

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07387

研究課題名(和文) SEREX法とFACS法を融合させた新手法による神経免疫疾患の網羅的自己抗体検索

研究課題名(英文) Comprehensive search of autoantibodies in neuroimmunological disorders using a novel hybrid SEREX-FACS method

研究代表者

森 雅裕 (Masahiro, Mori)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70345023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗AQP4抗体、抗MOG抗体陰性の視神経脊髄炎患者の血清を収集した。またbrainのcDNAライブラリーをHEK293細胞へ遺伝子導入し、患者血清と反応させ、反応細胞をセルソーターにて選択した。選択された細胞のプラスミドを抽出し、PCRで増幅してシークエンサーによりヌクレオチド配列を特定した。その結果、2つの患者血清抗体と反応する可能性があるタンパク質の遺伝子候補が抽出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、我々はSEREX法とFACS法を融合させた、世界で初めての新手法を編みだし、自己免疫が関与する神経難病であり、既存の抗体が陰性で原因が未解明である視神経脊髄炎患者血清を用いた検討を行った。結果、新規自己抗原候補のタンパクをコードする遺伝子の同定に成功した。それらが真の自己抗原か、さらなる検討が必要であるが、この方法が実際に施行でき、新規自己抗原が検出できる可能性を明確に示した点で学術的な意義は大きく、さらにこの方法が他の原因不明の多くの自己免疫疾患に応用できる可能性を秘めており、それらの疾患の治療に結びつきうる点でも意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：We have obtained sera from double seronegative (dSN) neuromyelitis optica patients without anti-aquaporin-4 antibody or anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody, and a cDNA library (plasmid DNA) constructed from human brain, which were transferred into HEK293 cells. Then, the transformed cells were reacted with sera from the dSN NMO patients. The reacted cells were collected by a Cell Sorter. Plasmid DNA was extracted from the collected cells, and amplified by PCR. Nucleotide sequences were determined with PCR-amplified DNA using an automated sequencer. After the homology screening of the identified genes within the public sequence database, and we succeeded in identification of two possible antigen genes.

研究分野：神経免疫学

キーワード：視神経脊髄炎 神経免疫疾患 自己抗体 フローサイトメトリー SEREX

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経免疫疾患患者血清、髄液中に数多くの自己抗体が発見され、その一部は病態機構に深く関与していることが証明されている。視神経脊髄炎における抗 aquaporin-4 (AQP4) 抗体が良い例になる。ただし、視神経脊髄炎でも抗 AQP4 抗体や抗 myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 抗体など既知の抗体が見つからない患者がおり、未知の抗原を認識する自己抗体が存在し病態にかかわっている可能性がある。このように多くの神経免疫疾患で自己抗体の存在が想定されるものの、一部自己抗体がみつかっていない一群が存在する疾患が数多く存在する。

2. 研究の目的

自己抗体の存在が示唆されるが、自己抗体、及びそれが認識する抗原が未解明の神経免疫疾患患者血清を用い、自己抗体の認識するエピトープを新たに見出し、ひいては病態の解明、新規治療法の開発につなげようというのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

まず、cDNA ライブラリーを Neon Transfection System を用い HEK293 細胞に導入する。cDNA ライブラリーは HEK293 細胞においてタンパク質に発現されるが、その遺伝子を組み込みタンパク質をその表面に発現した HEK293 細胞に抗 AQP4 抗体、抗 MOG 抗体両者陰性の視神経脊髄炎患者血清、髄液 IgG を反応させた後、蛍光標識した抗ヒト IgG 抗体を反応させ、フローサイトメーターで陽性細胞を同定し、回収された細胞から DNA を抽出し、PCR により cDNA 領域を増幅し、塩基配列を解析して標的抗原を同定する。

4. 研究成果

本研究の目的は、神経免疫疾患の中には自己抗体による発症機構が想定されるものの、自己抗体とその認識抗原が同定できないケースが数多く存在するため、それらの自己抗体の認識抗原を同定することであり、そのためにはまず自己抗体とその認識抗原が同定できていないが自己免疫疾患が疑われるケースの選定とそれらのケースの検体の収集が必要である。

このためにまず、抗 aquaporin-4 (AQP4) 抗体・抗 myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 抗体両者陰性視神経脊髄炎の患者血清 28例、抗 acetylcholin (ACh) 受容体抗体・抗 muscle specific kinase (MuSK) 抗体両者重症筋無力症の患者血清 18例、抗 voltage-gated potassium channel (VGKC) 抗体・抗 NMDA (N-methyl-d-aspartate) 受容体抗体陰性辺縁系脳炎 2例、抗 ガングリオシド抗体陰性ギランバレー症候群 35例、抗 neurofascin-155 (NF155) 抗体、抗 contactin-1 (CNTN1) 抗体陰性慢性炎症性脱髄性多発神経炎 20例などの血清を確保した。一部の症例については病気の急性期の髄液も確保した。また、これらの症例については性別、血清採取日、血清採取日の年齢、病型、重症度などの臨床情報もカルテなどから抽出して集めた。

ついで glioma 患者脳由来 cDNA ライブラリーおよび血管内皮細胞由来 cDNA ライブラリー、さらに市販の脳由来 cDNA ライブラリー (プラスミド DNA) を組換えるための準備として internal ribosome entry site (IRES) ベクターを入手した。

本研究の最終ゴールである「SEREX法とFACS法を融合させた新手法による神経免疫疾患の網羅的自己抗体検索」に向けて、理化学研究所のバイオリソース研究センター遺伝子材料開発室よ

りbrainのcDNAライブラリー（プラスミド）を入手した。大腸菌内に挿入された状態であり、LB培地にて大腸菌ごとcDNA量を増やしたのち、cDNA抽出キットにてcDNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動にてcDNAサイズを確認した。cDNAは特定のサイズの部位のみにあつまることなく幅広いサイズの領域に集まっていることを確認した。今後cDNAライブラリーをエレクトロポレーション法により、HEK293細胞に挿入し、neomycin耐性遺伝子を利用し、G418を用いて細胞選択をする予定である。そのため、様々な濃度のG418でHEK293細胞の選択能を確かめ、細胞選択に適したG418濃度を求めた。

また、これまでに作成した患者リストより抗aquaporin-4 (AQP4) 抗体・抗myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 抗体両者陰性視神経脊髄炎の患者の性別、血清採取日、血清採取日の年齢、病型、重症度、再発頻度などの臨床情報をまとめた。さらにserological identification of antigens by recombinant expression cloning (SEREX) 法を行うための患者検体を選ぶために、抗体陰性の視神経脊髄炎の中でも再発頻度が高いなど、自己免疫性の機序・自己抗体の存在が強く疑われる患者を抽出し、自己抗体が多く含まれると予想される再発時の急性期血清・髄液検体をまとめた。

その中で、さらに免疫抑制剤による維持療法が無い2名の急性期血清を選択した。上記のcDNAライブラリーをHEK293細胞へエレクトロポレーション法で導入したのちに抗生剤G418を用いて導入細胞を選択し、その後、上記患者血清と蛍光標識抗体で抗原抗体反応のある細胞を標識し、FACS AREAにて細胞を選択した。選択した細胞のプラスミドを抽出し、PCRで導入したcDNAのライブラリー部分を増幅してシークエンサーによりヌクレオチド配列を特定した。その結果、1名からは候補遺伝子が抽出できなかったが、もう1名からは2つの患者血清抗体と反応する可能性があるタンパク質の遺伝子候補と1つの抗原抗体反応を間接的に促進させる可能性があるマイクロRNA候補が抽出された。遺伝子から新規自己抗体・抗原検索を行うSEREX法とFACS法を組み合わせる新規の自己抗体検索法により、抗体陰性視神経脊髄炎の病態に影響を与える可能性がある遺伝子が抽出できることを確認できた意義は大きい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sugimoto K, Mori M, Liu J, Tanaka S, Kaneko K, Oji S, Takahashi T, Uzawa A, Uchida T, Masuda H, Ohtani R, Nomura K, Hiwasa T, Kuwabara S.	4. 巻 336
2. 論文標題 The accuracy of flow cytometric cell-based assay to detect anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) antibodies determining the optimal method for positivity judgement.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neuroimmunol.	6. 最初と最後の頁 577021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2019.577021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Liu J, Mori M, Sugimoto K, Uzawa A, Masuda H, Uchida T, Ohtani R, Kuwabara S.	4. 巻 91
2. 論文標題 Peripheral blood helper T cell profiles and their clinical relevance in MOG-IgG-associated and AQP4-IgG-associated disorders and MS.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurol Neurosurg Psychiatry.	6. 最初と最後の頁 132-139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jnnp-2019-321988.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Borisow Nadja, Mori Masahiro, Kuwabara Satoshi, Scheel Michael, Paul Friedemann	4. 巻 9
2. 論文標題 Diagnosis and Treatment of NMO Spectrum Disorder and MOG-Encephalomyelitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 888 ~ 888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2018.00888	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sugimoto Kazuo, Hiwasa Takaki, Shibuya Kazutomo, Hirano Shigeki, Beppu Minako, Iose Sagiri, Arai Kimihito, Takiguchi Masaki, Kuwabara Satoshi, Mori Masahiro	4. 巻 325
2. 論文標題 Novel autoantibodies against the proteasome subunit PSMA7 in amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 54 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2018.09.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuwabara Satoshi、Misawa Sonoko、Mori Masahiro	4. 巻 90
2. 論文標題 Atypical chronic inflammatory demyelinating polyneuropathies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry	6. 最初と最後の頁 121 ~ 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jnnp-2018-319411	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uzawa Akiyuki、Mori Masahiro、Kuwabara Satoshi	4. 巻 89
2. 論文標題 MOG antibody disorders and AQP4 antibody NMO spectrum disorders share a common immunopathogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry	6. 最初と最後の頁 900 ~ 900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jnnp-2018-318231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuwabara Satoshi、Misawa Sonoko、Mori Masahiro、Iwai Yuta、Ochi Kazuhide、Suzuki Hidekazu、Nodera Hiroyuki、Tamaoka Akira、Iijima Masahiro、Toda Tatsushi、Yoshikawa Hiroo、Kanda Takashi、Sakamoto Ko、Kusunoki Susumu、Sobue Gen、Kaji Ryuji、on behalf of the Glovenin-I MMN Study Group	4. 巻 23
2. 論文標題 Intravenous immunoglobulin for maintenance treatment of multifocal motor neuropathy: A multi-center, open-label, 52-week phase 3 trial	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the Peripheral Nervous System	6. 最初と最後の頁 115 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jns.12268	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoyama Shinji、Mori Masahiro、Uzawa Akiyuki、Uchida Tomohiko、Masuda Hiroki、Ohtani Ryohei、Kuwabara Satoshi	4. 巻 265
2. 論文標題 Serum anti-JCV antibody indexes in Japanese patients with multiple sclerosis: elevations along with fingolimod treatment duration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurology	6. 最初と最後の頁 1145 ~ 1150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00415-018-8813-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uzawa A., Mori M., Masuda H., Ohtani R., Uchida T., Kuwabara S.	4. 巻 193
2. 論文標題 Recombinant thrombomodulin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing high mobility group box 1 and inflammatory cytokines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 47 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cei.13123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori Masahiro, Kuwabara Satoshi, Paul Friedemann	4. 巻 89
2. 論文標題 Worldwide prevalence of neuromyelitis optica spectrum disorders	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry	6. 最初と最後の頁 555 ~ 556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jnnp-2017-317566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	鶴沢 顕之 (Akiyuki Uzawa) (10533317)	千葉大学・医学部附属病院・助教 (12501)	
研究分担者	八木 良二 (Ryouji Yagi) (20392152)	千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授 (12501)	
研究分担者	日和佐 隆樹 (Takaki Hiwasa) (30260251)	千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授 (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	星野 忠次 (Tyuji Hoshino) (90257220)	千葉大学・大学院薬学研究院・准教授 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関