

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860656

研究課題名(和文) 視神経脊髄炎におけるAQP4内在化を介したアストロサイト傷害分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of astrocytic damage via endocytosis of AQP4 in Neuromyelitis optica

研究代表者

西山 修平(Nishiyama, Shuhei)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60636017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトアストロサイト一次培養細胞に抗アクアポリン4(AQP4)抗体陽性NMO患者5名より抽出した精製IgG(NMO-IgG)を作用させると、まずAQP4が膜状でクラスターを形成し、さらにエンドサイトーシスが起きることが共焦点蛍光顕微鏡を用いた経時的観察で確認された。また、同時にアストロサイトの膜状仮足や糸状仮足が退縮し、一部は細胞培養液中に剥離、細胞形態が変化し、病理組織で認められるbeadingと似た形態に足突起を退縮させる現象が確認された。

研究成果の概要(英文)：Purified NMO-IgG from Aquaporin 4(AQP4)-IgG positive 5 NMO patients cause AQP4 clusters in the cell membrane then endocytosis of AQP4 in primary cultured human astrocyte using confocal fluorescence microscope. At the same time, NMO-IgG cause regression of filopodia and lamellipodia of astrocyte, change its shapes. Astrocytic foot process are also regressed like beading which are seen in the NMO pathology.

研究分野：神経内科

キーワード：視神経脊髄炎 アストロサイト アクアポリン4

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アクアポリン 4 (AQP4) であると報告された (Lennon V, et al. 2004, 2005)。我々の行った免疫組織学的検討では、NMO 病変では AQP4 や Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) の染色性が低下・消失し、病変部の血管周囲では補体や免疫グロブリンが沈着しアストロサイト傷害を来すことを報告した (Misu T, et al. 2006)。これにより補体介在性アストロサイト傷害があることは明らかである。In vitro では、NMO-IgG により AQP4 や関連する興奮性アミノ酸トランスポーター 2 (EAAT2) の内在化が細胞傷害に関わると報告されている。また、補体沈着を認めない部位にも AQP4 がアストロサイト足突起に塊状に染色され内在化し、それ自体も縮退した突起が認められることも報告している (Misu T, et al. 2013)。これは NMO-IgG のみでも補体非依存性のアストロサイト傷害、特に軸索伸長と細胞接着に機能障害が生じていることを示しており、その詳細なメカニズムについて検討する必要性が出てきた。しかし、それについて細胞モデルや組織モデルを用いた検討はまだされていない。また、近年 NMO-IgG 検査では陰性にもかかわらず、NMO の診断基準を満たす症例についても報告した (Sato DK, et al. 2013)。これら NMO-IgG 陰性 NMO の中には脳脊髄液中 GFAP が高値となる症例があることが我々の先行研究で明らかとなっており、アストロサイト傷害を来していると考えられる。しかし、その病因や病態形成については未だ確立したものが無い。

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 自体がどのようにアストロサイトを傷害するか、その中で病理学的に推測されたアストロサイト接着能や軸索伸長に関わるタンパクの動態を研究し、NMO-IgG による NMO の免疫病態の全体像を解明することが目標である。

「NMO-IgG には、従来まで言われていた補体介在性細胞傷害による破壊性病変の他に、NMO-IgG それ自体の作用により補体非依存性にアストロサイト足突起上の AQP4 が内在化し、膜状仮足や糸状仮足による軸索伸長と細胞接着を担うタンパクも同時に傷害され、グリア-ニューロン間やグリア-グリア間の細胞内輸送や電位活動に障害を引き起こしたり、血液脳関門が破綻したりすることで、結果としてアストロサイト自体の機

能障害を生じるメカニズムも存在する」という仮説のもと、NMO-IgG によるアストロサイト仮足や軸索の機能的・形態的变化、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。具体的には、アストロサイト仮足の骨格や運動に関わる、CRMP5 や Rho ファミリータンパク、コネキシンファミリー等の検討を行う。

3. 研究の方法

●NMO 患者血清抽出 IgG を用いた補体非依存性アストロサイトへ傷害性の検討

NMO-IgG 陽性 NMO 患者 5 名より IgG を抽出し、精製 IgG (NMO-IgG) を作成する。また、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いた。ヒトアストロサイト一次培養細胞に Venus-AQP4 を導入したモデルを用い、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する。さらに、正常培養液中では認められる膜状仮足や糸状仮足が NMO-IgG 添加後に縮退し、剥がれ落ちる反応を確認する。また、ライブイメージングによる AQP4 内在化の分子メカニズムを検討する。また、免疫組織化学染色やウェスタンブロッティング、RT-PCR を用い、NMO-IgG によるアストロサイト内の変化を多角的に検討する。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。

●NMO-IgG によるアストロサイト膜状仮足・糸状仮足関連タンパクの内在化/傷害性の検討

仮足とは、軸索先端部の成長円錐から始まり、細胞のアメーバ様運動を担う細胞質が一時的な突出である。NMO-IgG を正常アストロサイト一次細胞に作用させ、アストロサイトの膜状仮足や糸状仮足に対する反応を確認する。また、NMO-IgG を作用させた状態で、アストロサイト仮足を形成する CRMP5 や Rho ファミリーの低分子量 G タンパク (RhoA, Rac1, Cdc42 など) 仮足の運動や形態に関与する CRMP5 や Arp2/3 complex、Tip complex、細胞接着に関連する connexin や pannexin などについて免疫組織化学染色、ウェスタンブロッティングや RT-PCR による経時的变化の検討を行う。

●NMO 患者病理組織を用いた NMO-IgG 補体非依存性アストロサイト傷害性の検討

NMO の病巣では、補体沈着がないにもかかわらず、AQP4 がアストロサイト内に顆粒状に内在化し、足突起の beading や clasmatodendrosis を来している。これらの病変部位においては、アストロサイト足突起での細胞接着能や細胞骨格維持能が低下していると考えられる。これらについての軸索

生長因子や細胞接着因子、仮足に特異的な CRMP5 や Rho ファミリータンパク、仮足の運動に必要なアクチンや Arp2/3 complex、Tip complex などの仮足骨格タンパクについて、免疫組織化学染色を用いた検討を行う。これにより、細胞モデルでは証明しえない部分を補完する。

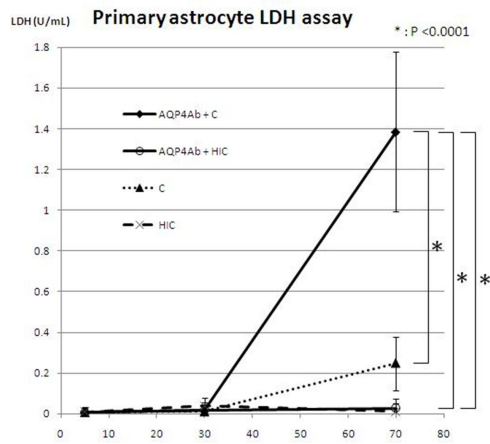
●NMO-IgG 陰性 NMO 患者由来血清を用いたアストロサイト傷害性の検討

我々の先行研究により、NMO-IgG 陰性 NMO 患者にもアストロサイト傷害を示唆する脳脊髄液中 GFAP の上昇を認める例があることが明らかになった。これらの一部は、NMO-IgG 検査自体の偽陰性と考えられるが、残りは新規のアストロサイトに対する自己抗体による NMO の可能性が示唆される。既存の報告では MOG-IgG の関与も疑われるが (Mader S. 2011)、これはオリゴデンドロサイトに対する自己抗体であり NMO に特徴的な一次的なアストロサイト傷害を来すとは考えづらい。我々のグループは視神経炎と長い脊髓病変を来し、その後 MOG-IgG 陽性が判明した NMOSD 患者を経験した (Ikeda K. 2015)。また、海外からは抗 CV2/CRMP5 抗体陽性で、視神経炎と脊髄炎を来した症例報告もある (Jarius S. 2011)。これら NMO-IgG 陰性の NMOSD 患者に対して、脳脊髄液中バイオマーカーの詳細な検索をされた研究は今のところない。そこで、NMO-IgG 陰性 NMOSD 患者の血清を用い、ヒトアストロサイト一次培養細胞に対する影響を、タイムラプス撮影や蛍光免疫染色法により検討する。アストロサイト一次培養細胞は Lonza 社製を用いる。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。

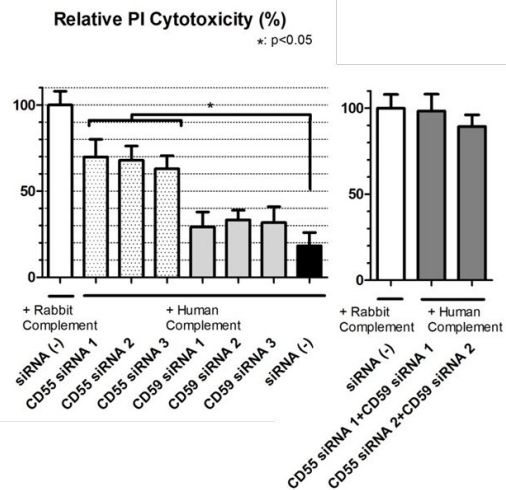
4. 研究成果

NMO-IgG 陽性患者より抽出した精製 IgG (NMO-IgG) は補体介在性・補体非介在性にアストロサイトを傷害するプロセスを確認した。

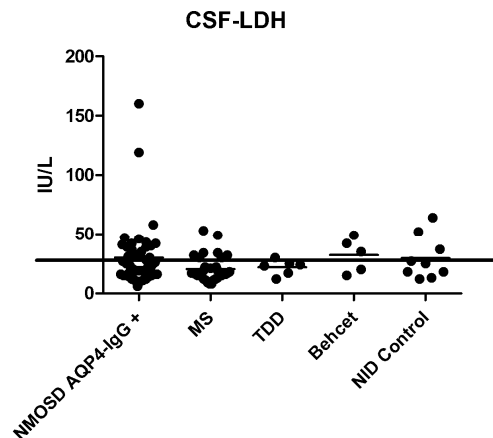
補体介在性には、NMO-IgG を介しアストロサイトが破壊された結果、アストロサイトは膨化し細胞接着能が低下、免疫化学染色ではアストロサイト膜状に活性化補体 C5b-9 が沈着し、アストロサイトの細胞核も膨化した。さらに培養液中の LDH が上昇することが *in vitro* の系を使った実験で示された。



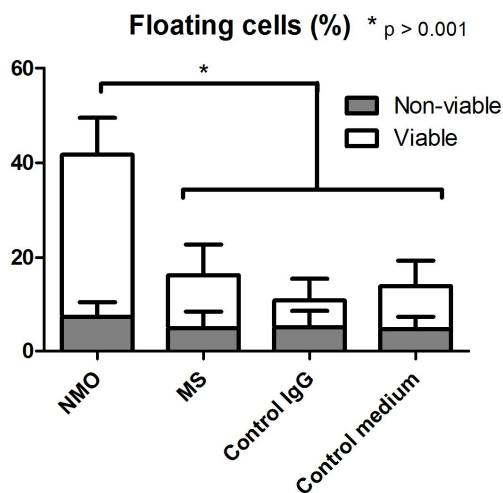
また、これらの反応は補体防御因子により防御されると考えられ、*in vitro* の系で siRNA を使い、アストロサイト膜状の CD55 や CD59 を阻害すると、補体による細胞傷害性が増悪することが示された。



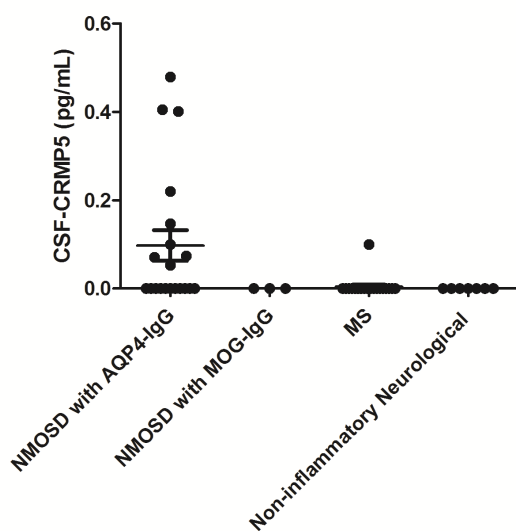
AQP4-IgG 陽性 NMO 患者の再発急性期に採取した脳脊髄液中では、GFAP や LDH が上昇することも明らかになった。これらの患者の一部は、血液中 AQP4-IgG が陰性にもかかわらず脳脊髄液中 GFAP が高値であった例があり、後に AQP4-IgG が陽性となった例や脳脊髄液中でのみ AQP4-IgG が陽性であった例を含んでいる。



補体非介在性には、NMO-IgG のみでアストロサイト一次培養細胞の糸状仮足・葉状仮足の破壊と共に足突起を縮め、細胞接着能が低下する形態変化を引き起こす。



AQP4-IgG 陽性 NMO 患者では、糸状仮足の頂点で成長円錐を形成する CRMP5 が脳脊髄液中で有意に上昇していた。非炎症性神経疾患群や MOG 抗体陽性 NMO 患者や神経ベーチェット病、神経サルコイドーシス等の炎症性中枢神経疾患ではこれらの変化を認めなかった。



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 1 件)

Nishiyama S, Misu T, Nuriya M, Takano R, Takahashi T, Nakashima I, Yasui M, Itoyama Y, Aoki M, Fujihara

K.

Complement-dependent and -independent aquaporin 4-antibody-mediated cytotoxicity in human astrocytes: pathogenetic implications in neuromyelitis optica. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 査読有り、7 巻、2016 Sep、p45-51.

〔学会発表〕(計 2 件)

第 56 回日本神経学 (新潟・朱鷺メッセ)

The usefulness of CSF-LDH in the inflammatory demyelinating diseases (2015 年 5 月 21 日)

Nishiyama S, Misu T, Takano R, Takai Y, Takahashi T, Nakashima I, Fujihara K, Aoki M.

31st ECTRIMS (Barcelona, Spain)

The usefulness of cerebrospinal fluid lactic dehydrogenation enzyme in the evaluation of disease activity in inflammatory demyelinating diseases. (2015 年 10 月 8 日)

Nishiyama S, Misu T, Takano R, Takai Y, Takahashi T, Nakashima I, Fujihara K, Aoki M.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/index.html>

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・助教

研究者番号 : 60636017