

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07051

研究課題名(和文)抗neurofascin155抗体関連脱髄疾患のフラグメント抗体による病態モデル

研究課題名(英文)Development of animal models for anti-neurofascin 155 antibody-positive inflammatory demyelinating diseases by single chain antibodies

研究代表者

緒方 英紀(Hidenori, Ogata)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90778838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、抗neurofascin 155 (NF155) 抗体陽性慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)の動物モデルを作成するために、病原性を有するモノクローナル抗体を単離することである。抗NF155抗体陽性CIDP患者のリンパ球を採取し、全RNAからcDNAを調製後、免疫ファージ抗体ライブラリーを作成した。その後、細胞パニング法を用いてヒトNF155特異的な一本鎖フラグメント(single chain variable fragment, scFv)の候補となるクローンを複数単離することに成功した。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that a subset of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) has autoantibodies against neurofascin 155 (NF155). However, pathogenicity of the antibodies remains to be elucidated. In this study, we aimed to isolate pathogenic single chain variable fragments against NF155 to elucidate pathomechanisms of anti-NF155 antibody-positive CIDP. We constructed an immunoglobulin V-gene phage-display library from the immunoglobulin repertoire of a patient with anti-NF155 antibody-positive CIDP. Then several antigen-specific clones were isolated using a cell panning method.

研究分野：神経内科

キーワード：慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー neurofascin 155 自己抗体 フラグメント抗体 ランビエ絞輪

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: CIDP) は古典的には2ヶ月以上にわたる慢性進行性あるいは階段状進行性、再発性の左右対称性の四肢の遠位、近位筋の筋力低下・感覚障害を主徴とした原因不明の末梢神経脱髄疾患と定義される。各症例での経過や治療への反応性が均一でないことから、不均一な病因の疾患が混在していると考えられている。CIDPでは細胞性免疫のみならず液性免疫の関与が指摘され、これまで様々な抗原に対する自己抗体の報告がなされてきたが、陽性例はごく一部の症例に限られていることや再現性の問題から診断・治療における有用性は確立されていなかった。近年、ランピエ絞輪部およびその周辺の分子機構の解明が進み自己抗体の標的部位としての側面にも注目が集まるようになり、特にランピエ傍絞輪部の髄鞘形成細胞より発現する neurofascin 155 (NF155) と CIDP の関連を示す報告が相次ぎ、その臨床的特徴、治療反応性が明らかにされつつある。申請者の施設では、炎症性脱髄性疾患と抗 NF155 抗体の関連に早期より着目し、一貫して研究を継続してきた。2013年に希少な難治性脱髄性疾患である中枢・末梢連合脱髄症と抗 NF155 抗体の関連について報告した。その後、申請者は13例の抗 NF155 抗体陽性 CIDP 症例を同抗体陰性 CIDP 症例と臨床像を比較し、同症例群では平均発症年齢が若く、遠位対称型である割合と下垂足、歩行障害、振戦を有する割合が高く、脳脊髄液中の蛋白が著増していることを明らかにした。更に電気生理学的異常の特徴を報告し、頸部・腰仙骨部神経根および近位末梢神経が対称性に肥厚していることを MRI neurography で見出した。治療効果については抗 NF155 抗体陽性例を治療反応群と抵抗群に分類した場合、大量免疫グロブリン療法 (IVIg) に加えてステロイドを併用している割合が治療反応群で有意に高いことを明らかにした。また抗 NF155 抗体陽性症例の IgG サブクラスを確認したところ、全員の血清で IgG4 が優位であった。以上より、抗 NF155 抗体は病原性を有する抗体であり、同抗体を有する症例は一律の病態生理により症状を呈すると推察される。しかし、抗 NF155 抗体の作用および発症に至るまでの過程は十分明らかになっていない。

病原性を有するモノクローナル抗体は疾患の病態生理を明らかにするために有用なツールであり、これまで様々な抗体介在性疾患の病態解明のため抗原特異的なモノクローナル抗体が作製・利用されてきた。モノクローナル抗体作製法の一つにファージディスプレイ法があり、近年は細胞融合法に替わる新たな抗体作製法として注目されている。抗 NF155 抗体陽性 CIDP と同様に自己抗体のサブクラスが IgG4 優位であり、類似の病態が示唆される疾患として天疱瘡、血栓性血小

板減少性紫斑病が挙げられるが、いずれの疾患においても既にファージディスプレイ法によって病原性を有する single-chain variable fragment (scFv) (抗体が抗原を認識するために必要な最小単位である VH および VL から構成される可変領域をペプチドリンカーで結合した単鎖可変領域フラグメント) が作製され、特徴的な病状、病態が再現されている。一方で、これまで NF155 に対する scFv の報告はない。

2. 研究の目的

本研究の目的はファージディスプレイ法を用いてヒト NF155 を抗原とする scFv を作製することである。NF155 特異的 scFv を動物モデルへ応用し、更にエピトープ解析することで病態生理の解明が期待できる。また、治療戦略を立てる上でも非常に有用なツールとなる。

3. 研究の方法

抗 NF155 抗体陽性 CIDP 患者由来抗体ファージライブラリーの構築

申請者の施設で抗 NF155 抗体を測定し陽性であった症例に対して本研究についての十分な説明を行い、同意を得た後に末梢血を採取し、LeucosepTM Tube を用いて末梢血単核細胞 (PBMC) を抽出した。RNeasy mini kit (QIAGEN 社) を用いて total RNA を抽出した後に逆転写反応を用いて cDNA を合成した。続いて IMG T (<http://www.imgt.org>) データベースを参考に設計したプライマーを用いて VL 遺伝子を VH 遺伝子と VL 遺伝子を個別に PCR 増幅した。その後リンカーペプチド配列をコードしたリンカー-DNA を用いてアセンブリ PCR を行うことでランダムに連結させ、それをファージのコートタンパク質 g3p の N 末端側に融合タンパク質として発現するようにファージミドベクター内に組み換えた。それを大腸菌 (TG-1) にエレクトロポレーターにより形質転換後、M13K07 ヘルパーファージを感染させることによって、抗体ファージライブラリーを構築した。

細胞パニングと特異的抗体の単離

今回パニングに際しては、抗 NF155 抗体のエピトープと推測される部位を恒常的に強制発現させた HEK 細胞 (NF155-HEK) に抗体ファージライブラリーを直接反応させる細胞パニング法を用いた。

1×10^6 個 / $100 \mu\text{L}$ の naive HEK 細胞と NF155-HEK とをそれぞれ $300 \mu\text{l}$ 準備した。最初に naive HEK 細胞にファージライブラリーを添加し、4 で 1 時間反応させた。この操作により HEK 細胞に結合するファージを除去した。遠心後の上清を NF155-HEK に添加して 4 で 1 時間反応させた。洗浄して NF155-HEK に結合しなかったファージを除去した後、 76mM のクエン酸 (pH 2.5) 1mL で細胞を懸濁し、

NF155-HEK から結合ファージを解離させた。その後 1M Tris-HCl (pH 7.4) 2mL で中和し、遠心後に上清を回収した。その後、対数増殖期の TG-1 に感染させ、2TYAG プレート上で 37、0.N. で培養した。プレートから回収した TG-1 を 2TYAG 培地で培養後、M13K07 ヘルパーファージを MOI = 10 で添加し、37、30 分静置、37、30 分振盪させ感染させた。1000 × g、10 分で遠心分離後、2TYAG でペレットを分散させ、37、0.N. で培養した。遠心分離後の上清に 0.2 容量の PEG6000 溶液と混合し、沈殿したファージを回収し、次のラウンドに用いた。

細胞パニングによる特異的抗体の濃縮は、NF155-HEK に結合したファージに Alexa488 で蛍光標識された抗 M13 抗体を結合させた後に、フローサイトメーターで NF155-HEK の蛍光強度を測定することで確認した。

単離したクローンと NF155 の結合性の評価には、抗 NF155 抗体のエピトープと推測される部位を一過性に発現させた HEK 細胞を用いた。

4. 研究成果

合計 3 回細胞パニングを行った結果、2 回目のパニング後よりヒト NF155 に結合する ScFv を有するクローンが十分濃縮されていることを確認した(図 1)。

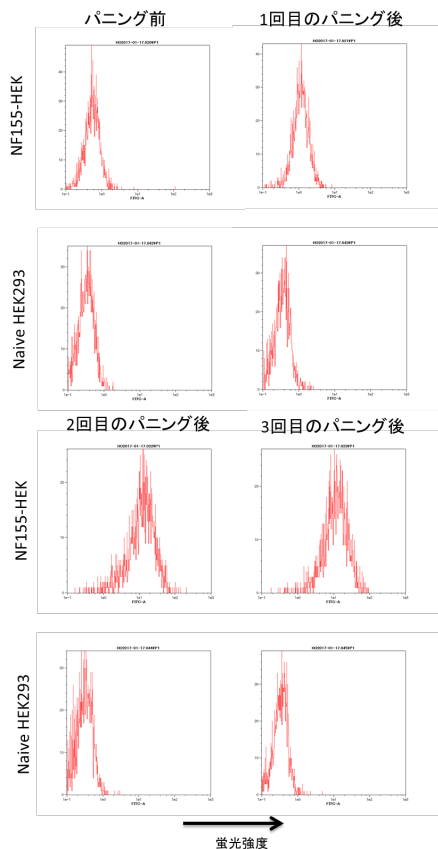


図 1. 細胞パニング結果

3 回目のパニング後に 15 クローンをピックアップしたところ、13 クローンがヒト NF155 に結合した。また、10 クローンの ScFv の塩基配列を確認したところ、その多くで類似の VH 遺伝子と VL 遺伝子の組み合わせがみられた。ヒト NF155 に高親和性の組み合わせが同定されている可能性が高い。今後は今回得られたファージクローンを利用して、ScFv を単利して動物に投与することで、抗 NF155 抗体陽性 CIDP 症例でみられる脱髄所見を呈するのか確認していく。

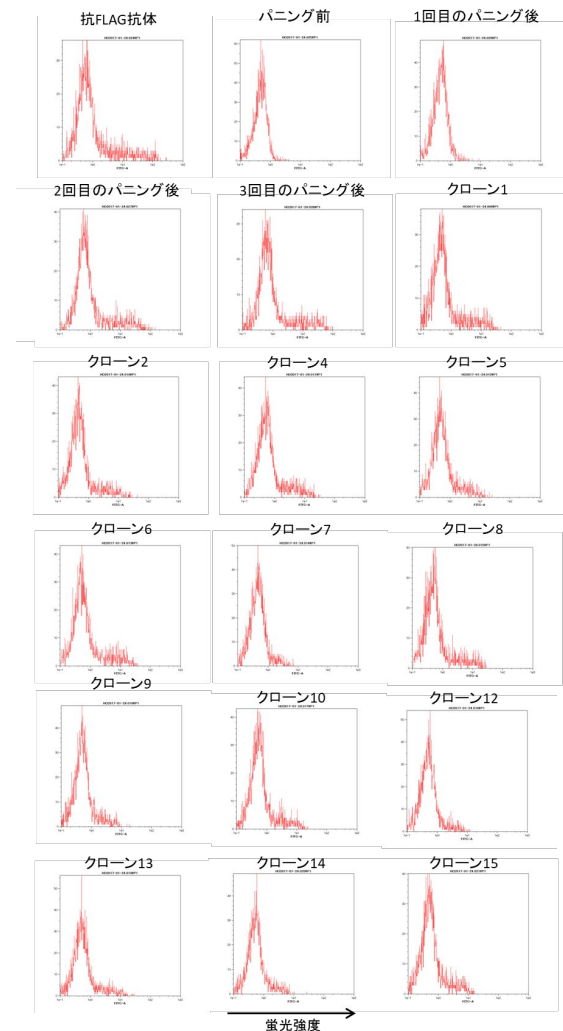


図 2. 単離したクローンの NF155 への結合性
15 のクローンのうち、13 のクローンで NF155 への結合を確認した

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 5 件)

1. Kuwahara M, Suzuki H, Oka N, Ogata H, Yanagimoto S, Sadakane S, Fukumoto Y, Yamana M, Yuhara Y, Yoshikawa K, Morikawa M, Kawai S, Okazaki M, Tsujimoto T, Kira JI, Kusunoki S.

- Electron microscopic abnormality and therapeutic efficacy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with anti-neurofascin155 immunoglobulin G4 antibody. Muscle and Nerve. 2018;57(3):498-502. DOI: 10.1002/mus.25757 査読有
2. Ogata H, Yamasaki R. Anti neurofascin 155 antibody related neuropathy. Clin Exp Neuroimmunol, 2018;9:54-64. doi:10.1111/cen3.12444 査読有
 3. Fujita A, Ogata H, Yamasaki R, Matsushita T, Kira JI. Parallel fluctuation of anti-neurofascin 155 antibody levels with clinico-electrophysiological findings in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. Journal of the Neurological Sciences. 2018;384:107-112. DOI: 10.1016/j.jns.2017.11.035 査読有
 4. Koike H, Kadoya M, Kaida KI, Ikeda S, Kawagashira Y, Iijima M, Kato D, Ogata H, Yamasaki R, Matsukawa N, Kira JI, Katsuno M, Sobue G. Paranodal dissection in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with anti-neurofascin-155 and anti-contactin-1 antibodies. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry. 2017;88(6):465-473. DOI: 10.1136/jnnp-2016-314895 査読有
 5. Hiwatashi A, Togao O, Yamashita K, Kikuchi K, Kamei R, Momosako D, Ogata H, Yamasaki R, Yoneyama M, Kira J, Honda H: Lumber plexus in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: evaluation with 3D nerve-sheath signal increased with inked rest-tissue rapid acquisition of relaxation enhancement imaging (3D SHINKEI) Eur J Radiol 93: 95-99, 2017. DOI: 10.1016/j.ejrad.2017.05.031. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) Hidenori Ogata, Atsushi Fujita, Ryo Yamasaki, Takuya Matsushita, Jun-ichi Kira: Clinico-electrophysiological correlation with anti-neurofascin 155 antibody levels in the antibody-positive chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy patients 2017

PERIPHERAL NERVE SOCIETY meeting (2017PNS meeting). 2017.7.8~12. Barcelona.

- 2) Hidenori Ogata, Ryo Yamasaki, Takuya Matsushita, Masato Kadoya, Kenichi Kaida, Makoto Matsui, Satoshi Kuwabara, Susumu Kusunoki, Jun-ichi Kira: Proposal of Diagnostic Criteria for Anti-Neurofascin 155 Antibody-Associated Neuropathy. XXIII World Congress of Neurology(WCN2017). 2017.9.16~21. 京都.
- 3) 緒方英紀, 山崎亮, 吉良潤一: 自己抗体陽性CIDPの臨床像~抗neurofascin155抗体陽性CIDPを中心に~. 第28回日本末梢神経学会学術集会. 2017.8.24~26. 愛知.
- 4) 緒方英紀, 前田泰宏, 岡伸幸, 西田圭一郎, 松下拓也, 山崎亮, 吉良潤一: 全身 neurography で多発する紡錘状末梢神経肥厚を認め、病理学的に脱髄・炎症を確認し得た MADSAM の一例. 第28回日本末梢神経学会学術集会. 2017.8.24~26. 愛知.
- 5) 緒方英紀, 山崎亮, 松下拓也, 角谷真人, 海田賢一, 松井真, 桑原聡, 楠進, 吉良潤一: 抗 neurofascin155 抗体関連ニューロパチー暫定診断基準案の策定. 第29回日本神経免疫学会学術集会. 2017.10.6~7. 札幌.

6. 研究組織

(1)研究代表者

緒方 英紀 (Hidenori Ogata)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号: 90778838

(2)研究協力者

伊東 祐二 (Yuji Ito)
鹿児島大学・理工学研究科・教授
研究者番号: 60223195

(3)研究協力者

()