

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15340

研究課題名(和文) 微小血管病態に基づく抗MAG抗体関連ニューロパチーの新規治療法の探索

研究課題名(英文) Search for novel therapeutic methods for anti-MAG antibody related neuropathy based on microvascular pathology

研究代表者

前田 敏彦 (MAEDA, Toshihiko)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50738961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：抗myelin associated glycoprotein (MAG) 抗体関連ニューロパチーにおける血液神経関門(BNB)破綻の病態を解明することを目的とし、in vitro BNBモデルを作成して解析を行った。本疾患患者IgM抗体は内皮細胞のバリア機能を低下させ、BNBを構成する内皮細胞・周皮細胞にmyelin protein zero (MPZ)やperipheral myelin protein 22 (PMP22)が認められた。抗MAG抗体はBNBを構成する内皮細胞・周皮細胞に存在するHNK-1エピトープを有する分子を標的としてBNB破綻に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To reveal the pathology of blood-nerve barrier (BNB) disruption in anti-myelin associated glycoprotein (MAG) antibody related neuropathy, we performed in vitro study using human BNB model. IgM antibody derived from anti-MAG antibody-related neuropathy decreased the barrier function of monolayer-cultured endothelial cells. Myelin protein zero (MPZ) and peripheral myelin protein 22 (PMP 22) are present in cell lines of endothelial cells and pericytes established from human peripheral nerve microvasculature. The anti-MAG antibody may be involved in BNB dysfunction by targeting the molecules which carrier carbohydrate HNK-1 epitope existing on endothelial cells and pericytes constituting BNB.

研究分野：神経内科学

キーワード：抗MAG抗体関連ニューロパチー 血液神経関門

1. 研究開始当初の背景

抗 MAG 抗体関連ニューロパチーは、末梢神経ミエリンを構成する主要な糖蛋白の1つである myelin associated glycoprotein (MAG) に対する IgM 型単クローン抗体が、患者血清中に検出される自己免疫機序を背景とした末梢神経疾患である。既存の治療に抵抗性があり、類縁疾患である慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー (CIDP) に有効な副腎皮質ステロイドや血漿交換療法、免疫グロブリン大量静注療法といった治療法の本疾患への効果は乏しく、真に有効な治療法が切望されている。本疾患では、血液神経関門 (BNB: blood-nerve barrier) の破綻により、IgM 型抗 MAG 抗体が流液中から末梢神経実質内に漏出することが、発症や増悪の鍵となる最初のステップとして重要であり、BNB 破綻の分子機構が明らかになれば、新たな治療法の開発につながると考えられる。本疾患の IgM 型単クローン抗体は myelin associated glycoprotein (MAG) や sulfated glucuronyl paragloboside (SGPG) 以外にも、HNK-1 エピトープを有する糖鎖抗原である myelin protein zero (MPZ) や peripheral myelin protein 22 (PMP22) などにも反応することが知られている。

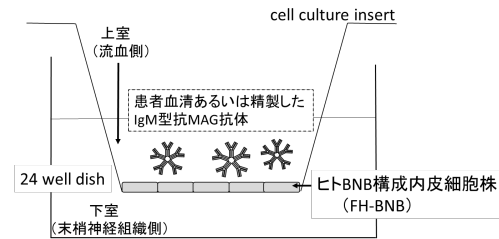
2. 研究の目的

抗 MAG 抗体関連ニューロパチーにおける BNB 破綻の病態に関して、ヒト由来 BNB 構成細胞を用いて構築した in vitro BNB モデルに、抗 MAG 抗体関連ニューロパチー患者の血清成分を作用させる実験系を作成し、本疾患における BNB 破綻のメカニズムを細胞学的に解明することを目的とした。特に抗 MAG 抗体が認識する BNB 構成細胞表面の糖鎖抗原に着目して検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 抗 MAG 抗体関連ニューロパチー患者血

清および血清から精製した IgM を、単層培養したヒト末梢神経神経内膜内微小血管由来内皮細胞株 (FH-BNB) に作用させた後、FH-BNB のバリア機能 (電気抵抗値) の変化を、健康者由来血清および IgM を対照として測定する。

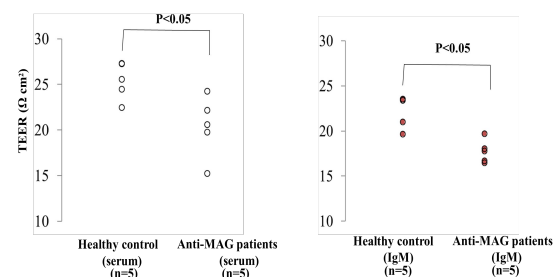


(図1) ヒト BNB model を用いたバリア機能評価法

(2) BNB を構成する内皮細胞株 (FH-BNB) と周皮細胞株に MAG、MPZ、PMP22 が存在するかについて検討を行う。FH-BNB 細胞株とヒト末梢神経微小血管由来周皮細胞株を用い、MAG、MPZ、PMP22 のプライマーを用いて RT-PCR を行う。また、細胞抽出液を電気泳動後、1次抗体として市販の各抗体および患者血清を用いて western blot 法で検討する。MAG、MPZ、PMP22 の FH-BNB 細胞株内の局在を知るため、市販抗体と患者血清を用いて免疫染色法を行う。

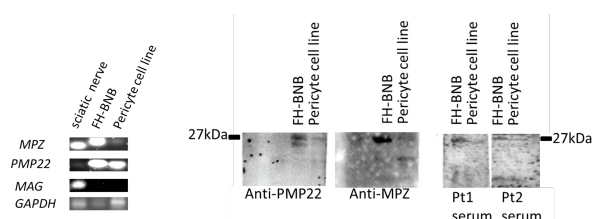
4. 研究成果

(1) 抗 MAG 抗体関連ニューロパチー患者血清および精製 IgM による単層培養内皮細胞 (FH-BNB) バリア機能への影響の検討では、患者血清および IgM は、健康者の血清および IgM に比較し、単層培養した FH-BNB のバリア機能 (電気抵抗値: TEER 値) を有意に低下させることが明らかとなった。



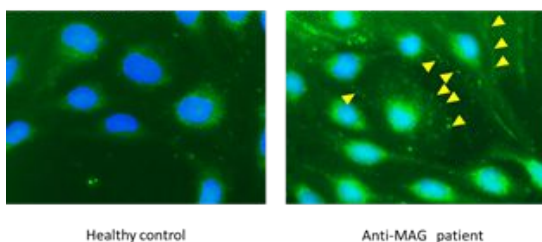
(図2) 患者血清および精製 IgM による単層培養内皮細胞 (FH-BNB) バリア機能への影響

(2) 内皮細胞株 (FH-BNB) と周皮細胞株と共に、MPZ、PMP22 の遺伝子発現を認め、western blot 法では、MPZ と PMP22 の 1 次抗体で染色される、共に 27 kDa のバンドが確認され、患者 IgM を 1 次抗体としても同一サイズにバンドが染色された。



(図3) BNB 構成細胞株における MPZ、PMP22、MAG の遺伝子・蛋白質の検出

MPZ、PMP22 について市販の一次抗体を用いて FH-BNB 細胞株の免疫染色を行ったところ、細胞辺縁と一部の細胞質が染色された。患者血清由来の IgM を用いた FH-BNB 細胞株の染色でも、市販抗体と同様に細胞辺縁と細胞質が染色された。一方、健常者の血清 IgM では、細胞質が僅かに染色されるのみであった。一方、MAG の遺伝子・蛋白は内皮細胞株 (FH-BNB) 周皮細胞株で共に検出されなかった。



(図4) 抗 MAG 抗体関連ニューロパチー患者由来 IgM による FH-BNB 細胞株の免疫染色

このことから、ヒト BNB 構成内皮細胞株 (FH-BNB)・周皮細胞株に MAG は存在しないが、MPZ、PMP22 が存在し、患者の抗 MAG 抗体がこれらの分子を標的分子としてバリア機能に影響する可能性を見出した。PMP22 は tight junction を形成する claudin family に含まれる分子として上皮細胞のバリア機能維持に寄与することが近年報告されてい

る。これらの分子が抗 MAG 抗体による BNB 破綻の標的分子となる可能性について、患者 IgM 抗体を MPZ、PMP22 で吸収処理を行うなどして、本疾患における BNB 破綻のメカニズムの解明をすべく研究を継続して行っている。

5. 主な発表文等

(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 5 件)

Nishihara H, Maeda T, Sano Y, Ueno M, Okamoto N, Takeshita Y, Shimizu F, Koga M, Kanda T. Fingolimod promotes blood-nerve barrier properties in vitro. *Brain Behav.* 8(4): e00924, 2018 査読有

DOI: 10.1002/brb3.924

Takahashi S, Maeda T, Sano Y, Nishihara H, Takeshita Y, Shimizu F, Kanda T. Active form of vitamin D directly protects the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Clin Exp Neuroimmunol.* 8(3): 244-254, 2017 査読有 DOI:10.1111/cen3.12398

Sano H, Sano Y, Ishiguchi E, Shimizu F, Omoto M, Maeda T, Nishihara H, Takeshita Y, Takahashi S, Oishi M, Kanda T. Establishment of a new conditionally immortalized human skeletal muscle microvascular endothelial cell line. *J Cell Physiol.* 232(12): 3286-3295, 2017 査読有 DOI: 10.1002/jcp.25772

Nishihara H, Shimizu F, Kitagawa T, Yamanaka N, Akada J, Kuramitsu Y, Sano Y, Takeshita Y, Maeda T, Abe M, Koga M, Nakamura K, Kanda T. Identification of galectin-3 as a possible antibody target for secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler.* 23(3):382-394, 2017 査読有

DOI: 10.1177/1352458516655217

佐野宏徳、前田敏彦、尾本雅俊、小笠原淳一、古賀道明、川井元晴、神田 隆。脱髄性

末梢神経障害をきたしステロイド治療が奏効した慢性NK細胞増多症の67歳女性例。臨床神経 57: 573-578, 2017 査読有
DOI:10.5692/clinicalneuro1.cn-001064

〔学会発表〕(計 10 件)

藤川 晋、前田敏彦、尾本雅俊、小笠原淳一、古賀道明、川井元晴、神田 隆。ADSSL1 ホモ接合性変異をみとめたミオパチーの34歳女性例。第103回日本神経学会中国四国地方会(徳島)、2017年12月2日

前田敏彦、佐野泰照、清水文崇、竹下幸男、西原秀昭、藤川 晋、神田 隆。抗MAG抗体関連ニューロパチー血清による血液神経関門破綻の解析。第29回神経免疫学会学術集会(札幌) 2017年10月6日-7日

Maeda T, Sano Y, Omoto M, Shimizu F, Takeshita Y, Nishihara H, Takahashi S, Kanda T. Soluble receptor for advanced-glycation end products and neuromyelitis optica: Potential therapeutic target against disruption of blood-brain barrier. XXIII World Congress of Neurology (Kyoto). Sept 16-21, 2017

Omoto M, Maeda T, Kanda T. Investigation of MCAM expression in the endothelial cells forming blood-nerve barrier. XXIII World Congress of Neurology (Kyoto). Sept 16-21, 2017

Maeda T, Sano Y, Abe M, Takeshita Y, Nishihara H, Takahashi S, Kanda T. Autocrine MMP-9 secretion disrupt the blood-nerve barrier in CIDP. 第57回日本神経学会学術大会(神戸) 2016年5月18日-21日

Maeda T, Sano Y, Omoto M, Abe M, Takeshita Y, Nishihara H, Kanda T. Sera from CIDP patients disrupt blood-nerve barrier via activation of rho-kinase pathway. XXII World Congress of Neurology

(Santiago). Oct 31-Nov 5, 2015

佐野泰照、前田敏彦、安部真彰、川井元晴、神田 隆。ヒト血液脳関門を介したアミロイド 蛋白排出における ABC 輸送体の役割。第34回日本認知症学会学術集会(青森) 2015年10月2日-3日

Maeda T, Sano Y, Omoto M, Abe M, Takeshita Y, Nishihara H, Kanda T. Sera from CIDP patients disrupt blood-nerve barrier via activation of rho-kinase pathway. 第56回日本神経学会学術大会(新潟)、2015年5月20日-23日

Takahashi S, Maeda T, Nishihara H, Sano H, Sano Y, Omoto M, Abe M, Kanda T. The active form of vitamin D modifies the blood-brain barrier properties. 第56回日本神経学会学術大会(新潟)、2015年5月20日-23日

太田怜子、前田敏彦、尾本雅俊、小笠原淳一、古賀道明、川井元晴、神田 隆。筋生検が診断の契機となり複合的免疫学的治療を施行した抗SRP抗体陽性筋症の69歳女性例。第112回日本内科学会中国地方会(米子) 2015年5月16日

〔図書〕(計 0 件)

〔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.neuro1.med.yamaguchi-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 敏彦 (MAEDA, Toshihiko)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 50738961