

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591232

研究課題名(和文) 視神経脊髄炎患者血清中抗アクアポリン4抗体の抗原決定部位の解明

研究課題名(英文) Analysis for Detection of Immunogenic Site on Aquaporin-4 in Neuromyelitis Optica

研究代表者

森 雅裕 (Masahiro, Mori)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70345023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：私たちはアクアポリン4(AQP4) isoform aの全シーケンスのライブラリーデータを用いて合成された156のペプチドから成るアレイを使って以下の解析を行った。22人の視神経脊髄炎患者および8人の疾患/正常対照血清をこのアレイと反応させた。その反応から患者血清中抗アクアポリン4抗体のimmunogenic siteが細胞外ドメインのループA上に存在すると考えられることを見出した。これらの結果を国内(厚生労働省「免疫性神経疾患に関する調査研究班 平成23年度班会議」と第24回日本神経免疫学会学術集会)、および国際学会(および第13回アジアオセアニア神経学会議において発表した。

研究成果の概要(英文)：We performed analysis using arrays consisting synthesized 156 peptides using peptide library data from entire human aquaporin-4 (AQP4) 'isoform a' sequences on a cellulose membrane. These peptides were reacted with serum samples obtained from 22 individuals with neuromyelitis optic (NMO), and 8 disease/normal controls. As a result, we can detect the immunogenic site on AQP4 that is recognized by the anti-AQP4 antibody in NMO patients. A peptides derived from an extracellular loop A of AQP4 may be a central immunogenic site on AQP4 in NMO. We have presented these results in domestic and international conferences.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経免疫疾患 視神経脊髄炎 多発性硬化症 抗アクアポリン4抗体

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景：視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica; NMO) は視神経と脊髄に局限して自己免疫機序に基づく強い炎症を引き起こす神経免疫疾患である。この視神経脊髄炎の患者血清中に、疾患特異的な抗体である「NMO-IgG」が存在し、さらにその抗体の認識する抗原は水分子のチャンネルである aquaporin-4 (AQP4) であることが報告された (Lennon VA, et al. Lancet 2004, Lennon VA, et al. J Exp Med 2005)。これまでに本抗体のげっ歯類への passive transfer や脳内への直接注入により、NMO 類似の病理所見が得られることから (Kinoshita M, et al., Biochem Biophys Res Commun 2009, Saadoun et al., Brain 2009)、本抗体が NMO 発症に深く関与していることが明らかとなっている。我々もこの NMO に注目し、世界で初めて enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法による抗 AQP4 全長蛋白抗体の抗体測定系を開発するとともに抗 AQP4 抗体陽性視神経脊髄炎の臨床的特徴を明らかにし (Hayakawa S et al., J Neuroimmunol 2008)、さらに頭部 MRI で特異な造影所見を呈すること (Ito S, et al., Ann Neurol 2009)、IL-6 がその病態に関与していること (Uzawa A et al., J Neurol 2009, Uzawa A, et al., Mult Scler 2010) などを報告してきている。以上のように解明された部分もあるものの、NMO と同様に視神経と脊髄に比較的局限した病変をきたし、長い脊髄病変をきたすことといった特徴を呈する動物モデルは作製されておらず、いまだに本抗体の病態における役割には未解明の部分があると言わざるをえない。また、今までの治療法の検討により、再発予防では一定の成果をあげているものの、視神経脊髄炎が難治疾患であることに変わりなく、本邦に多く、進行が速く障害度が高いことには変わりはなため、その病態の解明、さらには新規治療法の開発は急務である。もし仮に、患者ごとに抗 AQP4 抗体の抗原決定部位が決定されれば病態解明への寄与は大きく、新規治療へ結びつくことも十分に期待される。抗 AQP4 抗体の認識抗原に関しては現在までに細胞外ドメインを中心とした検討がされている (Tani T, et al., J Neuroimmunol 2009) が、多数患者での検討は成されておらず、患者ごとに認識部位が異なるかなど、その詳細が明らかになっていない状況にある。

2. 研究の目的

抗 AQP4 抗体陽性視神経脊髄炎患者の抗体が反応する AQP4 上の抗原決定部位を網羅的ペプチド解析により、患者ごとに、すなわちテーラーメイド的に抗原決定部位を特定

することを目的とした。

3. 研究の方法

中枢神経または視神経に炎症性病変を有し、同意を得て、自ら開発した ELISA 法により抗 AQP4 全長蛋白抗体を測定した患者 200 名近くのうち、ELISA 法により抗 AQP4 全長蛋白抗体が陽性と判明した 38 例の患者の臨床および検査データを収集した。臨床データに関しては特に再発部位 (視神経・脊髄・大脳・脳幹・小脳のいずれか) および、発症からの罹病期間に注目した。

網羅的ペプチドアレイ作製機は分担研究者の國松己歳が世界に先駆けて開発したもので一枚のメンブレン上に 1600 のペプチドを合成できる。これを用い AQP4 の構成ペプチド (14mer) を逐次 1 アミノ酸ずつずらしながら、全長にわたり網羅的にメンブレン上に配置したペプチドアレイを作製した。このペプチドを配したメンブレンと AQP4 全長蛋白に対する抗体が陽性である血清を反応させ、さらに蛍光標識した抗ヒト IgG 抗体を反応させ、その蛍光強度を富士フィルム社 FLA3000G を用いて定量し、解析した。Array Gauge や EXCEL にて解析し、結合を示したアミノ酸配列は標的たんぱく質の 3 次元立体構造 PDB データを MOLFEAT にて 3D 構造解析した。

実際にはメンブレンと血清中に全長 AQP4 蛋白に対する抗体が存在していることが ELISA 法により確認されている NMO ないし NMO spectrum disorder (NMOsd) 患者 24 名と、同抗体が陰性である多発性硬化症 (MS) 8 名と正常対照 (NC) 16 名から得られた血清を反応させ、さらに蛍光標識した IgG と反応させて、その蛍光強度を画像化し、画像からその濃度を読み取ることで、抗体価を半定量した。NC の mean+2SD をカットオフとして、NMO 群 (NMO + NMOsd) で陽性者が多い peptide に関し、AQP4 における位置を確認し、さらに抗 peptide 抗体陽性 NMO 群患者の臨床的特徴を解析した。また、NMO 群で陽性者の多い peptide に関し NMO 群と non-NMO 群 (MS + NC) で抗体価を比較した。

4. 研究成果

結果：1) NMO24 人中の複数名で抗 peptide 抗体が陽性であった peptide は、2 人 (8%) で陽性であった peptide が 12 個、3 人 (13%) で陽性が 10 個、4 人 (17%) で陽性が 3 個、5 人 (21%) で陽性が 2 個、6 人 (25%) で陽性が 4 個、8 人 (33%) で陽性が 1 個であり、これは LoopA を含む peptide で、NC に比べ有意に陽性者が多かった (P=0.04)。

このうち、4 人以上で陽性を示した peptide 10 個につき、NMO 群 (NMO/NMOsd) と NC 群の二群で Mann-Whitney 検定を行ったところ、うち 1 個の peptide は二群間で P=0.01 で NMO/NMOsd で有意に抗 peptide 抗体価が高値を示した。

さらに有意差はないが $P=0.07$ と NMO 群で高い傾向を示す peptide が二つあった。うち一つは Loop A を含む peptide であった。

MS では、NMO で問題になった peptide に関して、陽性者が多かったり、抗体価が高い傾向を示すことはなかった。

二個の連続した peptide で 4 人 (17%) 以上で陽性になるのは 1 箇所のみで、ここは Loop A を含む領域であった。この peptide 28or29or30 陽性例と陰性例間で、NMO:NMOsd、性比、採血時年齢、罹病期間 (年)、抗 AQP4 抗体陽性率、3 椎体病変陽性率、初回頭部 MR 正常率、採血時 EDSS、髄液細胞数、オリゴクローナルバンド陽性率を比較したがいずれも有意差を認めなかった。

考察：これまでに、患者血清中抗 AQP4 抗体は通常の western blotting 法で AQP4 を認識できなくなることから、立体構造を認識する抗体と考えられている。確かに今回の peptide への反応では最も多く抗体陽性となった peptide でも 1/3 の NMO 血清と反応するのみであり、立体構造を加味すると違う結果になる可能性を否定できない。

また、同抗体が M23 (isoform b) により形成される square array を認識するという報告や mutant への反応から Loop E が main target とする報告、さらには細胞内ドメインを認識するとする報告もある。

結論：以上より、抗 AQP 抗体陽性 NMO/NMOsd 患者血清の約半数は、AQP4 の LoopA を含む peptide に反応することが示され、同部位が抗 AQP4 抗体の main immunogenic site である可能性が示唆された。

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 10 件)

1. Yonezu T, Ito S, Mori M, Ogawa Y, Makino T, Uzawa A, Kuwabara S. "Bright spotty lesions" on spinal magnetic resonance imaging differentiate neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2014 Mar;20(3):331-7.
2. Uzawa A, Mori M, Kuwabara S. Neuromyelitis optica: concept, immunology and treatment. *J Clin Neurosci.* 2014 Jan;21(1):12-21.
3. Sugiyama A, Ito S, Hirano S, Mori M, Kuwabara S. A case of fulminant neuromyelitis optica presenting with destructive lesions in whole-brain. *Clin Neurol Neurosurg.* 2014 Jan;116:87-9.
4. Masuda H, Mori M, Katayama K, Kikkawa Y, Kuwabara S. Anti-aquaporin-4 antibody-seronegative NMO spectrum disorder with Baló's concentric lesions. *Intern Med.*

2013;52(13):1517-21. Epub 2013 Jul 1. Review.

5. Uzawa A, Mori M, Sawai S, Masuda S, Muto M, Uchida T, Ito S, Nomura F, Kuwabara S. Cerebrospinal fluid interleukin-6 and glial fibrillary acidic protein levels are increased during initial neuromyelitis optica attacks. *Clin Chim Acta.* 2013 Jun 5;421:181-3.
6. Uzawa A, Mori M, Masuda S, Muto M, Kuwabara S. CSF high-mobility group box 1 is associated with intrathecal inflammation and astrocytic damage in neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013 May;84(5):517-22.
7. Makino T, Ito S, Mori M, Yonezu T, Ogawa Y, Kuwabara S. Diffuse and heterogeneous T2-hyperintense lesions in the splenium are characteristic of neuromyelitis optica. *Mult Scler.* 2013 Mar;19(3):308-15.
8. Muto M, Mori M, Sato Y, Uzawa A, Masuda S, Kuwabara S. Seasonality of multiple sclerosis and neuromyelitis optica exacerbations in Japan. *Mult Scler.* 2013 Mar;19(3):378-9.
9. Uzawa A, Mori M, Muto M, Masuda S, Kuwabara S. When is neuromyelitis optica diagnosed after disease onset? *J Neurol.* 2012 Aug;259(8):1600-5.
10. Mori M, Kawaguchi N, Uzawa A, Nemoto Y, Masuda S, Kuwabara S. Seroconversion of anti-aquaporin-4 antibody in NMO spectrum disorder: a case report. *J Neurol.* 2012 May;259(5):980-1.

[学会発表](計 3 件)

1. 森 雅裕、鷓沢 顕之、増田 冴子、武藤 真弓、内田 智彦、桑原 聡. Peptide array 法による AQP4 上の immunogenic site 同定の試み. 免疫性神経疾患に関する調査研究班 平成 23 年度. 2014 年 1 月 25 日. 東京.
2. 森 雅裕、鷓沢 顕之、増田 冴子、武藤 真弓、内田 智彦、桑原 聡. Peptide array 法を用いた NMO 患者血清中抗 AQP4 抗体の AQP4 上認識抗原の解析. 第 24 回日本神経免疫学会学術集会. 2013 年 9 月 20 日. 軽井沢 (長野).
3. Mori M, Uzawa A, Masuda S, Muto M, Kuwabara S. Peptide array analysis for detection of immunogenic site on aquaporin-4 in neuromyelitis optica. 13th Asian & Oceanian Congress of Neurology (AOCN 2012). June 7, 2012. Melbourne, Australia.

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 雅裕 (Masahiro Mori)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70345023

(2) 研究分担者

日和佐 隆樹 (Takaki Hiwasa)
千葉大学・医学研究院・准教授
研究者番号：30260251

國松 己歳 (Toshimi Kunimatsu)
名古屋女子大学・家政学部・教授
研究者番号：70145746

(3) 連携研究者

なし