

令和 5 年 4 月 18 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15703

研究課題名(和文)慢性炎症性脱髄性多発神経炎の新規自己抗体の責任抗原LGI4の同定とノドパチー解明

研究課題名(英文)Discovery of novel anti-LGI4 antibodies in chronic demyelinating polyneuropathy and elucidation of its mechanism

研究代表者

張 旭 (Zhang, Xu)

国際医療福祉大学・トランスレーショナルニューロサイエンスセンター・特任助教

研究者番号：60892669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：抗原未同定の慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)104例の血清を坐骨神経と後根神経節の組織免疫染色でスクリーニングし、6例がランビエ傍後輪部と後根神経節のsatellite gliaと反応した。末梢神経の粗抽出蛋白のウェスタンブロットで60kDの陽性バンドが得られた。これらの特徴から、leucine-rich repeat LGI family, member 4 (LGI4)が候補抗原と考えた。抗LGI4抗体は坐骨神経と後根神経節を患者血清と同じパターンで染色した。LGI4を恒常的に発現するラットシュワン細胞でsiRNAでLGI4の発現を低下させると、患者血清の染色性が著減した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)は、抗原は未解明で根治療法はない。一部のCIDPでは、ランビエ絞輪部に局在するneurofascin 155などのノド蛋白に対するIgG4クラスの自己抗体が報告され、特異な病像を呈することから自己免疫性ノドパチーという新しい疾患概念が生まれた。しかし、類似の特徴を示すが、ノド抗体陰性例も少なくない。本研究で新たなノド抗原として、leucine-rich repeat LGI family, member 4 (LGI4)を同定できた。この新たなノドパチーの発見は、抗原未同定のCIDP患者の診断と治療の導入における意義が極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：Sera from 6 CIDP patients selectively bound to the nodal regions of sciatic nerves and dorsal root ganglion (DRG) satellite glia. IgG from all patients stained a 60 kDa band on western blots of mouse DRG and sciatic nerve lysates. These features indicated leucine rich repeat LGI family member 4 (LGI4) to be a candidate antigen. A commercial anti-LGI4 antibody and IgG from all seropositive CIDP patients showed the same immunostaining patterns on DRG and cultured rat Schwann cells, and bound to LGI4-overexpression lysates by western blotting. In cultured rat Schwann cells constitutively expressing LGI4, LGI4 siRNA effectively down-regulated LGI4 and reduced patients' IgG binding compared with scrambled siRNA. Application of serum from a positive patient to Schwann cells expressing a disintegrin and metalloprotease domain-containing protein 22 (ADAM22), an LGI4 receptor, significantly reduced expression of Krox20, but not Periaxin.

研究分野：神経内科学

キーワード：脱髄疾患 慢性炎症性脱髄性多発神経炎 ランビエ絞輪 ノド抗体 LGI4 後根神経節 satellite glia IgG4

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性炎症性脱髄性多発神経炎(Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy, CIDP)は、病因・病態が異なる heterogeneous な集合体である。私たちはその約 20%で末梢神経と中枢神経に共通してランビエ絞輪部に局在する neurofascin 155 (NF155)に対する IgG4 クラスの自己抗体が存在し、中枢神経脱髄を高率に合併することを初めて報告した(Kawamura et al., Neurology 2013; Ogata et al., Ann Clin Transl Neurol 2015)。NF155 抗体陽性 CIDP は、若年発症、感覚性失調と振戦、著明な髄液蛋白上昇(200 mg/dL 以上)、MR neurography での高度の神経根腫大、免疫グロブリン静注療法抵抗性等の共通した特徴を示した。しかも、全例が HLA-DR15 (DRB1\*15:01またはDRB1\*15:02)を保有し(Ogata, Zhang, et al., J Neuroimmunol 2020)、髄液で Th1 (IFN $\gamma$ )と Th2(IL-13/CCL11) サイトカインの両者が上昇していた(Zhang, Ogata, et al., Ann Clin Transl Neurol 2019)。NF155 以外にもランビエ絞輪部に局在する contactin-1(CNTN1)や contactin-associated protein 1 (Caspr1)に対する自己抗体が少数の CIDP(数%)で報告されている。これらのノド抗体陽性例は、抗 NF155 抗体陽性例と同様にユニークな病像を示すことから、現在では自己免疫性ノドパチーという新たな疾患概念でまとめられるようになった。CIDP の大部分では自己抗体や自己抗原は未同定で、自己免疫性ノドパチーと同様な病像を示しながら、既知のノド抗体が陰性である例も少なくない。したがって、本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、「抗原未同定の CIDP の責任自己抗原は何か」である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、上記のような抗原未同定の CIDP で新規自己抗体と責任抗原を見出し、自己免疫性ノドパチーの病態を解明することである。そのため、既知の自己抗体陰性 CIDP 患者で NF155 抗体陽性 CIDP と類似する病像を示す例を抽出し、坐骨神経と後根神経節標本を用いた組織免疫染色でランビエ絞輪を特異的に染色するケースをスクリーニングする。ウェスタンブロット、免疫沈降、液体クロマトグラフィー・質量分析で抗原を同定する。リコンビナント蛋白による吸収試験、cell-based assay、ELISA 法を樹立する。多数例の CIDP で抗体を測定し、陽性例の臨床的・免疫学的特徴を明らかにする。

### 3. 研究の方法

研究協力施設の九州大学神経内科及び福岡中央病院で血清保存している CIDP 症例のうち、NF155/CNTN1/Caspr1 等に対する自己抗体が陰性の 120 例を選択した。

これらの患者血清を用いて、マウス坐骨神経と後根神経節切片の組織免疫染色により、ランビエ絞輪部に特異的に反応する症例を抽出した。

マウス末梢神経抽出蛋白を用いたウェスタンブロットにより抗原蛋白の分子量を同定した。

末梢神経ランビエ絞輪部に局在することが報告されている蛋白質で、同様な分子量を有するものを責任抗原候補とした。ない場合は、当該患者血清と反応する標的蛋白質を免疫沈降し、切り出した蛋白質の液体クロマトグラフィー・質量分析により標的蛋白質候補の部分アミノ酸配列を同定し、合致する蛋白を責任抗原候補とした。

責任候補抗原を発現する細胞(株)に患者血清が反応することを確認のうえ、候補蛋白の siRNA を用いてノックダウンし反応性が消失するか検証した。

候補抗原のリコンビナント蛋白を作成し、組織免疫染色とウェスタンブロット法で吸収試験を行い対応抗原であることかを検討した。

同定された責任抗原蛋白をコードするプラスミドを HEK293 細胞等の細胞株にトランスフェクションし stable transformant を作成し、それを抗原とした cell-based assay による特異度・感度の高い抗体検出法(ゴールドスタンダード)の開発を行った。

多数例の抗原未同定 CIDP 患者を検討し、新規自己抗体陽性 CIDP 患者を同定し、その臨床・検査所見を検討した。

特徴ある病像を示す新規自己抗体陽性 CIDP 群を同定し、これまでの治療成績を後方視的に解析した。

新規自己抗体陽性患者血清から抽出した IgG をマウスの坐骨神経に注入し、病理学的に末梢神経脱髄が生じるかを検討した。

### 4. 研究成果

1) 120 例中 6 例(5%)が、組織免疫染色で坐骨神経の juxta-paranode および後根神経節 (dorsal root ganglion, DRG) の satellite glia と反応した。患者血清 IgG は、坐骨神経では juxta-paranode のマーカーである Kv1.2 とオーバーラップした。また、DRG では satellite glia のマーカーである glutamine synthetase とオーバーラップした。さらに患者血清 IgG は、培養ラットシュワン細胞膜と反応した。

2) DRG の粗抽出蛋白のウェスタンブロットでは、6 例全例が共通して 60kD のバンドと反応した。以上の特徴に合致する蛋白遺伝子として、8 個 (B3glct, Krt10, Lgi4, Tyrp1, Pgm1, Thbd, Gatb, Plekha4) の候補があったが、遺伝子変異により髄床低形成 (hypomyelination) をきたすのは、LGI4 (leucine-rich repeat LGI family member 4) だけだったので、LGI4 を最終候補とした。LGI4 は、末梢神経のグリアに発現し、分子量は 59377 ダルトンである。

3) DRG の組織免疫染色で、市販の抗 LGI4 抗体は患者血清 IgG と共局在した [Manders' colocalization coefficient (MCC) for M1 (fraction of LGI4 containing patient IgG) は 0.857 で、MCC for M2 (fraction of patient IgG containing LGI4) は 0.841]。

4) 培養シュワン細胞の組織免疫染色では、市販の抗 LGI4 抗体は患者血清 IgG と共局在した。培養シュワン細胞の粗抽出蛋白のウェスタンブロットでは、市販の抗 LGI4 は患者血清 IgG 同様に 60kD のバンドを染色した。

5) LGI4-Flag plasmid と、LGI4 の受容体である ADAM22-HA plasmid を HEK293T 細胞に、co-transfection し stable transformant を樹立した。患者血清 IgG は、LGI4-Flag plasmid と ADAM22-HA plasmid を co-transfect した HEK293T 細胞の細胞表面を染色したが、ADAM22-HA plasmid のみを transfect した HEK293T 細胞とは反応しなかった。127 例の健常対照血清は、LGI4-Flag plasmid と ADAM22-HA plasmid を co-transfect した HEK293T 細胞とは反応しなかった。したがって、LGI4-Flag plasmid と ADAM22-HA plasmid を co-transfect した HEK293T 細胞を用いた組織免疫染色は、抗 LGI4 抗体測定 gold standard となることが示された。

6) LGI4 と恒常的に発現する培養ラットシュワン細胞とヒトメラノーマ細胞株に Lgi4 siRNA を作用させて、LGI4 の発現を低下させると、scrambled RNA を作用させた場合に比して有意に患者血清 IgG の結合が低下した。

7) 患者血清 IgG を、LGI4-Flag plasmid と ADAM22-HA plasmid を co-transfect した HEK293T 細胞で前吸収させてから、DRG の組織免疫染色を行うと反応性が著しく低下した。一方、transfect していない HEK293T 細胞で前吸収しても DRG への反応性の低下はなかった。以上から、患者血清 IgG の標的抗原は LGI4 であると結論した。

8) ラット培養シュワン細胞が、LGI4 の受容体である ADAM22 を発現していることを、組織免疫染色で確認した。その上で、抗 LGI4 抗体陽性患者血清を培養シュワン細胞に作用させた。シュワン細胞の髄鞘化を独立して制御している Krox20 と Periaxin の発現を定量的 PCR 法で測定したところ、Krox20 の発現が健常対照血清や抗 LGI4 抗体陰性 CIDP 患者血清を作用させた場合に比して有意に低下した。Periaxin の発現は変化しなかった。したがって、患者血清抗 LGI4 抗体は、シュワン細胞が autocrine 機序で分泌した LGI4 が自身の ADAM22 に結合して髄鞘化シグナルを伝えるのを阻害していると考えられた。

9) 抗 LGI4 抗体陽性例の IgG サブクラスは、IgG1 が 4 例、IgG2 が 6 例、IgG3 が 4 例、IgG4 が 5 例だった。優位な IgG サブクラスは、5 例が IgG4、1 例が IgG2 だった。

10) 6 例の臨床的特徴をまとめると、比較的高齢発症 (平均 58 歳) で、男女比は 1:1 だった。臨床病型は typical CIDP が 5 例、multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy (MADSAM) が 1 例だった。発症様式は 3 例が急性から亜急性、3 例が慢性だった。全例が運動麻痺に加えて強い感覚障害、特に深部感覚障害を呈した。ロンベルグ長江は例で、手指振戦は 4 例で認められた。髄液蛋白は著明に上昇し (平均 394 mg/dl、182 から 618)、慢性発症の 3 例全例が、MRI neurography で神経根の腫大を示した。これらの特徴は、自己免疫性ノドバ

チーの特徴とよく一致した。免疫グロブリン大量静注療法は、使用された4例全例が部分的な有効性を示した。IgG2サブクラスの抗LG14抗体が主体の1例で、生検腓腹神経でonion bulbの形成を認めた。

11) 抗LG14抗体陽性患者血清を、マウス坐骨神経に反復投与したところ、患者血清IgGはランビエ絞輪からjuxta-paranodeに侵入し、ランビエ絞輪部蛋白Caspr1の発現を低下させた。したがって、患者抗LG14抗体はpathogenicと考えられた。

以上より、本研究では既知のノド抗体陰性のCIDPにおいて、新規ノド抗体である抗LG14抗体を発見し、特徴的な臨床像を明らかにできた。患者由来抗LG14抗体は、in vitroでラット培養シュワン細胞の髄鞘化シグナルの発現を低下させ、in vivoのマウス坐骨神経注入実験でjuxta-paranodeまで侵入しランビエ絞輪部の構造を破壊したことから、病原性があると考えられた。したがって、抗LG14抗体陽性脱髄性ニューロパチーは、新しい自己免疫性ノドパチーであることを確立できた。LG14-Flag plasmidとADAM22-HA plasmidをco-transfectしたHEK293T細胞は、抗LG14抗体測定のgold standardとして有用であり、今後の抗体測定に使用できる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Zhang X, Kira J, Ogata H, Imamura T, Mitsuishi M, Fujii T, Kobayashi M, Kitagawa K, Namihira Y, Ohya Y, Maimaitijiang G, Yamasaki R, Fukata Y, Fukata M, Isobe N, Nakamura Y	4. 巻 10(2)
2. 論文標題 Anti-LG14 antibody is a novel juxtapanodal autoantibody for chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurology Neuroimmunology and Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1212/NXI.000000000200081	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Xu Zhang, Hidenori Ogata, Tomohiro Imamura, Takayuki Fujii, Ryo Yamasaki, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 LG14 is a novel autoantigen for nodopathy type chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.
3. 学会等名 The 62nd Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Xu Zhang, Hidenori Ogata, Tomohiro Imamura, Takayuki Fujii, Ryo Yamasaki, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 LG14 is a novel autoantigen for nodopathy/paranodopathy type chronic inflammatory demyelinating polyneuropath
3. 学会等名 American Neurological Association 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 張旭、緒方英紀、今村友裕、藤井敬之、山崎亮、磯部紀子、吉良潤一
2. 発表標題 IgG4抗LG14抗体はランピエ絞輪juxta-paranodeを標的とするCIDPの新たな自己抗体である。
3. 学会等名 第32回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 張旭、緒方英紀、今村友裕、藤井敬之、山崎亮、磯部紀子、吉良潤一
2. 発表標題 LG14-IgG4はLG14とADAM22の蛋白間相互作用を阻害して脱髄を起こすCIDPの新たなノド抗体である。
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 u Zhang, Jun-ichi Kira, Hidenori Ogata, Ayako Sakoda, Masaki Kobayashi, Kazuo Kitagawa, Yukihiro Namihira, Yusuke Ohya, Tomohiro Imamura, Guzailiayi Maimaitijiang, Ryo Yamasaki, Noriko Isobe, Yuri Nakamura
2. 発表標題 Clinical features and mechanism of LG14-IgG4-positive inflammatory demyelinating polyneuropathy
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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