

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25117012

研究課題名(和文) 脱髄性疾患・統合失調症における白質グリア障害の機構解明と画期的治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of functional contribution of glial disturbances in pathomechanisms of demyelinating diseases and schizophrenia and development of new therapeutic options

研究代表者

吉良 潤一(Kira, Jun-ichi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：40183305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 46,900,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系には、神経細胞と同数のグリア細胞が存在する。これらはアストログリア、オリゴデンドログリアおよびミクログリアからなり、それぞれが高度に分化し中枢神経系のホメオスタシスを担っている。近年、神経疾患や精神疾患の原因としてのグリア細胞機能異常が注目を集めている。グリア細胞はコネクシン蛋白により構成されるギャップ結合により直接的に細胞同士が結合し巨大なネットワークを形成している。私達は神経疾患の患者剖検標本やモデル動物におけるコネクシン異常を介した神経障害発症機序を検討した。

研究成果の概要(英文)：In the central nervous system, the same number of glial cells as nerve cells exist. These consist of astroglia, oligodendroglia and microglia, each of which is highly differentiated and is responsible for the central nervous system homeostasis. In recent years, glial cell dysfunction as a cause of neurological diseases and psychiatric disorders attracts attention. Glial cells are directly connected to each other by gap junctions composed of connexin proteins to form a huge network. We examined the mechanism of neuropathy-induced connexin abnormalities in autopsy specimens and model animals of patients with neurological disorders.

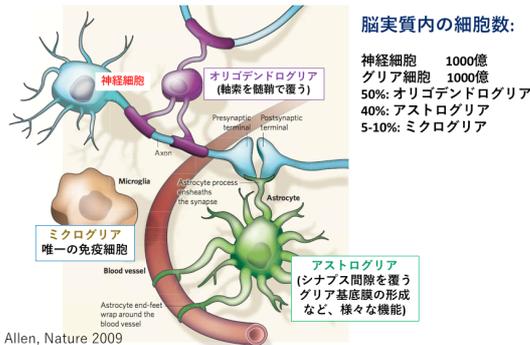
研究分野：神経内科学、神経科学、神経免疫学

キーワード：多発性硬化症 実験的自己免疫性脳脊髄炎 グリア コネクシン 筋萎縮性側索硬化症 SOD1

1. 研究開始当初の背景

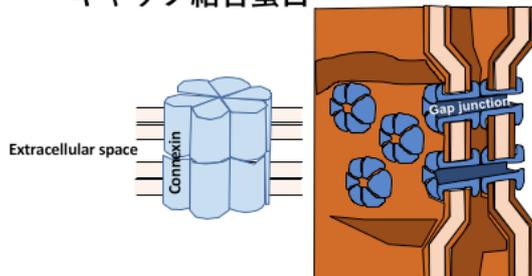
神経炎症性疾患、神経変性疾患、精神疾患は、中枢神経系を侵す神経難病で、これまで有効な治療法が開発されていない。その原因として、これまでの研究が神経細胞もしくは末梢炎症を標的としていたことが挙げられる。

中枢神経は神経細胞と同数の非神経細胞 = グリア細胞からなる。グリア細胞は主に星膠細胞(アストログリア)、希突起膠細胞(オリゴデンドログリア)および小膠細胞(ミクログリア)で構成され、それぞれ 40%、50%、10% を占める。アストログリアは神経細胞のメンテナンス、血液脳関門の構成など様々な役割をもつ。オリゴデンドログリアは髄鞘形成が主な役割であるが他にも食食作用やサイトカイン放出機能などが判明している。ミクログリアは脳内唯一の免疫細胞で、脳内環境の変化や外部からの侵害刺激に反応するが、定常状態でも脳神経を構成する細胞のターンオーバーや使用頻度の低いシナプスの食食など様々な機能をもつ。



これらのグリア細胞は単独では機能せず、ギャップ結合を介して細胞同士が直接接合し、また半ギャップ結合(hemichannel)を介して様々な生理活性物質を放出し、直接的・間接的に大きなネットワーク(=グリアアセンブリ)を形成している。ギャップ結合蛋白は主にコネキシンという蛋白で形成されている。コネキシンは 4 回膜貫通型細胞表面蛋白で、6 量体を形成し、ヘミチャンネルをなす。このヘミチャンネル同士が結合することで細胞間を直接連絡するギャップ結合ができる。

コネキシン(connexins): ギャップ結合蛋白



ヒトの脳では、ニューロンがコネキシン(Cx)36、アストログリアは Cx30 と Cx43、オリゴデンドログリアが Cx32 と Cx47 を発現している。ミクログリアは活性化すると Cx43 を発現する。これらのうち、アストロ

グリアとオリゴデンドログリアは同種細胞間のみならず異種細胞間でもギャップ結合を介して直接結合している。オリゴデンドログリアの Cx32 は別名 GJB1 と呼ばれ、劣性遺伝性シャルコーマリーツース病(CMTX)の原因遺伝子として有名である。また、我々の研究では、MS 患者の病変部剖検組織を解析し、急性期病変ではアストログリアの Cx30 や Cx43 とともにオリゴデンドログリアの Cx32 や Cx47 が低下する一方、慢性期病変ではオリゴデンドログリアの Cx32/47 は低下したままであるがアストログリアの Cx30/43 は増加することが明らかとなった。また、筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデルマウスの脊髄でも MS の慢性期病変同様にアストログリアの Cx30/43 が増加する一方でオリゴデンドログリアの Cx32/47 は低下していた。これらの結果から、グリアアセンブリを形成するおもな分子であるコネキシンが、MS などの神経炎症性疾患のみならず ALS でも発現の変動がみられ、病態生理に関与している可能性が強く示唆された。

2. 研究の目的

(1) 多発性硬化症モデルマウスである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の病態におけるコネキシンの機能解析

(2) EAE におけるグリア炎症を標的とした既存治療薬の適応拡大による治療法開発

(3) 筋萎縮性側索硬化症モデルマウス(mSOD1 マウス)脊髄前角細胞およびヒト ALS 患者脊髄前角細胞におけるコネキシン発現解析

3. 研究の方法

(1) コネキシンの機能解析を行うため、コネキシン欠損マウスを導入した。Cx30 は欠損していても出生発達に問題ないが、Cx43 や Cx47 は欠損すると出生できないので、Cx43 や Cx47 は時限的かつ細胞特異的に欠損させる方策を検討した。その結果、タモキシフェン投与で時限的に遺伝子変異を誘導し、その遺伝子変異を Cx43 ではアストログリア、Cx47 はオリゴデンドログリア特異的に欠損させるマウスを作成した。すなわち、Cx30 は Cx30 欠損マウス、Cx43 はアストログリア特異的・時限的 Cx43 欠損マウス(Cx43icK0)、Cx47 はオリゴデンドログリア特異的・時限的 Cx47 欠損マウス(Cx47icK0)の 3 系統と、それぞれの同腹仔をもちいて、EAE の臨床経過、病理解析および生化学的解析を行った。タモキシフェンは、EAE 誘導 2 週間前から、一日 2 回の腹腔内投与を 5 日間連続で行った。EAE の誘導は、生後 12 週の雌マウスに髄鞘蛋白である MOG ペプチドと免疫賦活物質アジュバントのエマルジョンで作成した抗原を皮下注射し、臨床経過を観察した。連日の体重変化とともに、マウスの神経症状をスコア化

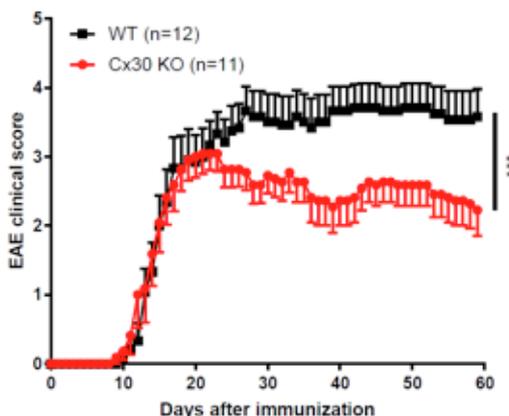
(0: 無症状、1: 尾脱力、2: 片足麻痺、3: 両足麻痺、4: 上肢麻痺、5: 死亡)した。観察対象のマウスは、セボフルランで吸入麻酔後に経左室還流固定を行い、脳や脊髄を摘出し組織学的解析に供した。生化学的解析には、還流後に固定せず組織を回収し、遺伝子解析に供した。

(2) 抗リウマチ薬イグラチモドはすでに市販され副作用もすくない薬剤で、末梢血白血球の機能抑制による抗炎症作用が知られている。本研究では、同薬剤をマウスに経口投与することで、前述のEAE症状が改善するか、検討した。生後12週野生型雌マウスにEAEを誘導し、その直後もしくは疾患極期からイグラチモドの経口投与(一日二回)を行った(投与量は都合により割愛)。イグラチモド投与の有無による臨床症状の変化、組織・生化学的解析を行った。また、中枢神経からミクログリアを抽出し、イグラチモドに対する反応を培養系で検討した。

(3) 神経細胞のCx36は、神経細胞のシナプス前、後膜に発現し、電気シナプスを形成するとされる。家族性ALSの原因遺伝子である変異SOD1(G93A)をもつマウス(mSOD1マウス)では、生後12週頃から後ろ足の麻痺が出現し、生後20週頃に呼吸不全で死亡する。同マウスの脊髄前角細胞におけるCx36電気シナプスの発現を検討した。また、これらのCx36電気シナプスは興奮性シナプス、抑制性シナプスのどちらに発現しているか、それぞれの分子マーカーとの多重染色により定量解析した。

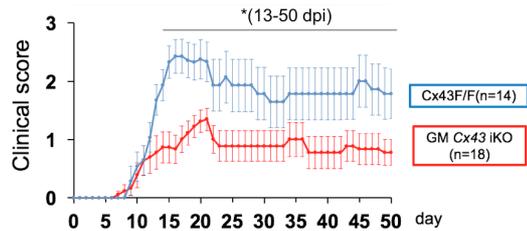
4. 研究成果

(1) ①Cx30KOマウスでは、野生型同腹仔と比較しEAEの症状が軽減した。同マウスではミクログリアが神経保護的活性化を遂げていた。中枢神経系ではアストログリアがCx30の主な発現細胞であることから、アストログリアの機能修飾が何らかの原因でミクログリアの保護的活性化を促進したと考えられ、現在原因を検討中である。

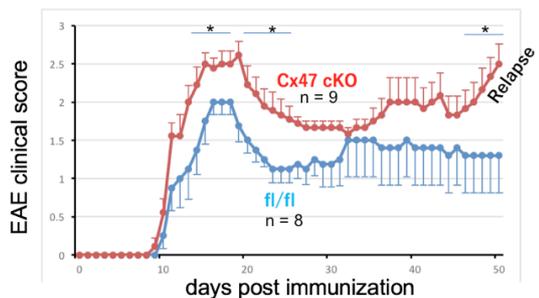


②アストログリア特異的Cx43icKOマウスでは、やはりEAEの軽減がみられた。炎症細胞の脊髄への浸潤は軽減していた。本マウスで

はアストログリアが保護的に活性化していた。現在はアストログリアが保護的活性化した原因について検討している。



③オリゴデンドログリア特異的Cx47icKOマウスでは、上記①②とは逆に早期発症かつ重症化した。また、興味深いことに、慢性期になって症状の再増悪を認めた。通常、C57Black6を遺伝的背景に持つマウスは急性発症のあと慢性化するが、再発することはない。Cx47icKOマウスはその80%以上で再発したことから、このマウスは世界初のC57Black6系統の二次進行性MSモデルと考えられた。Cx47icKOマウスでは、末梢血の炎症細胞機能には野生型と比較し有意差がなかったことから、中枢神経グリア細胞に症状悪化要因の存在を考え検討中である。



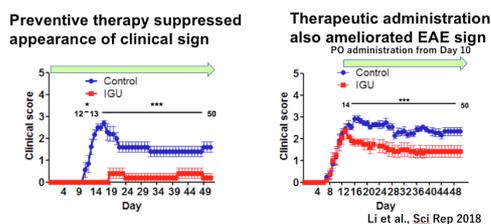
①②③の結果から、概してアストログリアのコネキシンは通常は中枢神経の炎症悪化に関与し、オリゴデンドログリアのコネキシンは逆に症状改善や組織修復、再発抑制に寄与していると考えられる。同じコネキシンでも発現細胞により反対の機能を有することは大変示唆に富んでおり、今後の解析によりコネキシンがEAEの病態に及ぼす役割を解明できれば、新たな治療標的となりうる。

	Genotype	EAE		Suggested mechanisms
		acute	chronic	
Astroglia	Cx30 KO	unchanged	ameliorated	<ul style="list-style-type: none"> Inhibition of M1-microglial activation Down-regulation of Cx43
	Cx43 icKO	ameliorated	ameliorated	<ul style="list-style-type: none"> Less influx of inflammatory cells were observed Dysregulation of glial assembly may play a role
Oligodendroglia	Cx32 KO		exacerbated	<ul style="list-style-type: none"> Disruption of GJs induces vulnerability of myelinated fibers (Markoulis 2012)
	Cx47 icKO		exacerbated	<ul style="list-style-type: none"> Infiltration of inflammatory cells were observed Inhibition of re-myelination may contribute to the relapse of EAE signs

Connexins in astroglia: pro-inflammatory function
Connexins in oligodendroglia: anti-inflammatory

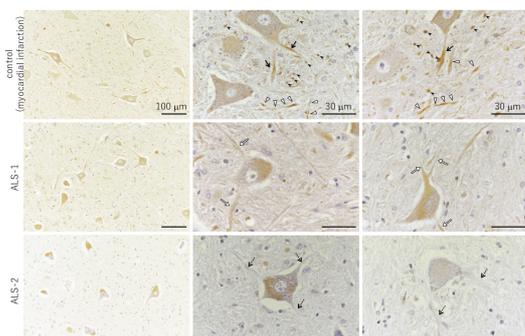
(2) 抗リウマチ薬イグラチモド(IGU)をマウスに予防投与すると、EAEの発症を完全に抑制した。また、EAEの症状極期から投与開始すると、その後の慢性症状を軽減した。同マウス脊髄では、iNOSやCOX2の発現が低下していた。抽出ミクログリアにIGUを添加すると、NF-κBの核内移行を抑制した。これらの結果から、IGUはミクログリアの活性化を抑制することでEAEの慢性症状軽減に寄与して

いることが考えられた。



(3) まず、実際の ALS 患者前角細胞において、Cx36 の発現異常がみられるか検討した。その結果、大変興味深いことに、ALS 患者では脊髄前角細胞の樹状突起における Cx36 の発現が著明に減少していることが明らかとなった

ALS患者脊髄(腰髄)におけるCx36の発現低下



た。同様の変化は mSOD1 マウス前角細胞でも認められ、この点では実際の患者における病態を mSOD1 マウスでもよく再現されていることが確認された。次に、野生型マウスにおける Cx36 が興奮性シナプスにあるのか、抑制性シナプスにあるのか、多重染色により検討したところ、Cx36 は抑制性シナプスにより多く存在することが明らかとなった。これらの結果から、実際の患者および mSOD1 マウスの前角細胞でみられた Cx36 の発現低下は、抑制性シナプスの減少を強く示唆し、Cx36 機能異常が前角細胞の異常興奮性(興奮毒性)に寄与している可能性が強く示唆された。

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 1 件)

Li G, Yamasaki R, Fang M, Masaki K, Ochi H, Matsushita T, Kira JI. Novel disease-modifying anti-rheumatic drug iguratimod suppresses chronic experimental autoimmune encephalomyelitis by down-regulating activation of macrophages/microglia through an NF- κ B pathway. *Sci Rep*. 2018 Jan 31;8(1):1933.

[学会発表] (計 10 件)

1) 山崎 亮、小早川 優子、白石 渉、山口 浩雄、眞崎 勝久、渡邊 充、藤田 篤史、藤井 敬之、宇根 隼人、斎藤 万有、崔 訳文、方 梅、李 広瑞、趙 奕楠、ウルファ・カメラ・イ

ンディアサリ、吉良 潤一. 筋萎縮性側索硬化症の新たな病態：ギャップ結合蛋白コネキシン機能異常や末梢神経炎症を介した病態機序の解明. グリアアセンブリ第 5 回班会議・成果報告会 2018.01.20 東京.

2) Jun-ichi Kira, Ryo Yamasaki, Hayato Une, Mei Fang, Yinan Zhao, Guangrui Li, Kyoko Iinuma, Katsuhisa Masaki, Koji Shinoda, Hiroo Yamaguchi.

Elucidation of pathomechanistic effect toward central nervous system (CNS) demyelinating disorders by altered function of gap junction-consisting protein “connexins”. グリアアセンブリ第 5 回冬のシンポジウム 2018.01.19 東京.

3) Ryo Yamasaki, Mei Fang, Yinan Zhao, Hayato Une, Hiroo Yamaguchi, Jun-ichi Kira. Astroglial and oligodendroglial connexins differentially modulate acute and chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. The 22nd Annual Meeting of the Japan Glia 2017.12.2 名古屋.

4) Ryo Yamasaki, Yinan Zhao, Hiroo Yamaguchi, Jun-ichi Kira. Oligodendroglia-specific Connexin 47 deletion induced relapse-remitting EAE model mice. 10th PACTRIMS. 2017.11.23~25. Ho Chi Minh City, Viet nam.

5) 山崎 亮、方 梅、李 広瑞、藤田 篤史、宇根 隼人、山口 浩雄、吉良 潤一. Connexin 30 欠損マウスにおける慢性進行期 EAE の軽症化. 第 29 回日本神経免疫学会学術集会 2017.10.6~7 札幌.

6) Yinan Zhao, Ryo Yamasaki, Hiroo Yamaguchi, Hayato Une, Yiwon Cui, Jun-ichi Kira. Oligodendroglial Cx47 mediates myelin protective effects and plays a role in suppressing infiltration of inflammatory cells in autoimmune encephalomyelitis. The 29th Annual Meeting of the Japanese Society Neuroimmunology. 2017.10.6~7. 札幌.

7) Jun-ichi Kira, Ryo Yamasaki, Hayato Une, Mei Fang, Yinan Zhao, Guangrui Li, Kyoko Iinuma, Katsuhisa Masaki, Koji Shinoda, Hiroo Yamaguchi. Astroglial and oligodendroglial connexins differentially modulate acute and chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. the 142nd American Neurological Association Annual Meeting 2017.10.18~20 アメリカ.

8) Hayato Une, Hiroo Yamaguchi, Yinan Zhao, Koji Shinoda, Katsuhisa Masaki, Magdalena Götz, Ryo Yamasaki, and Jun-ichi Kira. Experimental autoimmune encephalomyelitis is ameliorated in mice with gray matter astroglia-specific inducible connexin 43 knock-out. XXIII

World Congress of Neurology (WCN2017)
2017.09.16~21. 京都.

9) Ryo Yamasaki, Fang Mei, Hayato Une, Zhao Yinan, Hiroo Yamaguchi, Jun-ichi Kira. Astroglial(Cx30,Cx43) and oligodendroglial(Cx47) connexins modulate acute and chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). The 4th MS summer college 2017. 2017.08.05 神戸.

10) Jun-ichi Kira, Ryo Yamasaki, Hayato Une, Mei Fang, Yinan Zhao, Guangrui Li, Hiroo Yamaguchi. Astroglial and Oligodendroglial Connexins Differentially Influence Both Acute and Chronic Progressive Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. International Gap Junction Conference Glasgow 2017. 2017.07.29~8.2 Glasgow.

〔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〕 特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉良 潤一 (KIRA, Jun-ichi)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：40183305

(2) 研究分担者

山崎 亮 (YAMASAKI, Ryo)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：10467946

松下 拓也 (Matsushita, Takuya)
九州大学病院・診療准教授
研究者番号：00533011