

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591247

研究課題名(和文) PKCeta多型からみた視神経脊髄炎・多発性硬化症への炎症性マクロファージの関与

研究課題名(英文) Macrophage function and polymorphism of PKCeta in neuromyelitis optica and multiple sclerosis

研究代表者

松下 拓也 (Matsushita, Takuya)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00533001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：PKCeta多型(rs2230500)は多発性硬化症(multiple sclerosis, MS)および視神経脊髄炎(neuromyelitis optica, NMO)のリスク因子ではなく、臨床経過との関連も認められなかったが、末梢血単球の機能分類では、無治療MSにおいてrs2230500-AA or GA群はGG群と比較してCX3CR1陽性細胞の割合が高く、髄液サイトカイン・ケモカイン測定では寛解期MSおよび一次進行型MSにおいてCXCL8濃度がrs2230500-AA or GA群で有意に高かった。多型間でのマクロファージ・ミクログリア機能の差異が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Polymorphism of PKCeta (rs2230500) was not risk allele or disease modulation factor for multiple sclerosis (MS) or neuromyelitis optica (NMO). However, a ratio of CX3CR1 positive monocytes was increased in rs2230500-A positive group of MS without therapy than in the allele-negative group. From a measurement of cytokines/chemokines of CSF revealed that CXCL8 was increased in rs2230500-A positive group of MS at remission phase and primary progressive MS than in the allele-negative group. These findings suggest differences of function of macrophages or microglia between PKCeta polymorphisms.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：多発性硬化症 視神経脊髄炎 マクロファージ PRKCH

1. 研究開始当初の背景

アジア人種の多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) は欧米白人に比し視神経と脊髄の障害が高度である点と、大脳・小脳病巣が著しく少ない点が大きな特徴である。このため、アジア人種の MS は視神経と脊髄を選択的に侵す視神経脊髄型 (opticospinal MS, OSMS) と大脳や小脳も含めて多巣性に中枢神経系を侵す通常型 (conventional MS, CMS) の 2 型に大別されてきた。しかし、OSMS で視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica, NMO) に特異的に出現するとされる NMO-IgG (抗 AQP4 抗体) が 30~70% で検出されることから、OSMS は NMO と同一であり MS とは異なる病態と考えられるようになった。NMO 病巣では、アストロサイトの AQP4 や GFAP が脱落し、血管周囲性に抗体や補体の沈着が見られることから、NMO は補体を活性化する抗 AQP4 抗体依存性にアストロサイトが障害されるのが第一義的とされる。

私たちは、最近、MS の最重症亜型の一つである Baló 病の同心円状脱髄巣で脱髄層、非脱髄層ともに広汎にアストロサイトの AQP4 が脱落していることを報告した (Matsuoka et al, Acta Neuropathol, 2010)。さらに AQP4 以外にもコネキシン 43 などのアストロサイトのグリア間相互作用に重要な分子の発現も著明に低下することを見出している。Baló 病巣では血管周囲性の抗体や補体の沈着はなく、マクロファージや活性化ミクログリアの高度の浸潤がみられる。そこで、私たちは、抗体非依存性のアストロサイトパッチが脱髄に先行し、グリア間相互作用の破綻を通じて脱髄にいたるとの仮説を提唱している。同様な同心円状脱髄巣は、典型的な MS で発症した例でも NMO 例でも認められることがあり、同様な抗体非依存性のアストロサイトパッチは広く中枢脱髄性疾患で共通した機序と考えられる。ここでは、マ

クロファージ・活性化ミクログリアの浸潤が先行してみられることから、マクロファージやミクログリアの炎症機能が抗体非依存性アストロサイトパッチのトリガーとして重要と考えた。

近年、日本人、中国人において、PKC η のリン酸化活性を促進する *PRKCH*1425G/A SNP (V374I) 多型がラクナ梗塞の発症リスクであることが示された (Kubo et al, Nat Genet, 2007. Chen et al, Neurosci Lett, 2009)。この多型は白人、黒人では極めて稀で、アジア人に特徴的な多型の一つである。また興味深いことに *PRKCH* 多型は慢性関節リウマチの感受性因子であることも報告されている (Takata et al, Arthritis Rheum, 2007)。*PRKCH* がコードする PKC η は、ヒトではマクロファージやリンパ球に発現がみられる。PKC η 欠損マウスでは、動脈硬化巣へのマクロファージの浸潤が著明に減少し脳梗塞が著しく軽減する。以上より、PKC η 活性は炎症性マクロファージ機能の亢進に寄与すると考えられる。

2. 研究の目的

アジア人種の MS や NMO で病巣へのマクロファージや活性化ミクログリアの浸潤が高度である理由は明らかではない。さらに、アジア人の MS で視神経と脊髄の障害が高度である理由あるいは NMO がアジア人に多い理由は全く不明のままである。この点に関して、アジア人に多い PKC η の多型で炎症性マクロファージ機能を高める 1425G/A SNP (V374I, rs2230500) 多型が、日本人の NMO や MS の疾患感受性遺伝子となっている可能性を考えた。そこで、本研究では PKC η 多型と単球系細胞サブセットの日本人 NMO、MS 病態への寄与を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 対象群の収集と群分け

当科で集積し経過観察中の中枢脱髄性疾

患者を対象に高感度の AQP4 抗体測定 (M23 分子を用いたフローサイトメトリー法と免疫組織染色法による二重確認) を実施。NMO 群 (AQP4 抗体陽性だが NMO 基準を満たしていない NMO spectrum disorders (NMOSD) 例も含める) と McDonald 診断基準を満たす MS 群に群分けし、以降の解析はこの群分けを固定して実施する。

2) *PRKCH* 遺伝子多型の確定

上記対象患者と健常対照者において *PRKCH* の一塩基多型 (rs61740172、rs2230500、rs2230501) を PCR direct sequencing により確定、日本人 MS、NMO と同多型との関連を統計学的に解析する。

3) 末梢血単球系サブセットの評価

上記対象例の単球系のサブセットの比率を評価するため、表面抗原 (CD14、CD16、CD64、CXCR1、CCR2、CD62L) に対する抗体を用い、フローサイトメトリー法により測定する。これらマクロファージの機能的なバランスと *PRKCH* 遺伝子多型との関連を明らかにする。

4) 脱髄性疾患髄液の収集とサイトカイン・ケモカイン測定

対象の髄液を収集し、まとまった数に達した段階で対照群 (非炎症性神経疾患患者) とともに一括して蛍光ビーズサスペンションアレイ法で測定する。37 種のサイトカイン/ケモカインの疾患群間での差異を明らかにするとともに、*PRKCH* 遺伝子多型との関連性について検討する。

4. 研究成果

1) *PRKCH* 遺伝子多型のリスク

96 例の MS、52 例の NMO/NMOSD、151 例の健常者群を対象として、rs2230500 の多型を確定した。同多型と MS、NMO/NMOSD との関連を解析したが、いずれも有意な関連は認められなかった。また、重症度、髄液所見、画像所見との関連も解析したが、いずれの疾患でも有

意な関連は認められなかった。これらの解析結果については英文査読誌に発表した (Clinical and Experimental Neuroimmunology 4 (2013) 283–287)。

2) MS、NMO における単球系サブセットの比較

CD14、CD16 の発現パターンにより単球は 3 つのサブタイプに分類されている (CD14+CD16⁻: classical type、CD14+CD16⁺: intermediate type、CD14^{low}CD16⁺: non-classical type) これらのサブタイプ毎に、さらに表面抗原として CD64、CXCR1、CCR2 および CD62L の発現を確認し、寛解期の多発性硬化症 19 例、NMOS/NMOSD 10 例、健常者群 42 例と比較した。

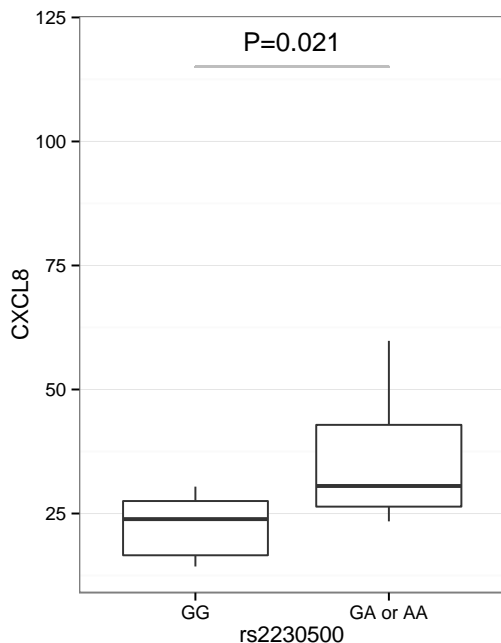
この結果 MS では classical type monocyte において、interferon β 治療の有無にかかわらず CCR2 発現が低下していることが明らかとなった。また MS interferon β 治療群で CXCR1 の発現はすべてのサブタイプで低下していたが、NMO/NMOSD についてプレドニゾロン治療群の classical type でのみ有意な差が見られた。NMO/NMOSD プレドニゾロン治療群では intermediate monocytes、non-classical monocytes、CD64+ intermediate monocytes の割合が健常者群と比較して低下していた。

rs2230500 との関係では無治療 MS において rs2230500-AA or GA 群は GG 群と比較して classical および intermediate type の CX3CR1 陽性細胞の割合が高かった。また、rs230500-GG 群の classical type の割合は健常者群と比較して低下していた。

結果については英文査読誌に報告した (Clinical and Experimental Neuroimmunology 4 (2013) 201–205)。

3) 髄液中ケモカイン・サイトカインの比較

寛解期 MS10 例、8 例の一次進行型 MS8 例を対象として 37 種のサイトカイン/ケモカインを測定、うち 12 種のサイトカイン/ケモカインが統計的に処理可能であり解析対象となった。18 例を rs230500-AA or GA 群 8 例と GG 群 10 例で比較した場合、CXCL8 が GA or AA 群において高い値を示した。



4) まとめ

PRKCH の多型は MS、NMO のリスクではなく、また臨床経過にも関連はなかったが、末梢血単球の機能的区分と髄液中 CXCL8 の濃度に多型間で差異が見られた。CXCL8 は好中球の走化性因子であり、炎症を惹起しやすい環境にあるとも言える。症例数を増やせば PRKCH 多型は臨床経過を修飾する因子であることが、明らかになるかもしれない。

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 2 件)

1. Kawano Y, Matsushita T, Cui YW, Isobe N, Yoshimura S, Yonekawa T, Masaki K, Yamasaki R, Murai H, Kira J-I. Protein kinase C η polymorphism rs2230500 does not

confer disease susceptibility to multiple sclerosis or neuromyelitis optica. Clin Exp Neuroimmunol. 2013;4(3):283-7.

2. Cui YW, Kawano Y, Shi N, Masaki K, Isobe N, Yonekawa T, Matsushita T, Tateishi T, Yamasaki R, Murai H. Alterations in chemokine receptor expressions on peripheral blood monocytes in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. Clin Exp Neuroimmunol. 2013;4(2):201-5.
3. Matsushita T, Tateishi T, Isobe N, Yonekawa T, Yamasaki R, Matsuse D, Murai H, Kira J-I. Characteristic cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in neuromyelitis optica, relapsing remitting or primary progressive multiple sclerosis. PLoS ONE. 2013;8(4):e61835.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Cui YW, Masaki K, Yamasaki R, Tateishi T, Matsushita T, Shi N, Ohyagi Y, Kira J : Dysregulation of surface marker expressions on peripheral monocytes in multiple sclerosis. PACTRIMS, Beijing, 2012.9.13 ~ 15.
2. Cui YW, Kawano Y, Shi N, Masaki K, Isobe N, Yonekawa T, Matsushita T, Tateishi T, Yamasaki R, Kira J: Cytokine receptor expressions in monocyte subsets in multiple sclerosis, neuromyelitis optica, and amyotrophic lateral sclerosis. PACTRIMS, Kyoto, 2013.11.6~8

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松下 拓也 (MATSUSHITA, Takuya)
九州大学大学院医学研究院神経内科学・学術研究員
研究者番号 : 00533001

(2)研究分担者

吉村 怜 (YOSHIMURA, Satoshi)
九州大学大学院医学研究院神経内科学・共同研究員
研究者番号 : 20596390