

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890017

研究課題名(和文) 視神経脊髄炎における補体介在性・非介在性アストロサイト傷害の解明

研究課題名(英文) The effect of NMO-IgG and complement against primary human astrocytes in culture.

研究代表者

西山 修平(Nishiyama, Shuhei)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：60636017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円、(間接経費) 600,000円

研究成果の概要(和文)：NMO患者血清抽出IgG(NMO-IgG)は抗体単独でアストロサイト膜上にアクアポリン4(AQP4)のクラスターを形成し、その後AQP4の内在化を引き起こす。同時に足突起は縮小し細胞接着能は低下する。これらの変化は可逆的である。NMO-IgG存在下さらに補体を加えることにより、短時間でアストロサイトは膨化してネクローシスを起こし、不可逆的に破壊される。ヒトアストロサイトはヒト補体による細胞傷害に対し、CD55やCD59といった補体防御因子を細胞膜上に発現している。これら補体防御因子がNMOの病態形成に関与し、新たな治療ターゲットとなる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Purified IgG derived from anti-Aquaporin 4(AQP4) antibody positive patients(NMO-IgG) itself caused AQP4 cluster on astrocytic membrane following endocytosis. NMO-IgG also caused reversible morphological changes like shrinking of foot processes and adhesion ability. NMO-IgG with human complements irreversibly damage the cells in a short time, suggesting a unique AQP4 antibody-mediated astrocytopathy in NMO. Complement is involved in the pathogenesis of NMO, and the worn-out of complement regulatory proteins like CD55 or CD59 on the membrane accelerate astrocytic cytotoxicity. The controlling of complement or complement regulatory proteins may be a new therapeutic target in NMO.

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：視神経脊髄炎 アストロサイト 補体介在性障害 補体非介在性障害

1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎 (Neuromyelitis optica: NMO) は視神経と脊髄を病変の主座とする炎症性疾患である。2004年、当科と Mayo Clinic との共同研究により、特に視神経と脊髄に病巣が出現する NMO 患者の中に中枢神経の血管周囲や軟膜に特異的に反応する抗体 (NMO-IgG) が発見され、2005年にはその対応抗原がアストロサイトの足突起に発現する AQP4 であると報告された (Lennon V, et al. 2004, 2005)。我々は HEK293 にリコンビナント AQP4 を強制発現させた細胞株を用いて血清中の抗 AQP4 抗体を測定しており (疾患感度・特異度は、91%・100%)、NMO の非常に有用な疾患マーカーと考えている (Takahashi T, et al. Brain 2007)。また、我々の行った免疫組織学的検討では、NMO 病変では本来 AQP4 の豊富な脊髄灰白質や白質血管周囲で補体や免疫グロブリンが沈着し、AQP4 やアストロサイトのマーカーである GFAP の染色性が低下・消失しており、血管周囲に補体介在性の AQP4 やアストロサイトの障害を生じうることを報告した (Misu T, et al. TJEM 2006)。さらに、NMO 患者再発時の脳脊髄液を使用した我々の検討では、アストロサイトに特異的なタンパクである Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) が著明に上昇していることが明らかとなった (Takano R, et al. Tohoku J Exp Med 2008)。臨床的に、NMO-IgG は NMO 発症前より上昇してくる事が判明しており (Nishiyama S, et al. Neurology 2009)、少なくとも NMO-IgG が単に組織障害によって二次的に出現した抗体ではないことが解っている。これらの結果より、NMO-IgG が NMO の病態形成に関わることが強く示唆されている。近年 in vitro/in vivo の実験系において NMO-IgG の病原性を証明した報告が幾つか存在するが、(Hinson SR, et al. Neurology 2007, Kinoshita M, et al. Neuroreport 2009, Sabater L, et al. J Neuroimmunol 2009, Vincent T, et al. J Immunol 2008)、それぞれアストロサイト傷害について詳細な検討がされていない。

2. 研究の目的

本研究は、ヒトアストロサイト培養モデルを用い、NMO において NMO-IgG がどのように関わるかを明らかにし、NMO-IgG による NMO の免疫病態の詳細を解明することが目標である。

脱髄疾患では、髄鞘およびそれを形成するオリグデンドロサイトの脱落が本質とされてきた。しかし我々の先行研究から、少なくとも脱髄疾患と言われてきた NMO を含む一部の患者群についてはアストロサイトの傷害を考える必要が生じた。臨床・病理学的には、NMO にて NMO-IgG がその発症に関与していること、NMO 剖検脳脊髄では血管周囲に補体介在性の AQP4 や GFAP の欠落

と壊死性病変があることが明らかだが、NMO-IgG によるヒトアストロサイトへの傷害性を詳細に検討した研究は現在のところない。そのため、NMO-IgG はあくまで二次的な産物であるとの立場をとる研究者もいる。本研究は、「NMO-IgG によりアストロサイト足突起上の AQP4 が欠落、アストロサイトが傷害され、結果としてアストロサイト自体の機能傷害や壊死性病変・脱髄をきたし NMO を発症する」という仮説のもと、NMO-IgG によるアストロサイトの機能的・形態的变化や細胞死、その促進因子・抑制因子を In vitro モデルを用いて検討するものである。さらに、アストロサイトの補体防御に関するタンパクや機能を検討し、NMO における補体介在性アストロサイト傷害の全貌を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) NMO 患者血清抽出 IgG を用いたアストロサイトへ傷害性の検討

NMO 患者 5 名の再発時に行った血漿交換後の廃液約 500mL を IgG カラム (rProteinA Sepharose Fast Flow) にて抽出し、精製 IgG (NMO-IgG) を作成する。この NMO-IgG のヒトアストロサイト一次培養細胞に対する影響を、蛍光免疫染色法を用い補体非依存性の形態的变化・細胞傷害の有無を検討する。アストロサイト一次培養細胞は Lonza 社から購入し、解凍後安定した状態で使用する。併せて培養液中の細胞死関連タンパクの検出や各種サイトカインの測定を行い、病態に促進的な因子、抑制的な因子の解明を目指す。また NMO-IgG 添加後の培養液中に、さらにヒト補体を添加し、補体依存性細胞傷害による細胞死が生じるかを上清の細胞傷害アッセイ (LDH ELISA) やアポトーシスシグナルの発現 (AnnexinV 法や Tunnel 法) によって検討する。対照群としては、正常コントロール 3 名、多発性硬化症患者 3 名の精製 IgG を用いる。

(2) 蛍光タンパクとのリコンビナント AQP4 を使用したアストロサイトでの形態学的検討

AQP4 は細胞膜上に発現することによって生理的役割を担うと考えられ、また NMO-IgG は細胞膜上 (特に細胞外ドメイン) に発現した AQP4 を認識すると考えられる。蛍光タンパクとのリコンビナント AQP4 (Venus-AQP4) を研究協力者である慶應義塾大学医学部薬理学教室・安井先生、塗谷先生から提供頂き、ヒトアストロサイト一次培養細胞に導入して発光 AQP4 を細胞膜上に発現するモデルがほぼ完成した。Venus-AQP4 をトランスフェクトしたヒトアストロサイトに対して、培養液中に NMO-IgG を添加し細胞膜上の AQP4 の発現変化を共焦点蛍光顕微鏡にて経時的に観察し、補体非依存性アストロサイト傷害につい

て検討を行ったところ、NMO-IgG により膜上 AQP4 のクラスター形成やエンドサイトーシスが確認された。今後は細胞膜を染色する色素(FM4-64 色素)や細胞骨格を染色する色素(TubulinTracker)を用い、NMO-IgG によるアストロサイト内での変化も検討する。さらに、ヒ素化合物(Phenylarsine Oxide)を培養液中に添加し、アストロサイト膜状タンパクのエンドサイトーシスを停止した状態で NMO-IgG を添加し、膜状での AQP4 の経時的変化について観察、検討を行う。NMO-IgG 添加し一定時間経過後、培養液中から NMO-IgG を取り除き、アストロサイト膜状 AQP4 がどのように回復するかその過程も経時的に観察しそのメカニズムを解析する。同様の検討を正常コントロール群や多発性硬化症患者群でも行い、上記の変化が NMO-IgG のみで引き起こされることを確認する。

(3) 補体・補体防御因子による細胞傷害性修飾の検討

我々の行った NMO 患者剖検例における病理学的検討により、アストロサイトが補体により細胞傷害を来していることが示唆される。一方、アストロサイトに限らず細胞膜上には補体に対する防御タンパクが存在し(Zipfel PF, et al. Nat Rev Immunol 2009)、ある程度の補体による攻撃に対しては防御可能であると考えられる。まず、ヒトアストロサイト膜上にどのような補体防御因子が発現しているか、蛍光免疫染色や Western blotting 法を用いて検討する。

それら補体防御因子の役割を明らかにするため、まずはウサギ補体とヒト補体による細胞傷害性の比較による総合的な防御因子の機能について検討する。これは、種差により補体防御因子が機能しないこと(homologous restriction)を利用したものである。予備実験では、ウサギ補体とヒト補体との間に細胞傷害性の違いを認めた。

補体防御因子を個々に siRNA を用いてノックダウンし、それぞれの補体防御因子がどのくらい防御に寄与しているかの検討を、上清の細胞傷害アッセイ(LDH ELISA)やアポトーシスシグナルの発現(AnnexinV 法や Tunnel 法)を用いて行う。siRNA は Invitrogen 社によるオーダーメイド siRNA(Stealth RNAi)にて作成する。

(4) AQP4 の水チャネル機能低下によるアストロサイトへ傷害の検討

アクアポリンは水チャネルとして細胞内外の水分子移動を担っており、これは AQP4 においても同様である。AQP4 における水チャネル機能は acetazolamide や五苓散、マンガンなどの重金属により抑制されることが知られている(Katada R, et al. Am J Pathol 2012, 磯濱洋一郎. 漢方と最新治療 2008)。これら薬剤と NMO-IgG をアストロサイト

次培養細胞培養液中に添加し、細胞傷害性に变化が出るかを検討する。

4. 研究成果

(1) NMO 患者血清抽出 IgG を用いたアストロサイトへ傷害性の検討

一次培養アストロサイトの培養液中に NMO-IgG を添加すると、アストロサイトの足突起が縮小し細胞接着性が低下した。これらの変化に際し、IL-6 や TNF- α 、IL-1 と云った炎症性サイトカインの培養液中での変化をフローサイトメトリーで検索したが、明らかな変化を認めなかった。NMO-IgG 添加後さらに補体を添加すると、細胞質と核は膨化し細胞運動が低下した。一部の細胞は膨化後に破裂した。残った細胞はほとんどが Propidium Iodide 陽性であった。培養液中の LDH 値は NMO-IgG と補体を加えた群で有意に高かった。これら変化は AQP4 抗体陰性 NMO 患者由来の精製 IgG や MS 患者血清由来精製 IgG、正常コントロール IgG、非動化補体では認められなかった。また、AnnexinV を用いた検討ではアポトーシスを起こした細胞について、各群での有意差を認めなかった。

(2) 蛍光タンパクとのリコンビナント AQP4 を使用したアストロサイトでの形態学的検討

Venus-AQP4 を用い観察すると、AQP4 は細胞膜上でまずクラスターを形成した。その後膜上 AQP4 は FM4-64 色素で染色された細胞膜と一緒に細胞内へ取り込まれ、endocytosis を認めた。また、細胞膜上の Venus-AQP4 発現の低下を認めた。同時に、アストロサイトの足突起は縮小した。これらの変化は培養液から NMO-IgG を取り除くと元に戻った。Phenylarsine Oxide を用いた検討では、Venus-AQP4 のクラスターは膜上で形成されるものの、内部への取り込みは明らかではなかった。すなわち、まず膜上で AQP4 のクラスターが形成され、その後細胞内に取り込まれると考えられた。これらの変化は AQP4 抗体陰性 NMO 患者由来の精製 IgG や MS 患者血清由来精製 IgG、正常コントロール IgG、非動化補体では認められなかった。

(3) 補体・補体防御因子による細胞傷害性修飾の検討

まず蛍光免疫染色や Western blotting を用いてヒトアストロサイトに発現する補体防御因子を検索したところ、CD55 と CD59 の発現を両方法にて確認した。これらの siRNA をオーダーメイドで作成し、上記ヒトアストロサイトに導入したところ、細胞膜上での発現低下を確認した。その上で 2)と同様の検討を行ったところ、補体防御因子をノックダウンした群では Propidium Iodide 陽性が有意に増加し、培養液中の LDH 値も有意に上昇した。これらにより補体防御因子が NMO の病態形成に關与している可能性が示唆された。

(4) AQP4の水チャネル機能低下によるアストロサイトへ傷害の検討

ヒトアストロサイト一次培養細胞に対し acetazolamide や五苓散を添加し、NMO-IgG による細胞傷害性の変化を観察したが、今回の検討では AQP4 の発現も含め明らかな変化を認めなかった。アストロサイト足突起における AQP4 の役割としては、水チャネルとしての水分子の出し入れの他に、血管周囲基底膜とのアンカータンパクとして働いていることが知られており、NMO-IgG による細胞傷害は水チャネルとしての機能よりむしろ細胞接着因子としての寄与が大きいと考えられた。

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 1 件)

西山修平、三須建郎、中島一郎、藤原一男. 視神経脊髄炎(NMO)におけるアストロサイトの役割. 神経内科. 査読無し. 2013;79(2):257-61 ページ

[学会発表](計 4 件)

西山修平、三須建郎、清水優子、横山和正、景山卓、高井良樹、高野里菜、高橋利幸、藤盛寿一、佐藤滋、中島一郎、糸山泰人、藤原一男、青木正志. 炎症性脱髄性疾患の診断・予後における髄液中 GFAP 濃度有用性の多施設横断的検討. 第 25 回日本神経免疫学会学術集会. 2013年11月27日~11月29日, 下関.

S. Nishiyama, T. Misu, Y. Simizu, K. Yokoyama, T. Kageyama, Y. Takai, R. Takano, T. Takahashi, J. Fujimori, S. Sato, I. Nakashima, Y. Itoyama, K. Fujihara, M. Aoki. A multicentric cross-sectional study of the usefulness of CSF-GFAP in the diagnosis and the prognosis of inflammatory demyelinating diseases. PACTRIMS 2013. 2013年11月6日~8日, 京都.

S. Nishiyama, T. Misu, Y. Simizu, K. Yokoyama, T. Kageyama, Y. Takai, R. Takano, T. Takahashi, J. Fujimori, S. Sato, I. Nakashima, Y. Itoyama, K. Fujihara, M. Aoki. A multicentric cross-sectional study of the usefulness of CSF-GFAP in the diagnosis and the prognosis of inflammatory demyelinating diseases. 29th ECTRIMS. 2013年10月2日~5日, デンマーク・コペンハーゲン.

西山修平、三須建郎、清水優子、横山和正、景山卓、高井良樹、高野里菜、高橋利幸、藤盛寿一、佐藤滋、中島一郎、糸山泰

人、藤原一男、青木正志. 炎症性脱髄性疾患の診断・予後における髄液中 GFAP 濃度有用性の多施設横断的検討. 第 54 回日本神経学会. 2013年5月29日~6月1日, 東京.

6. 研究組織

(1)研究代表者

西山 修平 (Nishiyama, Shuhei)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：60636017