



Title	実験的自己免疫性脳脊髄炎における中枢神経炎症の抑制と排尿機能障害の検討
Author(s)	樋口, まどか
Description	配架番号 : 2621
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14500号
Issue Date	2021-03-25
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14500">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14500</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/84692">https://hdl.handle.net/2115/84692</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Madoka_Higuchi.pdf



# 学位論文

実験的自己免疫性脳脊髄炎における中枢神経炎症の抑制と  
排尿機能障害の検討

(studies on the suppression of inflammation of central nervous  
system and urinary disfunction in experimental autoimmune  
encephalomyelitis)

2021年3月

北海道大学

樋口 まどか



# 学位論文

実験的自己免疫性脳脊髄炎における中枢神経炎症の抑制と  
排尿機能障害の検討

(studies on the suppression of inflammation of central nervous  
system and urinary disfunction in experimental autoimmune  
encephalomyelitis)

2021年3月

北海道大学

樋口 まどか

## 目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
【第一章】	
緒言	9 頁
方法	10 頁
結果	17 頁
考察	28 頁
【第二章】	
緒言	31 頁
方法	32 頁
結果	35 頁
考察	44 頁
結論	46 頁
謝辞	47 頁
利益相反	48 頁
引用文献	49 頁

## 発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は、以下の論文に投稿中である。

TANAKA Kumiko\*, HIGUCHI Madoka\*, ARIMA Yasunobu\*, JIANG Jing-Jing,  
SHINOHARA Nobuo, KAMIMURA Daisuke, MURAKAMI Masaaki, TANAKA  
Yuki

\* Equal contribution

Flavin-adenine dinucleotide, which is induced by antigravity responses in spinal  
cord, suppressed EAE development

Lancet

本研究は学会では未発表である。

## 要旨

### 【背景と目的】

多発性硬化症(MS: multiple sclerosis)は中枢神経系の自己免疫疾患であり、多くは再発・寛解を繰り返す。遺伝学的に自己反応性 CD4+T 細胞の関連が証明され、中枢神経への炎症誘導により脱髄を生じ、神経症状を呈する。半数以上で過活動膀胱を呈し、さらにその半数は排尿筋尿道括約筋協調不全とされるが、脱髄部位により排尿症状も多彩である。

血管内皮細胞や尿細管上皮細胞などの非免疫細胞において、NF- $\kappa$ B と STAT3 の同時活性化により IL-6 などの炎症性メディエーター発現が相乗的に増加し、臓器特異的な炎症性疾患の起点となる IL-6 amplifier(IL-6 アンプ)が報告されている。多発性硬化症のモデルマウスである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis)では、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein)を認識する CD4+T 細胞(病原 T 細胞)を誘導、単離し、これを正常マウスに移入することで尾から始まり上行する一過性の麻痺を呈する(移入 EAE)。後脚への重力刺激によるヒラメ筋を介した感覚-交感神経のクロストークにより、ノルアドレナリン産生、血管内皮細胞での NF- $\kappa$ B 活性化から CCL20 が放出され、第 5 腰髄(L5)背側血管に病原 T 細胞が集積する。この集積病原 T 細胞が、さらに L5 背側血管にて IL-6 アンプを活性、血管透過性が亢進し、さらなる病原 T 細胞の集積と微小炎症が生じる。このように、特定の神経回路の活性化により特定血管に血管ゲートが形成され、局所炎症が起こる機序はゲートウェイ反射と呼ばれる。また、睡眠障害ストレスを移入 EAE マウスに負荷すると消化管出血による心機能不全で突然死する。ストレスに反応する室傍核での交感神経様神経が活性化され、病原 T 細胞が第 3 脳室、歯状回、視床に囲まれた特定血管に集積し、微小炎症を誘導する。この炎症から生じる ATP が神経伝達物質として機能し、神経回路を新規に活性化し、過剰な迷走神経活性化から消化管炎症や心機能低下を生じる(ストレスゲートウェイ反射)。

定常マウスに病原 T 細胞を移入した EAE の病態は一過性であることから、中枢神経系には炎症抑制因子が存在し、これらにより病態が一過性なのではないかと考えた。今回、L5 のメタボローム解析を行い、EAE および中枢神経の炎症に対して抑制的に関わる代謝産物の同定を試みた。

また、中枢神経系の免疫疾患発症時での排尿障害についての検討は少ない。さらに下部尿路障害と中枢炎症や慢性ストレスとの関係についての検

討・報告はほとんどない。今回、病原 T 細胞を移入した移入 EAE モデルを用いて、中枢神経の自己免疫疾患における排尿変化やその治療法について、また、ゲートウェイ反射を応用し下部尿路障害モデルのストレス反応について検討した。

#### 【方法】

(第 1 章) 定常、後肢懸垂、後肢懸垂かつ電気刺激の 3 群のマウスで GC/MS および LC/MS による L5 のメタボローム解析を行った。また MOG ペプチドで C57BL/6 マウスを免疫し免疫 EAE を誘導後、このマウスから脾臓を摘出し病原性 CD4+T 細胞を採取し、マウスに移入することで移入 EAE を誘導した。移入後 day5、day12 に FAD 解析を行った。メタボローム解析により中枢神経炎症に対して抑制的にはたらくと考えられる FAD を同定し、EAE マウスに投与し臨床スコアを評価した。投与前後に脾臓細胞の分画変化、L5 の細胞集積、IL-6 アンプへの関与を検討した。

(第 2 章) 移入 EAE マウスの移入前、麻痺ピーク時、移入 4 週後、移入 6 週後にて 24 時間の排尿回数と平均 1 回尿量、排尿時膀胱内圧の測定を行った。各群で膀胱の組織学的評価、L5 の細胞集積、排尿中枢である中脳水道の神経活性化を検討した。下部尿路閉塞モデルと間質性膀胱炎モデルに対して病原性 CD4+T 細胞を移入し症状スコアを評価した。

#### 【結果】

(第 1 章) 後肢懸垂により L5 にて FAD 発現が低下し、電気刺激により増加した。免疫 EAE 発症とともに L5 での FAD が増加した。免疫 EAE では FAD 投与により臨床スコアが抑制された。FAD による免疫細胞の分画に変化を認めず、L5 への病原性 T 細胞の集積が抑制された。非免疫細胞のサイトカイン刺激では FAD 投与により IL-6 発現は増加した。MOG 免疫時に FAD を投与し病原性 T 細胞を移入すると、移入 EAE では発症が抑制された。

(第 2 章) 移入 EAE マウスで発症とともに排尿回数が減少した。1 回尿量は移入 4 週頃に増加し、病態が寛解した 6 週目も増加していた。移入 4 週から 6 週にかけて排尿時膀胱内圧が上昇した。膀胱の HE 染色では組織学的な違いはなかった。寛解期も L5 に病原 T 細胞の集積があり、病態ピーク時で中脳水道神経活性化を認めた。下部尿路障害モデルでの EAE 誘導では、下部尿路閉塞モデル、間質性膀胱炎モデルともに症状スコアに sham との有意差を認めなかった。

#### 【考察】

(第 1 章) FAD は重力刺激と L5 の炎症で増加する可能性がある。FAD がどのように EAE 病態誘導を抑制するかは現時点では不明であるが、MOG 免疫時に

FAD を投与したマウスから病原 T 細胞を採取し移入したところ、移入 EAE での発症が抑制された。免疫時の FAD 暴露により CD4+T 細胞が MOG に対して病原性を獲得しなかった可能性がある。

(第 2 章)EAE マウスでは麻痺とともに 1 回尿量が増加した。膀胱の組織学的な変化がなかったこと、麻痺ピーク時の中脳水道活性、麻痺寛解後の L5 周囲での病原 T 細胞残存から、神経学的に排尿機能の変化が表れている可能性が示唆された。また寛解後の EAE での排尿時膀胱内圧の上昇は、神経因性膀胱の一症状として、MS における排尿筋尿道括約筋協調不全を再現している可能性を考える。

下部尿路障害モデルに対する EAE 移入では臨床スコアにおいて sham との間に違いを認めず、下部尿路障害モデルにおいて病原 T 細胞は通常の EAE と同様な病態を示した。下部尿路障害モデルでも重力刺激による L5 腰髄周囲血管の微小炎症に勝る炎症誘導はなかったと考えられた。

#### 【結論】

FAD は中枢神経の炎症に対して抑制的にはたらく因子である可能性がある。

EAE モデルを用いた多発性硬化症の排尿評価では、中枢神経の炎症による排尿変化が不可逆的な場合もあることが示唆された。

## 略語表

BOO	bladder outlet obstruction
BSA	Bovine serum albumin
CFA	complete Freund' s adjuvant
CMG	cystometrography
DMEM	Dulbecco` s modified Eagle medium
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ES	electric stimulation
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide Sodium
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GC/MS	Gas Chromatography-Mass spectrometry
HE	hematoxylin and eosin
H2O2	hydrogen peroxide
IC	interstitial cystitis
IL-6	interleukin-6
IL-17	interleukin-17
IL-23	interleukin-23
i.p.	intraperitoneal injection
LC/MS	Liquid Chromatography-Mass spectrometry
MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	multiple sclerosis
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B
PBS	phosphate buffered saline
PFA	paraformaldehyde
RPTEC	renal proximal tubule epithelial cells
RT-PCR	real time quantitative polymerase chain reaction
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
TS	tail suspension
WT	wild type

## 緒言

多発性硬化症(MS : multiple sclerosis)は中枢神経系の自己免疫疾患であり、多くは再発・寛解を繰り返す(Steinman, 2009, 2014)。遺伝学的に自己反応性 CD4+T 細胞の関連が証明され、中枢神経への炎症誘導により脱髄を生じ、神経症状を呈する。半数以上で過活動膀胱を呈し、さらにその半数は排尿筋尿道括約筋協調不全とされるが、脱髄部位により排尿症状も多彩である(Aharony et al., 2016)。

線維芽細胞・血管内皮細胞などの非免疫細胞において、NF- $\kappa$ B 経路と STAT3 経路の同時活性化により IL-6 などの炎症性メディエーターの発現・産生が相乗的に増加し、臓器特異的な慢性炎症性疾患や自己免疫性疾患の病態形成の起点となる IL-6 amplifier(IL-6 アンプ)の機序が報告されている(Ogura et al., 2008)。IL-6 アンプは関節、皮膚、腎、中枢神経等の様々な臓器の炎症性疾患への関与が報告されている(Fujita et al., 2019; Harada et al., 2015; Higuchi et al., 2020; Lee et al., 2012; Murakami et al., 2013; Murakami et al., 2011; Ogura et al., 2008; Okuyama et al., 2018; Ota et al., 2020; Stofkova et al., 2019; Takada et al., 2020; Tanaka et al., 2018)。局所炎症による NF- $\kappa$ B や IL-6 および STAT3 の持続的な活性化により、NF- $\kappa$ B がさらに過剰に活性化され、さらなる炎症が誘導される(Atsumi et al., 2014; Harada et al., 2015; Lee et al., 2013; Murakami et al., 2013; Murakami et al., 2011; Ogura et al., 2008)。

MS のモデルマウスである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE : experimental autoimmune encephalomyelitis)においても、IL-6 アンプの関与が明らかにされている。MS は中枢神経の自己免疫疾患であり、患者の 80%で再発・寛解を繰り返す(Steinman, 2009, 2014)。免疫細胞、特に自己反応性 T 細胞の中枢神経への浸潤により脱髄を生じ(Sawcer et al., 2011)、麻痺などの神経症状を呈する。ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG : myelin oligodendrocyte glycoprotein)で免疫したマウスから病原性 CD4+ 細胞(病原 T 細胞)を単離し、これを正常マウスに静脈内投与する(移入)ことで尾から始まり上行する一過性の麻痺を発症する。この原理は、常に接地した後脚が重力により刺激されることでヒラメ筋近傍の交感神経が刺激され、ノルアドレナリン産生や NF- $\kappa$ B 活性が増強し CCL20 等のケモカインが放出され(感覚-交感神経のクロストーク)、L5 腰髄背側に MOG 特異的な病原 T 細胞が集積するためである(Arima et al., 2012; Arima et al.,

2015; Arima et al., 2017)。L5 腰髄背側血管において IL-6 アンプが活性化し微小炎症が起こり、病原 T 細胞が血液脳関門を通過し髄腔内に侵入する。このように、特定の神経回路の活性化により特定の血管ゲートが形成され、局所炎症が起こる機序はゲートウェイ反射として報告されている (Andersson and Tracey, 2012; Kamimura et al., 2020; Tracey, 2016)。通常飼育した移入 EAE マウスは L5 腰髄周囲での炎症が誘導され一過性の麻痺を発症するが、ストレス環境下に EAE マウスを飼育すると、消化管出血による心機能低下で突然死する。慢性ストレスを与えられた EAE マウスではストレスに反応する室傍核での交感神経が活性化され、移入した病原 T 細胞が L5 腰髄背側ではなく脳内に直接侵入し、第 3 脳室、歯状回、視床に囲まれた特定血管に集積した。特定血管周囲で生じた微小炎症により、炎症誘導因子かつ神経伝達物質である ATP が分泌され、これが特定血管周囲の神経回路を新規に活性化し、ストレス応答を増強させ胃・十二指腸の炎症や心機能低下を生じる。脳内で生じた微小炎症が、神経回路を新たに活性化させることで、その神経に支配される臓器の機能を変容させる可能性が示唆された (Arima et al., 2017)。

EAE への炎症アンプの関与の検討により、血液脳関門の透過性および中枢神経への T 細胞浸潤を抑制することで、EAE の発症を抑制することは報告されている (Arima et al., 2012)。今回は中枢神経炎症に対して、これを抑制する物質・反応について明らかにすることを目的とした。

MS 患者の症状は脱髄の起こった神経に関連した症状であり、排尿障害もその一つである。50~90%で過活動膀胱を呈し、その半数は排尿筋尿道括約筋協調不全を呈するとされるが、脱髄部位の違いや、再燃・寛解の経過を通じて症状が変化することから、患者により排尿症状は多彩である。未だ排尿障害の診断や治療には苦慮することがある (Aharony et al., 2016)。脳梗塞や脊髄損傷等の神経障害による不可逆的な排尿障害がある一方で、MS や中枢神経の炎症性疾患のように身体症状の改善がみられる疾患における排尿障害は、より症状が多彩で個人差がある。しかし麻痺等の身体症状が主に注目され、排尿症状が検討される機会は少ない可能性がある。一方で排尿障害は患者にとって著しく QOL を損ない、精神的なストレスになる。これら下部尿路障害に伴うストレスの検討も少ない。

今回 EAE モデルを用いて、中枢神経の自己免疫疾患および炎症に対する抗炎症作用の検討を行った。また中枢神経炎症と排尿機能障害の関連について検討するため、EAE での排尿機能の検討、およびゲートウェイ反射を応用した下部尿路障害モデルのストレス反応についての検討を行った。

## 第一章

実験的自己免疫性脳脊髄炎における FAD による炎症抑制と  
IL-6 炎症アンプの関連の検討

(studies on the suppression of experimental autoimmune  
encephalomyelitis and effect to IL-6 amplifier by FAD)

## 緒言

中枢神経の炎症性疾患である多発性硬化症 (MS : multiple sclerosis) のモデルマウスである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE : experimental autoimmune encephalomyelitis) において、IL-6 アンプの関与が明らかにされている。MOG で免疫した C57BL/6 マウスから病原 T 細胞を単離し、これを正常マウスに静脈内投与する (移入) した場合には尾から始まり上行する一過性の麻痺を発症する。後脚が重力により刺激されることでヒラメ筋近傍の交感神経が刺激されることが発症の契機である。(Arima et al., 2012; Arima et al., 2015; Arima et al., 2017)。

後肢懸垂 (TS : tail suspension) による重力刺激を解除した EAE マウスでは、L5 腰髄血管周囲の CCL20 が減少する。一方、後肢懸垂下で後肢に電気刺激を与えると、刺激時間に比例して CCL20 の発現が増加することが所属研究室で明らかにされている (Arima et al., 2012)。

移入 EAE の麻痺は、重力以外の刺激がなければ一過性である。このことから、中枢神経の炎症に対して抑制的に働く因子が存在し、これら因子により発症後に麻痺が改善するのではないかと考えた。後肢懸垂と電気刺激により EAE マウスでの中枢神経へのケモカイン発現に差を認めることから、これら腰髄のメタボローム解析を行い、EAE および中枢神経の炎症に対して抑制的に関わる代謝産物の同定を試みることで、中枢神経の炎症性疾患に対する新たな治療について検討した。

## 方法

### 1. 実験動物

生後 6-8 週齢の雌性 C57BL/6 マウス (Japan Slc. Inc., Shizuoka, Japan) に、後述する処置を行い EAE モデルを作成した。対照として EAE 処置を行わない雌性 C57BL/6 マウスを wild type (WT) 群とした。

本研究 に関する実験プロトコールは北海道大学動物実験委員会によって承認された。飼育および実験に関しては、北海道大学医学研究科「動物実験に関する指針 (Guide for the Care and use of Laboratory Animals)」に準拠した。

### 2. 移入 EAE モデルと免疫 EAE モデルの作成

生後 6-8 週齢の雌性 C57BL/6 マウスに pertussis toxin (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) を  $0.2 \mu\text{g}$  静脈内投与し、MOG ペプチド (Sigma-Aldrich) と complete Freund's adjuvant (CFA) (Sigma-Aldrich) の混合液  $100 \mu\text{L}$  (MOG  $50 \mu\text{L}$  + CFA  $50 \mu\text{L}$ ) を皮下注射し、これを day0 とした。Day2、day7 にも pertussis toxin を同量静脈内投与した。Day9 に脾臓を摘出し、抗 CD4 microbeads (Miltenyi Biotec, Tokyo, Japan) により CD4+T 細胞 (病原 T 細胞) をソーティングした。ソーティングした CD4+T 細胞 ( $4.0 \times 10^7$ ) と rIL-23 (10 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, USA) を、MOG ( $62.5 \mu\text{L}$ ) を添加した照射脾臓細胞 ( $1.0 \times 10^8$ ) と共に  $42^\circ\text{C}$  で 2 日間培養した。Day11 に培養細胞を抗 CD4 microbeads によりソーティングし、CD4+T 細胞  $1.5 \times 10^7$  個を 6 週齢の雌性 C57BL/6 マウスに静脈内投与した (移入) (Arima et al., 2012; Arima et al., 2015; Ogura et al., 2008)。これを移入 EAE と呼ぶ。移入日を day0 とし、マウスの臨床スコア (0: 正常、1: 尾の下垂、2: 後肢筋力低下、3: 両側後肢麻痺、4: 両側前脚肢麻痺、5: 死亡) を観察した) を評価した。MOG 免疫後の day9 に脾臓を採取しないマウスは免疫 EAE と呼び、MOG 投与日を day0 として同様に臨床スコアを評価する。

### 3. 後肢懸垂による重力解除、ヒラメ筋電気刺激

マウスの尾にタコ糸をテープで固定し、糸のもう一方をケージの屋根に固定することで、後肢接地に伴う後肢への重力刺激を解除した (Arima et al., 2012; Kawano et al., 2007; Ohira et al., 2002)。マウスは床敷上の食餌を摂取でき、体を支えられる程度に前肢が地に着くよう糸の長さを調整して固定した。糸は尾の成長や血流を妨げぬよう緩く固定し、一週間

毎に交換した。

後肢懸垂したマウスの一部で、ヒラメ筋を電気刺激装置 (Nippon Koden, Tokyo and Unique Medical, Osaka) により、0.1mA、1-8ms 間隔でランダムに 12 時間電気刺激 (ES: electric stimulation) した (Arima et al., 2012)。

#### 4. L5 腰髄におけるメタボローム解析

C57BL/6 マウスの正常飼育 (none)、後肢懸垂のみ (TS)、後肢懸垂とヒラメ筋電気刺激 (TS+ES) を行った 3 群でそれぞれ L5 腰髄を摘出しガストロクロマトグラフィ質量分析 (GC/MS: Gas Chromatography-Mass spectrometry) と液体クロマトグラフィ質量分析 (LC/MS: Liquid Chromatography-Mass spectrometry) によるメタボローム解析を大阪大学工学研究科 生物工学 福崎英一郎先生に行っていた (Yamamoto et al., 2014)。

摘出した腰髄サンプルは分析前処理時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。サンプルの入った 2 mL 容エッペンドルフチューブにジルコニアボール (直径 3 mm) を 1 個入れてふたをし、エッペンドルフチューブごと液体窒素に浸して凍結した。ミキサーミル器 (MM301, Retsch) により、20 Hz 3 分でサンプルを粉碎した。その後、遠心分離機で遠沈 ( $16000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 3 分間) し、上澄液 800  $\mu\text{L}$  を新しい 2.0 mL 容エッペンドルフチューブに移した。さらに内部標準物質としてリビトール・カンファー水溶液 (Ribitol 0.2 mg/mL かつ D-compher sulfonic acid 20  $\mu\text{g/mL}$  になるように調整) を 90  $\mu\text{L}$  添加し、再びボルテックスで 20 秒間よく混和した。この上澄液に蒸留水 600  $\mu\text{L}$  を添加し、ボルテックスで 20 秒間よく混和した。さらに遠心分離機で二相分離し、上相の水層液 1000  $\mu\text{L}$  を別の 1.5 mL 容エッペンドルフチューブに移し、そのうち 200  $\mu\text{L}$  をフィルター濾過してさらに別の新しい 1.5 mL 容エッペンドルフチューブに移して LC/MS 用サンプルとし、分析時まで  $-30^{\circ}\text{C}$  にて保存した。また、この上相液の残り 800  $\mu\text{L}$  の入ったチューブは穴あきフタをした。上相の水層液を 1~2 時間遠心濃縮 (TAITEC, Spin Dryer Standard VC-96R; ULVAC, Dry Vacuum Pump DTC-41; TAITEC, Freeze Trap VA-500R) 後、液体窒素で凍らせて凍結乾燥器 (TAITEC, FREEZE DRYER VD-800F) に一晩供し、よく乾固させた。GC/MS では、1.5 mL 容エッペンドルフチューブに入ったよく乾固させたサンプルに、要時調整したメトキシアミン-ピリジン溶液 (20 mg/mL-pyridine) を 100  $\mu\text{L}$  加え、インキュベーターにて  $30^{\circ}\text{C}$  90 分間、1200 rpm でメトキシ化反応させた。これにさらに、MSTFA (*N*-Methyl-*N*-

(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) を 50  $\mu$ L 加え、インキュベーターにて 37°C 30 分間 1200 rpm でシリル化反応させた。誘導体化反応後、サンプルを GC-MS 用サンプルバイアル (Chromacol クリンプトップバイアル GC-MS 用, Thermo Scientific) に 150  $\mu$ L すべて移し、GC/MS 分析を行った (GCMS-QP2010 ultra, Shimazu, Japan)。

LC-MS では、LC/MS 分析用サンプルを解凍・混和し、LC-MS サンプルバイアル (Chromacol ネジロキャップ付インサート入り透明ガラスバイアル, Thermo Scientific) に全量 (約 200  $\mu$ L) 移し、LC/MS 分析を行った (UHPLC Nexera, Shimazu)。

また、passive EAE では day5、day12 にそれぞれ L5 を摘出し、同様なメタボローム解析を行い WT と比較した。

## 5. 免疫 EAE に対する FAD (Flavin Adenine Dinucleotide Sodium) の投与

生後 6 週齢の雌性 C57BL/6 マウスに免疫 EAE を誘導し、FAD (Flavin Adenine Dinucleotide Sodium) 投与による症状変化を検討した。FAD 投与群 (EAE+FAD+、n=5) では day0 から連日 FAD 50mg/kg を腹腔内投与 (i. p. : intraperitoneal injection) かつ、1.5mg/ml 濃度で飲水させた。FAD 非投与群 (EAE+FAD-、n=5) では生理食塩水を i. p. し、通常の飲水をさせた。両群で臨床スコアと体重の推移を観察した。同一週齢の WT に対しても FAD 投与群と非投与群を用意し、体重変化を記録した (EAE-FAD+、EAE-FAD-、n=5 ずつ)。

## 6. 脾臓における免疫細胞の分画評価

上記実験 5 と同様な免疫 EAE の誘導で、FAD 投与群および FAD 非投与群、WT の 3 群において、day8 に脾臓を摘出した (EAE+FAD+ n=3, EAE+FAD- n=3, EAE-FAD- n=2)。

脾臓は cell strainer で各々すりつぶし、NH<sub>4</sub>Cl で溶血後、3ml の RP10 に希釈し 5  $\mu$ L を cell count し total cell を算出した。さらに 500  $\mu$ L を蛍光活性化セルソーティング (FACS : fluorescence-activated cell sorting) 用に抗体と反応させ、cell count と合わせ各細胞分画の細胞数を算出した。FACS では CD4、CD25、CD44、NK1.1、Gr-1、CD11b、Ly6c、CD3、I-A<sup>b</sup>、CD8、CD9 をソーティングした。

## 7. L5 腰髄における免疫細胞の分画評価

実験 6 と同様な免疫 EAE の誘導と 3 群において、ペントバルビタール

(0.04mg/g body weight; Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan)の腹腔内投与によりマウスを麻酔後、day13に冷PBSで心還流後にL5腰髄を摘出し、cell strainerで各々すりつぶした(WT+FAD<sup>-</sup> n=2, EAE+FAD<sup>+</sup> n=4, EAE+FAD<sup>-</sup> n=4)。実験4と同様にcell countを行い、CD4、CD11b抗体と反応させFACSを行った。

## 8. L5 腰髄の蛍光免疫染色

実験6と同様な免疫EAEの誘導と3群において、day13に冷PBSで心還流後にL5腰髄を摘出し、SCEM compound (SECTION-LAB Co. Ltd., Hiroshima, Japan)で包埋し、-80℃で保存した(Kawamoto, 2003)。ミクロトームにて14μmに薄切し、CD4、MHC class IIによる免疫蛍光染色を行った。

組織はCryofilm type III C (SECTION-LAB Co. Ltd.)に貼付し、100%エタノールで脱水、4% paraformaldehyde (PFA)で固定後、PBSで30分洗浄した。2%BSAで60分ブロッキングした後、一次抗体液に4℃で一晩反応させた。Fcレセプターのブロッキングのため、一次抗体液にanti-CD16/CD32 (2.4G2)を添加した。PBSで10分3回の洗浄後、室温で60分二次抗体と反応した。PBSでの洗浄後、Hoechst(33342, Life Technologies, Tokyo, Japan)により核染色し、PBSで洗浄した後に20%グリセロールでスライドガラスに封入し観察した。CD4染色は一次抗体にFITC anti-mouse CD4 Antibody (100510, Biolegend, Tokyo, Japan)を使用、MHC Class II染色はMHC Class II (I-A/I-E) Monoclonal Antibody (M5/114.15.2) Biotin(13-5321-85, eBioscience, San Diego, CA, USA)とStreptavidin PE-Cyanine7 Conjugate (10-4317-82, eBioscience)を使用した。

## 9. Evans blue の血液脳関門透過

実験6と同様な免疫EAEの誘導と3群において、day16に生理食塩水で溶解した5mg/mLのEvans blue (E2129-50G, Sigma)を0.2ml静脈内投与した。4時間後にPBSで心還流後にL3-L5腰髄を摘出し200μLのPFAに入れた。200μLのPFAにEvans blueを溶解し1mg/mL濃度を作成後、5倍ずつ希を繰り返して、0.1mg/mL~1.28×10<sup>6</sup>mg/mLのstandardを作成した。サンプルとstandardはそれぞれ100μLずつ96well platesに添加し、吸光計により620nm、680nmで吸光度を測定し、その差によりEvans blueの濃度を測定した(Wang and Lai, 2014)。これにより、血液脳関門の血管透過性を評価した。

## 10. 非免疫細胞の刺激

EAE に対する FAD の作用が、IL-6 アンプに関与しているかを検討するため、非免疫細胞をサイトカイン刺激し、FAD 投与有無による違いがあるかを評価した。ヒト近位尿細管上皮細胞 renal proximal tubule epithelial cells (RPTEC, CC-2553, Lonza, Switzerland) を用いた。これらの非免疫細胞を 96-well plates ( $1 \times 10^4$  cells/well) で培養し、starvation 後に human IL-6 (20 ng/ml; Toray Industries, Tokyo, Japan)、human soluble IL-6R- $\alpha$  (20 ng/ml; PeproTech INC., Rocky Hill, NJ)、TNF- $\alpha$  (20 ng/ml; PeproTech) で 90 分刺激した。FAD 投与群では FAD  $10 \mu\text{g/ml}$  濃度で添加した。サイトカイン刺激は IL-6 と TNF- $\alpha$  による共刺激も行った。Soluble IL-6R $\alpha$  は、非免疫細胞では通常 IL-6 signal-transducing receptor subunit gp130 のみを発現するため加えた。

## 11. Real Time Quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR)

7300 fast RT-PCR system (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) と SYBR Green PCR master mix (Kapa Biosystems, Woburn, MA) を用いて mRNA を定量した。細胞からの total RNA は RNA extraction kit と DNase I (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) を用いて抽出した。RT-PCR に用いた PCR プライマーの配列は下記の表 1 の通りである。RT-PCR は 40 cycles、 $95^\circ\text{C}$ 、15 秒、40 cycles、 $60^\circ\text{C}$ 、60 秒の条件で行った。Human の mRNA の発現量は GAPDH で補正した。

表 1. RT-PCR で用いたプライマー

Gene	Sequence
human GAPDH	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'
	5'-CGCTCCTGGAAGATGGTG-3'
human IL-6	5'-GGTACATCCTCGACGGCATCT-3'
	5'-GTGCCTCTTTGCTGCTTTTAC-3'

## 12. 共焦点顕微鏡による NF- $\kappa$ B p65 の核内移行実験

FAD が IL-6 アンプ、特に NF- $\kappa$ B pathway に関与しているかを確認するため、FAD による NF- $\kappa$ B p65 の核内移行の変化を検討した。

不死化処理した Human Brain Neuroglioma cell line (H4, Sumitomo Pharma, Japan)  $6.0 \times 10^4$  を micro slide 6 (VI 0.1) (ibidi, Gräfelfing, Germany) に流し incubation 後、2 時間の starvation 後に TNF- $\alpha$  (100 ng/ml) で 0 分、15 分、30 分間刺激した。刺激時の FAD ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) の有無による比較を行った。刺激した細胞は Cytofix solution (Cytofix/Cytoperm kit, BD Biosciences, San Jose, CA) で 10 分間固定し、Perm/Wash solution (Cytofix/Cytoperm kit) による洗浄、2% FBS による blocking 後、NF- $\kappa$ B p65 (C20) rabbit polyclonal IgG (1:50) (sc-372, Santa Cruz Biotechnology, California, USA) で 1 時間処理した。2 次抗体として Alexa Fluor 546 donkey anti-rabbit IgG (1:200)、核を Hoechst 33342 (1:10,000) で 30 分染色し、共焦点顕微鏡 LSM5 Pascal system (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) で観察した。P65 の局在が核内 > 細胞質にみられる細胞の数を計測した。

## 13. 共焦点顕微鏡による STAT3 の核内移行実験

FAD が JAK-STAT3 pathway に関与しているかを確認するため、FAD による STAT3 の核内移行の変化を検討した。

不死化処理した H4  $1.0 \times 10^5$  を micro slide 6 (VI 0.1) に流し incubation 後、2 時間の starvation 後に IL-6 (100 ng/ml) と human soluble IL-6R- $\alpha$  (100 ng/ml) で 0 分、15 分、30 分間刺激した。刺激時の FAD ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) の有無による比較を行った。刺激後、PBS での wash、4% PFA による固定の後、 $-20^\circ\text{C}$  の 100% メタノールと 10 分反応させた。Perm/Wash solution により 1 時間 blocking 後、anti-phospho STAT3 pY705 rabbit monoclonal Ab (1:100) (9145, Cell signaling technology, MA, USA) と 12 時間反応させ、2 次抗体として Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (1:1000) と 2 時間、Hoechst (1:5000) で 30 分染色し、共焦点顕微鏡で観察した。STAT3 の局在が核内 > 細胞質にみられる細胞の数を計測した。

## 14. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

FAD が IL-6 アンプを抑制するかを確認するため、サイトカイン刺激による IL-6 発現量を Human IL-6 ELISA MAX Deluxe set (Biolegend) を用いて評価した。

96-well plates ( $1 \times 10^4$  cells/well) に RPTEC を 24 時間培養後、IL-6 (20 ng/ml)、TNF- $\alpha$  (20 ng/ml)、human TGF- $\beta$  (100 ng/ml、PeproTech)、human IL-17 (20 ng/ml; PeproTech) による単独刺激と、IL-6 とその他のサイトカインによる共刺激を行った。それぞれの共刺激に FAD ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) を添加した。刺激時に加えた IL-6 を wash するため、刺激後 8 時間に DMEM  $300 \mu\text{L}$  ですべての well を wash した。FAD 投与群では wash 後の DMEM に FAD ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) を添加した。サイトカイン刺激から 24 時間後に wash 後、Human IL-6 ELISA MAX Deluxe set のプロトコールの通りに処理、スタンダード作成を行った。サンプルは 4 倍に希釈後、吸光計により 450nm、550nm で吸光度を測定し、その差により IL-6 の発現量を測定した。

### 15. FAD 暴露による病原 T 細胞の活性変化

実験 2 のごとく 6 週齢の雌性 C57BL/6 マウスを免疫し、移入 EAE モデルを作成した。Day0-9 までの免疫時に FAD 投与群 (n=16) と FAD 非投与群 (n=16) の 2 群に分け、FAD 投与群では連日 50mg/kg の FAD を i. p. かつ、1.5mg/ml 濃度の FAD を飲水させた。Day9 に脾臓を摘出し、CD4+T 細胞をソーティングし照射脾臓細胞とともに 2 日間培養した。培養の際、FAD 投与群では FAD  $10 \mu\text{g/ml}$  を培養液に添加した。Day11 に各群の培養細胞を抗 CD4 microbeads によりソーティングし、CD4+T 細胞  $1.5 \times 10^7$  個を 6 週齢の雌性 C57BL/6 マウスに静脈内投与した (FAD+ n=4、FAD- n=7)。移入後は両群ともに通常の食餌を与えた。移入日を day0 とし、マウスの臨床スコアと体重変化を観察した。

### 16. 統計学的解析

データは中央値±標準誤差で示した。解析は 2 群間の比較に Student's t tests を、2 群以上の比較には ANOVA test を用い、p-value <0.05 を有意差ありとした。

## 結果

### 1. L5 腰髄におけるメタボローム解析

C57BL/6 WT において後肢懸垂 (TS) による重力解除を行い GC/MS および LC/MS によるメタボローム解析を行った。正常飼育と比較して TS 群では L5 腰髄において、FAD の発現量が有意に減少した。FAD はビタミン B2 であるリボフラビンから誘導される補酵素である。一方、TS+ES 群では、TS 群と比較して FAD の発現量は増加した。

移入 EAE マウスでも同様の比較を行ったところ、day5 で WT と比較して有意に L5 での FAD 発現が増加し、day12 ではさらに FAD の発現量が増加した。

Day12 は移入 EAE において症状スコアがピークに達する時期であり、FAD は EAE に対して抑制的に働く可能性があることが示唆された。

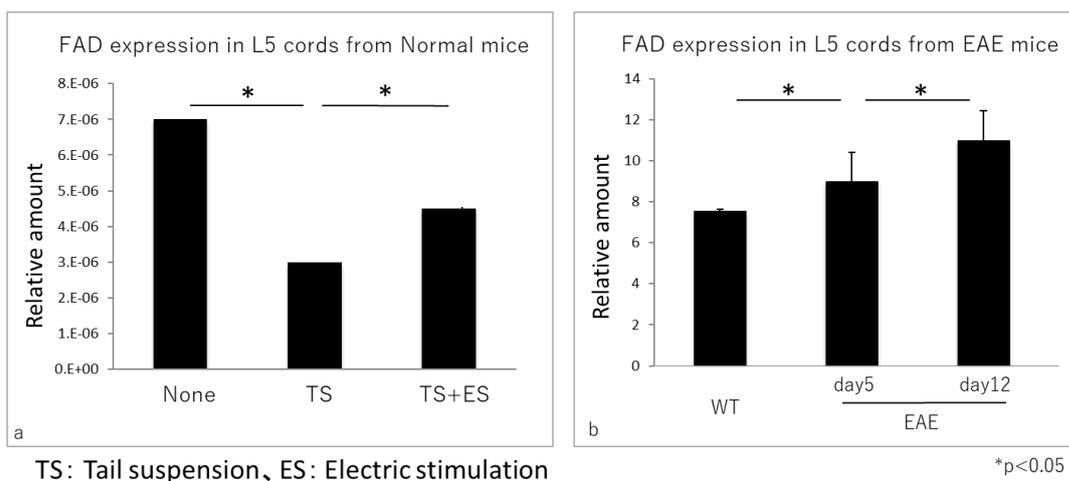


図. 1 a). 正常飼育された WT マウス (none)、後肢懸垂したマウス (TS)、後肢懸垂とヒラメ筋電気刺激を行ったマウス (TS+ES) の L5 腰髄での FAD の発現量。TS により L5 での FAD 発現が減少したが、ES の併用で FAD は増加した。

b). WT、移入 EAE day5、day12 における L5 腰髄での FAD の発現量。EAE では FAD 発現量が増加し、症状スコアが進行した day12 でさらに FAD は増加した。

## 2. EAE マウスでの FAD 投与

FAD が EAE に対して抑制的に作用するかを確認するため、免疫 EAE に対して FAD を投与し臨床スコアを評価した。FAD 非投与群 (EAE+FAD-) では 5 匹全例が麻痺を発症したのに対し、FAD 投与群 (EAE+FAD+) では 4 匹で発症せず、有意に臨床スコアが低下した (図. 2-a)。

一方、FAD 投与により WT、EAE ともに一過性の体重減少を認めた。

EAE+FAD- 群では麻痺が発症した day9 から day16 にかけて体重減少を認めたのに対し、EAE+FAD+ 群では day3-4 から体重減少を認めた後、麻痺が発症し始める day11 頃から体重は増加傾向に転じた。EAE+FAD+ 群の体重減少の推移は EAE-FAD+ 群と同様の傾向であった (図. 2-b)。よって EAE+FAD+ 群における体重減少は FAD 投与によるものと考えられる。

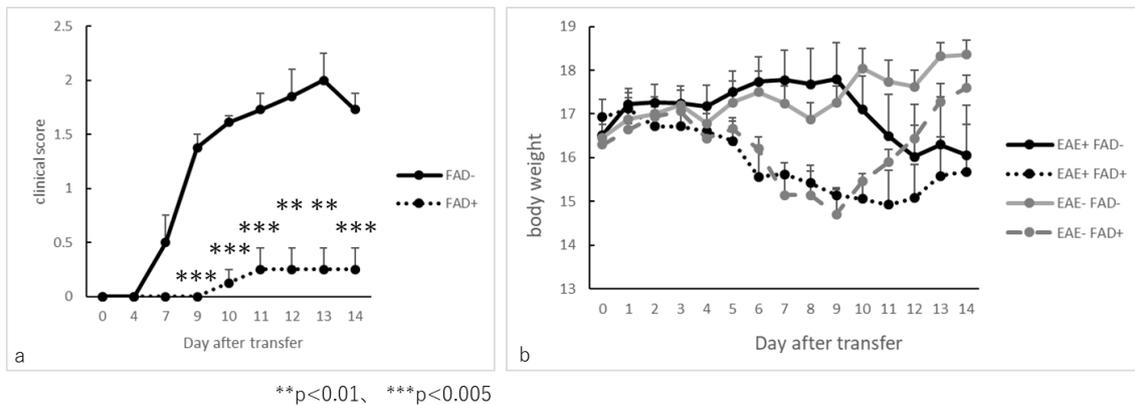


図. 2 a). FAD 投与有無による免疫 EAE の臨床スコア推移

FAD により臨床スコアが有意に抑制された。 (\*\* p<0. 01、\*\*\* p<0. 005)

b). WT、免疫 EAE 群における FAD 投与有無による体重推移

EAE+FAD-では麻痺に伴う体重減少を認めた。FAD 投与により、投与開始から一過性の体重減少を認めた。

### 3. 脾臓における免疫細胞の分画評価

免疫 EAE の day8 における脾臓細胞数を比較した。EAE では WT よりも脾臓の総細胞数は増加していたが、FAD の有無による有意な差を認めなかった (図 3)。

さらに脾臓細胞の分画を FACS により評価したところ、EAE において FAD 投与の有無による細胞分画の違いを認めなかった (図 4)。

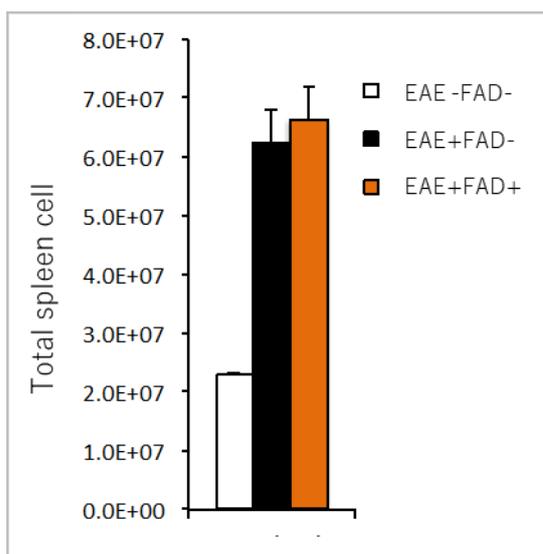


図 3. EAE day8 における脾臓細胞数

EAE では WT よりも脾臓細胞が増加するが、FAD 投与の有無による違いを認めなかった。

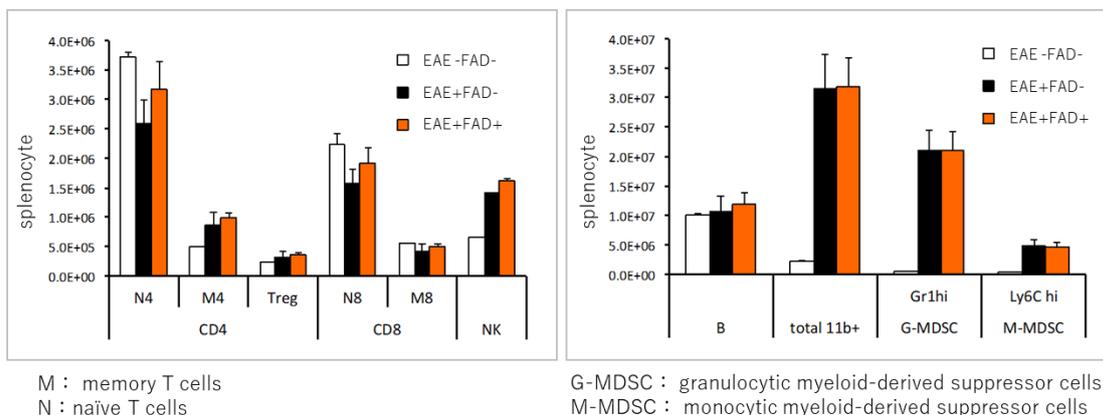


図 4. 脾臓における免疫細胞の分画

FAD 投与有無による免疫細胞の分画に違いを認めなかった。

#### 4. L5 腰髄における免疫細胞の分画評価

免疫 EAE の day13 において L5 腰髄の細胞分画を FACS により解析すると、EAE+FAD<sup>-</sup>において CD4<sup>+</sup>細胞および CD11b<sup>+</sup>細胞が増加していたが、FAD 投与ではいずれも増加を認めず、有意差を認めた(図 5)。

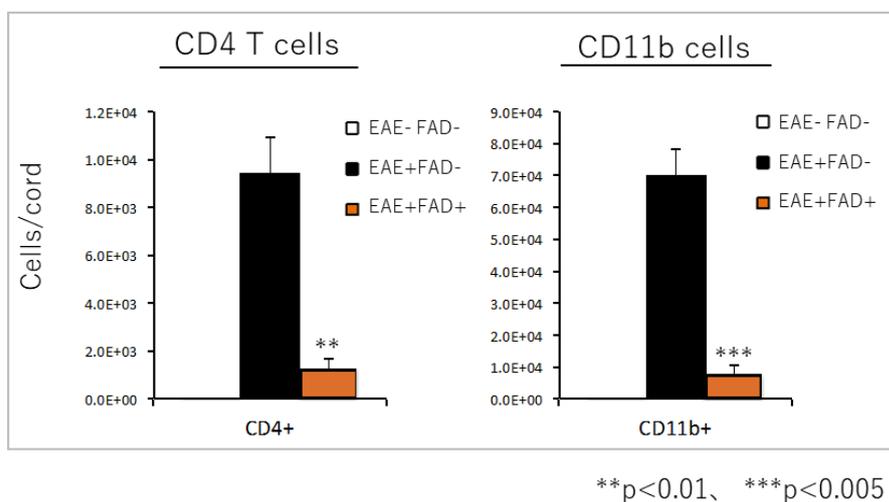


図. 5 免疫 EAE day13 における L5 の細胞分画。

EAE により L5 で CD4<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞が増加していたが、FAD 投与では増加を認めなかった。(\*\* p<0.01、\*\*\* p<0.005)

## 5. L5 腰髄の蛍光免疫染色

免疫 EAE の day13 において、L5 腰髄の蛍光免疫染色を施行した。核、CD4、MHC class II の染色を行ったところ、EAE では L5 周囲に CD4、MHC class II 陽性細胞を認めるが、FAD 投与によりこれらの発現を認めなかった (図 6)。

脾臓細胞の分画は FAD により変化しないが、腰髄周囲への CD4 や MHC class II 細胞の移行が障害されたことから、腰髄周囲微小血管での IL-6 アンプに FAD が関与している可能性が示唆された。

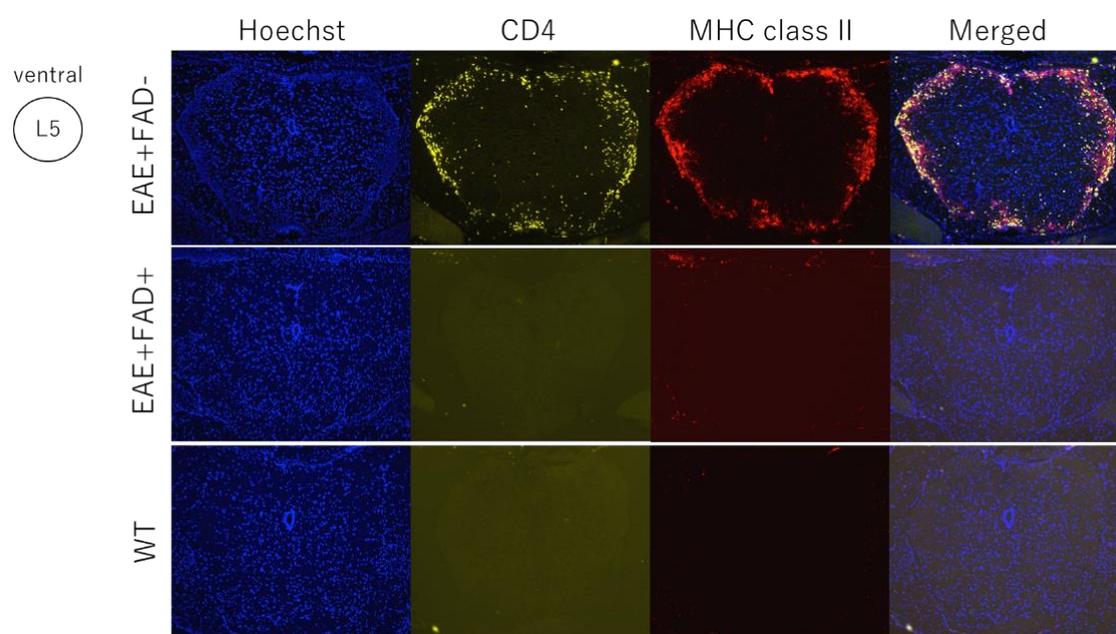


図 6. 免疫 EAE day13 における L5 の蛍光免疫染色  
FAD 投与では L5 周囲の CD4、MHC class II 陽性細胞の発現を認めなかった。

## 6. Evans blue の血液脳関門透過

血液脳関門の血管透過性を評価するため、免疫 EAE の day16 において Evans blue を静脈内投与し、L3-L5 腰髄への Evans blue 透過量を測定した。EAE+FAD<sup>-</sup>では Evans blue の透過量が増加するが、EAE+FAD<sup>+</sup>では、EAE<sup>-</sup>と同程度の透過量であった(図 7)。よって FAD 投与により、EAE における血液脳関門の血管透過性が抑制されることがわかった。

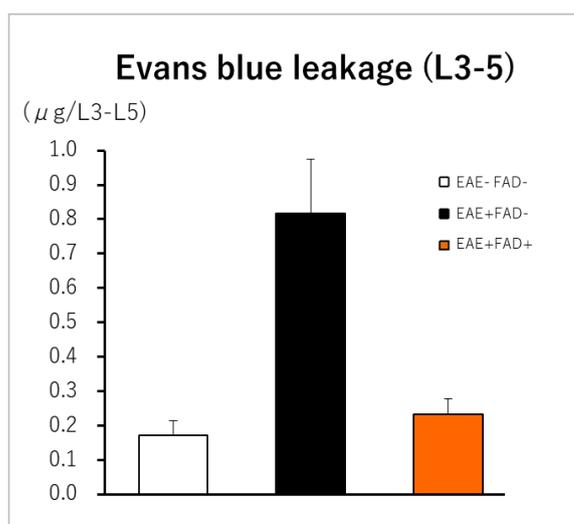


図 7. L3-L5 周囲への Evans blue 透過量  
FAD 投与により、EAE での Evans blue 透過が抑制された。

## 7. 非免疫細胞の刺激、RT-PCR

非免疫細胞に対しサイトカイン刺激を行い、IL-6の発現量を評価することで、FADがIL-6アンプに関与するかを検討した。RPTECをIL-6、TNF- $\alpha$ で刺激し、さらに共刺激に対してFADを添加すると、IL-6の発現はさらに有意に上昇した(図8-a)。

グルコースの高摂取は自己免疫疾患を悪化させ、EAEにおいても高グルコースが病態を悪化させる報告がある(Cao et al., 2017; Kleinewietfeld et al., 2013)。*in vitro*の実験では低濃度グルコース 5.5mMと中濃度グルコース濃度 25mMの間にサイトカイン活性で有意差を認めている(Zhang et al., 2019)。今回の実験系で使用したDMEMはグルコース濃度 4.5 g/mL(25mM)であったため、グルコース濃度を 1.0 g/mL(5.5mM)と低濃度に変更して同様の手順でIL-6の発現を評価した。グルコース濃度 1.0g/mL(5.5mM)でもFAD投与によりIL-6は上昇した(図8-b)。

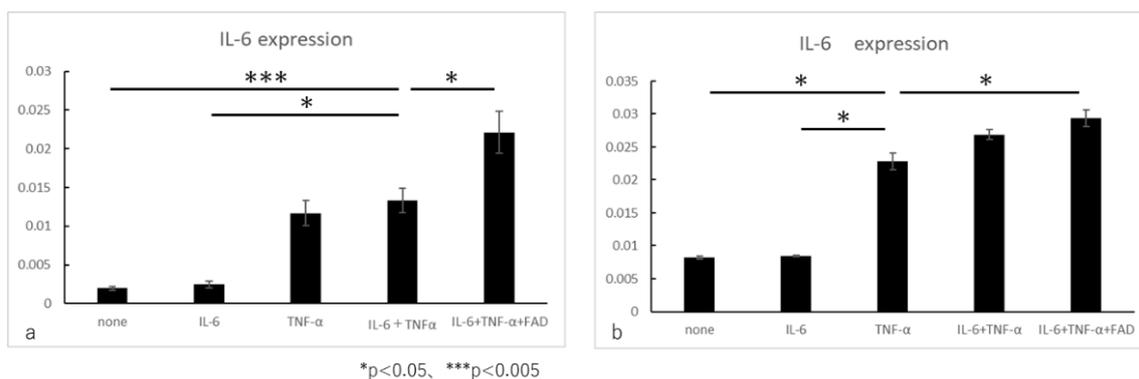


図8. 非免疫細胞刺激時のIL-6発現

FAD添加によりIL-6の発現量は増加した。

a). グルコース濃度 4.5g/mL、b). グルコース濃度 1.0g/mLのいずれにおいてもFAD投与によりIL-6の発現量は増加した。

(\* p<0.05、\*\*\* p<0.005)

## 8. 共焦点顕微鏡による NF- $\kappa$ B p65 の核内移行実験

FAD が IL-6 アンプ、NF- $\kappa$ B pathway に関与しているかを確認するため、FAD による NF- $\kappa$ B p65 の核内移行の変化を検討した。

不死化した H4 を TNF- $\alpha$  により刺激し、FAD 投与による p65 の核内移行の変化を観察した。FAD 投与群でも同様に p65 は核内移行し、FAD による移行阻害を認めなかった(図 9)。

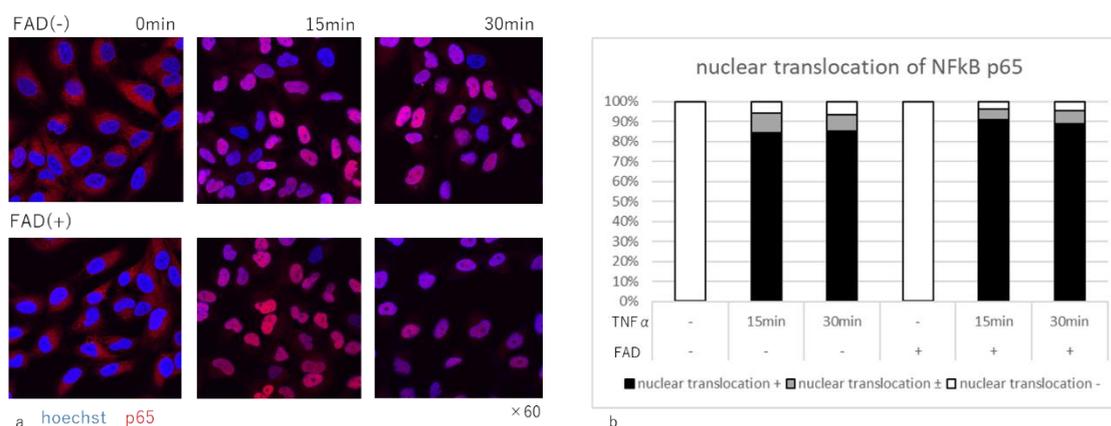


図 9. TNF- $\alpha$  刺激による NF- $\kappa$ B p65 の核内移行

- TNF- $\alpha$  の刺激により核内移行した p65 は桃色に染まっている。
- p65 が核内移行した細胞数の割合。FAD 添加による核移行の変化を認めなかった。

## 9. 共焦点顕微鏡による STAT3 の核内移行実験

FAD が JAK-STAT3 pathway に関与しているかを確認するため、FAD による STAT3 の核内移行の変化を検討した

不死化した H4 を IL-6 により刺激し、FAD 投与による STAT3 の核内移行の変化を観察した。IL-6 の刺激から 15 分では STAT3 は核内移行するが、その後は再度核外に戻るために刺激後 30 分では核内の STAT3 の割合は減少する。FAD 投与群でも同様な核移行変化を認め、核移行阻害を認めなかった (図 10)。

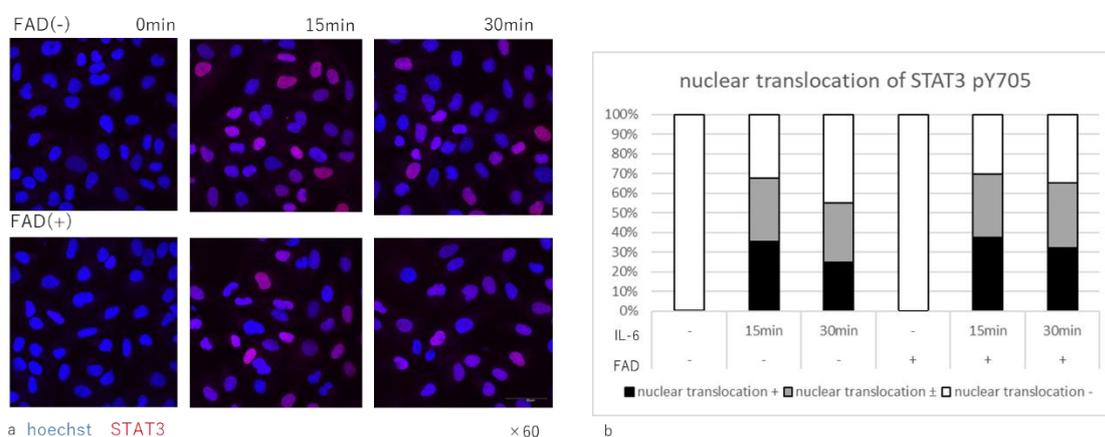


図 10. IL-6 刺激による STAT3 の核内移行

- a). IL-6 の刺激により核内移行した STAT3 は桃色に染まっている。  
 b). STAT3 が核内移行した細胞数の割合。FAD 添加による核移行の変化を認めなかった。

## 10. ELISA

RPTEC を各サイトカインで刺激し、刺激後 24 時間の IL-6 発現量を ELISA により測定した。IL-6 と TNF- $\alpha$ 、IL-6 と IL-17 の共刺激ではそれぞれの単独刺激よりも IL-6 発現は上昇した。IL-6 と TNF- $\alpha$ 、IL-17、TGF- $\beta$  によるに対して FAD を添加すると、いずれも IL-6 の発現量が増加した。IL-6 と IL-17 の共刺激でのみ、FAD 投与による IL-6 発現上昇に有意差を認めた (図 11)。

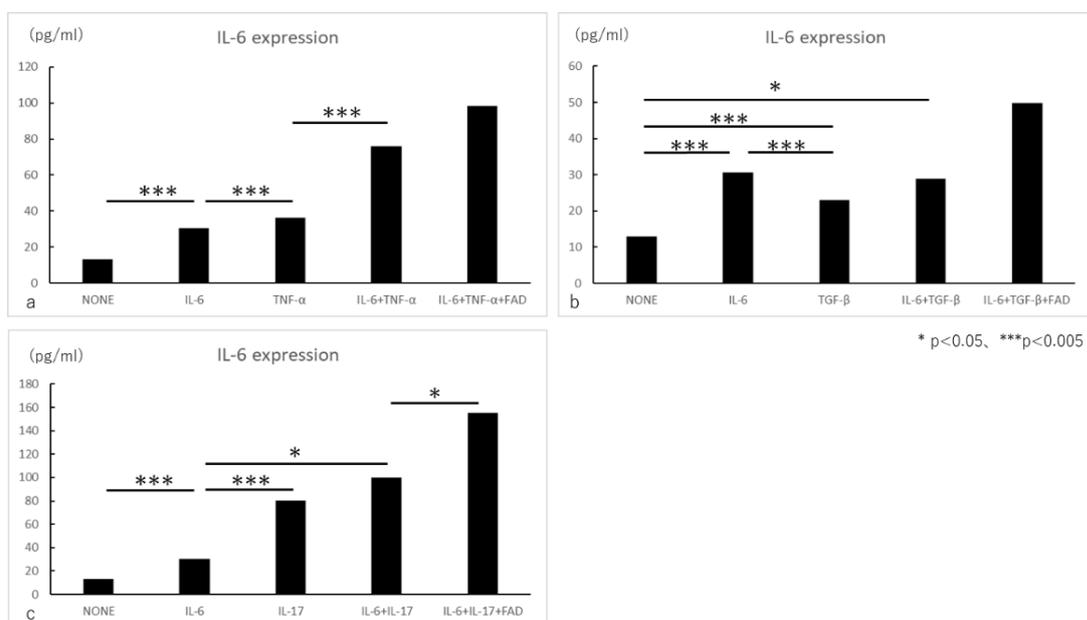


図 11. 非免疫細胞に対するサイトカイン刺激時の IL-6 の発現量。いずれの共刺激においても、FAD により IL-6 発現は上昇した。

(\* p<0.05, \*\*\* p<0.005)

## 11. FAD 暴露による病原性 CD4+T 細胞の活性変化

MOG 免疫時の FAD 投与有無の違いで、移入 EAE に変化を認めるかを観察した。FAD+群は 4 匹、FAD-群は 7 匹に CD4+T 細胞を移入した。FAD+群では 4 匹全例で麻痺を発症せず、FAD-群では 7 匹中 4 匹で麻痺を発症した(図 11-a)。FAD-群で臨床スコアが 0 で経過したマウスでも、発症したマウスと同様に一過性の体重減少を認め、図 11-b のように 2 群で有意な体重差を認めた。FAD+群では、病原 T 細胞の活性が FAD により抑制され、移入後に麻痺を発症させなかった可能性があると考えられる。

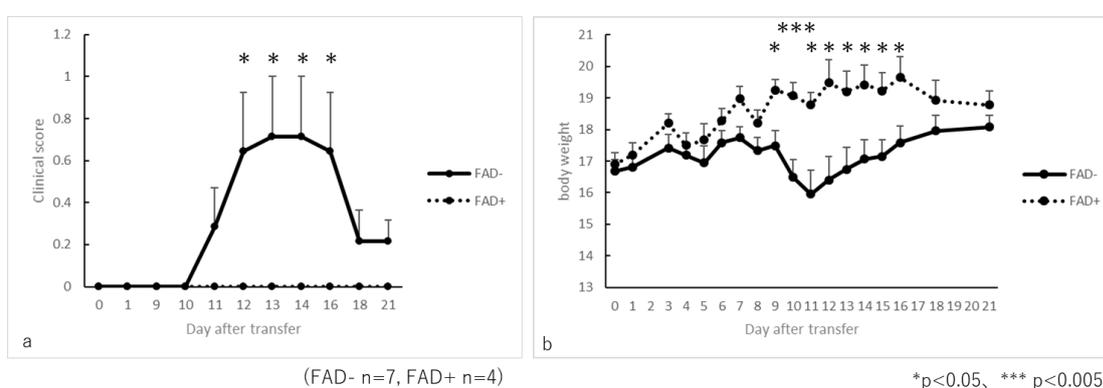


図 12. 病原 T 細胞移入前の FAD 暴露の有無による臨床スコアと体重変化の推移

- 臨床スコアの推移。FAD+群では EAE が抑制され、臨床スコアに有意差を認めた。
- 体重変化の推移。FAD-群でのみ麻痺発症時期に一過性の体重減少を認めた。(\* p<0.05, \*\*\* p<0.005)

## 考察

WT の通常飼育、TS、TS+ES の 3 群において、GC/MS および LC/MS により L5 のメタボローム解析を行い、100 を超える代謝物について検討を行った。TS により発現が抑制し、TS+ES で増加するものに FAD が挙げられた。同様に EAE マウスにおいて解析したところ、発症に伴い FAD が経時的に上昇した。ヒラメ筋刺激に伴う腰髄 L5 刺激、および EAE での L5 腰髄周囲の炎症に伴い FAD が反応性に上昇している可能性が考えられた。次に EAE 発症前からマウスに FAD を投与したところ、EAE 発症を有意に抑制した。以上から FAD は中枢神経の炎症に対して抑制的に作用する因子であると考えられ、次にその機序について検討した。

移入 EAE では MOG で免疫したマウスの脾臓から病原 T 細胞を採取し移入する。この脾臓における免疫細胞の分画では、FAD 投与による違いを認めなかった。EAE において、L5 腰髄周囲での微小血管で IL-6 アンプが活性化され、病原 T 細胞は L5 周囲の血液脳関門から髄腔内に入り、L5 レベルで中枢神経の炎症が起こる。本検討では EAE 発症時の血液脳関門の透過性が FAD により抑制され、L5 周囲での CD4+T 細胞の集積が抑制されたことから、血液脳関門周囲での IL-6 アンプに対し FAD が抑制的に働き、髄腔内への T 細胞移行を阻害していると考えられた。

EAE では L5 周囲血管で IL-6 アンプが活性化することが報告されている (Arima et al., 2012)。よって次に *in vitro* で FAD が IL-6 アンプに抑制的に関わるかを検討した。非免疫細胞の刺激後の RT-PCR、ELISA の検討では、FAD により IL-6 発現は上昇した。また IL-6 アンプに関わる NF- $\kappa$ B pathway、および JAK-STAT3 pathway への FAD の関与について検討したが、FAD 投与による変化を認めなかった。EAE は高血糖下での症状悪化、ROS 活性の関与の報告があるため (Cao et al., 2017; Kleinewietfeld et al., 2013; Zhang et al., 2019)、培養液の条件、FAD 投与量の調整による条件検討を行ったが、いずれも *in vitro* では FAD による IL-6 の発現低下を認めなかった。

FAD はビタミン B2 であるリボフラビンから誘導される酸化還元反応の補因子であり、水素の授受に関与する。例えば LSD1 (リジン特異的脱メチル酵素 1) はメチル化されたヒストン 3 リジン 4 (H3K4) を脱メチル化し、ミトコンドリア内での転写抑制やエネルギー代謝に関わる酵素であり、FAD 依存性である (Duteil et al., 2014; Hamamoto et al., 2015; Hino et al., 2012)。LSD1 は好気呼吸や脂肪分解等のエネルギー消費に関わる遺伝子を負に制御

する。つまり、LSD1 が活性化されるとエネルギー消費を抑制し、一方 LSD1 の活性抑制により飢餓刺激下では貯蔵エネルギーの消費を亢進させるとされている。FAD によるマウスの体重変化はこの一連のエネルギー消費に関連した反応である可能性があるが、FAD はエネルギー代謝を直接的に制御するものではない。また WT における体重減少がエネルギー消費亢進によるものだとしたら、その誘因が明らかでなかった。このように FAD がエネルギー産生や細胞代謝に関わることから、先に述べた *in vitro* での条件検討を行ったが、FAD が IL-6 アンプを抑制し、中枢神経の炎症を抑制するという仮説には矛盾する結果だった。

次に FAD が病原 T 細胞の機能を直接的に阻害する可能性を考えた。MOG 免疫時に FAD を投与したマウスから CD4+T 細胞を採取しこれを移入したところ、移入 EAE での発症が抑制された。移入後のマウスには FAD 投与を行っていないことから、免疫時の FAD 暴露により CD4+T 細胞が MOG に対して病原性を獲得しなかった可能性が考えられる。しかし免疫 EAE からの脾臓細胞採取、FACS による細胞分画の評価では FAD 投与有無による免疫細胞の分画の違いを認めておらず(実験結果 3)、今回検討していない細胞マーカーについての追加検討など、CD4+T 細胞の機能的変化についてさらなる検討が必要である。

## 第 2 章

### 中枢神経炎症と排尿機能障害との関連の検討

(studies on the impact of inflammation of central nervous system  
to urinary dysfunction)

## 緒言

MS では初期に排尿症状を認めることは少ないが、50～90%で過活動膀胱を呈し、その半数は排尿筋尿道括約筋協調不全を呈するとされる。しかし脱髄部位により神経症状は異なり、また再燃・寛解の経過を通じて症状が変化するため、患者により排尿症状は多彩である。未だ排尿障害の診断や治療には苦慮することがある(Aharony et al., 2016)。

中枢神経の自己免疫疾患および炎症性疾患での排尿障害についての検討、モデル動物での排尿障害の検討は少ない(Mizusawa et al., 2000; Negoro et al., 2013)。中枢神経の炎症性疾患では排尿症状が個々で変化するため、治療オプションも異なる。さらに急性期でみられた身体的な症状が軽快した後も、排尿障害が残存する症例が存在する。また、下部尿路障害の原因・機序は多様であり著しいQOL低下の原因となりうるが、下部尿路障害と中枢神経の炎症や精神的ストレスとの関係についての検討・報告は少ない。

MSの動物モデルであるEAEにおいて、特定の神経回路の活性化により特定の血管ゲートが形成され、局所炎症が起こる機序であるゲートウェイ反射が報告されている(Andersson and Tracey, 2012; Kamimura et al., 2020; Tracey, 2016)。また、EAEではストレス応答により脳内で生じた微小炎症が、神経回路を新たに活性化させることで、その神経に支配される臓器の機能を変容させる可能性が示唆された(Arima et al., 2017)。

EAEモデルを用いて、中枢神経の自己免疫疾患および炎症による排尿変化について検討した。また下部尿路障害モデルにEAEを誘導し、中枢神経の炎症誘導や下部尿路症状に対するストレス反応について、ゲートウェイ反射を応用し検討した。

## 方法

### 1. 実験動物

生後 6-8 週齢の雌性 C57BL/6 マウスに第 1 章で述べた処置を行い、移入 EAE モデルを作成した。対照として EAE 処置を行わない雌性 C57BL/6 マウスを wild type (WT) 群とした。

下部尿路障害モデルは同様の C57BL/6 マウスに対して後述の処置を行い、下部尿路閉塞モデル (BOO: bladder outlet obstruction) および間質性膀胱炎モデル (IC: interstitial cystitis) を作成した。

本研究に関する実験プロトコールは北海道大学動物実験委員会によって承認された。飼育および実験に関しては、北海道大学医学研究科「動物実験に関する指針 (Guide for the Care and use of Laboratory Animals)」に準拠した。

### 2. 24 時間排尿記録

移入 EAE モデルにおいて、病原 T 細胞移入前 (6 週齢)、臨床スコアのピーク時、移入後 4 週、6 週にそれぞれ排尿代謝ケージを用いた aVSOP 法 (automated Voided Stain on Paper: アレイバイオサイエンス, Kyoto, Japan) (Negoro et al., 2013) により 24 時間の排尿回数と 1 回尿量を計測した。同一週齢の WT 群の排尿変化も追跡した。

### 3. 組織の凍結保存

ペントバルビタール (0.04mg/g body weight) の腹腔内投与によりマウスを麻酔し、冷 PBS に心還流後、膀胱、脊髄、脳を摘出した。組織は SCEM compound で包埋し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 5. 膀胱の組織学的検討

移入 4 週後の EAE と、10 週齢 WT の凍結膀胱をマイクロトームにて  $10\mu\text{m}$  に薄切し、組織学的検討のため Hematoxylin and eosin (HE) 染色を行った。各サンプルで膀胱筋層の厚さをランダムに 3 か所計測し、平均値を比較した (EAE n=2、WT n=2)

### 6. 膀胱機能学的検討

ペントバルビタール (0.04mg/g body weight) の腹腔内投与による麻酔後に下腹部正中切開をおき、膀胱頂部からポリエチレン製カテーテル (PE-50,

Clay Adams, Parsippany, NJ)を挿入し、先端を膀胱内に留置した。カテーテルは6-0吸収糸にて膀胱壁に固定し、周囲に明らかなリークがないことを確認した後に、もう一方の先端をマウスの背側から体外に出した(Uvin et al., 2012)。下腹部を閉創し翌日、覚醒下に三方活栓を介してカテーテルを圧モニターおよび生理食塩水注入ラインと接続し、尿流動態測定システム(Nihon Kohden, Tokyo, Japan)にて膀胱内圧測定(CMG: cystometrography)を行った。生理食塩水を1.2ml/hで注入し、排尿時圧をAcq Knowledge 3.7.1(Biopac Systems Inc., Santa Barbara, CA)にて記録し解析した。

## 7. 脊髄、脳の免疫蛍光染色

移入4週後のEAEと、10週齢WTのL5腰髄をマイクロームにて14 $\mu$ mに薄切し、CD4、MHC class IIによる免疫蛍光染色を行った。染色手順は第1章-8と同様に行った。CD4染色は一次抗体にFITC anti-mouse CD4 Antibody(100510, Biolegend, Tokyo, Japan)を使用、MHC Class II染色はMHC Class II (I-A/I-E) Monoclonal Antibody (M5/114.15.2) Biotin(13-5321-85, eBioscience, San Diego, CA, USA)とStreptavidin PE-Cyanine7 Conjugate (10-4317-82, eBioscience)を使用した。

脳は10 $\mu$ mに薄切し、同様の手順でcFos染色を行った。一次抗体、二次抗体はそれぞれanti-c-Fos antibody(ab208942, abcam, Cambridge, UK)、Goat anti-mouse IgG1 cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Flour 488 (A21121, Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA)を使用した。

## 8. 下部尿路障害モデルの作成

下部尿路障害の疾患モデルとして、下部尿路閉塞(BOO: bladder outlet obstruction)モデルと、間質性膀胱炎(IC: interstitial cystitis)モデルを作成した。BOOモデルは尿道狭窄や前立腺肥大症の疾患モデルであり、排出障害、残尿増加、頻尿等を呈する(Kanno et al., 2016; Metcalfe et al., 2010)。ICモデルは膀胱痛、1回蓄尿量の減少、頻尿等を呈する(Dogishi et al., 2015; Dogishi et al., 2017; Homan et al., 2013)。BOOは生後8週齢の雌性C57BL/6マウスに対しペントバルビタール腹腔内投与による麻酔ののち、下腹部正中切開をおいた。尿道周囲を剥離し、0.55mmの金属ロッドを介在して4-0絹糸で尿道周囲を結紮した。金属ロッドを除去し、腹部を閉創した。対照となるsham群では、尿道周囲の剥離の

みを行い閉創した。

IC モデルは生後 6 週齢の雌性 C57BL/6 マウスに対し同様の麻酔を行い、0.5% 過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) 50  $\mu$  L を経尿道的に膀胱内に注入し、60 分後に生理食塩水で洗浄した。Sham 群では  $H_2O_2$  の代わりに生理食塩水を 50  $\mu$  L 膀胱内に注入した。処置日を day0 とした。

IC モデル (day1、day7、day14) の膀胱組織を HE 染色し、同一週齢の sham と比較した。また、B00 モデルにおいて 24 時間排尿記録を行い (処置前 8 週齢、10 週齢、12 週齢、14 週齢、16 週齢)、同様に sham と比較した (各群 n=4)。

### 9. 下部尿路障害モデルに対する病原 T 細胞の移入

8 週齢で B00 処置を行い、16 週齢で MOG 特異的病原性 CD4+T 細胞を移入し、EAE スコアの変化を B00-sham と比較した (B00 n=13、sham n=10)。

IC マウスは 6 週齢で IC 処置を行い、day1 に病原 T 細胞を移入し、IC-sham と EAE スコアを比較した (n=10 ずつ)。

### 10. 統計学的解析

データは中央値±標準誤差で示した。解析は群間の比較に Student' s t tests を用い、p-value <0.05 を有意差ありとした。

## 結果

### 1. 移入 EAE モデルのスコアリング

6 週齢の雌性 C57BL/6 マウス (n=6) に病原 T 細胞を移入すると、図 12 のように day10-12 をピークに麻痺を発症し、day20 頃に定常状態となった。

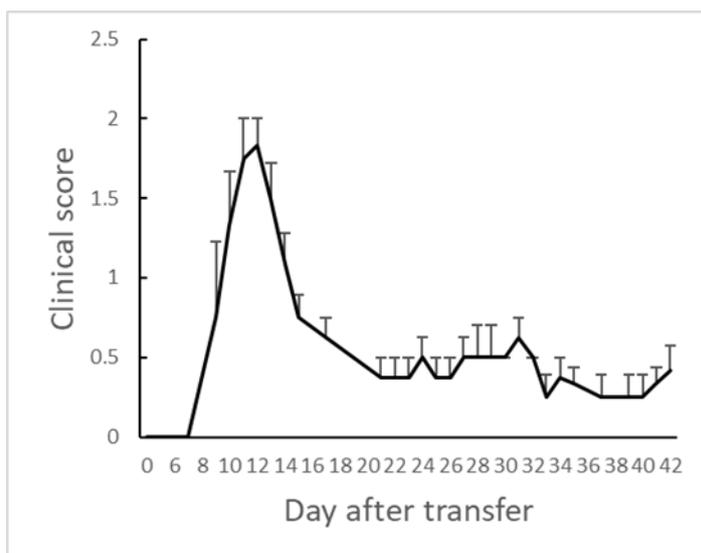


図 12. 移入 EAE マウスの臨床スコア  
day10-12 をピークに一過性の麻痺を発症した。

## 2. 24 時間排尿記録

6 週齢で病原 T 細胞を移入した移入 EAE と、同一週齢の WT 群の 24 時間排尿記録を比較した (WT n=4、EAE n=6)。WT 群では、図 13 のように 1 日排尿回数や 1 回尿量の週齢による有意な変化を認めなかった。一方 EAE 群では麻痺発症とともに 1 日排尿回数が減少し、1 回平均容量が増加した。移入後 6 週目で麻痺が寛解した後も、1 回尿量は増加したままであり、10 週齢で WT 群との間に有意差を認めた。

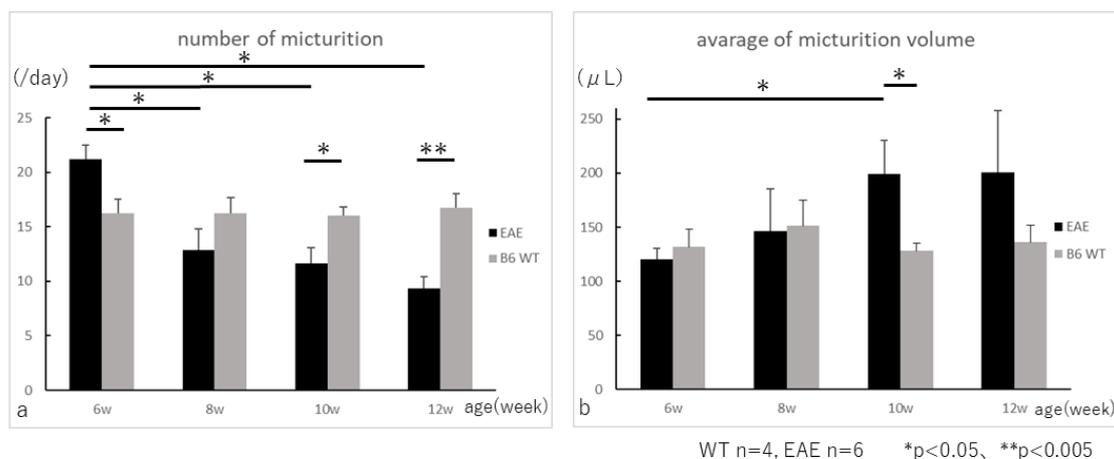


図 13. EAE 群と WT 群の排尿変化

### a). 1 日排尿回数の変化

WT では週齢間の変化がないのに対し、EAE では週齢とともに排尿回数の減少を認めた。(\* p<0.05、\*\*<0.005)

### b). 1 回平均尿量の変化

WT では週齢間に有意な変化を認めなかったが、EAE では 1 回尿量が増加し、麻痺が寛解した 12 週齢でも 1 回尿量は増加したままであった。

### 3. 膀胱の組織学的検討

1回尿量の違いがみられるWT群とEAE群で、それぞれ10週齢(EAEは移入4週後)の膀胱組織をHE染色により比較した。WT群とEAE群の膀胱において形態学的変化を認めなかった(図14)。筋層の厚さはEAEで $344.6(\pm 12.61)\mu\text{m}$ 、WTで $323.2(\pm 6.13)\mu\text{m}$  ( $p=0.133$ )で有意差を認めなかった。

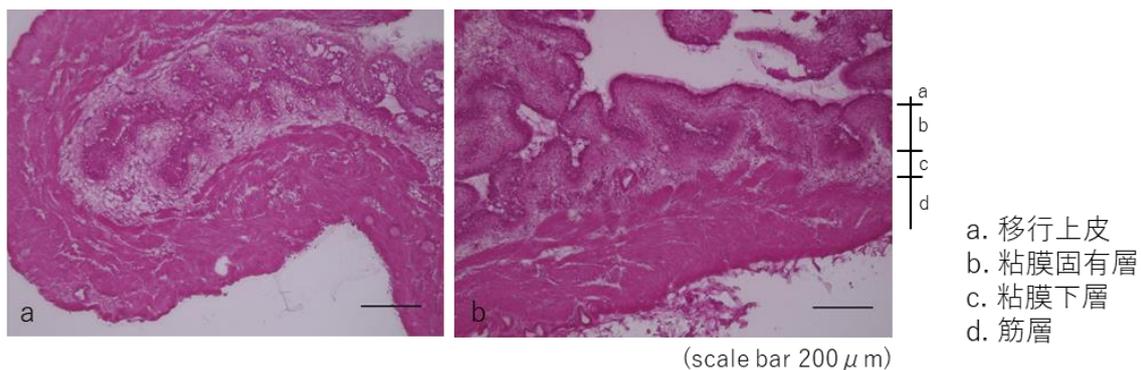


図14. 10週齢の膀胱組織のHE染色(a: EAE群、b: WT群)組織学的な違いを認めなかった。

#### 4. 膀胱機能学的検討

6週齢の雌性 C57BL/6 マウスに病原 T 細胞を移入し、8 週齢、10 週齢、12 週齢で CMG を施行し排尿時膀胱内圧を測定し、同一週齢の WT と比較した (n=3-4)。WT 群では膀胱内圧は経時的に有意な変化がなかったのに対し、EAE 群では 10 週から 12 週にかけて膀胱内圧が有意に上昇し、12 週齢において WT 群との間に有意差を認めた。

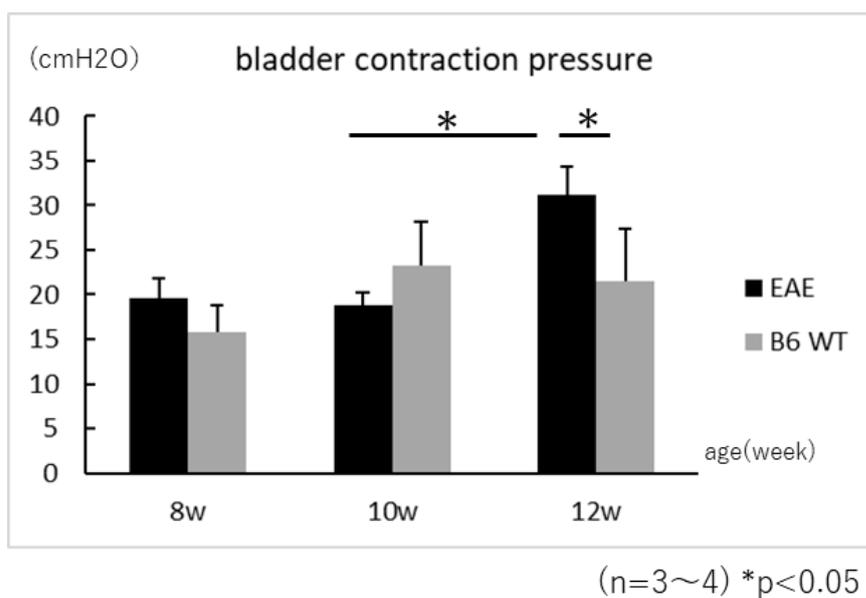


図 15. EAE 群と WT 群における CMG による排尿時圧の変化  
EAE 群では 10 週齢から 12 週齢にかけて排尿時圧が上昇し、12 週齢で WT との間に有意差を認めた。(\* p<0.05)

## 5. 脊髄の免疫蛍光染色

移入 4 週後の EAE と 10 週齢 WT の腰髄 L5 を CD4、MHC class II で染色した。EAE で L5 周囲に CD4、MHC class II 陽性細胞を認めた (図. 16)。

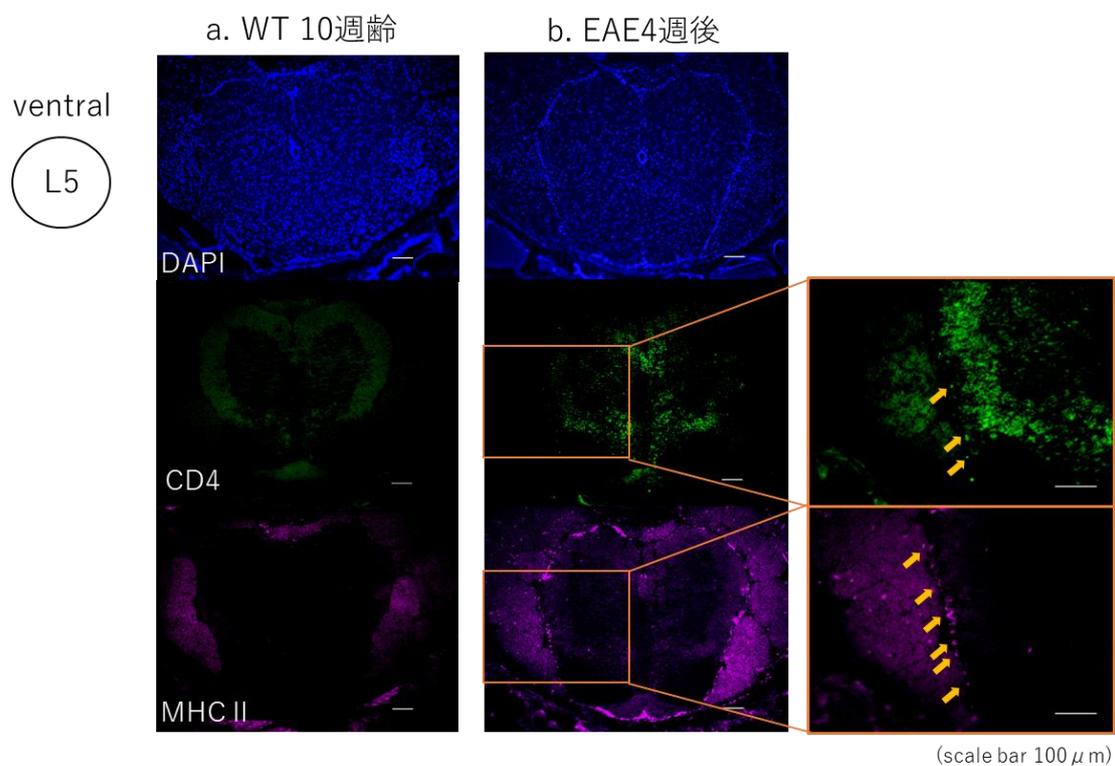


図 16. 腰髄 L5 の免疫蛍光染色 (CD4、MHC class II)

移入 4 週後の EAE では L5 周囲で CD4、MHC class II 陽性細胞を認めた。

## 6. 脳の免疫蛍光染色

EAE 後の排尿中枢の神経活性の確認として、中脳水道の cfos 染色を行った。EAE スコアがピークの頃には中脳水道周囲で cfos 陽性となったが、移入 4 週後では同部の cfos は陰性であった(図 17)。

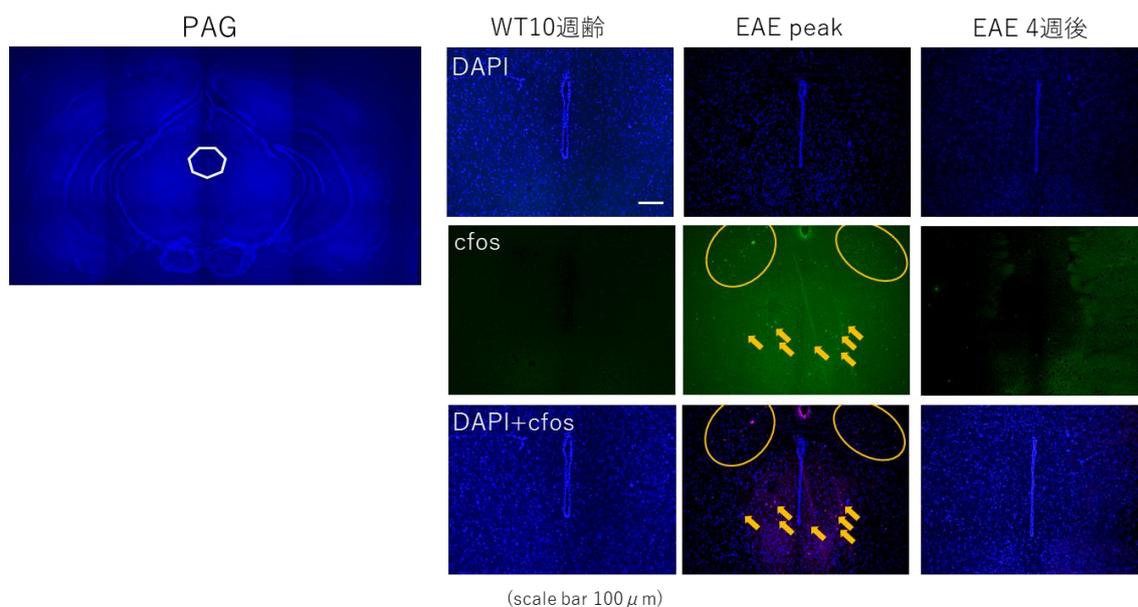


図 17. PAG の免疫蛍光染色(cfos)

EAE ピーク時には PAG 周囲で cfos 陽性であったが、移入 4 週後には cfos 活性を認めなかった。

## 7. IC モデルの膀胱 HE 染色

IC モデルと IC-sham マウスの膀胱組織を HE 染色により比較した。IC では  $H_2O_2$  投与翌日に膀胱間質の著明な浮腫を認めた。徐々に浮腫は軽減したが、処置後 14 日目でも浮腫は残存していた(図 18)。

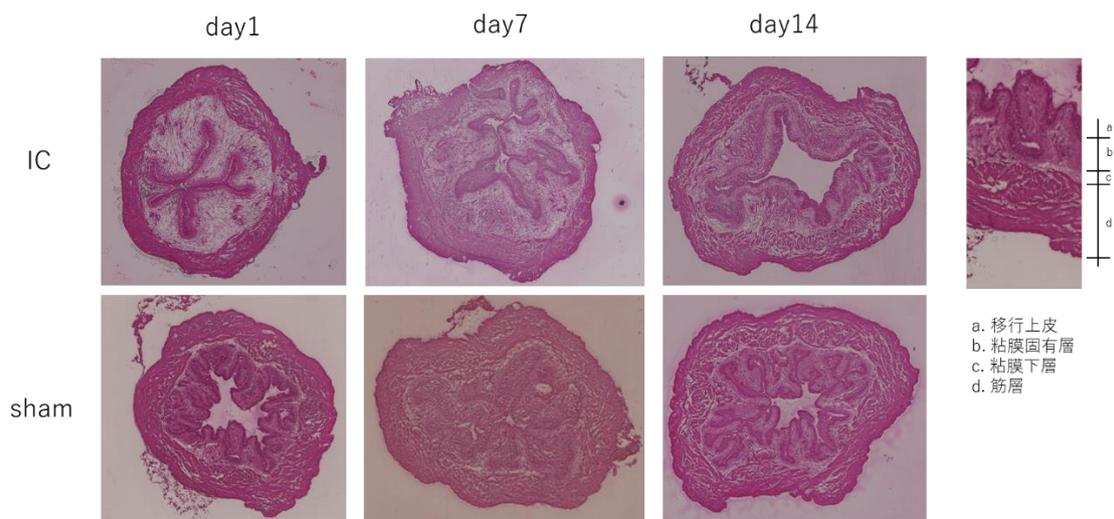


図 18. IC と IC-sham マウスの膀胱 HE 染色の変化(上段：IC、下段：sham)  
IC では  $H_2O_2$  投与により粘膜下層の著明な浮腫を認め、投与 14 日目においても浮腫が残存していた。

## 8. B00 モデルの 24 時間排尿記録

8 週齢で処置した B00 群 (n=4) と B00-sham 群 (n=4) の 24 時間排尿記録を行い、1 日排尿回数と 1 回排尿量の変化を比較した。8 週齢の評価は処置前に行った。B00-sham 群では 1 回尿量、排尿回数ともに経時的に有意な変化を認めなかった。B00 群では処置後から 1 回尿量が減少、1 日排尿回数は増加し、術後 8 週で術前と同程度の排尿状態に戻った。B00 群では 1 回尿量、排尿回数ともに 8 週齢と 10 週齢の間に有意差を認めた (図 19)。

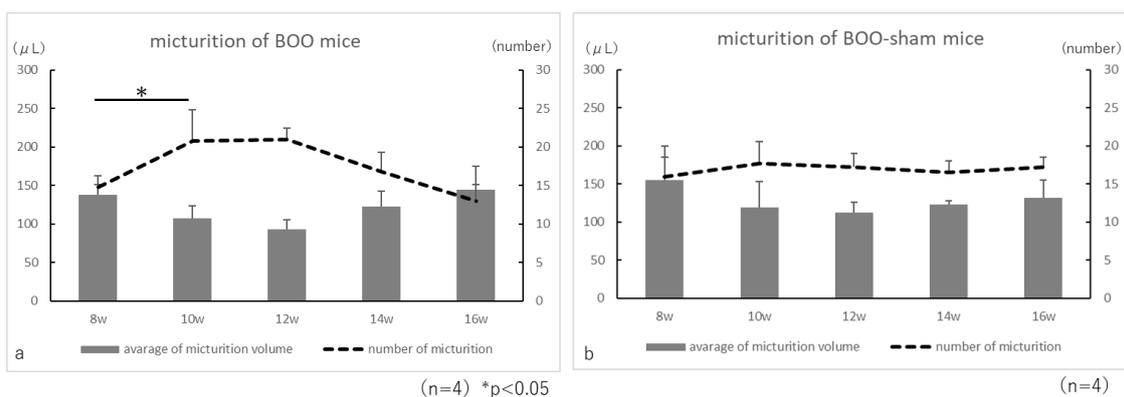


図 19. a). B00 と b). B00-sham の 24 時間排尿記録の変化

B00 群では 8 週から 10 週にかけて 1 回尿量が減少し、排尿回数が増加した。  
(\*  $p < 0.05$ ) Sham 群では週齢による有意な変化を認めなかった。

## 9. 下部尿路障害モデルに対する病原 T 細胞の移入

術後 8 週の B00 と B00-sham (B00 n=13, sham n=10)、処置後 1 日目の IC と IC-sham (IC n=10, sham n=10) にそれぞれ病原 T 細胞を移入した。

B00、IC ともに病原 T 細胞移入後の臨床スコアは、sham マウスと比較して有意な変化を認めなかった (図 20)。

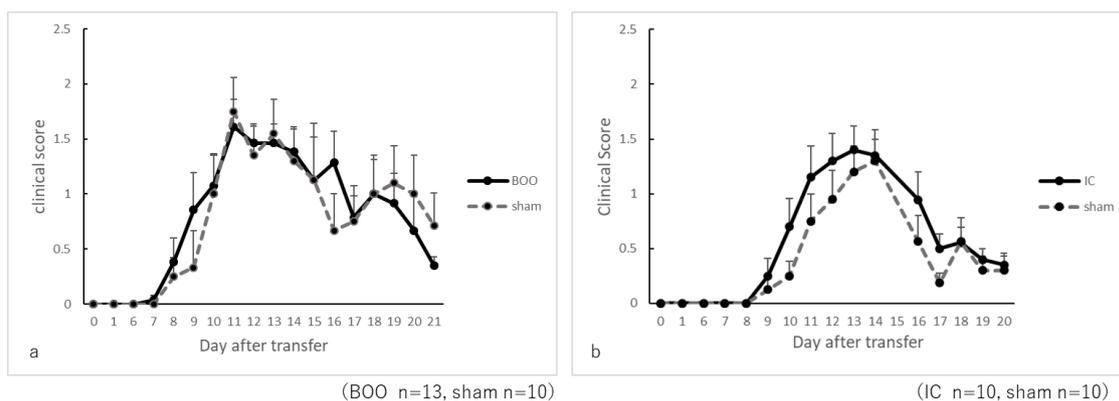


図 20. 病原性 CD4+T 細胞移入後の臨床スコアの変化

a). B00 と B00-sham の比較。

b). IC と IC-sham の比較。

B00、IC ともに sham との間に有意な変化を認めなかった。

## 考察

EAE 移入マウスでは麻痺発症とともに 1 日排尿回数が減少し、1 回平均尿量が増加した。麻痺が発症する頃には一過性に体重減少を認め、衰弱や食餌摂取が減少するマウスもいる。よって排尿回数は飲水量の変化により変動しうる。一方 1 回尿量、膀胱容量は体重変化や衰弱による変化は少なく、神経障害の影響を受けていると考えられる。免疫 EAE モデルでの排尿評価を行った報告 (Negoro et al., 2013) では同様に aVSOP により 1 回尿量を測定しており、急性期、慢性期にかけて次第に 1 回尿量は減少したと報告しており、本研究とは異なる結果であった。しかしこのモデルは day20 に麻痺がピークに達したのちも麻痺が維持され、今回評価に用いた麻痺寛解を呈する移入モデルとは臨床症状が異なる。実際、動物種の違いや系統の違いで EAE に感受性の差があり、EAE 誘導に用いる神経抗原やペプチドの有無により麻痺の発症は異なることが報告されている (山村, 1997)。麻痺が寛解する移入 EAE モデルの排尿評価としては、今回が初めての報告である。組織学的評価において、EAE による膀胱の形態学的な変化がなかったこと、麻痺寛解後も EAE マウスでは L5 腰髄周囲に CD4 や MHC class II 陽性細胞が残存しており、神経学的に排尿機能の変化が表れている可能性が示唆された。たとえばヒトでも、中枢神経の感染症、自己免疫疾患等の炎症性疾患の治療後に四肢の麻痺等の身体的症状が改善した場合でも、排尿障害が残存し治療継続が必要なことは稀ではなく、これらを再現している可能性が考えられた。また、麻痺寛解後に EAE マウスでは排尿時膀胱内圧の上昇を認めた。排尿時の膀胱収縮があるにも関わらず、尿道括約筋が弛緩しない排尿筋尿道括約筋協調不全では、収縮時膀胱内圧が上昇する。これは神経因性膀胱の一症状として起こる可能性がある。また、今回排尿評価を行った移入 EAE モデルは、麻痺寛解後に痛み刺激を加えることで麻痺が再燃することが確認されている (Arima et al., 2015)。これは、痛み刺激により中枢神経系に残存している CD11b 陽性 MHC class II 高発現のモノサイトが L5 腹側血管に集積することで炎症が再燃するためであり、MS においても疼痛を契機に臨床症状が悪化することがあり、より MS の病態に近いモデルといえる。今後、症状スコア再燃後の排尿評価を行うことで、今回得た EAE での排尿変化と、中枢神経の炎症との関連がより詳細に評価できる可能性があると考えられる。

今回は EAE での排尿変化のメカニズムまでは明らかにすることはできなかったが、ヒトにおける中枢神経の炎症性疾患、特に MS における排尿障害をより高く再現している可能性があると考えられた。EAE における排尿メカニ

ズムと、これに関与する因子が特定できれば、MS および中枢神経系の炎症疾患による排尿障害の治療に新たな介入ができる可能性がある。

B00 や IC の下部尿路障害モデルに対して EAE 移入を行うことで、正常マウスとの間に違いが見いだせるか、間接的にマウスのストレスを評価できるかを検討した。B00 は前立腺肥大症のモデルである。前立腺肥大症は、排出障害、頻尿、残尿量の増加、夜間頻尿を伴う場合には睡眠障害等の症状をきたす慢性的な排尿障害である。また間質性膀胱炎は膀胱の痛み、頻尿、強い尿意、排尿困難など、膀胱や排尿に関する極めて不快な症状をもたらす難治性の疾患であり、その症状により生活上の不便さから QOL を低下させる（間質性膀胱炎・膀胱痛症候群診療ガイドライン）。IC モデルは酸の膀胱内注入により機械的な炎症を起こすが、痛みに対するマウスのリッキング行動は一週間程度観察され、細胞浮腫などの組織学的変化は 2 週間程度続き、ある程度長期の炎症を維持したモデルである (Dogishi et al., 2015; Dogishi et al., 2017)。今回はこれら B00、IC モデルに対して病原 T 細胞を移入した。B00、IC ともに EAE 移入による臨床スコアにおいて sham との間に違いを認めず、下部尿路障害モデルにおいて病原 T 細胞移入による症状は通常の EAE と同様な病態を示した。病原 T 細胞は特定の神経活性に伴う微小炎症を生じた部位に誘導されるが、下部尿路障害モデルでも重力刺激による L5 腰髄周囲血管の微小炎症に勝る炎症部位はなかったと考えられ、ゲートウェイ反射を応用しての間接的なストレス評価、下部尿路障害モデルにおける微小炎症誘導の評価はできなかった。

B00 モデルでは排尿障害が確立する時期として、定常状態になった術後 8 週目で病原 T 細胞を移入した。IC モデルでは膀胱の炎症は 2 週間程度確認されたが、痛みや膀胱の炎症が最も強い処置翌日に病原 T 細胞を移入した。今回はそれぞれのモデルマウスにおいて、1 点のみで病原 T 細胞の移入を行った。マウスが最もストレスを感じている時期や、微小炎症が生じている時期として移入が適切なタイミングであったかどうか、検討が必要であると考える。

## 結論

### ①本研究全体から得られた新知見

- ・ FAD は中枢神経の刺激により上昇し、炎症を抑制した。
- ・ FAD は EAE による血液脳関門の血管透過性低下を阻害し、病原 T 細胞の腰髄周囲への集積を抑制した。
- ・ 移入 EAE マウスにおいて、臨床スコアに相関しない不可逆的な排尿変化を認めた。
- ・ モデルマウスを用いて中枢神経の炎症による排尿障害を確認できた。

### ②新知見の意義

- ・ FAD は炎症性疾患に対して実臨床で使用されている。中枢神経の炎症疾患に対して治療薬として使用できる可能性がある。
- ・ 多発性硬化症や中枢神経の自己免疫疾患の排尿障害について、EAE マウスを用いて検討できる可能性がある。

### ③今後の展望・課題

- ・ 中枢神経の炎症に対する FAD の抑制作用について、その作用部位と機序についてさらに検討が必要である。
- ・ FAD の投与経路と至適投与量の検討が必要である。
- ・ 中枢神経の炎症による排尿障害の機序・治療について、さらなる解明が必要である。排尿障害に対する FAD の効果を確認する。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、ご指導・助言を賜りました北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学分野 篠原信雄教授および北海道大学遺伝子制御研究所分子神経免疫学分野 村上正晃教授に心より感謝申し上げます。また、研究技法をご指導いただきました同講座のスタッフの皆様にも心からお礼申し上げます。

併せて本研究にあたりご指導をいただきました北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学分野 橘田岳也講師、千葉博基助教、今雅史助教、山梨大学大学院医学工学総合研究部泌尿器科学・泌尿器科 垣渕由岐子助教に心より感謝いたします。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

## 引用文献

- Aharony, S., Lam, O., Lapierre, Y., and Corcos, J. (2016). Multiple sclerosis (MS) for the urologist: What should urologists know about MS? *Neurourol Urodyn* *35*, 174-179.
- Andersson, U., and Tracey, K.J. (2012). Neural reflexes in inflammation and immunity. *J Exp Med* *209*, 1057-1068.
- Arima, Y., Harada, M., Kamimura, D., Park, J.H., Kawano, F., Yull, F.E., Kawamoto, T., Iwakura, Y., Betz, U.A., Márquez, G., *et al.* (2012). Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell* *148*, 447-457.
- Arima, Y., Higuchi, K., Nishikawa, N., Stofkova, A., Ohki, T., Kamimura, D., and Murakami, M. (2015). Pain is an inducer for relapse in multiple sclerosis models through a regional neural signal. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* *6*, 343-344.
- Arima, Y., Ohki, T., Nishikawa, N., Higuchi, K., Ota, M., Tanaka, Y., Nio-Kobayashi, J., Elfeky, M., Sakai, R., Mori, Y., *et al.* (2017). Brain micro-inflammation at specific vessels dysregulates organ-homeostasis via the activation of a new neural circuit. *Elife* *6*.
- Atsumi, T., Singh, R., Sabharwal, L., Bando, H., Meng, J., Arima, Y., Yamada, M., Harada, M., Jiang, J.J., Kamimura, D., *et al.* (2014). Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer Res* *74*, 8-14.
- Cao, G., Wang, Q., Huang, W., Tong, J., Ye, D., He, Y., Liu, Z., Tang, X., Cheng, H., Wen, Q., *et al.* (2017). Long-term consumption of caffeine-free high sucrose cola beverages aggravates the pathogenesis of EAE in mice. *Cell discovery* *3*, 17020.
- Dogishi, K., Kodera, M., Oyama, S., Shirakawa, H., Nakagawa, T., and Kaneko, S. (2015). Long-lasting pain-related behaviors in mouse chronic cystitis model induced by a single intravesical injection of hydrogen peroxide. *J Pharmacol Sci* *129*, 244-246.
- Dogishi, K., Okamoto, K., Majima, T., Konishi-Shiotsu, S., Homan, T., Kodera, M., Oyama, S., Oyama, T., Shirakawa, H., Yoshimura, N., *et al.* (2017). A rat long-lasting cystitis model induced by intravesical injection of hydrogen peroxide. *Physiological*

reports 5.

Duteil, D., Metzger, E., Willmann, D., Karagianni, P., Friedrichs, N., Greschik, H., Gunther, T., Buettner, R., Talianidis, I., Metzger, D., *et al.* (2014). LSD1 promotes oxidative metabolism of white adipose tissue. *Nat Commun* 5, 4093.

Fujita, M., Yamamoto, Y., Jiang, J.J., Atsumi, T., Tanaka, Y., Ohki, T., Murao, N., Funayama, E., Hayashi, T., Osawa, M., *et al.* (2019). NEDD4 Is Involved in Inflammation Development during Keloid Formation. *J Invest Dermatol* 139, 333-341.

Hamamoto, R., Saloura, V., and Nakamura, Y. (2015). Critical roles of non-histone protein lysine methylation in human tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 15, 110-124.

Harada, M., Kamimura, D., Arima, Y., Kohsaka, H., Nakatsuji, Y., Nishida, M., Atsumi, T., Meng, J., Bando, H., Singh, R., *et al.* (2015). Temporal expression of growth factors triggered by epiregulin regulates inflammation development. *J Immunol* 194, 1039-1046.

Higuchi, H., Kamimura, D., Jiang, J.J., Atsumi, T., Iwami, D., Hotta, K., Harada, H., Takada, Y., Kanno-Okada, H., Hatanaka, K.C., *et al.* (2020). Orosomucoid 1 is involved in the development of chronic allograft rejection after kidney transplantation. *Int Immunol* 32, 335-346.

Hino, S., Sakamoto, A., Nagaoka, K., Anan, K., Wang, Y., Mimasu, S., Umehara, T., Yokoyama, S., Kosai, K.-i., and Nakao, M. (2012). FAD-dependent lysine-specific demethylase-1 regulates cellular energy expenditure. *Nature Communications* 3, 758.

Homan, T., Tsuzuki, T., Dogishi, K., Shirakawa, H., Oyama, T., Nakagawa, T., and Kaneko, S. (2013). Novel mouse model of chronic inflammatory and overactive bladder by a single intravesical injection of hydrogen peroxide. *J Pharmacol Sci* 121, 327-337.

Kamimura, D., Tanaka, Y., Hasebe, R., and Murakami, M. (2020). Bidirectional communication between neural and immune systems. *Int Immunol* 32, 693-701.

Kanno, Y., Mitsui, T., Kitta, T., Moriya, K., Tsukiyama, T., Hatakeyama, S., and Nonomura, K. (2016). The inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  is involved in bladder

remodeling after bladder outlet obstruction in mice. *Neurourol Urodyn* 35, 377-381.

Kawamoto, T. (2003). Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. *Arch Histol Cytol* 66, 123-143.

Kawano, F., Matsuoka, Y., Oke, Y., Higo, Y., Terada, M., Wang, X.D., Nakai, N., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S., and Ohira, Y. (2007). Role(s) of nucleoli and phosphorylation of ribosomal protein S6 and/or HSP27 in the regulation of muscle mass. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C35-44.

Kleinewietfeld, M., Manzel, A., Titze, J., Kvakana, H., Yosef, N., Linker, R.A., Muller, D.N., and Hafler, D.A. (2013). Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature* 496, 518-522.

Lee, J., Nakagiri, T., Kamimura, D., Harada, M., Oto, T., Susaki, Y., Shintani, Y., Inoue, M., Miyoshi, S., Morii, E., *et al.* (2013). IL-6 amplifier activation in epithelial regions of bronchi after allogeneic lung transplantation. *International immunology* 25, 319-332.

Lee, J., Nakagiri, T., Oto, T., Harada, M., Morii, E., Shintani, Y., Inoue, M., Iwakura, Y., Miyoshi, S., Okumura, M., *et al.* (2012). IL-6 amplifier, NF- $\kappa$ B-triggered positive feedback for IL-6 signaling, in grafts is involved in allogeneic rejection responses. *J Immunol* 189, 1928-1936.

Metcalf, P.D., Wang, J., Jiao, H., Huang, Y., Hori, K., Moore, R.B., and Tredget, E.E. (2010). Bladder outlet obstruction: progression from inflammation to fibrosis. *BJU Int* 106, 1686-1694.

Mizusawa, H., Igawa, Y., Nishizawa, O., Ichikawa, M., Ito, M., and Andersson, K.E. (2000). A rat model for investigation of bladder dysfunction associated with demyelinating disease resembling multiple sclerosis. *Neurourol Urodyn* 19, 689-699.

Murakami, M., Harada, M., Kamimura, D., Ogura, H., Okuyama, Y., Kumai, N., Okuyama, A., Singh, R., Jiang, J.J., Atsumi, T., *et al.* (2013). Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell Rep* 3, 946-959.

Murakami, M., Okuyama, Y., Ogura, H., Asano, S., Arima, Y., Tsuruoka, M., Harada, M., Kanamoto, M., Sawa, Y., Iwakura, Y., *et al.* (2011). Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *J Exp Med* *208*, 103-114.

Negoro, H., Lutz, S.E., Liou, L.S., Kanematsu, A., Ogawa, O., Scemes, E., and Suadiciani, S.O. (2013). Pannexin 1 involvement in bladder dysfunction in a multiple sclerosis model. *Sci Rep* *3*, 2152.

Ogura, H., Murakami, M., Okuyama, Y., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Kanamoto, M., Nishihara, M., Iwakura, Y., and Hirano, T. (2008). Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. *Immunity* *29*, 628-636.

Ohira, M., Hanada, H., Kawano, F., Ishihara, A., Nonaka, I., and Ohira, Y. (2002). Regulation of the properties of rat hind limb muscles following gravitational unloading. *Jpn J Physiol* *52*, 235-245.

Okuyama, Y., Tanaka, Y., Jiang, J.J., Kamimura, D., Nakamura, A., Ota, M., Ohki, T., Higo, D., Ogura, H., Ishii, N., *et al.* (2018). Bmi1 Regulates  $I\kappa B\alpha$  Degradation via Association with the SCF Complex. *J Immunol* *201*, 2264-2272.

Ota, M., Tanaka, Y., Nakagawa, I., Jiang, J.J., Arima, Y., Kamimura, D., Onodera, T., Iwasaki, N., and Murakami, M. (2020). Role of Chondrocytes in the Development of Rheumatoid Arthritis Via Transmembrane Protein 147-Mediated NF- $\kappa$ B Activation. *Arthritis Rheumatol* *72*, 931-942.

Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C.C., Patsopoulos, N.A., Moutsianas, L., Dilthey, A., Su, Z., Freeman, C., Hunt, S.E., *et al.* (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* *476*, 214-219.

Steinman, L. (2009). A molecular trio in relapse and remission in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* *9*, 440-447.

Steinman, L. (2014). Immunology of relapse and remission in multiple sclerosis. *Annu*

Rev Immunol 32, 257-281.

Stofkova, A., Kamimura, D., Ohki, T., Ota, M., Arima, Y., and Murakami, M. (2019). Photopic light-mediated down-regulation of local  $\alpha$  1A-adrenergic signaling protects blood-retina barrier in experimental autoimmune uveoretinitis. *Sci Rep* 9, 2353.

Takada, Y., Kamimura, D., Jiang, J.J., Higuchi, H., Iwami, D., Hotta, K., Tanaka, Y., Ota, M., Higuchi, M., Nishio, S., *et al.* (2020). Increased urinary exosomal SYT17 levels in chronic active antibody-mediated rejection after kidney transplantation via the IL-6 amplifier. *Int Immunol* 32, 653-662.

Tanaka, Y., Sabharwal, L., Ota, M., Nakagawa, I., Jiang, J.J., Arima, Y., Ogura, H., Okochi, M., Ishii, M., Kamimura, D., *et al.* (2018). Presenilin 1 Regulates NF- $\kappa$ B Activation via Association with Breakpoint Cluster Region and Casein Kinase II. *J Immunol* 201, 2256-2263.

Tracey, K.J. (2016). Reflexes in Immunity. *Cell* 164, 343-344.

Uvin, P., Everaerts, W., Pinto, S., Alpízar, Y.A., Boudes, M., Gevaert, T., Voets, T., Nilius, B., Talavera, K., and De Ridder, D. (2012). The use of cystometry in small rodents: a study of bladder chemosensation. *J Vis Exp*, e3869.

Wang, H.L., and Lai, T.W. (2014). Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples. *Sci Rep* 4, 6588.

Yamamoto, S., Shiga, K., Kodama, Y., Imamura, M., Uchida, R., Obata, A., Bamba, T., and Fukusaki, E. (2014). Analysis of the correlation between dipeptides and taste differences among soy sauces by using metabolomics-based component profiling. *J Biosci Bioeng* 118, 56-63.

Zhang, D., Jin, W., Wu, R., Li, J., Park, S.A., Tu, E., Zanvit, P., Xu, J., Liu, O., Cain, A., *et al.* (2019). High Glucose Intake Exacerbates Autoimmunity through Reactive-Oxygen-Species-Mediated TGF- $\beta$  Cytokine Activation. *Immunity* 51, 671-681.e675.

山村, 隆. (1997). 自己免疫疾患の動物モデル 実験的自己免疫性脳脊髄炎. 最新医学  
52, 1917-1922.