

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 7日現在

機関番号：32645
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591967
 研究課題名（和文） 難治性視神経脊髄炎に対する神経ペプチド遺伝子組み込み
 免疫制御細胞の開発
 研究課題名（英文） Suppression of murine experimental autoimmune optic neuritis by
 innovation of mature dendritic cells transfected with calcitonin
 gene-related peptide gene.
 研究代表者
 毛塚 剛司 (KEZUKA TAKESHI)
 東京医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：00287137

研究成果の概要（和文）：ヒト視神経炎において、抗アクアポリン(AQP)4抗体が陽性で、かつ抗MOG抗体の陽性例では重症化していた。マウス視神経炎モデルでは、まず視力低下が起こり、引き続きミクログリアや炎症細胞が浸潤することが判明した。その後、神経軸索数が減少するとともに視覚誘発電位(VEP)の潜時も延長していた。カルシトニン遺伝子関連蛋白質(CGRP)遺伝子を導入した樹状細胞やIL-10遺伝子を導入した樹状細胞を用いた免疫制御細胞療法により、マウス視神経炎が抑制可能であることが明らかとなった。マウス視神経炎に対する免疫調節薬フィンゴリモドの投与は、視神経への細胞浸潤を抑制した。

研究成果の概要（英文）：The disease becomes severe in individuals who possess anti-AQP4 antibodies, together with anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) antibodies. In optic neuritis models, visual acuity decreases first, infiltration of microglia and inflammatory cells. Thereafter, the number of axons decreases and latency of visually evoked potential (VEP) is prolonged. Applying this phenomenon, cell therapy using dendritic cells transfected with CGRP or dendritic cells transfected with IL-10 was attempted, and was found to be effective in suppressing optic neuritis. At the same time, as a more practical therapy, administration of the new multiple sclerosis drug fingolimod suggests suppression of cell infiltration into the optic nerve.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：視神経炎、免疫制御療法、細胞治療、抗アクアポリン4抗体、抗MOG抗体、IL-10、多発性硬化症、視神経脊髄炎

1. 研究開始当初の背景

(1) マウス視神経炎モデルの開発の歴史

以前から多発性硬化症に視神経脊髄炎を生じた場合、ステロイド治療の無効例の存在が問題視されており、早急な治療法の開発が望まれていた。また、新しい治療法を開発するには、多発性硬化症に併発する視神経脊髄炎のマウスモデルの確立が必要であった。Shaoらは、C57BL/6マウスに脊髄蛋白に対するペプチドを免疫し、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を発症せしめ、視神経炎をも発症させることに成功した。研究代表者らは、この視神経脊髄炎マウスモデルを改良し、簡便な免疫で視神経炎の発症率を9割にまで引き上げる方法を開発した。

(2) 我々の取り組み：マウス視神経炎モデルの解析と新規治療法の開発について

我々の予定では、免疫学的解析によりマウス視神経炎の病態を同定し、ターゲットとなる細胞を確定させる。次に治療として、視神経炎マウスモデルに神経ペプチドの一種であるCGRP遺伝子を導入した免疫制御細胞を注入し、視神経脊髄炎の抑制の程度を病理学的に検証し、抑制のメカニズムを免疫学的に解析する。マウスモデルを用いた視神経脊髄炎の抑制メカニズムがおおよそ解明されてから、ヒト視神経脊髄炎に対する臨床応用の可能性について、基礎的な検討を行う。神経免疫は近年目覚ましく解析が進んでいる分野でありながら、視神経脊髄炎型多発性硬化症の活動期の治療法としては、まだステロイド大量療法が主流であり、他には患者への身体的負担

が大きい血漿交換療法しか選択の余地がないのが実情である。ステロイド療法も繰り返しているうちに効果が減弱し、決め手となる治療法がなくなってしまうことが多い。我々が以前行ったマウス難治性ぶどう膜炎の治療で目覚ましい効果をあげた免疫制御細胞の注入療法を用いれば、治療の選択肢が増えることになる。また最近、国内外で免疫調整を行う細胞療法が脚光を浴びており、遺伝子導入の手法を用いた細胞療法は従来の治療法より疾患特異的で、患者本人の細胞を用いるために、副作用をはじめとした身体的負担が少ないと考えられる。この方法を確立することにより、多くの失明の危機に瀕している視神経脊髄炎患者にとって切り札となる治療法になることが期待される。

2. 研究の目的

難治性神経疾患である多発性硬化症は、日本において人口10万人あたり10—20人の有病率である。このうち多発性硬化症に併発する視神経脊髄炎は、両眼の失明という最悪な事態を引き起こす可能性のある重篤な疾患である。治療法はステロイド大量投与が一般的であるが、無効例も多く新しい革新的な治療法が求められている。そこで以下の項目を中心に検討した。

(1) ヒト視神経炎において、どのような抗原もしくは抗体が病態に関与しているか検討する。

(2) マウス視神経炎モデルを免疫学的に解析し、ヒト視神経炎とのつながりを検討する。

(3) このマウス視神経炎モデルを用いて新

規に免疫細胞療法を開発し、ヒト視神経脊髄炎への臨床応用の実現を目的とする。

3. 研究の方法

視神経脊髄型多発性硬化症の病態を深く理解するために、まず患者血清から病態に関連する抗体を検索し、関連を探った。その解析を基に、発症率の高いマウスモデルを作成し、免疫病理学的に解析を行った。同時に新しい免疫細胞注入法の基本原理となる神経ペプチド遺伝子組み込み細胞もしくはサイトカイン遺伝子組み込み細胞による免疫制御法が視神経脊髄炎マウスモデルにどの程度効果があるか判定した。

4. 研究成果

(1) ヒト視神経炎における発症関連抗体の探索

抗AQP4抗体陽性視神経炎患者ではおそらく視神経内アストロサイトが標的となり、組織障害が起こると予想される¹⁾。一方、再発を繰り返す多発性硬化症患者に多いミエリン-オリゴデンドロサイトを標的とする抗MOG抗体は、視神経炎患者に存在するのかわかり不明である。そこで我々は、視神経炎患者23名において、抗AQP4抗体と抗MOG抗体の陽性率を検討した(東京医科大学医学研究倫理委員会より No. 1026, 1262, 1983 承認済)^{1), 6)}。結果は、健常人ではほとんど抗MOG抗体が上昇しないのに対し、抗AQP4抗体陽性視神経炎患者では、抗MOG抗体陽性例と陰性例が存在していた¹⁾。また、視神経炎患者において、副腎皮質ステロイドや血漿交換治療前後の視力は、抗AQP4抗体陽性かつ抗MOG抗体陽性例では予後が不良である一方、両抗体陰性例では予後が良好であった^{1), 6)}。また、これらの重症例はNMO患者であることが多かった。これらの症例の抗体検索の結果と予後を検討すると、AQP4を発現しているアストロサイトが標的

となって傷害された場合には、組織の浮腫や血管壁の肥厚を生じ、炎症に加えて神経組織内の血流障害を生じている可能性がある。一方、細胞表面にMOGを有しているミエリン-オリゴデンドロサイトが標的となって傷害された場合には、強い抗原性を有するという免疫学的な特性により、継続的な炎症が起きる可能性がある。以上のことから、アストロサイトとミエリン-オリゴデンドロサイトの両方が障害を受けると、重症化する可能性が高いと推察される。

(2) マウス視神経炎における機能的および免疫学的解析の差異について

マウス視神経炎における視力低下は免疫後21日目にピークを迎え、以後はわずかながら回復していた(正常マウス視力と視神経炎マウス視力の比較: $p=0.0313$, Wilcoxon符号付順位検定)^{1), 5)}。視神経炎マウスではVEPの振幅の低下、潜時の延長がみられ、視神経伝達障害の指標となる潜時の有意な延長は免疫後21日目から確認された^{1), 5)}。次に視神経炎マウスの病理組織学的検討を行ったところ、正常マウスに比べて視神経内に多数の細胞浸潤がみられた^{1), 5)}。また、マウス視神経炎における視神経内の細胞密度の増加は、免疫後14日目に有意にピークを迎え、以降は減少傾向にあった。興味深いことに、視神経内細胞浸潤のピークと同時期である免疫後14日目には視神経内に補体C1qの沈着が認められ、補体結合反応により組織障害が部分的に引き起こされ、細胞浸潤が引き起こされた可能性などが推察された。一方、免疫組織学的な検討において、視神経内の浸潤T細胞は免疫後21日目より増加したが、B細胞はどの時期においても視神経内への細胞浸潤はほとんどみられなかった³⁾。同様に視神経内のミクログリア(Iba1染色)は免疫後14日目より増加し、アストロサイ

ト(GFAP染色)は免疫後21日目に増加し、ミエリン-オリゴデンドロサイト(MBP染色およびolig2染色)は免疫後21日目には減少していた^{1), 5)}。ミエリン-オリゴデンドロサイトが視神経内で減少していたのは、免疫抗原がMOGペプチドであったために直接、標的になったと考えられる。一方、ミクログリアとアストロサイトは反応性に増加したと思われる。視神経内神経軸索は、免疫後14日目で部分的に構造が不整となり、28日目で完全に構造が不整となった^{1), 5)}。また、視神経をエポキシ樹脂で包埋して冠状断で切片を作製し、カウントした視神経内の軸索数は、免疫後21日目より有意に減少していた。これらをまとめると、視神経炎の病態は、まず比較的早期の視力低下と同時に視神経内に補体が沈着し、ミクログリアの視神経内への浸潤が起き、この浸潤のピークは免疫後14日目であった。また、免疫後21日目より機能的な低下、つまりVEPにおける潜時の延長を来し、同時に視神経内にT細胞の浸潤、アストロサイトの増加、ミエリン-オリゴデンドロサイトの減少、軸索数の減少が確認された。これらのマウス視神経炎の検討結果から、ヒト視神経炎の治療においては、発症初期の視力低下からVEPの潜時延長に至るまでの間に積極的な治療を開始するべきであり、軸索数も減少してしまうVEP潜時延長後は視機能の改善が困難となることが考えられる。

(3) CGRP遺伝子組み込み樹状細胞によるマウス視神経炎の抑制

CGRP遺伝子が導入された樹状細胞注入群では、陽性対照群と比較して有意に視神経内への細胞浸潤が軽減していた⁴⁾ ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test)。また、このCGRP遺伝子導入樹状細胞からはIL-10が産生されていることも確認された。一方、CGRP遺伝子導入

樹状細胞による治療後の脾細胞からのサイトカイン産生は、IL-10のみが高値を示し、他のサイトカインはいずれも低値のままであった⁴⁾。以上の結果より、CGRP遺伝子導入樹状細胞によるマウス視神経炎の抑制には、IL-10が関与していることが推察された。

(4) IL-10遺伝子組み込み樹状細胞によるマウス視神経炎の抑制

さらにIL-10遺伝子導入樹状細胞が視神経内に直接作用しているという仮説のもと、IL-10遺伝子導入樹状細胞に蛍光標識を持ったgreen fluorescent protein(GFP)マウス由来の細胞を用いて解析したところ、免疫後14日目にGFP陽性IL-10遺伝子導入細胞が視神経内に認められた³⁾。すなわち、注入した樹状細胞が視神経内の炎症局所に到達していることが確認された。また当システムは抗原刺激の有無にかかわらず、IL-10が遺伝子導入細胞から産生されるために、この細胞療法は抗原非特異的と考えられ、IL-10遺伝子導入樹状細胞が炎症局所の場に到達し、炎症を起こしている臓器へ直接働きかけていることが窺えた³⁾。特に炎症を強く生じている視神経ではIL-10遺伝子導入樹状細胞数が多く、細胞注入後の視神経内にIL-10mRNAが通常の視神経より多く認められた³⁾。陽性対照群のすべてのマウスで視神経炎を発症していたのに対し、IL-10遺伝子導入樹状細胞を投与したマウスでは、その発症は50%程度に抑制され、なおかつ軽症化していた³⁾。また、IL-10遺伝子導入樹状細胞による治療群では、脾細胞からのIL-10を含む測定したすべてのサイトカインの値が低下しており、全身レベルでの免疫制御が生じていると考えられた³⁾。このようにIL-10遺伝子導入樹状細胞の投与により、全身レベルでの免疫制御が起きている可能性が示された。一方では炎症局所に免疫制御性樹状細胞が多

く集簇し、炎症に対して抑制性のサイトカインであるIL-10を作用させていることも十分に考えられ、眼局所において二重の作用機序により免疫抑制作用を発揮している可能性が窺えた。

(5) フィンゴリモドによるマウス視神経炎の抑制

蒸留水を投与した陽性対照群と比較して、フィンゴリモド経口投与免疫マウスでは視神経内の細胞浸潤が有意に減少しており、視神経炎に対する抑制効果が確認された²⁾。また、対照である視神経炎マウスでは21日目をピークに視力が低下していたが、フィンゴリモド経口投与群では正常マウスとほぼ同様に良好な視力が保たれていた²⁾。フィンゴリモドによる視神経炎の抑制の機序については今後の検討を要するが、細胞性免疫および液性免疫の両方から抑制された可能性がある。また、最近マウスにおいてフィンゴリモドによるミエリン再生の可能性が指摘されている。一方、フィンゴリモドが視神経炎の治療に効果的であるという結果に反して、網膜神経節細胞の喪失はある程度避けられないとする報告もある。いずれにしても、今回の研究により、フィンゴリモドの投与によりマウス視神経炎では視神経への細胞浸潤が軽減し、視力の維持が可能であることが示された。

これらの成果を学会に報告し、邦文でまとめた報告を文献1に示す。

5. 主な発表論文等

(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7件)

(1) 毛塚剛司. 視神経炎—免疫学的アプローチによる病態の解明と新規治療法の開発

— 第116回 日本眼科学会総会 評議員指名講演 III 日眼会誌、査読有、117:270-91, 2013.

<http://journal.nichigan.or.jp/PastContent?year=2013&vol=117&number=3&mag=0>

(2) An X, Kezuka T, Usui Y, Matsunaga Y, Matsuda R, Yamakawa N, Goto H. Suppression of Experimental Autoimmune Optic Neuritis by the Novel Agent Fingolimod. J Neuroophthalmol. 査読有、2013 印刷中 <http://journals.lww.com/jneuro-ophthalmology/toc/publishahead>

(3) Matsuda R, Kezuka T, Nishiyama C, Usui Y, Matsunaga Y, Okunuki Y, et al : Interleukin-10 gene-transfected mature dendritic cells suppress murine experimental autoimmune optic neuritis. Invest Ophthalmol Vis Sci、査読有、53 : 7235-7245, 2012. doi: 10.1167/iovs.12-10587.

(4) Matsuda R, Kezuka T, Nishiyama C, Usui Y, Matsunaga Y, Okunuki Y, et al : Suppression of murine experimental autoimmune optic neuritis by mature dendritic cells transfected with calcitonin gene-related peptide gene. Invest Ophthalmol Vis Sci、査読有、53 : 5475-5485, 2012. doi: 10.1167/iovs.12-9935.

(5) Matsunaga Y, Kezuka T, An X, Fujita K, Matsuyama N, Matsuda R, et al : Visual functional and histopathological correlation in experimental autoimmune optic neuritis. Invest Ophthalmol Vis Sci、査読有、53 : 6964-6971, 2012. doi: 10.1167/iovs.12-10559.

(6) Kezuka T, Usui Y, Yamakawa N, Matsunaga Y, Matsuda R, Masuda M, et al :

Relationship between NMO-antibody and anti-MOG antibody in optic neuritis. J Neuroophthalmol, 査読有, 32:107-110, 2012. doi: 10.1097/WNO.0b013e31823c9b6c.

⑦ Kezuka T, Usui Y, Goto H. Analysis of the pathogenesis of experimental autoimmune optic neuritis. J Biomed Biotechnol. 2011, 査読有, 2011:294046. doi: 10.1155/2011/294046.

[学会発表] (計7件)

① Kezuka, T et al. Suppression of experimental autoimmune optic neuritis by the novel agent FTY720. ARVO 2012 Annual Meeting, 2012年05月06-10日. Fort Lauderdale, USA

② Matsunaga Y, Kezuka T, et al. Correlation between visual evoked potential and histopathology in experimental autoimmune optic neuritis. ARVO 2012 Annual Meeting, 2012年05月06-10日. Fort Lauderdale, USA

③ Matsuda R, Kezuka T, et al. Interleukin-10 gene transfected regulatory dendritic cells suppress murine experimental autoimmune optic neuritis. ARVO 2012 Annual Meeting, 2012年05月06-10日. Fort Lauderdale, USA

④ 毛塚 剛司 評議員会指名講演Ⅲ. 神経眼科の進歩. 視神経炎—免疫学的アプローチによる病態の解明と新規治療法の開発—第116回 日本眼科学会総会 (招待講演) 2012年04月05-08日 東京

⑤ Kezuka T, et al. Humoral factor profile in cerebrospinal fluid of patients with optic neuritis. American Academy of Ophthalmology (AAO) annual meeting, 2011年10月22-25日. Orlando, USA

⑥ Kezuka T, et al. Peripheral blood mononuclear cell cytokine production and response to steroid therapy in patients with optic neuritis. ARVO 2011 Annual Meeting, 2011年5月1-5日. Fort Lauderdale, USA

⑦ 松田隆作、毛塚剛司、臼井嘉彦 他 遺伝子導入免疫制御細胞による実験的自己免疫性視神経炎の抑制 第48回 日本神経眼科学会 2010年11月26日 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

毛塚 剛司 (KEZUKA TAKESHI)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00287137

(2) 研究分担者

臼井 嘉彦 (USUI YOSHIHIKO)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：50408142