

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07467

研究課題名(和文) グリアコネクシン低分子量イソフォーム発現エキソソームによる脱髄炎の悪化と治療開発

研究課題名(英文) Exacerbation of demyelination by glia connexin truncated isoform-expressing exosomes and its therapy development

研究代表者

中村 優理 (Nakamura, Yuri)

国際医療福祉大学・福岡薬学部・准教授

研究者番号：40822375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症(MS)ではアストログリアのコネクシン43(Cx43)が急性病巣で脱落し、慢性病巣で発現が亢進する。Cx43をコードするGJA1は、酸化ストレスに際してtruncated isoformを産生しエキソソーム(Ex)に組み込まれるが、その意義は不明である。本研究で、MSでは血清Ex-29kは再発時から寛解期、二次進行期にかけて次第に増加し、二次進行期には障害度と正相関を示した。マウスの実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)時に脳Cx43が脱落するとともに血清Ex-29kが著増した。アストログリア特異的・時限的にCx43遺伝子を欠失させるとEx-29kの増加が消失しEAEが軽症化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MSでは多くの疾患修飾薬が臨床応用され、再発はよく抑えられるようになったが、慢性進行期の重症化を抑制する有効な手段が乏しく、二次進行期を早期に発見できる液バイオマーカーは確立していない。本研究はMS二次進行期に関連した全く新しい炎症性バイオマーカーを発見した意義の大きいものである。血清Ex中のCx43-truncated isoformは、神経炎症の急性期には脳アストログリア由来で、Ex-29kの増加は神経炎症の重症化に寄与していると考えられる。したがって、Ex-29kは病態に関与したバイオマーカーである点で意義が大きい。今後、これらを標的とした二次進行期の治療の道が開かれることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We discovered alterations of connexin 43 (Cx43)-truncated isoforms, which are produced upon stress, in serum exosomes (Ex) from multiple sclerosis (MS) patients. Ex-29k successively increased in relapsing remitting MS (RRMS) at relapse and in remission, and in secondary progressive MS (SPMS). In SPMS, 29k showed a positive correlation with disability scores. Ex-glial fibrillary acidic protein (GFAP) also showed a positive correlation with disability scores in SPMS. We think that Ex-29k and Ex-GFAP are useful markers for SPMS activity, reflecting astroglia inflammation. Serum Ex-29k markedly increased at acute phases in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in wild type mice. Such increase was completely abrogated in astroglia-specific Cx43-inducible conditional knockout mice with attenuated EAE at acute phase. These findings suggest that serum Ex-29k is derived from brain astroglia and confers neuroinflammation. Serum Ex-29k is suggested to be a novel biomarker for SPMS.

研究分野：神経内科学

キーワード：多発性硬化症 脱髄疾患 アストログリア エキソソーム バイオマーカー コネクシン 神経炎症 二次進行型

## 1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症(multiple sclerosis, MS)は、脱髄疾患では最も多い指定難病である。様々な疾患修飾薬が導入されているが、根治療法はない。なかでも secondary progressive MS (SPMS)の障害進行を防止することは難しく、二次進行期に入ったことを示すバイオマーカーも存在しない。

コネキシン(connexin, Cx)は細胞間で gap junction (GJ)チャンネルを形成し、情報・エネルギー伝達を担い恒常性維持に重要な役割を果たしている。私たちは、MS 急性期病巣では脱髄の範囲を超えて広汎にアストログリアの Cx43 やオリゴデンドログリアの Cx47 が脱落すること、慢性期病巣ではアストログリオシスを反映して Cx43 は発現が亢進する一方、髄鞘が再生しても Cx47 は脱落したままであることを報告した。

さらに私たちは、オリゴデンドログリア特異的・時限的に Cx47 を inducible conditional knockout (icKO)すると MS モデルの実験的自己免疫性脳脊髄炎(Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)が重症化することを初めて示した。EAE は脊髄で脱髄炎が高度である一方、脳皮質アストログリアが発症前に活性化することが報告されていたが、その意義は全く不明だった。そこで、私たちは脳皮質アストログリア特異的・時限的に Cx43 遺伝子を喪失できる astroglia-specific Cx43 icKO マウスを樹立し、EAE を誘導したところ、急性期及び慢性期 EAE が著明に軽減した。

Cx43 をコードする GJA1 には異なる開始コドンから始まる translational isoform (truncated isoform)が存在し、低分子量 isoform は低酸素ストレスなどで発現が亢進しチャンネル機能を失うが RNA/DNA 結合部位はある程度保持する。M100 から始まる GJA1-29k は microRNA(miR)等を伝搬し、M281 から始まる GJA1-11k は細胞増殖抑制因子として作用する。Cx43 やこれらの低分子量 isoform は Ex 中に組み込まれ、他の細胞に移入され機能し得る。

Ex は血液脳関門(blood brain barrier, BBB)をフリーに通過することから、私たちは、血液中の GJA1-29k 発現 Ex はアストログリア由来で、中枢神経炎症を増悪させるという全く新しい仮説を立てた。そこで、本研究の学術的な問いは、(1) MS で変動する Cx43 が中枢神経炎症の重症化に果たす役割は何か、(2) その変動には truncated isoform の産生が関わっているか、(3) アストログリア由来の血清 Ex には、Cx43 やその truncated isoform が組み込まれているか、(4) そのような血清 Ex 中の Cx43 truncated isoform は MS の二次進行期を予測するバイオマーカーとして適しているかである。

## 2. 研究の目的

上記仮説に基づいた本研究の目的は、Cx43 低分子量 isoform を発現する Ex が、MS の炎症における役割を解明し、MS の二次進行期の予測マーカーとしての意義を明らかにすることである。具体的には、(1) MS 患者の各病期の血清 Ex 中の Cx43 truncated isoform が MS の急性再発期や二次進行期の重症化診断バイオマーカーとして有用であるかを検討する。(2) 野生型及び Cx43icKO マウス EAE において血清

Ex-GJA1-29k の中枢神経炎症との関連を検討する。

### 3. 研究の方法

本研究では、以下を実施した。

#### (1) MS 患者での血清 Ex の解析

MS 48 例 (relapsing remitting MS (RRMS) の再発期 13 例と寛解期 21 例、SPMS 14 例)、Healthy control (HC) 17 例、Other inflammatory neurological disease (OIND) 20 例から本人同意を得て血液を採取し、血清より濃縮沈殿 (Exo-Quick) 法およびサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 法で、Ex 分画を抽出した。定量的ウェスタンブロット (western blot, WB) 法で CD63 (exosome マーカー)、Cx43 とその translational isoform (低分子量 isoform) を測定した。Ex 含有の neurofilament L (NfL: 神経障害マーカー) と glial fibrillary acidic protein (GFAP: グリアマーカー) を single molecule array (SIMOA) 法で測定した。

#### (2) EAE での血清 Ex の解析

野生型及びアストログリア特異的・時限的に Cx43 を脱落させた astroglia-specific Cx43-inducible conditional knockout (icKO) マウスを myelin oligodendroglia glycoprotein (MOG) peptide35–55 で免疫して EAE を誘導し、免疫前、急性期、慢性期で、上記ヒトと同様に血清 Ex を解析した。また EAE 時の脾臓細胞中の制御性 T 細胞%を計測した。さらに、EAE マウスの血清 IL-10 と、培養脾臓細胞を MOG peptide35–55 で刺激した時の培養上清中の IL-10 を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) MS 患者での血清 Ex の解析

##### (A) Cx43 及び Cx43 truncated isoform の定量的 WB 解析結果

Ex-CD63 量は、MS、OIND、HC の 3 群間で有意な差はなかった。Cx43WB では 43k、29k、26k、11k が全例で検出された。43k、26k、11k は 3 群間で有意な差はなかったが、29k は MS で HC や OIND より有意に高かった。その結果、Ex-29k/11k 比は、MS で HC や OIND より顕著に高値となった。Ex-29k と 29k/11k 比は、再発時に HC より有意に高値となり、寛解期、二次進行期と次第に増加した。Ex-29k は、SPMS で障害度と正相関を示した。以上より、Ex-29k は、MS の再発時に増加し、その後、寛解期から二次進行期にかけてさらに増加することから、アストログリアの急性障害ストレスに加えて持続的なアストログリオーシスを反映し、神経障害に寄与していることが示唆された。

## **(B) Ex 中及び全血清中の NfL、GFAP の SIMOA による解析結果**

NfL も GFAP も全血清値と Ex 中の値が、強い正相関を示した。血清中の全 GFAP の平均 43%、sNfL の平均 12% が Ex 中に存在し、GFAP の方が NfL より有意に Ex 中の分画の割合が高かった。血清 NfL (sNfL) は、MS 全体で HC より有意に上昇し、かつ再発期に増加し SPMS でさらに増加したが、寛解期には有意な増加はなかった。Ex-NfL は MS の急性期にのみ上昇し、急性期の神経軸索障害を反映すると考えられた。sGFAP 及び Ex-GFAP はともに、MS 全体では HC より有意に上昇した。sGFAP は SPMS でのみ有意に上昇した。Ex-GFAP は MS の再発期と SPMS で HC より有意に高かった。したがって、Ex-GFAP は、MS のアストログリアの変化を、sGFAP より鋭敏に反映すると考えた。MS では、sNfL、sGFAP、Ex-GFAP が、障害度と有意な正相関を示した。

## **(C) Ex 中の Cx43 truncated isoform と NfL/GFAP との関連**

HC と OIND では、Ex-43k は sGFAP と有意な正相関を示したが、そのような関連は MS では消失していた。このことは、MS における Ex-43k と sGFAP の正相関の消失は、正常な Cx43 の Ex への取り込み機構が制御されていないことを示唆する。また、RRMS の寛解期では、Ex-29k が sGFAP と有意な正相関を示し、アストログリオシスを反映している可能性が示唆された。

## **(2) EAE での血清 Ex の解析結果**

野生型マウスの EAE に比べて、Cx43 icKO マウスの EAE は急性期及び慢性期で症状が軽減した。野生型マウスでは、急性期から免疫前に比べて有意に Ex-29k が上昇し、慢性期にはさらに増加した。一方、Cx43 icKO マウスでは、急性期の Ex-29k の増加は消失し、慢性期には野生型よりも低いものの増加がみられた。Cx43 icKO マウスでは脾臓リンパ球からの抗炎症性サイトカイン IL-10 産生が亢進し制御性 T 細胞が増加し血清 IL-10 が増加した。したがって、Ex-29k は少なくとも EAE の急性期に増加するものは、脳のアストログリア由来のものが多くと考えられ、それは EAE を増悪させ向炎症性・障害性に作用していることが示唆された。

以上をまとめると、血清 Ex-29k と Ex-29k/11k 比は RRMS の再発期、寛解期、二次進行期(SPMS)と次第に上昇し、SPMS では障害度と正相関を示すことから、SPMS の新しい神経炎症マーカーと考えられる。加えて Ex-GFAP は、SPMS で上昇し障害度と正相関する SPMS のバイオマーカーといえる。EAE での検討結果から、血清 Ex 中の Cx43-truncated isoform は、神経炎症の急性期には脳アストログリア由来で、Ex-29k の増加は神経炎症の重症化に寄与していると考えられ

る。したがって、Ex-29k は SPMS の病態に関与したバイオマーカーである点で意義が大きい。今後、これらを標的とした二次進行期の治療の道が開かれることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

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 juxtaparaneuronal 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 -

1. 著者名 Watanabe M, Nakamura Y, Sato S, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 HLA genotype-clinical phenotype correlations in multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorders based on Japan MS/NMOSD Biobank data.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 607
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79833-7	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

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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 グリアコネキ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

1. 発表者名 中村優理, 迫田礼子, 柳原由記, 岩永育貴, 山下謙一郎, 飛松省三, 吉良潤一
2. 発表標題 SARS-CoV-2ワクチン接種後に再発した視神経脊髄炎関連疾患の一例
3. 学会等名 第235回日本神経学会九州地方会
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 Jun-ichi Kira, Ayako Sakoda, Yoshie Yamato, Yuki Yanagihara, Ban-yu Saitoh, Yasutaka Iwanaga, Kenichiro Yamashita, Guzailiyi Maimaitijiang, Tomohiro Imamura, Xu Zhang, Shozo Tobimatsu, Yuri Nakamura
2. 発表標題 Foot-dorsiflexion power on the dominant hand side is useful to predict multiple sclerosis disability
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 Guzailiyi 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 中村優理, 迫田礼子, 柳原由記, 岩永育貴, 山下謙一郎, 飛松省三, 吉良潤一
2. 発表標題 SARS-CoV-2ワクチン接種後に再発した視神経脊髄炎関連疾患の一例
3. 学会等名 第235回日本神経学会九州地方会
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
研究分担者	山崎 亮 (Yamasaki Ryo)  (10467946)	九州大学・医学研究院・准教授  (17102)	
研究分担者	今村 友裕 (Imamura Tomohiro)  (30725122)	国際医療福祉大学・福岡薬学部・講師  (32206)	
研究分担者	渡邊 充 (Watanabe Mitsuru)  (30748009)	九州大学・大学病院・助教  (17102)	
研究分担者	吉良 潤一 (Kira Junichi)  (40183305)	国際医療福祉大学・福岡薬学部・教授  (32206)	
研究分担者	M a i m a i t i j i a n g G u z a i l i a y i (Maimaitijiang Guzailiayi)  (60887107)	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  (32206)	
研究分担者	真崎 勝久 (Masaki Katsuhisa)  (90612903)	九州大学・大学病院・講師  (17102)	

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