

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09332

研究課題名(和文) 視神経脊髄炎免疫病態の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) A research of immune mechanism and treatment in neuromyelitis optica

研究代表者

三須 建郎 (MISU, TATSURO)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00396491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は視神経脊髄炎(NMO)の研究において、ヒトアクアポリン4(AQP4)高親和性の抗体を新たに作成し、ラット脳脊髄炎モデルにおいて病原性を検証したところ、高親和性抗体においてはラット脊髄に広範なNMO病変を呈し、脱髄や軸索障害を伴う病理学的所見を呈することを明らかにした。またAQP4特異的T細胞を樹立した系において、ヒトAQP4抗体を同時に注入することにより、AQP4発現の豊富なラットの大脳表面や脳室周囲、脊髄や網膜等の血管周囲や視交叉などにAQP4脱落病変とヒトIgGの沈着を認めることを明らかにした。同部位では軸索障害を示唆する所見が明らかであり、意義のあるNMO組織傷害モデルと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We made a new high-affinity antibody against the extradomain of aquaporin-4 (AQP4) and studied about its pathogenic roles in experimental rat models. We revealed that high-affinity IgG could make a diffuse astrocytopathy with extensively diffuse lesion lacking AQP4 compared with human IgG, suggesting the important role of antibody-related affinity in the pathogenesis of neuromyelitis optica (NMO). In addition, a rat model injected with AQP4-specific T cell lines and human-derived AQP4-IgG, we could make a new rat model with typical perivascular loss of AQP4 in cerebrum, periventriculum, spinal cord, retina, and optic chiasm with secondary demyelination and diffuse axonal damage, which is close to the pathological findings of diffuse injury in NMO patients in post-mortem.

研究分野：神経内科

キーワード：アクアポリン4 アストロサイト 視神経脊髄炎 多発性硬化症

1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎 (NMO) は、主に視神経と脊髄に炎症性病変を呈する中枢性免疫性疾患である。近年、当科と Mayo Clinic との共同研究により 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) が存在することが見いだされ、NMO-IgG は星状神経細胞に存在するアクアポリン 4 (AQP4) に特異的に反応することが明らかとなった。また、我々は NMO の剖検脊髄におけるアクアポリン 4 の免疫組織学的検討を行い、NMO 剖検脊髄の活動期病変においては、補体の沈着がみられる血管周囲で AQP4 の発現が欠落していること、さらに早期 NMO 病変においては AQP4 およびアストロサイトのマーカーである GFAP が欠落する一方、髄鞘蛋白は保たれており、脱髄に先行して一次性にアストロサイト障害が起こる病態である事を報告した。そのアストロサイト傷害機序、脱髄機序や軸索障害機序は充分には解っておらず、疾患の病態研究や治療研究に用いる動物モデルが求められている。

2. 研究の目的

本研究では、AQP4 抗体を用いた中枢神経局所における新たなアストロサイト傷害モデルを作成し、アストロサイトの傷害機序ならびに二次性に生じる脱髄機序を明らかにすることを目的としている。AQP4 抗体を用いて実験的脳脊髄炎 (EAE) モデルを作成するとともに、病理学的に AQP4/GFAP 脱落病変の有無を検証し、さらにその際に出現するアストログリアやミクログリア等の免疫動態を免疫組織学的に検証する。病態に関連する分子を蛋白レベルで病態促進因子の特定を試み、それらを抑制する治療的研究の発展を念頭に置いている。

3. 研究の方法

(1) ヒト由来抗 AQP4 抗体の精製

NMO 患者や対照群患者の血清・血漿を非働化 (56・30分)・ろ過 (0.45 μm) 処理後、希

釈して Protein G にアプライし、溶出・ゲル濾過・ろ過の過程を経て、10 mg/mL の調整後に保存する。

(2) NMO 剖検標本

AQP4 抗体陽性 NMO 剖検例を研究対象として準備している。

モデル動物で得られた因子のヒト脳における発現を免疫組織化学的に検証する。

(3) 実験的 T 細胞+AQP4 抗体導入モデル

週齢 8 週の雌 Lewis ラット (CrI:CrIj) の両足背にミエリン塩基性蛋白 Myelin basic protein (MBP) 100 μg と結核死菌 complete freund's adjuvant (CFA) 100 μg を混ぜたエマルジョンを皮下注射して EAE を作成、臨床症状もしくは 10g/day の体重減少が出現した時点で、NMO 患者血清から精製した抗 AQP4 抗体をラットに腹腔内投与する。また、予め生体外で樹立した AQP4 特異的 T 細胞を導入し、NMO-IgG を投与する系も作成。それぞれ抗体投与量は段階的に振り分け、抗体投与後 2 日でラットを解剖、NMO 病変の好発部位である大脳 (脳室周囲、視床下部、視索)、視神経、脳幹 (最後野)、脊髄、網膜等のパラフィン標本および凍結標本を作成し、急性期の脱髄や軸索障害を含めた病理評価を行う。また、血液脳関門の影響を考え、脳局所注入モデルの検討や髄腔内投与モデルの開発を行う。

(4) 免疫組織化学

パラフィン包埋されたヒトやラット標本を用い、切片を 3-5 μm 厚にて作成。切片は、染色前に脱パラフィン処理 (キシレン 20 分 × 2 回) 後、96% エタノールに浸漬。Hydrogen peroxide 混 Methanol にて内因性 Peroxidase をブロック後、さらに 10% FCS 混 PBS にて非特異反応をブロック。抗原賦活法としては、1mM EDTA 10mM Tris pH8.5 あるいは 0.1mM クエン酸溶液 (pH6) を用いて煮沸して施行した (60-90 分)。一次抗体 (Mouse, Rabbit or Goat) を添加し 8h 後に PBS にて洗浄し、

Envision ポリマー試薬 (Mouse, Rabbit) あるいは Biotin-Avidin (ABC 法) 試薬を用いた。発色基質としては、Diaminobenzidine (DAB) や Fuchsin, Vector blue を用いる。

4. 研究成果

(1) 高親和性抗 AQP4 抗体による組織傷害モデル

我々は、ヒト由来 AQP4 抗体ないし AQP4 の細胞外ドメインを認識する特異的リコンビナント抗体を用いて AQP4 抗体関連モデルを作成し、特に高親和性抗 AQP4 抗体によって広大な脊髄病変を呈するラットモデルを作成した。ヒト NMO 剖検脳脊髄標本で見られる組織壊死や髄鞘脱落を伴い、好中球を主体とする炎症細胞浸潤、血管中心性の AQP4 や GFAP や EAAT2 の脱落、抗体や補体の沈着を認め、各病変は相互に癒合して脊髄や視神経、脳幹部などに広大な病変を呈するなど、NMO 患者にも見られる特有の病変分布を呈した。

重症度は、高親和性抗体については、僅か 0.1 mg 投与したレベルで、ヒト IgG 40~80 mg を投与した結果に相当し、更に投与量を 1 mg にすることで病変面積は脊髄の灰白質全体を覆うほどにまで拡大することが解り、抗体の親和性が強く影響することが示唆され、抗体のエピトープが鍵であると思われた。また、脱髄が比較的軽度であったが、組織には Nf 陽性の軸索腫脹が多数確認され、アストロサイト傷害に起因して、二次的に軸索障害を来たすことが示唆された。また、血液脳関門の影響を排除した脳局所投与モデルにおいても、二次的な脱髄病変を再現することを確認し、脳病変の伸展様式にアストロサイトの一次性傷害が寄与すると考えられた。

(2) AQP4 の脳内分布と NMO 病変の関係
AQP4 は、脊髄灰白質や視神経束に広く分布する他、大脳灰白質、最後野等の脳室周囲器官にも高密度に分布しており、臨床的にも NMO 病変の比較的起こりやすいところとされている。今回のモデルにおいて、最後野を含む

脊髄中心部には高頻度に病変が起こることが解ったほか、脳室周囲器官の1つで血液脳関門の希薄な視索上核や視交叉などに、AQP4 特異的 T 細胞の浸潤と、AQP4 脱落病変を認めた。また、視交叉を含む視神経内や網膜神経叢にも、AQP4 の脱落を伴う病変が認められた。(3) NMO 動物モデルにおける組織傷害機序と軸索変性

今回の両モデルにおいて、これらのアストロサイトバチー病変における脱髄現象は限定的であったのに対して、軸索障害を示唆するアミロイド前駆蛋白 (APP) 陽性のスフェロイドや腫脹軸索変性の所見が、脊髄や網膜や視神経乳頭で顕著に認められた。これらの所見は、AQP4 特異的 T 細胞導入群において顕著であり、免疫系賦活や iNOS 陽性ミクログリアの活性化を介して活性酸素種等に依る軸索障害が進展したものと推察された。これらの機序において、軸索障害は比較的視覚系繊維に沿って観察される事実から、免疫系の直接的な影響を受ける病変局所の傷害のみならず、神経遠位における二次的な変性機序も存在することが示唆され、アストロサイトの機能傷害に起因する組織傷害機序として注目される。

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 19 件)

- 1) Zeka B, Hastermann M, Kaufmann N, Schanda K, Pende M, Misu T, (14 人中 6 番). Aquaporin 4-specific T cells and NMO-IgG cause primary retinal damage in experimental NMO/SD. Acta Neuropathol Commun 2016;4:82. 10.1186/s40478-016-0355-y.(査読有)
- 2) Kurosawa K, Misu T, Takai Y, Sato DK, Takahashi T, Abe Y, Iwanari H, (13 人中 2 番). Severely exacerbated neuromyelitis optica rat model with

extensive astrocytopathy by high affinity anti-aquaporin-4 monoclonal antibody. Acta Neuropathol Comm. 2015;4;3(1):82.10.1186/s40478-015-0259-2. (査読有)

- 3) Zeka B, Hastermann M, Hochmeister S, Kögl N, Kaufmann N, Schanda K, Mader S, Misu T, (17人中8番). Highly encephalitogenic aquaporin 4-specific T cells and NMO-IgG jointly orchestrate lesion location and tissue damage in the CNS. Acta Neuropathol. 2015;130(6):783-98. 10.1007/s00401-015-1501-5.(査読有)

〔学会発表〕(計 38件)

1. 2017/9/16-21, World Congress of Neurology, Kyoto. Scientific program MO2C: New insight into the pathogenesis of anti-MOG and other disseminated demyelinating diseases. Tatsuro Misu
2. 2017年9月16-21日 XXIII World Congress of Neurology, Kyoto (Japan) The Staging of astrocytopathy in aquaporin 4 Igg positive neuromyelitis optica spectrum disorders. Takai Y, Misu T, Nishiyama S, Kuroda H, Ogawa R, Kaneko K, Takahashi T, Nakashima I, Suzuki H, Fujihara K, Aoki M
3. 2016年9月14-17日 32nd Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (London, United Kingdom) Severely exacerbated neuromyelitis optica rat model with extensive tissue damage including astrocytopathy and axonal damage by high affinity anti-aquaporin-4 monoclonal

antibody.

Kurosawa K, Misu T, Abe Y, Takahashi T, Sato D, Nakashima I, Fujihara K, Yasui M, Aoki M.

4. 2015年9月15日~9月16日 第27回 日本神経免疫学会(岐阜) NMO モデルマウスにおけるアストロサイト障害に伴う二次性脱髄機序の解明. 高井 良樹(東北大学病院 神経内科), 三須 建郎, 黒沢 和夫, 高橋 利幸, 中島 一郎, 黒田 宙, 西山 修平, 藤原 一男, 青木 正志
5. 2015年5月20日~5月23日 第56回 日本神経学会(新潟) Passive transferred NMO rat model with high affinity mouse anti-AQP4 antibody 黒澤和夫、三須建郎、高井良樹、高橋利幸、佐藤ダグラス、中島一郎、藤原一男、安井正人、青木正志

〔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

東北大学大学院多発性硬化症治療学

<http://www.ms.med.tohoku.ac.jp/>

東北大学大学院神経内科学

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

三須 建郎 (MISU, Tatsuro)

東北大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 00396491

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

青木 正志 (Aoki, Masashi)

東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 70302148

(4)研究協力者

なし