

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 7 年 6 月 9 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究

研究期間：2023～2024

課題番号：23K14783

研究課題名（和文）中枢神経脱髄疾患における新規ノド抗体の発見と視神経脱髄モデルの作成による病態解明

研究課題名（英文）Discovery of novel nodal antibodies in the central nervous system demyelinating diseases and elucidation of the mechanisms through an optic nerve demyelination model

研究代表者

張 旭 (Zhang, Xu)

国際医療福祉大学・トランスレーショナルニューロサイエンスリサーチセンター・特任助教

研究者番号：60892669

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：多発性硬化症ではランビエ絞輪部蛋白の広汎な脱落が認められるが、機序は不明である。本研究では、ランビエ絞輪を同定しやすいマウス視神経を用いた組織免疫染色により既知抗体陰性中枢神経（CNS）脱髄疾患で新規CNSノド抗体を発見した。新規ノド抗体の責任抗原は、ランビエ絞輪部グリア細胞膜に発現するATP1A2、及び軸索膜に発現するATP1A3に共通の細胞外ループと考えられた。抗体は、CNS脱髄疾患81例中26例（32%）が陽性である一方、その他の神経疾患70例及び健常対照31例の合計101例は陰性だった。抗体陽性例は、若年発症、女性優位、重度の視神経障害、巨大脳脊髄病巣、高度障害等の特徴があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で初めて中枢神経ノド抗体を発見でき、多発性硬化症で初期からみられる原因不明のノドパチーには自己抗体介在性機序が関わっていることを示すことができた。特に進行型多発性硬化症で、新規発見した抗ATP1A2/3抗体の陽性率が高く、抗体陽性例は重症化しやすいことから、抗体介在性機序が病態の進行に重要であることがわかった。一方、既知抗体が陰性の多発性硬化症以外の脱髄疾患は原因が全く不明であった。そのうち、既知抗体陰性の視神経脊髄炎や中枢末梢連合脱髄症で抗ATP1A2/3抗体が高率陽性になることから、これらの疾患の発症に抗ATP1A2/3抗体が関わっていることを初めて示すことができた。

研究成果の概要（英文）：In multiple sclerosis (MS), widespread nodal protein loss is observed beyond the areas of demyelination. In this study, we discovered a novel nodal antibody to ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting subunit alpha 2/3 (ATP1A2/3) in idiopathic central nervous system inflammatory demyelinating disease (IDD). We developed a live cell-based assay for anti-ATP1A2/3 antibody. We found that anti-ATP1A2/3 antibody-positive IDD showed higher frequency of juvenile onset, higher EDSS scores, greater relapse numbers, higher frequency of optic nerve involvement, and higher frequency of long spinal cord lesions than anti-ATP1A2/3 antibody negative MS. Serum glial fibrillary acidic protein levels measured by single molecule array were increased at relapse and progressive phases in anti-ATP1A2/3 antibody-positive IDD, and related to disability. In conclusion, anti-ATP1A2/3 antibody-positive IDD shows greater disability and larger lesions than anti-ATP1A2/3 antibody-negative MS through astroglia damage.

研究分野：神経内科学

キーワード：多発性硬化症 脱髄疾患 視神経脊髄炎 ランビエ絞輪 自己抗体 ノドパチー アストログリア オリゴデンドログリア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症(multiple sclerosis, MS)と慢性炎症性脱髄性多発神経炎(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, CIPD)は、それぞれ中枢神経(central nervous system, CNS)と末梢神経(peripheral nervous system, PNS)の髄鞘に対する自己免疫とされるが、特異抗体は未発見で根治療法はない。CNS・PNS 両者の脱髄を呈する例は、中枢末梢連合脱髄症(combined central and peripheral demyelination, CCPD)と呼ばれる。私たちは、CCPD でランビエ絞輪部ノド蛋白 NF155 に対する IgG4 抗体を初めて報告した。<sup>1)</sup> CIPD では、私たちははじめ内外の研究者が、NF155、contactin-1 (CNTN1)、contactin-associated protein 1 (CASPR1)などのノド蛋白に対する IgG4 抗体が、それぞれ約 20%、数%、0.2%存在し、特異な病像を呈することを明らかにした。<sup>2)</sup>私たちは、坐骨神経と後根神経節 (dorsal root ganglion, DRG)の tissue-based immunofluorescence assay, TBA)法で、既知抗体陰性 CIPD 患者血清をスクリーニングし、ランビエ傍絞輪と DRG satellite glia に反応する IgG4 抗体を sensory-dominant CIPD で発見し、責任抗原が leucine-rich repeat LGI family, member 4 (LGI4)であることを発見した。<sup>3)</sup> さらに、私たちは、NF155 抗体陽性例は約 80%が視覚誘発電位検査(visual evoked potential, VEP)で視神経に潜在的な脱髄(有症状は 15%のみ)を示すことを報告した。<sup>4)</sup> これはオリゴデンドログリアも NF155 を発現する事実と合致する。PNS を侵す IgG4 ノド抗体は補体結合能がなく、シュワン細胞の NF155 と軸索の CNTN1/CASPR1 複合体との蛋白間相互作用を阻害することでランビエ傍絞輪部から脱髄を生じ、絞輪部が伸長する PNS ノドパッチを起こす。一方、MS でも初期病巣からランビエ絞輪部が伸長することが、よく知られている。MS ではランビエ絞輪の軸索蛋白である NF186 や TAG1 に対する自己抗体が 10 年以上前に報告されたが、それを肯定する他施設からの報告はなく、CNS ノド抗体は確立したものはない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)既知抗体陰性 CNS 脱髄患者で CNS ノド抗体・ノド抗原を同定すること、及び(2)CNS ノド抗体による CNS 脱髄機序を解明することである。

### 3. 研究の方法

#### A)視神経 TBA 法による CNS ノド抗体の探索と責任抗原の同定

1) 本人同意を得て収集した、既知抗体陰性の再発寛解型 MS 47 例、進行型 MS19 例、NMOSD 11 例、CCPD 3 例の CNS 脱髄疾患、及び健常対照(healthy control, HC) 31 例、other inflammatory neurological disease (OIND:各種脊髄炎など) 70 例の血清を用いた。

2) マウス視神経 TBA 法でランビエ絞輪と反応する抗体をスクリーニングした。サブクラス特異的二次抗体で IgG サブクラスを同定した。

3) マウス視神経組織抽出蛋白を用いたウェスタンブロットにより抗原蛋白の分子量を同定した。

4) 患者血清 IgG と反応する標的蛋白質を免疫沈降し、液体クロマトグラフィー・質量分析により候補蛋白の部分アミノ酸配列を同定し、責任抗原候補とした。

#### B)抗体測定法開発と臨床的特徴の解析

5) 同定責任抗原をコードするプラスミドを、ヒト神経芽細胞腫由来細胞株である SK.N.SH 細胞等の細胞株にトランスフェクションし、stable transformant を作成して抗原とした CBA 法による特異度の高い抗体検出法を確立した。

6) CBA 法により多数の CNS 脱髄患者をスクリーニングして陽性例を同定し、臨床・検査所見・治療成績を解析した。

7) 新規 CNS ノド抗体陽性症例で、軸索障害マーカーである neurofilament L (NfL)とアストログリア障害マーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP)を、血清で single molecule array (SIMOA)法で測定した。

8) 新規 CNS ノド抗体陽性例の白血球 DNA を用いて、HLA 領域の次世代シーケンスを行って、HLA ハプロタイプを決定し、日本人健常対照と比較した。

#### C)動物モデル作成と脱髄機序の in vivo 解析

9) 受動免疫：新規 CNS ノド抗体陽性患者血清、末梢神経ランビエ絞輪を標的とする抗 neurofascin 155 (NF155)抗体陽性患者血清、及び健常者血清を、マウスの視神経に注入し、非投与側と免疫病理学的に比較した。

#### 4. 研究成果

1) 本研究において、私たちは既知抗体陰性 CNS-IDD で新規 CNS ノド抗体を発見した。責任抗原はランビエ絞輪部の oligodendroglia と astroglia 細胞膜に発現する ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting subunit alpha 2 (ATP1A2) 及び juxta-paranode の軸索膜に発現する ATP1A3 に共通の細胞外ループだった。

2) SK.N.SH 細胞株に ATP1A3 の発現ベクターを遺伝子導入した細胞を用いた live CBA 法を確立した。抗 ATP1A2/3 抗体は、全 CNS-IDD 患者 80 例中 26 例 (33%) で陽性である一方、その他の神経疾患 70 例及び健常対照 31 例の合計 101 例は全例陰性だった ( $p < 0.001$ )。陽性者の内訳は、CCPD 3/3 (100%)、既知抗体陰性 NMOSD 8/11 (73%)、PMS 8/19 (42%) で高率に陽性で、RRMS でも 7/47 (15%) の陽性率だった。

3) 抗 ATP1A2/3 抗体陽性例は、若年発症、女性優位 (女 77%)、頻回再発、重度の視神経障害 (77%、両側性 42%)、tumefactive lesion などの巨大脳・脊髄病巣の存在 (38%)、高度障害 (総合障害度 EDSS 6 以上が 42%) 等の特徴があった。

4) 抗 ATP1A2/3 抗体陽性例は、自己免疫疾患・自己抗体の合併率 (54%) が高く、かつ HLA-DRB1\*04 の保有率 (86%, 17/21) が有意に日本人健常対照 (25.4%) より高かった ( $p = 0.0234$ )。

5) マウス視神経への IgG 注入では、ランビエ絞輪部へのヒト IgG 沈着は、抗 NF155 抗体陽性患者血清 IgG (NF155-IgG) でも抗 ATP1A2/3 抗体陽性患者血清 IgG (ATP1A2/3-IgG) でも認められたが、健常者血清 IgG ではみられなかった。傍絞輪部マーカーの CASPR1 の脱落は、ATP1A2/3-IgG で NF155-IgG より顕著にみられた。また、ATP1A2/3-IgG では、軸索膜の ATP1A3 よりグリア膜の ATP1A2 の脱落が著しかった。

以上の研究成果から、本研究では、新規 CNS ノド抗体として抗 ATP1A2/3 抗体を発見した。抗 ATP1A2/3 抗体は、抗体陰性 NMOSD、CCPD、tumefactive MS、進行型 MS などの CNS-IDD の発症や重症化に関連している。抗体は、まず perinodal astrocyte や oligodendroglia に発現する ATP1A2 を攻撃し、脱髄が起こると juxta-paranode の軸索膜に発現する ATP1A3 を攻撃する機序を考えた (図 1)。HLA-DR4 と自己免疫素因が抗体産生のリスク因子と考えられた。

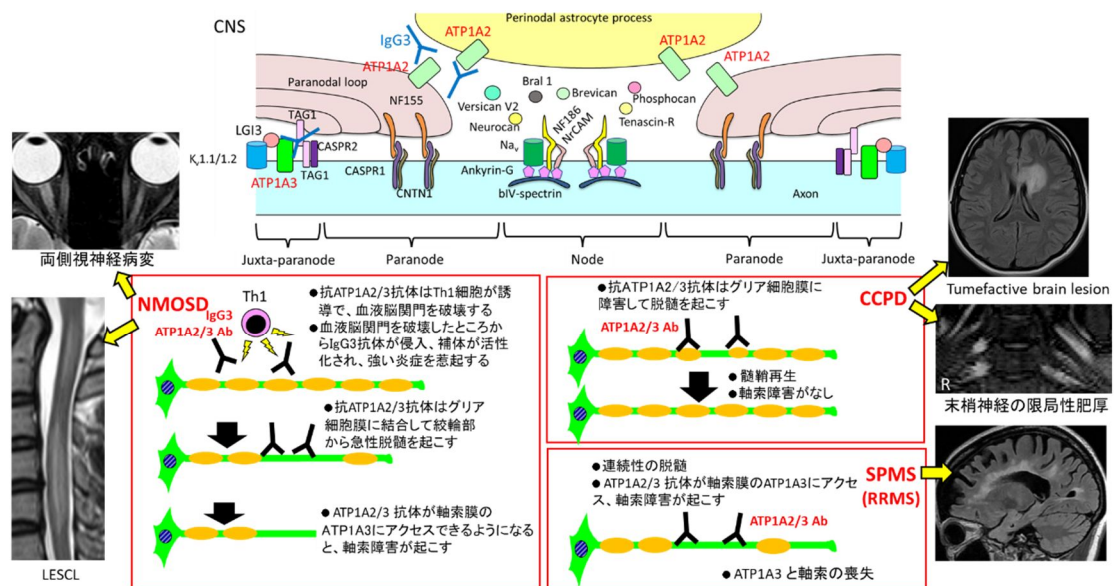


図1. 抗ATP1A2/3抗体の脱髄機序 (仮説)

#### <引用文献>

1) Kawamura N, et al. Anti-neurofascin antibody in patients with combined central and peripheral demyelination. Neurology 81: 714-722, 2013.

2) Zhang X, et al. Anti-LGI4 antibody is a novel juxtapanodal autoantibody for chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. Neurology: Neuroimmunology and Neuroinflammation 2023; 10(2):1-13. DOI: 10.1212/NXI.000000000200081

3) Ogata H, et al. Characterization of IgG4 anti-neurofascin 155 antibody-positive neuropathy. *Ann Clin Transl Neurol* 2: 960-971, 2015.

4) Ogata H, et al. Optic, trigeminal and facial neuropathy related to anti-neurofascin 155 antibody. *Ann Clin Transl Neurol* 7(11):2297-2309, 2020. doi: 10.1002/acn3.51220.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Zhang Xu, Kira Jun-Ichi, Ogata Hidenori, Imamura Tomohiro, Mitsuishi Mikio, Fujii Takayuki, Kobayashi Masaki, Kitagawa Kazuo, Namihira Yukihiro, Ohya Yusuke, Maimaitijiang Guzailiyi, Yamasaki Ryo, Fukata Yuko, Fukata Masaki, Isobe Noriko, Nakamura Yuri	4. 巻 10
2. 論文標題 Anti-LGI4 Antibody Is a Novel Juxtaparanodal Autoantibody for Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1212/NXI.000000000200081	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 Maimaitijiang G, Kira J, Nakamura Y, Watanabe M, Takase E0, Nagata S, Sakoda A, Zhang X, Masaki K, Yamasaki R, Isobe N, Yamaguchi H, Imamura T	4. 巻 12
2. 論文標題 Blood Exosome Connexins and Small RNAs Related to Demyelinating Disease Activity.	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 Ann Clin Transl Neurol	6. 最初と最後の頁 538-555
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/acn3.52307	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 Abdelhadi AA, Ogata H, Zhang X, Tashiro T, Yamasaki R, Kira J, Isobe N:	4. 巻 12
2. 論文標題 Epitope mapping of anti-neurofascin 155 antibody in a large cohort of autoimmune nodopathy patients.	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 Ann Clin Transl Neurol	6. 最初と最後の頁 1034-1042
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/acn3.70036	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Xu Zhang, Jun-ichi Kira, Akira Yokote, Ayako Sakoda, Takayasu Mishima, Yoshio Tsuboi, Ryota Sato, Takashi Kanda, Hidenori Ogata, Noriko Isobe, Masaki Kobayashi, Kazuo Kitagawa, Yukihiro Namihira, Yusuke Ohya, Yuko Fukata, Masaki Fukata, Tomohiro Imamura, Guzailiyi Maimaitijiang, Yuri Nakamura
2. 発表標題 IgG2 autoantibody relates to IVIg response and onion bulb formation in LGI4+ autoimmune nodopathy
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Guzailiyi Maimaitijiang, Jun-ichi Kira, Ayako Sakoda, Katsuhisa Masaki, Mitsuru Watanabe, Satoshi Nagata, Ezgi Ozdemir, Ryo Yamasaki, Noriko Isobe, Xu Zhang, Tomohiro Imamura, Yuri Nakamura
2. 発表標題 Exosome GJA1-29k is a blood marker for progressive multiple sclerosis reflecting glial inflammation
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jun-ichi Kira, Guzailiyi Maimaitijiang, Yuri Nakamura, Ayako Sakoda, Yoshie Yamato, Yuki Yanagihara, Yasutaka Iwanaga, Ken-ichiro Yamashita, Akira Yokote, Keiko Haro, Shozo Tobimatsu, Xu Zhang, Tomohiro Imamura
2. 発表標題 Serum glial fibrillary acidic protein is useful to predict multiple sclerosis disability progression
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hidenori Ogata, Amina Abdelhadi, Zhang Xu, Ryo Yamasaki, Jun-ichi Kira, Noriko Isobe
2. 発表標題 Epitope mapping of anti-neurofascin 155 antibodies in a large cohort of autoimmune nodopathy
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hidenori Ogata, Amina Abdelhadi, Zhang Xu, Takumi Tashiro, Ryo Yamasaki, Jun-ichi Kira, Noriko Isobe
2. 発表標題 Epitope mapping of anti-neurofascin 155 antibodies in a large cohort of autoimmune nodopathy
3. 学会等名 2023 Peripheral Nerve Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Xu Zhang, Jun-ichi Kira, Mikio Mitsuishi, Daisuke Tsuchimoto, Guzailiyi Maimaitijiang, Tomohiro Imamura, Ayako Sakoda, Yuri Nakamura
2. 発表標題 Nodal ATP1A2/3 antibody is a new pathogenic marker for juvenile onset NMOSD/CCPD and progressive MS.
3. 学会等名 第65回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Jun-ichi Kira, Guzailiyi Maimaitijiang, Ayako Sakoda, Mitsuru Watanabe, Satoshi Nagata, Ezgi Ozdemir Takase, Katsuhisa Masaki, Ryo Yamasaki, Noriko Isobe, Xu Zhang, Tomohiro Imamura, Yuri Nakamura.
2. 発表標題 Exosome connexin 43-truncated isoforms, 29k and 11k, respectively relate to mitigation of MS and NMO.
3. 学会等名 第65回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Maimaitijiang Guzailiyi, Jun-ichi Kira, Ayako Sakoda, Mitsuru Watanabe, Satoshi Nagata, Ozdemir Ezgi, Katsuhisa Masaki, Ryo Yamasaki, Noriko Isobe, Xu Zhang, Tomohiro Imamura, Yuri Nakamura.
2. 発表標題 Exosome SNORD37 is a new marker for relapse mitigation in NMO and miR133b is that for progressive MS.
3. 学会等名 第65回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hidenori Ogata, Takumi Tashiro, Ryo Yamasaki, Takayuki Fujii, Xu Zhang, Jun-ichi Kira, Noriko Isobe,
2. 発表標題 Group. Characterization of nodopathy with IgG4 anti-contactin-1 antibodies through a larger cohort in Japan.
3. 学会等名 第65回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2024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
---------	---------