

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17037

研究課題名（和文）抗plexinD1抗体の免疫性神経障害性疼痛マーカー確立とモデルによる病態解明

研究課題名（英文）The pathologic clarification of Plexin D1-IgG-related neuropathic pain

研究代表者

藤井 敬之（Fujii, Takayuki）

九州大学・病院・医員

研究者番号：30822481

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、有痛性三叉神経ニューロパチー患者の14.3%、小径線維ニューロパチー患者の12.7%で小径痛覚ニューロンに特異的に結合する抗Plexin D1抗体が陽性であることを明らかにした。次に、抗Plexin D1抗体陽性神経障害性疼痛患者血清からIgGを精製し、マウス髄腔内に投与したところ、有意な機械的痛覚過敏を認めた。以上の結果から、抗Plexin D1抗体は、一部の原因不明の疼痛疾患の責任抗体であるとともに、生体内において後根神経節などの体性感覚神経系に結合して神経障害性疼痛を惹起する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、抗Plexin D1抗体が生体内において神経障害性疼痛の発症における病原性を有することが明らかとなり、また、これまで原因不明とされてきた神経障害性疼痛疾患の一部において存在することが示されたことから、抗Plexin D1抗体は神経障害性疼痛の診断バイオマーカーの候補と考えられた。今後は、抗Plexin D1抗体を標的とする免疫治療により鎮痛効果が得られるか検証していく必要があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we determined whether anti-Plexin D1 antibody (Plexin D1-IgG), which is associated with neuropathic pain (NP) and binds to pain-conducting small unmyelinated dorsal root ganglion neurons, exists in patients with idiopathic painful trigeminal neuropathy (IPTN) and small fiber neuropathy (SFN). Serum Plexin D1-IgG was detected in 14.3% of IPTN patients and 12.7% of SFN patients. Plexin D1-IgG derived from NP patients could induce a mechanical pain hypersensitivity by passive transfer to mice 24 h after intrathecal injection. Plexin D1-IgG is pathogenic but with low prevalence in IPTN and SFN.

研究分野：神経障害性疼痛

キーワード：神経障害性疼痛 抗Plexin D1抗体 自己抗体 小径線維ニューロパチー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は、様々な病態を含む難治性疼痛のひとつで、多くの病態機序は依然として不明である。そのため、個々の神経障害性疼痛の病態機序を明らかにし、それぞれの病態を診断するバイオマーカーと病態に応じた治療法を開発することが喫緊の課題である。2018年、申請者らは、神経障害性疼痛に関連する自己抗体として抗 Plexin D1 抗体を世界に先駆けて発見し、米国神経学会の機関誌である *Annals of Neurology* に報告し、表紙を飾った<sup>1)</sup>。抗 Plexin D1 抗体は、C線維型小径後根神経節 (dorsal root ganglion, DRG) ニューロンと脊髄後角に特異的に結合する自己抗体であり、抗 Plexin D1 抗体陽性患者は灼熱痛や温痛覚過敏といったC線維障害を反映する臨床症状を特徴していた。この発見から、これまで原因不明とされてきた神経障害性疼痛患者さんの一部においては抗 Plexin D1 抗体が関連している可能性が考えられた。一方で、抗 Plexin D1 抗体が、生体内においてどのようなメカニズムで神経障害性疼痛の発症に関与しているか明らかでなかった。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究では、「抗 Plexin D1 抗体がどの疼痛疾患において原因自己抗体となっているか」、「抗 Plexin D1 抗体が生体内でどのような機序で疼痛を誘導しているか」を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 研究対象者

原因不明の疼痛性三叉神経ニューロパチーにおける血清中抗 Plexin D1 抗体の保有率を評価するために、原因不明の疼痛性三叉神経ニューロパチー患者 21 名と年齢・性別を一致させた神経障害性疼痛を有さない対照群 35 名 (健康人 25 名と神経変性疾患患者 10 名) を登録した<sup>2)</sup>。

小径線維ニューロパチーにおける血清中抗 Plexin D1 抗体の保有率を評価するために、小径線維ニューロパチー患者 63 名 (特発性小径線維ニューロパチー患者 38 名と二次性小径線維ニューロパチー患者 25 名) と健康人 55 名を登録した<sup>3)</sup>。

#### (2) 抗 Plexin D1 抗体の測定方法

原因不明の疼痛性三叉神経ニューロパチー患者と対照群については、患者血清とマウス DRG 組織を用いた蛍光免疫染色法を実施し、小径 DRG ニューロンへの患者 IgG の結合を認めた場合に、リコンビナント Plexin D1 と患者血清を前吸着し、再度蛍光免疫染色法を実施し、小径 DRG ニューロンへの患者 IgG が消失するか評価を行った。さらに、リコンビナント Plexin D1 と患者血清を用いた western blotting (WB) 法でも測定を行った<sup>2)</sup>。

小径線維ニューロパチー患者においては、抗 Plexin D1 抗体測定用 ELISA を用いて 1 次スクリーニングを実施した。ELISA 陽性であった患者においては、患者血清とマウス DRG 組織を用いた蛍光免疫染色法を実施し、小径 DRG ニューロンへの患者 IgG の結合を認めた場合に、リコンビナント Plexin D1 と患者血清を前吸着し、再度蛍光免疫染色法を実施し、小径 DRG ニューロンへの患者 IgG の消失が確認された場合に、抗 Plexin D1 抗体陽性と判断した<sup>3)</sup>。

#### (3) 抗 Plexin D1 抗体の三叉神経節への結合評価

抗 Plexin D1 抗体陽性疼痛性三叉神経ニューロパチーの患者 IgG が三叉神経節の痛覚ニューロンに結合するかを評価するため、患者血清とマウス三叉神経節 (trigeminal ganglion, TG) を用いた間接蛍光抗体法を実施した<sup>2)</sup>。

#### (4) 抗 Plexin D1 抗体受動免疫モデルの作製

##### IgG 精製

3名の抗 Plexin D1 抗体陽性神経障害性疼痛患者と2名の健康人の血清から Protein G HP SpinTrap columns (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて IgG を精製した。

##### 精製 IgG のマウス髄腔内投与

3名の抗 Plexin D1 抗体陽性患者 IgG、リコンビナント Plexin D1 と前吸着した3名の抗 Plexin D1 抗体陽性患者 IgG、健康人 IgG を、10~12 週齢の雌 ICR マウスの第5椎体と第6椎体の椎間から穿刺し、髄腔内投与を行った。

von Frey filament を用いた機械性痛覚過敏評価

マウスを網の上に置いて、網の下からマウスの足底に対して、強さの異なる von Frey filament を、それぞれ 10 回ずつ押しつけ、マウスが足をあげる反応率を評価した。

Hot plate を用いた熱性痛覚過敏評価

48 に保たれたプレートの上に、マウスを置き、疼痛関連行動である足をあげる、足をなめる、ジャンプするまでの潜時を測定した。

Phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinase (pERK)陽性 DRG ニューロンの評価

IgG 投与 24 時間後と 48 時間後の腰椎レベルの DRG ニューロンの活性化を評価するため、活性化 DRG ニューロンマーカーである pERK を用いた免疫染色を実施した。それぞれの受動免疫モデルマウスにおいて、総 DRG ニューロン数あたりの pERK 陽性 DRG ニューロン数の割合を算出し、統計学的に比較を行った。

本研究について、臨床研究については九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会の承認を、動物実験の計画については九州大学総長の承認を得ている。

#### 4. 研究成果

(1) 原因不明の疼痛性三叉神経ニューロパチーにおける血清中抗 Plexin D1 抗体の保有率

原因不明の疼痛性三叉神経ニューロパチー患者 21 名を対象として、抗 Plexin D1 抗体を間接蛍光抗体法ならびに WB 法で測定したところ、3 名 (14.3 %) において間接蛍光抗体法と WB 法の両方で抗 Plexin D1 抗体が陽性であった<sup>2)</sup>。抗 Plexin D1 抗体陽性疼痛性三叉神経ニューロパチー患者の特徴として、全症例で舌の疼痛を合併していた。

(2) 抗 Plexin D1 抗体の三叉神経節における結合

抗 Plexin D1 抗体陽性疼痛性三叉神経ニューロパチー患者の血清とマウス TG を反応させたところ、患者 IgG がマウス TG の isolectin B4 陽性小径痛覚ニューロンに特異的に結合し (図 1) 患者血清とリコンビナント Plexin D1 を前吸着したところ、これらの IgG の結合は消失した<sup>2)</sup>。以上のことから、抗 Plexin D1 抗体は DRG の痛覚ニューロンだけでなく、TG の痛覚ニューロンにも結合し、三叉神経領域の疼痛性ニューロパチーを惹起している可能性が示唆された。

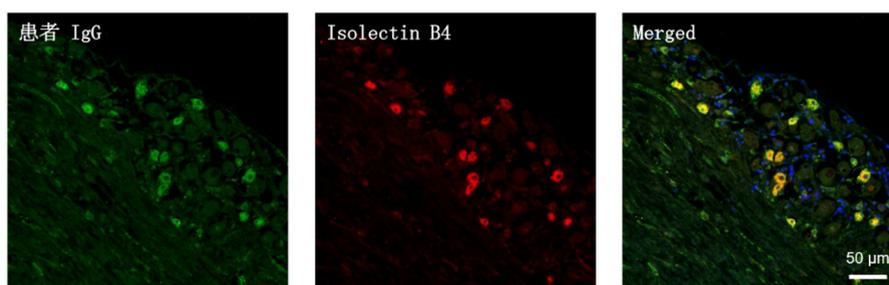


図1: 疼痛性三叉神経ニューロパチー患者IgGとマウス三叉神経節を用いた間接蛍光抗体法

(3) 小径線維ニューロパチーにおける血清中抗 Plexin D1 抗体の保有率

63 名の小径線維ニューロパチー患者のうち、ELISA かつ間接蛍光抗体法で血清中の抗 Plexin D1 抗体が陽性であった患者は 8 名 (12.7%) であった。内訳として、特発性小径線維ニューロパチー患者では 38 名中 6 名 (15.8%) で陽性であり、二次性小径線維ニューロパチー患者では 25 名中 2 名 (8.0%) で陽性であり、この 2 名は糖尿病に罹患していた<sup>3)</sup>。抗 Plexin D1 抗体陽性小径線維ニューロパチー患者の 87.5% で、IgG2 優位であった。抗 Plexin D1 抗体陽性小径線維ニューロパチー患者の臨床的特徴として、中年期以降の発症が多く、慢性の経過で進行し、灼熱痛や刺痛といった神経障害性疼痛を呈する割合が高かった。

(4) 抗 Plexin D1 抗体受動免疫モデルにおける疼痛様行動

髄腔内投与 24 時間後の von Frey 試験

抗 Plexin D1 抗体陽性神経障害性疼痛患者 1~3 の IgG を髄腔内投与したマウスでは、投与 24 時間後に有意な機械性痛覚過敏を認めた (図 2)。一方、リコンビナント Plexin D1 で前吸着した患者 1~3 の IgG を投与したマウスでは機械性痛覚過敏を認めなかった。

## 髄腔内投与 24 時間後の Hot plate 試験

抗 Plexin D1 抗体陽性神経障害性疼痛患者 1 の IgG を髄腔内投与したマウスでは、投与 24 時間後に有意な熱性痛覚過敏を認めた (図 3)。一方、リコンビナント Plexin D1 で前吸着した患者 1 の IgG を投与したマウスでは機械性痛覚過敏を認めなかった。

## 髄腔内投与 48 時間後の von Frey 試験と Hot plate 試験

患者 1 ~ 3 の IgG を投与したマウスでは、投与 48 時間後には機械性痛覚過敏、熱性痛覚過敏のいずれの疼痛様行動を認めなかった。このことから、抗 Plexin D1 抗体の単回投与による疼痛様行動は可逆的である可能性が示唆された。

## 髄腔内投与 24 時間後と 48 時間後の腰椎レベル DRG の pERK 染色

患者 1 ~ 3 の IgG を投与したマウスでは、投与 24 時間後には腰椎レベル DRG の pERK 陽性活性化小径ニューロンの数の増加を認めた。一方、リコンビナント Plexin D1 で前吸着した患者 1 ~ 3 の IgG を投与したマウスと健常人 IgG を投与したマウスでは腰椎レベル DRG の pERK 陽性活性化小径ニューロンはほとんど認められなかった。

上記 ~ の結果から、患者由来の抗 Plexin D1 抗体を用いた受動免疫動物モデルは、可逆的な小径 DRG ニューロンの活性化を伴う機械性ならびに熱性痛覚過敏を呈しており、抗 Plexin D1 抗体は機能的に神経障害性疼痛発症における病原性を有しているものと示唆された。

### ( 5 ) 本研究成果のまとめ

本研究では、世界で初めて、抗 Plexin D1 抗体が生体内において神経障害性疼痛の発症における病原性を有することを示し、また、これまで原因不明とされてきた神経障害性疼痛疾患 ( 有痛性三叉神経ニューロパチー、小径線維ニューロパチー ) の一部において抗 Plexin D1 抗体が存在することを示した。これらの結果から、抗 Plexin D1 抗体は神経障害性疼痛の診断バイオマーカーの候補になると考えられた。さらに、自己抗体は免疫治療により抗体価の減少を導くことができることから、今後、抗 Plexin D1 抗体を標的とする免疫治療により鎮痛効果が得られるかを検証していくことにより、抗 Plexin D1 抗体が診断バイオマーカーだけでなく、神経障害性疼痛における治療選択バイオマーカーとなる可能性もある。このように、本研究成果は、神経障害性疼痛診療の発展の一助となるものと考えられた。

### < 引用文献 >

- 1) Fujii T, Yamasaki R, Iinuma K, et al. A novel autoantibody against plexin D1 in patients with neuropathic pain. *Ann Neurol* 2018;84:208-224.
- 2) Fujii T, Yamasaki R, Miyachi Y, et al. Painful trigeminal neuropathy associated with anti-Plexin D1 antibody. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2020;7:e819. doi:10.1212/NXI.0000000000000819.
- 3) Fujii T, Lee E-J, Miyachi Y, et al. Anti-Plexin D1 antibodies relate to small fiber neuropathy and induce neuropathic pain in animals. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm in press.*

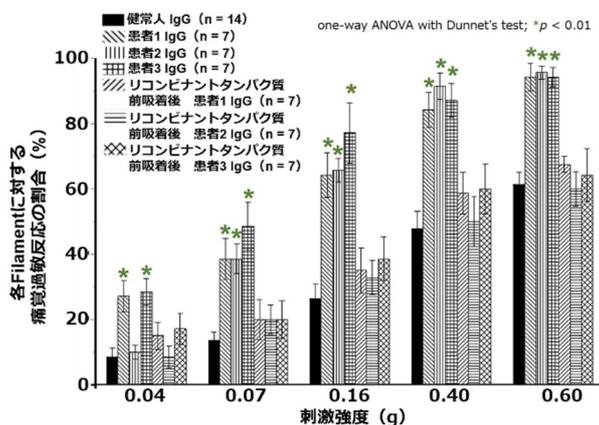


図2: 髄腔内投与24時間後の von Frey 試験

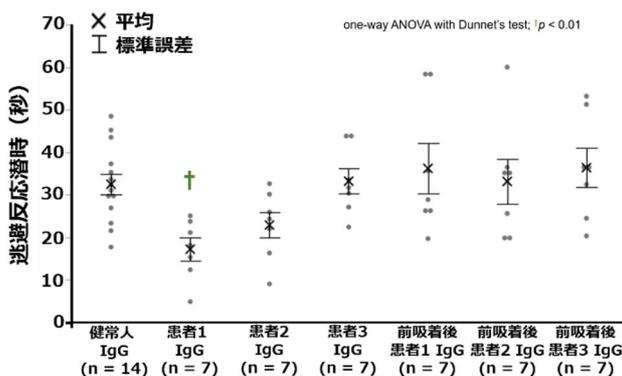


図3: 髄腔内投与24時間後の Hot plate 試験

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takayuki Fujii, Eun-Jae Lee, Yukino Miyachi, Ryo Yamasaki, Young- Min Lim, Kyoko Iinuma, Ayako Sakoda, Kwang-Kuk Kim, Jun-ichi Kira	4. 巻 -
2. 論文標題 Anti-Plexin D1 antibodies relate to small fiber neuropathy and induce neuropathic pain in animals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 藤井敬之、山崎亮、宮地佑希野、飯沼今日子、吉良潤一	4. 巻 53
2. 論文標題 抗Plexin D1抗体介在性神経障害性疼痛	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 自律神経	6. 最初と最後の頁 163-168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Takayuki, Yamasaki Ryo, Miyachi Yukino, Iinuma Kyoko, Hashimoto Yu, Isobe Noriko, Matsushita Takuya, Kira Jun-ichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Painful trigeminal neuropathy associated with anti-Plexin D1 antibody	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 e819
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1212/NXI.0000000000000819	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 藤井敬之、山崎亮、宮地佑希野、飯沼今日子、吉良潤一	4. 巻 31
2. 論文標題 抗plexin D1抗体に関連した神経障害性疼痛	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 末梢神経	6. 最初と最後の頁 62-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Takayuki, Yamasaki Ryo, Miyachi Yukino, Iinuma Kyoko, Kira Jun-ichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Anti-plexin D1 antibody-mediated neuropathic pain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 48～52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen3.12570	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Takayuki, Yamasaki Ryo, Kira Jun-ichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel Neuropathic Pain Mechanisms Associated With Allergic Inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2019.01337	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Takayuki, Yamasaki Ryo, Miyachi Yukino, Nagata Satoshi, Maimaitijiang Guzailiyi, Nakamura Yuri, Shinoda Koji, Matsushita Takuya, Isobe Noriko, Kira Jun-ichi	4. 巻 409
2. 論文標題 Central nervous system-specific antinuclear antibodies in patients with multiple sclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 116619～116619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2019.116619	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Takayuki Fujii, Ryo Yamasaki, Yukino Miyachi, Kyoko Iinuma, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 Intrathecal injection of neuropathic pain patient-derived anti-Plexin D1-IgG induces allodynia in mice
3. 学会等名 61st Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井 敬之、山崎 亮、宮地 佑希野、飯沼 今日子、 Eun-Jae Lee、 Kwang-Kuk Kim、 吉良 潤一
2. 発表標題 抗Plexin D1抗体陽性小径線維ニューロパチーの 発見と受動免疫による疼痛の再現
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 藤井 敬之、山崎 亮、宮地 佑希野、飯沼 今日子、 Eun-Jae Lee、 Kwang-Kuk Kim、 吉良 潤一
2. 発表標題 抗Plexin D1抗体ELISA法の開発と神経障害性疼痛を主徴とする同抗体陽性small fiber neuropathyの発見
3. 学会等名 第31回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujii Takayuki、 Yamasaki Ryo、 Miyachi Yukino、 Iinuma Kyoko、 Kira Jun ichi
2. 発表標題 Anti-plexin D1 antibody and painful neuropathy
3. 学会等名 60th Annual Meeting of The Japanese Society of Neurology (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujii Takayuki、 Yamasaki Ryo、 Miyachi Yukino、 Iinuma Kyoko、 Kira Jun ichi
2. 発表標題 Quantitative measurement of anti-plexin D1 antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay
3. 学会等名 60th Annual Meeting of The Japanese Society of Neurology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Fujii
2. 発表標題 Plexin D1 antibody in neuropathic pain and atopic myelitis
3. 学会等名 The 6th MS Summer College in Fukuoka (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井敬之、山崎亮、宮地佑希野、飯沼今日子、吉良潤一
2. 発表標題 Enzyme-linked immunosorbent assayによる抗plexin D1抗体測定系の確立
3. 学会等名 第30回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井敬之、山崎亮、宮地佑希野、飯沼今日子、吉良潤一
2. 発表標題 抗plexin D1抗体測定系の確立と疾患スペクトラムの実態解明
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 藤井敬之、山崎亮、宮地佑希野、飯沼今日子、吉良潤一
2. 発表標題 A Novel Autoantibody against Plexin D1 in Patients with Neuropathic Pain
3. 学会等名 第72回日本自律神経学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井敬之、山崎亮、宮地佑希野、飯沼今日子、吉良潤一
2. 発表標題 抗plexin D1抗体測定系の確立と髄液サイトカインの網羅的解析
3. 学会等名 第72回日本自律神経学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 藤井敬之、宮地佑希野	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本臨牀社	5. 総ページ数 6
3. 書名 日本臨牀 特集 免疫性神経疾患update	

〔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		
韓国	Asan medical center		