

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 7 日現在

機関番号：87302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590720

研究課題名(和文) 生物発光を利用した高感度抗体検出システムの開発と視神経脊髄炎関連自己抗体の解析

研究課題名(英文) Development of the luciferase immunoprecipitation systems with high detection density for anti-AQP4 antibody in neuromyelitis optica

研究代表者

樋口 理 (higuchi, osamu)

独立行政法人国立病院機構長崎川棚医療センター(臨床研究部)・その他部局等・研究員

研究者番号：50361720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：視神経脊髄炎(NMO)を罹患する患者血清中に含まれる自己抗体・抗AQP4抗体はNMOの分子病態を解明する上でKey分子であると考えられている。また、当該抗体の迅速検査はNMOの治療戦略策定上重要事項であり、高感度で高速な検査システムが必須である。従来法の中では蛍光顕微鏡システムを駆使したcell-based assay (CBA)の信頼度が最も高いが、検査の手技上の複雑さや定量性に関しての問題点が指摘されていた。本研究では、CBAが包含する問題点を全てクリアし、かつ、信頼度はも十分に担保された画期的な抗体検査システムの構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：Anti-AQP4 antibody in patient serum with neuromyelitis optica (NMO) is thought to be one of key molecules in the molecular pathogenesis of NMO. In addition, the quick inspection of the antibody concerned is an important matter in treatment strategy development of NMO, and the inspection system which is high-speed for high sensitivity is essential. Reliability of cell-based assay (CBA) which made full use of a fluorescent microscope system was the highest in the law conventionally, but problems about complexity and the quantifiability in the maneuver of the inspection had it pointed out. In this study, CBA problems include clear all, and, reliability was also succeeded in building a fully collateral has been innovative antibody test system.

研究分野：神経分子病態学

キーワード：NMO 自己抗体 AQP4 ルシフェラーゼ LIPS

1. 研究開始当初の背景

抗 AQP4 抗体陽性の NMO 症例はアジア・アフリカ系人種に多く認められ、特に中高年女性にて高度の視力障害および脊髄病変を生じる。また、再発率が高く、機能予後も悪いとされている。さらには、高頻度で全身性自己免疫疾患の合併が観察されることや病理組織学的検討の結果などを総合的に判断すると抗体を含む液性因子が NMO の病態に関与するものと考えられている。これは T リンパ球等による脱髄病変を主体とする MS とは病態機序が異なる可能性を意味している。このような経緯のなかで NMO 症例に関する抗 AQP4 抗体の解析が世界中で実施されている。本邦における抗 AQP4 抗体検査に関しては、主に 3 施設において複数の異なる手法が利用されているが、ヒト AQP4 遺伝子を強制発現させたヒト細胞と患者血清を反応させ、間接蛍光染色法により抗体を検出するという基本原理は共通である。現行の抗 AQP4 抗体検査に関する間接蛍光染色法の問題点の一つは、定量性に乏しい点であると言われている。事実、顕微鏡を利用した間接蛍光染色法を抗 AQP4 抗体検査に採用している施設は検査結果において抗体価等の定量性に関連した回答は実施していない。間接蛍光染色法以外にも、ELISA 法や RIA 法による測定方法等も試みられている。ELISA 法は多検体処理に適しているが、抗原である AQP4 分子をマイクロプレートに固相化する過程でエピトープの一部が利用できなくなる可能性があり、抗体検出感度の低下を招く一因となる。事実、英国の RSR 社から販売されている抗 AQP4 抗体測定用 ELISA キットの抗体検出感度については多くの臨床医が疑問の念を抱いているのが実情である。また、RIA 法の場合は放射性同位元素を扱うため、検査従事者の心身への負担が少なくない。以上の理由により、従来法とは抗体検出原理が異なり、簡便で安全な高感度抗 AQP4 抗体測定の開発が切望されている。

2. 研究の目的

自己抗体介在性神経難病の一つとして、視神経脊髄炎 (NMO) が知られる。NMO が疑われるおよそ 7 割の患者血清中に抗アクアポリン 4 (AQP4) 抗体が検出されるが、現在本邦で実施されている抗 AQP4 抗体検出法には様々な問題点が潜在しており、より高感度で定量性を有した抗体検査法の開発が期待されている。本研究では、生物発光を利用する高感度抗体測定技術を応用し、NMO 診断の鍵となる抗 AQP4 抗体測定に関する世界標準の assays を確立する。

3. 研究の方法

検体収集 (担当: 松尾)

NMO の臨床診断に際しては Wingerchuk

博士らが提示した診断基準を参考とし、抗 AQP4 抗体の有無に関わらず NMO の疑いが強い症例から検体 (血清) を採取する。一方、対照疾患としては、鑑別がしばしば困難である MS が第一に挙げられ、その他としては非炎症性神経疾患 (筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、正常圧水頭症など) も対照疾患群とする。これら疾患群についても診断がより確実な症例を選抜し、検体を採取する。さらに、上記 3 群 (NMO 群、MS 群、非炎症性神経疾患群) に加え、NMO 群と年齢・性別分布がほぼ一致する健康群から採取した検体を用意する。

ルシフェラーゼ免疫沈降法 (LIPS) による高感度抗 AQP4 抗体検出用多検体処理システムの構築 (担当: 樋口)

まず、ヒト AQP4 の C 末端に GL が融合したリポーター (AQP4-GL) を作成する。次に、AQP4-GL 発現ベクターをヒト胎児腎臓由来株細胞 HEK293 に遺伝子導入し、AQP4-GL を強制発現させる。引き続き、AQP4-GL 発現細胞を適切な界面活性剤 (Triton など) で可溶化した後に適切なカラム操作を行い、AQP4-GL を精製する。精製した AQP4-GL、ヒト血清、そしてプロテイン G セファロース (PGS) の三者を混合し、GL 免疫沈降を実施する。使用した血清中に抗 AQP4 抗体が存在すると、抗 AQP4 抗体、AQP4-GL、そして、PGS が免疫複合体を形成する。この免疫沈降物に含まれる AQP4-GL 活性をルミノメーターにより測定し、得られた発光量を基にヒト血清中の抗 AQP4 抗体量を算定する。さらに、作業効率の向上を考慮して、マイクロプレートを利用した多検体処理に適した抗体検査システムの開発を行う。これは、抗 AQP4 抗体検査を将来的に自動化するためには必須のプロセスである。現行のカイアシルシフェラーゼ免疫沈降法の場合、PGS を回収するために遠心操作が必要であるが、遠心操作は多検体処理には不向きであるため、遠心操作を除外したシステムが必要である。そこで、免疫グロブリンの PGS への吸着のステップに磁性 PGS を導入する。さらに、磁性検体洗浄プロトコールが導入されているマイクロプレート洗浄機を導入する。磁性 PGS の導入により、カイアシルシフェラーゼ免疫沈降法において最も煩雑である遠心機を用いた洗浄ステップを排除することができ、検査に要する時間と労力の大幅な削減が望める。カイアシルシフェラーゼ免疫沈降後には、マイクロプレート対応のルミノメーターを利用して免疫沈降物中のルシフェラーゼ活性を測定することで抗体量を算定する。

データ解析 (担当: 樋口・松尾)

国内外で汎用されている間接蛍光染色法および ELISA 法とカイアシルシフェラ

一ゼ免疫沈降法の各種方法で得られたデータを比較検討する。間接蛍光染色法では細胞膜上に存在する AQP4 を抗原とするため、高感度な抗体検出法であると推測されるが、検査全体の煩雑さに伴うデータの再現性や定量性に関しては少なからず問題があると指摘されている。事実、細胞免疫染色法を実施する多くの施設では、抗 AQP4 抗体が陽性か陰性かの判定のみを回答するケースが多い。ELISA 法の場合は感度が十分ではないとの臨床医からの意見が根強い。そこで、抗 AQP4 抗体検出系としての感度と定量性に重点を置き、抗 AQP4 抗体検出に関する各種アッセイ法の長短所を整理し、明確にする。

[平成 25 年度以降]

前年度に確立した新しい抗 AQP4 抗体測定系を利用して、引き続き抗体検査を実施するとともに、陽性と判定された症例に関する臨床情報を精査する。さらに、平成 25 年度以降には、長崎県下のみならず、全国の神経難病を専門とする医療機関と協力し、さらなる検体収集を実施する。そして、新しい高感度抗体検査法により陽性と判定された抗 AQP4 抗体陽性型 NMO の臨床情報を精査し、より精緻な NMO 臨床像の確立を目指す。さらに、本研究において、抗 AQP4 抗体陰性と判定された検体についても、その保存と臨床情報の整理を実施する。抗 AQP4 抗体陰性と判定された血清中には、未知の自己抗体が潜んでいる可能性があり、将来的な抗体探索研究において非常に重要な研究材料となりうる。

4. 研究成果

1) 抗 AQP4 抗体に関する LIPS の確立：本研究課題申請時に提案した LIPS 法による抗 AQP4 抗体測定系の確立は達成した。LIPS による抗 AQP4 抗体の検出感度は既存の ELISA システム（保険適応されている検査システムを指す）の結果と比較しても同等以上の感度が確認された。一方で、現存する抗 AQP4 抗体測定法の中でもその抗原特異性と抗体検出感度に関して最も信頼度が高い cell-based assay (CBA) の解析結果と比較すると抗体検出感度はわずか 6 割程度であることが判明した。本結果を受け、従来の LIPS では本研究課題の目的達成には及ばないと判断し、新たな LIPS 法の開発に着手した。

2) 複数膜貫通型膜タンパク質に特化した cell-based LIPS の樹立：我々が改良点として注視したのは、抗原である AQP4-GL の細胞膜からの可溶化のタイミングであった。AQP4 は複数膜貫通の膜タンパク質であり、細胞膜上に発現している状態ではその細胞外領域は高度な立体構造を保持していると考えられ、その特異構造を抗 AQP4 抗体が認識・結合していると推測される。従って、抗 AQP4

抗体と AQP4-GL を結合させる場合には、CBA 法と同じように、後者が細胞膜上に局在している時を選択する必要がある。そこで、細胞膜上に AQP4-GL が局在する状態でヒト血清と反応させ、その後に細胞膜を可溶化し、抗 AQP4 抗体と AQP4-GL の免疫複合体を PGS により免疫沈降するプロトコールに変更した。この改良によって、CBA とほぼ同等の抗原特異性と抗体検出感度が得られた。この複数膜貫通型膜タンパク質に特化した世界初の LIPS を cell-based LIPS と命名した（2015 年内の学術論文投稿を目指して準備中）。

3) 多発性硬化症における抗 Kir4.1 の抗体解析：NMO の鑑別疾患として多発性硬化症 (MS) が挙げられるが、後者の治療には IFN β が用いられることが多い。しかしながら、本薬剤は抗 AQP4 抗体陽性の NMO に対しては時に症状を増悪化させることが知られ、慎重な診断が求められ、IFN β 治療を実施する前には MS 患者血清に関する抗 AQP4 抗体検査が選択される場合がある。2012 年にドイツの研究グループから MS 患者血清中に高頻度 (40% 程度) にカリウムイオンチャネルである Kir4.1 に対する自己抗体が潜在することが報告された。これを受け、我々は MS および抗 AQP4 抗体陽性 NMO に対する抗 Kir4.1 抗体検査研究を実施した。結果、少なくとも本邦において MS と確定診断された症例では抗 Kir4.1 抗体は殆ど検出されなかった。ドイツの研究グループの抗体検査法に加え、LIPS と CBA による抗体検査も重ねたが、同様の結果であり、先にあった報告とは内容は合致しなかった。また、NMO/NMOsd 症例でも同様の抗体探索を実施したが、有意な当該抗体の陽性率は認めなかった。最終的に、本邦における MS に関しては、抗 Kir4.1 抗体の検査はその確定診断の一助には不適であるとの結論に達した (2015 年 4 月に国際学術雑誌に投稿済み)。

4) 多検体高速処理システムの開発

LIPS の多検体高速処理化においては、PGS を利用した免疫沈降のステップの自動化が必須であった。この問題を解決するためには、PGS から PG で表面をコーティングした磁性ビーズへの変更が必要と考え、販売されている PG 磁性ビーズを各種取り揃えて、抗体-抗原複合体の吸着とその免疫複合体の洗浄の各ステップを重点とした比較検討を行った。その結果、ビーズの粒径が最小のものが LIPS の自動化に適していることが明らかとなった。この PG 磁性ビーズを採用した LIPS は当初の目的どおりに多検体を高速に処理することを可能にし、今後の大規模血清検体処理に有用であると判断した (2015 年内の学術論文投稿を目指して準備中)。

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 5 件)

1) Nakane S*, Higuchi O*, Koga M, Kanda T, Umoto M, Murata K, Suzuki T, Kurono H, Kunimoto M, Higashihara M, Kaida KI, Mukaino A, Sakai W, Matsuo H.

Clinical features of autoimmune autonomic ganglionopathy and detection of subunit-specific autoantibodies to ganglionic acetylcholine receptor in Japanese patients. (*These authors equally contributed in this work.)

PLOS ONE (IF_2013: 3.73) 2015

2) Nishihara H, Koga M, Tasaki A, Nakane S, Higuchi O, Ogasawara J-I, Kawai M, Kanda T.

Combined immunomodulatory therapies showed stepwise recovery in autoimmune autonomic ganglionopathy (a case report). Clin. Exp. Neuroimmunol. 2014 (Article first published online: 20 JUL 2014 DOI: 10.1111 /cen3.12137)

3) Higuchi O.

Autoantibodies to low-density lipoprotein-related protein 4 that is essential for the neuromuscular junction formation

Clin Exp Neuroimmunol 4(2), 216-219, (2013).

4) A case of Alexander disease suspected juvenile-onset and exacerbating after long stationary state.

Nagaishi A, Nakane S, Fukudome T, Matsuo H, Yoshida T.

Rinsho Shinkeigaku. 2013;53(6):474-7. Japanese.

5) Neuroleptic malignant syndrome (parkinsonism-hyperpyrexia syndrome) after deep brain stimulation of the subthalamic nucleus.

Urasaki E, Fukudome T, Hirose M, Nakane S, Matsuo H, Yamakawa Y.

J Clin Neurosci. 2013 May;20(5):740-1. doi: 10.1016/j.jocn.2012.04.024. Epub 2013 Mar 5.

[学会発表] (計 9 件)

1) 全身性および臓器特異的自己免疫疾患に潜む抗 ganglionic アセチルコリン受容体抗体 樋口理, 中根俊成, 向野晃弘, 中村英樹, 川上純, 小森敦正, 右田清志, 八橋弘, 松尾秀徳 日本臨床免疫学会@東京 (2014年9月)

2) 膠原病および自己免疫性慢性肝疾患における抗 ganglionic AChR 抗体の後方視的解析 樋口理, 中根俊成, 向野晃弘, 中村英樹, 川上純, 小森敦正, 右田清志, 八橋弘, 松尾秀徳 第26回日本神経免疫学会学術集会@金沢 (2014年9月)

3) 本邦の多発性硬化症患者群における抗 KIR4.1 抗体陽性率の検討 樋口理¹, 中根俊成¹, 酒井和香¹, 新野正明^{2,3}, 深澤俊行⁴, 菊地誠志³, 高橋利幸⁵, 藤原一男⁵, 松尾秀徳¹ 第25回日本神経免疫学会学術大会 (2013年11月@下関)

4) Anti-potassium channel KIR4.1 antibody in multiple sclerosis and neuromyelitis optica Shunya Nakane^{1,2}, Osamu Higuchi¹, Waka Sakai², Masaaki Niino^{3,4}, Toshiyuki Fukazawa⁵, Seiji Kikuchi⁴, Toshiyuki Takahashi⁶, Kazuo Fujihara⁶, Hidenori

Matsuo² 6th Congress of the Pan-Asian Committee for treatment and research in Multiple Sclerosis (PACTRIMS) (2013年11月6-8日@京都)

5) MSの新規自己抗体(KIR4.1抗体)、欧米と本邦での検討 松尾秀徳¹, 樋口理¹, 中根俊成¹, 酒井和香¹, 新野正明², 深澤俊行³, 菊地誠志², 高橋利幸⁴, 藤原一男⁴. 第34回日本アフェレシス学会学術大会(2013年11月@軽井沢)

6) Anti-potassium channel KIR4.1 antibody in multiple sclerosis and neuromyelitis optica Shunya Nakane^{1,2}, Osamu Higuchi¹, Waka Sakai², Masaaki Niino^{3,4}, Toshiyuki Fukazawa⁵, Seiji Kikuchi⁴, Toshiyuki Takahashi⁶, Kazuo Fujihara⁶, Hidenori Matsuo² Sendai MS/NMO Conference 2013 (2013年7月13-14日@仙台)

7) カイアシルシフェラーゼを利用した未知自己抗体探索システムの開発 樋口理¹, 中根俊成^{1,2}, 松尾秀徳² 第24回日本神経免疫学会学術大会(2012年9月20-21日@軽井沢)

8) 生物発光を利用した抗AQP4抗体検出系の開発 松尾秀徳¹, 中根俊成^{1,2}, 栢田智子³, 本村政勝³, 川上純一³, 樋口理², 第53回日本神経学会学術大会(2012年5月22-25日@東京国際フォーラム)

9) 臨床的に重要な新しい抗体の基礎研究 樋口理 Novartis Neuroscience Forum/MG分科会(2012年11月24日@グランドプリンスホテル高輪)

[図書](計 8 件)

1) 神経筋接合部の形成と維持に関する分子

機構とその破綻 2014 樋口理 Clinical Neuroscience (2014) 32巻9号 980-982

2) 重症筋無力症と自己抗体 Up to date 酒井和香, 樋口理 Clinical Neuroscience (2014) 32巻9号 983-985

3) 抗体と神経疾患—最近の話題—抗ganglionic アセチルコリン受容体抗体と自己免疫性自律神経節障害 中根俊成, 樋口理, 向野晃弘, 松尾秀徳 月刊神経内科 79(3) 311-318 2013年9月

4) 自己免疫性自律神経節障害(AAG)の病態と免疫療法 中根俊成, 樋口理, 松尾秀徳 日本アフェレシス学会誌 32巻3号 198-203 (2013)

5) Gaussia Luciferase Immunoprecipitation (GLIP)法を利用した複数膜貫通タンパク質に対する自己抗体検出システム 樋口理 日本アフェレシス学会誌 32巻3号 155-161 (2013)

6) 自律神経障害をきたすニューロパチー;最近の進歩」— Autoimmune autonomic ganglionopathy 中根俊成, 樋口理, 松尾秀徳 末梢神経 24(1) 5-13 2013年6月

7) ANTENNA/重症筋無力症の診療—最近の進歩 樋口理, 本村政勝 (2012) Current Insights in Neurological Science Vo. 19&20 合併号

8) 重症筋無力症の進歩: Lrp4抗体陽性MGの発見 本村政勝, 樋口理 (2012) 臨床神経 52巻1303-5.

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

名称：NHO 長崎川棚医療センター 神経内
科・臨床研究部ホームページ

URL：<http://nkmcneuro.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 理 (HIGUCHI, osamu)

長崎川棚医療センター臨床研究部・免疫ゲ
ノム医化学研究室長

研究者番号：50361720

(2) 連携研究者

松尾秀徳 (MATSUO, hidenori)

長崎川棚医療センター・副院長

研究者番号：20380975