

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：17102
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659459
 研究課題名（和文） コネキシン・アストロサイトパチーによる同心円硬化症・多発性硬化症の脱髄機序
 研究課題名（英文） Connexin astrocytopathy in the pathogenesis of demyelination in concentric sclerosis and multiple sclerosis
 研究代表者
 吉良 潤一（KIRA JUN-ICHI）
 九州大学・医学研究院・教授
 研究者番号：40183305

研究成果の概要（和文）：多発性硬化症、視神経脊髄炎、Baló 病を含む脱髄性疾患において、connexin (Cx) 蛋白を中心にアストロサイト障害と脱髄の神経病理学的検討を行った。急性期から aquaporin-4 (AQP4) と Cx43 脱落を特徴とするアストロサイトパチーや、myelin-associated glycoprotein (MAG) 脱落を特徴とする脱髄が共通に生じており、Cx を介するアストロサイト - オリゴデンドロサイト間情報伝達の広汎な障害が病態に関与している可能性が示唆された。今後は、脱髄性疾患における Cx を標的とした新規治療法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：To investigate the relationship between astrocytopathy and demyelination, we examined the expression of connexins (Cx). We pathologically evaluated the expressions of astrocytic Cx43/Cx30 and oligodendroglial Cx47/Cx32 among autopsied cases with demyelinating disorders. In Baló's disease (BD), Cx43, Cx32 and Cx47 were extensively diminished. In the leading edge of Baló's lesions, Cx43 and AQP4 loss preceded Cx47 loss. Three cases with multiple sclerosis (MS) and six with neuromyelitis optica (NMO) showed preferential Cx43 and AQP4 loss far beyond the demyelinated areas, while vasocentric deposition of immunoglobulins or complements was observed in four of the six NMO cases. Some NMO cases showed preferential myelin-associated glycoprotein (MAG) loss in AQP4- and Cx43-diminished active lesions. Our findings indicate that disruption of Cx gap junction and preferential MAG loss could occur in MS, BD and NMO, and could be a common denominator. Inhibition of Cx hemichannels is a possible therapeutic target for demyelinating disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：コネキシン、多発性硬化症、視神経脊髄炎、Baló 病

1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎(Neuromyelitis optica: NMO)

病巣では AQP4 や glial fibrillary acidic protein (GFAP) の発現が低下し、血管周囲性に抗体や補体の沈着がみられることから、抗 AQP4 抗体が補体を結合してアストロサイトを破壊することが NMO の一次的な機序と提唱されている。最近、MS のみならず NMO 例でも Baló 病様の同心円状の脱髄巣がみられることが報告されたため、私たちは Baló 病剖検脳病巣での AQP4 発現を検討した。その結果、Baló 病では脱髄層も非脱髄層も含めて広汎に AQP4 の発現が低下していることを見出した (Matsuoka et al, Acta Neuropathol 2010)。Baló 病ではアストロサイトにおける GFAP の発現は保たれており、免疫グロブリンや活性化補体の沈着も認めず、血清抗 AQP4 抗体も陰性であることから、Baló 病は NMO とは異なり、抗 AQP4 抗体非依存性のアストロサイトパチーであることを明らかにした。さらに、日本人 MS 患者脊髄の同心円状脱髄巣や NMO 例の脱髄巣の一部でも、やはり抗体や補体の沈着なくアストロサイトの AQP4 が広汎に脱落していることを発見した。即ち、抗 AQP4 抗体非依存性アストロサイトパチーは中枢神経脱髄性疾患で広く認められ、脱髄機転に大きく寄与している可能性があると考えた。

その脱髄機転として、アストロサイトーアストロサイト間、アストロサイトーオリゴデンドロサイト間の形態的・機能的相互作用に重要な役割を担っている Cx 蛋白の障害に着目した。私たちは、Baló 病をはじめとするヒト中枢性脱髄疾患ではオリゴデンドロサイトやアストロサイトに発現する Cx 蛋白ファミリーの破綻が脱髄の形成に重要な役割を果たすという新しい仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、Baló 病、MS、NMO 患者の剖検脳脊髄標本を用いて、Cx30、Cx32、Cx43、Cx47 の発現パターンを免疫組織化学的に評

価する。

3. 研究の方法

MS6 例(1 例は Marburg 型 MS)、NMO11 例(1 例は抗 AQP4 抗体陽性例、1 例は NMO spectrum disorder)、Baló 病 4 例の剖検標本を使用し、免疫組織化学染色を施行した。アストロサイトに関連する蛋白として AQP4、GFAP、Cx43、Cx30、megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cyst1 (MLC1) を対象抗原として染色、一方で脱髄評価としてオリゴデンドロサイトに関連する Cx32、Cx47、ミエリン関連糖蛋白 (MAG)、ミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白 (MOG)、オリゴデンドロサイト特異蛋白 (OSP)、ミエリン塩基性蛋白 (MBP)、Nogo-A を免疫染色した。CD68 陽性マクロファージを指標とした炎症の時期と上記蛋白発現のパターンについて疾患毎に比較を行った。

また、ヒト Cx 遺伝子 (Cx32、Cx43) と GFP 遺伝子の融合遺伝子ベクターを作製し、HEK293 細胞にリポフェクション法により遺伝子導入した。Cx と GFP の融合蛋白を強制発現させた HEK293 細胞に対して、患者血清を反応させ、間接蛍光抗体法により検出した。二次抗体に抗ヒト IgG 抗体を用いることで、患者血清中に抗 Cx 抗体が存在するかを測定した。

4. 研究成果

Baló 病の広汎な病巣においては GFAP や MLC1 陽性反応性アストロサイトは多数残存していたが、一方で Cx43 の染色性は明らかに低下していた (図 1)。またオリゴデンドロサイトやミエリンに発現する Cx32 および Cx47 の染色性も低下していた。Cx43、Cx32、Cx47 の発現は Baló 病の脱髄層、非脱髄巣ともに低下していた。Baló 病巣の辺縁部においてはオリゴデンドロサイト/ミエリンの特異

的蛋白である MOG、OSP、Cx32、Cx47 の染色性およびアストロサイト特異的蛋白である GFAP の染色性は保たれる一方で、Cx43 と AQP4、MAG の染色性は顕著に低下していた。また 6 例の Baló 病患者血清中において AQP4 および Cx43、Cx32 に対する自己抗体は確認されなかった。

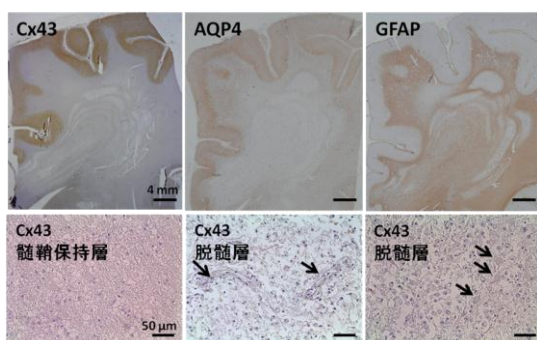


図1 Baló病巣における広範なCx43脱落
(矢印:血管周囲やアストロサイトのCx43は脱落)

MS3 例の急性期病巣でも AQP4 や Cx43 の発現は低下し、GFAP 陽性アストロサイトは残存していた。AQP4 は病巣内で斑状に脱落しており、一部の反応性アストロサイトでは発現が亢進していたが、Cx43 はよりびまん性に発現低下が認められた (図 2)。Marburg 型 MS の病巣内には Creutzfeldt astrocyte を多数認め、AQP4 の発現は細胞膜上で亢進しており、Cx43 の発現は認めないことを見出した。

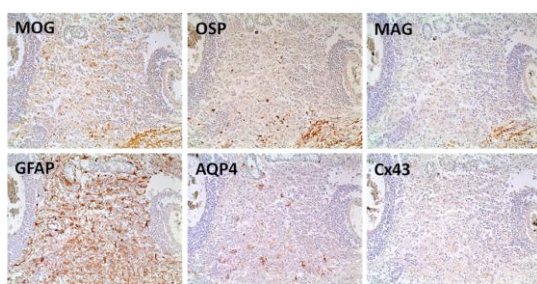


図2 急性期MS病巣における広範なCx43脱落
(GFAP陽性アストロサイトは残存、AQP4は斑状に脱落)

NMO6 例では、血管周囲性に AQP4 や Cx43 が脱落するアストロサイトパチーを認め、GFAP 陽性アストロサイトは高度に変性していた(図 3)。うち NMO4 例では、アストロサイトパチーを認める血管周囲性に免疫グロブリンや補体沈着が認められた。一方、実質

内に形成された急性期病巣では、MAG 脱落が先行する脱髄(pattern III)が認められ、MOG、MBP や Cx47、Cx32 は比較的保持されていた。この pattern III 脱髄は、抗 AQP4 抗体陽性の NMO 剖検例の脳病巣でも認められた。NMO の病巣内では、Nogo-A 陽性オリゴデンドロサイトは顕著に脱落が認められ、残存するオリゴデンドロサイトは核の偏在化や凝集が生じており、アポトーシス様変化と考えられた。また、NMO の延髄や脊髄の急性期病巣では、灰白質に発現が限局する Cx30 の発現が病側のオリブ核や脊髄前角で低下していることを見出した。MS30 例、NMO30 例の血清中に抗 Cx43 抗体は認められなかった。

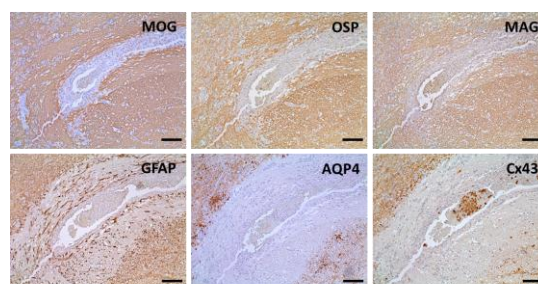


図3 単一血管周囲の急性期NMO病巣におけるCx43脱落

以上の結果から Baló 病の病巣においてはアストロサイトの Cx43 とともにオリゴデンドロサイトの Cx32 と Cx47 の染色性が広汎に低下しており、辺縁部の急性期病巣の特徴からはアストロサイトの傷害が脱髄に先行している可能性が示唆された。またこれらのアストロサイト傷害については抗体非依存性に生じていると考えられた。今回 MS や NMO でも類似した病理所見を見出し、脱髄に至るプロセスに共通のメカニズムが存在する可能性が示唆された。

脱髄性疾患では、急性期から AQP4 と Cx43 脱落を特徴とするアストロサイトパチーや、MAG 脱落を特徴とする脱髄が共通に生じており、Cx を介するアストロサイト-オリゴデンドロサイト間情報伝達の広汎な障害が病

態に關与している可能性が示唆された。今後は、脱髓性疾患の病態における Cx の機能的役割を解析するとともに、Cx を標的とした新規治療法の開発が期待される。

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 14 件)

- 1) 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 form starved cells. Neurochem Res 36: 58-66, 2011.
- 2) Himeno E, Ohyagi Y, Ma L, Nakamura N, Miyoshi K, Sakae N, Motomura K, Soejima N, Yamasaki R, Hashimoto T, Tabira T, LaFerla FM, Kira J: Apomorphine treatment for Alzheimer's mice promoting amyloid- β degradation Ann Neurol 69: 248-256, 2011.
- 3) Doi H, Matsushita T, Isobe N, Tateishi T, Kira J: Analysis of cerebrospinal fluid cytokines and growth factors in multiple sclerosis patients with and without chronic headaches. Neurology Asia 16: 65-70, 2011.
- 4) Matsuoka T, Suzuki SO, Suenaga T, Iwaki T, Kira J: Reappraisal of aquaporin-4 astrocytopathy in Asian neuromyelitis optica and multiple sclerosis patients. Brain Pathol 21: 516-532, 2011.
- 5) Fang L*, Isobe N*, Yoshimura S, Yonekawa T, Matsushita T, Masaki K, Doi H, Ochi K, Miyamoto K, Kawano Y, Kira J: Interleukin-7 receptor alpha gene polymorphism influences multiple sclerosis risk in Asians. Neurology 76: 2125-2127, 2011. *Equal contribution.
- 6) Yonekawa T, Matsushita T, Minohara M, Isobe N, Masaki K, Yoshimura S, Nishimura S, Kira J: T cell reactivities to myelin protein-derived peptides in neuromyelitis optica patients with anti-aquaporin-4 antibody. Neurology Asia. 16: 139-142, 2011.
- 7) Riwanti Estiasari, Matsushita T, Masaki K, Akiyama T, Yonekawa T, Isobe N, Kira J: Comparison of clinical, immunological and neuroimaging features between anti-aquaporin-4 antibody-positive and -negative Sjögren's syndrome patients with central nervous system manifestations. Mult Scler 18: 807-816, 2012.
- 8) Isobe N, Kanamori Y, Yonekawa T, Matsushita T, Shigeto H, Kawamura N, Kira J: First diagnostic criteria for atopic myelitis with special reference to discrimination from myelitis-onset multiple sclerosis. J Neurol Sci 316: 30-35, 2012.
- 9) Isobe N, Yonekawa T, Matsushita T, Kawano Y, Masaki K, Yoshimura S, Fichna J, Chen S, Furmaniak J, Smith BR, Kira J: Quantitative assays for anti-aquaporin-4 antibody with subclass analysis in neuromyelitis optica. Mult Scler 18:1541-1551, 2012.
- 10) Saida T, Itoyama Y, Tashiro K, Kira J, Hao Q, the Interferon Beta-1a Multiple Sclerosis Study Group of Japan: Intramuscular interferon beta-1a is effective in Japanese patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a pre-treatment versus treatment comparison study of gadolinium-enhanced MRI brain lesions. Mult Scler 18: 1782-1790, 2012.
- 11) Saida T, Kikuchi S, Itoyama Y, Hao Q, Kurosawa T, Nagao K, Tang D, Zhang-Auberson L, Kira J: A randomized,

controlled trial of fingolimod (FTY 720) in Japanese patients with multiple sclerosis.

Mult Scler 18: 1269-1277, 2012.

- 1 2) Masaki K, Suzuki SO, Matsushita T, Yonekawa T, Matsuoka T, Isobe N, Motomura K, Wu XM, Tabira T, Iwaki T, Kira J: Extensive loss of connexins in Baló's disease: evidence for an auto- antibody-independent astrocytopathy via impaired astrocyte-oligodendrocyte/myelin interaction. Acta Neuropathol 123: 887-900, 2012.
- 1 3) Gulibahaer A, Yamashita K, Torii T, Furuta K, Isobe N, Matsushita T, Masaki K, Matsumoto S, Kira J: Clinical disability progression and platelet GP II b/IIIa values in patients with atopic myelitis. J Neuroimmunol 246: 108-112, 2012.
- 1 4) Sato S, Isobe N, Yoshimura S, Kanamori Y, Masaki K, Matsushita T, Kira J: HLA-DPB1* 0201 is associated with susceptibility to atopic myelitis in Japanese. J Neuroimmunol 251: 110-113, 2012.

[学会発表] (計 19 件)

- 1) Kira J: Nosology & Pathology of Opticospinal MS. American Academy of Neurology 2011.4.9~16 Hawaii.
- 2) Kira J: Reappraisal of Longitudinally Extensive Spinal Cord Lesions in MS & NMO. East Asia Neurology Forum 2011.4.30 Taipei.
- 3) Kira J: Asian OSMS & NMO. 5th World Congress on Controversies in Neurology 2011.9.25~27 China.
- 4) Kira J: Anti-neurofascin antibody in patients with combined central and peripheral demyelination. Philippine Neurological Association 34th annual convention

2012.11.7~10 Philippines.

- 5) Kira J: Nationwide survey of hypertrophic pachymeningitis in Japan. Philippine Neurological Association 34th annual convention 2012.11.7~10 Philippines.
- 6) Kira J: Immunological & pathological features of NMO. 7th LACTRIMS & 5th Rio de Janeiro Neurology Association 2012.11.28~30 Brazil.
- 7) Kira J: Demyelinating Diseases in Asian Population. 7th LACTRIMS & 5th Rio de Janeiro Neurology Association 2012.11.28~30 Brazil.
- 8) Kira J: Cutting Edges of MS & NMO. Keystone Symposium Multiple Sclerosis 2013.1.11~16 USA.
- 9) Kira J: Chronic Progressive Multiple Sclerosis & HDLS: differential diagnosis & implication for roles of microgliopathy in white matter disease. International Symposium on Hereditary Diffuse Leukoencephalopathy with Axonal Spheroids 2013.2.21 東京.
- 10) Masaki K, Kira J: Molecular pathology of astrocytopathy in Baló's disease and tumefactive MS. PACTRIMS 2012.9.13~15 北京.
- 11) Masaki K, Kira J: Molecular pathology of astrocytopathy in Baló's disease and tumefactive MS. 第 35 回日本神経科学大会 2012.9.18~21 名古屋.
- 12) Masaki K, Suzuki SO, Matsushita T, Matsuoka T, Suenaga T, Tabira T, Iwaki T, Kira J: Connexin astrocytopathy in multiple sclerosis, Baló's disease and neuromyelitis optica. American Neurological Association 2012 Annual Meeting 2012.10.7~9 Boston.
- 13) Masaki K, Suzuki SO, Matsushita T,

Matsuoka T, Suzuki M, Suenaga T, Tabira T, Iwaki T, Kira J: Early disruption of astrocytic connexins in multiple sclerosis, Baló's disease and neuromyelitis optica. ECTRIMS 2012.10.10~13 Lyon.

- 14) 吉良潤一: 多発性硬化症の大規模遺伝・環境因子が語る有病率増加の原因: 発症増加を予防できるか. 第 53 回日本神経学会学術大会 2012.5.22~25 東京.
- 15) 吉良潤一, 糸山泰人, 菊地誠志, Qi Hao, 斎田孝彦: 日本人多発性硬化症患者を対象とした fingolimod の継続投与試験 (12 ヶ月) (口演). 第 53 回日本神経学会学術大会 2012.5.22~25 東京.
- 16) 吉良潤一: MS Variants & MS Mimics : 多発性硬化症のスペクトラムからみた病態と治療. 第 1 回東京神経難病フォーラム 2012.7.5 東京.
- 17) 吉良潤一: 脱髄性疾患に共通する抗体非依存性アストロサイトパチー. 第 5 回名古屋大学グローバル COE 国内シンポジウム 2012.7.17 名古屋.
- 18) 眞崎勝久, 鈴木諭, 松下拓也, 松岡健, 米川智, 磯部紀子, 田平武, 岩城徹, 吉良潤一: 多発性硬化症、視神経脊髄炎、Baló 病における広汎なコネキシン蛋白の脱落と病態への関与 (口演). 第 53 回日本神経学会学術大会 2012.5.22~25 東京.
- 19) 眞崎勝久, 鈴木諭, 松下拓也, 松岡健, 鈴木万幾子, 末長敏彦, 田平武, 岩城徹, 吉良潤一: 脱髄性疾患における広汎なコネキシン脱落と病態への関与. 第 24 回日本神経免疫学会学術集会 2012.9.20~21 長野.

[図書] (計 2 件)

- 1) 眞崎勝久, 吉良潤一: 神経病理. アクチュアル脳・神経疾患の臨床. 最新アプロ

ーチ

多発性硬化症と視神経脊髄炎. 辻省次(総編集). 吉良潤一(専門編集). 中山書店 pp. 29-36, 2012
2) 眞崎勝久, 吉良潤一: 多発性硬化症の類縁疾患 バロー病. アクチュアル脳・神経疾患の臨床. 最新アプローチ 多発性硬化症と視神経脊髄炎. 辻省次(総編集). 吉良潤一(専門編集). 中山書店 pp. 99-103, 2012.

[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

吉良 潤一 (KIRA JUN-ICHI)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 40183305

(2) 研究分担者

松下 拓也 (MATSUSHITA TAKUYA)
九州大学・医学研究院・学術研究員
研究者番号: 00533001
吉村 怜 (YOSHIMURA SATOSHI)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号: 20596390