

## 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：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790870

研究課題名(和文)NOGマウスを用いた抗アкваポリン4抗体産生モデルの作製

研究課題名(英文)Creation of an animal model producing anti-aquaporin 4 antibody using NOG mouse

研究代表者

鈴木 千尋(SUZUKI, Chihiro)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：20624331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は自己免疫性疾患患者細胞を用いてヒト自己抗体産生動物モデルを作製することである。MHC Class I & Double Knockout NOGマウスへヒト末梢血リンパ球またはヒトB細胞を移入した。2ヶ月後のマウス脾臓内ではヒトB細胞の生存も確認できなかった。血中でも同様の結果であった。NOGマウス生体内においてヒトB細胞が生存するには、ヒトT細胞からのヘルプが必要であり、かつT細胞が異常に活性化しない事も必要である事が示唆された。NOGマウス体内でのヒトB細胞生存を誘導させる工夫を試したものの、生存を誘導することはできなかった。

研究成果の概要(英文)：Our purpose is to create an animal model producing human antibodies, using human cells collected from patients with an autoimmune disease. We injected human peripheral lymph cells or B cells into MHC class I and II Double Knockout NOG mice. 2month after injection, we weren't able to find the human cells in the blood or the spleen of the mice. We supposed that human peripheral immune-associated cells need any help from T cells and that too much active T cells do harm to human B cells when those cells live long in the body of mouse. We tested several methods, but we weren't able to find the best way for induction that human B cells can live long.

研究分野：神経内科

科研費の分科・細目：自己免疫

キーワード：自己免疫疾患 NOGマウス 自己抗体

## 1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎(Neuromyelitis optica, NMO)は重度の視神経炎と3椎体以上に及ぶ横断性脊髄炎を特徴とする炎症性中枢神経疾患である。多くのNMO患者の血中にはアストロサイトの足突起に高密度に発現する水チャンネル、アクアポリン4(AQP4)に対する抗体が高頻度に認められ、疾患特異的バイオマーカーとなっている。NMOでは抗AQP4抗体が補体を活性化して惹起する免疫介在性アストロサイトパチーが病態の主体であると考えられるようになってきており、AQP4抗体とB細胞は今後の治療ターゲットとなる可能性があると考えられる。

申請者らはこれまでにAQP4抗体測定法を確立しており(Takahashi et al. Brain 2007)、国内外のNMO患者の抗体測定を行っている。また本研究の予備的な実験として、NMO患者および健常者の末梢血B細胞を分離し、複数のサイトカイン(IL-6, BAFF, IL-10 およびIL-15)を同時に添加して無血清培地で7日間培養し、無刺激培養と比較したところ、(1)生存B細胞の割合が増加し( $p < 0.0001$ )、(2)B細胞のサブクラスであるCD27<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>免疫グロブリン産生細胞の割合の増加し( $p < 0.0001$ )、(3)培養上清中のtotal IgG濃度の上昇する( $p < 0.0001$ )ことを明らかにした。さらにNMO患者由来の末梢血B細胞を同様に14日間培養すると培養上清中にAQP4抗体が産生されることも明らかとしている。しかし、このin vitroでのAQP4抗体産生モデルでは、末梢血B細胞の長期生存を誘導することはできないため、NMOにおけるAQP4抗体産生抑制治療モデルとして不十分である。

本申請研究で使用するNOG®マウス(NOD/SCID/ $\gamma c^{null}$ マウス)は重症免疫不全マウスであり、従来の免疫不全マウスと比較して異種細胞の生着性に優れており、免疫学的なヒト化マウス作製が可能とされている。NOG®マウスではT、BおよびNK細胞の欠

失、補体活性の欠失、マクロファージ、樹状細胞の機能不全という多様な不全形質を持っており、ヒトの臍帯血由来の造血幹細胞の移植が可能である。ヒトPBMC移植実験も各種行われている。

本申請研究では、このNOG®マウスにNMO患者の末梢血リンパ球(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)を移入してヒト化マウスを作製し、AQP4抗体産生を誘導してマウス体内にNMOの病態を再現することで、各種治療効果を検討する。

## 2. 研究の目的

NOGマウスを用いた抗アクアポリン4抗体産生モデルの作製

(1)重症免疫不全マウスを用いて、視神経脊髄炎の原因抗体であるアクアポリン4抗体産生モデルを作製する。

(2)モデルマウスにおける抗体産生抑制治療法を探索し、臨床応用する。

## 3. 研究の方法

(1)NOGマウスへのヒトPBMCの生着およびIgG産生誘導

申請者らはすでに健常人由来PBMCをNOGマウス移入後4週間後の脾臓中にヒトT、B細胞が生着していることを確認している。そこで健常人由来PBMCがNOGマウス内で長期(8週間以上)生存するかを、フローサイトメトリー(FACS Aria™II)を用いてマウス脾臓細胞の解析をして確認し、また病理学的にも検討する。さらにELISAでマウス血清中のIgG濃度を測定する。ヒトT、B細胞の生存と抗体産生を誘導するために必要な条件(投与するサイトカインの種類、量、頻度)を設定する。想定しているサイトカインはIL-6またはBAFF、およびその同時投与である。

(2)NOGマウスでのAQP4抗体産生誘導  
1. 得られた結果をもとに、NMO患者由来PBMCをNOGマウスに移入し、8週間か

ら 12 週間後に血清中の AQP4 抗体の有無および抗体価を、HEK293 細胞を用いた間接的蛍光抗体法を用いた AQP4 抗体測定法で調べる。血清中の抗体価が低い場合には 1 . と同様に抗体産生を誘導するために必要な条件(投与するサイトカインの種類、量、頻度)を設定する。

(3) ヒト PBMC を移入した NOG マウス体内でのサイトカイン・ケモカイン動態の変化の検討

(1)(2) で得られた NOG マウス血清中の炎症性サイトカインおよびケモカインの濃度を Bio Plex サスペンションアレイシステム(BIO-RAD)で測定する。

#### 4 . 研究成果

(1) 健康人より採取した末梢血リンパ球を重度免疫不全マウスである NOG マウス(NOD/SCID c null mouse)へ移入し、2 週後にマウス脾臓においてヒト T 細胞および B 細胞を検出できた。ELISA にてマウス血中のヒト IgM および IgG を少量確認できた。移入 4 週以降よりマウス血中でヒト T 細胞が高度に増殖し、ヒト B 細胞が確認されなくなった。加えて外見的にも立毛や体温低下といった典型的な移植片対宿主病(graft-versus-host disease, 以下 GVHD)様の所見も確認された。原因として NOG マウスの MHC Class および Class はマウス由来であるため移入したヒト細胞側から見ると異種となる。そのため免疫(拒絶)反応が惹起され、GVHD 様の症状を呈したと推察した。

(2) 次に、GVHD 様症状を避けるために MHC Class & Double Knockout NOG マウスを用いた実験を行った。本マウスへヒト PBMC またはヒト B 細胞を移入し、2 ヶ月後におけるマウス生体内 B 細胞割合を確認した。2 ヶ月後のマウス脾臓内ではヒト T 細胞の異常増殖は見られなかったが、ヒト B 細胞の生存も確認できなかった血中でも同様の結果であった。原因として T 細胞の活性化が抑制された

ことにより、B 細胞生存に必要な因子が減少したと推測した。

(3) 上記マウス体内の非特異的抗体が抗 AQP4 抗体にて染色されないことを確認した。

(4) 患者 PBMC を上記マウスに移入し、同時にヒト IL-6, BAFF, IL-6 と BAFF をマウス体内に注入し、ヒト B 細胞の生存と分化、抗体産生の促進を試みた。PBMC 移入後 4 週間後のマウス血漿中に抗 AQP4 抗体は確認されなかった。マウス血中のヒトリンパ球は確認されなかった。

(5) 患者 B 細胞を上記マウスに移入し、同時にヒト IL-6, BAFF, IL-6 と BAFF をマウス体内に注入し、ヒト B 細胞の生存と分化、抗体産生の促進を試みた。

B 細胞移入後 4 週間後のマウス血漿中に抗 AQP4 抗体は確認されなかった。マウス血中のヒトリンパ球は確認されなかった。

(6) 患者および正常人の PBMC を移入した上記マウス血中のヒトサイトカイン濃度の動態の検討を Bio Plex サスペンションアレイシステムを用いて行う予定であった。しかし血清が採取できず、実験は行わなかった。

#### 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 3 件)

1: Sato DK, Nakashima I, Bar-Or A, Misu T, Suzuki C, Nishiyama S, Kuroda H, Fujihara K, Aoki M. Changes in Th17 and regulatory T cells after fingolimod initiation to treat multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2014 Mar 15;268(1-2):95-8. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.01.008. Epub 2014 Jan 23. PubMed PMID: 24507619. (査読あり)

2: Sato DK, Nakashima I, Takahashi T, Misu T, Waters P, Kuroda H, Nishiyama S, Suzuki C, Takai Y, Fujihara K, Itoyama Y, Aoki M. Aquaporin-4 antibody-positive cases

beyond current diagnostic criteria for NMO spectrum disorders. Neurology. 2013 Jun 11;80(24):2210-6. doi:

10.1212/WNL.0b013e318296ea08. Epub 2013 May 15. PubMed PMID: 23677744. ( 査読あり )

3: Kazuo Fujihara, Tatsuro Misu, Ichiro Nakashima, Toshiyuki Takahashi, Monika Bradl, Hans Lassmann, Rina Takano, Shuhei Nishiyama, Yoshiki Takai, Chihiro Suzuki, Douglas Sato, Hiroshi Kuroda, Masashi Nakamura, Juichi Fujimori, Koichi Narikawa, Shigeru Sato, Yasuto Itoyama and Masashi Aoki

Neuromyelitis optica should be classified as an astrocytopathic disease rather than a demyelinating disease. Clinical and experimental neuroimmunology. Volume 3, Issue 2, May 2012, Pages: 58-73, DOI: 10.1111/j.1759-1961.2012.00030.x

( 査読あり )

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

1: Douglas Kazutoshi Sato, Ichiro Nakashima, Chihiro Suzuki, Masashi Aoki. The Importance of a Sensitive AQP4-antibody Assay in Patients Beyond NMO Spectrum Disorders Diagnostic Criteria. American Academy of Neurology 65<sup>th</sup> Annual Meeting. 2013年3月19日, San Diego, CA, USA

[ 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

鈴木 千尋 ( SUZUKI CHIHIRO )

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号 : 20624331

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :