

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390241

研究課題名(和文)

視神経脊髄炎(デビック病)におけるアクアポリン4関連分子及び細胞病態の解明

研究課題名(英文) Clarification of aquaporin-4 related molecular and cellular pathomechanism in neuromyelitis optica (Devic's disease)

研究代表者

藤原 一男 (FUJIHARA KAZUO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70280873

研究成果の概要(和文)：視神経脊髄炎(NMO)は、重症の視神経炎と横断性脊髄炎を繰り返す神経難病である。本研究により、NMOに特異な自己抗体であるアクアポリン4(AQP4)抗体が、NMOの病勢に伴い変動することが示唆された。またAQP4抗体はin vitro及びin vivoで病原性を有し、NMOは免疫介在性アストロサイトパチーという新たな疾患概念であることを明示した。NMOの治療では、ステロイドの長期漸減療法が早期の再発予防に有効であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Neuromyelitis optica (NMO) is an intractable neurologic disease characterized by recurrent severe optic neuritis and transverse myelitis. The present study showed that the titers of aquaporin 4 (AQP4) antibody, an autoantibody unique to NMO, reflect disease activity. We also demonstrated that AQP4 antibody has a pathogenic potential in vitro and in vivo, and that NMO is a new clinical entity (immune-mediated astrocytopathy). Concerning therapy of NMO, we found therapeutic efficacy of long-term gradual steroid tapering in preventing early relapse of this disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経病態免疫学

キーワード：脳神経疾患、視神経脊髄炎、デビック病

1. 研究開始当初の背景

(1) 視神経脊髄炎(Neuromyelitis Optica [NMO]、デビック病)は重症の視神経炎と横断性脊髄炎のみを繰り返す重篤な免疫性神経難病である。わが国では従来NMOは、多発性硬化症(MS)の一病型(視神経脊髄型MS)に分類されてきた。このため中枢神経内に病変が播種する古典的MS(classical MS)との臨床的相違点が指摘されてはいたが、類似の治療法が用いられてきたためインターフェロンベ

ーターや副腎皮質ステロイドなどの有効性について混乱が生じてきた。

(2) NMOに特異的な自己抗体(抗AQP4抗体)の発見：2004年、我々は米国メイヨークリニックとともにNMO症例に特異的に検出され、MSには全くみられない自己抗体(NMO-IgG)を報告した(Lancet, 2004:Lancet Neurol, 2006)。NMO-IgGは蛍光免疫組織染色により微小血管、軟膜、軟膜下組織などが染色される。その後2005年にNMO-IgGの標的抗原が脳の

水分子のチャンネルであるアクアポリン 4 (AQP4) であることが見出された。すなわち NMO-IgG は抗 AQP4 抗体である。AQP4 はアストロサイトの足突起に高密度に発現している。

MO に特異な病変分布：我々は、抗 AQP4 抗体陽性例において失明と 3 椎体以上に及ぶ長く横断面では中心灰白質に主座を置く脊髄病変が有意に高頻度であることや一部の症例で MS と異なる脳病変(第 3 脳室周囲の視床下部病変、長軸方向に長く進展する大脳病変、第 4 脳室周囲の吃逆と嘔吐を症状とする病変など)を報告した(Neurology, 2005: JNNP, 2006: J Neurol, in press)。脊髄中心灰白質や脳室周囲は AQP4 の高発現部位であり、この特異な病変分布と関連が推測された。

着想に至った経緯：2 つの重要な進歩 [抗 AQP4 抗体測定系確立と NMO 病変での AQP4 消失の発見]

① 抗ヒト AQP4 抗体アッセイ系の確立 (Tohoku JExp Med, 2006: Brain, 2007) 我々は抗ヒト AQP4 抗体を鋭敏に検出する系を確立した。このアッセイ系は再現性で抗体価を算出でき、NMO 例の 90% で本抗体陽性だった。また抗 AQP4 抗体価は NMO 病勢を反映して変動し、本自己抗体が NMO の診断のみならず、その病態にも直接関わっている可能性が示唆された。

② Loss of AQP4 in Active Perivascular Lesions in NMO (Tohoku J Exp Med, 2006: Brain, 2007)

我々は免疫組織化学的解析を行い NMO の脊髄病変ではアストロサイトの指標である AQP4 (ピンク) と Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (茶色) と染色性が広範に消失していることを発見した。一方ミエリン塩基性タンパク (MBP) の染色性 (茶色) は比較的保たれていた。組織の強拡大像では、血管周囲に免疫グロブリンや活性化補体が沈着し、その周囲には AQP4 と GFAP の染色性が消失していた。

2. 研究の目的

(1) 抗 AQP4 抗体、抗ミエリン抗体の病原性及び病勢との関連の解析

[A] エピトープ解析、[B.] 病勢における抗体価の推移、[C] 抗 AQP4 抗体サブクラスの解析、[D] 抗 AQP4 抗体の動物モデル実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における病原性の検討、[E] 免疫沈降法その他新たな抗体アッセイ系の確立

(2) NMO 患者のリンパ球反応の検討

[A] NMO 患者末梢血単核球における T 細胞、B 細胞の表面マーカーのフローサイトメーター解析

(3) NMO に特異なアストロサイト細胞障害性の証明 ~AQP4 を標的とするアストロサイ

ト病~

[A] 髄液、血清アストロサイト関連タンパク濃度の測定、

[B] 抗 AQP4 抗体の病原性

(4) NMO の有効な治療法の検討

3. 研究の方法

(1) 抗 AQP4 抗体の病原性及び病勢との関連の解析

[A] エピトープ解析：抗 AQP4 抗体陽性 NMO、NMO の High Risk Syndrome (再発性視神経炎あるいは 3 椎体以上の長い脊髄炎のみの症例) 症例における抗 AQP4 抗体が結合する抗原エピトープの解析を行う。

[B.] 病勢における抗体価の推移：NMO 症例において臨床経過を追って血清及び再発時の髄液検体を採取し、抗体価の推移を下記の方法で分析する。抗 AQP4 抗体アッセイ系：成人ヒト小脳 cDNA library から AQP4 cDNA を増幅しクローニングし、HEK-293 細胞に対して AQP4 のトランスフェクションを行う。得られた安定な細胞株を geneticin を用いて選択する。AQP4 トランスフェクション後は 30~40% の細胞が間接蛍光抗体法で陽性に染色される。ベクターのみの細胞は染色されない。血清を AQP4 あるいはベクターのみをトランスフェクした HEK-293 細胞に添加し、反応後に蛍光色素 (FITC) で標識したウサギ抗ヒト IgG 抗体を添加して細胞を固定し蛍光顕微鏡下で染色性を観察する。二重染色では、さらにヤギ抗ヒト AQP4 抗体を添加し、ローダミン標識ヤギ抗ウサギ IgG を加え、共焦点顕微鏡下で染色性を比較し陽性、陰性の判定を行う。陽性検体では 4 倍から連続的に 2 倍希釈して、陽性となる最大の希釈倍率を抗体価とする。

[C] 抗 AQP4 抗体サブクラスの解析：抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者の血清及び髄液中の IgG 抗体のサブクラス (IgG1-IgG4) 検討する。

[D] 抗 AQP4 抗体の動物モデル EAE における病原性の検討：まず抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者の血漿あるいは抗体陰性患者からプロテイン G カラムを用いて精製した IgG 分画を得る。この抗 AQP4 抗体を含む精製 IgG 分画を用いて transfer EAE の実験系で以下の 1)~5) の条件でラットに投与する。1) MBP などの EAE 惹起性 T 細胞ラインのみ (Day 0 で投与)、あるいは抗 AQP4 抗体陰性者の精製 IgG 分画 (Day3-4 で投与) とともに投与、2) 1) の条件にウサギ補体を添加、3) EAE 惹起性 T 細胞ライン及び抗 AQP4 抗体を含む精製 IgG 分画、4) 3) の条件にウサギ補体を添加、5) 抗 AQP4 抗体を含む精製 IgG 分画及びウサギ補体を投与 (EAE 惹起性 T 細胞ラインは投与しない) 投与 3 日後に病理学的に炎症、脱髄、軸索傷害、GFAP の染色性、免疫グロブリン及び補体の沈着などについて解析する。

[E] 免疫沈降法その他新たな抗体アッセイ系の確立：前述の AQP4 発現細胞を用いて免疫沈降して NMO 患者血清の結合が観察される条件を設定する。

(2) NMO 患者の T 細胞、B 細胞の検討

[A] AQP4 に対する T, B 細胞反応の解析：NMO 患者の末梢血単核球のリンパ球表面マーカーをフローサイトメーターで分析する。

(3) NMO に特異なアストロサイト細胞障害性の証明

[A] 髄液アストロサイト関連タンパク濃度の測定：NMO, MS 及び種々の疾患対照群（緊張型頭痛、脊髄梗塞、CJD、ベーチェット病など）の各々 20 例の髄液及び血清において GFAP, S-100 (アストロサイト関連タンパク) また MBP, neurofilament heavy chain (軸索傷害のマーカー) の ELISA 法により濃度を測定する。これにより NMO におけるアストロサイト細胞障害の特異性を証明する。

(4) NMO の治療について、自験例においてステロイド治療の有効性と投与方法を解析する。

4. 研究成果

(1) AQP4 抗体に関する検討

[A] AQP4 抗体のエピトープ解析により、NMO では症例により AQP4 抗体は複数の AQP4 の細胞外ドメインに結合することが示唆された。

[B] NMO 症例における抗体価の経時的解析では再発時期に高く、免疫抑制療法により寛解状態が継続している時期には低下する傾向が確認された。しかし抗体価は症例毎に様々であった。

[C] AQP4 抗体は主として IgG1 サブクラスであった。

[D] ミエリン反応性 T 細胞の注入により発症させる EAE において AQP4 抗体を同時に血中に投与すると、NMO 様の病変 (AQP4, GFAP の染色性消失、血管周囲の免疫グロブリンや活性化補体の沈着、好中球の侵潤など) が脊髄中心灰白質中心にみられた。一方、AQP4 抗体のみあるいは AQP4 抗体陰性の IgG をミエリン反応性 T 細胞とともに投与しても NMO 様の病変はみられなかった。

[E] 細胞を用いたアッセイ法とほぼ同等の検出感度を有する AQP4 抗体 ELISA アッセイ法を開発した。

(2) NMO のリンパ球解析

[A] NMO の種々の B 細胞マーカーをフローサイトメーターで解析したが、対照群と大きな相違は見られなかった。また AQP4 反応性 T 細胞は NMO の病態に影響を及ぼすが重篤な病変形成には AQP4 抗体が必要であることを実験的に観察した。

(3) NMO に特異なアストロサイト細胞障害性の証明

[A] NMO の再発時の髄液中におけるアストロサイトの特異的タンパクである GFAP の濃度

を測定すると、平均で数千 ng/ml と MS の再発時の値 (1ng/ml 未満) に比べて極めて高値であった。また NMO においてはステロイドパルス治療後は髄液 GFAP 濃度は正常近くまで低下した。すなわち NMO の再発時には急激に高度のアストロサイト障害が起きており、MS とまったく異なる病態であることが明らかになった。

[B] 培養アストロサイトに AQP4 抗体と補体を添加すると細胞障害が観察された。AQP4 抗体のみでは細胞破壊は起こらなかったが、細胞表面の AQP4 が endocytosis, degradation により消失していった。この変化は AQP4 抗体を除去すると可逆性だった。

(4) NMO のステロイド治療法の検討。当科症例の解析により再発後のプレドニゾロン投与量は 1.5 年は 10mg/日以上を保持し、その後漸減することにより早期の再発が抑制されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 84 件)

- ① Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O' Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*, 69:292-302, 2011. 査読有
- ② Shimizu Y, Fujihara K, Kubo S, Takahashi T, Misu T, Nakashima I, Yokoyama K, Itoyama Y, Uchiyama S. Therapeutic efficacy of interferon beta-1b in Japanese patients with optic-spinal multiple sclerosis (OSMS). *Tohoku J Exp Med*, 223:211-214, 2011. 査読有
- ③ Koga M, Takahashi T, Kawai M, Fujihara K, Kanda T. A serological analysis of viral and bacterial infections associated with neuromyelitis optica. *J Neurol Sci*, 300:19-22, 2011. 査読有
- ④ Kim W, Park MS, Lee SH, Kim SH, Jung IJ, Takahashi T, Misu T, Fujihara K, Kim HJ. Characteristic brain MRI abnormalities in CNS aquaporin-4 autoimmunity. *Mult Scler*, 16:1229-1236, 2010. 査読有
- ⑤ Takano R, Misu T, Takahashi T, Sato S, Fujihara K, Itoyama Y. Astrocytic damage is far severer than demyelination in NMO: a clinical CSF biomarker study. *Neurology* 75:208-216, 2010. 査読有
- ⑥ Sharma R, Fischer MT, Bauer J, Felts PA, Smith KJ, Misu T, Fujihara K, Bradl M,

- Lassmann H. Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination. *Acta Neuropathol*, 120:223-236, 2010. 査読有
- ⑦ Nakamura M, Nakazawa T, Doi H, Hariya T, Omodaka K, Misu T, Takahashi T, Fujihara K, Nishida K. Early high-dose intravenous methylprednisolone is effective in preserving retinal nerve fiber layer thickness in patients with neuromyelitis optica. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 248:1777-1785, 2010. 査読有
- ⑧ Suzuki N, Takahashi T, Aoki M, Misu T, Konohana S, Okumura T, Takahashi H, Kameya S, Yamaki K, Kumagai T, Fujihara K, Itoyama Y. Three cases of neuromyelitis optica preceded by hyperCKemia episode. *Neurology*, 74:1543-1545, 2010. 査読有
- ⑨ Bradl M, Misu T, Takahashi T, Watanabe M, Mader S, Reindl M, Adzemovic M, Bauer J, Berger T, Fujihara K, Itoyama Y, Lassmann H. Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Ann Neurol*, 66:630-643, 2009. 査読有
- ⑩ Nishiyama S, Ito T, Misu T, Takahashi T, Kikuchi A, Suzuki N, Jin K, Aoki M, Fujihara K, Itoyama Y. A case of NMO seropositive for aquaporin-4-antibody over 10 years before the onset. *Neurology*, 72:1960-1961, 2009. 査読有
- ⑪ Nakamura M, Misu T, Fujihara K, Miyazawa I, Nakashima I, Takahashi T, Watanabe S, Itoyama Y. Occurrence of acute large and edematous callosal lesions in neuromyelitis optica. *Mult Scler*, 15:695-700, 2009. 査読有
- ⑫ Misu T, Takano R, Fujihara K, Takahashi T, Sato S, Itoyama Y. Marked Increase of CSF GFAP in neuromyelitis optica-an astrocytic damage marker. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 80:575-577, 2009. 査読有
- ⑬ Takahashi T, Miyazawa I, Misu T, Takano R, Nakashima I, Fujihara K, Tobita M, Itoyama Y. Intractable hiccup and nausea in neuromyelitis optica with anti-aquaporin-4 antibody: a herald of acute exacerbations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79:1075-1078, 2008. 査読有
- ⑭ Shimizu Y, Yokoyama K, Misu T, Takahashi T, Fujihara K, Kikuchi S, Itoyama Y, Iwata M. Development of extensive brain lesions following interferon beta therapy in relapsing neuromyelitis optica and longitudinally extensive myelitis. *J Neurol*, 255:305-307, 2008. 査読有
- [学会発表] (計 31 件)
- ① Fujihara K. The spectrum of neuromyelitis optica (NMO): clinical phenotypes, pathology and pathogenesis, S4 Symposium: New developments in CNS inflammation and MS, The 17th International Congress of Neuropathology (ICN), Salzburg (Austria), September 13, 2010.
- ② Fujihara K. Apheresis in neuromyelitis optica (NMO), Japanese session: Therapeutic apheresis in Japan, The 13th International Congress of World Apheresis Association (WAA)/The 7th International Society for Apheresis (ISFA) Congress, Interlaken (Switzerland), September 2, 2010
- ③ Fujihara K. Risk-benefit balance in NMO treatment, Pan-Asian Committee for Treatment and Research for Multiple Sclerosis (PACTRIMS), Bali (Indonesia), August 27, 2010.
- ④ Fujihara K. A clinical biomarker study of astrocytic damage in NMO, Neuroimmunology Kyoto Conference 2010, Kyoto, August 19, 2010.
- ⑤ Fujihara K. Diagnosis of multiple sclerosis in Asia and Latin America, The International Panel Meeting on the Diagnosis of Multiple Sclerosis, Dublin (Ireland), May 20, 2010.
- ⑥ Fujihara K. The relationship between MS and NMO in Japan. Lecture, The 11th Brazilian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (BCTRIMS), Porto Alegre (Brazil), May 5-8, 2010.
- ⑦ Fujihara K. Anti-aquaporin 4 (AQP4) antibody and neuromyelitis optica (NMO). Scientific session Devic's neuromyelitis optica, The 11th Brazilian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (BCTRIMS), Porto Alegre (Brazil), May 5-8, 2010.
- ⑧ Fujihara K. Neuromyelitis optica (NMO): clinical phenotypes and pathogenesis. MS network symposium, Seoul (Korea), Feb. 18, 2010.
- ⑨ Fujihara K. Issues and need for consensus: The Tokyo Workshop. MS Forum

Satellite Symposium (Management of MS Spectrum Disorders in Asia) in Pan-Asian Committee for Treatment and Research for Multiple Sclerosis (PACTRIMS), Hong Kong, Nov. 21-22, 2009.

- ⑩ Fujihara K. Neuromyelitis optica (NMO): Astrocytic damage in its pathogenesis. European Charcot Foundation 2009, Lisbon, Nov. 12-14, 2009.
- ⑪ Fujihara K. MS Variant: NMO. Teaching course: Treatment options for MS, World Congress of Neurology 2009, Bangkok, Oct. 24, 2009.
- ⑫ Fujihara K. Clinical implications of aquaporin4 antibody in neuromyelitis optica. International Symposium: New aspects of NMO, Awajishima, Oct. 2-3, 2009.
- ⑬ Fujihara K. Neuromyelitis optica (NMO): an update. 2nd German-Japanese Neuroimmunology Symposium, Eibsee, July 9-12, 2009.
- ⑭ Fujihara K. NMO in Asians. Symposium: AQP4 Autoimmunity: Pro and Con, PACTRIMS2008, Kuala Lumpur, Nov. 21, 2008.
- ⑮ Fujihara K. Neuromyelitis optica and aquaporin-4. Symposium SY3A-D: Roles of aquaporins in the central nervous system. The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuroscience 2008), Tokyo, July 11, 2008.

[図書] (計 12 件)

- ① 藤原一男. 多発性硬化症. 今日の診断指針(第6版). 金澤一郎、永井良三編. pp664-667, 医学書院、2010.
- ② 三須建郎、藤原一男、糸山泰人. NMOに対する最新の治療法は. EBM 神経疾患の治療 2009-2010(第1版). 岡本幸市、棚橋紀夫、水澤英洋編. Pp416-421、中外医学社、2009.
- ③ 藤原一男. 多発性硬化症(MS)と視神経脊髄炎(NMO)の治療の進歩. Annual Review 神経 2009. 柳澤信夫、篠原幸人、岩田 誠、清水輝夫、寺本 明編. pp203-210、中外医学社、2009.
- ④ 藤原一男. IV 疾患別各論 脳疾患 多発性硬化症と視神経脊髄炎. 神経疾患最新の治療 2009-2011 小林祥泰、水澤英洋編. pp143-147、南江堂、2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計◇件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ms.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 一男 (FUJIHARA KAZUO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 70280873

(2) 研究分担者

糸山 泰人 (ITOYAMA YASUTO)

国立精神・神経医療研究センター・病院・病院長

研究者番号: 30136428

三須 建郎 (MISU TATSURO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 00396491

中島 一郎 (NAKASHIMA ICHIRO)

東北大学・病院・講師

研究者番号: 50333810