

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 3 日現在

機関番号：32206

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22910

研究課題名(和文) グリアコネクシン発現エクソソームによる多発性硬化症の制御と血液バイオマーカー開発

研究課題名(英文) Development of blood novel biomarkers and therapy for multiple sclerosis by using glial connexin-expressing exosome

研究代表者

Maimaitijiang Guzailiayi (Maimaitijiang, Guzailiayi)

国際医療福祉大学・トランスレーショナルニューロサイエンスセンター・特任助教

研究者番号：60887107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症(MS)の再発期と二次進行期で血液アストログリア由来のグリア線維性蛋白を含有するエクソソームが増加していた。コネクシン(Cx)43をコードするGJA1は、酸化ストレスなどで低分子量イソフォームの発現が増える。MSの末梢血では低分子量イソフォームのうち、GJA1-29kが、再発期、寛解期、二次進行期と継時的に増加した。野生型マウス実験的脳脊髄炎(EAE)では末梢血で急性期から慢性進行期にかけてGJA1-29kを発現するエクソソームが著増した。アストログリア特異的Cx43 inducible conditional knockoutマウスのEAEでは、その増加が消失した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性硬化症で二次進行期が起こる理由は不明で、二次進行期バイオマーカーもない。本研究で、MSでは二次進行期に血清中のグリア線維性蛋白とコネクシン低分子量イソフォームGJA1-29kを含有するエクソソームが著増することを発見した。これらの血清エクソソームは、多発性硬化症の新たな二次進行期バイオマーカーとなることが期待され、病期の診断において大きな意義を有する。野生型と脳アストログリア特異的なコネクシン43の inducible conditional knockoutマウスの実験的脳脊髄炎の比較から、GJA1-29kを含有するエクソソームがアストログリア由来のものが多いことを証明できた。

研究成果の概要(英文)：Serum exosome (Ex) connexin (Cx) isoforms were analyzed in multiple sclerosis (MS). MS patients had significantly greater Ex glial fibrillary acidic protein amounts than HC. Ex GJA1-29k was higher in MS than healthy controls (HC). In MS, 29k was highest in secondary progression (SP)>remission>relapse>HC (p<0.001). Wild type (WT) mice showed increase of Ex GJA1-29k upon EAE compared with the pre-immunized state; more pronounced in chronic than acute phase. By contrast, astroglia-specific Cx43 inducible conditional knockout (ickO) mice showed attenuated acute and chronic EAE compared with WT mice, and had no and attenuated increase of 29k at acute and chronic phases, respectively. Splenic regulatory T cells and IL10 production were significantly greater in Cx43 ickO than WT mice upon EAE. Increased circulating Ex GJA1-29k, partly derived from astroglia, is associated with SPMS reflecting progressive astroglialosis, and may propagate pro-inflammatory messages via bound microRNA.

研究分野：神経内科学

キーワード：脱髄疾患 多発性硬化症 エクソソーム コネクシン グリア線維性蛋白 イソフォーム アストログリア マイクロRNA

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、代表的な中枢神経脱髄疾患である。自己免疫機序が想定されているが、責任抗原は未同定で根治療法はない。疾患修飾薬により、再発寛解期の再発はよく抑えられるようになったが、再発寛解型から半数以上が移行する二次進行型や最初から再発なく緩徐に進行する一次進行型では、障害の進行を十分に抑えることができず、最大の問題となっている。MSの障害は、再発ではなく、再発によらない緩徐な障害の進行によることが報告されているが、障害の慢性進行の機序は全く不明である。

オリゴデンドログリアとアストログリアは、グリアコネクシン(connexin, Cx)で細胞間ギャップ結合(gap junction, GJ)を形成してグリアシンシチウムを構成し、それを通じてグルコースや乳酸などのエネルギー源を供給したり、カリウムイオンのバッファリングをしたりすることにより脳の恒常性を維持している。そのみならず、MSモデルの実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)において、私たちはグリアCxが脳炎症を制御する重要な役割を担っていることを報告している。

私たちはMSの剖検脳標本で、広汎なグリアCxの異常を明らかにしている。MSの急性病巣では、アストログリアのGJ蛋白であるコネクシン43(Cx43)やオリゴデンドログリアのGJ蛋白であるCx47やCx32が脱髄範囲を越えて広範に脱落することを報告している。しかも脱落例は早期に重症化して死亡に至っていた。しかし、慢性期にはアストログリオシスを反映してCx43の発現は広汎に亢進し、オリゴデンドログリアのCx47は再髄鞘化が起こっても脱落したままであった。EAEでも急性期には、Cx43は脱髄巣の範囲を越えて広範に脱落し、慢性期にはやはりアストログリオシスを反映してCx43の発現が亢進していた。

Cx43をコードするGJA1は、酸化ストレスに際してN末が短縮したトランスレーショナルイソフォームを産生する。これらはGJチャネル機能を失うが、DNA/RNA結合部位を保持し、microRNA(miR)等を伝搬し転写に作用する。グリアから放出されたエキソソームは、Cx43を含有することが報告されており、これらのエキソソームは血液脳関門を通過できる。そこで、MSやEAEの急性期にはアストログリア障害を反映して、慢性期にはアストログリオシスを反映して、アストログリア由来のCx43及びその低分子イソフォームを含有するエキソソームが、グリア間や血液脳関門を越えて末梢免疫細胞にmiR等を伝搬することで、中枢神経炎症を増悪・進展させるとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MSの様々な病期で血清エキソソーム中のCx43低分子量イソフォームを測定し、MSの増悪との関連を検討し、その病的意義を明らかにすることである。さらに、MSモデルのEAEにおいて、野生型マウスと脱髄炎が軽減する脳アストログリア特異的なCx43 inducible conditional knockout(icKO)マウス(独自作成のGLASTCreERT;Cx43f1/f1マウスにタモキシフェンを投与しEAE誘導前にアストログリア特異的にCx43を脱落させたマウス)において、免疫前とEAEの各病期において血清エキソソームの解析を行い、アストログリア特異的にCx43遺伝子(*GJA1*)をノックアウトした際の影響を明らかにする。

3. 研究の方法

①健常対照(healthy control, HC) 19例、MS 72例(再発寛解型 60例：うち再発時 19例、寛解

期 41 例；二次進行型 12 例）、その他の炎症性神経疾患(other inflammatory neurological diseases, OIND) 20 例の末梢血より血清エクソソームを、Exo-Quick による沈殿法で分離した。

②精製した血清エクソソームから蛋白を抽出し、エクソソームマーカーの CD63 と Cx43 の定量的ウェスタンブロットを行った。なお、抗 Cx43 抗体は C 末を認識し、全ての低分子量イソフォームと反応するものを用いた。

③精製した血清エクソソーム蛋白中の、neurofilament L (NfL、神経軸索障害マーカー)と glial fibrillary acidic protein (GFAP、アストログリアマーカー)を、single molecule array (SIMOA、超高感度デジタル ELISA)法で測定した。

④血清エクソソームより RNA を精製し、RNA シークエンス解析を行った。

⑤上記の血清エクソソーム解析結果と臨床パラメーターとの関連を解析した。

4. 研究成果

1) 血清エクソソーム蛋白の定量的ウェスタンブロット解析では、CD63 量は 3 群間で有意な差を認めなかった。

2) 血清エクソソームの Cx43 ウェスタンブロットでは、全例で GJA1-43k と低分子イソフォームである GJA1-29k、26k、11k が検出された。

3) 血清エクソソーム Cx43 の定量的ウェスタンブロット解析では、GJA1-43k と 26k は 3 群間で有意な差はなかったが、GJA1-29k は MS で HC や OIND より有意に高かった。GJA1-11k は OIND で HC より有意に低かったが、MS では HC と有意な差はなかった。

4) MS の各病期との関連解析では、GJA1-29k は再発期、寛解期、二次進行期と次第に増加した(図 1)。いずれも病期でも HC より有意に高かったが、二次進行期には再発期よりもさらに有意に増加していた。

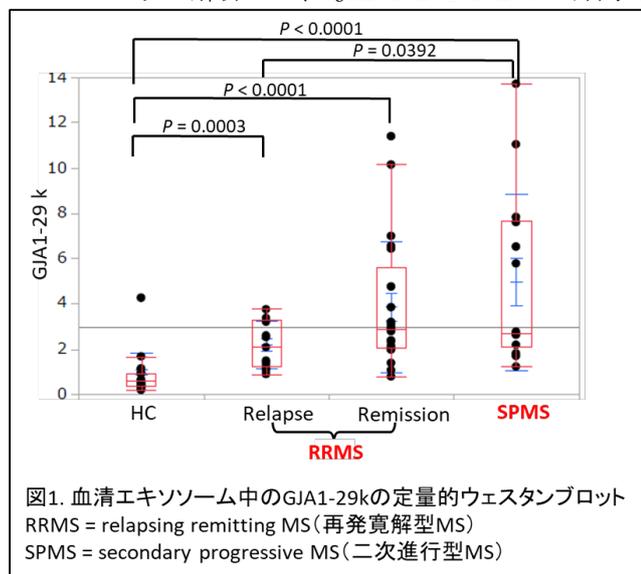


図1. 血清エクソソーム中のGJA1-29kの定量的ウェスタンブロット
RRMS = relapsing remitting MS(再発寛解型MS)
SPMS = secondary progressive MS(二次進行型MS)

5) 野生型マウス EAE では、血清エクソソームの Cx43 の定量的ウェスタンブロット解析で、急性期から慢性進行期にかけて GJA1-29k を発現するエクソソームが著増した。一方、EAE が軽症化するアストログリア特異的 Cx43 icK0 マウスの EAE では、その増加は消失した。

6) 血清エクソソーム蛋白の SIMOA 解析では、MS の再発期と二次進行期で、エクソソーム GFAP が HC より有意に増加したが、エクソソーム NfL の増加はみられたものの有意差には至らなかった。

7) 血清エクソソームの RNA シークエンス解析により二次進行型 MS では健常対照に比して、エクソソーム中の miR301a、 miR324、 miR21、 miR191、 let-7e、 let-7d、 let-7f-1、 let-7f-2 が有意に増加した。

以上より、MS の末梢血では血清エクソソームにおいて、Cx43 の低分子量イソフォームのうち、GJA1-29k が増加し、特に二次進行期において著増することが明らかとなった。野生型マウス EAE では末梢血で急性期から慢性進行期にかけて GJA1-29k を発現する血清エクソソームが著増する一方、アストログリア特異的 Cx43 icKO マウスの EAE では、その増加が消失したことから、MS や EAE の末梢血で増加する血清エクソソーム中の GJA1-29k の多くは、脳アストログリア由来と考えた。Cx43 低分子量イソフォームは、チャネル機能を失うが RNA/DNA 結合部位を保持するので、GJA1-29k は miR を伝搬することで脳炎症の増幅に寄与していると考えた。今後、定量的 PCR 法により、RNA シークエンスで MS で増加していた miR が本当に健常対照より増加しているかを多数例で検討する。これらの有意に増加していることが確認された miR の機能を培養免疫細胞やグリア細胞で検討する予定である。血清エクソソームの GJA1-29k は、MS 二次進行期の新たな血液バイオマーカーとして有用であると結論された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hayashi F, Isobe N, Glanville J, Matsushita T, Maimaitijiang G, Fukumoto S, Watanabe M, Masaki K, Kira J	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 A new clustering method identifies multiple sclerosis-specific T cell receptors.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Clin Transl Neurol	6. 最初と最後の頁 163-176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/acn3.51264	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 該当する

1. 著者名 Matsuse D, Yamasaki R, Maimaitijiang G, Yamaguchi H, Masaki K, Isobe N, Matsushita T, Kira J.	4. 巻 577395
2. 論文標題 Early decrease in intermediate monocytes in peripheral blood is characteristic of multiple system atrophy-cerebellar type	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology,	6. 最初と最後の頁 349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jneuroim.2020.577395	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 Zhang X, Kira J, Ogata H, Imamura T, Mitsuishi M, Fujii T, Kobayashi M, Kitagawa K, Namihira Y, Ohya Y, Maimaitijiang G, Yamasaki R, Fukata Y, Fukata M, Isobe N, Nakamura Y	4. 巻 10(2)
2. 論文標題 Anti-LGI4 antibody is a novel juxtapanodal autoantibody for chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurology Neuroimmunology and Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1212/NXI.000000000200081	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 グザリアイ・ママティジャン, 迫田礼子, 渡邊充, 篠田紘司, 中村優理, 磯部紀子, 松下拓也, 吉良潤一
2. 発表標題 T細胞受容体gamma鎖領域欠失型コピー数変異と多発性硬化症末梢血gamma delta T細胞分画の変化
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Guzailiayi Maimaitijiang, Jun-ichi Kira, Yuri Nakamura, Mitsuru Watanabe, Ayako Sakoda, Katsuhisa Masaki, Satoshi Nagata, Hiroo Yamaguchi, Ryo Yamasaki, Noriko Isobe, Xu Zhang, Tomohiro Imamura
2. 発表標題 Exosomal GJA1-29k translational isoform is a novel blood biomarker for neuroinflammation in neuromyelitis optica.
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 グザリアイ・ママティジャン, 中村優理, 今村友裕, 渡邊充, 迫田礼子, 張旭, 磯部紀子, 吉良潤一
2. 発表標題 エクソソーム中のコネクシン43(Cx43)低分子量イソフォームとグリア線維性酸性蛋白質(GFAP)は視神経脊髄炎(NMOSD)再発の血液バイオマーカーである
3. 学会等名 第12回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 グザリアイ・ママティジャン, 中村優理, 渡邊充, 迫田礼子, 今村友裕, 張旭, 磯部紀子, 吉良潤一
2. 発表標題 視神経脊髄炎(NMOSD)再発時の神経障害と関連する新規血液エクソソーム(Ex)マーカー
3. 学会等名 第34回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村優理, グザリアイ・ママティジャン, 今村友裕, 柳原由記, 岩永育貴, 山下謙一郎, 張旭, 吉良潤一
2. 発表標題 グリアコネクシン低分子量イソフォーム発現エクソソームによる多発性硬化症の増悪機序
3. 学会等名 第12回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------