

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461295

研究課題名(和文) グリアシンシチウムを介するエネルギー供給機構の破綻による巨大脱髄巣形成機序の解明

研究課題名(英文) Extensive disruption of energy transports via glial syncytium in demyelinating diseases

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：MS、NMO、Balo病におけるコネクシンの神経病理学的解析が完了した。NMOの脊髄ではisolated perivascular lesionは白質に多発していることを見出した。Th1細胞由来の液性因子がCx43を低下させることを見出した。変異SOD1-Tgマウスにおいて、脊髄灰白質のオリゴデンドロサイトでCx47やCx32が著明に低下することを発見した。

グルコース担体および乳酸単体の脱髄病巣における変化について検討し、アストロサイト足突起MCT4の急性期病変での脱落を確認した。血管内皮のGLUT1やMCT1は保持されており、グリア細胞を介した栄養供給障害が存在する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Neuropathological analysis of connexins in MS, NMO, Balo disease was completed. In the spinal cord of NMO, isolated perivascular lesion was frequently found in white matter. We also found that humoral factors derived from Th1 cells decreased the expression of Cx43. We found that the expressions of Cx47 and Cx32 were markedly diminished in oligodendrocytes of spinal gray matter in mutant SOD1-Tg mice. We investigated the expression pattern of glucose lactate transporters in demyelinating disorders and found the decreased expression of astrocyte MCT4 in active demyelinating lesions. GLUT1 and MCT1 expressed on the vascular endothelium are retained, and our findings indicated that nutrient supply impairment via glial cells is present in demyelinating diseases.

研究分野：脱髄性疾患

キーワード：多発性硬化症 視神経脊髄炎 グリアシンシチウム 栄養供給障害

1. 研究開始当初の背景

中枢神経疾患におけるグリア細胞間の機能的連絡障害をより詳細に理解するために、脳内エネルギー代謝に必須なトランスポーターである facilitated glucose transporter (GLUT) と monocarboxylic acid transporter (MCT) に着目した。GLUT は 12 回膜貫通型の膜結合性糖蛋白質で、グルコースの促進拡散型輸送を担う主要蛋白であり、これまで 13 種類のアイソフォームが同定されている。中枢神経では GLUT1-6,8 が発現しているとされるが、実際にグルコース輸送体としての機能が証明されているものは GLUT1 と GLUT3 である。MCT は 14 種類のアイソフォームが報告されているが、乳酸、ピルビン酸などモノカルボン酸の輸送に関わるものは MCT1-4 といわれる (Simpson, JCBFM, 2007)。中枢神経系における GLUT や MCT の発現パターンは報告されているが、ヒト神経疾患を対象としたものは未だ少なく、脱髄性疾患に関してはこれまで全く検討されていない。

2. 研究の目的

脱髄性疾患における GLUT や MCT の発現解析、GLUT や MCT 脱落に伴うグリア合胞体の機能破綻による脱髄・軸索障害機序を、MS 剖検標本、MS 動物モデルと培養細胞を用いて解明し新たな分子標的療法を開発する。

3. 研究の方法

MS、NMO、Baló 病患者の剖検標本を対象に、GLUT1,3,4,5 および MCT1-4 の詳細な発現パターンを免疫組織化学的に評価した。Baló 病 4 例、MS6 例、NMO11 例の剖検標本はすでに保有していた。比較対象疾患として、ヘルペス脳炎、脳梗塞、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、重症筋無力症などの剖検標本を使用した。各種 GLUT や MCT 蛋白に対する特異抗体を用い酵素抗体法、蛍光抗体法による組織免疫染色を施行する。

4. 研究成果

MS、NMO、Balo 病の脱髄病巣におけるコネキシン蛋白の神経病理学的解析が完了し、これら一連の研究成果を英文総説として発表した (Masaki K. Neuropathology, 2015)。

NMO 患者の脊髄病変の分布、進展に関する神経病理学的・神経放射線学的研究では、灰白質病変のみならず、白質とくに側索や後索に病変が多く存在すること、早期病巣と考えられる isolated perivascular lesions も白質にのみ多発していたことを見出し、国際神経病理学会雑誌 Brain Pathology に報告した (Hayashida S, et al. Brain Pathol 2016)。Isolated perivascular lesion でも Cx43 は発現が既に低下していた。

加えて、マウス大脳由来初代培養アストロ

サイトを用いて Cx43 発現を変化しうる因子を検討した結果、T 細胞サブセットの中でも Th1 細胞由来の液性因子が Cx43 発現を低下させることを見出した。サイトカインの中では IFN が用量依存的に Cx43 を低下させ、加えて高用量の IL-17 でも Cx43 の発現を低下させることを発見した (Watanabe M, et al. Sci Rep 2016)。これらサイトカインの影響は、アストロサイトへの直接作用ではなく、ミクログリアの活性化を介した間接的な作用であることも証明した。

一方、Cx43 脱落と脱髄の関連を in vivo で評価するため、Tamoxifen により inducible なアストロサイト特異的 Cx43 conditional knockout (cKO) マウス (Cx43icKO mice) を新規作製した。灰白質でのみ Cx43 発現を低下させる Cx43icKO mice では、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の重症度が軽減することを見出し、現在その病態機序解析をすすめている (Une H, et al. in preparation)。

他方、変異 SOD1-Tg マウスにおいて、脊髄灰白質のオリゴデンドロサイトで Cx47 や Cx32 の発現が病気の進行とともに著明に低下することを発見した (Cui Y and Masaki K, et al. J Neuroinflammation 2014)。逆にアストロサイトの Cx43 は発現が亢進しており、グリア細胞間情報連絡の破綻やヘミチャネルの発現亢進が神経変性の進行に寄与している可能性が示唆された。

さらに、グリアシンシチウム破綻の観点から、中枢神経系に広く発現するグルコーストランスポーターおよび乳酸トランスポーターの脱髄病巣における変化について解析した。その結果、アストロサイトの血管周囲足突起に発現する monocarboxylate transporter 4 (MCT4) の急性期病変での脱落を発見した。一方、血管内皮細胞に発現する glucose transporter 1 (GLUT1) や MCT1 は保持されており、グリア細胞を介した栄養供給経路に障害がある可能性を見出した (Masaki K, et al. in preparation)。その他、ミクログリアの GLUT5 は急性期脱髄病巣で著明に発現亢進していること、軸索の GLUT3 は障害時に発現が局所的に亢進していることなどを見出している。

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 15 件)

- 1) Hayashida S, Masaki K, Yonekawa T, Suzuki SO, Hiwatashi A, Matsushita T, Watanabe M, Yamasaki R, Suenaga T, Iwaki T, Murai H, Kira JI. Early and Extensive Spinal White Matter Involvement in Neuromyelitis Optica. *Brain Pathol.* 2016 Apr 15. doi: 10.1111/bpa.12386. [Epub ahead of print]
- 2) Watanabe M, Masaki K, Yamasaki R, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Matsushita T,

- Suzumura A, Kira J. Th1 cells inhibit the expression of connexin 43 in astrocytes via microglial activation. *Scientific Reports*, 2016 Dec 8;6:38387. doi: 0.1038/srep38387.
- 3) Yamasaki R, Fujii T, Wang B, Masaki K, Kido MA, Yoshida M, Matsushita T, Kira JI. Allergic Inflammation Leads to Neuropathic Pain via Glial Cell Activation. *J Neurosci*. 2016 Nov 3;36(47):11929-11945.
 - 4) Shinoda K, Iwata T, Nakamura Y, Masaki K, Matsushita T, Yamasaki R, Kira JI. Minocycline-induced human herpesvirus 6 encephalomyelitis with drastically disseminated contrast-enhanced lesions. *Eur J Neurol*. 2016 Dec;23(12):e76-e77. doi: 10.1111/ene.13190.
 - 5) Niino M, Sato S, Fukazawa T, Masaki K, Miyazaki Y, Matsuse D, Yamasaki R, Takahashi E, Kikuchi S, Kira J. Decreased serum vitamin D levels in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 15; 279: 40-5, 2015
 - 6) Song ZY, Yamasaki R, Kawano Y, Sato S, Masaki K, Yoshimura S, Matsuse D, Murai H, Matsushita T, Kira J. Peripheral blood T cell dynamics predict relapse in multiple sclerosis patients on fingolimod. *PLOS ONE* 28; 10: e0124923, 2015
 - 7) Ramanathan S, Sato S, Matsushita T, Masaki K, Yamasaki R, Dale RC, Kira JI, Brilot F. Antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein are uncommon in Japanese opticospinal multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2015 May 26. pii: 1352458515586089
 - 8) Sato S, Yamamoto K, Matsushita T, Isobe N, Kawano Y, Iinuma K, Niino M, Fukazawa T, Nakamura Y, Watanabe M, Yonekawa T, Masaki K, Yoshimura S, Murai H, Yamasaki R, Kira JI; and the Japan Multiple Sclerosis Genetics Consortium (JMSGC). Copy number variations in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Ann Neurol*. 78: 762-774, 2015
 - 9) Ogata H, Yamasaki R, Hiwatashi A, Oka N, Kawamura N, Matsuse D, Kuwahara M, Suzuki H, Kusunoki S, Fujimoto Y, Ikezoe K, Kishida H, Tanaka F, Matsushita T, Murai H, Kira J. Characterization of IgG4 anti-neurofascin 155 antibody-positive polyneuropathy. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015 Oct;2(10):960-71.
 - 10) Yamasaki R, Matsushita T, Fukazawa T, Yokoyama K, Fujihara K, Ogino M, Yokota T, Miyamoto K, Niino M, Nomura K, Tomioka R, Tanaka M, Kawachi I, Ohashi T, Kaida KI, Matsui M, Nakatsuji Y, Ochi H, Fukaura H, Kanda T, Nagaishi A, Togo K, Mizusawa H, Murai H, Kira JI. Efficacy of intravenous methylprednisolone pulse therapy in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Mult Scler*. 2015 Nov 12. pii: 1352458515617248. [Epub ahead of print]
 - 11) Masaki K. Early disruption of glial communication via connexin gap junction in multiple sclerosis, Balo's disease, and neuromyelitis optica. *Neuropathology* 35: 469-480, 2015
 - 12) Yoshimura S, Isobe N, Matsushita T, Masaki K, Sato S, Kawano Y, Ochi H, Kira J. Genetic and infectious profiles influence cerebrospinal fluid IgG abnormality in Japanese multiple sclerosis patients. *PLOS ONE* 9: e95367, 2014
 - 13) Cui Y*, Masaki K*, Yamasaki R, Imamura S, Suzuki SO, Hayashi S, Sato S, Nagara Y, Kawamura MF, Kira J. Extensive dysregulations of oligodendrocytic and astrocytic connexins are associated with disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J Neuroinflammation*. 11: 42, 2014 (*equal contribution)
 - 14) Ainiding G, Kawano Y, Sato S, Isobe N, Matsushita T, Yoshimura S, Yonekawa T, Yamasaki R, Murai H, Kira J: Interleukin 2 receptor α chain gene polymorphisms and risks of multiple sclerosis and neuromyelitis optica in southern Japanese. *J Neurol Sci* 337: 147-150, 2014.
 - 15) Cui YW, Kawano Y, Yamasaki R, Shi N, Masaki K, Isobe N, Yonekawa T, Matsushita T, Tateishi T, Hayashi S, Kira J: Decreased CCR2 and CD62L expressions on peripheral blood classical monocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Exp Neuroimmunol* 5: 92-96, 2014.
- [学会発表](計12件)
- 1) Masaki K, et al. Extensive loss of astrocytic MCT4 in demyelinating diseases. 第57回日本神経学会学術大会 2016.5.18-21 神戸
 - 2) 眞崎勝久. 多発性硬化症・視神経脊髄炎におけるグルコース・乳酸担体の神経病理学的検討 第28回日本神経免疫学会学術集会 2016.9.29 - 30 長崎
 - 3) Masaki K, et al. Immunopathological study of glucose and lactate transporters in white and gray matter lesions of MS and NMO. 第141回ANA 2016.10.16-18 Baltimore
 - 4) 眞崎勝久. 多発性硬化症・視神経脊髄炎におけるグルコース・乳酸担体の神経病理学的検討 第56回日本神経学会学術大会 2015.5.20 新潟
 - 5) 眞崎勝久. 多発性硬化症・視神経脊髄炎におけるグルコース・乳酸担体の神経病理学的検討 第27回日本神経免疫学会学術集会 2015.9.15 岐阜
 - 6) Masaki K, et al. Extensive loss of MCT4 in active lesions of MS and NMO. ECTRIMS2015 2015.10.7-10 Barcelona, Spain
 - 7) Masaki K. Common and distinct features

of immunopathology between MS and NMO.
PACTRIMS2015 Seoul, Korea

- 8) Masaki K, et al. Connexin gap junction pathology in MS, Balo's disease and NMO. 第 55 回日本神経学会学術大会 2014.5.21 福岡
- 9) 眞崎勝久. 脱髄性疾患におけるグルコース・乳酸トランスポーターの神経病理学的検討 第55回日本神経学会学術大会 2014.5.21 福岡
- 10) 眞崎勝久. 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 55 回日本神経病理学会総会学術研究会 2014.6.6 東京
- 11) 眞崎勝久. MS におけるアストロサイトパチー 第 26 回日本神経免疫学会学術集会 2014.9.6 金沢
- 12) Masaki K, et al. Neuropathological study of glucose and monocarboxylate transporters in MS. ECTRIMS2014 2014.9.12 Boston

〔図書〕(計 13 件)

- 1) 眞崎勝久, 吉良潤一. Tumefactive MS. アクチュアル脳神経疾患の臨床 最新アプローチ 免疫性神経疾患. p237-241, 2016
- 2) 眞崎勝久, 吉良潤一. Balo 病. アクチュアル脳神経疾患の臨床 最新アプローチ 免疫性神経疾患. p242-245, 2016
- 3) 眞崎勝久. Lhermitte 徴候. 脊椎脊髄ジャーナル 28; 351-353, 2015
- 4) 眞崎勝久. 多発性硬化症の神経病理. 日本臨床増刊号 免疫性神経疾患 p141-149, 2015
- 5) 眞崎勝久. Balo 病(同心円硬化症). 日本臨床増刊号 免疫性神経疾患 p320-326, 2015
- 6) 眞崎勝久. Tumefactive MS とコネキシン. 日本臨床増刊号 免疫性神経疾患 p826-834, 2015
- 7) 眞崎勝久. 同心円硬化症(Balo 病) 日本臨床別冊 免疫症候群(第 2 版) p20-25, 2015
- 8) 眞崎勝久. 多発性硬化症における神経炎症. 別冊 Bio Clinica 神経系の慢性炎症 16-22. 2014
- 9) 眞崎勝久. アストロサイトの動態. Clinical Neuroscience. 32; 1225-1228. 2014
- 10) 眞崎勝久. 急性期 MS 病巣の特徴. MS frontier. 3;1, 2014
- 11) 眞崎勝久. Baló 病の MRI. MS frontier. 3; 70, 2014
- 12) 眞崎勝久. Baló 病の神経病理. 日本臨床 72; 1880-1883, 2014
- 13) 眞崎勝久. 多発性硬化症・視神経脊髄炎の分子神経病理 日本臨床 72; 1909-1917, 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞崎 勝久 (MASAKI KATSUHISA)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号: 90612903

(2) 研究分担者

山崎 亮
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号: 10467946
山口 浩雄
九州大学・医学研究院・講師
研究者番号: 00701803