

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15443

研究課題名(和文) 視神経脊髄炎関連疾患の病態機序へのエクソソームの関与

研究課題名(英文) The involvement of exosomes in neuromyelitis optica spectrum disorders

研究代表者

佐治 越爾 (SAJI, Etsuji)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：00706418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：視神経脊髄炎関連疾患(neuromyelitis optica spectrum disorders; NMOSD)は、アストロサイトに発現するアクアポリン4水チャネル(AQP4)を標的とする自己抗体がアストロサイト障害を引き起こすことにより、重篤な神経症状を引き起こす中枢神経系自己免疫疾患である。病態に影響する候補因子として細胞外小胞の一つであるエクソソームに着目し、ヒト血清からエクソソームを分離した。また予備実験として末梢血単核球から抽出したRNAのRNAシーケンスを行った。今後、エクソソームRNAのRNAシーケンシングによりNMOSDの病態へのエクソソームの関与を明らかにしていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視神経脊髄炎はアクアポリン4に対する自己抗体が脳のアストロサイトを障害することで重篤な神経障害を引き起こす中枢神経系自己免疫疾患である。アクアポリン4自己抗体の発見により早期診断が可能となり、ステロイドや免疫抑制剤によって再発をある程度抑制できるようになっているが、一部の症例では治療に抵抗性である。NMOSD患者特有のエクソソームのプロファイルを明らかにすることで、より適切な治療選択につなげる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD) is an autoimmune disease of the central nervous system (CNS). Autoantibodies that target the aquaporin 4 water channel (AQP4) expressed in astrocytes cause astrocyte damage, which leads to severe neurological symptoms. We focused on exosomes of the extracellular vesicles, as a candidate factor affecting the disease, and isolated exosomes from human serum. As a preliminary experiment, we performed RNA sequencing of RNA extracted from peripheral blood mononuclear cells. In the future, we will elucidate the involvement of exosomes in the pathogenesis of NMOSD through RNA sequencing of exosomal RNA.

研究分野：神経免疫

キーワード：視神経脊髄炎 エクソソーム 細胞外小胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica; NMO) は視神経と脊髄を首座とする炎症性脱髄疾患である。長らく NMO は多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) の一亜型と捉えられてきた。NMO 患者血清中にアクアポリン 4 (aquaporin 4; AQP4) 水チャネルを標的とする自己抗体が発見され、NMO は MS とは異なる病態機序を持つ疾患と認識されるようになった[1]。NMO の炎症性脱髄病変では、アストロサイトの血管足突起に発現する AQP4 の消失と血管中心性の補体沈着を認めることから、AQP4 抗体による補体介在性アストロサイト障害が NMO の病変形成に重要な役割を果たしている[2-4]。さらに中枢神経病変を呈する AQP4 抗体陽性患者の解析により、NMO は視神経および脊髄病変に留まらず、より多彩な病巣を呈することが明らかにされた[5]。最新の NMO 診断基準案では AQP4 抗体陽性炎症性中枢神経疾患として NMO 関連疾患 (NMO spectrum disorders; NMOSD) として疾患概念が拡大し、自己免疫性アストロパチーと捉えることも提唱されている[6]。

(2) NMOSD では急性の炎症性アストロサイト障害だけでなく慢性の神経変性病態も存在している。これまでに NMOSD の病態について我々と共同研究者は以下のことを明らかにしている。

脊髄炎のみの早期型・限局型 NMO (limited form) は視神経炎と脊髄炎を持つ晚期型・完全型 NMO と同様の病理所見を認めること、髄液インターロイキン (IL)-6, IL-1 をはじめとした炎症性サイトカインは限局型 NMO から上昇し、完全型 NMO ではさらに増加することを明らかにしている [4]。

NMO 患者の認知機能を評価し、MS 患者同様に認知機能障害が存在することを明らかにし、剖検脳の病理解析で NMO では MS と異なり大脳皮質に脱髄は存在しないが、大脳皮質の神経細胞の減少および皮質 II 層にアストロサイトの AQP4 発現が低下していることを明らかにしている [7]。

NMO 剖検組織における異常なミトコンドリアの集積を伴う神経軸索変性の存在を明らかにしている [8]。これらの結果は、発作的に増悪する炎症性アストロサイト障害に加え、慢性的な神経変性病態が存在することを示唆している。

(3) 病理学的解析の結果より、AQP4 抗体と補体を中心とする液性因子がその病態機序において重要な役割を果たしているが、動物モデルでは血中の自己抗体のみで神経症状を再現することが困難であり、自己抗体以外の何らかの免疫因子の存在が必要と考えられている[9]。自己抗体が中枢神経系内へ流入するために血液脳関門を破綻させる因子が必要と推定される。NMO 病変局所および髄膜には T 細胞に加え、マクロファージ、好酸球、好中球などの免疫細胞が多数浸潤しており、さらにミクログリアが活性化していることも明らかにされている[10, 11]。活性化した T 細胞や自然免疫細胞群により産生されるサイトカインなどが BBB を破綻させる一因を担っている可能性があるが、「NMOSD の発症起点および再発および神経変性の進行を予想する疾患活動性のバイオマーカー」は未だに明らかになっていない。

2. 研究の目的

細胞外小胞の一つであるエクソソームの細胞間情報伝達ツールとして役割が近年注目されている。エクソソームは細胞外小胞 (Extracellular vesicle) の一つで、細胞から分泌される直径約 40-150nm のエンドソーム由来の小胞である。内部には核酸 (RNA, DNA) や蛋白質を含んでいる[12]。エクソソームは細胞から能動的に分泌されていることから、離れた組織や細胞の情報を運ぶ重要な細胞間情報伝達ツールとしての役割が明らかとなっている。特にがん細胞由来のエクソソーム解析により新たながん診断バイオマーカーとしての役割が期待されている[13]。また、免疫系では抗原提示細胞から分泌された細胞外小胞は MHC class I および II 分子を表面に有していることで、直接 T 細胞を刺激しうることを示されている[14]。本研究では NMOSD のエクソソームに着目し、NMOSD における疾患特異的な分子を明らかにし、疾患活動性のバイオマーカーを探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NMOSD 症例の検体の収集および長期経過の臨床的特徴の解析：
NMOSD 症例の検体(血清および髄液)の収集を行うとともに、NMOSD 症例について過去 28 年間の長期にわたる臨床的特徴の変化を後方視的解析した。

- (2) エクソソームの回収法の確立：
エクソソーム回収法として、MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (FUJIFILM Wako)および Total Exosome Isolation Reagent(Invitrogen)の2つのキットを用いてエクソソームを回収した。回収したエクソソームを PS Capture™ Exosome ELISA Kit (FUJIFILM Wako)にてエクソソーム濃度を測定した。
- (3) エクソソームの RNA シーケンス予備実験として末梢血単核球から RNA を抽出し、RNA シーケンスを行った。

4. 研究成果

- (1) NMOSD 症例の検体の収集および長期経過の臨床的特徴の解析：
NMOSD 症例の検体（血清および髄液）を継続的に収集した。過去 28 年間に診療した NMOSD 73 症例について臨床的特徴の解析では、発症した時期における年間再発回数および後遺障害の解析を行い、2010 年以降の最近の発症例において、年間再発回数は低下し、後遺障害も低下していることを明らかにした。初発後の早期診断および再発予防薬の導入により、初回発作のみで再発のない症例の割合が有意に増加していたが、その一方で現行の治療に対するノンレスポonderが一定数存在している。
- (2) エクソソームの回収法の確立：
血清サンプルおよび末梢血単核球の培養上清から MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (FUJIFILM Wako)および Total Exosome Isolation Reagent(Invitrogen)を用いてエクソソーム回収した。ELISA を用いて十分量のエクソソームが回収できていることを確認した。
- (3) RNA シーケンス解析：
エクソソーム RNA の RNA シーケンス解析の前に予備実験を行った。健常者全血から分離した末梢血単核球を CD3/CD28 ビーズによる TCR 刺激を行い、RNeasy Plus Universal Mini Kit (QIAGEN)を用いて RNA を抽出した。パイオアナライザーで RIN 値を測定し、いずれも 9.6 以上と RNA サンプル品質に問題ないことを確認した。RNA-seq ライブラリを調整し、NextSeq 500 (Illumina)を用いて RNA シーケンスを行った。クオリティスコア Q30 以上だった塩基の割合 (% QC 30) は 91.8%であった。

今後、健常者群と NMOSD 患者群との違いおよび NMOSD 臨床病型や治療反応性を反映するエクソソームのプロファイルの違いを明らかにしていく。エクソソームにおける NMOSD 特有の分子を明らかにすることで、疾患活動性や治療反応性を予測することが可能となり、より適切な治療選択につなげる可能性がある。

引用文献

- Lennon, V.A., et al., A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet*, 2004. 364(9451): p. 2106-12.
- Roemer, S.F., et al., Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Brain*, 2007. 130(Pt 5): p. 1194-205.
- Misu, T., et al., Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain*, 2007. 130(Pt 5): p. 1224-34.
- Yanagawa, K., et al., Pathologic and immunologic profiles of a limited form of neuromyelitis optica with myelitis. *Neurology*, 2009. 73(20): p. 1628-37.
- Pittock, S.J., et al., Brain abnormalities in neuromyelitis optica. *Arch Neurol*, 2006. 63(3): p. 390-6.
- Wingerchuk, D.M., et al., International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology*, 2015. 85(2): p. 177-89.
- Saji, E., et al., Cognitive impairment and cortical degeneration in neuromyelitis optica. *Ann Neurol*, 2013. 73(1): p. 65-76.
- Hokari, M., et al., Clinicopathological features in anterior visual pathway in neuromyelitis optica. *Ann Neurol*, 2016. 79(4): p. 605-24.
- Bradl, M., et al., Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Ann Neurol*, 2009. 66(5): p. 630-43.
- Pohl, M., et al., T cell-activation in neuromyelitis optica lesions plays a role in their formation. *Acta Neuropathol Commun*, 2013. 1: p. 85.

Lucchinetti, C.F., et al., A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain*, 2002. 125(Pt 7): p. 1450-61.

Colombo, M., G. Raposo, and C. Théry, Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014. 30: p. 255-89.

Kalluri, R., The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest*, 2016. 126(4): p. 1208-15.

Robbins, P.D. and A.E. Morelli, Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol*, 2014. 14(3): p. 195-208.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 A. Ono, E. Saji, A. Nakajima, T. Wakasugi, F. Yanagimura, K. Yanagawa, O. Onodera, I. Kawachi
2. 発表標題 The clinical and immunological features of NMO patients with onset over 80 years old
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐治越爾, 中島章博, 若杉尚宏, 柳川香織, 小野寺理, 河内泉
2. 発表標題 重症筋無力症合併視神経脊髄炎関連疾患の解析
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 若杉尚宏, 佐治越爾, 中島章博, 柳村文寛, 柳川香織, 小野寺理, 河内泉
2. 発表標題 多発性硬化症における大脳萎縮の解析
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 E. Saji, A. Nakajima, T. Wakasugi, F. Yanagimura, K. Yanagawa, M. Hokari, M. Nshizawa, O. Onodera, I. Kawachi
2. 発表標題 A 28-year observational study of disease activities in a Japanese cohort of neuromyelitis optica spectrum disorders
3. 学会等名 The 35th Congress of the European committee for treatment and research in multiple sclerosis ((国際学会))
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐治越爾, 中島章博, 若杉尚宏, 柳村文寛, 柳川香織, 穂苅万李子, 小野寺理, 河内泉
2. 発表標題 多発性硬化症および視神経脊髄炎患者の臨床的特徴 - 過去28年間における変遷
3. 学会等名 第31回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島章博, 佐治越爾, 若杉尚宏, 柳村文寛, 柳川香織, 穂苅万李子, 小野寺理, 河内泉
2. 発表標題 本邦における高齢発症視神経脊髄炎の臨床免疫学的特徴 - 連続73症例の解析から
3. 学会等名 第31回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 E. Saji, A. Nakajima, T. Wakasugi, F. Yanagimura, K. Yanagawa, O. Onodera, I. Kawachi
2. 発表標題 Unique clinical features of late-onset neuromyelitis optica spectrum disorders in a Japanese cohort
3. 学会等名 34th Congress of the european committee for treatment and research in multiple sclerosis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐治越爾, 中島章博, 若杉尚宏, 柳村文寛, 柳川香織, 小野寺理, 河内泉
2. 発表標題 視神経脊髄炎関連疾患におけるジェンダー効果の解析
3. 学会等名 第30回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------