

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 16日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591090

研究課題名（和文）脱髄性疾患における Claudin ファミリー蛋白に対する自己免疫応答の解析

研究課題名（英文） Analysis of autoimmune response to claudin-family proteins in demyelinating disease.

研究代表者

三野原 元澄（MINOHARA MOTOZUMI）

九州大学・大学病院・特任講師

研究者番号：70398113

研究成果の概要（和文）：血清抗 claudin domain containing 1 (CLDND1) 抗体は健常群に比べ抗アキアポリン4抗体陽性多発性硬化症 (MS) 群での陽性率が有意に高い。また、CLDND1 の発現は中枢神経系の脳梁や内包、白質などの髄鞘の多い場所やニューロンや脳毛細血管周囲にも発現が認められる。また実験的自己免疫性脳脊髄炎や MS の病変では CLDND1 は脱落していた。これらの結果は、CLDND1 が髄鞘におけるタイトジャンクション形成や血液脳関門の形成にも関わるユニークな蛋白質である事を示唆し、さらに CLDND1 に対する自己免疫応答の存在は、血液脳関門の破綻と同時に脱髄を引き起こし、広範な病巣形成に関わることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：To clarify the role of autoimmune response to claudin domain containing 1 (CLDND1) in multiple sclerosis (MS), we measured serum anti-CLDND1 autoantibody in MS patients. We found a significant increase in anti-CLDND1 seropositivity in anti-aquaporin-4 antibody positive MS patients (41.2%) compared with controls (3.2%). CLDND1 was expressed in the myelin, neuron and endothelial cell in the central nervous system. The result of our study suggest that the autoimmune response to CLDND1 is related with demyelination and distraction of BBB in anti-AQP4 antibody positive MS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：claudin、CLDND1、多発性硬化症、実験的自己免疫性脳脊髄炎、ミエリン、血液脳関門、タイトジャンクション

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 病巣の形成には自己免疫機序の関与が考えられている。MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune

encephalomyelitis, EAE) において、myelin basic protein (MBP) や proteolipid protein (PLP)、myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)、oligodendrocyte-specific

protein (OSP)などのミエリン蛋白が EAE 惹起活性を有することが証明され、自己抗原として認知されている。これらミエリン蛋白のうち OSP (claudin-11) は細胞間の tight junction の形成に関わる claudin ファミリー蛋白の一つである。claudin 蛋白は、哺乳類では 20 種類以上が認められており、それぞれの claudin 蛋白は細胞や臓器に特異的に発現する。4 回膜貫通型の膜蛋白で、2 つのループを細胞外に向け claudin 間での会合などを介して細胞膜を密着させる。OSP はオリゴデンドロサイトで特異的に発現しており、本蛋白に対する MS での自己抗体の存在や OSP 反応性 T 細胞応答の報告、並びに感受性のあるマウスに免疫することで EAE を誘導できることが報告されている。

一方、日本人 MS 患者では、視神経や脊髄に病巣が局限する視神経脊髄型 MS (opticospinal MS, OSMS) が多く存在する。近年、neuromyelitis optica (NMO) で発見された抗 aquaporin-4 抗体 (抗 AQP4 抗体) は OSMS の一部でも認められ、AQP4 がアストロサイトのフットプロセスに存在することから、NMO/OSMS はアストロサイトの傷害が一次性であり、脱髄は二次的とする説が提唱されている。しかし、なぜアストロサイトのフットプロセス上の AQP4 分子の障害が、広汎な脱髄や壊死を起こしえるかは全く不明である。

最近、私たちは、claudin domain containing 1 (CLDND1) 蛋白に対する自己抗体が、MS 患者の一部、なかでも抗 AQP4 抗体陽性患者で有意に高率に認められることを発見した (図 1)。さらに、本抗体陽性例は有意に重症度が高く、横断性脊髄炎を有する率も有意に高いことを見出した (図 2)。CLDND1 蛋白の機能は解明されていないが、その発現はヒトにおいては中枢神経系 (central

nervous system, CNS) に局限し、ニューロンとオリゴデンドロサイトにおいて認められることから、CLDND1 は両者の接着に関与していることが示唆されている。そこで、私たちは、NMO や OSMS では CLDND1 に対する液性免疫 (抗 CLDND1 抗体) や細胞性免疫が脱髄に寄与しているという仮説を立てた。

さらに、血液脳関門 (blood brain barrier, BBB) において、血管内皮細胞間の tight junction の形成に関わる分子は、claudin-5 である。Claudin-5 ノックアウトマウスでは、BBB の機能障害のため透過性の亢進がみられる。もし MS において claudin-5 に対する自己免疫応答の亢進 (自己抗体産生や、自己反応性 T 細胞応答の存在) が認められれば、BBB の破綻に関与している可能性が考えられる。

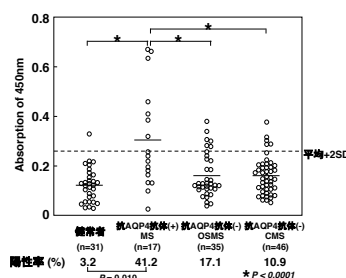


図 1 多発性硬化症における血清抗CLDND1抗体
AQP4: aquaporin-4, MS: multiple sclerosis, OSMS: opticospinal MS, CMS: conventional MS, CLDND1: claudin domain containing 1

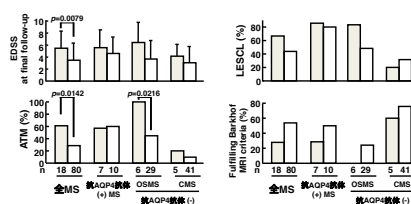


図 2 血清抗CLDND1抗体と臨床像
Anti-CLDND1 (+)
Anti-CLDND1 (-)
AQP4: aquaporin-4, MS: multiple sclerosis, OSMS: opticospinal MS, CMS: conventional MS, CLDND1: claudin domain containing 1, LESCL: longitudinally extensive spinal cord lesion, ATM: acute transverse myelitis

2. 研究の目的

本研究では、CNS に特異的に発現し髄鞘の接着に関与する claudin ファミリー蛋白である CLDND1 に対する自己免疫応答と、中枢神経を侵す脱髄性疾患の発症との関連を明ら

かにすることを目的とする。

3. 研究の方法

正常マウス、ラットの中枢神経組織に対して、下記抗体を用いて免疫染色を行った。抗 CLDND1 抗体、抗 MBP 抗体、抗 OSP/claudin-11 抗体、抗 AQP4 抗体、抗 CD34 抗体。また、SJL/J マウスに PLP ペプチドにより誘導した EAE、および多発性硬化症脱髄病巣に対して同様に免疫染色を施行した。

4. 研究成果

ラットの中枢神経系では、CLDND1 は脳梁や内包、視索、脊髄白質など髄鞘の豊富な場所に発現を認め、MBP や OSP の分布と一致した。脊髄切片において、CLDND1 は OSP と同様に中枢神経系にのみ発現し、末梢神経での発現は認めず、MBP との発現と解離が見られた。一方 CLDND1 はニューロンでの発現も認められた (図 3)。マウスの中枢神経系では、CLDND1 の発現は OSP と同様に髄鞘にそって点状に発現が認められた。また小脳の切片において、白質、並びに血管周囲にも発現が認められた (図 4)。CD34 との二重染色により、CLDND1 は内皮細胞側での発現が示唆された。他の組織では、心筋の一部に淡い発現を認めるのみで、肝臓、腎臓、肺、骨格筋などでの発現は認められなかった。SJL/J マウスを用いた EAE の脱髄病変における CLDND1 の発現は、脱髄巣に一致して発現の低下を認めた。MS 脱髄病変においても、急性期病変、並びに慢性期病変では共に CLDND1 の発現の欠如が認められた (図 5)。以上の結果をまとめると、CLDND1 の発現は、脳梁や内包、視索、脊髄白質など髄鞘が豊富に存在する部位に多く認められ、末梢神経には発現が認められないなど、多くの点で OSP の発現パターンと類似していたが、CLDND1 ではニューロンの細胞質や脳毛細血

管の内皮細胞にも発現が認められた点で異なっている。このことは CLDND1 が髄鞘におけるタイトジャンクション形成のみならず血液脳関門の形成にも関わるユニークな蛋白質である事を示唆している。また、EAE や MS の脱髄病巣では、CLDND1 の発現は MBP や OSP と同様に脱落している。

私どもはこれまでに、MS 患者血清中の抗 CLDND1 抗体を測定し、この自己抗体が MS 患者の一部、なかでも抗 AQP4 抗体陽性患者で高率に認められること、さらに本抗体陽性例は有意に重症度が高く、横断性脊髄炎を有する率も有意に高いことを報告している。CLDND1 の発現パターンが他のミエリン蛋白と異なり髄鞘以外のニューロンや脳毛細血管周囲に発現する。つまり CLDND1 に対する自己免疫応答の存在は脱髄のみならず BBB の破綻にも関連し、その標的部位を拡大させ、より重篤化に寄与しているものと考えられる。本研究により MS における CLDND1 に対する免疫応答の存在と claudin ファミリーの中でもその特異な発現が解明された。

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 9 件)

- 1) Doi H, Matsushita T, Isobe N, Matsuoka T, Minohara M, Ochi H, Kira J: Hypercomplementemia at relapse in patients with anti-aquaporin-4 antibody. *Mult Scler*. 査読有 2009: 15, 304-10
- 2) Matsushita T, Matsuoka T, Isobe N, Kawano Y, Minohara M, Shi N, Nishimura Y, Ochi H, Kira J: Association of the HLA-DPB1*0501 allele with anti-aquaporin-4 antibody positivity in Japanese patients with idiopathic central nervous system demyelinating disorders. *Tissue Antigens*. 査読有 2009: 73, 171-6
- 3) Li W, Minohara M, Piao H, Matsushita T, Masaki K, Matsuoka T, Isobe N, Su JJ, Ohyagi Y, Kira J. Association of

- anti-Helicobacter pylori neutrophil-activating protein antibody response with anti-aquaporin-4 autoimmunity in Japanese patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Mult Scler*, 査読有 2009: 15, 1411-21
- 4) Piao H, Minohara M, Kawamura N, Li W, Mizunoe Y, Umehara F, Goto Y, Kusunoki S, Matsushita T, Ikenaka K, Maejima T, Nabekura J, Yamasaki R, Kira J. Induction of paranodal myelin detachment and sodium channel loss in vivo by *Campylobacter jejuni* DNA-binding protein from starved cells (C-DPS) in myelinated nerve fibers. *J Neurol Sci*, 査読有 2010: 288, 54-62
- 5) Yoshimura S, Ochi H, Isobe N, Matsushita T, Motomura K, Matsuoka T, Minohara M, Kira J. Altered production of brain-derived neurotrophic factor by peripheral blood immune cells in multiple sclerosis. *Mult Scler*, 査読有 2012: 16, 1178-88
- 6) Piao H, Minohara M, Kawamura N, Li W, Matsushita T, Yamasaki R, Mizunoe Y, Kira J. Tissue binding patterns and in vitro effects of *Campylobacter jejuni* DNA-binding protein from starved cells. *Neurochem Res*, 査読有 2011: 36, 58-66
- 7) Pineda AA, Minohara M, Kawamura N, Matsushita T, Yamasaki R, Sun X, Piao H, Shimokawa H, Kira J. Preventive and therapeutic effects of the selective Rho-kinase inhibitor fasudil on experimental autoimmune neuritis. *J Neurol Sci*, 査読有 2011: 309, 115-20
- 8) Kawamura N, Piao H, Minohara M, Matsushita T, Kusunoki S, Matsumoto H, Ikenaka K, Mizunoe Y, Kira J. *Campylobacter jejuni* DNA-binding protein from starved cells in Guillain-Barre syndrome patients. *J Neuroimmunol*, 査読有 2011: 240-241, 74-8
- 9) Yamasaki T, Goto Y, Ohyagi Y, Monji A, Munetsuna S, Minohara M, Minohara K, Kira J, Kanba S, Tobimatsu S. Selective impairment of optic flow perception in amnesic mild cognitive impairment: evidence from event-related potentials. *J Alzheimers Dis*, 査読有 2012: 28, 695-708

[学会発表] (計 6 件)

- 1) 三野原元澄、李巍、松下拓也、松岡健、磯部紀子、吉良潤一；多発性硬化症におけるヘリコバクターピロリ感染の影響：

第 21 回日本神経免疫学会学術集会、2009 年 3 月 (大阪)

- 2) 三野原元澄、李巍、松下拓也、松岡健、磯部紀子、石津尚明、吉良潤一；ヘリコバクターピロリ感染による多発性硬化症の重症化：第 50 回日本神経学会総会、2009 年 5 月 (仙台)
- 3) 真崎勝久、三野原元澄、米川智、磯部紀子、松下拓也、吉良潤一；中枢神経系における CLDN1 の発現と脱髄疾患への関与：第 22 回日本神経免疫学会学術集会、2010 年 3 月 (東京)
- 4) 河村信利、朴華、三野原元澄、楠進、水之江義充、吉良潤一；*C. jejuni* 感染後ギランバレー症候群における C-Dps および抗体反応の検出：第 22 回日本神経免疫学会学術集会、2010 年 3 月 (東京)
- 5) 真崎勝久、三野原元澄、米川智、磯部紀子、松下拓也、吉良潤一；脱髄疾患における CLDN1 の病理学的検討：第 51 回日本神経学会総会、2010 年 5 月 (東京)
- 6) 河村信利、朴華、三野原元澄、楠進、水之江義充、吉良潤一；*C. jejuni* 感染後ギラン・バレー症候群における抗 C-Dps 抗体および C-Dps の検出：第 51 回日本神経学会総会、2010 年 5 月 (東京)

[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

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/neuro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三野原 元澄 (MINOHARA MOTOZMI)
九州大学・大学病院・特任講師
研究者番号：70398113

(2) 研究分担者

松下 拓也 (MATSUSHITA TAKUYA)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：00533001
河村 信利 (KAWAMURA NOBUTOSHI)
九州大学・大学病院・特任講師
研究者番号：00432930

Figure 3 Expression of CLDND1 (rat spinal cord)

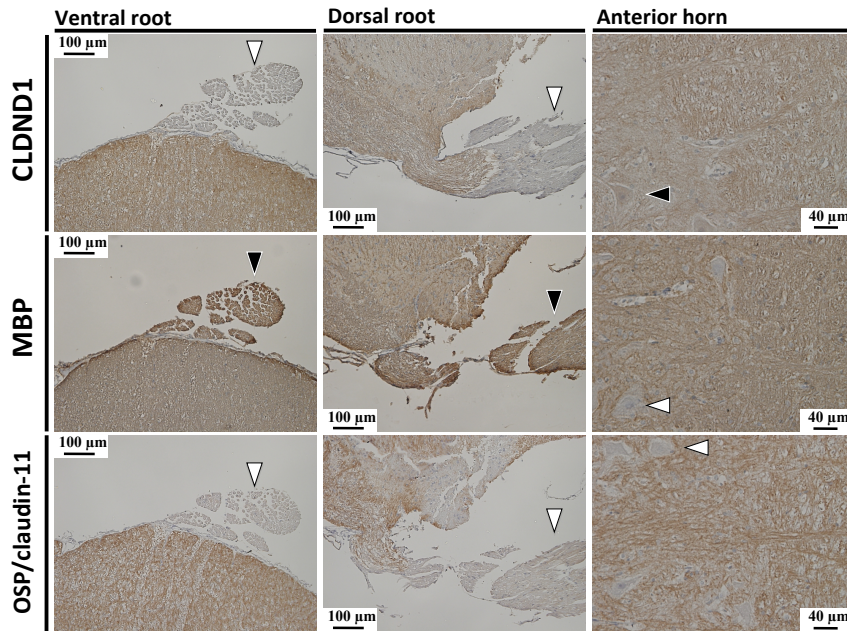


Figure 4 Expression of CLDND1 (mouse cerebellum, spinal cord)

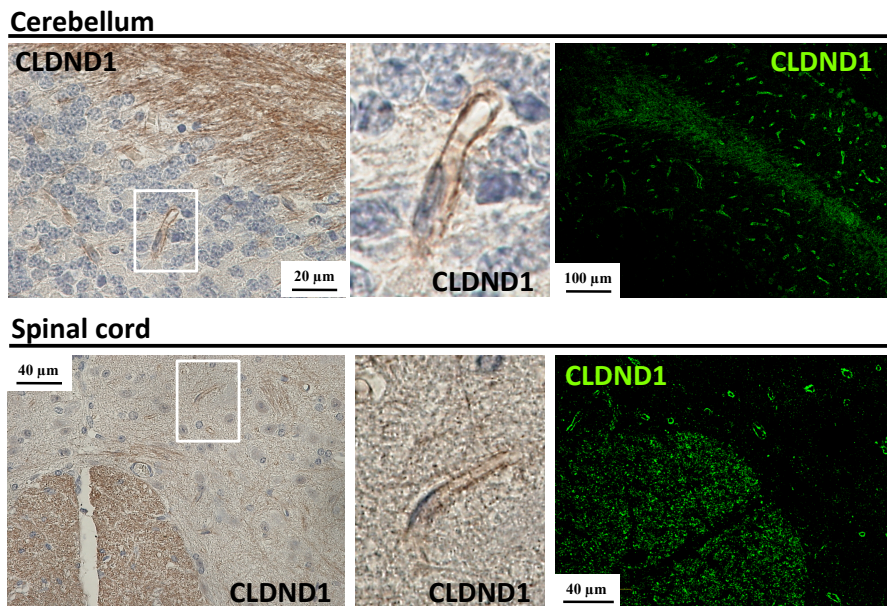


图5 Expression of CLDND1 (MS: D42-A3, acute lesion)

