

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461282

研究課題名(和文) 保護的ミクログリアの選択的・時限的活性化による多発性硬化症の完全寛解誘導療法開発

研究課題名(英文) Complete remission induction therapy development of multiple sclerosis by selective - timed activation of the protective microglia

研究代表者

山崎 亮 (Yamasaki, Ryo)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：10467946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症モデルマウスの脊髄病変で活性化している中枢ミクログリアが神経障害性か神経保護的かは議論の余地があった。我々は、中枢ミクログリアの遺伝子発現パターンを精査した結果、神経保護的因子を多く発現していることを発見した。今回の研究で、これらの保護的ミクログリアの機能を増幅することで、現在治療法がない慢性期の症状改善を目指した。先の遺伝子発現解析で、ミクログリアがエンドセリン受容体EDNRBを高発現していることを見出した。我々は、EDNRBの選択的拮抗薬BQ788を投与したところ、疾患の重症度を軽減させることに成功した。このことから、BQ788は多発性硬化症慢性期治療薬となることが期待された。

研究成果の概要(英文)：Whether microglia which activated in the spinal cord lesions of multiple sclerosis model mice are neuroprotective or neurotoxic is controversial. We have reviewed the gene expression pattern of microglia and discovered that these activated microglia expressed neuroprotective factors. In this study, we aimed to develop new treatment for the chronic phase of multiple sclerosis which there are currently no treatment options by amplifying neuroprotective effect of microglia. In the previous gene expression analysis, expression of EDNRB was up-regulated in activated microglia. It was able to reduce the severity of the disease by the administration of the selective antagonist of EDNRB, BQ788. Therefore, BQ788 was expected as a new therapeutic agents to treat chronic phase of multiple sclerosis.

研究分野：神経科学

キーワード：ミクログリア 多発性硬化症 アストログリア 実験的自己免疫性脳脊髄炎 筋萎縮性側索硬化症

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症(multiple sclerosis, MS)は、中枢神経髄鞘を標的とする自己免疫疾患である。その90%は再発寛解型(relapsing remitting MS, RRMS)が占める。RRMSの半数は、10年から20年の経過で予後不良な二次性進行型(secondary progressive MS, SPMS)に移行する。MSの最重要な予後規定因子は、再発後の運動障害の残存と二次性進行期への移行である。再発時の組織破壊のエフェクター細胞は、マクロファージ(M ϕ と活性化ミクログリア(Mg)である。また二次性進行期ではT細胞浸潤は乏しく、M ϕ や活性化Mgが広範囲に浸潤し組織を破壊し続ける。近年開発の進むIFN- β をはじめとする疾患修飾薬(disease modifying drug, DMD)は、RRMSの再発を30から60%程度抑えるものの、障害の進行を食止めることはできない。すなわち、DMDだけではM ϕ や活性化Mgによるグリア炎症を抑えることができない。したがって、再発時の重度の組織障害および二次性進行期の持続的な組織破壊のエフェクターアームであるM ϕ や活性化Mgによるグリア炎症の機序を解明し、それを標的とした新規治療法を開発することが強く望まれている。

MSでもその動物モデルの実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)でも共通して自己反応性T細胞は末梢で活性化され、血液脳関門を越えて中枢神経内に侵入し、そこで再び抗原提示を受けてIFN-gやIL-17などの炎症性サイトカインを分泌し、末梢血からM ϕ をリクルートしたり脳内Mgを活性化したりして髄鞘や軸索の破壊を引き起す。ここで、組織破壊のエフェクターアームを担うMgには二面性があり、神経保護的にも組織破壊性にも作用し得る。このM ϕ と活性化Mgを厳密に区別することは従来不可能であった。ところが、最近、ケモカイン受容体のCX3CR1は中枢神経内ではMg特異的に、他方CCR2は末梢血M ϕ 特異的に発現していることが示された。そこで私たちは、この特性を利用して、CX3CR1GFP/GFPマウス(Jung, 2000)およびCCR2RFP/RFPマウス(Saederup, 2010)を交配しCX3CR1+/GFPCCR2+/RFPダブルノックインマウス(red-greenマウス)を作成することに成功した。このマウスでは、M ϕ とMgを容易に識別できた。私たちは、このマウスをmyelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)で免疫して誘導したEAEの急性病変では、最初に末梢血由来のM ϕ が浸潤し、次いでそれに反応して脳常在性Mgの活性化が起こることを突き止めた。その後、M ϕ はすぐに減少するのに対し、Mgはその後も活性化を続ける。これらの細胞の発現遺伝子を解析したところ、M ϕ は炎症性サイトカインを主に発現していたのに対し、Mgは神経保護的サイトカインを発現していた。この結果から、EAE発症急性期は末梢血由来Mgが神経障害性に、Mgが神経保護性に働いていることが初めて明らかにできた。

一方、近年のアレルギー性疾患増加は新たな問題となりつつあるが、末梢のアレルギー炎症が中枢神経系へ及ぼす影響は明らかでない。我々は、気管支喘息モデルマウスにおいて中枢のグリア細胞活性化が認められることを世界で初めて発見した(論文投稿中)。中枢のグリア炎症はMSなどの疾患重症度を修飾する重要な因子であり、これまでリポポリサッカリドやインターフェロンなどによる炎症準備状態は直後のEAEを悪化させることが明らかとなっているが、アレルギー炎症がEAEに及ぼす影響は明らかでない。

2. 研究の目的

多発性硬化症モデルマウスの病態機序に中枢グリア炎症が及ぼす影響とそのメカニズムの解析及び同機序を標的とした新規治療法の開発

3. 研究の方法

1) 気管支喘息モデルマウスの作成

生後6週のおスC57Black系統マウスに卵アルブミン(ovalbumin, OVA) 50 μ gとAlum(免疫活性アジュバント) 2mgを200 μ l PBSに溶解し、Day 0, 7, 14に腹腔内注射した後、OVA 2.5mg/ml PBSを4日連続で経鼻的に吸入させた。対照としてPBSを注射した群及びAlumのみを注射した群を作成した。

2) EAEの誘導

上記マウス(生後12週)にEAEを誘導した。免疫当日(Day0)に、まず200ngのPertussis Toxin(百日咳毒素, PT)を腹腔内注射し、その後400ngのMycobacterium Tuberculosisを含むComplete Freund's adjuvant (CFA)とMOG35-55 200 μ g溶液をエマルジョン化し鼠径部に皮下注射した。48時間後、Day2にもPTを腹腔内注射した。連日マウスの体重及び臨床スコアを記録した。臨床スコアは、0:無症状、1:尾部脱力、2:一肢麻痺、3:両下肢麻痺、4:3肢以上麻痺あるも自力移動可能、5:移動不可能に分類し記録した。

3) 解析

気管支喘息マウスは、モデルの確認の為に誘導後に肺組織を採取しアレルギー炎症をチェックした。末梢血のサイトカインプロファイル解析の為に、磁気ビーズサスペンションアレイを行って多項目同時解析を行った。

EAEマウスは、発症期、極期、慢性期に分類し各時期で灌流固定し、脳脊髄をとりだして病理学的解析を行った。気管支喘息マウス脊髄で活性化したグリア細胞発現遺伝子を解析するため、ミクログリア(Mg)を単離し、メッセンジャーRNAを抽出しアレイアッセイを行った。

4. 研究成果

1) 気管支喘息マウス脊髄ではミクログリア(Mg)が活性化している

気管支喘息マウスにEAEを誘導するにあたり、前段階のアレルギー炎症及びそれが中

中枢神経に及ぼす影響を検討した。気管支喘息モデルマウス血清では、予想通り Th2 系のサイトカイン IL-5 の上昇と Th1 系サイトカイン IL-2 の減少を認めた。肺の主気管支及び細気管支では好酸球を含む炎症細胞の浸潤が著明であった。肺胞内皮細胞ではムチンの産生が亢進しており、本モデルは実際の気管支喘息をよく再現していた。同マウス脊髄では、驚くべきことにミクログリアやアストログリア

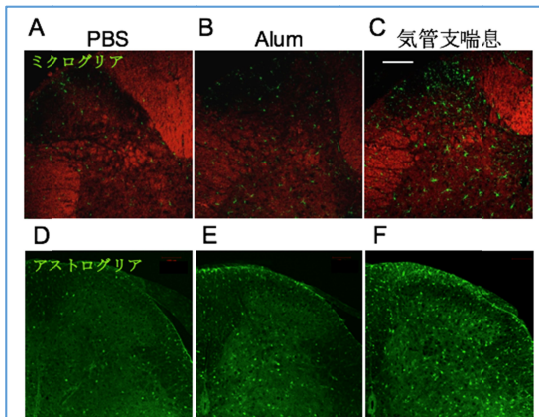


図1. 気管支喘息モデルマウス脊髄におけるミクログリアとアストログリアの活性化.
A-C: ミクログリアは気管支喘息モデルで著明に活性化している。
D-F: アストログリアも気管支喘息モデルで増殖している。スケールバー：100 μm。

リアの活性化が見られた(図1)。これらは特に主気管支の感覚入力をつかさどる上位頸髄後角に強く認められた。同部位で活性化している Mg の RNA アレイアッセイでは様々な分子生物学的経路の活性化を認めた。細胞表面の受容体では、特にエンドセリン(ET-1)の受容体 EDNRB の発現が増加していた。また、

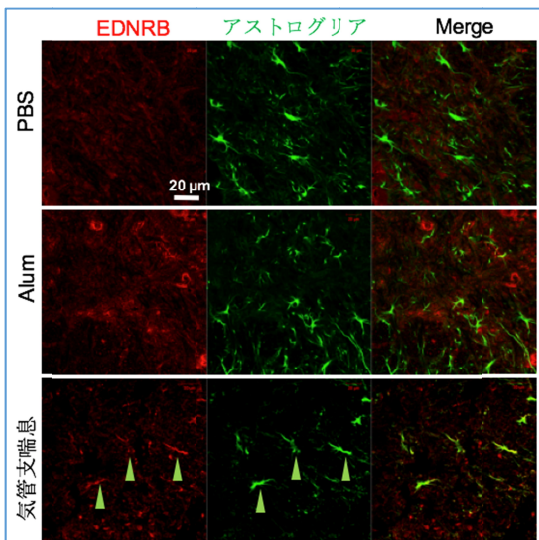


図2. 気管支喘息モデルマウス脊髄におけるアストログリアはEDNRBを発現.
気管支喘息モデルマウス脊髄で活性化しているアストログリアはEDNRBを発現している(矢頭)。スケールバー:20 μm。

組織学的解析により、Mg のみならず、アストログリア(Ag)でも EDNRB の発現が亢進していることが明らかとなった(図2)。これらの結果を踏まえ、エンドセリンの血中濃度を測定したところ、気管支喘息モデルマウスで優位に上昇していた。また、免疫染色の結果、これらの ET-1 は主に気管支喘息病変部で産生されていることが明らかとなった。これらの結果から、気管支喘息モデルマウスにおいては、気管支喘息病変で産生された ET-1 が増加し、これらの受容体を持つ中枢グリア細胞が著明に活性化していることが明らかとなった。

(2)気管支喘息モデルマウスでは EAE が悪化する。

気管支喘息は末梢血で Th2 系サイトカインの上昇きたす一方、中枢でグリア細胞の活性化をきたすことから、EAE の臨床経過に及ぼす影響を検討した。気管支喘息誘導後に EAE を誘導したところ、EAE 症状が著明に悪化した。発症時期は変わらなかったことから、末梢における自己免疫誘導よりむしろ中枢のグリア炎症が症状増悪に深く関与している可能性が示唆された。これらの結果から、グリア炎症抑制により、特に慢性期の症状改善が期待された。今回新たに認められた ET-1/EDNRB 経路の活性化とグリア炎症が EAE に及ぼす影響を検討するため、気管支喘息誘導前から EDNRB の選択的阻害薬 BQ788 の予防投与を行ったところ、気管支喘息は誘導されたがグリア炎症が抑制され、EAE の症状も改善した。驚くべきことに、気管支喘息モデルにおける EAE のみならず、通常の EAE 症状の改善も見られた(図3)。この結果、気管支喘息モデルにおける EAE のみならず、一般的な EAE の病態生理においても ET-1/EDNRB

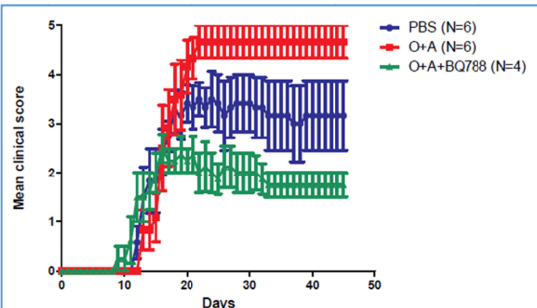


図3. 気管支喘息モデルマウスEAEの増悪とBQ788による治療.

通常のEAE(青)と比較し、気管支喘息モデルマウスではEAEが悪化する(赤)。一方、EDNRB選択的阻害薬BQ788の予防投与により、EAEの症状は著明に改善する(緑)。

シグナルカスケードが重要であることが証明された。

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5件)

Peripheral atopic diathesis induces allodynia and glial activation in the spinal cord.
第56回日本神経学会学術大会(新潟)
2015.5.20-23.

Peripheral atopic diathesis induces allodynia and glial activation in the spinal cord.
日本アレルギー学会総会(東京)
2015.5.26-28.

A mouse model of atopic diathesis displaying tactile allodynia with glial inflammation in the spinal cord.
XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease. (Bilbao, Spain)
2015.6.15-18.

Peripheral allergic diseases induces glial activation in the spinal cord via endothelin-1/ endothelin receptor type B pathway causing allodynia.
APSNI(東京)
2015.8.31.

アレルギー素因マウスにおける中枢グリア炎症とアロディニア.
第27回日本神経免疫学会(岐阜) 2015.9.15-16.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 亮 (YAMASAKI, Ryo)
九州大学病院・講師
研究者番号: 10467946

(2) 研究分担者

真崎 勝久 (MASAKI, Katsuhisa)
九州大学大学院医学研究院・助教
研究者番号: 90612903