

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15717

研究課題名(和文) グリオゾームを介する視神経脊髄炎増悪機構の解明と再発重症化予測バイオマーカー開発

研究課題名(英文) elucidation of mechanism of exacerbation in neuromyelitis optica and development of biomarkers that predict relapse severity

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リサーチセンター・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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：視神経脊髄炎(NMO)では、健常対照(HC)に比し血清エキソソームのconnexin 43 isoformのGJA1-29kが急性再発期に著増する一方、GJA1-11kが再発期・寛解期を通じて有意に低下することを発見した。29k/11k比は再発期に著増し障害度と有意な正相関を示した。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エキソソームGJA1-29kが著増すること、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GJA1-29kの増加が消失しEAEが軽症化した。以上より血清エキソソームの29k/11k比はNMO再発の新炎症バイオマーカーである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NMOでは分子標的療法が臨床応用され、再発はよく抑えられるようになったが、急性期の重症化を軽減する有効な手段が乏しく、再発重症化の血液バイオマーカーは確立していない。本研究はNMO急性期の重症度に関係した全く新しい炎症性バイオマーカーを発見した価値あるものである。血清エキソソーム中の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、GJA1-29kの増加は神経炎症の重症化に、GJA1-11kは神経炎症の軽減に寄与していると考えられ、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。将来は、これらを標的とした急性期治療へ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 marked alterations of connexin 43 (Cx43)-truncated isoforms, which are produced upon stress, in serum exosomes from patients with neuromyelitis optica (NMO). At relapse, exosome GJA1-29 significantly elevated as compared with healthy controls (HCs) while exosome GJA1-11k significantly decreased at relapse and in remission compared with HCs. As a result, exosome 29k/11k ratio markedly increased at relapse compared with HCs and showed a positive correlation with disability in NMO. Serum exosome GJA1-29k 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 exosome GJA1-29k is derived from central nervous system astroglia and confers neuroinflammation. Therefore, serum GJA1-29k/11k ratio is suggested to be a novel biomarker for NMO exacerbation at relapse.

研究分野：神経内科学

キーワード：視神経脊髄炎 脱髄疾患 アストログリア エキソソーム バイオマーカー コネキシン 神経炎症 重症化

1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎(neuromyelitis optica, NMO)は、重篤な視神経と脊髄の障害をきたす炎症性疾患で、障害は再発重症度により決まる。再発はモノクローナル抗体製剤によりよく抑えられるようになったが、髄膜炎菌性髄膜炎や侵襲性肺炎球菌感染症など死亡に至る重大な副作用を呈することがある上、年間 2000 万から 6000 万円に及ぶ超高額な薬剤費が大きな課題である。NMO は全盲(両側視神経炎)や横断性脊髄炎(長大脊髄病巣)を呈する重症例が存在する一方、軽症例やステロイドでコントロール可能な例も多い。そのため抗体製剤をどの NMO 患者に用いたらよいかを判定できる安全で反復測定可能な再発重症化予測バイオマーカーの開発が強く望まれている。

一方、私たちは、剖検標本の免疫染色により NMO 病巣では最初期から血管周囲アストログリア足突起の AQP4 とともに細胞膜上の Cx43 が失われ、その脱落が重症度と相関することを報告した(Masaki K, et al., PLOS ONE, 2013; Hayashida S, et al., Brain Pathology, 2020)。私たちは実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)でも急性期病巣で Cx43 が喪失することを明らかにしている(Zhao Y, Yamasaki R, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2020)が、この脱落する Cx43 が中枢神経炎症の重症化にどのような役割果たすかは全く不明である。

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、エキソソーム(exosome, Ex)中に組み込まれ、他の細胞に移入され機能し得る。

そこで、本研究の学術的な問いは、(1) NMO で早期から脱落する Cx43 が中枢神経炎症の重症化に果たす役割は何か、(2) その脱落は truncated isoform の産生によるものか、(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 NMO の再発重症化予測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

Ex は血液脳関門(blood brain barrier, BBB)をフリーに通過することから、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。この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、NMO の炎症を増幅する機序を解明し、NMO の再発重症化予測マーカーとして確立することである。

具体的には、(1) AQP4-IgG 陽性 NMO 患者血清 Ex 中の Cx43 truncated isoform が NMO の急性期の重症化や再発予測診断バイオマーカーとして有用であるかを明らか

にする。(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明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、以下を実施した。

(1) NMO 患者での血清 Ex の解析

NMO 35 例(再発期 15 例、寛解期 20 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。

4. 研究成果

(1) NMO 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、NMO、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 と 26k は 3 群間で有意な差はなかったが、29k は NMO で HC や OIND より有意に高く、11k は NMOSD と OIND で HC より有意に低かった。その結果、Ex-29k/11k 比は、NMO で HC や OIND より顕著に高値となった。Ex-29k は再発時に寛解期より有意に高かったが、11k は再発時に顕著に低下し、寛解期には部分的に回復したが、それでも HC より有意に低下していた。NMO では、11k は再発時の総合障害度(EDSS)の悪化と有意な負相関を示した。29k/11k 比は、再発時に顕著に上昇し、寛解期には減少したが、HC より有意に高値だった。29k/11k 比は再発時の EDSS スコアと正相関を示した。

以上より、Ex-11k は、NMO の再発時に顕著に低下し障害度と負相関を示すことから防御的な因子と考えられた。寛解期には部分的に回復するが、HC と比べると十分ではない。11k は Ex に含まれ、他の細胞に移入されて核内へ移行し細

胞増殖を抑制する。したがって、リンパ球など免疫細胞の増殖を抑えて防御的に作用していることが示唆された。一方、Ex-29k は再発期に上昇するため、Ex-29k/11k 比は、NMO 再発期に著明に高値となり障害度と正相関を示すことから、NMO の再発期の障害度マーカーとして有用と考えられる。

(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、高度の正相関を示した。血清中の全 GFAP の $43\pm 12\%$ 、sNfL の $12\pm 4\%$ 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、NMO の再発期と寛解期で HC より有意に上昇した。Ex-NfL は再発時にのみ HC より有意に高かった。sGFAP は NMO 全体では HC と有意な差はなかったが、NMO の再発期では HC より有意に高かった。Ex-GFAP は NMO 再発時のみならず寛解期にも HC より有意に上昇していた。NMO の再発期では、Ex-NfL と Ex-GFAP は、EDSS の悪化と正相関を示した。したがって、GFAP は Ex 中に NfL より多く含まれ、NMO の再発期のアストログリア障害に関連したマーカーといえる。また慢性期の Ex-GFAP の上昇は、慢性に続くアストログリア障害を、sGFAP より鋭敏に反映していると考えられる。Ex-NfL は NMO の急性期にのみ増加することから、NMO の急性の神経軸索障害をよりよく反映すると考えられた。

(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 NMO では消失していた。NMO では再発期に 11k は Ex-NfL と有意な負相関を示した。一方、NMO の寛解期では、11k は Ex-GFAP 及び sGFAP と有意な正相関を示した。NMO における Ex-43k と sGFAP の正相関の消失は、正常な Cx 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。NMO 再発期に Ex-11k が Ex-NfL と有意な負相関を示すことから 11k の防御的な機能の破綻が示唆される。また NMO 寛解期に、Ex-11k が Ex-GFAP と強い正相関を示すことは、アストログリアの回復を反映している可能性がある。

(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。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いと考えられ、それは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/11k 比と Ex-GFAP、Ex-NfL は NMOSD 再発時に上昇し、障害度と正相関するバイオマーカーである。Ex-11k は、NMO 急性期に低下する保護的な因子、Ex-29k は NMO 急性期に増加する増悪因子であることが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1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-LG14 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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

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, 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 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キシン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

〔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
---------	---------