

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07087

研究課題名(和文) 多発性硬化症における異常構造をもつMBP蛋白質の発現と小胞体ストレス応答

研究課題名(英文) Involvement of ER stress-mediated MBP expression in myelin abnormalities in multiple sclerosis

研究代表者

板東 良雄 (BANDO, YOSHIO)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20344575

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)：我々は近年、髄鞘構成蛋白質であるMBPの構造異常の変化が多発性硬化症(MS)の再発に関与している可能性を見出した。本研究の一連の結果から異常な髄鞘形成は髄鞘構成蛋白質に対する自己抗体および小胞体ストレスが髄鞘形成に関与し、オリゴデンドロサイトにおけるMBP産生能が亢進することが明らかとなった。また、MBPアイソフォームの一つが変性を起こし、MBPのバランスが崩れることによって異常な髄鞘が形成されることが明らかとなった。さらに、変性蛋白質の産生抑制により異常な髄鞘構造の出現も抑制することができ、この抑制効果はin vitroのみならずin vivoにおいても一定の効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、自己抗体や炎症反応によって惹起されるERストレスによりOLにおけるMBPの蛋白合成が異常となった結果、産生される変性MBPが異常な髄鞘構造の形成に関与していることを明らかにした。さらに、分子シャペロン誘導剤を用いることによってこのような異常な髄鞘構造の形成を抑制でき、EAEの症状を改善できることも明らかにした。これら一連の成果はERストレスを標的とした薬剤がMS治療に有効である可能性を示唆するものであり、これまでにない全く新しい視点のMS治療薬を開発する上で基盤になるものと思われる、社会的にも貢献するものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the CNS, resulting in neurological impairments. However, the mechanism of relapsing has not been fully understood. On the other hand, we have recently found the possibility that demyelination with abnormal myelin morphology is involved in the pathogenesis of relapsing. In this project, we tried to understand the mechanism of abnormal myelin formation.

Abnormal myelin formation was induced by experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). In addition, anti-MOG autoantibody and ER-stress could induce this abnormality in the cultured oligodendrocytes. Moreover, we found that one of MBP isoform was significantly induced, but degenerated by these stresses, resulting in losing balance of MBP isoforms. By contrast, an ER chaperone inducer improved this phenomenon by refolding MBP protein. The ER chaperone inducer also suppressed progression of EAE and improved abnormal myelin formation.

研究分野：神経解剖学

キーワード：ERストレス オリゴデンドロサイト 脱髄 髄鞘構造

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症(Multiple sclerosis: MS)は中枢神経組織内への炎症細胞の浸潤とともに髄鞘が傷害され、再発により症状が増悪する。しかしながら、根治療法の糸口が見えていない。これまで我々はマウス MS モデルおよびヒト MS 患者剖検脳を用いた形態学的解析により、病理学的に脱髄を起こしている領域(LFB 染色陰性)においても、電子顕微鏡レベルの微細構造レベルにおいては髄鞘構造が残存しており、むしろ異常な髄鞘構造が多数認められることを明らかにしてきた。おそらく、異常な髄鞘構造は何らかの原因により髄鞘を染色する LFB に対して感度の低下が起こっているものと推測されるが、“脱髄 = 髄鞘が消失”というこれまでの概念を大きく覆してきた。さらにこのような異常な髄鞘構造は再発寛解型のマウス MS モデルにおいても認められ、興味深いことに初発ではほとんど認められず、寛解から再発にかけての期間に異常な髄鞘構造が増加することを見出した。また、髄鞘構成タンパクの一つである MBP の発現量が増加し、4つの MBP アイソフォームのうち、特定のアイソフォームが増加していることも見出すことに成功したが、その病理学的意義については不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、このような異常な髄鞘構造形成が何によって誘導されるのか、そのメカニズムや病理学的意義を明らかにすることを目的とし、本知見から得られる新しい治療法についても検討を行った。

### 3. 研究の方法

培養細胞ならびにマウス MS モデルを用いて western blot 法や免疫組織化学法(レーザー共焦点顕微鏡, LSM)・電子顕微鏡による形態学的解析を行った。

#### (1) 培養細胞

マウス初代培養オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)および我々が独自に開発したマウス ES 細胞由来 OPC を用いて検討した。ともに甲状腺ホルモン T3 を用いてオリゴデンドロサイト(OL)へ分化誘導を行い、各種ストレス誘導剤を培地に添加した。

#### (2) western blot 法

培養細胞あるいはマウス MS モデル(EAE)から採取した組織から蛋白を抽出し、一般的な手法により行った。

#### (3) 免疫組織化学法および細胞染色法

培養細胞は細胞を PBS(-)で洗浄後に 4% PFA で固定し、一般的な細胞染色法を用いた。EAE においては生理食塩水および 4% PFA で灌流固定の後、脊髄を取り出し、30% シュクロース置換を行った後、ドライアイスを用いて凍結包埋した。その後、クリオスタットを用いて凍結切片を作成した。凍結切片を用いて一般的な免疫組織化学法を行った。染色後の細胞および切片の観察は共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

#### (4) オスミウム浸軟法を用いた走査型電子顕微鏡(SEM)による髄鞘の観察

EAE を発症したマウスを 0.5% PFA/0.5% GA にて灌流固定を行い、脊髄を採取した後、オスミウム浸軟法を用いて試料を作成した。試料の観察は走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ER ストレスによる MBP の構造変化

マウス初代培養 OL ならびに ES 細胞由来 OL を用いて ER ストレス誘導剤である tunicamycin を培地中に添加した後、細胞から蛋白質を抽出して western blot を行った。その結果、MBP の発現に重要な fyn のリン酸化を介した細胞内シグナル伝達機構により、4つの MBP アイソフォームのうちの一つの発現量が増加することが明らかとなった。また、変性 MBP を検出する抗体を用いた western blot においてもこのアイソフォームのみがシグナルを検出した。以上のことから、少なくとも ER ストレスによって MBP の構造変化が惹起されることが明らかとなった。

#### (2) ER ストレスによる MBP の構造変化が OL の形態に及ぼす影響

上述(1)において、OL の形態変化に及ぼす影響について検討を行った。細胞染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、ER ストレスによって OL は肥大化することが明らかとなった。また、小胞体に局在する分子シャペロン誘導剤を培地に添加すると、このような肥大化が抑制され、ER ストレスによって誘導される変性 MBP の発現も抑制された。

#### (3) 分子シャペロン誘導剤投与により EAE における異常な髄鞘構造は修復できるか?

EAE モデルにおいて分子シャペロン誘導剤(0-50mpk)をマウス尾静脈から投与したところ、EAE の発症は数日程度遅延し、症状も改善傾向を示した。免疫組織化学法を用いた形態学的解析により、異常な MBP の発現も抑制されていた。また、電子顕微鏡による観察においても異常な髄鞘構造をもつ軸索の数はコントロール群に比べて減少しており、一定の有意な効果が認められたと判断した。しかしながら、in vitro における結果から期待される効果が得られなかったことも事実であり、薬効評価については引き続き検討を要すると考えられた。特に、投与方法、投与量および投与期間は結果に大きな影響を及ぼすファクターであり、今回は過去の我々の同様の実験を参考に行ったが、本薬剤に対して必ずしも最適な条件ではなかった可能性も否定できないため、今後検証および修正していく必要があると思われる。

#### (4) まとめ

本研究において、EAE における異常な髄鞘構造形成には自己抗体や炎症反応によって惹起される ER ストレスが関与していることを明らかにした。また、ER ストレスによって OL における MBP の蛋白合成が異常となり、変性 MBP が産生されることにより異常な髄鞘構造が形成されることを明らかにした。さらに、分子シャペロン誘導剤を用いることによってこのような異常な髄鞘構造の形成を抑制でき、EAE の症状を改善できることも明らかにした。これら一連の成果は ER ストレスを標的とした薬剤が MS 治療に有効である可能性を示唆するものであり、これまでにない全く新しい視点の MS 治療薬を開発する上で基盤になるものと思われ、社会的にも貢献するものであると考えられる（論文投稿準備中）。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nomura T, Bando Y, Nakazawa H, Kanemoto S, Yoshida S.	4. 巻 126
2. 論文標題 Pathological changes in mice with long term cuprizone administration.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochem Int.	6. 最初と最後の頁 229-238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2019.03.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakazawa H, Suzuki Y, Ishikawa Y, Bando Y, Yoshida S, Shiosaka S.	4. 巻 162
2. 論文標題 Impaired social discrimination behavior despite normal social approach by kallikrein-related peptidase 8 knockout mouse.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurobiol Learn Mem.	6. 最初と最後の頁 47-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nlm.2019.04.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maeda Y, Nakagomi N, Nakano-Doi A, Ishikawa H, Tatsumi Y, Bando Y, Yoshikawa H, Matsuyama T, Gomi F, Nakagomi T.	4. 巻 8(9)
2. 論文標題 Potential of Adult Endogenous Neural Stem/Progenitor Cells in the Spinal Cord to Contribute to Remyelination in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells.	6. 最初と最後の頁 E1025
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells8091025.	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 -
1. 著者名 Bando Y, Geisler JG.	4. 巻 131
2. 論文標題 Disease modifying mitochondrial uncouplers, MP101, and a slow release ProDrug, MP201, in models of Multiple Sclerosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochem Int.	6. 最初と最後の頁 104561
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2019.104561.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakazawa H, Suzuki Y, Ishikawa Y, Bando Y, Yoshida S, Shiosaka S.	4. 巻 26
2. 論文標題 Dataset on the effect of knockout of KLK8 in social memory.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Data Brief.	6. 最初と最後の頁 104458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2019.104458.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bando Y.	4. 巻 1190
2. 論文標題 Roads to Formation of Normal Myelin Structure and Pathological Myelin Structure.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol.	6. 最初と最後の頁 257-264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-32-9636-7_16.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhou M, Ishizawa A, Akashi H, Suzuki R, Kanatsu Y, Abe H, Bando Y.	4. 巻 95(2)
2. 論文標題 An anomalous case of the flexor carpi radialis with an excessive muscular bundle.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anat Sci Int.	6. 最初と最後の頁 293-296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-019-00519-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhou M, Yoshikawa K, Akashi H, Miura M, Suzuki R, Li TS, Abe H, Bando Y.	4. 巻 9(2)
2. 論文標題 Localization of ATP-sensitive K <sup>+</sup> channel subunits in rat liver.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World J Exp Med.	6. 最初と最後の頁 14-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5493/wjem.v9.i2.14.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bando Y, Hagiwara Y, Suzuki Y, Yoshida K, Aburakawa Y, Kimura T, Murakami C, Ono M, Tanaka T, Jiang YP, Mitrovi B, Bochimoto H, Yahara O, Yoshida S.	4. 巻 66(2)
2. 論文標題 Kallikrein 6 secreted by oligodendrocytes regulates the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 359-378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ueda Y, Bando Y, Misumi S, Ogawa S, Ishida A, Jung CG, Shimizu T, Hida H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Alterations of Both Dendrite Morphology and Weaker Electrical Responsiveness in the Cortex of Hip Area Occur Before Rearrangement of the Motor Map in Neonatal White Matter Injury Model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Neurol.	6. 最初と最後の頁 443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2018.00443.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nomura T, Bando Y, Nakazawa H, Kanemoto S, Yoshida S.	4. 巻 126
2. 論文標題 Pathological changes in mice with long term cuprizone administration.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochem Int.	6. 最初と最後の頁 229-238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 板東良雄
2. 発表標題 Mechanism of demyelination and remyelination in multiple sclerosis.
3. 学会等名 The 6th MS summer college (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 板東良雄、吉田成孝
2. 発表標題 オリゴデンドロサイトにおける小胞体ストレス応答
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 板東良雄
2. 発表標題 MP101およびMP201は多発性硬化症モデルにおける脱髄と軸索変性を抑制する
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 板東良雄
2. 発表標題 脱髄と軸索変性の病態解析
3. 学会等名 グリアクラブ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 板東良雄、吉田成孝
2. 発表標題 オリゴデンドロサイトにおける小胞体ストレス応答
3. 学会等名 日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 板東良雄、吉田成孝
2. 発表標題 抗MOG自己抗体とオリゴデンドロサイト
3. 学会等名 日本解剖学会・東北北海道支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Bando Y., Yoshida S.
2. 発表標題 Anti-MOG autoantibody induces morphological changes in oligodendrocytes
3. 学会等名 日本神経化学会
4. 発表年 2018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	吉田 成孝  (YOSHIDA SHIGETAKA)  (20230740)	旭川医科大学・医学部・教授    (10107)	