

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09779

研究課題名（和文）慢性脊髄炎の新規自己抗体同定と病原性モノクローナル抗体作成の試み

研究課題名（英文）Identification and establishment of novel autoantibody in myelitis

研究代表者

奥野 龍禎（Okuno, Tatsusada）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00464248

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：脊髄炎を来す代表的疾患であるNMOSD患者の髄液プラズマブラストからリコンビナントAQP4抗体を作成した。AQP4 Abでアストロサイトを刺激するとミトコンドリアDNAとケモカインであるCCL2が増加した。ミトコンドリアDNAは単球からのCCL2を増加させることから、単球の病巣へのリクルートが増強されることが予測される。またアクアポリン4抗体を直接ラットの脊髄に注入したところ疼痛が誘発され、NMO疼痛動物モデルの確立に成功した。原因不明の脊髄炎については候補となる抗原の探索を行った。現在セルベースとアッセイを作成して候補となる抗原の絞り込みを行っているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アクアポリン4抗体はこれまで免疫吸着カラムから精製して使用していたが、量が限られていた。本研究では国内で初めてリコンビナントアクアポリン4抗体作成に成功しており今後安定的な動物モデル作成が可能になる。またNMOの疼痛は非常に強く、就業や家庭生活の妨げとなり、大きな社会的損失を来しているが、その治療法に結び付くと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We established anti-AQP4 recombinant autoantibodies (Ab) from plasmablasts in NMOSD patient's CSF. Human astrocytes treated with anti-AQP4 Ab produced a significant amount of CCL2 and contributed to the efficient recruitment of monocytes. Moreover, mitochondrial DNA (mtDNA) was released from astrocytes treated with anti-AQP4 Ab. MtDNA further enhanced CCL2 production by monocytes, and it was demonstrated that mtDNA concentration correlated with the efficiency of monocyte recruitment in the CSF of NMOSD patients. These observations highlight that mtDNA which was released from astrocytes damaged by anti-AQP4 Ab has a central role in establishing the inflammatory loop of monocyte recruitment and activation via an innate immunity pathway. Regarding myelitis with unknown etiology, we tried to search for antigens. We are currently selecting candidate antigens by establishing a cell base and assay.

研究分野：神経免疫学

キーワード：慢性脊髄炎 視神経脊髄炎 アクアポリン4抗体 自己抗体

1. 研究開始当初の背景

神経免疫疾患の分野において近年自己抗体の必要性は診断マーカーとしての意義のみならず、病態の解明やモデル動物の作製に重要と考えられている。我々はヘルパーT細胞やマクロファージを介した脊髄の炎症機転について実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)などの動物モデルを用いて検討してきたが、視神経脊髄炎(NMO)における抗アクアポリン(AQP)4抗体の病原性を世界に先駆けて報告し、NMOが抗AQP4抗体によるアストロサイトパチーであることを明らかにした。さらに急性期NMO患者の免疫吸着後カラムから精製したIgGをパッシブトランスファーすることにより世界で初めてNMO動物モデルを作成した。このように自己抗体の発見は神経疾患の概念や治療法の革新をもたらしてきた。その一方で、脊髄炎の中には明らかに血液浄化療法や大量ガンマグロブリン療法が有効で液性免疫の関与が示唆されるにもかかわらず、自己抗体が同定されていないものが未だ多数存在する。

2. 研究の目的

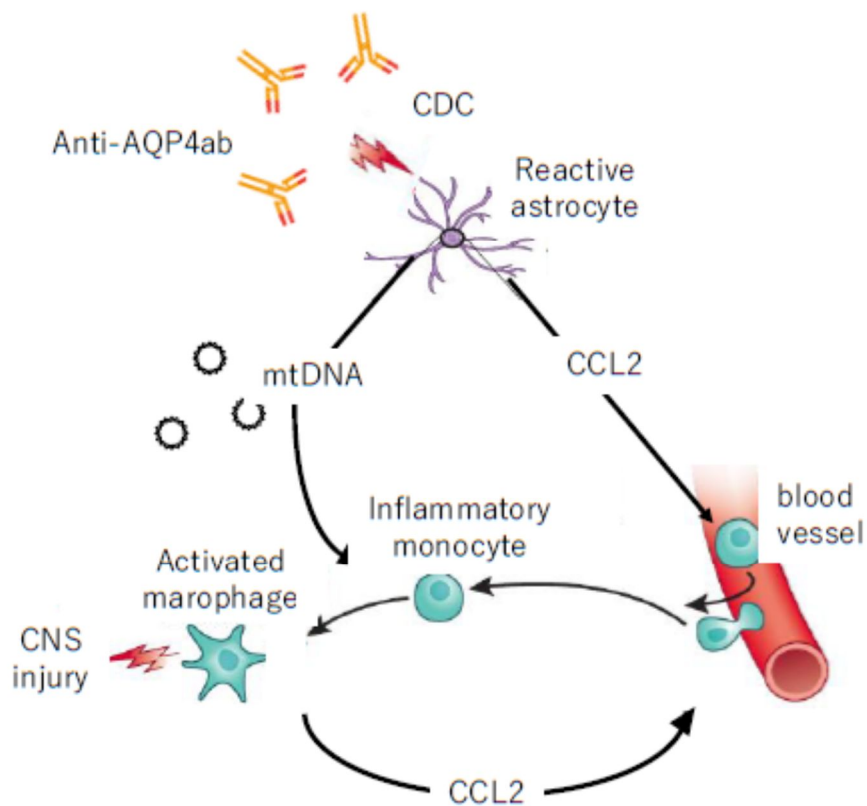
本研究では神経免疫疾患、特に脊髄炎に焦点を当て、自己抗体を同定し、バイオマーカーとしての確立を目指すとともに、シングルセルテクノロジーを駆使することにより病原性リコンビナントモノクローナル抗体を作製し、動物モデル作成や創薬につなげる。

3. 研究の方法

自己抗体が原因となっている脊髄炎症例の抗原をウェスタンブロットや抗原アレイなどの使用により同定する。自己抗体と病勢との関連及び疾患特異性を評価してバイオマーカーとしての意義を確立するとともに、セルラインなどを用いて補体依存性細胞障害(CDCC)、抗体依存性細胞障害(ADCC)双方の面から病原性を評価する。病原性が示唆される場合には、患者の形質細胞、形質芽細胞からシングルセルRT-PCRを行って抗体遺伝子をクローニングし、モノクローナル抗体を作成する。病原性が確認できればラットあるいはマウスにパッシブトランスファーを行い、動物モデルを作成して疾患の病態解明を行うとともに、治療法の開発などを行っていく。

4 . 研究成果

脊髄炎を来す代表的疾患である NMOSD 患者の髄液プラズマブラストからリコンビナント AQP4 抗体を作成した。この抗 AQP4 Ab にアストロサイトを刺激するとミトコンドリア DNA とケモカインである CCL2 が増加した。ミトコンドリア DNA は単球からの CCL2 を増加させることから、単球の病巣へのリクルートが増強されることが予測される。またアクアポリン 4 抗体を直接ラットの脊髄に注入したところ疼痛が誘発され、NMO 疼痛動物モデルの確立に成功した。NMO の疼痛は非常に強く、就業や家庭生活の妨げとなり、大きな社会的損失を来しているが、その治療法に結び付くと考えられる。原因不明の脊髄炎については候補となる抗原の探索を行った。現在セルベースとアッセイを作成して候補となる抗原の絞り込みを行っているところである。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamashita K, Kinoshita M, Miyamoto K, Namba A, Shimizu M, Koda T, Sugimoto T, Mori Y, Yoshioka Y, Nakatsuji Y, Kumanogoh A, Kusunoki S, Mochizuki H, Okuno T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid mitochondrial DNA in neuromyelitis optica spectrum disorder.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neuroinflammation.	6. 最初と最後の頁 125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-18362-2 10.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Harada K, Fujita Y, Okuno T, Tanabe S, Koyama Y, Mochizuki H, Yamashita T	4. 巻 8
2. 論文標題 Inhibition of RGMa alleviates symptoms in a rat model of neuromyelitis optica.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-18362-2 10.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Honorat JA, Nakatsuji Y, Shimizu M, Kinoshita M, Sumi-Akamaru H, Sasaki T, Takata K, Koda T, Namba A, Yamashita K, Sanda E, Sakaguchi M, Kumanogoh A, Shirakura T, Tamura M, Sakoda S, Mochizuki H, Okuno T	4. 巻 12
2. 論文標題 Febuxostat ameliorates secondary progressive experimental autoimmune encephalomyelitis by restoring mitochondrial energy production in a GOT2-dependent manner.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0187215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 1371/journal.pone.0187215.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 清水幹人、奥野龍禎 木下允、甲田亨、南波明子、山下和哉、石倉照之、中辻祐司、望月秀樹
2. 発表標題 患者由来レコンピナントAQP4モノクローナル抗体を用いたNMOの病態解析
3. 学会等名 第30回日本神経免疫学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamashita K, Kinoshita M, Miyamoto K, Namba A, Shimizu M, Koda T, Nakatsuji Y, Kumanogoh A, Kusunoki S, Mochizuki H, Okuno T
2. 発表標題 Cerebrospinal fluid mitochondrial DNA elicits innate immune response in NMOSD
3. 学会等名 ECTRIMS (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----