

平成 30 年 8 月 29 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08224

研究課題名(和文)ナルコレプシーにおける、より侵襲性の低い診断法の確立

研究課題名(英文) Attempt of a less invasive diagnostic method in narcolepsy

研究代表者

本多 和樹 (HONDA, Kazuki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・研究員

研究者番号：70173656

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)：TRIB2免疫感作後に断眠による睡眠負債、免疫賦活による脳血管関門減弱、TRIB2の脳室内直接投与などを試み、オレキシン細胞の変化を再検証した。外部からのTRIB2による感作だけではオレキシン細胞の破壊にはつながらない事が確認され、ナルコレプシーではオレキシン細胞が何らかの要因で破壊された後、TRIB2流出に伴ってTRIB2抗体価が上昇する事が示唆された。そこで、当研究ではAtx3/ORXマウスを用いてオレキシン細胞破壊に伴うTRIB2以外の新規自己免疫反応検索を進めた。ナルコレプシー診断に応用可能ないくつかの候補物質を検出したが、同定には至っておらず、継続検索を進めている。

研究成果の概要(英文)：After TRIB2 immunization, the change of orexin was reexamined with the condition of sleep debt, attenuation of cerebrovascular barrier, and TRIB2 intracerebroventricular administration. It is confirmed that sensitization with TRIB2 did not lead orexin cells destruction. As the next step, to confirm whether TRIB2 antibody is induced as a result of the hypocretin cell destruction, we examined the reactivity of the plasma against TRIB2 peptide obtained from hypocretin/ataxin-3(Atx)-mice.

Murine hypothalamic sections were specifically double-stained by plasma from a 31-week-old Atx-mouse and rabbit anti-hypocretin-1 antiserum. Furthermore, an about 140-kDa band reacting with the Atx-mouse plasma was found. Our findings strongly suggest that the ablation of hypocretin neurons induces antibodies to TRIB2, hypocretin itself, or specific factors expressed in hypocretin neurons. The identification of this band in future study could be useful for estimating the degree of hypocretin neuronal loss.

研究分野：睡眠科学

キーワード：ナルコレプシー TRIB2

## 1. 研究開始当初の背景

典型的な過眠症であるナルコレプシーは日本人集団において罹患率1/600人を示し、日中の強い眠気と情動脱力発作(笑い等の強い快感を契機とした脱力、てんかんとは異なる)を主徴とする(Dauvilliers et al, Lancet 2007)。ナルコレプシーは「神経伝達物質オレキシンの機能異常に基づく疾患」であることが知られており(Thannickal et al, Neuron 2000)(Nishino et al, Lancet 2000)。その疾患特異性から脳脊髄液中のオレキシン濃度が検出感度以下まで低下すること、ならびに十分な睡眠をとった上での反復睡眠潜時検査による短い睡眠潜時がナルコレプシーの診断を確定するために国際的に強く推奨されている。しかしながらオレキシン測定に伴う髄液検査では局所麻酔が必要な上、局所麻酔がある状態でも痛みを伴うこと、ならびに何度も繰り返す必要のある反復睡眠潜時検査を患者が忌避しやすいことも確定診断までの時間を延長させている。

ナルコレプシーの発症メカニズムとして、組織適合性抗原 HLA の DQB1\*0602 アリルおよび T 細胞受容体 との強い関連の報告(Hallmayer et al, Nat Genet 2009)ならびに情動脱力発作が大量の IgG 静注により改善された症例も報告されており(Vallo et al, J Neurol 2008)。ナルコレプシーの病態における自己免疫機序の関与が示唆されてきた。最近になりオレキシン神経細胞に高発現する TRIB2 が報告された(Cvetkovic-Lopes et al, JCI 2010)。Cvetkovic-Lopes らはマウスにおいてオレキシン神経細胞でのみ FLAG タグを結合させた poly-A 結合タンパク Pabpc1 を発現させ、オレキシン神経細胞が存在する視床下部ホモジェネートから抗 FLAG 抗体により Pabpc1-FLAG に結合した mRNA を免疫沈降し、その mRNA を同定することによりオレキシン神経細胞において特異的かつ高発現の遺伝子を選定した。TRIB2 自体は自己免疫性ブドウ膜炎の自己抗原として同定されており(Zang et al, Mol Immunol 2005)、ブドウ膜炎自体がナルコレプシーの合併症として知られている。そこで Cvetkovic-Lopes らは ELISA によってナルコレプシー患者血清中の抗 TRIB2 抗体の有無を検討し、約 2 割の患者で TRIB2 に対する自己抗体の陽性反応を見いだした。日本人集団においても同程度の陽性率が報告されている(Toyoda et al, SLEEP 2010)。

## 2. 研究の目的

ナルコレプシーの発症ピークは15歳前後であり、本疾患症状の特性上、ただの居眠り等との鑑別が難しく、病気であることに患者本人ならびに周りの親や学校の先生等が気づかない場合が多い。そのため、確定診断までの期間が平均約15年と極めて長いものとなっている。先に挙げたオレキシン測定に伴う髄液検査では局所麻酔が必要な上、局所麻酔がある

状態でも痛みを伴うこと、ならびに何度も繰り返す必要のある反復睡眠潜時検査を患者が忌避しやすいことも確定診断までの時間を延長させる要因となっている。

われわれは日本人患者集団の約2割に於いて TRIB2 に対する自己抗体の陽性反応を見出している。TRIB2 はオレキシン神経細胞に共存しており、われわれは先行研究からオレキシン神経細胞成分への自己免疫反応の結果として出現したという仮説のもと研究を進めている。本研究ではオレキシン細胞に共存する TRIB2 以外のタンパクに対して高頻度で出現する自己抗体の存在を探る事を目的とする。はじめに自己免疫性ナルコレプシー動物モデルによる TRIB2 の役割の再確認を行い、前述の結果仮説が確認された場合は Atx3/ORX マウスにおいて TRIB2 以外の自己抗体の出現の有無を探る。新規自己抗体の存在が確認された場合はその抗原を用いた新規ナルコレプシー診断法の手がかりとする事を目標とする。本研究により、オレキシン脱落の初期に起こる自己免疫反応を知るための良い指標となると自己抗体が確認されれば、侵襲性の低くかつ検出力の高い診断法の開発へとつながる事が期待される。

## 3. 研究の方法

はじめにナルコレプシー患者血清中に見い出されたこの抗 TRIB2 抗体が、A) 原因仮説: 実際にオレキシン神経細胞を攻撃することによりナルコレプシーの発症に寄与するのか、または B) 結果仮説: オレキシン神経細胞の脱落により血中でのオレキシン神経細胞成分が増加した結果、に対する自己免疫反応であるのかを確認する

1) TRIB2 免疫動物と断眠負荷および免疫賦活 TRIB2 免疫動物に断眠負荷および免疫賦活を加えた動物でオレキシン細胞が破壊された場合は、A) の仮説にもとづき TRIB2 を用いたオレキシン細胞破壊過程における自己抗体検出へ実験を進め、オレキシン細胞に変化が見られない場合は B) の仮説にそって Atx3/ORX マウスを用いたオレキシン細胞破壊により誘導される自己抗体検出を行う。以下結果に示すように B) の結果仮説が採択されたので、結果仮説にそった研究計画部分のみを示す。

### 2) 自己抗原の探索

野生型及び Atx3/ORX マウスより血清を分離し、その血清およびマウス視床下部組織を用いた Immuno-blotting を行い、陽性バンドすなわち自己抗原を探索する。

予備検討を行った結果、生後10週齢の Atx3/ORX マウス視床下部組織切片においてオレキシン神経細胞の脱落が完了することを確認した。そこで以下の方法にて抗 TRIB2 抗体価の上昇を確認する。

生後2~3週齢、10週齢、ならびに6か月齢の野生型および Atx3/ORX マウスより血液を採取後、

血清を分離する。96well plateにTRIB2抗原を固相化後、ブロッキングを行う。そこにマウス血清を反応させ、TRIB2抗原に血清由来のマウス抗体を結合させる。結合したマウス抗体にProteinG-ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)を加え、抗体と結合したHRPをDABにて検出する。陽性反応が得られた血清はTRIB2抗原を用いたImmuno-blottingにおいても検出可能であることを確認する。この際、陽性コントロールとして抗TRIB2家兎血清、ならびに陰性コントロールとしてマウス陰性血清を用いる。さらに、陽性反応血清をTRIB2抗原で吸収することにより陽性バンドとELISA値の減弱を確認する。

### 3) 自己抗原の同定と検出

マウス視床下部組織と陽性血清を反応させた後、自己抗原-自己抗体複合体をProteinGビーズにて沈降させる。この操作によりAtx3/ORXマウス血清に反応する視床下部タンパクを濃縮することが可能であり、そのタンパク群を泳動後、対応する位置のバンドを切り出しMALDI-TOF/MSを用いた質量分析法にて新規自己抗原を同定に進む。

野生型マウス視床下部よりオレキシン神経細胞が密集する外側野部位をLaser MicroDissection法により切り出しタンパク画分を調整する。氷冷RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) with Protease Inhibitor Cocktailにてホモジェナイズ後、遠心分離し上清を可溶性画分とする。沈殿は直接SDSサンプルバッファーにて溶解し不溶性画分とする。

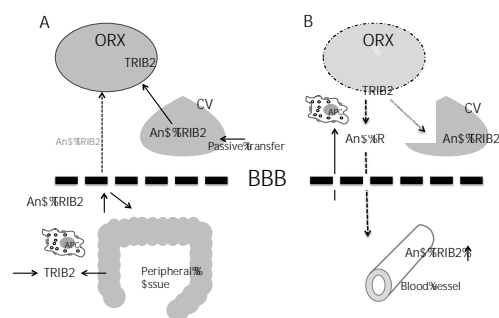
得られた調整タンパク画分を SDS-PAGE によりタンパクサイズにて分離する。ELISA によって抗 TRIB2 抗体が陽性と判定された血清を用いて Immuno-blotting を行い陽性バンドを確認する。確認されたバンドをゲルより切り出し、トリプシンによるゲル内消化を行う。ゲル内消化サンプルを MALDI-TOF/MS にて質量分析し、その配列をデータベースと照合することにより新規自己抗原を同定する。沈降サンプルを用いた Immuno-blotting においても同位置に陽性バンドが得られることを確認する。その際、陰性コントロールによる検討も併せて行い陽性血清でのみ観察されるバンドを確認する。また、抗 TRIB2 家兎血清を用いた検討により、そのバンドが TRIB2 抗原でないことを確認する。ただし、家兎血清において予想される TRIB2 (39kDa) との泳動距離の違いが観察されたバンドに関しても、質量分析法により抗原同定する。

## 4. 研究の成果

1) 科研費課題「実験的自己免疫性ナルコレプシー動物モデルの作出」(24621014)で報告したようにTRIB2による免疫感作により血清および脊髄液中のTRIB2抗体価が上昇、視床下部のオレキシン(ペプチド、mRNAとも)の

減少が見られた。しかしオレキシン細胞数には変化が無かった。そこで本研究では免疫感作後に断眠、免疫賦活(LPS注入)による脳血管関門減弱下、TRIB2の脳室内直接投与などを試み、オレキシン量、オレキシン細胞数の変化を再検証した。結果として外部からのTRIB2による感作はオレキシン細胞の破壊にはつながらない事(図1A)が確認され、ナルコレプシーではオレキシン細胞が何らかの別の要因で破壊された後、TRIB2流出に伴ってTRIB2抗体価が上昇する事が推測された。(図1B)そこで、当研究ではAtx3/ORXマウスによりオレキシン細胞を破壊に伴う新規自己抗体に絞って進める事となった。

図1 TRIB2抗体価上昇はオレキシン細胞破壊の原因?結果?



### 2) 自己抗原の探索

オレキシン神経細胞の脱落に伴い、末梢のオレキシン神経細胞への自己免疫反応が賦活化されるか否かを、アポトーシスにより細胞毒性を引き起こすアタキシン3をオレキシン神経細胞でのみ発現させるよう遺伝子改変されたマウス(Atx3/ORX, Hara et al. Neuron 2001)を用いて検討した。予備検討の結果、アタキシン3の蓄積に伴い後天的にオレキシン神経細胞の脱落が観察され、それに伴い血清中に抗TRIB2抗体に対する陽性反応が発現する個体が現れた。

図2 Anti-TRIB2 and hypocretin neuron antibodies in hypocretin/ataxin-3 mice.

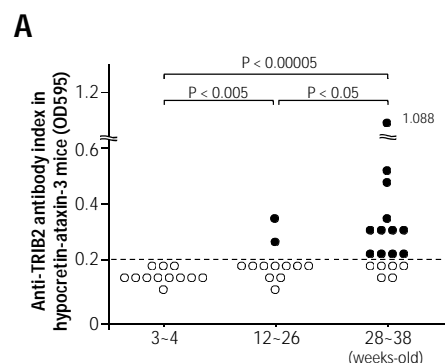
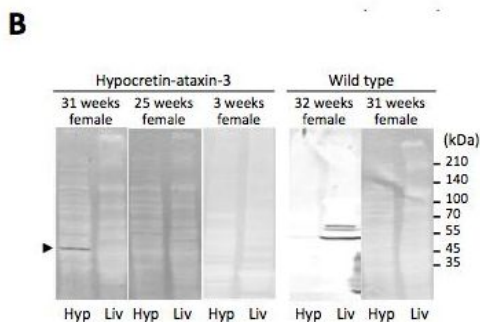


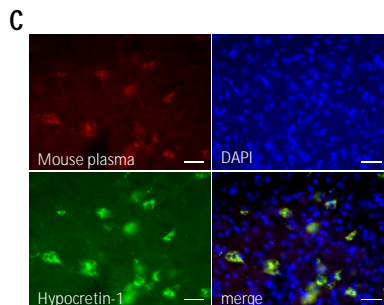
Fig 2 (A) Indices of autoantibodies in 3~4, 12~26, and 28~38-week-old hypocretin/ataxin-3 mice are represented. Each dot corresponds to data from one mouse plasma sample. The dotted line indicates the mean + 3 SD levels in 3~4-week-old mice (n = 12). The indices with plasma above this line were considered to be positive. Open dots indicate plasma negative for anti-TRIB2 antibody.

このことはオレキシン神経細胞成分への末梢の自己免疫反応を裏付けており、TRIB2と同様にオレキシン神経細胞に共存する他のタンパクへの自己免疫反応の存在を示唆するものである。オレキシン神経細胞の脱落が完了することを確認された生後10週齢のAtx3/ORXマウスを用いて抗TRIB2抗体価を計測、抗体価も上昇することを確認した。生後2~3週齢、10週齢、ならびに6か月齢の野生型およびAtx3/ORXマウス血清を分離。TRIB2抗原を固相化96well plateを用いてマウス血清を反応させ、血清由来のマウス抗体を結合させ、ProteinG ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) を加えることで抗体と結合したHRPをDABにて検出した。陽性反応が得られた血清はTRIB2抗原を用いたImmuno-blottingにおいても検出可能であることが確認された。さらに、陽性反応血清をTRIB2抗原で吸収することにより陽性バンドとELISA値の減弱を確認した。ELISAによって抗TRIB2抗体が陽性と判定された血清を用いてImmuno-blottingをおこない陽性バンドを確認。陰性コントロールによる検討も併せて行い陽性血清でのみ観察されるバンドを抽出した。家兔血清において予想されるTRIB2 (39kDa)との泳動距離との違いが観察されたバンドに関しても分離し、質量分析法による抗原同定の準備を進めた。

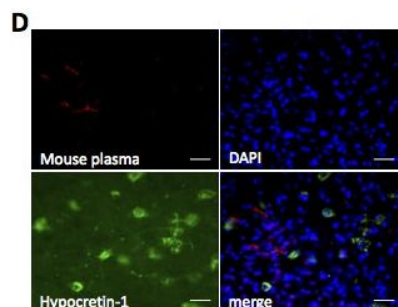


(B) Immunoblotting analysis of anti-TRIB2 antibodies in hypocretin/ataxin-3 transgenic mice and wild-type littermates. The arrowhead indicates TRIB2 expression. Hyp: hypothalamus, Liv: liver.

陽性血清にてマウス視床下部組織より新規自己抗原候補を濃縮し、質量分析によってその配列をデータベースと照合することにより新規自己抗原の同定を試みたが、芳しい結果が得られなかった。引き続き検討を重ねている。



(C) The murine hypothalamic section was stained by plasma from a 31-week-old hypocretin/ataxin-3 mouse (red), DAPI (blue), and rabbit anti-hypocretin-1 antiserum (green). Scale bar: 20  $\mu$ m.



(D) The murine hypothalamic section was stained by plasma from a 32-week-old wild-type littermate mouse (red), DAPI (blue), and rabbit anti-hypocretin-1 antiserum (green). Scale bar: 50  $\mu$ m.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

1. Toyoda H, Honda Y, Tanaka S, Miyagawa T, Honda M, Honda K, Tokunaga K, Kodama T, Narcolepsy susceptibility gene CCR3 modulates sleep-wake patterns in mice. *PLoS ONE* 12(11): e0187888 (2017). (査読あり) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187888>
2. Tanaka S, Honda Y, Honda M, Yamada H, Honda K, Kodama T. Anti-tribbles pseudokinase 2 (TRIB2)-immunization modulates HYPOCRETIN/OREXIN neuronal functions. *SLEEP* Jan 1;40(1) (2017). (査読あり) <https://doi.org/10.1093/sleep/zsw036>
3. Tanaka S, Takizawa N, Honda Y, Taro Koike T, Oe S, Hiromi Toyoda H, Kodama T, Hisao Yamada H. Hypocretin/orexin loss changes the hypothalamic immune response. *Brain Behav Immun* 57:

58-67, (2016) (査読あり)

[https://doi:](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.06.009)

10.1016/j.bbi.2016.06.009.

4. Tanaka S, Toyoda H, Honda Y, Seki Y, Sakurai T, Honda K, Kodama T. Hypocretin/orexin prevents recovery from sickness. *Biomedical Reports* 3: 648-650, (2015) (査読あり)  
DOI: 10.3892/br.2015.491

[その他]

- 1 . Why narcoleptic mice exhibit faster recovery from sickness behavior?  
Tanaka S, Kodama T, Yamada H  
Atlas of Science 「2017/01/02」

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/>

<http://www.igakuken.or.jp/sleep/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

本多 和樹 (HONDA, Kazuki)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・精神  
行動医学研究分野・研究員  
研究者番号：70173656

(2)研究分担者

児玉 亨 (KODAMA, Tohru)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・精神  
行動医学研究分野・シニア研究員  
研究者番号：20195746

田中 進 (TANAKA, Susumu)  
関西医科大学・解剖学講座・准教授  
研究者番号：30399472