

令和 4 年 10 月 14 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05134

研究課題名（和文）視神経脊髄炎の動物モデルと抗アクアポリン4抗体を用いた新規治療法の開発基盤研究

研究課題名（英文）Development of new therapy for neuromyelitis optica using its animal models and anti-AQP4 antibodies.

研究代表者

阿部 陽一郎（Abe, Yoichiro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：10317331

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：視神経脊髄炎の新規治療法の開発に必要な新しいモデル動物の確立を試み、ラットの2系統を樹立した。

この他、視神経脊髄炎特異的自己抗体がアクアポリン4に結合した際に見られるアクアポリン4の内在化の分子機構の解明を試みた。その過程においてアクアポリン4のC末端ドメインに少なくとも3つのアクアポリン4内  
在化・細胞内輸送・分解に関与する配列が存在することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新しい視神経脊髄炎のモデル動物の作製のため、ラットの2系統を作製したことで、ラットにおけるゲノム編集技術の発展に寄与した。これらのラットの使用により、視神経脊髄炎治療法開発のためのツールが開発できただけでなく、他の疾患の治療法開発にも貢献できると期待される。また、体が小さいためにマウスでは困難であった研究を可能とする。これらラットはナショナルバイオリソースプロジェクトに寄託した。

研究成果の概要（英文）：We planed to establish new animal models for developing new therapy for neuromyelitis optica.

In addition, we tried to elucidate a molecular mechanism for endocytosis of aquaporin-4 induced by binding of autoantibody called NMO-IgG. In this process, we found at least three amino-acid sequences responsible for endocytosis, intracellular trafficking, or degradation of aquaporin-4.

研究分野：神経科学・薬理学

キーワード：アクアポリン4 視神経脊髄炎 モノクローナル抗体 動物モデル 抗体医薬 内在化/エンドサイトーシス 自己免疫疾患

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 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脱髄を伴う自己免疫疾患で、長く多発性硬化症 (MS) の一亜型とされてきた。ところが、NMO 患者血清中の特異的自己抗体 (NMO-IgG) がアストロサイトに発現するアクアポリン 4 (AQP4) の細胞外ドメインを抗原とすることが明らかとなり、NMO は NMO-IgG が AQP4 を介してアストロサイトに結合し、補体依存的にこれを傷害し、その結果脱髄が生じる、MS とは異なる疾患であると理解された。すなわち NMO-IgG の AQP4 への結合を阻害することにより症状の緩和・再発防止が可能と予測される。

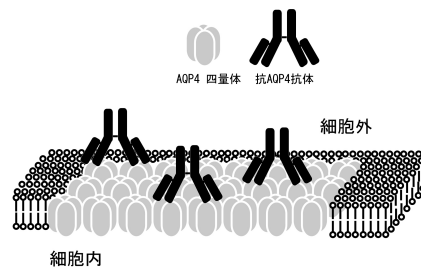


図1: AQP4アレイ構造と抗AQP4細胞外ドメイン抗体の結合

NMO-IgG の標的である AQP4 は 6 回膜貫通型膜タンパク質で、3 つの細胞外ループ (この中に NMO-IgG のエピトープが存在) を持ち、四量体が機能ユニットである。AQP4 はこの四量体が更に規則正しく並び会合するアレイ構造を形成する (図 1)。AQP4 には細胞内 N 末端 22 残基の有無により 2 つのアイソフォーム (M1 及び M23) が生じる。M1 にのみ存在する N 末端 22 残基はアレイ構造形成を阻害するため、M1 単独ではアレイ構造が形成されない。一方、M23 を単独で発現させると巨大なアレイ構造を形成する。すなわち生体内では両者の存在比率によりアレイ構造の大きさが規定されている。申請者らは NMO の発症機構解明・新規治療法開発・新規診断法開発を目標として研究を行ってきた。その中で基軸となるのが NMO-IgG と同様に AQP4 の細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体 (mAb) の作製である。典型的な NMO-IgG の特徴は、(1) 脂質二重膜に挿入された AQP4 を認識し、変性した AQP4 を認識しないこと、(2) M1 よりも M23 を強く認識する、すなわち抗原認識に AQP4 のアレイ構造形成が有利に働くこと、更に (3) マウス AQP4 (mAQP4) を認識しないものが存在することである。NMO-IgG 様の mAb を得るため東京大学との共同研究により、バキュロウイルスディスプレイ法を用いた。本法は抗原となる膜タンパク質 (ヒトあるいはマウス AQP4) を発芽型バキュロウイルスのエンベロープ上に高効率に発現させる手法である。これを直接マウスに免疫することで上記性質を有するヒト AQP4 (hAQP4) 選択的 mAb 3 種、mAQP4 選択的 mAb 2 種を得ることに成功した (Miyazaki et al. 2013, Ramadhanti et al. 2013, Miyazaki-Komine et al. 2015, Huang et al. 投稿中)。ヒト選択的 mAb については、その定常領域を、補体活性化能を消失させたヒト IgG の相同領域と置換したキメラ抗体を作製することで、NMO-IgG に拮抗する新規 NMO 治療薬の可能性を示した (Miyazaki-Komine et al. 2015)。一方、マウス選択的 mAb については東北大学との共同研究により従来の NMO モデル動物と比較してより実際の病理像を再現したマウス・ラットモデルの作出に成功するとともに、AQP4 の抗体依存的内在化を誘導するために必要な抗体結合様式を明らかにした (いずれも投稿中)。5 種類の mAb は抗原に対する親和性が比較的弱い一方、何れも 2 つの四量体を架橋するように二価結合することで AQP4 に強く結合すること、その際に AQP4 のアレイ構造が mAb の一価結合から二価結合への移行を著しく促進する (図 1 及び 2A) こと、一価結合と二価結合は頻りに遷移しており、一価結合から二価結合への移行を阻害すると速やかに解離する (図 2B) ことが申請者らの kinetics 実験 (投稿中) 並びに高速原子間力顕微鏡による観察 (投稿準備中) により強く示唆された。すなわち、図 2B に示すように結合初速度が極めて速い抗体 (灰色) を開発すれば、既に結合した NMO-IgG (黒) を解離させる抗体医薬が実現できると考えられる。

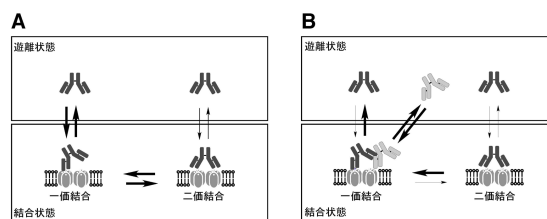


図2: 抗AQP4細胞外ドメイン抗体の結合モデル

## 2. 研究の目的

### (1) 開発したキメラ mAb の NMO モデル動物による治療効果の証明

申請者らはヒト AQP4 に高親和性に結合する mAb をキメラ化した分子が新しい NMO 治療・再発防止のための抗体医薬になると提唱している (Miyazaki-Komine et al. 2015)。現在この仮説を証明する為に相応しい動物モデルが存在しないため、これを開発し *in vivo* での治療効果を検証する。

### (2) 抗体依存的 AQP4 の内在化機構の解明とその NMO 病態・治療における位置づけ

抗体依存的 AQP4 の内在化は細胞表面から NMO-IgG の標的を減少させるという点で有用と考えられるが、一方で NMO の病態に関与するという報告もある。この問題は NMO-IgG に拮抗する分子として抗体を用いる限り検証を要する。申請者らは mAQP4 に結合し、その内在化を強く誘導する mAb と誘導しない mAb を確立した。そこで、各々の mAb を用いて作製した動物モデルの NMO 様病態、更には AQP4 を発現する他の臓器に対する影響に違いが生じるか否か (安全性) 詳細に検討する。またこれと同時に *in vitro* の系で抗体結合後の内在化の細胞

内分子機構をも明らかにする。

### 3. 研究の方法

NMO-IgG に拮抗する抗体医薬の治療効果及びその安全性を動物モデルにより *in vivo* で評価する。治療効果を評価する上での問題点である、NMO-IgG を含むヒト選択的抗 AQP4 抗体が齧歯類の AQP4 に対して親和性が低い点を克服するため、①発生工学的手法を駆使した AQP4 をヒト化したマウス/ラットの作製、及び②マウス選択的 mAb を用いた NMO モデルに対する、マウス選択的結合特性を持った無毒化 mAb による治療効果の証明を、主に組織学的解析及び行動試験により行う。一方、安全性については、①AQP4 内在化を起こすマウス選択的 mAb と起こさない mAb をそれぞれマウスあるいはラットに投与し、両者の間に表現型の違いがあるか否か組織学的に解析する他、②内在化の分子機構を生化学的・分子生物学的手法により *in vitro* で明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) ゲノム編集によるヒト化 AQP4 ラットの作製

##### ① ラット AQP4 (rAQP4) ヒト化の設計

マウス及びラットの AQP4 のアミノ酸配列を hAQP4 と比較するとマウスで 22 残基、ラットで 19 残基異なる。AQP4 遺伝子の ORF は 10kb 以上にわたり、

すべてのアミノ酸配列をヒトの配列に置換するとすると 1 度の操作では完結できない。そこで NMO-IgG の結合親和性という観点から、最小限置換すべきアミノ酸残基を決定することとした。NMO-IgG が結合するのは 3 つの細胞外ループであるが、配列はマウスで 4 残基、ラットで 3 残基異なる。ラットでの 3 残基は全てエクソン 1 にあり、約 300 bp の領域を置換することで細胞外領域をヒト化できる。一方、マウスの場合は 4 残基全てヒトの配列にするためにはエクソン 3 まで約 3 kbp に渡る置換が必要である。これに加えて、マウスは小型で遺伝子改変動物を作製しやすい利点があるが、NMO モデルを再現する際に必須な補体の活性化が十分でないという欠点があり、他種の補体を適宜加える必要がある。一方、ラットモデルは補体の補充は不要で、腹腔内に抗体のみ注入すれば良い。ラット抗体を認識しない二次抗体を用いれば投与した抗体の血中濃度の測定が可能で薬物動態学的評価ができる利点もある。そこでラットを用いたモデルの作製に絞り、rAQP4 の細胞外ドメインの 3 残基及び近傍の膜貫通ドメインにある 2 残基、すなわちエクソン 1 上にある計 5 残基をヒトの配列に置換した rAQP4 を作製し、これに対する hAQP4 選択的抗体の結合を ELISA 法により確認したところ、調べた限り全てのヒト選択的抗体はヒト化 rAQP4 に hAQP4 と同程度の親和性で結合した (図 3)。

##### ② ヒト化 AQP4 ノックインラット及び AQP4 ノックアウトラットの作製

大阪大学との共同研究により CRISPR/Cas9 システムを用いヒト化 AQP4 ラットの作製に成功した。またその過程で AQP4 遺伝子のエクソン 1 からイントロンにわたって 295 bp 欠損したラットも得た。このラットは機能的 AQP4 を発現していないと考えられる。いずれも 1 度野生型ラットに戻し交配したのち、得られたヘテロ個体同士を交配してホモ個体を得ている。得られたそれぞれのホモ個体における AQP4 の発現をウェスタンブロットリングにより確認したところ、ヒト化 AQP4 ノックインラットでは抗 AQP4 C 末端ドメイン抗体により認識される野生型ラットと同等のバンドが検出された (図 4, Humanized)。一方、AQP4 遺伝子に 295 bp の欠損を持つラットではそのようなバンドは検出されなかった (図 4, Knockout)。しかしながら、長時間露光すると抗 AQP4 C 末端ドメイン抗体により認識される 15 kDa 程度のバンドが認められた。これはスプライシングの異常により、途中から翻訳された C 末端ドメインを含む AQP4 の断片であると考えられる。AQP4 ノックアウトラットにおける AQP4 の断片の発現は脳 (図 5, A-D) 及び腎臓 (図 5, E-H) における組織染色によっても確認された。これらの結果から、この AQP4 ノックアウトラットにヒト化 rAQP4 を免疫した場合、抗原として認識されると期待される一方、細胞外ドメイン以外の部位に対する免疫応答は起こりにくいと予想され、免疫により活性化された T 細胞・B 細胞をヒト化 AQP4 ノックインラットに移植することで、EAE を用いない新たな NMO モデルラットが作製できる可能性が

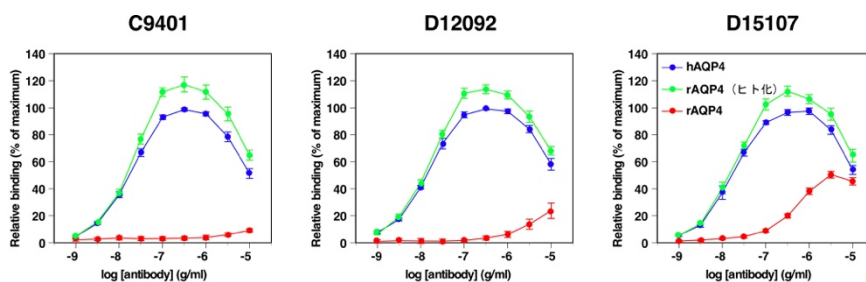


図3: ヒト化ラットAQP4に対するヒトAQP4選択的モノクローナル抗体の結合。ヒトAQP4 M23 (青)、ラットAQP4 M23 (赤)、及びヒト化ラットAQP4 M23 (緑)の発現プラスミドをトランスフェクションしたCHO細胞を用い、ヒトAQP4選択的モノクローナル抗体C9401、D12092、D15107の結合をELISA法により求めた。

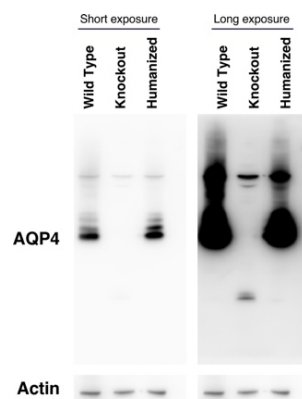


図4: AQP4 ヒト化ラット及びAQP4ノックアウトラットにおけるAQP4の発現。小脳タンパク質抽出液中のAQP4を抗AQP4 C末端ドメイン抗体を用いたウェスタンブロットリング法により検出した。

生じた。

### ③今後の展望

今後はこれら新規開発した遺伝子改変ラットを用いて新規 NMO モデルの作製とこれを用いた新規 NMO 治療法の開発を目指す。

#### (2) 抗体依存的内在化機構の解明

①AQP4 C 末端ドメイン欠損による AQP4 安定化に対する影響

mAQP4 を発現した CHO 細胞を mAQP4 選択的 mAb で処理すると AQP4 タンパク質の減少が認められる (図 6、左、レーン 3)。これは bafilomycin A1 を加えることにより抑制されることから、抗体刺激後 AQP4 はライソゾームに運ばれ分解されるということを示唆している。AQP4 の C 末端ドメインを AQP1 の相当する領域と置換すると、抗体刺激に伴う AQP4 の分解は起こらなくなった (図 6、中央)。これらのことから、AQP4 の C 末端ドメインには抗体刺激に伴うライソゾームへの移行に必要な配列が存在する可能性が考えられた。

そこで mAQP4 の C 末端ドメインの欠損変異体を作成し、その発現を調べた。各コンストラクトの AQP4 cDNA には IRES を介して EGFP を連結しており、その発現及び蛍光を指標に転写レベルがモニターできるようになっている。Val<sup>301</sup> 以降の欠損で AQP4 タンパク質の発現が劇的に減少した (図 7、レーン 3)。AQP4 の発現減少は、MG132 処理及び bafilomycin A1 処理により復活することから、プロテアソーム及びライソゾームにおいて分解されていることが示唆された。一方、Gln<sup>271</sup> まで欠損すると AQP4 の発現が復活した (図 7、レーン 5)。さらに詳しく調べたところ、Asp<sup>314</sup> 以降の 10 残基の欠損で AQP4 タンパク質は分解を受ける一方、Val<sup>280</sup> まで欠損させると AQP4 の安定性が増加することが明らかとなった。これらのことから AQP4 の C 末端 10 残基に AQP4 の安定化に寄与するシグナルがあることが予想された。

#### ②AQP4 安定化に寄与する配列

全長 AQP4 を用いたアミノ酸置換による実験において、2つの酸性アミノ酸 Asp<sup>314</sup> 及び Glu<sup>318</sup> を Ala に置換すると AQP4 タンパク質が劇的に不安定化した (図 8、レーン 4)。一方、プロテインキナーゼ CK2 によりリン酸化されると考えられる Ser<sup>315</sup> (hAQP4 では Gln) 及び Ser<sup>316</sup> をそれぞれ Gln, Ala に置換しても影響はなかった (図 8、レーン 6)。従って AQP4 の安定化に Ser<sup>315</sup>, Ser<sup>316</sup> のリン酸化は必須ではないことがわかった。

#### ③AQP4 分解に寄与する配列

C 末端ドメインの欠損によりタンパク質が不安定化している AQP4 (Δ282-323) に対して、Tyr<sup>277</sup> を Phe に置換 (図 9、レーン 3)、もしくは Val<sup>280</sup> を Arg (図 9、レーン 4) に置換した変異体を作成したところ、AQP4 (Δ282-323) の安定性が増加した。この近傍の配列は膜タンパク質の内在化に関わるコンセンサス配列を満たしている (YXXΦ) ことから、現在は AQP4 の分解過程に内在化に関与するか否か検討中である。

④抗体刺激による内在化後の AQP4 ライソゾーム輸送に寄与する配列

前述の通り AQP4 の C 末端ドメインを AQP1 の相当する領域と置換すると、抗体刺激に伴う AQP4 の分解は起こらなくなる (図 6、中央) が、AQP4 の C 末端ドメインの Lys<sup>259</sup>-Ala<sup>270</sup> を欠損させても同様の効果が得られた (図 6、右)。このことは Lys<sup>259</sup>-Ala<sup>270</sup> に抗体による内在化後のライソゾームへの移行にはこの領域の配列が必要であることを示唆している。現在更に領域を狭めるなどシグナルの特定を進めている。

#### ⑤AQP4 の細胞膜への輸送に対する影響

AQP4 の C 末端ドメインの Gln<sup>271</sup> 以降を欠損させると AQP4 タンパク質は安定に発現する (図 7、レーン 5) が、細胞外に投与した蛍光標識した抗体が細胞内に取り込まれなかった (図

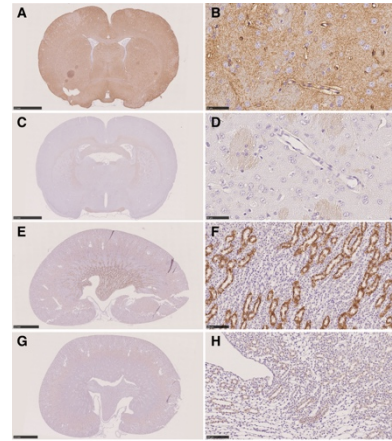


図5: AQP4ノックアウトラットにおけるAQP4の発現 (A-D) 野生型 (A, B) 及びAQP4ノックアウトラット (C, D) 脳における抗AQP4 C末端ドメイン抗体による染色。 (E-H) 野生型 (E, F) 及びAQP4ノックアウトラット (G, H) 脳における抗AQP4 C末端ドメイン抗体による染色。 Bar: 2.5 mm (A, C, E, G), 50 μm (B, D), 100 μm (F, H)

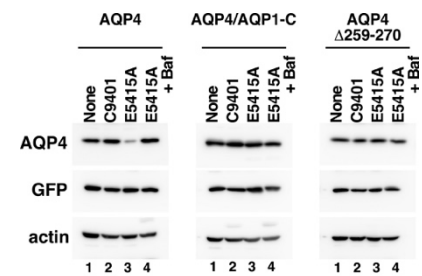


図6: AQP4内在化におけるC末端領域の役割。マウスAQP4及びその誘導体を発現したCHO細胞をマウスAQP4細胞外ドメインを認識するmAb (E5415A) もしくはヒトAQP4の細胞外ドメインを認識するが、マウスAQP4は認識しないmAb (C9401) で24時間処理後細胞タンパク質を抽出し、ウェスタンブロットングを行った。

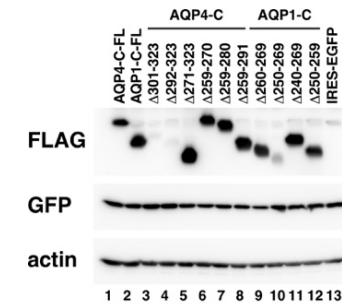


図7: AQP4C末端領域の欠損によるAQP4の安定性に対する影響。マウスAQP4及びその誘導体を発現したCHO細胞からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットングを行った。

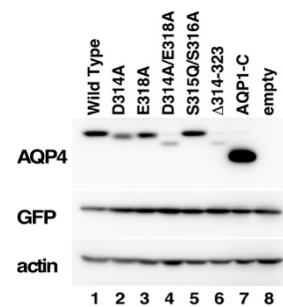


図8: AQP4安定化に寄与するシグナル。全長AQP4に対してアミノ酸置換を行い、ウェスタンブロットングによりAQP4タンパク質の発現量を確認した。

現在更に領域を狭めるなどシグナルの特定を進めている。

10、左)。細胞を固定し、AQP4のN末端に付加したFLAGに対する抗体で染色を行うと、野生型及びC末端ドメインをAQP1の相当する領域と置換したAQP4は細胞膜への発現が見られたが、AQP4のC末端ドメインのGln<sup>271</sup>以降を欠損させたAQP4 (AQP4 Δ271-323)は細胞内のコンパートメントに局在していた(図10、右)。これらのことはC末端ドメインのGln<sup>271</sup>以降の欠損が細胞膜への移行を阻害していることが示唆する。メカニズムとしては(a)C末端ドメイン中のAla<sup>270</sup>までの間に細胞内のコンパートメントに局在するシグナルがあり、それ以降の配列にそれを解除することで細胞膜への移行を促進する配列が存在する、もしくは(b)C末端ドメインのGln<sup>271</sup>以降に細胞膜への移行に必須の配列が存在する、の2通りが考えられた。これを検証するため、Gln<sup>271</sup>の前後のアミノ酸の付加・欠損によりAQP4の局在がどのような影響を受けるかをフローサイトメトリーにより解析を行った。その結果、Ala<sup>270</sup>がC末端になった時(図11A、Δ271-323)のみAQP4は細胞膜に局在できないことがわかった。この時C末端にはSKAAという配列が存在することになる。C末端にKKXXという配列が存在すると、小胞体に局在することが既に報告されている。AQP4 Δ271-323のC末端はこのコンセンサス配列を完全には満たしていないが、SKAAも小胞体に局在する可能性が考えられた。そこで幾つかのアミノ酸置換を行い、この仮説を検証した。図11Bに示すように、Lys<sup>268</sup>をAlaに置換するとAQP4 Δ271-323は細胞膜に発現した。このほかAla<sup>270</sup>をGlyに置換してもAQP4 Δ271-323は細胞膜に移行することができた。興味深いことにAla<sup>270</sup>をLeuに置換しても細胞膜へ移行しなかったことから、C末端のアミノ酸残基の脂肪族の側鎖も細胞内コンパートメントに局在するために必須であることが示唆された。これらの結果から、AQP4 Δ271-323の局在の変化はC末端にKAAという配列が存在したことによるアーチファクトであることが明らかになったが、膜タンパク質の局在を決定するシグナルを同定したことは細胞生物学的に意義のあることであると考えられる。

### ⑥今後の展望

本研究で明らかになったシグナルに変異を入れたAQP4を免疫沈降し、共沈してくるタンパク質を同定することにより、AQP4の輸送・局在・分解のメカニズムがより詳細に明らかになると期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3件)

1. Mestre H, Hablitz LM, (15名省略), Abe Y, Yasui M, (5名省略), Nedergarrd M. Aquaporin-4-dependent glymphatic solute transport in the rodent brain. *e-Life* (2018) 7, e40070 (査読あり) DOI: 10.7554/eLife.40070

2. Obata T, Kershaw J, Tachibana Y, Miyauchi T, Abe Y, (4名省略), Aoki I, Yasui M. Comparison of diffusion-weighted MRI and anti-Stokes Raman scattering (CARS)

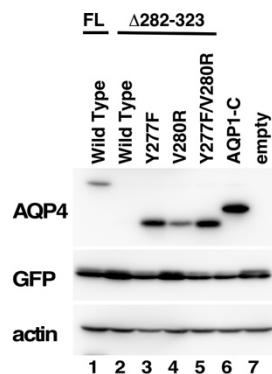


図9. AQP4分解に寄与するシグナル AQP4 (Δ282-323) に対してアミノ酸置換を行い、ウェスタンブロッティングによりAQP4タンパク質の発現量を確認した。

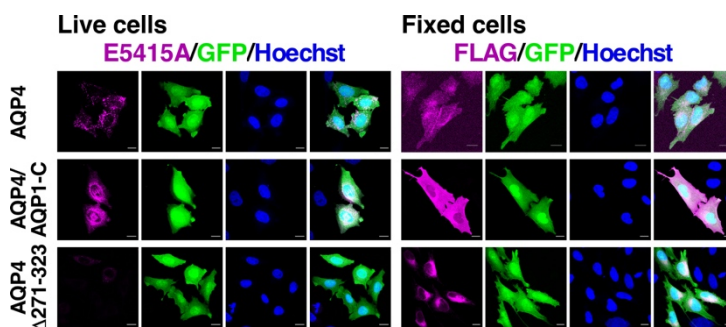


図10. AQP4の局在に対するC末端ドメインの役割 (左) FLAGタグをN末端に付加したAQP4及びその誘導体を発現させたCHO細胞に対し、Alexa Fluor 555で標識したマウスAQP4細胞外ドメインを認識するmAb (E5415A) を投与した。(右) AQP4及びその誘導体を発現させたCHO細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した後、0.1% Triton X-100で透過化し、抗FLAG抗体で染色した。

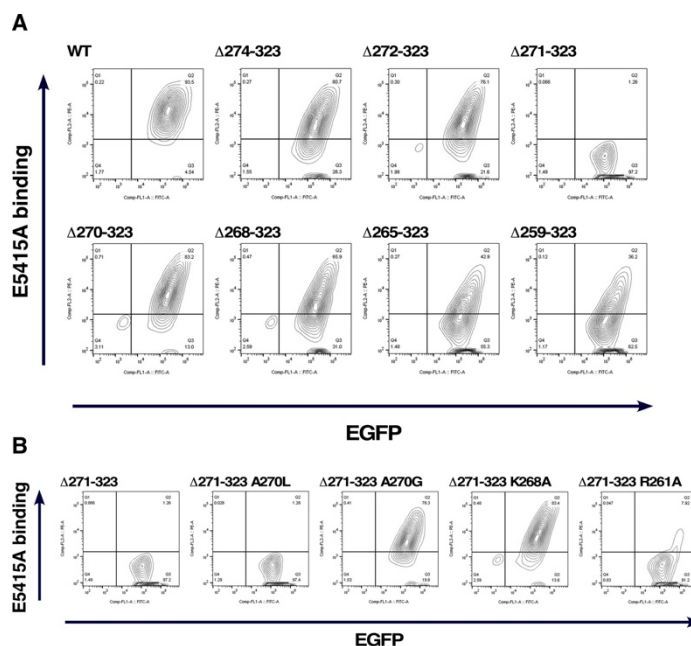


図11. AQP4の細胞内コンパートメントに局在するために必要な配列の検索 マウスAQP4及びその誘導体を発現したCHO細胞をマウスAQP4細胞外ドメインを認識するmAb (E5415A) 及びPE標識二次抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーを行った。(A) アミノ酸残基の欠損変異体による検討。(B) AQP4 Δ271-323に対して、アミノ酸置換を行ったことによるAQP4の局在に対する影響。

measurements of the inter-compartmental exchange-time of water in expression-controlled aquaporin-4 cells.

*Sci. Rep.* (2018) **8**, 17954 (査読有り) DOI:10.1038/s41598-018-36264-93.

3. Abe Y., Goda W, Ikeshima-Kataoka H, Yasui M.

Dual effect of the astrocyte-specific enhancer of the AQP4 M1 promoter.

*FEBS Lett.* (2017) **591**, 3906-3915. (査読有り) DOI: 10.1002/1873-3468.12910

〔学会発表〕 (計 4 件)

1. Abe Y., Suzuki R., Goda W., and Yasui M.

Three amino-acid sequences regulate the expression level of aquaporin-4.

The 92th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society

March 14-16, 2019

2. Abe Y., Suzuki R., Goda W., and Yasui M.

Identification of regions in the C-terminal domain of aquaporin-4 responsible for its intracellular trafficking and degradation.

The 41st Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan

November 28-30, 2018

3. Chau S.H., Abe Y., and Yasui, M.

Development of a new Neuromyelitis Optica model mice.

The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology/The 91st Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society

July 1-6, 2018

4. Abe Y., Fujii, A., Goda, W., and Yasui, M.

Roles of the C-terminal domain in intracellular trafficking and degradation of AQP4.

The 40th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan

December 6-9, 2017

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：高井 良樹

ローマ字氏名：TAKAI, Yoshiki

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：医員

研究者番号 (8 桁)：40725743

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。