

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790889

研究課題名(和文) グリア細胞間情報伝達障害からみた脱髄性疾患の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Connexin astrocytopathy and novel therapeutic strategy targeting connexin hemichannels in demyelinating disease

研究代表者

真崎 勝久 (Masaki, Katsuhisa)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90612903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症、視神経脊髄炎、Balo病を含む脱髄性疾患において、connexin (Cx) 蛋白を軸として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 evaluated the expressions of astrocytic Cx43/Cx30 and oligodendrocytic Cx47/Cx32 among autopsied cases with demyelinating disorders. In Balo disease (BD), Cx43, Cx32 and Cx47 were extensively diminished. In the leading edge area, 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 vasculocentric deposition of immunoglobulins or complements was observed in four of the six NMO cases. Some NMO cases showed preferential myelin-associated glycoprotein (MAG) loss. 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.

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：コネクシン 多発性硬化症 視神経脊髄炎 Balo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ッ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ッ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でギャップ結合を構成し、形態的・機能的相互作用に重要な役割を担っているコネキシン(connexin: 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形成や巨大病巣への進展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。

さらに、新生児マウス脳から単離した初代培養アストロサイトを用い、T細胞因子によるコネキシン蛋白の発現変化を検討した。

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、非脱髄巢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。

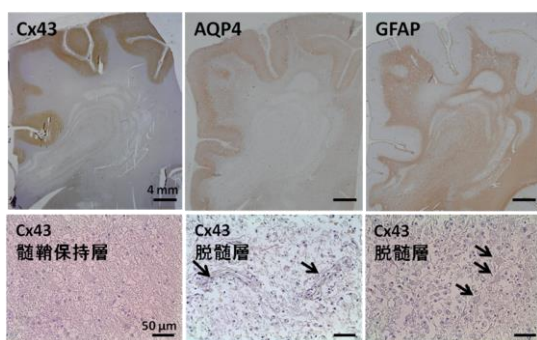


図1 Baló病巣における広範なCx43脱落
(矢印:血管周囲やアストロサイトのCx43は脱落)

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。

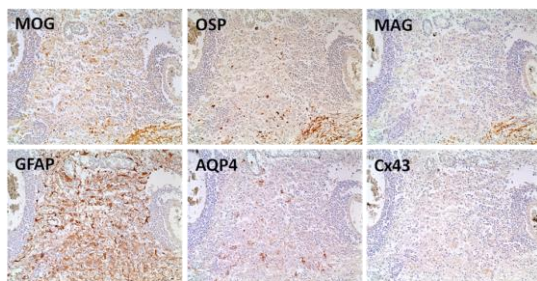


図2 急性期MS病巣における広範なCx43脱落
(GFAP陽性アストロサイトは残存、AQP4は斑状に脱落)

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ッチを認め、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、アストロサイトパッチ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。

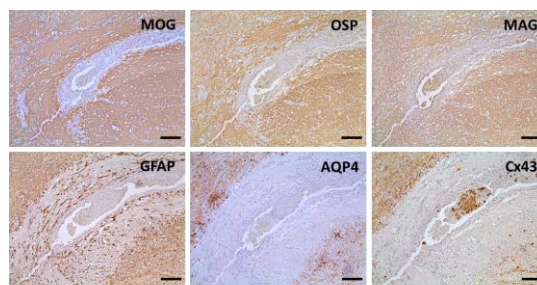


図3 単一血管周囲の急性期NMO病巣におけるCx43脱落

マウス脳由来の初代培養アストロサイトを用いた検討では、Th1 細胞の上精処理後に Cx43 の発現が低下することを見出した(図 4)。この結果は western blot や定量的 PCR でも確認し、Th1 細胞由来の因子が Cx43 を低下させることが示唆された。

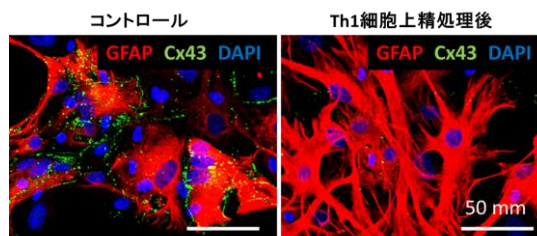


図4 マウス脳由来の初代培養アストロサイト
(Th1因子処理後にCx43の発現が低下している)

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。MS の急性期病巣では、T 細胞を主体とした炎症細胞が血管周囲性に顕著であることが以前から知られており、T 細胞因子が Cx43 を発現低下させることが病態に寄与している可能性も示唆された。

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関与している可能性が示唆された。今後は、脱髄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 11 件)

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Sato S, Isobe N, Yoshimura S, Kanamori Y, Masaki K, Matsushita T, Kira J: HLA-DPBI* 0201 is associated with susceptibility to atopic myelitis in Japanese. *J Neuroimmunol* 251: 110-113, 2012.
- 6) Yoshimura S, Isobe N, Yonekawa T, Matsushita T, Masaki K, Sato S, Kawano Y, Yamamoto K, Kira J; South Japan Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Genetic and infectious profiles of Japanese multiple sclerosis patients. *PLoS One*. 2012;7(11):e48592.
- 7) Yoshimura S, Isobe N, Matsushita T, Yonekawa T, Masaki K, Sato S, Kawano Y, Kira J; South Japan Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Distinct genetic and infectious profiles in Japanese neuromyelitis optica patients according to anti-aquaporin 4 antibody status. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84: 29-34, 2013
- 8) Isobe N, Yonekawa T, Matsushita T, Masaki K, Yoshimura S, Fichna J, Chen S, Furmaniak J, Smith BR, Kira J. Clinical relevance of serum aquaporin-4 antibody levels in neuromyelitis optica. *Neurochem Res* 38: 997-1001, 2013

- 9) Masaki K, Suzuki SO, Matsushita T, Matsuoka T, Imamura S, Yamasaki R, Suzuki M, Suenaga T, Iwaki T, Kira J: Connexin 43 astrocytopathy linked to rapidly progressive multiple sclerosis and neuromyelitis optica. PLoS One 8: e72919, 2013
- 1 0) Suzuki M, Kawasaki H, Masaki K, Suzuki SO, Terada T, Tsuchida T, Tokuyama T, Kono S, Komori T, Baba S, Kira J, Miyajima H. An autopsy case of Marburg variant of multiple sclerosis (acute multiple sclerosis). Intern Med 52: 1825-32, 2013
- 1 1) Yonekawa T, Murai H, Utsuki S, Matsushita T, Masaki K, Isobe N, Yamasaki R, Yoshida M, Kusunoki S, Sakata K, Fujii K, Kira J. A nationwide survey of hypertrophic pachymeningitis in Japan. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2013 Nov 22. doi: 10.1136/jnnp-2013-306410.

[学会発表] (計 10 件)

- 1) Masaki K, Kira J: Molecular pathology of astrocytopathy in Baló's disease and tumefactive MS. PACTRIMS 2012.9.13~15 北京.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Masaki K, Cui YW, Yamasaki R, Hayashi S, Nagara S, Kawamura MF, Sato S, Ohyagi Y, Kira J. Connexin gap junction pathology in the SOD1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Neuro2013 2013.6.20-23. Kyoto.
- 8) Masaki K. Rapidly progressive MS and gliopathy. PACTRIMS 2013.11.6-8. Kyoto.
- 9) 眞崎勝久, 鈴木諭, 松下拓也, 松岡健, 鈴木万幾子, 末長敏彦, 岩城徹, 吉良潤一: Distal oligodendroglialopathy 型脱髄におけるコネキシンアストロサイトパチーの関与 (口演). 第 54 回日本神経学会学術大会 2013.5.29~6.1 東京.
- 10) 眞崎勝久, 鈴木諭, 松下拓也, 松岡健, 鈴木万幾子, 末長敏彦, 岩城徹, 吉良潤一: 脱髄性疾患における Connexin 43 脱落は病態の急速な進行および distal oligodendroglialopathy 型脱髄と関連する. 第 25 回日本神経免疫学会学術集会 2013.11.27~29 下関.

[図書] (計 5 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) 真崎勝久、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.
- 3) 真崎勝久、吉良潤一. OSMS における AQP4 の病態意義. 神経内科 76:537-542, 2012
- 4) 真崎勝久. Balo 病における広汎なコネキシン蛋白の脱落. MS frontier 1: 31-33, 2012
- 5) 真崎勝久. アストロサイトパチーと脳細胞間情報伝達機構の修復戦略. 臨床神経 52: 1354-6, 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

真崎 勝久 (MASAKI KATSUHISA)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：90612903