

令和 5 年 4 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15700

研究課題名（和文）自己抗体介在性小径線維ニューロパチーの臨床像解明とモデルによる新規治療法開発

研究課題名（英文）Clinical features of autoantibody-mediated small fiber neuropathy and developing novel neuropathic pain treatments using animal models

研究代表者

藤井 敬之（Fujii, Takayuki）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：30822481

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）：本研究では、特発性小径線維ニューロパチー患者を対象として、抗Plexin D1抗体を測定したところ、15.8%で抗体陽性者を認め、灼熱痛や刺痛といった小径線維障害を反映する症状の割合が高いことを明らかにした。さらに新たな神経障害性疼痛関連自己抗体として、Annexin A2に対する自己抗体に注目し、測定系としてELISAを確立し、神経障害性疼痛患者と疼痛を有しない患者を対象として抗Annexin A2抗体を測定したところ、神経障害性疼痛患者で有意に保有率が高いという結果が得られた。研究期間全体を通して、自己抗体が介在した小径線維ニューロパチーならびに神経障害性疼痛患者の臨床像の解明ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小径線維ニューロパチーの原因の約半数は不明とされてきたが、本研究により抗Plexin D1抗体や抗Annexin A2抗体が小径線維ニューロパチーの新たな原因である可能性を示すことができた。原因不明の小径線維ニューロパチーにおいて、小径線維に結合する自己抗体を測定することにより原因を特定できる可能性がある。さらに、今後、自己抗体介在性ニューロパチーにおける免疫治療に対する効果が明らかとなった際には、これら自己抗体が免疫治療選択バイオマーカーとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, anti-Plexin D1 autoantibodies were detected in 15.8% of idiopathic small fiber neuropathy patients, who showed a high frequency of pricking pain and burning pain. Moreover, we focused on anti-Annexin A2 autoantibodies as a novel neuropathic pain related autoantibody. The frequency of anti-Annexin A2 autoantibodies was higher in patients with neuropathic pain than in healthy controls and patients without neuropathic pain. We have revealed the prevalence and clinical features of autoantibody-mediated small fiber neuropathy and neuropathic pain.

研究分野：神経内科学

キーワード：神経障害性疼痛 小径線維ニューロパチー 自己抗体

1. 研究開始当初の背景

小径線維ニューロパチー (small fiber neuropathy, SFN) は、痛覚の伝導を受け持つ小径無髄 C 線維と有髄 A 線維を選別的に障害する末梢神経疾患で、神経障害性疼痛を主徴とし、また様々な程度の自律神経障害を合併する。SFN の約半数は原因不明 (特発性) であり、その神経障害性疼痛はしばしば難治性で、生活の質の低下が著しい。そのため、特発性 SFN の病態を解明し、新規治療薬の開発につなげることが喫緊の課題である。2018 年、申請者らは、神経障害性疼痛に関連する自己抗体として抗 Plexin D1 抗体を世界に先駆けて発見した¹⁾。抗 Plexin D1 抗体は、C 線維型小径後根神経節 (dorsal root ganglion, DRG) ニューロン特異的に結合する自己抗体であり、抗 Plexin D1 抗体陽性患者は灼熱痛や温痛覚過敏といった小径線維障害を反映する臨床症状を特徴していた。これらの学術的背景から、原因不明とされる SFN において、感覚神経を標的とする自己抗体が主要な原因のひとつとなっている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、「特発性 SFN において、自己抗体が関連した SFN がどのくらいの割合で存在し、どのような臨床的特徴を有しているか」を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究対象者

SFN における血清中抗 Plexin D1 抗体の保有率を評価するために、九州大学病院ならびに韓国 Asan medical center の SFN 患者 63 名 (特発性 SFN 患者 38 名と 2 次性 SFN 患者 25 名) と健常人 55 名を登録した²⁾。

マウス後根神経節の小径 DRG ニューロンに発現する Annexin A2 に対する自己抗体の神経障害性疼痛患者における保有率を評価するために、末梢性神経障害性疼痛患者 37 名と、神経障害性疼痛を有していない患者 82 名 (神経疾患患者 32 名と健常人 50 名) を登録した。

(2) 自己抗体の測定方法

SFN 患者においては、抗 Plexin D1 抗体測定用 ELISA を用いて 1 次スクリーニングを実施した。ELISA 陽性であった患者においては、患者血清とマウス DRG 組織を用いた組織染色法 (tissue-based assay, TBA) を実施し、小径 DRG ニューロンへの患者 IgG の結合を認めた場合に、リコンビナント Plexin D1 と患者血清を前吸着し、再度 TBA を実施し、小径 DRG ニューロンへの患者 IgG の消失が確認された場合に、抗 Plexin D1 抗体陽性と判断した²⁾。さらに、ELISA で抗 Plexin D1 抗体陽性であった症例の 2 段階目の確認法として、TBA より感度の高い方法として、マウス初代培養 DRG ニューロンを用いた細胞染色法 (Immunocytochemistry-based assay, ICC) を開発した。具体的には、TBA 同様に、マウス初代培養 DRG ニューロンへの患者の結合を認めた場合に、リコンビナント Plexin D1 と患者血清を前吸着し、再度 ICC を実施し、小径 DRG ニューロンへの患者 IgG の消失が確認された場合に、抗 Plexin D1 抗体陽性と判断する方法である。

神経障害性疼痛患者においては、抗 Annexin A2 抗体測定のゴールドスタンダードである HEK293 由来ヒト Annexin A2 を使用した ELISA を確立し、ELISA を用いて神経障害性疼痛患者における抗 Annexin A2 抗体の保有率を評価した。

4. 研究成果

(1) SFN における血清中抗 Plexin D1 抗体の保有率

63 名の SFN 患者のうち、ELISA かつ間接蛍光抗体法で血清中の抗 Plexin D1 抗体が陽性であった患者は 8 名 (12.7%) であった (図 1)。内訳として、特発性 SFN 患者では 38 名中 6 名 (15.8%) で陽性であり、2 次性 SFN 患者では 25 名中 2 名 (8.0%) で陽性であり、この 2 名は糖尿病に罹患していた²⁾。

抗 Plexin D1 陽性 SFN 患者の臨床的特徴として、発症年齢の平均は 56.6 歳で、慢性の経過をたどり、抗 Plexin D1 抗体陽性 SFN 患者では、

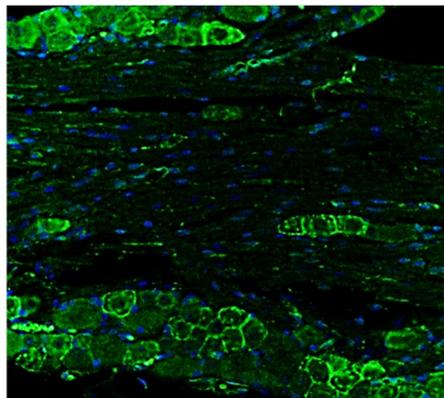


図1: 抗Plexin D1抗体陽性SFN患者IgGとマウスDRG組織を用いたTBA

SFN-Symptom Inventory Questionnaire (SFN-SIQ)において灼熱足の割合が高く(85.7%)、疼痛の性状として、灼熱痛(75.0%)や刺痛(62.5%)といった小径線維障害を反映する症状の割合が高かった。

2022年に米国から発表された報告³⁾では、特発性SFN患者54名中5名(9.3%)で陽性であり、申請者らアジアからの報告と合わせると、特発性SFN患者の約10%で抗Plexin D1抗体陽性患者がいる可能性が示唆された。

また前述の米国からの報告では³⁾、抗Plexin D1抗体陽性SFN患者において免疫グロブリン投与により神経障害性疼痛が改善する症例が存在したことが報告されている。今後の展望として、本邦においても抗Plexin D1抗体陽性SFN患者の免疫治療による治療効果について評価していく必要があると考えられた。

(2) 抗Plexin D1抗体測定のためのICCの開発

TBAより感度の高い抗Plexin D1抗体の確認法を確立するために、マウス初代培養系DRGニューロンを用いたICCを開発した。ELISAとTBAで抗Plexin D1抗体陽性を確認したSFN患者の血清とマウス初代培養DRGニューロンを反応させたところ、患者IgGがマウス初代培養DRGニューロン特異的に結合し(図2)患者血清とリコンビナントPlexin D1を前吸着したところ、これらのIgGの結合は消失した。このように、抗Plexin D1抗体測定用のICCが確立できた。今後、TBAとICCでの感度・特異度の評価を行っていく予定としている。

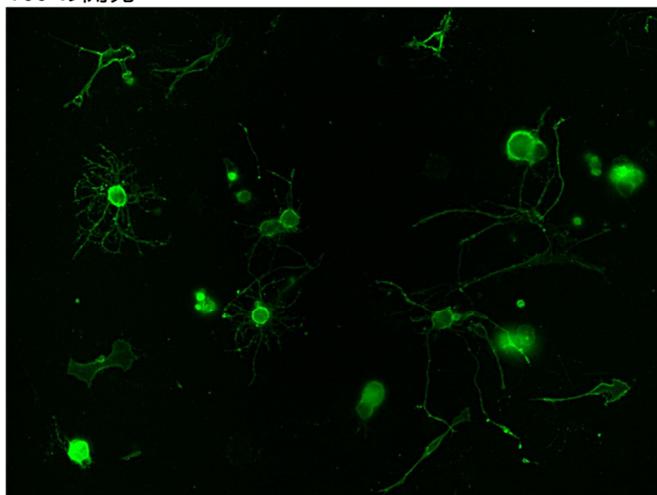


図2: 抗Plexin D1抗体陽性SFN患者IgGとマウス初代培養DRGニューロンを用いたICC

(3) 神経障害性疼痛患者における血清中抗Annexin A2抗体の保有率

抗Plexin D1抗体以外にも自己抗体介在性SFNの原因自己抗体が存在する可能性を考えた。抗リン脂質抗体症候群の患者の一部で、血清中に抗Annexin A2抗体が存在することが以前から報告されているが、Annexin A2は、抗リン脂質抗体の主要な抗原である2グリコプロテイン1の血管内皮細胞表面の結合分子であるとともに、マウス小径DRGニューロンの細胞膜に発現し神経障害性疼痛に関連していることが報告されていることから、抗Annexin A2抗体が神経障害性疼痛の発症にも関連しているのではないかと考えた。そこで、Annexin A2に対する自己抗体の測定系としてゴールドスタンダードであるELISAを確立し、神経障害性疼痛患者37名と神経障害性疼痛を伴わない患者82名を対象として、抗Annexin A2抗体をELISAで測定したところ、神経障害性疼痛患者では10.8%(4/37)、神経障害性疼痛を伴わない患者では1.2%(1/82)で陽性であり、神経障害性疼痛患者で有意に保有率が高いという結果が得られた。抗Annexin A2抗体陽性患者は全て男性で、多くが再発性の経過をたどり、約半数で免疫治療により疼痛の緩和が得られた。

本研究で、世界で初めて神経障害性疼痛における抗Annexin A2抗体の保有率を明らかにした。今後、神経障害性疼痛を主徴とする特発性SFN患者での抗Annexin A2抗体の保有率を評価していく予定である。

<引用文献>

- 1) Fujii T, Yamasaki R, Iinuma K, et al. A novel autoantibody against plexin D1 in patients with neuropathic pain. *Ann Neurol* 2018;84:208-224.
- 2) Fujii T, Lee E-J, Miyachi Y, et al. Anti-Plexin D1 antibodies relate to small fiber neuropathy and induce neuropathic pain in animals. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2021;8:e1028.
- 3) Zeidman LA, Saini P, Mai P. Immune-Mediated Small Fiber Neuropathy With Trisulfated Heparin Disaccharide, Fibroblast Growth Factor Receptor 3, or Plexin D1 Antibodies: Presentation and Treatment With Intravenous Immunoglobulin. *J Clin Neuromuscul Dis* 2022;24:26-37.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Fujii Takayuki, Lee Eun-Jae, Miyachi Yukino, Yamasaki Ryo, Lim Young-Min, Iinuma Kyoko, Sakoda Ayako, Kim Kwang-Kuk, Kira Jun-ichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Antiplexin D1 Antibodies Relate to Small Fiber Neuropathy and Induce Neuropathic Pain in Animals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 e1028 ~ e1028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXI.0000000000001028	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

1. 著者名 Miyachi Yukino, Fujii Takayuki, Yamasaki Ryo, Tsuchimoto Daisuke, Iinuma Kyoko, Sakoda Ayako, Fukumoto Shoko, Matsushita Takuya, Masaki Katsuhisa, Isobe Noriko, Nakabeppu Yusaku, Kira Jun-ichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Serum Anti-oligodendrocyte Autoantibodies in Patients With Multiple Sclerosis Detected by a Tissue-Based Immunofluorescence Assay	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 681980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2021.681980	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 藤井敬之、山崎亮	4. 巻 32
2. 論文標題 自己抗体介在性小径線維ニューロパチー	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 末梢神経	6. 最初と最後の頁 31-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Zhang Xu, Kira Jun-Ichi, Ogata Hidenori, Imamura Tomohiro, Mitsuishi Mikio, Fujii Takayuki, Kobayashi Masaki, Kitagawa Kazuo, Namihira Yukihiro, Ohya Yusuke, Maimaitijiang Guzailiayi, Yamasaki Ryo, Fukata Yuko, Fukata Masaki, Isobe Noriko, Nakamura Yuri	4. 巻 10
2. 論文標題 Anti-LGI4 Antibody Is a Novel Juxtaparanodal Autoantibody for Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 e200081 ~ e200081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXI.0000000000200081	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 藤井敬之、山崎亮、宮地佑希野、飯沼今日子、吉良潤一	4. 巻 58
2. 論文標題 抗Plexin D1抗体介在性神経障害性疼痛	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 自律神経	6. 最初と最後の頁 163-168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Takayuki Fujii, Ryo Yamasaki, Yukino Miyachi, Kyoko Iinuma, Ayako Sakoda, Eun-Jae Lee, Young-Min Lim, Kwang-kuk Kim, Jun-ichi Kira, Noriko Isobe
2. 発表標題 The clinical features of small fiber neuropathy patients with anti-Plexin D1 antibodies
3. 学会等名 62nd Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井 敬之、宮地 佑希野、山崎 亮、土本 大介、迫田 礼子、福元 尚子、松下 拓也、中別府 雄作、吉良 潤一、磯部 紀子
2. 発表標題 間接蛍光抗体法による多発性硬化症患者血清中の抗オリゴデンドロサイト抗体の検討
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 Takayuki Fujii, Hiroyuki Honda, Ryo Yamasaki, Motoi Yoshimura, Toru Iwaki, Noriko Isobe
2. 発表標題 Plexin D1 is upregulated in degenerated motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis patients
3. 学会等名 63rd Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井敬之、本田裕之、山崎亮、吉村基、岩城徹、磯部紀子
2. 発表標題 SEMA 3E-Plexin D1経路に着目した筋萎縮性側索硬化症の病態解明
3. 学会等名 第119回日本内科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井敬之、緒方英紀、山崎亮、磯部紀子
2. 発表標題 定量的感覚検査を用いた自己免疫性ノドパチーにおける 小径線維障害の検討
3. 学会等名 第34回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takayuki Fujii
2. 発表標題 Autoantibody-related neuropathic pain
3. 学会等名 The 96th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 藤井敬之、宮地佑希野	4. 発行年 2022年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 Annual review 神経 2022	

1. 著者名 藤井敬之、吉良潤一	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日本臨牀社	5. 総ページ数 5
3. 書名 Neuropathic pain (small fiber neuropathy) / painful trigeminal neuropathyと抗Plexin D1抗体	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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			
韓国	Asan Medical Center			