

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：H21~H22

課題番号：21790842

研究課題名 (和文) 細菌由来アクアポリンによる抗 AQP4 抗体の誘導と動物モデルでの抗体作用機序の解析

研究課題名 (英文) A mechanisms of composing anti-aquaporin-4 antibody and the association with bacterial infection.

研究代表者

松下拓也 (Takuya Matsushita)

研究者番号：00533001

研究成果の概要 (和文) : 多発性硬化症, 視神経脊髄炎の臨床像, とくに特異的とされる抗アクアポリン 4 (AQP4) 抗体産生に対して, 感染状況, 遺伝学的背景, サイトカインプロファイルが与える影響を明らかにした。抗 AQP4 抗体陽性例では, ピロリ菌感染率が抗 AQP4 抗体陰性の通常型 MS より有意に高く, 抗 NAP 抗体価は障害度と有意な正相関があり, 抗 NAP 抗体陽性例では好中球の産生するミエロペルオキシダーゼ活性が抗 NAP 抗体陰性例より有意に高かった。遺伝学的背景については抗 AQP4 抗体陽性例では, *HLA-DPB1*0501* の頻度が健常対照より有意に高く, *HLA-DRB1* のなかでは *HLA-DRB1*12* が疾患感受性遺伝子アリルとなっていた。遺伝子相互作用に関しては, *HLA-DRB1*09/15* は抗 AQP4 抗体陰性多発性硬化症のリスクを下げるとともに, *HLA-DRB1*12/15* は抗 AQP4 抗体陽性 MS のリスクを増大させた。またサイトカインプロファイルについては視神経脊髄炎群では多発性硬化症群と比較して IL-6, IL-8, IL-17, IP-10 が有意に高かった。また IL-6, IL-8, GCSF は採取時の EDSS, 髄液中の好中球数と正の相関が見られ, IL-8 と GCSF は脊髄の最大病変長との関連が見られた。

研究成果の概要 (英文) : We revealed influences of infectious status, genetic background and cytokine/chemokine profile on multiple sclerosis (MS) and neuromyelitis optica (NMO), especially on the production of anti aquaporin-4 (AQP4) antibody. *Helicobacter pylori* infection was more common in patients with anti-AQP4 antibody than in patients with conventional MS. Anti-NAP antibody titer positively correlated with the severity of neurological disability and patients with anti-NAP antibody had higher activity of myeloperoxidase than patients without the antibody. A frequency of *HLA-DPB1*0501* was higher in patients with anti-AQP4 antibody than in healthy controls. Among *HLA-DRB1* genotypes, *HLA-DRB1*12* increased the risk of anti-AQP4 antibody-positivity. Individuals with *HLA-DRB1*09/15* decreased the risk of anti-AQP4 antibody-negative MS, while those with *HLA-DRB1*12/15* increased the risk of anti-AQP4 antibody-positivity. Patients with NMO had a higher concentration of IL-6, 8, 17, and IP-10 in CSF than patients with MS had. The value of IL-6, 8, and GCSF positively correlated with EDSS at sample collection, neutrophil count in CSF, and the value of IL-8 and GCSF had a positive correlation with the length of spinal cord lesions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成 22 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：ライフサイエンス（共通基礎研究）

科研費の分科・細目：医歯薬学分野・神経内科学・神経病態免疫学

キーワード：多発性硬化症，視神経脊髄炎，アクアポリン 4，細菌

1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica, NMO) に特異性の高い自己抗体として，抗 aquaporin-4 (AQP4) 抗体が発見された。AQP4 はアストロサイトのフットプロセスに存在する水チャネルであることから，NMO ではアストロサイトの障害が一次的で脱髄は二次的とする説が提唱されているが，抗 AQP4 抗体の産生機序は全く不明である。また，本抗体は，*in vitro* では培養アストロサイトを障害することが最近報告されているが，*in vivo* での作用機序は明らかになっていない。

2. 研究の目的

抗 AQP4 抗体産生の背景にあるサイトカインバランスと，それに影響を与えるような宿主の感染状態，遺伝的背景がどのように NMO の病態に関連するかを明らかにする。

3. 研究の方法

多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS)，視神経脊髄炎 (NMO) を中心とした中枢神経脱髄性疾患患者の血清を対象に，ヒト AQP4 を発現させた HEK293 細胞と反応する IgG 抗体を間接的蛍光免疫法にて確認した。抗 AQP4 抗体陽性例，陰性例のヘリコバクター・ピロリ菌の抗体陽性率と，ピロリ菌の産生する neutrophil activating protein (NAP) に対する抗体陽性率を検討し，その臨床像・画像的特徴との関連を統計学的に解析した。

また遺伝的背景の特徴を明らかにするため，対象患者の *HLA-DRB1* および *DPB1* の genotyping を行い，抗 AQP4 抗体産生のリスクファクターとしての関与を統計学的手法を用いて解析した。

抗 AQP4 抗体の測定結果を元に診断を確定した NMO (および NMO spectrum disorders, NMOSD)，MS, Primary progressive MS (PPMS)，非炎症性神経疾患患者 (OND) の脳脊髄液を用いて蛍光ビーズサスペンションアレイ法により 27 種のサイトカイン/ケモカインを同時測定し，疾患毎の特徴を解析した。

4. 研究成果

(1) 抗 AQP4 抗体陽性例は，ピロリ菌感染率が抗 AQP4 抗体陰性の通常型 MS (CMS) より有意に高かった。さらに，抗 AQP4 抗体陽性であれば，抗 AQP4 抗体陰性であれば，視神経脊髄型 MS では抗 NAP 抗体陽性率が健常者より有意に高かった。抗 AQP4 抗体陽性例では，抗

NAP 抗体価と Kurtzke 総合障害度スケールスコアが有意な正相関を示し，抗 NAP 抗体陽性例では好中球の産生するミエロペルオキシダーゼ活性が抗 NAP 抗体陰性例より有意に高かった。したがって，ピロリ菌は抗 AQP4 抗体の有無に関わらず OSMS の発現に寄与する一方，抗 AQP4 抗体陰性 CMS ではピロリ菌感染は疾患抵抗性に働くことが示唆された。ピロリ菌の産生する NAP には好中球の活性化作用があり，OSMS では脊髄病巣に好中球が浸潤し組織破壊に寄与していると考えられるので，NAP に暴露されることで OSMS の病像の悪化につながると推測された。このような変化は抗 AQP4 抗体陽性例でより顕著と考えられる。

(2) 抗 AQP4 抗体陽性例では，*HLA-DPB1*0501* の頻度が健常対照より有意に高いことを明らかにした。このことは，視神経脊髄型 MS の疾患感受性遺伝子アリルである *HLA-DPB1*0501* が抗 AQP4 抗体出現のリスクファクターであることを示唆している。また *HLA-DRB1* アリルの相互作用と抗 AQP4 抗体陰性・陽性 MS との関連について検討した。抗 AQP4 抗体陰性 MS では，*HLA-DRB1*09* と *HLA-DRB1*01* が疾患抵抗性遺伝子アリルとして作用していた。他方，抗 AQP4 抗体陽性例では *HLA-DRB1*12* が疾患感受性遺伝子アリルとなっていた。遺伝子相互作用に関しては，*HLA-DRB1*09/15* は抗 AQP4 抗体陰性 MS のリスクを下げる一方，*HLA-DRB1*12/15* は抗 AQP4 抗体陽性 MS のリスクを増大させた。すなわち，*HLA-DRB1*09* の抗 AQP4 抗体陰性 MS のリスク低減作用は，*HLA-DRB1*15* との相互作用によっており，*HLA-DRB1*12* の抗 AQP4 抗体陽性 MS のリスク増大作用は，*HLA-DRB1*15* との相互作用によっていることが判明した。*HLA-DRB1*15* は異なる *HLA-DRB1* アリルとの遺伝子間相互作用により，抗 AQP4 抗体陽性と陰性の MS のリスクに異なる作用を及ぼしていることが示唆された。

(3) NMO/NMOSD 21 例 (そのうち再発 17 例)，MS 26 例 (そのうち再発 13 例)，PPMS 9 例，OND 18 例の髄液が利用可能であった。再発期で比較すると NMO/NMOSD 群は MS 群と比較して IL-6，IL-8，IL-17，IP-10 が有意に高かった。また IL-6，IL-8，GCSF は採取時の EDSS，髄液中の好中球数と正の相関が見られ，IL-8 と GCSF は脊髄の最大病変長との関連が見られた。抗 AQP4 抗体が陽性の NMO/NMOSD では好中球を遊走させる IL-8，GCSF により脊髄

障害が惹起され、その背景に自己免疫応答との関連が指摘されている IL-17 系の影響があると考えられた。

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 16 件)

1. Doi H, Matsushita T, Isobe N, Matsuoka T, Minohara M, Ochi H, Kira J: Hypercomplementemia at relapse in patients with anti-aquaporin-4 antibody. *Multiple Sclerosis* 15: 304-310, 2009.
2. Matsushita T, Matsuoka T, Isobe N, Kawamura Y, Minohara M, Shi N, Nishimura Y, Ochi H, Kira J: Association of the HLA-DPB1*0501 allele with anti-aquaporin-4 antibody positivity in Japanese patients with idiopathic central nervous system demyelinating disorders. *Tissue Antigens* 73: 171-176, 2009.
3. Doi H, Matsushita T, Isobe N, Ishizu T, Ohyagi Y, Kira J: Frequency of chronic headaches in Japanese patients with multiple sclerosis: with special reference to optospinal and conventional forms of multiple sclerosis. *Headache* 49: 1513-1520, 2009.
4. Matsushita T, Isobe N, Matsuoka T, Shi N, Kawano Y, Wu X-M, Yoshiura T, Nakao Y, Ishizu T, Kira J: Aquaporin-4 autoimmune syndrome and anti-aquaporin-4 antibody-negative optospinal multiple sclerosis in Japanese. *Multiple Sclerosis* 15: 834-847, 2009.
5. Watanabe A*, Matsushita T*, Doi H, Matsuoka T, Shigetou H, Isobe N, Kawano Y, Tobimatsu S, Kira J: Multimodality evoked potential study of anti-aquaporin-4 antibody-positive and -negative multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 281: 34-40, 2009. *Both authors contributed equally.
6. Matsushita T, Isobe N, Matsuoka T, Ishizu T, Kawano Y, Yoshiura T, Ohyagi Y, Kira J: Extensive vasogenic edema of anti-aquaporin-4 antibody-related brain lesions. *Multiple Sclerosis* 15: 1113-1117, 2009.
7. Li W, Minohara M, Piao H, Matsushita T, Masaki K, Matsuoka T, Isobe N, Su JJ, Ohyagi Y, Kira J: Association of anti-Helicobacter pylori neutrophil-activating protein antibody response with anti-aquaporin-4 autoimmunity in Japanese patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Multiple Sclerosis* 15: 1411-1421, 2009.
8. Kihara Y, Matsushita T, Kita Y, Uematsu S, Akira S, Kira J, Ishii S, Shimizu T: Targeted lipidomics reveals mPGES-1-PGE2 as a therapeutic target for multiple sclerosis. *Proc Nat Acad Sci USA* 106: 21807-21812, 2009.
9. Okada K, Matsushita T, Kira J, Tsuji S: B-cell activating factor of the TNF family is up-regulated in neuromyelitis optica. *Neurology* 74: 177-178, 2010.
10. Piao H*, Minohara M*, Kawamura N, Li W, Mizunoe Y, Umehara F, Goto Y, Kusunoki S, Matsushita T, Ikenaka K, Maejima T, Nabekura J, Yamasaki R, Kira J: Induction of paranodal myelin detachment and sodium channel loss in vivo by Campylobacter jejuni DNA-binding protein from starved cells (C-Dps) in myelinated nerve fibers. *J Neurol Sci* 288: 54-62, 2010. *Both authors contributed equally.
11. Qiu W, Wu JS, Zhang MN, Matsushita T, Kira J, Carroll WM, Mastaglia L, Kermode AG: Longitudinally extensive myelopathy in Caucasians: a West Australian study of 26 cases from the Perth Demyelinating Diseases Database. *J Neurol Neurosurgery Psychiatry* 81: 209-212, 2010.
12. Matsushita T, Isobe N, Piao H, Matsuoka T, Ishizu T, Doi H, Masaki K, Yoshimura T, Yamasaki R, Ohyagi Y, Kira J: Reappraisal of brain MRI features in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica according to anti-aquaporin-4 antibody status. *J Neurol Sci* 291: 37-43, 2010.
13. Hagiwara K, Okamoto T, Shigetou H, Ogata K, Somehara Y, Matsushita T, Kira J, Tobimatsu S: Oscillatory gamma synchronization binds the primary and secondary somatosensory areas in humans. *Neuroimage* 51: 412-420, 2010.
14. Isobe N, Matsushita T, Yamasaki R, Ramagopalan SV, Kawano Y, Nishimura Y, Ebers GC, Kira J: Influence of HLA-DRB1 alleles on the susceptibility and

resistance to multiple sclerosis in Japanese patients with respect to anti-aquaporin 4 antibody status. Multiple Sclerosis 16: 147-155, 2010.

15. Matsushita T, Isobe N, Kawajiri M, Mogi M, Tsukada K, Horiuchi M, Yamasaki R, Ohyagi Y, Kira J: CSF angiotensin II and angiotensin-converting enzyme levels in anti-aquaporin-4 autoimmunity. J Neurol Sci 295: 41-45, 2010.
16. Yoshimura S, Ochi H, Isobe N, Matsushita T, Motomura K, Matsuoka T, Minohara M, Kira J: Altered production of brain-derived neurotrophic factor by peripheral blood immune cells in multiple sclerosis. Multiple Sclerosis 16: 1178-1188, 2010.

[学会発表] (計 28 件)

1. Matsushita T, Matsuoka T, Tanaka M, Shi N, Suzuki S, Iwaki T, Kira J: Anti-AQP4 autoimmunity-related and -unrelated opticospinal multiple sclerosis in Japanese. World Congress of Neurology 2009. 10. 29 Thailand.
2. Isobe N, Matsushita T, Yamasaki R, Ramagopalan S.V., Kawano Y, Nishimura Y, Ebers G.C., Kira J: The influence of HLA-DRB1 alleles on the susceptibility and resistance to multiple sclerosis with respect to the criteria of neuromyelitis optica. PACTRIMS 2009. 11. 20~21 香港.
3. Matsushita T, Matsuoka T: Pathological heterogeneity and T cell participation in the neuromyelitis optica/opticospinal form of MS. PACTRIMS 2009. 11. 20~21 香港.
4. Matsushita T, Masaki K, Minohara M, Isobe N, Kawano Y, Yamasaki R, Nishimura N, Kira J: T cell reactivities to major myelin protein-derived peptides in anti-aquaporin-4 antibody-positive and -negative patients with multiple sclerosis. PACTRIMS 2009. 11. 20~21 香港.
5. 土井光, 松下拓也, 立石貴久, 磯部紀子, 大八木保政, 吉良潤一: 多発性硬化症に合併する慢性頭痛患者の髄液中サイトカイン分析. 2009 年度頭痛学会総会 2009. 11. 28 埼玉.

6. 土井光, 松下拓也, 河村信利, 吉良潤一: 神経性疼痛・片頭痛特異的 髄液分子マーカーの同定. 九州大学 P&P 研究会 2010. 2. 19 福岡.
7. 磯部紀子, 松下拓也, 松岡健, 米川智, 真崎勝久, Ramagopalan SV, Ebers GC, 西村泰治, 吉良潤一: Non-NMO MS と NMO における HLA-DRB1 アリル間の epistatic interaction 解析. 第 22 回日本神経免疫学会学術集会 2010. 3. 17 東京.
8. 松下拓也, 真崎勝久, 米川智, 磯部紀子, 松岡健, 吉良潤一: 中枢神経障害を有するシェーグレン症候群と抗 aquaporin-4 (AQP4) 抗体. 第 22 回日本神経免疫学会学術集会 2010. 3. 17 東京.
9. 真崎勝久, 三野原元澄, 米川智, 磯部紀子, 松下拓也, 吉良潤一: 中枢神経系における CLDN1 の発現と脱髄疾患への関与. 第 22 回日本神経免疫学会学術集会 2010. 3. 17 東京.
10. 土井光, 松下拓也, 立石貴久, 磯部紀子, 大八木保政, 吉良潤一: 多発性硬化症に対するインターフェロン β 導入による脳脊髄液サイトカインへの影響. 第 22 回日本神経免疫学会学術集会 2010. 3. 17 東京.
11. 磯部紀子, 松下拓也, 松岡健, 米川智, 真崎勝久, Ramagopalan SV, Ebers GC, 西村泰治, 吉良潤一: Non-NMO MS と NMO における HLA-DRB1 アリル間の epistatic interaction 解析. 第 51 回日本神経学会総会 2010. 5. 20~22 東京.
12. 松下拓也, 磯部紀子, 松岡健, 真崎勝久, 米川智, 吉良潤一: 頭部病巣の有無による視神経脊髄炎の臨床的特徴の比較. 第 51 回日本神経学会総会 2010. 5. 20~22 東京.
13. 真崎勝久, 三野原元澄, 米川智, 磯部紀子, 松下拓也, 吉良潤一: 脱髄疾患における CLDN1 の病理学的検討. 第 51 回日本神経学会総会 2010. 5. 20~22 東京.
14. 米川智, 真崎勝久, 磯部紀子, 松下拓也, 吉良潤一: アクアポリン 4 M1, M23 各イソフォームに対する NMO 及び MS 患者血清の反応性の検討. 第 51 回日本神経学会総会 2010. 5. 20~22 東京.
15. 土井光, 松下拓也, 立石貴久, 磯部紀子,

- 大八木保政, 吉良潤一 : MS および NMO における脳脊髄液サイトカインの解析および IFN β による影響. 第 51 回日本神経学会総会 2010. 5. 20~22 東京.
16. Matsushita T, Isobe N, Yonekawa T, Shi N, Tateishi T, Kira J : Cytokine/chemokine profile of Japanese multiple sclerosis and neuromyelitis optica patients with or without anti-AQP4 antibody. 第 14 回国際免疫学会議 2010. 8. 22~27 神戸.
 17. Yoshimura S, Ochi H, Isobe N, Matsushita T, Motomura K, Minohara M, Kira J : Altered production of brain-derived neurotrophic factor by peripheral blood immune cells in multiple sclerosis. 第 14 回国際免疫学会議 2010. 8. 22~27 神戸.
 18. Isobe N, Matsushita T, Yamasaki R, Ramagopalan S.V., Kawano Y, Nishimura Y, Ebers G.C., Kira J : The influence of HLA-DRB1 alleles on the susceptibility and resistance to multiple sclerosis with respect to the criteria of neuromyelitis optica (口演). 第 14 回国際免疫学会議 2010. 8. 22~27 神戸.
 19. Isobe N, Matsushita T, Yamasaki R, Ramagopalan S.V., Kawano Y, Nishimura Y, Ebers G.C., Kira J : The influence of HLA-DRB1 alleles on the susceptibility and resistance to multiple sclerosis with respect to the criteria of neuromyelitis optica (ポスター). 第 14 回国際免疫学会議 2010. 8. 22~27 神戸.
 20. Masaki K, Matsuoka T, Suzuki SO, Wu XM, Zhang KN, Yonekawa T, Isobe N, Ordinario AT, Tabira T, Iwaki T, Matsushita T, Kira J : Extensive Aquaporin-4 (AQP4) Loss In Baló's Concentric Sclerosis In The Absence Of Anti-AQP4 Antibody (口演). PACTRIMS 2010. 8. 26~28 Indonesia.
 21. Masaki K, Matsuoka T, Suzuki SO, Wu XM, Zhang KN, Yonekawa T, Isobe N, Ordinario AT, Tabira T, Iwaki T, Matsushita T, Kira J : Extensive Aquaporin-4 (AQP4) Loss in Baló's Concentric Sclerosis in The Absence of Anti-AQP4 Antibody. PACTRIMS 2010. 8. 26~28 Indonesia.
 22. Doi H, Zong SY, Matsushita T, Isobe N, Yonekawa T, Masaki K, Kira J : P-15: Cytokine and T helper cell profiles in Multiple Sclerosis. PACTRIMS 2010. 8. 26~28 Indonesia.
 23. Isobe N, Yonekawa T, Matsushita T, Kawano Y, Masaki K, Chen S, Smith B R, Kira J : Usefulness of flowcytometry and enzyme-linked immunosorbent assay for detecting anti-aquaporin-4 antibody. 135th Annual Meeting of American Neurological Association 2010. 9. 12~15 San Francisco.
 24. Matsushita T, Isobe N, Kawajiri M, Mogi M, Tsukuda K, Horiuchi M, Kira J : CSF angiotensin II and angiotensin-converting enzyme levels in anti-aquaporin-4 autoimmunity. ECTRIMS 2010. 10. 13~16 スウェーデン.
 25. Kira J, Matsuoka T, Suzuki SO, Yonekawa T, Masaki K, Tabira T, Iwaki T, Wu XM, Matsushita T : Extensive Aquaporin-4 Loss in Baló's Concentric Sclerosis: Anti-Aquaporin-4 (AQP4) Antibody-Independent Astrocytopathy in Baló's Concentric Sclerosis. ECTRIMS 2010. 10. 13~16 スウェーデン.
 26. Isobe N, Fang L, Yoshimura S, Yonekawa T, Matsushita T, Masaki K, Doi H, Kira J : Interleukin-7 receptor alpha gene polymorphism influences multiple sclerosis risks in Asians. ECTRIMS 2010. 10. 13~16 スウェーデン.
 27. 土井光, 松下拓也, 河村信利, 吉良潤一 : 神経障害性疼痛・片頭痛特異的髄液分子マーカーの同定. 第 6 回「九大痛みの研究会」 2011. 2. 3 福岡.
 28. 松下拓也, 河村信利, 立石貴久, 吉良潤一 : 多発性硬化症・視神経脊髄炎におけるサイトカイン/ケモカイン動態. 福岡臨床免疫研究会 2011. 2. 19 福岡.
- [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]

特になし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下拓也 (Takuya Matsushita)

研究者番号 : 00533001

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し