数が有意に低下していた。Stage I では Cx43 が顕著に低下しており、Cx47 がヘミチャネル化している可能性が示唆された。

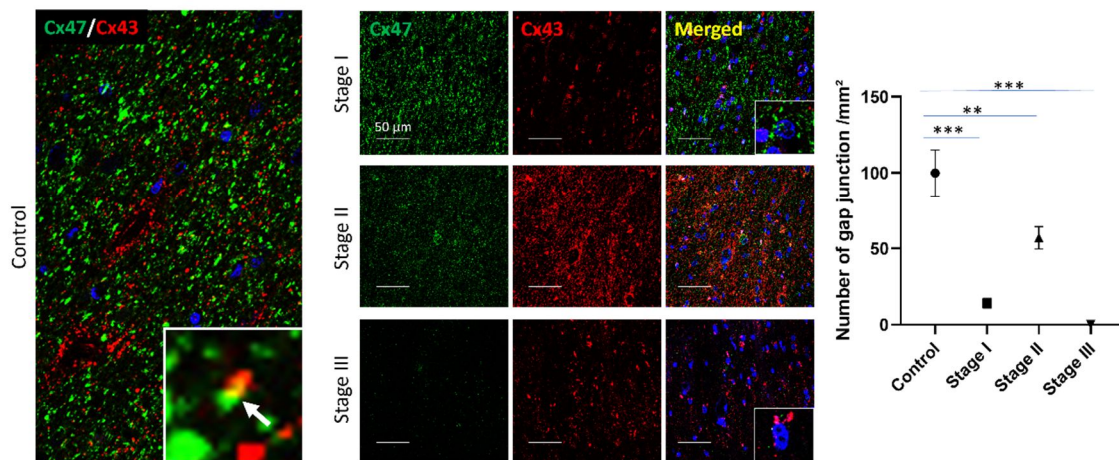
一方で Stage III では Cx47 が顕著に低下しており、Cx43 がヘミチャネル化している可能性が考えられた(図4)。本研究で初めて MSA における広汎なコネクシンの脱落や発現分布の変化を明らかとした。ギャップ結合は軸索の電氣的興奮で発生した K イオンを血管内まで戻すために重要な役割を担い、グルコースや ATP

図3 MSA病変におけるアストロサイトCx43の発現変化



など細胞の恒常性維持に必須の物質の細胞間移動に重要とされる。多系統萎縮症における早期からのコネクシン蛋白の発現異常が脱髄に寄与している可能性が考えられた。以上の研究成果を原著論文として発表した(Nishimura Y, et al. Brain Pathology 2023)。

図4 MSA病変におけるCx43-Cx47ギャップ結合の破綻



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishimura Y, Masaki K, Matsuse D, Yamaguchi H, Tanaka T, Matsuo E, Hayashida S, Watanabe M, Matsushita T, Sadashima S, Sasagasako N, Yamasaki R, Isobe N, Iwaki T, Kira JI.	4. 巻 33
2. 論文標題 Early and extensive alterations of glial connexins, distal oligodendroglial pathology type demyelination, and nodal/paranodal pathology are characteristic of multiple system atrophy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain Pathology	6. 最初と最後の頁 e13131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bpa.13131.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto T, Hayashida S, Yamasaki K, Sasahara Y, Takaki T, Yatera K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Paraneoplastic neuromyelitis optica spectrum disorder associated with malignant melanoma: A case report.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thorac Cancer	6. 最初と最後の頁 1775-1779
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1759-7714.13965	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 西村 由宇慈, 眞崎 勝久, 松瀬 大, 山口 浩雄, 田中 辰典, 貞島 祥子, 笹ヶ迫 直一, 山崎 亮, 磯部 紀子, 岩城 徹, 吉良 潤一.
2. 発表標題 多系統萎縮症におけるconnexin蛋白群の早期かつ広範な変化と脱髄病態との関連.
3. 学会等名 第34回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nishimura Yuji, Masaki Katsuhisa, Matsuse Dai, Yamaguchi Hiroo, Tanaka Tatsunori, Sadashima Shoko, Yamasaki Ryo, Iwaki Toru, Kira Jun-ichi.
2. 発表標題 Early loss of connexin 32 in multiple system atrophy; implication for pathogenesis of demyelination.
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
---------	---------