

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19489

研究課題名(和文) T細胞によるグリアコネクシン喪失機構の解明とそれに基づく脱髄疾患の新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment strategy based on the mechanisms that pathogenic T cells induce loss of glial connexins in CNS demyelinating disorders

研究代表者

渡邊 充 (Watanabe, Mitsuru)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：30748009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：以前、私たちは多発性硬化症などの中枢神経系脱髄疾患の病理組織の検討で、疾患活動性が高い患者の巨大病巣においてコネクシン(Cx)蛋白が広範に脱落していることを見出した。本研究では、マウス培養細胞を用いてグリア細胞のCx蛋白の減少機序を検証した。結果、Th1細胞が産生するIFN $\gamma$ がミクログリアを活性化し、IL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインを産生し、それがアストロサイトに作用しCx43発現を減少させることを解明した。Cx蛋白の脱落は細胞間のシグナル伝達をつかさどるギャップ結合の破綻を招き、グリア間で維持されているホメオスタシスを障害し、中枢神経系脱髄疾患の病態を増悪させると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously reported early and extensive loss of astrocytic connexin 43 (Cx43) in acute demyelinating lesions of multiple sclerosis (MS) patients. Because it is widely accepted that autoimmune T cells initiate MS lesions, we hypothesized that infiltrating T cells affect Cx43 expression in astrocytes. In this research, primary mixed glial cell cultures prepared from newborn mouse brains were used. We showed that Th1 cell-conditioned medium decreased Cx43 expression in mixed glial cell cultures and interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) activated microglia to release interleukin (IL)-1 $\beta$  that reduced Cx43 gap junctions in astrocytes. Thus, Th1-dominant inflammatory states disrupt astrocytic intercellular communication and may exacerbate the inflammatory processes in demyelinating disorders. Moreover, IFN $\gamma$  and Th1-prone conditions can be important targets to prevent development of extensive demyelinating lesions.

研究分野：神経免疫学

 キーワード：多発性硬化症 中枢神経脱髄疾患 コネクシン ギャップ結合 Th1細胞 インターフェロン $\gamma$  アストロサイト ミクログリア

### 1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) は、中枢神経髄鞘抗原を標的とする T 細胞が起こす自己免疫疾患と考えられている。ところが私たちは MS の最重症亜型で脱髄層と非脱髄層が交互に同心円状に配列する巨大病巣を呈する Baló 病の病理学的検討において、病巣の leading edge で脱髄に先行してまずアストロサイトのコネキシン (Cx) 43 が広汎に脱落し、次いでオリゴデンドロサイトの Cx32 や Cx47 が脱落し、最後に髄鞘蛋白が脱落することを見出した。同様の Cx 群の広範な脱落を、MS や視神経脊髄炎の急性期病巣でも認めた。Cx は細胞間で接合してギャップ結合 (gap junction; GJ) channel を形成する。グリア細胞は、GJ により巨大なシンシチウムを形成し、GJ channel を介した種々の物質の出入により情報やエネルギーを伝達する。それ故、私たちは病巣形成早期からのグリア細胞間の機能的連絡障害 (グリアシンシチウムの破綻) がヒト脱髄性疾患の病態進展に極めて重要であることを指摘した。しかし、この Cx 群の脱落がどのような機序で起こるのか、またどのような機構で脱髄性疾患の病態を悪化させるのかは全く不明である。

一方、MS では、T 細胞が炎症のトリガーとして病態の鍵を握ると考えられている。実際、私たちは Cx 群の脱落がみられた MS 病巣で T 細胞の血管周囲浸潤が強いことを示した。このことから、本研究では T 細胞およびその産生因子がアストロサイトの Cx 発現を抑制し、それが脱髄性疾患の発症を誘導もしくは重症化させるとの仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

(1) 脱髄に先行して最初に脱落するアストロサイトの Cx (特に Cx43) の発現に影響を与える主要な炎症性サイトカインが何かを *in vitro* で検証する。また実際に T 細胞が Cx 発現を抑制するのか、その機序を含めて解析する。

(2) Cx の脱落が実際に多発性硬化症を悪化させるのか、種々の Cx 発現をノックアウトしたマウスを作製し、同マウスに MS の動物モデルとされる実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導し、その影響を検証する。

### 3. 研究の方法

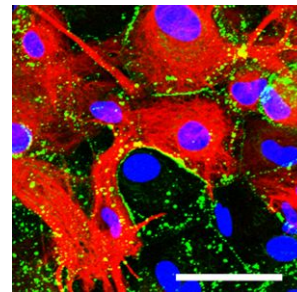
(1) 新生児 C57BL/6 マウス脳から初代混合グリア細胞培養を樹立し、さらにミクログリアを抗 CD11b 抗体結合磁気ビーズで分離し、アストロサイト単独培養およびアストロサイト・ミクログリア混合培養を作製した。これらの培養細胞を、様々な炎症性サイトカインで刺激を行い、Cx43 の発現変化を、western blot 法、免疫細胞染色法、リアルタイム PCR 等で検討した。また GJ 機能の変化を scrape loading/dye transfer assay という方法を用いて評価した。

また同マウスの脾臓細胞からナイーブ T 細胞を分離し、各種ヘルパー T 細胞へ分化誘導を行った。その培養上清を用いてグリア培養細胞を刺激し、Cx43 発現の変化を評価した。

(2) Cx30 ノックアウトマウス、灰白質のアストロサイト特異的 Cx43 コンディショナルノックアウトマウス、オリゴデンドロサイト特異的 Cx47 コンディショナルノックアウトマウスを作製し、ミエリンオリゴデンドロサイト糖脂質ペプチド (MOG<sub>35-55</sub>) で免疫を行い EAE を誘導した。その重症度および病理学的変化を評価した。

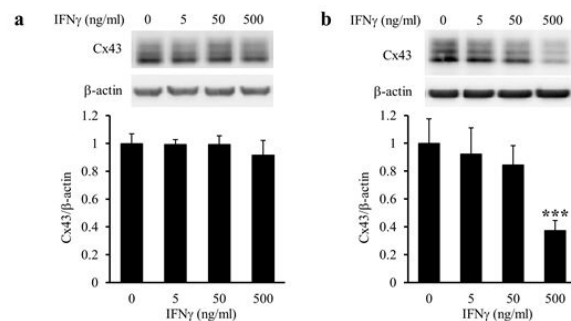
### 4. 研究成果

(1) 新生児 C57BL/6 マウス脳から初代混合グリア細胞培養を樹立し、この培養細胞のうち、アストロサイトが Cx43 を発現していることを確認した。



**図 1 . 混合グリア培養細胞の免疫染色によるアストロサイトにおける Cx43 発現の確認 (GFAP/Cx43/DAPI)**

この混合グリア細胞を T 細胞関連の炎症性サイトカインで刺激したところ、インターフェロン (IFN) 刺激でアストロサイトの Cx43 の減少がみられた。アストロサイトのみを直接 IFN で刺激しても Cx43 の減少は見られず、ミクログリアとの共培養においてのみ Cx43 の減少および GJ 機能低下がみられた (図 2) ことから、IFN がミクログリアの活性化を介してアストロサイトの Cx43 を減少させることが示唆された。



**図 2 . IFN による Cx43 減少 (western blot)**  
a. アストロサイトのみを IFN で刺激、b. アストロサイト・ミクログリア混合培養を IFN で刺激

次にミクログリアを IFN で刺激し、その培養上清でアストロサイトを刺激しても同様にアストロサイトの Cx43 の発現が低下したことから、ミクログリア由来の液性因子がアストロサイトに作用していると考えられた。この IFN でミクログリアを刺激した培養上清中には様々な炎症性サイトカインが増加していたが、そのうちインターロイキン (IL) -1 がアストロサイトの Cx43 を減少させることを見出した (図 3)。

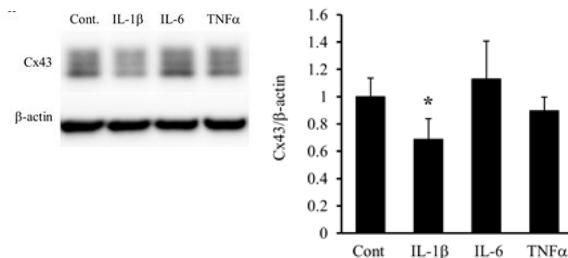


図 3 .IL-1 による Cx43 減少 (western blot)

最後にマウス脾臓細胞からナイーブ T 細胞を分離し、各種ヘルパー T 細胞 (Th1, Th17, 制御性 T (Treg)) へ分化誘導し、その培養上清でグリア混合培養を刺激したところ、IFN を産生する Th1 細胞のみがアストロサイトの Cx43 発現を低下させることが示された (図 4)。

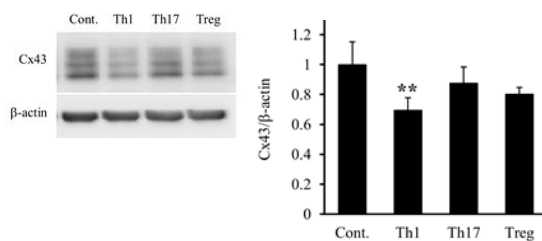


図 4 . Th1 細胞上清による Cx43 減少 (western blot)

以上より、多発性硬化症において中枢神経系に浸潤する Th1 細胞が産生する IFN がミクログリアを活性化し、IL-1 などの炎症性サイトカインを産生し、それがアストロサイトに作用し Cx43 発現を減少させることを解明した。Cx 蛋白の脱落は細胞間のシグナル伝達をつかさどるギャップ結合の破綻を招き、グリア間で維持されているホメオスタシスを障害し、中枢神経脱髄性疾患の病態を増悪させると考えられる。

(2) また実際に Cx の発現変化が多発性硬化症の病態を悪化させるのか検証するため、まず Cx30 ノックアウトマウス、タモキシフェン誘導の灰白質のアストロサイト特異的 Cx43 コンディショナルノックアウト (*Glast-Cre<sup>ERT2</sup>:Cx43<sup>f1/f1</sup>*) マウス、オリゴデンドロサイト特異的 Cx47 コンディショナルノックアウト (*Plp-Cre<sup>ERT</sup>:Cx47<sup>f1/f1</sup>*) マウスを作製した。これらのマウスに対し MOG<sub>35-55</sub> で免

疫を行い EAE を誘導した。アストロサイトの Cx30 ノックアウトマウスでは、慢性期の EAE が軽症化したのに対し、オリゴデンドロサイト特異的 Cx47 コンディショナルノックアウトマウスでは EAE が重症化した。灰白質のアストロサイト特異的 Cx43 コンディショナルノックアウトに対する EAE の効果についても現在検証中であるが、アストロサイトの Cx とオリゴデンドロサイトの Cx では、EAE 重症度に与える影響が異なる可能性が示唆される。現在、その機序について検証中である。

## 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)

Watanabe M, Yamasaki R, Kira J. The relationship between Th1 cells and astrocytic connexin 43 gap junctions in multiple sclerosis. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2017;8(2):101-102. (査読有)  
DOI: 10.1111/cen3.12384.

Watanabe M, Masaki K, Yamasaki R, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Matsushita T, Suzumura A, Kira JI. Th1 cells downregulate connexin 43 gap junctions in astrocytes via microglial activation. *Sci Rep*. 2016;6:38387. (査読有)  
DOI: 10.1038/srep38387.

〔学会発表〕(計 6 件)

渡邊 充, 眞崎 勝久, 山崎 亮, 川ノ口 潤, 竹内 英之, 松下 拓也, 錫村 明生, 吉良 潤

IFN はミクログリアに IL-1 /TNF を産生させてアストロサイトコネキシン 43 発現を低下させる  
第 28 回日本神経免疫学会学術集会、2016 年 9 月 30 日、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

Watanabe M, Masaki K, Yamasaki R, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Matsushita T, Suzumura A, Kira J.

IFN reduces expression of connexin 43 in astrocytes via activation of microglia. 32nd Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, 2016 年 9 月 15 日、ロンドン(イギリス)

Watanabe M, Masaki K, Yamasaki R, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Suzumura A, Kira J.

IFN-gamma inhibit the expression of connexin 43 in astrocytes via activation of microglia.

第 57 回日本神経学会学術大会、2016 年 5 月

19 日、神戸コンベンションセンター（兵庫県・神戸市）

Watanabe M, Masaki K, Yamasaki R, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Suzumura A, Kira J.

Th1 cells inhibit the expression of connexins in astrocytes.

31st Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, 2015年10月8日、バルセロナ(スペイン)

渡邊 充、眞崎 勝久、山崎 亮、川ノ口 潤、竹内 英之、錫村 明生、吉良 潤一

Th1 細胞によるアストロサイトコネクシン発現抑制作用

第 27 回日本神経免疫学会学術集会、2015 年 9 月 15 日、長良川国際会議場（岐阜県・岐阜市）

Watanabe M, Masaki K, Yamasaki R, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Suzumura A, Kira J.

Th1 cells inhibit the expression of connexins in astrocytes.

第 56 回日本神経学会学術大会、2015 年 5 月 22 日、朱鷺メッセ・ホテル日航新潟（新潟県・新潟市）

〔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

[https://www.neuro.med.kyushu-u.ac.jp/report/watanabe\\_2017/](https://www.neuro.med.kyushu-u.ac.jp/report/watanabe_2017/)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 充 (WATANABE, Mitsuru)

九州大学病院・神経内科・医員

研究者番号：30748009

(2)研究分担者

なし

研究者番号：

(3)連携研究者

なし

研究者番号：

(4)研究協力者

吉良 潤一 (KIRA, Jun-ichi)

山崎 亮 (YAMASAKI, Ryo)

松下 拓也 (MATSUSHITA, Takuya)

眞崎 勝久 (MASAKI, Katsuhisa)

錫村 明生 (SUZUMURA, Akio)

竹内 英之 (TAKEUCHI, Hideyuki)

川ノ口 潤 (KAWANOKUCHI, Jun)