

令和 5 年 4 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16577

研究課題名（和文）治療層別化に向けた原因不明自己免疫性脳炎single-cell病態解析

研究課題名（英文）Single-cell analysis of autoimmune encephalitis of unknown etiology for treatment stratification

研究代表者

石倉 照之（Ishikura, Teruyuki）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：80838524

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）：自己免疫性脳炎の臨床情報、髄液、血清、末梢血単核球細胞などサンプル収集を行った。中枢炎症性疾患の一つである視神経脊髄炎スペクトラム障害(NMOSD)患者の髄液形質細胞をシングルセルソーティングしてアクアポリン4抗体を作成した。抗体を脊髄に直接注射することでラット疼痛動物モデルを作成し、ATPに着目した疼痛メカニズムを明らかにした。現在はラット脳切片を用いて自己免疫性脳炎患者髄液、血清中の抗神経抗体のスクリーニングを行って、髄液中に抗神経抗体を含むサンプルもいくつか集まってきている。同患者の髄液細胞、末梢血単核球細胞から病原性自己抗体を作成し動物モデルの作成を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NMOSD患者の疼痛を呈する割合は高く、薬剤抵抗性であり、QOLを大きく低下させるため臨床的に大きな問題となっている。今回動物モデルを用いてNMOSD疼痛にATPが重要であることを示し、治療方法に結び付くと考えられる。またシングルセルソーティングによって得られた患者由来自己抗体から動物モデルを作成する手法は、自己免疫性脳炎にも今後適応することができると考えている。

研究成果の概要（英文）：We collected clinical information, cerebral spinal fluid, serum, and peripheral blood mononuclear cells from autoimmune encephalitis patients. We generated patient-derived aquaporin 4 antibody by Single-cell sorting of cerebral spinal fluid plasmablasts from neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD) patients. By injecting the antibody directly into the rat spinal cord, we created a NMOSD pain animal model and clarified the pain mechanism focusing on ATP. Currently, we are still screening for anti-neuronal antibodies in cerebral spinal fluid and serum of autoimmune encephalitis patients using rat brain sections, and some samples containing anti-neuronal antibodies have been collected. We hope to create an animal model in the future by generating pathogenic autoantibodies from cerebral spinal fluid cells and peripheral blood mononuclear cells from the autoimmune encephalitis patients.

研究分野：神経免疫学

キーワード：自己免疫性脳炎 視神経脊髄炎スペクトラム障害 アクアポリン4抗体 神経障害性疼痛

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫介在性脳炎 (Autoimmune-mediated encephalitis:AIE) は幅広い年齢層に発症し、高度の神経障害残存を呈する難治性疾患である。近年の精力的な研究により様々な疾患特異的自己抗体が同定されたことで、以前は分離不能であった疾患群が層別化され確定診断や個別化治療確立に多大な貢献を行ってきた。しかし上記のような研究領域の進歩にも関わらず、約半数を超える AIE 患者では特異的自己抗体は陰性であり、免疫病態機序が不明であることから経験的治療に委ねられているのが現状である。

2. 研究の目的

均質でない疾患群である AIE において、当研究室にて確立している革新的免疫解析法であるシングルセル解析を駆使し、新規バイオマーカーの確立および治療ターゲットの層別化を可能とする免疫動態解明を目指した。

3. 研究の方法

AIE 患者や他の中枢性炎症性疾患患者の髄液細胞から抗体産生する形質細胞をシングルセル分離し、単一細胞レベルの相補的 DNA 作成を行う。相補的 DNA をテンプレートとし nested PCR を行いプラスミド化する。作成したプラスミドを用いて培養細胞に形質導入し、上清中に大量のモノクローナル抗体を産生させる。得られたモノクローナル抗体でラット脳組織の免疫染色を行うことで、標的抗原の分布を確認し、発現細胞集団の絞り込みを行う。ラット初代培養で得られる神経もしくはグリア細胞を用いて免疫沈降法により自己抗体の標的抗原の同定を質量分析で行う。

4. 研究成果

中枢性炎症性疾患の代表である視神経脊髄炎スペクトラム障害(NMOSD)患者の髄液形質細胞からリコンビナント AQP4 抗体を作成した。この AQP4 抗体をラットの脊髄に直接注射することにより、NMOSD 病巣を作成した(図 1、2)。この動物は Von Frey 試験で抗体投与後 3 日目をピークに疼痛症状を示し、NMOSD ラット疼痛モデルの確立に成功した(図 3)。NMOSD 患者の疼痛を呈する割合は高く、薬剤抵抗性であり、QOL を大きく低下させるため臨床的に大きな問題となっている。この動物モデルを用いて NMOSD 疼痛に ATP が重要であることを示した。

なお自己免疫性脳炎の臨床情報、髄液、血清、PBMC などサンプルの収集は引き続き行っている。自己免疫性脳炎でもラット脳切片を用いて髄液、血清中の抗神経抗体のスクリーニングを行って、髄液中に抗神経抗体を含むサンプルもいくつか集まってきている。それらの抗神経抗体の病原性を評価して、同様の手法で自己免疫性脳炎のリコンビナント抗体を作成し、最終的に動物モデル作成を試み、病態解明を目指したいと考えている。

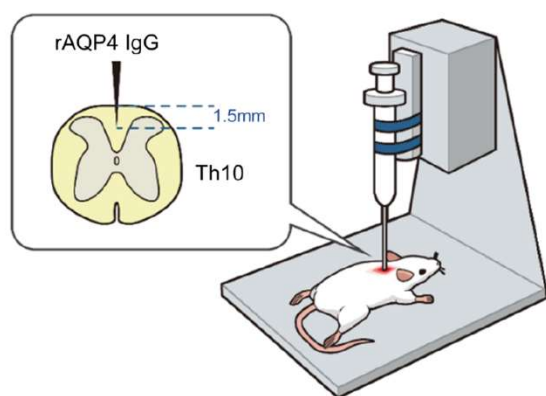


図 1

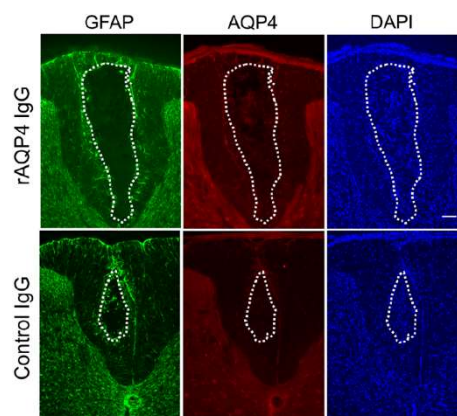
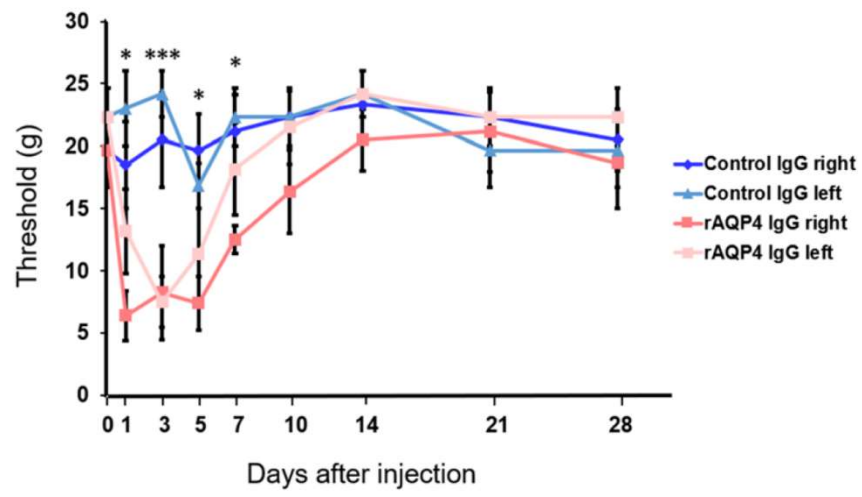


図 2



3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tomoya Wadayama, Mikito Shimizu, Tomohiro Yata, Teruyuki Ishikura, Yuta Kajiyama, Daisuke Hirozawa, Tatsusada Okuno, Hideki Mochizuki	4. 巻 363
2. 論文標題 Cryptogenic new-onset refractory status epilepticus responded to anti-interleukin-6 treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology	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） 10.1016/j.jneuroim.2021.577789	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 Shohei Beppu, Makoto Kinoshita, Jan Wilamowski, Tadahiro Suenaga, Yoshiaki Yasumizu, Kotaro Ogawa, Teruyuki Ishikura, Satoru Tada, Toru Koda, Hisashi Murata, Naoyuki Shiraishi, Yasuko Sugiyama, Keigo Kihara, Tomoyuki Sugimoto, Hisashi Arase, Daron M Standley, Tatsusada Okuno, Hideki Mochizuki	4. 巻 12
2. 論文標題 High cell surface expression and peptide binding affinity of HLA-DQA1*05:03, a susceptible allele of neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-021-04074-1.	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 Teruyuki Ishikura et al.	4. 巻 18
2. 論文標題 Anti-AQP4 autoantibodies promote ATP release from astrocytes and induce mechanical pain in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of 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） 10.1186/s12974-021-02232-w	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 Toru Koda, Akiko Namba, Makoto Kinoshita, Yuji Nakatsuji, Tomoyuki Sugimoto, Kaori Sakakibara, Satoru Tada, Mikito Shimizu, Kazuya Yamashita, Kazushiro Takata, Teruyuki Ishikura, Syo Murata, Shohei Beppu, Atsushi Kumanogoh, Hideki Mochizuki, Tatsusada Okuno	4. 巻 17
2. 論文標題 Sema4A is implicated in the acceleration of Th17 cell-mediated neuroinflammation in the effector phase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of 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） 10.1186/s12974-020-01757-w.	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 Mikito Shimizu, Tatsusada Okuno, Makoto Kinoshita, Hisae Sumi, Harutoshi Fujimura, Kazuya Yamashita, Tomoyuki Sugimoto, Shuhei Sakakibara, Kaori Sakakibara, Toru Koda, Satoru Tada, Teruyuki Ishikura, Hisashi Murata, Shohei Beppu, Naoyuki Shiraishi, Yasuko Sugiyama, Yuji Nakatsuji, Atsushi Kumanogoh, Hideki Mochizuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Mitochondrial DNA enhance innate immune responses in neuromyelitis optica by monocyte recruitment and activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-020-70203-x.	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Teruyuki Ishikura, Makoto Kinoshita, Tatsusada Okuno, Hideki Mochiduki
2. 発表標題 ATP mediates neuropathic pain in neuromyelitis optica via microglial activation
3. 学会等名 15th ISNI Congress - International Society of Neuroimmunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石倉照之、木下允、甲田亨、宮本勝一、奥野龍禎、望月秀樹
2. 発表標題 新規NMO/D疼痛動物モデルとATP、ミクログリア、IL-1 による疼痛機序
3. 学会等名 第39回日本神経治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Teruyuki Ishikura
2. 発表標題 ATP induces neuropathic pain in neuromyelitis optica spectrum disorder through microglial activation
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石倉照之
2. 発表標題 新規NMODS疼痛モデル動物樹立とATPシグナル経路解明
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会
4. 発表年 2020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
---------	---------