

令和元年6月5日現在

機関番号：17102  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2017～2018  
 課題番号：17K16124  
 研究課題名(和文) グルコース・乳酸担体を標的とした中枢脱髄疾患のエネルギー供給機構修復治療の開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment for CNS demyelinating disorders targeting glucose and monocarboxylate transporter

研究代表者  
 渡邊 充 (Watanabe, Mitsuru)

九州大学・病院・助教

研究者番号：30748009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：同心円病変が特徴のBalo病患者剖検脳では、グルコース担体の1つGLUT5陽性細胞をTMEM119と同様、急性期活動性病変である最外層に多く認めた。これよりGLUT5はレジデントミクログリアで発現し、急性期脱髄病変に関与すると考えられた。オリゴデンドロサイト特異的コネキシン47ノックアウトにより多発性硬化症モデルマウスが重症化した。また視神経脊髄炎関連疾患ではアストロサイト由来のGFAP濃度が血中で高く、ニューロフィラメント濃度高値が再発後も持続した。アストロサイトからのエネルギー供給障害が神経障害の遷延に寄与すると考えられ、これらは神経・グリア細胞の機能的連絡の重要性を示すものである。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経脱髄疾患において、コネキシン蛋白やグルコース担体、乳酸担体などの発現が変化していることから、神経細胞やグリア同士の機能的連絡障害(グリアシンシチウムの破綻)が病態に関与していることを提唱し、今回コネキシンの障害により多発性硬化症モデルが悪化すること、アストロサイト障害により軸索障害が遷延する可能性を示した。中枢神経系脱髄性疾患を理解するうえで、免疫細胞や一つの中枢神経系の細胞のみに注目するのでは不十分であり、様々な細胞が相互につながりをもっていることを踏まえて病態を評価することが重要である。

研究成果の概要(英文)：In Balo's concentric demyelinating lesion, GLUT5 and TMEM119 (marker of resident microglia) positive microglia were preferentially seen in most outer layer (acute active demyelinating lesion). Therefore, this finding suggests that GLUT5 is expressed on resident microglia and involved in active lesion formation. Experimental autoimmune encephalomyelitis in oligodendrocyte-specific connexin 47 knockout mouse showed severer course than in control. In neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD), serum glial fibrillary acidic protein and neurofilament light chain (NfL) levels were higher than in healthy controls. The decrease of serum NfL levels per month after relapse was significantly smaller in NMOSD than in multiple sclerosis. Taken together, in NMOSD, astrocytic damage may disturb trophic support from astrocyte to neuron and cause sustained neuronal damage even in the remission phase. These findings showed the importance of neuron-glia syncytium in demyelinating disorders.

研究分野：神経免疫

キーワード：多発性硬化症 視神経脊髄炎関連疾患 Balo病 グルコース担体 アストロサイト ミクログリア GFA  
 P ニューロフィラメント

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 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 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し巨大病巣を呈する Baló 病において、私たちは病巣の leading edge では脱髄に先行してまずアストロサイトの connexin (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 (Masaki K et al, Acta Neuropathol, 2012)。同様な Cx 群の広汎な脱落は、MS や視神経脊髄炎関連疾患 (neuromyelitis optica spectrum disorders, NMOSD) の急性期病巣でも認めることを世界で初めて報告した (Masaki K et al, PLOS ONE, 2013; Masaki K. Neuropathology, 2015)。NMOSD の脊髄病変の病理学的解析でも、早期病変である孤立性血管周囲性病変で Cx43 が既に脱落していることを見出した (Hayashida S, et al. Brain Pathol, 2016)。Cx はグリア細胞間で接合して gap junction (GJ) channel を形成する。GJ channel を介した種々の物質の出入によりグリアは合体体 (シンシチウム) を形成している。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。

そこで、申請者はアストロサイトの Cx43 発現を抑制する機序を、マウス初代グリア培養細胞を用いて検証した。MS の病態に寄与する T 細胞のうち、1 型ヘルパー T 細胞 (Th1 細胞) が産生するインターフェロン (IFN) がマイクログリアを活性化し、産生された IL-1 がアストロサイトに作用することで Cx43 を低下させ、さらに GJ 機能を抑制する機序を解明した。 (Watanabe M, et al. Sci Rep, 2016)。事実、MS の急性期病巣では血管周囲性に T 細胞が顕著に浸潤しており、さらに脳血管周囲の Cx43 が欠損することで炎症細胞が脳実質内に浸潤し易くなることが報告されている (Boulay AC, et al. J Neurosci, 2015)。従って、ヒト MS 急性期でも T 細胞、マイクログリア、アストロサイトを軸とした Cx43 脱落が病態進展に大きく寄与している可能性が高い。現在、*in vivo* での Cx43 脱落の意義を証明するため、アストロサイト特異的 Cx43 欠損マウスに脱髄を誘導し解析を進めている。

他方、グリアシンシチウムの破綻により脳血管 - グリア細胞 - 神経軸索を介した栄養供給経路が顕著に遮断されると考えられる。今回、神経軸索生存に必須な栄養供給経路とその障害に焦点を当て、グルコースの促進拡散型輸送タンパクであるグルコース担体 (GLUTs) とモノカルボン酸輸送に参与する乳酸担体 (MCTs) に着目した。中枢神経において、GLUT1 や MCT4 はアストロサイトに、GLUT5 はマイクログリアに発現すると報告されているが、ヒト神経疾患、特に脱髄性疾患を対象とした研究は殆ど報告されていない。

私たちは、MS や NMOSD の急性期病巣において、血管内皮の GLUT1 や MCT1 は保持され、血管周囲孤発病巣のアストロサイトの MCT4 発現は保持されるのに対し、広汎な病巣では MCT4 が減少し、マイクログリアの GLUT5 発現は亢進していることを見出した (図 1, 2) (Masaki K, et al. in preparation)。このことから、広汎な脱髄病巣形成に MCT4 を介した乳酸代謝が重要であることが示唆された。また、急性期病巣のマイクログリアで GLUT5 の発現が亢進していること、抗炎症性マイクログリア (M2) に対し

炎症性マイクログリア (M1) は、酸化的リン酸化に比べ解糖系のエネルギー代謝が優位になる (Orihuela R, et al. Br J Pharmacol, 2016) ことから、GLUT5 の発現亢進はマイクログリアの M1 シフトを意味し、それが急性期病巣の増悪につながる事が想定される。

そこで私たちは、ヒト脱髄性疾患では、グリアシンシチウム破綻により MCT4 や GLUT5 の発現・機能異常が生じ、脱髄・軸索障害および病巣拡大に重要な役割を果たすという新仮説を立てた。本研究では中枢神経系脱髄性疾患におけるグリアシンシチウムに参与する Cxs や MCT4, GLUT5 などの発現変化とその機序の解明、病態との関与を解明する。

## 2. 研究の目的

上述の通り、中枢神経系脱髄性疾患において、GLUTs や MCTs の発現変化によるエネルギー

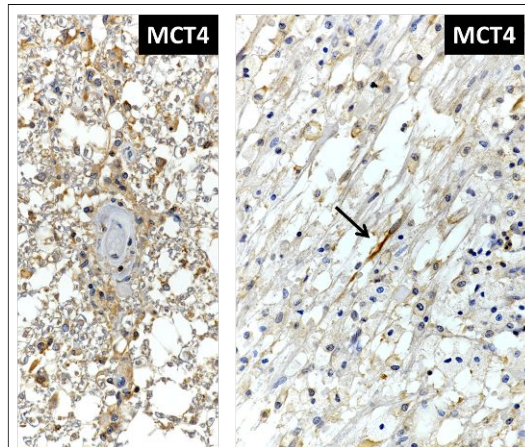


図 1 : NMOSD 急性期病巣における MCT4 発現変化  
孤立性血管病変では発現亢進 (左)  
広汎な病変では発現低下 (右、一部で亢進)

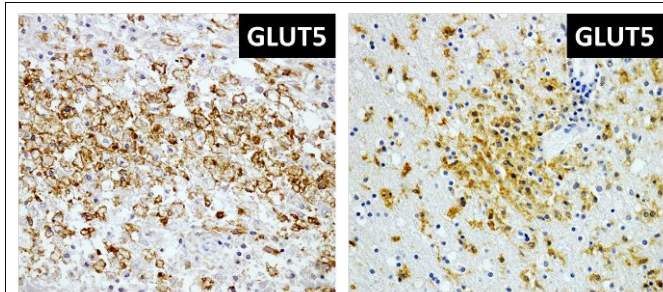


図 2 : NMOSD 急性期病巣における GLUT5 発現亢進  
泡沫状マクロファージ (左)、活性化マイクログリア (右) で発現亢進

という新仮説を立てた。本研究では中枢神経系脱髄性疾患におけるグリアシンシチウムに参与する Cxs や MCT4, GLUT5 などの発現変化とその機序の解明、病態との関与を解明する。



供給障害が広汎な脱髄や軸索障害を引き起こすとの新仮説を立てた。中枢性脱髄性疾患において MCT4 脱落や GLUT5 亢進を来す機序、およびその変化から脱髄・軸索障害に至る機序を明らかにすることで、新たな病態機序の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 中枢神経系脱髄性疾患における GLUTs, MCTs の発現評価：中枢神経系脱髄性疾患の剖検脳をもちいて免疫組織染色を含む各種染色を行うことで、GLUTs や MCTs の発現変化や分布を病理学的に詳細に検討する

(2) グリアシンシチウムに關与する Cxs 群が MS のモデルマウスである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) に与える影響評価：Cx30 ノックアウト (KO) マウス、GLAST 発現アストロサイト特異的 Cx43 KO マウス、オリゴデンドロサイト特異的 Cx47 KO マウスに対し、それぞれ EAE を誘導し重症度を評価した。

(3) 中枢神経系脱髄性疾患における神経軸索障害及びグリア障害の評価：中枢神経系脱髄性疾患の代表である MS や NMOSD 患者の髄液や血清を採取し、Single-molecule array (Simoa) assay を用いて神経軸索やアストロサイトの骨格蛋白であるニューロフィラメント軽鎖 (NfL) やグリア線維性酸性蛋白 (GFAP) の濃度を測定し、疾患障害度や疾患活動性、その他の臨床像との相関を評価し、病理学的機序を推察する。

(4) 炎症細胞による GLUTs や MCTs の発現変化の評価およびその機序の解明：マウス脳由来の培養細胞を用いて GLUTs や MCTs の発現を確認する。そしてそこに各種炎症性サイトカインや T 細胞、ミクログリアなどを用いて刺激して、GLUTs や MCTs の発現変化を評価し、その機序を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) GLUT5 の健常脳での分布を評価したところ、定常ミクログリアで発現することが確認された。中枢神経脱髄疾患の一つである Baló 病は同心円病変を呈することが特徴とされ、典型病巣では最外層が急性期病変で、中心部は陳旧病変とされる。Baló 病患者剖検脳の病理学的検討で GLUT5 陽性細胞を急性期活動性脱髄病変である最外層に多く認めた (図 3 A, B) のに対し、中心部の慢性期病巣ではいずれの陽性細胞も乏しかった。一方、炎症性マーカーである CD68 や抗炎症性のマーカーである CD163 陽性細胞は最外層から中心部まで広く分布していた (図 3 C, D)。最近の報告でレジデントミクログリアに特異的なマーカーとして注目されている TMEM119 (Zrzavy T, et al. Brain, 2017) の分布も評価したところ、GLUT5 と類似した空間的分布を呈していることが判明した (図 3 E)。このことから、GLUT5 はレジデントミクログリアで発現し、脱髄病変のなかで急性期に特異的に關与していることが示唆された。

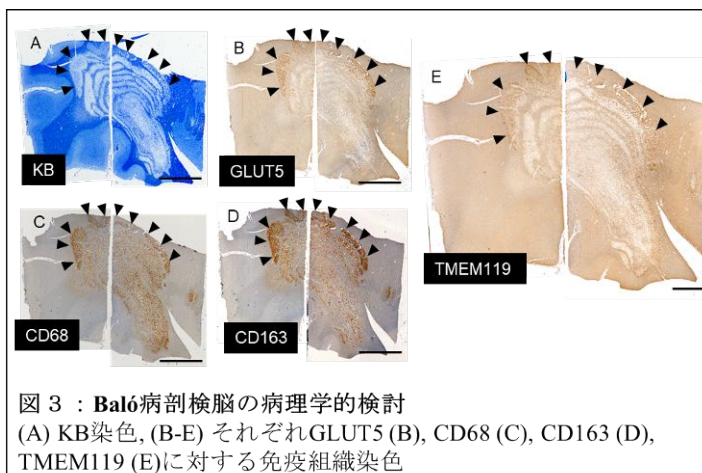


図 3 : Baló 病剖検脳の病理学的検討 (A) KB 染色, (B-E) それぞれ GLUT5 (B), CD68 (C), CD163 (D), TMEM119 (E) に対する免疫組織染色

(2) オリゴデンドロサイト特異的 Cx47 KO マウスに対して EAE を誘導すると、野生型マウスよりも重症化し、これはグリアシンシチウムの破綻による障害による脱髄・軸索障害の増悪という仮説に合致する所見であったが、一方、Cx30 KO マウスや GLAST 発現アストロサイト特異的 Cx43 KO マウスに EAE を誘導すると、対照群より軽症化した。この機序としてはアストロサイトの神経保護的作用の活性化を想定し解析を進めているが、一概にグリアシンシチウムの破綻が直接脱髄や軸索障害の増悪につながるわけではないデータと考えられる。

(3) 軸索障害とグリア細胞の障害の関係性を評価するために、MS 患者および NMOSD 患者の髄液・血清中 NfL および GFAP 濃度を測定した。まず、血清 NfL および GFAP 濃度はそれぞれ髄液中濃度と強い相関を有することを確認し、血清中濃度が中枢神経系の病理学的変化を反映することが示された。さらに MS 患者、NMOSD 患者いずれにおいても NfL および GFAP が疾患障害度と相関するのに対し、MS においては NfL のみが、NMOSD においては GFAP のみが疾患活動性と相関していた (表 1, 2)。NMOSD は抗 AQP4 抗体によるアストロサイト障害が主病態であることが知られているが、今回 NMOSD において MCT4 を発現するアストロサイトの細胞骨格蛋白である GFAP が疾患活動性に依りて変動することが確認された。このことから、GFAP は NMOSD においてアストロサイトの障害を反映する疾患活動性を見るバイオマーカーであると考えられる。

表 1 : MS において血清 GFAP, NfL 値 (単位 : pg/mL) に影響する因子 (多変量解析)

	血清GFAP				血清NfL			
	中央値 (pg/mL)	$\beta_{\text{mult}}$	95% CI	P値	中央値 (pg/mL)	$\beta_{\text{mult}}$	95% CI	P値
年齢	-	1.00	0.98-1.01	0.832	-	0.99	0.98-1.01	0.299
性別 [男性 vs. 女性]	180.9 vs. 111.9	0.94	0.61-1.47	0.795	34.1 vs. 24.6	1.48	0.97-2.25	0.068
EDSS score	-	1.08	1.00-1.15	0.049	-	1.12	1.03-1.21	0.011
病型 [PMS vs. RRMS]	186.4 vs. 111.9	0.98	0.72-1.35	0.913	28.6 vs. 24.6	0.88	0.53-1.47	0.618
2ヶ月以内の再発 [あり vs. なし]	129.8 vs. 112.9	1.16	0.93-1.45	0.190	30.2 vs. 23.8	1.69	1.16-2.47	0.007
MRI上のT2病巣数 [ $\geq 9$ vs. $< 9$ ]	129.6 vs. 106.5	1.48	0.91-2.41	0.112	26.9 vs. 24.2	1.65	1.04-2.62	0.034
治療 (疾患修飾薬) [あり vs. なし]	127.6 vs. 114.8	0.97	0.81-1.17	0.764	23.8 vs. 27.2	0.72	0.53-0.99	0.041

表 2 : NMOSD において血清 GFAP, NfL 値に影響する因子 (多変量解析)

	血清GFAP				血清NfL			
	中央値 (pg/mL)	$\beta_{\text{mult}}$	95% CI	P値	中央値 (pg/mL)	$\beta_{\text{mult}}$	95% CI	P値
年齢	-	0.99	0.96-1.01	0.272	-	1.01	1.00-1.03	0.031
性別 [男性 vs. 女性]	140.8 vs. 225.4	0.73	0.28-1.93	0.518	21.9 vs. 40.8	0.83	0.54-1.27	0.381
EDSS score	-	1.17	1.02-1.35	0.026	-	1.13	1.06-1.21	<.001
2ヶ月以内の再発 [あり vs. なし]	540.9 vs. 152.9	3.34	1.86-6.00	<.001	37.0 vs. 36.5	0.92	0.69-1.24	0.595
治療 (ステロイド/免疫抑制薬) [あり vs. なし]	211.6 vs. 172.9	1.20	0.57-2.54	0.631	37.4 vs. 26.4	0.99	0.68-1.45	0.955

興味深いことに、もともと炎症による神経軸索障害の他に神経変性機序が想定されている MS 患者において、NfL が再発期から寛解期にかけて有意に低下するのに対し、NMOSD 患者での NfL 値には再発期・寛解期に有意な差はなく、再発後の変化が MS に比べ NMOSD の方が有意に遅いことを見出した (図 4)。NMOSD では主病態がアストロサイト障害であることから、アストロサイトが障害されると GLUTs や MCTs を介して栄養供給される神経軸索にも障害が二次的に及び、寛解期に至っても軸索障害が持続することを示しているデータではないかと推察される。

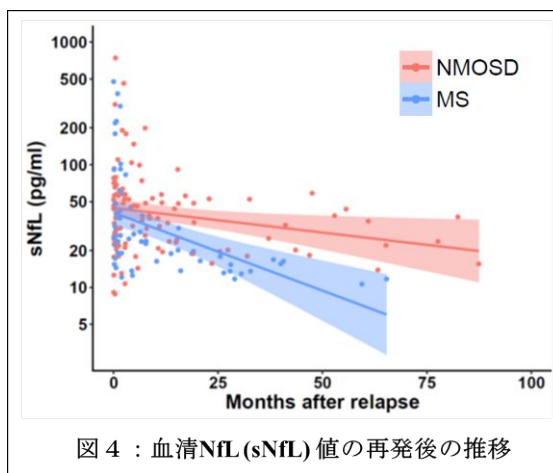


図 4 : 血清 NfL (sNfL) 値の再発後の推移

(4) マウス脳由来の培養アストロサイトを用いて MCT4 の発現を評価したが、発現が見られなかった。またミクログリアを用いて GLUT5 の発現を確認したが、発現変化を評価できるような特異性の高い抗体を見出せず、十分な検討が行えなかった。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1) Watanabe M, Nakamura Y, Michalak Z, Isobe N, Barro C, Leppert D, Matsushita T, Hayashi F, Yamasaki R, Kuhle J, Kira J. Serum GFAP and neurofilament light as biomarkers of disease activity and disability in NMOSD. Neurology (in press [2019 年 6 月時点]). 査読あり

[学会発表](計 3 件)

1) Watanabe M, et al. Serum glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neurofilament light chain (NfL) in neuromyelitis optica spectrum disorders. 34<sup>th</sup> Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS), 2018.

2) Watanabe M, et al. Serum glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neurofilament light chain (NfL) as potential biomarkers for disease activity and disability in neuromyelitis optica spectrum disorders and multiple sclerosis. The 11<sup>th</sup> PACTRIMS Congress, 2018.

3) 渡邊 充ら. 血清 GFAP とニューロフィラメント軽鎖は視神経脊髄炎関連疾患や多発性硬化症の障害度や再発率と相関する. 第 30 回日本神経免疫学会学術集会, 2018.

〔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：なし

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。