

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790890

研究課題名(和文)多発性硬化症におけるNOTCH4機能ブロックによる画期的治療法の開発

研究課題名(英文)Development of the novel therapeutic options for the treatment of multiple sclerosis by functional blocking of Notch4

研究代表者

吉村 怜(Yoshimura, Satoshi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20596390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：Notch4はヒト血管に発現し、血管の発達に関与していると考えられてきたが、我々の研究でNotch4遺伝子多型は多発性硬化症(MS)に抵抗性を示すことが明らかとなった。これをふまえて、Notch4機能を解析するため、マウスMSモデルの脊髄におけるNotch4の機能、およびNotch4遺伝子変異マウスにおけるMSモデルの症状修飾を解析した。まず、マウスではNotch4蛋白は血管内皮にはあまり発現せず、ある種の白血球に発現が見られ、樹状細胞である可能性が示唆された。Notch4遺伝子変異マウスではMSモデルの発症促進および症状悪化がみられ、Notch4は新たな治療標的となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Notch4 is expressed on human endothelial cell surface and related to the development of vasculature. We have found that the polymorphism of Notch4 gene has the protective effect of multiple sclerosis (MS). To analyze Notch4 function in MS lesion, we have induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice with Notch4 gene modification. Notch 4 protein was expressed on the cell surface of the small population of infiltrated white blood cells of EAE mice spinal cord. Nevertheless, the gene modification of Notch4 lead to the early onset and aggravated signs of EAE. These results indicated the possibility to invent new therapy that target to the Notch4.

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：Notch4 多発性硬化症 実験的自己免疫性脳脊髄炎

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症(multiple sclerosis, MS)は、若年成人に好発する中枢神経髄鞘抗原を標的とする自己免疫疾患とされる。MS に対する治療法の開発は未だ不十分な状況であり、しかも生産年齢に多く、社会的損失も大きいことから画期的な治療法の開発が望まれている。

MS の発症には遺伝的要因と環境要因が関与するとされる。MS の遺伝的要因として、全ゲノム関連解析により、human leukocyte antigen (HLA)が最も疾患と相関することが明らかにされた(Hafler DA et al, 2007)。私たちは、最近、多数例の日本人脱髄性疾患患者で HLA 領域の single nucleotide polymorphism (SNP)関連解析を行い、この領域に存在する非 HLA 遺伝子である NOTCH4 が、最も強力に脱髄性疾患と関連することを見出した(McElroy, Isobe, et al, Genes Immunity, 2011)。

NOTCH4 は NOTCH ファミリーに属する膜貫通型受容体で、脳では血管内皮にのみ恒常的に発現し、血液脳関門の保持に関与している。NOTCH4 は全ゲノム関連解析により統合失調症のリスク遺伝子となっていることが報告されているものの、これまでに NOTCH4 と神経免疫疾患の関連が示されたことはない。同じ NOTCH ファミリーに属する NOTCH3 の変異は、CADASIL の原因としてよく知られており、NOTCH3 変異による CADASIL では、MS 様の臨床・画像所見を呈する例も報告されている (Phillipis et al CD, J La State Med Soc, 2010)。また、リガンドが NOTCH4 と共通する NOTCH1 のブロックでは、Th17 細胞が抑制され、MS の動物モデルとされる実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)が軽減することも示されている (Bassil R et al, J Immunol, 2011)。しかし、NOTCH4 の神経免疫疾患における作用については、全く解明されていない。

2. 研究の目的

マウス EAE における NOTCH4 機能解明とその修飾による治療法開発。

3. 研究の方法

(1)マウス NOTCH4 蛋白の発現解析

マウスにおける NOTCH4 蛋白発現を解析するため、まずマウス正常脳脊髄および EAE 脳脊髄サンプルの免疫染色を試みた。また、非特異的染色などを除外するため、同組織の in-situ hybridization をおこなった。さらに、脾臓組織における NOTCH4 蛋白の発現を免疫染色で確認した。

(2)NOTCH4 発現細胞の同定

NOTCH4 発現細胞を確認するため、マウス脾臓細胞を単離し flow cytometry 法 (FCM)にて解析を試みた。

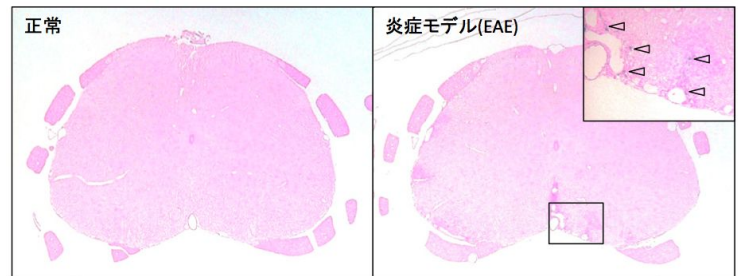
(3)NOTCH4 遺伝子変異マウスにおける EAE の病態解析

NOTCH4 遺伝子変異マウスおよび正常コントロールに EAE を誘導し、発症および症状の推移を比較検討した。

4. 研究成果

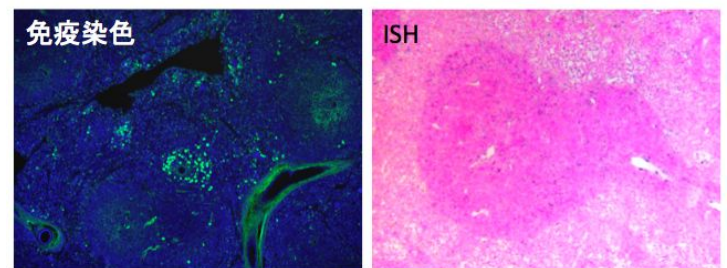
(1)マウス NOTCH4 蛋白の発現解析

ヒトにおいては血管内皮細胞に高発現している NOTCH4 蛋白をマウス組織でも確認するため、まずマウス脳脊髄を市販の抗体を用いて免疫染色したが、ヒト組織と異なり、明らかな染色像が得られなかった。このことからマウスとヒトで NOTCH4 蛋白の発現が異なっていることが予想された。このため、正常マウスおよび EAE マウス(脊髄炎マウス)脊髄における NOTCH4 遺伝子の発現を in-situ hybridization (ISH)にて解析したところ、NOTCH4 mRNA は EAE マウス脊髄に浸潤している白血球の一部にのみ確認され、正常組織では明らかな発現を確認できなかった。このことから、マウスでは末梢血炎症細胞の一部にのみ NOTCH4 蛋白が高発現していることが予想された。



中枢神経炎症性病変に浸潤している炎症細胞は脾臓にプールされているため、脾臓サンプルの ISH を行ったところ、red pulp と white pulp の境目に NOTCH4 蛋白の高発現が見られた。同サンプルを抗 NOTCH4 抗体で染色すると、同様の部位に NOTCH4 陽性細胞が散見された。このことから、NOTCH4 陽性細胞は脾臓に存在し、中枢神経炎症の際にリクルートされることが明らかとなった。

マウス脾臓におけるNOTCH4陽性細胞の分布

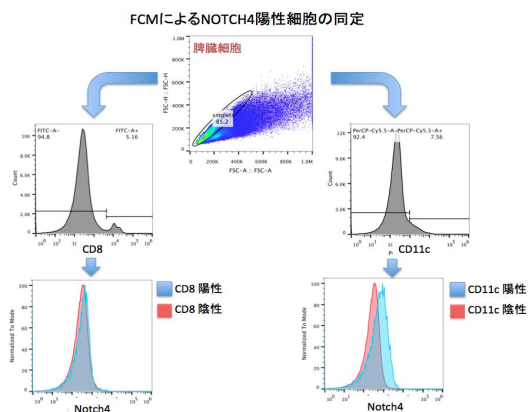


緑: 抗NOTCH4抗体陽性細胞 深紫: NOTCH4-ISH

(2)NOTCH4 発現細胞の同定

脾臓における NOTCH4 発現炎症細胞の種

類を同定するため、まず脾臓の NOTCH4 陽性細胞と同様に marginal zone に分布する単球、樹状細胞などの免疫染色を行ったところ、樹状細胞 (CD11c 陽性細胞) の分布と NOTCH4 陽性細胞の分布とが酷似していた。これをふまえ、FCM にて CD11c 陽性細胞群と陰性細胞群で NOTCH4 の発現度 (mean fluorescent intensity, MFI) を比較したところ、CD11c 陽性細胞では NOTCH4 の MFI が高値であり、NOTCH4 は CD11c 陽性細胞群の一部であることが示唆された。



(3)NOTCH4 遺伝子変異マウスにおける EAE の病態解析

NOTCH4 遺伝子変異マウス (B6;129S1-Notch4tm1Grid/J) および野生型マウスに、MOG35-55 蛋白を用いて EAE を誘導したところ、NOTCH4 遺伝子変異マウスは対照群と比較し、早期発症かつ重症化した。これは我々の予想とは逆の結果であった。浸潤細胞などには明らかな違いは見られなかった。

結果のまとめと考察

今回の研究により、①マウスとヒトでは NOTCH4 蛋白の発現パターンが明確に異なること、②NOTCH4 は、中枢神経炎症性病変に浸潤している細胞のごく一部に発現し、樹状細胞の一種である可能性が高いこと、③NOTCH4 遺伝子変異により EAE が早期発症・重症化することが明らかとなった。ヒトでは、NOTCH4 は元来血管内皮に発現し、炎症性病変における血管新生などに関与すると考えられていたが、マウスにおいては NOTCH4 は中枢神経血管系には発現しておらず、末梢由来の浸潤炎症細胞の一部にのみ発現していることが明らかとなった。これらの細胞は脾臓の marginal zone に由来し、樹状細胞の一種である可能性が高い。NOTCH4 遺伝子変異マウスで EAE が重症化したことから、NOTCH4 陽性樹状細胞は抗炎症作用や炎症制御作用を持つことが予想される。樹状細胞の NOTCH 受容体は、Jgd1 というリガンドから刺激を受けると IL-2 を産生分泌させる。IL-2 は CD4+CD25+制御性 T 細胞の分化に関与し、炎症抑制作用を発揮すると

考えられており (Bugeon et al. 2008)、NOTCH4 を介した刺激は中枢の過剰な炎症を抑制する作用が考えられる。これらの結果から、中枢神経炎症性病変を来す疾患の治療として、ただ単に末梢血由来の炎症細胞浸潤を抑制するだけでは、生体の持つ制御作用をも阻害する可能性があることが示唆された。今後は、本研究の更なる発展 (NOTCH4 陽性細胞の分離解析、NOTCH4 発現促進による炎症抑制など) を行う予定である。

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2件)

①Ainiding G, Kawano Y, Sato S, Isobe N, Matsushita T, Yoshimura S, Yonekawa T, Yamasaki R, Murai H, Kira J; South Japan Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Interleukin 2 receptor α chain gene polymorphisms and risks of multiple sclerosis and neuromyelitis optica in southern Japanese. J Neurol Sci. 2014 Feb 15;337(1-2):147-50. doi: 10.1016/j.jns.2013.11.037.

②Huang J, Yoshimura S, Isobe N, Matsushita T, Yonekawa T, Sato S, Yamasaki R, Kira J; South Japan Multiple Sclerosis Genetics Consortium. A NOTCH4 missense mutation confers resistance to multiple sclerosis in Japanese. Mult Scler. 2013 Nov;19(13):1696-703. doi: 10.1177/1352458513482512.

③Yoshimura S, Isobe N, Yonekawa T, Matsushita T, Masaki K, Sato S, Kawano Y, Yamamoto K, Kira J; South Japan Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Genetic and infectious profiles of Japanese multiple sclerosis patients. PLoS One. 2012;7(11):e48592. doi: 10.1371/journal.pone.0048592.

[学会発表](計1件)

Satoshi Yoshimura et al.
Genetic and infectious burdens affect CSF IgG abnormality in Multiple Sclerosis.
第55回日本神経学会学術大会(福岡,2014)
優秀口演賞候補

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

[その他]

ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉村 怜(YOSHIMURA, Satoshi)

九州大学大学院医学研究院神経内科学・助教

研究者番号：20596390