

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07412

研究課題名(和文)細胞外小胞の臓器特異性に着目した視神経脊髄炎関連疾患の再発予測の確立

研究課題名(英文) Establishment of relapse prediction of neuromyelitis optica spectrum disorders focusing on organ specificity of extracellular vesicles

研究代表者

佐治 越爾 (SAJI, Etsuji)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：00706418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：視神経脊髄炎関連疾患(NMOSD)はアストロサイトに発現するアクアポリン4水チャネルに対する自己抗体が陽性となる中枢神経系自己免疫疾患である。本研究では、NMOSD患者特有のエクソソームを明らかにすることはできなかったが、病理解析によりNMOの初期・早期活動性病変に活性化好中球、IL-17を分泌するT細胞が集積しており、これらの細胞群がNMO病変拡大に関与していることを明らかにした。また、組織常在性記憶T細胞が細胞傷害性顆粒を発現することで活動性病変を引き起こし、FOXP3陽性調節性T細胞が病巣を鎮静化させていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視神経脊髄炎関連疾患において、病変のステージによって、活性化好中球、IL-17産生T細胞、細胞傷害性顆粒を発現した組織常在性記憶T細胞の集積が炎症の増幅と病変の拡大に関与することを見出した。また、炎症を制御するFOXP3陽性調節性T細胞が病巣を鎮静化させることを明らかにした。これらの細胞群を制御するエクソソームを含む血液バイオマーカーを明らかにしていくことで、個々の患者の再発の予兆をとらえ、より適切な治療選択につなげることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD) is an autoimmune CNS disease with autoantibodies against aquaporin 4 water channels expressed on astrocytes. The present study did not identify specific exosomes in the patients with NMOSD. Neuropathological analysis revealed that activated neutrophils and IL-17-secreting T cells accumulate in the early and early active lesions of NMO, and these cells are involved in NMO lesion expansion. We also found that tissue-resident memory T cells cause active lesions by expressing cytotoxic granules, and that FOXP3-positive regulatory T cells suppress inflammation.

研究分野：神経免疫学

キーワード：視神経脊髄炎 細胞外小胞 エクソソーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 視神経脊髄炎関連疾患 (NMOSD) は中枢神経系自己免疫疾患の代表的疾患である。視神経脊髄炎患者の血清においてアストロサイトに発現するアクアポリン 4 (aquaporin 4; AQP4) 水チャネルに対する自己抗体が発見されたことで、NMOSD は自己免疫性アストロサイトパチーとして、多発性硬化症とは異なる疾患として分離独立している [1]。

(2) AQP4 抗体による補体介在性アストロサイト障害が NMO の病態機序の中核をなしているが、その一方で、発症 10 年以上前の血清で AQP4 抗体陽性であった症例の存在や、動物モデルにおいて AQP4 抗体と補体の末梢への投与のみでは中枢神経病変を形成しないことが報告されている [2, 3]。これらは、血清中の AQP4 抗体の存在は NMO 発症に必要な条件ではあるが、自己抗体が中枢神経系内へ流入するために血液脳関門 (Blood brain barrier; BBB) を破綻させるもう一つのステップを必要とすることを意味している。上述した液性因子以外に、NMO 病変局所および髄膜には T 細胞に加え、マクロファージ、好酸球、好中球などの自然免疫細胞が多数浸潤しており、さらにミクログリアが活性化している [4]。これらの活性化した T 細胞や自然免疫細胞群が産生する臓器特異性を持った何らかの因子が BBB を破綻させることが推測される。

(3) NMOSD では再発予防薬として副腎皮質ステロイドホルモンや免疫抑制剤が主に用いられているが、ステロイドによる副作用や完全に発作を抑制できない症例が存在している。近年、補体 C5、IL-6 受容体、CD19 に対するモノクローナル抗体薬の有効性が示された [5-7]。これらの新規薬剤は高い有効性を示す一方、高額であるという問題点がある。個別化医療を実現するために、個々の患者の再発リスクや治療反応性を予測するバイオマーカーが求められている。

2. 研究の目的

(1) 細胞外小胞 (Extracellular vesicles; EV) は脂質二重膜に囲まれたナノサイズの小胞で、内部に核酸 (RNA, DNA) や蛋白質を含んでいる [8]。細胞外小胞は産生機構の違いよりエクソソーム、微小小胞体、アポトーシス小体に分けられる。あらゆる細胞が EV を分泌するとされ、離れた細胞へ輸送されることで重要な細胞間情報伝達ツールとしての役割が明らかとなっている。特にがん細胞由来のエクソソームは悪性化、転移、血管新生などに関与しており、診断や治療に活用することが期待されている。また、免疫系では抗原提示細胞から分泌されたエクソソーム上には peptide-MHC 複合体などの様々な活性化分子が含まれており、遠く離れた細胞まで運ばれ、T 細胞を活性化しうることが示されている [9]。MS のモデル動物 EAE においても、脳の血管内皮細胞由来細胞外小胞は神経抗原反応性 T 細胞を活性化させ、脳における自己免疫病態のトリガーとなり得ることが明らかにされている。また、細胞外小胞には細胞接着分子であるインテグリンに加え、生体において細胞の局在を制御しているケモカインが存在しており、これらの分子が中枢神経指向性を規定している可能性がある [10]。

(2) 本研究では細胞間コミュニケーションツールとしての細胞外小胞の臓器特異性に着目して疾患活動性・治療反応性に関わる分子マーカーを探索し、視神経脊髄炎関連疾患の病態を規定する因子を解明し、個別化医療の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 末梢血における細胞外小胞の解析

ヒト血清検体よりホスファチジルセリン (PS) 特異的に結合する Tim4 タンパク質と磁気ビーズを利用した PS アフィニティ法により細胞外小胞を単離する。細胞外小胞のマーカー分子を用いて、単離した細胞外小胞をフローサイトメトリーで検出系を確立する。続いて、末梢血単核球を刺激した培養上清からの細胞外小胞の検出し、フローサイトメトリーを用いて細胞外小胞の産生細胞起源の同定を試みるとともに、細胞外小胞の臓器特異性を規定しうる分子を探索する。

(2) 剖検組織を用いて病理学的解析

剖検組織における細胞外小胞由来のバイオマーカーの下流のシグナル変化を確認する：臓器特異性細胞外小胞に含まれるバイオマーカーによる剖検組織で変化を免疫組織学的染色で解析する。

4. 研究成果

(1) 末梢血における細胞外小胞の解析

ヒト血清検体より PS アフィニティ法により細胞外小胞を単離した。細胞外小胞のマーカー分

子である CD63 抗体および CD81 抗体を用いて、単離した細胞外小胞をフローサイトメトリーで検出できることを確認した。PS アフィニティ法で単離した細胞外小胞を細胞外小胞のマーカー分子である CD63 抗体もしくは CD81 抗体と産生細胞のマーカー分子との二重染色を行い、細胞外小胞の産生細胞を同定することを試みたが、同定するに至らなかった。

(2) 剖検組織を用いた病理学的解析

剖検組織における細胞外小胞由来のバイオマーカーの下流のシグナル変化を確認する予定であったが、血液検体での同定に至らなかったことから、剖検組織において病変を拡大させる免疫細胞の動態を解析した。視神経脊髄炎の初期・早期活動性病変において、細胞外 DNA トラップ (NETs) を示唆するシトルリン化ヒストンを持つ活性化好中球、IL-17 を産生する T 細胞が集積していた。これら NETs を示唆するシトルリン化ヒストン陽性シグナル数および IL-17 を産生する T 細胞数は NMO の病変の大きさと正に相関しており、NMO 病変拡大に寄与していることが示唆された。また、NMO の病期と関係なく、CD103 陽性組織常在性記憶 T 細胞 (T_{RM}) が存在していた。初期・早期活動性病変における T_{RM} は細胞傷害性顆粒であるグランザイムを発現しており、活動性病変の形成に関与していることが想定される。また、NMO の活動性病変には、炎症を制御する FOXP3 陽性調節性 T 細胞も集積しており、病巣を鎮静化させていることが示唆された。

本研究により、NMO 病変の拡大・制御に関与する免疫細胞群を明らかにした。これら細胞群を活性化させる細胞外小胞を明らかにしていくことで、個々の患者の再発リスクを予測するバイオマーカーの開発につなげることが期待できる。

〈引用文献〉

- ① Lennon, V.A., et al., A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet*, 2004. **364**(9451): p. 2106-12.
- ② Nishiyama, S., et al., A case of NMO seropositive for aquaporin-4 antibody more than 10 years before onset. *Neurology*, 2009. **72**(22): p. 1960-1.
- ③ Bradl, M., et al., Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Ann Neurol*, 2009. **66**(5): p. 630-43.
- ④ Misu, T., et al., Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica. *Acta Neuropathol*, 2013. **125**(6): p. 815-27.
- ⑤ Pittock, S.J., et al., Eculizumab in Aquaporin-4-Positive Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *N Engl J Med*, 2019. **381**(7): p. 614-625.
- ⑥ Yamamura, T., et al., Trial of Satralizumab in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *N Engl J Med*, 2019. **381**(22): p. 2114-2124.
- ⑦ Cree, B.A.C., et al., Inebilizumab for the treatment of neuromyelitis optica spectrum disorder (N-MOMentum): a double-blind, randomised placebo-controlled phase 2/3 trial. *Lancet*, 2019. **394**(10206): p. 1352-1363.
- ⑧ Pegtel, D.M. and S.J. Gould, Exosomes. *Annu Rev Biochem*, 2019. **88**: p. 487-514.
- ⑨ Robbins, P.D. and A.E. Morelli, Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(3): p. 195-208.
- ⑩ Takeshita, Y. and R.M. Ransohoff, Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models. *Immunol Rev*, 2012. **248**(1): p. 228-39.

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakajima A, Yanagimura F, Saji E, Shimizu H, Toyoshima Y, Yanagawa K, Arakawa M, Hokari M, Yokoseki A, Wakasugi T, Okamoto K, Takebayashi H, Fujii C, Itoh K, Takei Y, Ohara S, Yamada M, Takahashi H, Nishizawa M, Igarashi H, Kakita A, Onodera O, Kawachi I	4. 巻 147
2. 論文標題 Stage-dependent immunity orchestrates AQP4 antibody-guided NMOSD pathology: a role for netting neutrophils with resident memory T cells in situ	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00401-024-02725-x	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 Hongo Shoko, Shimizu Hiroshi, Saji Etsuji, Nakajima Akihiro, Okamoto Kouichirou, Kawachi Izumi, Onodera Osamu, Kakita Akiyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Acute respiratory failure caused by brainstem demyelinating lesions in an older patient with an atypical relapsing autoimmune disorder	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/neup.12976	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 Ueki Satoshi, Hatase Tetsuhisa, Kiyokawa Megumi, Kawachi Izumi, Saji Etsuji, Onodera Osamu, Fukuchi Takeo, Igarashi Hironaka	4. 巻 65
2. 論文標題 Visual outcome of aquaporin-4 antibody-positive optic neuritis with maintenance therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 699 ~ 703
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10384-021-00858-0	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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐治越爾, 中島章博, 柳川香織, 小野寺理, 河内泉
2. 発表標題 AQP4抗体陽性視神経脊髄炎関連疾患における脳幹小脳症状と病変分布
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐治 越爾, 河内泉
2. 発表標題 Pros & Cons 2022年の多発性硬化症診療を考える. Pros「#2. 多発性硬化症は神経変性疾患である」
3. 学会等名 第34回日本神経免疫学会学術研究集会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐治越爾, 中島章博, 柳川香織, 小野寺理, 河内泉
2. 発表標題 脊髄病変で再発した視神経脊髄炎関連疾患の臨床的特徴
3. 学会等名 第34回日本神経免疫学会学術研究集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐治 越爾, 中島 章博, 柳川 香織, 清水 宏, 岡本 浩一郎, 柿田 明美, 小野寺 理, 河内 泉
2. 発表標題 視神経脊髄炎関連疾患における脳幹・小脳病変の臨床的特徴
3. 学会等名 第33回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Saji Etsuji, Kawachi Izumi
2. 発表標題 Chronic inflammation and disease progression in multiple sclerosis based on a neuropathological view
3. 学会等名 第33回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Etsuji Saji, Akihiro Nakajima, Takahiro Wakasugi, Fumihiro Yanagimura, Kaori Yanagawa, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera, Izumi Kawachi
2. 発表標題 Autoimmune disease comorbidities in patients with neuromyelitis optica spectrum disorder
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021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
研究分担者	河内 泉 (KAWACHI Izumi) (40432083)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	
研究分担者	清水 宏 (SHIMIZU Hiroshi) (40608767)	新潟大学・脳研究所・准教授 (13101)	

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
---------	---------