

平成 2 6 年 6 月 1 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890267

研究課題名（和文）アドレノメデュリンを用いた多発性硬化症に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）Developing new therapy of multiple sclerosis using adrenomedullin

研究代表者

北村 彰浩（Kitamura, Akihiro）

京都大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：80636019

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,200,000 円、（間接経費） 360,000 円

研究成果の概要（和文）：MSのモデル動物である実験的自己免疫性脊髄炎(EAE)をC57BL/6JマウスにMOG35-55ペプチドを免疫して作成した。EAE感作と同時に浸透圧ポンプを用いて組換え型ヒト成熟型アドレノメデュリン(AM)または生理食塩水の腹腔内14日間持続投与を開始し経時的に行動解析を施行した。生理食塩水投与群は、感作後11日から症状が出現し急激に増悪した。一方、AM投与群では、感作後13日から16日まで有意な症状の軽減を認めたが、投与終了後、急激に増悪し有意差は消失した。AMによるEAE抑制効果が明かになった。今後、組織学的、免疫学的解析を経時的に施行し、AMがMSの新たな治療薬となる可能性を検索する。

研究成果の概要（英文）：We investigated recombinant human adrenomedullin (AM) for treatment of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6J mice, which is the representative model of multiple sclerosis. Intraperitoneal continuous administration of AM and normal saline for 14 days using osmotic pumps were started concomitant with sensitization of EAE. Temporal changes of the clinical score were evaluated. In the group of normal saline, clinical scores started to increase on 11 days after sensitization and rapidly got worse. AM significantly reduced clinical scores on between 13 and 16 days but got worse immediately to the level of the other group after the end of administration. AM was revealed to improve the clinical score of EAE. We will temporally perform histological and immunological evaluation and will explore the possibility of AM to serve as a strategy to tackle multiple sclerosis.

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：多発性硬化症 アドレノメデュリン EAE VCAM-1 ICAM-1

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症は中枢性の慢性炎症性脱髄性疾患で、視力障害や運動障害等が寛解と再発を繰り返す難病である。機序として髄鞘蛋白に対する自己免疫応答の関与が考えられ、Th2 細胞から Th1 細胞へのシフトが再発に関与していると考えられてきた。現在、この Th1/Th2 バランスに立脚した病態解釈から、再発予防には Interferon β が用いられるが、年間再発率を約 30%減少させるにとどまり、使用した約 90%の症例で何らかの副作用を認めており、新たな治療法の開発が望まれる。

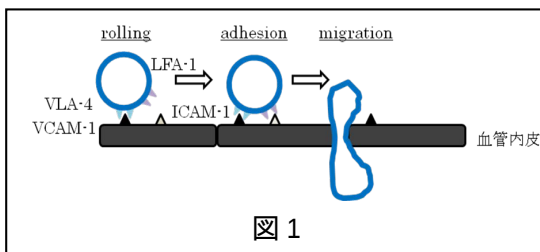
申請者はこれまで、血管性認知症の新規モデルラットの開発に取り組み確立した (Kitamura A et al. Neurobiol Aging 2012)。血管性認知症の半分以上をしめる皮質下血管性認知症は、脳慢性低灌流状態に伴い、ミクログリアの活性化等が誘発され神経炎症が生じ、慢性的に脱髄が進行する疾患である (Pantoni L et al. Lancet Neurol 2010)。病変の主座や病態機序など、皮質下血管性認知症は多発性硬化症と共通した要素を非常に多く有している。今回、多発性硬化症の治療開発の探求に当たり、申請者が今までたずさわってきた血管性認知症研究の側面から考察し、新たな取り組みを行っていきたいと考えた。

多発性硬化症 (MS) の炎症性脱髄性変化は活性化 T 細胞が末梢血から脳内へ移行することから始まる。末梢で抗原提示細胞から刺激を受けた T 細胞が VLA-4 や LFA-1 を強く発現し、血管内皮上に発現した VCAM-1 や ICAM-1 等の分子と結合することで血液脳関門の通過が可能となる。VLA-4 に対するモノクローナル抗体である Natalizumab は強力な MS の再発・進行抑制効果を示したが、免疫能が過度に低下し進行性多巣性白質脳症の発症を認め必ずしも安全な治療法とは言えない。

一方、血管作動性ホルモンであるアドレノメデュリン (AM) は血管新生・血管保護等の作用に加え、VCAM-1 や ICAM-1 の発現を抑制する作用が明らかとなった。

2. 研究の目的

AM を用い、血管内皮側の接着因子を抑制して活性化 T 細胞の脳内移行を阻害し、MS の新たな治療法の開発に取り組む (図 1)。



3. 研究の方法

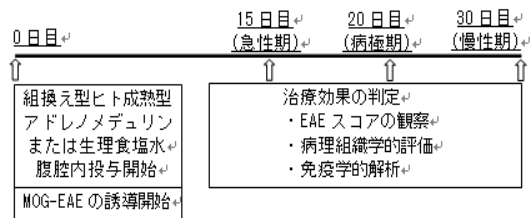


図 2

図 2 の様に実験を施行した。

まず、MS のモデル動物である実験的自己免疫性脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) を C57BL/6J マウスに Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 35-55 ペプチドを免疫して作成した。具体的には、まず MOG 35-55 peptide (Operson biotechnology) 100mg と結核死菌 (Mycobacterium Tuberculosis) (Difco) 1mg を不完全フロンドアジュバント (Sigma F5506) と共に尾底部に皮下投与し、投与 2 時間後に百日咳毒素 (List Biological Laboratory) 200ng を腹腔内投与した。そして、二日後、百日咳毒素 200ng を腹腔内に追加投与した (図 3)。

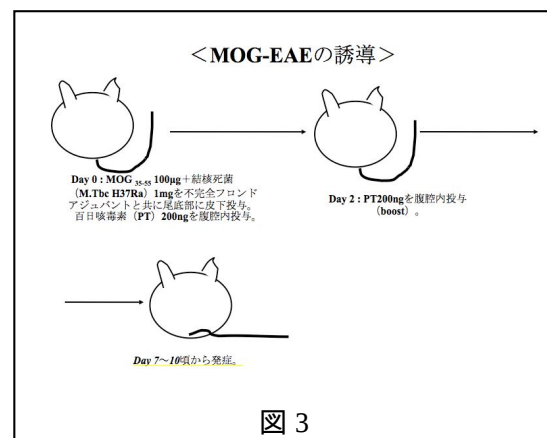


図 3

EAE 感作と同時に組換え型ヒト成熟型 AM (6 匹) または生理食塩水 (5 匹) の腹腔内 14 日間持続投与を開始した。具体的には、14 日間の持続投与が可能な浸透圧ポンプ (Alzet Model 1002) (図 4) に 50ng/h 換算量の組換え型ヒト成熟型 AM または同容量の生理食塩水を充填し、マウスの腹腔内に留置した。

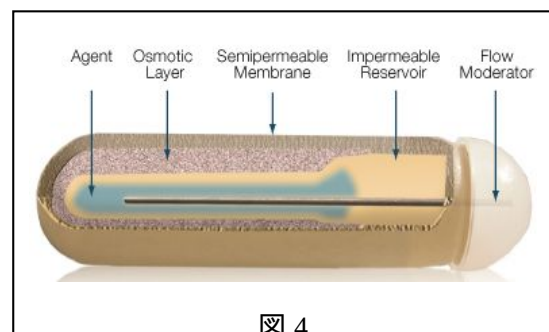


図 4

そして、経時的に行動解析を施行した。評価には下記の様な、EAE Clinical Score を使用した。

[Clinical Score]

- 0; 正常
- 1; 尾の緊張が一部低下
- 2; 尾の完全麻痺、歩行異常
- 3; 下肢の不全対麻痺
- 4; 下肢の完全対麻痺
- 5; 麻痺が上肢に及び/瀕死状態

4. 研究成果

生理食塩水投与群は、感作後 11 日から症状が出現 (clinical score 0.2 ± 0.12) し、13 日 (0.90 ± 0.10)、16 日 (2.6 ± 0.10)、21 日 (2.7 ± 0.20) と急激に増悪した。一方、AM 投与群では、感作後 13 日 (0.37 ± 0.16 、 $p < 0.05$) から 16 日 (1.1 ± 0.30 、 $p < 0.05$) まで有意な症状の軽減を認めたが、AM 投与終了後、症状は急激に増悪し (21 日 2.6 ± 0.16) 有意差は消失した (図 5) (いずれも分散分析法による)。

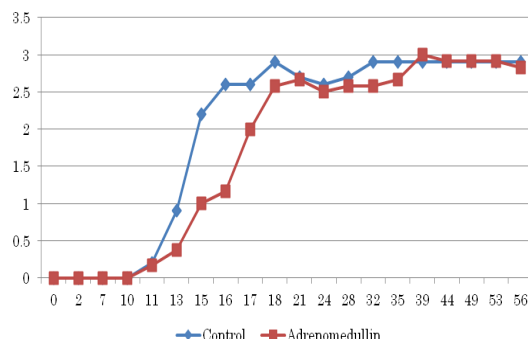


図 5

AM による EAE 抑制効果が明かになった。

今後、は、AM の腹腔内投与時間を 14 日から 28 日に延長する。また、投与開始時期も EAE の症状出現が予想される感作後 10 日後に変更して、経時的に行動解析を施行する。そのうえで、以下の様な、病理組織学的、末梢血・脾細胞を用いて抗原特異的リンパ球増殖反応、免疫学的解析を経時的に行なう。

【組織学的評価】

- ・脳、脊髄を HE 染色により、基本的形態や細胞浸潤の評価を行う。
- ・Luxol fast blue 染色により白質の粗鬆化を 4 段階にグレーディングする。また、抗 MBP 抗体、抗 MAG 抗体等を用い、免疫蛍光染色で白質の評価を行う。
- ・抗 VLA-4 抗体、抗 ICAM-1 抗体を用いて接着因子の発現を評価する。
- ・抗 Iba-1 抗体、抗 GFAP 抗体を用いて免疫組織化学染色でミクログリア、アストログリア

アの評価を行う。

【免疫学的解析】

末梢血 (心臓より採血) と脾細胞を用いて以下の免疫学的解析を行う

- ・Flow cytometry: (Guo B et al. J Clin Invest 2008)

Th1 細胞の同定: CD4 x CXCR3

Th2 細胞の同定: CD4 x CCR4

Treg 細胞の同定: CD4 x CD25 x CD127 x Foxp3

Th1 機能評価: CD4 x IFN- γ , CD4 x TNF- α

Th2 機能評価: CD4 x IL-4

Th17 機能評価: CD4 x IL-17

- ・Antigen-specific reaction/cytokine assay:

末梢血および脾細胞を MOG 35-55 ペプチドで刺激し、培養上清中の IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17 等の炎症惹起性サイトカイン、および IL-4, IL-5, IL-10 等の抗炎症性サイトカインを ELISA により測定する。

そして、AM が MS の新たな治療薬となる可能性を検索する。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

北村彰浩、富岳亮、高橋良輔、松井真：実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する血管作動性ホルモン・アドレノメデュリンの治療効果。第 26 回 日本神経免疫学会学術集会，金沢，2014 年 9 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

北村 彰浩 (Akihiro Kitamura)

京都大学医学研究科 助教

研究者番号：80636019

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：