

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07869

研究課題名(和文) 視神経脊髄炎の横断性脊髄炎遺伝リスクBKチャネルの作用機構解明と神経保護療法開発

研究課題名(英文) Novel therapy for spinal cord damage of neuromyelitis optica via regulation of BK channel

研究代表者

松下 拓也 (Matsushita, Takuya)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：00533001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：視神経脊髄炎スペクトラム障害(neuromyelitis optica spectrum disorders: NMOSD)の疾患特異的抗体である抗AQP4抗体は補体依存性にアストロサイト傷害を惹起する。BKチャネルの調整ではその障害に影響はないが、補体非依存性にNF Bの核内移行が促進する。BKチャネルinhibitorであるPAXの添加によりこの核内移行は増加し、activatorであるISO添加により低下した。この結果よりKCNA1は直接的に補体介在性の細胞傷害を抑制するというよりはむしろアストロサイトの炎症誘導を抑制することで神経保護作用をもたらすと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NMOSDにおける脊髄病巣は長大であり、その対応としてはステロイドや血漿交換による炎症抑制しかなく、患者に重篤な障害を残すことが多い。再発を抑制することで障害の蓄積を抑制することは重要だが、急性期の障害進展を抑制する治療は限られている。BKチャネルはアストロサイト傷害時の炎症誘導に影響していると考えられ、同機構を介してCNSのグリア炎症を抑制し、障害度の緩和をもたらす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated associations between KCNA1, a component of BK channel, and spinal cord damage in patients with neuromyelitis optic spectrum disorders (NMOSD). Immunoreactivity in the perivascular area of the central gray matter, where aquaporin-4 (AQP4), an antigen targeted by specific autoantibodies in NMOSD, is observed. Primary astrocyte cultures exhibited KCNA1 expression in the membrane similar to AQP4, as well as in the perikaryon. These astrocytes were damaged to death by addition of IgG purified from serum of a NMOSD patient with anti-AQP4 antibody and complements. Addition of modulator of KCNA1, ISO or PAX, did not elicit any effects on IgG-complement-mediated damage. However, NMO-IgG addition to the cells induced translocation of NF B into the nucleus and the translocation was inhibited by ISO and accelerated by PAX addition. These findings suggest that KCNA1 influences CNS inflammation by promoting astrocytes to adopt a pro-inflammatory phenotype.

研究分野：神経免疫学

キーワード：視神経脊髄炎スペクトラム障害 アストロサイト KCNA1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎スペクトラム障害 (neuromyelitis optica spectrum disorders: NMOSD) は視神経、脊髄に強い障害を引き起こす脱髄性疾患である。NMOSD では血液脳関門の形成に関わる、アストロサイト足突起上に発現する水チャネル分子、aquaporin-4 (AQP4) に対する自己抗体の存在が特徴である。病理学的にも脊髄病巣では免疫グロブリンの沈着と補体の活性化を伴って広範囲に AQP4 の発現が低下しており、抗 AQP4 抗体が病原性を有していると考えられている。NMOSD の脊髄障害は、同じく中枢神経系脱髄性疾患である多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) と比較しても高度かつ広範囲に渡っており、こうしたアストロサイト障害が重篤かつ広範な脊髄脱髄病巣を惹起する機序は明らかになっていない。

私たちは single nucleotide polymorphism (SNP) を用いた全ゲノム関連解析 (GWAS) により日本人 NMOSD に関連する遺伝因子を探索する過程で、障害度と大コンダクタンス Ca<sup>2+</sup>活性化 K<sup>+</sup> (BK) チャネル遺伝子 (KCNMA1) における多型 (rs1516512) が NMOSD の障害度と強く関連 ( $p = 1.98 \times 10^{-8}$ ) することを見出した。さらに、この多型が横断性脊髄炎にも強く関連することを発見した<sup>1</sup>。

この SNP は培養線維芽細胞では KCNMA1 発現と有意に関連しており、リスクアリル (A) 数が多いほど KCNMA1 の発現は低下することが報告されている。これらの結果は、BK チャネルの発現低下が脊髄障害の増悪に関連していることを示している。私たちは、対照疾患と NMOSD の脊髄標本を用いた免疫染色により、KCNMA1 は AQP4 と同様にアストロサイトの足突起に発現し、NMOSD の急性病巣では KCNMA1 の発現が著明に低下し、血管周囲性の初期病巣では KCNMA1 が喪失すると脱髄が生じていたが、KCNMA1 が保たれていると脱髄は起こっていなかった。

NMOSD における脊髄病巣は長大であり、その対応としてはステロイドや血漿交換による炎症抑制しかなく、患者に重篤な障害を残すことが多い。脊髄障害を抑制する治療は強く望まれているが、これまで BK チャネルと脊髄障害の関連は知られておらず、今までにない新たな治療ターゲットの候補と考えられる。

### 2. 研究の目的

#### (1) 中枢神経系における KCNMA1 の発現領域の確認

BK チャネルは細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度に依存して大量の K<sup>+</sup>を細胞外に排出する機能を有する。BK チャネルは周囲血管の平滑筋弛緩による拡張や、神経活動により神経から髄鞘内に排出された K<sup>+</sup>を、アストロサイトを介して血管内に排出させる機能を持つ。こうした機構の破綻が、脱髄範囲を拡大している可能性がある。ヒトおよびマウス中枢神経組織における KCNMA1 の発現局在性を免疫組織化学的に確認し、AQP4 の発現パターンと比較する。

#### (2) *in vitro* 培養細胞モデルにおける BK チャネル動態の解析

マウス胎児脳からアストロサイト primary cell culture を作成し、抗 AQP4 抗体陽性 NMOSD 患者から抽出した IgG を添加し、補体存在下・非存在下での血清添加の影響を評価し、BK チャネル調整を介した影響について解析する。

#### (3) 動物モデルを用いた BK チャネルの脊髄障害の拡大における役割の解析

BK チャネル活性化薬剤として chlorpromazine が、脳卒中モデルにおいて虚血病巣のサイズを縮小することが報告されている<sup>2</sup>。NMOSD 動物モデルとして頭蓋内に抗 AQP4 抗体陽性患者血清から抽出した IgG を補体とともに注入するモデル<sup>3</sup>を用いて、BK チャネルと脱髄病巣の拡がり免疫病理学的に解析する。発症後早期における BK チャネル調整により脱髄病巣のサイズを比較する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 免疫組織化学および蛍光染色

ヒト剖検例およびマウスの中枢神経に対して市販抗 KCNMA1 抗体を用いて免疫組織化学および蛍光的に KCNMA1 の局在性を確認する。また市販抗 AQP4、GFAP 抗体を用いて共染色を行い、発現パターンの比較を行う。また後述するアストロサイト培養細胞に対しても免疫蛍光染色も行い、KCNMA1 発現を確認する。

#### (2) マウスアストロサイト primary cell culture の作成

マウス胎児 P1、P2 時点の脳を分離培養し、フィルターにより OPC、CD11b マイクロビーズによりミクログリアを除去し、アストロサイトリッチな培養細胞を作成する。

#### (3) アストロサイト培養細胞を用いた Western blotting

培養アストロサイトと市販抗 KCNMA1 抗体を用い、アストロサイトにおける KCNMA1 のタンパク発現を確認する。

#### (4) 培養アストロサイト細胞に対する抗 AQP4 抗体による細胞死アッセイ

抗 AQP4 抗体陽性 NMOSD 患者血清より Protein G セファロースカラムを用いて IgG を抽出 (NMO-IgG)、2-7mg/ml の濃度に調整する。対照として健常者血清からも IgG を抽出する (c-IgG)。また補体として健常者血清を用いる。培養アストロサイトに対して NMO-IgG および c-IgG、補体添

加・非添加の条件で Calcein-AM と Propidium iodide の取り込みによる生存細胞および死細胞数を蛍光的に評価する。さらに KCNMA1 の activator である Isopimaric acid (ISO) inhibitor である Paxilline (PAX) の添加による細胞生存性を評価する。

#### (5) NMOSD 病変作成モデル

C57BL/6 マウスをイソフルランで麻酔、stereotactic frame に固定し、頭蓋骨右に burr hole をあけ、30G 針を挿入、NMO-IgG/c-IgG および補体を注入する。24 時間後に脳を抽出し病変サイズを抗 AQP4 抗体や髄鞘染色により免疫組織化学・蛍光的に評価する。

## 4. 研究成果

### (1) 中枢神経系における KCNMA1 の局在性

ヒト組織の免疫組織化学的染色では KCNMA1 は中枢神経の血管周囲に発現が確認された。マウス中枢神経組織では灰白質血管周囲に染色され、AQP4 と一部共染性が確認された (図 1)。

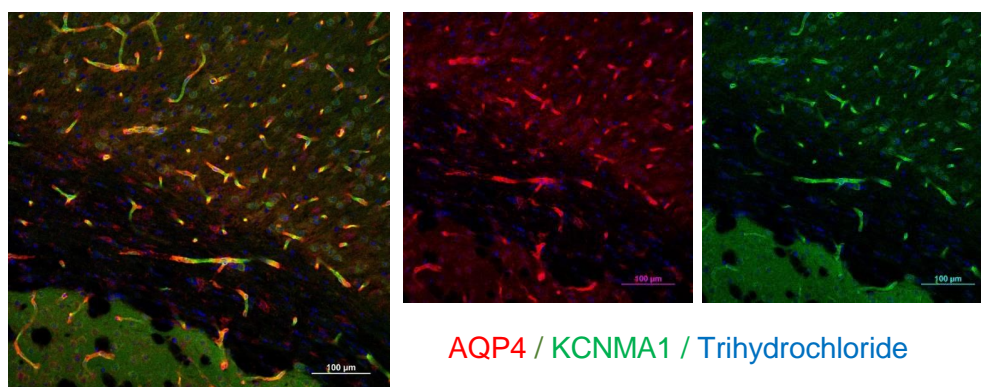


図 1. マウス脳組織における KCNMA1 の血管周囲における発現

血管周囲アストロサイトにおける KCNMA1 の機能的関与が示唆された。

### (2) *in vitro* 培養細胞モデルにおける KCNMA1 の発現

胎児マウス脳より作成された培養アストロサイト細胞の評価では KCNMA1 は細胞周囲および核周囲に発現が認められた。またアストロサイトの primary cell culture 作成と同時に作成した脳血管内皮細胞においても western blotting により KCNMA1 の発現が確認された (図 2)。

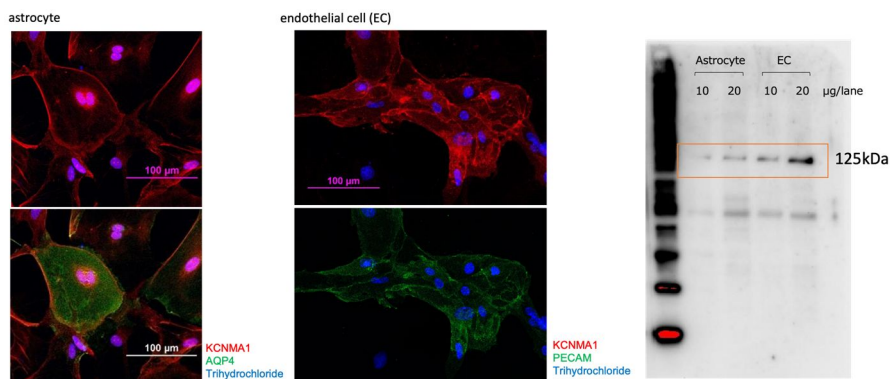


図 2. アストロサイトおよび血管内皮細胞における KCNMA1 の発現

### (3) 培養アストロサイトに対する NMO-IgG の細胞死誘導と KCNMA1 調整の影響

培養アストロサイトに対して NMO-IgG および c-IgG、補体を添加および非添加の条件で生細胞と死細胞の比率を比較した。NMO-IgG に加えて補体を添加した場合のみ生細胞/死細胞の比率は有意に低下した。NMO-IgG および補体添加後 3 時間ですでに細胞死頻度が増加していることが確認されたため、NMO-IgG および補体添加に PAX または ISO を加えて 3 時間後に死細胞/生細胞比を評価した。この結果 PAX および ISO の追加によってもアストロサイトの死細胞/生細胞比に変化は認められなかった (図 3)。この結果から抗体-補体介在性の細胞傷害に対しては KCNMA1 の影響がないことが示された。一方で NMO-IgG の添加により NF- $\kappa$ B の核内移行が促進しており、PAX の添加によりその移行が促進、PAX により抑制されている傾向が認められた (図 4)。この結果からは KCNMA1 は炎症性アストロサイトの活性化を調整することで、組織障害に影響している可能性が示された。

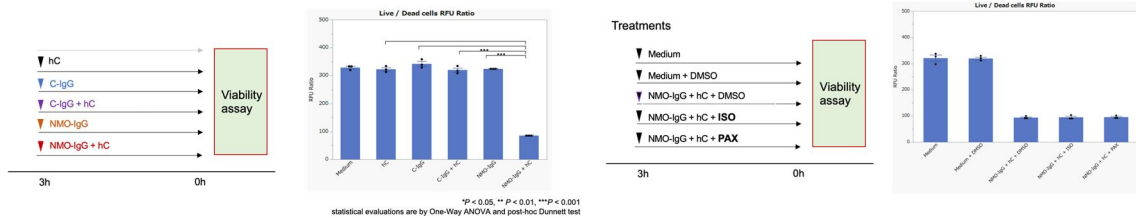


図 3. 培養アストロサイトに対する NMO-IgG・補体による細胞死と BK チャネル調整による影響

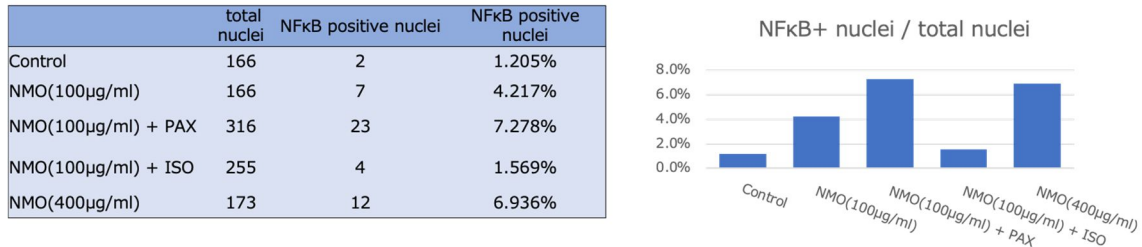


図 4. 培養アストロサイトへの NMO-IgG 添加による NF B の核内移行と BK チャネルの影響

#### (4) NMOSD 動物モデルの作成

マウス脳への局所的な NMO-IgG および補体の注入により広い範囲にわたる AQP4 の発現低下領域を確認した(図 5)。今後 BK チャネル調整の影響について PAX、ISO の局注および腹腔内投与による病変サイズの影響について検討を行う予定である。



図 5. マウス脳への NMO-IgG と補体注入による AQP4 の発現抑制

#### < 引用文献 >

1. Matsushita T, Masaki K, Isobe N, Sato S, Yamamoto K, Nakamura Y, Watanabe M, Suenaga T, Kira J, the JMSGC. Genetic factors for susceptibility to and manifestations of neuromyelitis optica. *Ann Clin Transl Neur* 7:2082-2093, 2020
2. Li H-J, Zhang Y-J, Zhou L, Han F, Wang M-Y, Xue M-Q, Qi Z. Chlorpromazine confers neuroprotection against brain ischemia by activating BKCa channel. *Eur J Pharmacol* 735:38-43, 2014
3. Saadoun S, Waters P, Bell BA, Vincent A, Verkman AS, Papadopoulos MC. Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice. *Brain* 133:349-361, 2010

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Matsushita Takuya, Masaki Katsuhisa, Isobe Noriko, Sato Shinya, Yamamoto Ken, Nakamura Yuri, Watanabe Mitsuru, Suenaga Toshihiko, Kira Jun-ichi, the Japan Multiple Sclerosis Genetic Consortium	4. 巻 7
2. 論文標題 Genetic factors for susceptibility to and manifestations of neuromyelitis optica	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Clinical and Translational Neurology	6. 最初と最後の頁 2082 ~ 2093
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/acn3.51147	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takuya Matsushita
2. 発表標題 A novel approach to decipher molecular mechanisms of human demyelinating diseases
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020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
研究分担者	渡邊 充 (Watanabe Mitsuru) (30748009)	九州大学・大学病院・助教  (17102)	
研究分担者	吉良 潤一 (Kira Jun-ichi) (40183305)	国際医療福祉大学・福岡薬学部・教授  (32206)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	磯部 紀子  (Isobe Noriko)  (60452752)	九州大学・医学研究院・教授    (17102)	
研究分担者	真崎 勝久  (Masaki Katsuhisa)  (90612903)	九州大学・大学病院・講師    (17102)	

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