

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19438

研究課題名（和文）標的抗原細胞外領域とIgG1Fc融合タンパク質による自己抗体病の革新的治療法開発

研究課題名（英文）Development of innovative therapy for autoantibody-related disorders using fusion proteins combining IgG1Fc and extracellular domains of target antigen.

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：抗アクアポリン4（AQP4）抗体視神経脊髄炎において、AQP4細胞外領域-Fc融合タンパク質を投与することにより、抗AQP4抗体の中和と抗AQP4抗体産生B細胞に対する抗体介在性細胞傷害により、視神経脊髄炎を改善させることができるという作業仮説を証明するため、AQP4の細胞外領域とIgG1 Fc領域の融合タンパク質（AQP4loopX-Fc）を作製した。方法としてはまずAQP4の細胞外領域loop A,C,Eの部位のアミノ酸配列を決定し、リンカー領域を加え、アミノ酸配列を塩基配列に変換し、これをIRESベクターに組み込むことに成功した。さらにこれをHEK細胞に遺伝子導入することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この成功により、AQP4の細胞外領域とIgG1 Fc領域の融合タンパク質（AQP4loopX-Fc）が抗AQP4抗体の中和と抗AQP4抗体産生B細胞に対する抗体介在性細胞傷害により、視神経脊髄炎を改善させることができるという作業仮説を証明する重要な一歩を踏み出すことができた。作業仮説が証明されれば、他の自己抗体関連神経免疫疾患のみならず、自己抗体の関連する数多くの病気の治療に応用できる可能性を秘める方法であり、学術的、社会的意義は小さくはないと考える。

研究成果の概要（英文）：To prove the hypothesis that administration of fusion proteins combining IgG1 Fc region and extracellular domains of target aquaporin-4(AQP4) can ameliorate neuromyelitis optica (NMO) by neutralization of anti-AQP4 antibodies and antibody-mediated cytotoxicity against anti-AQP4 antibody-producing B cells in AQP4-IgG-positive neuromyelitis, We tried to make a fusion protein (AQP4loopX-Fc) of the extracellular region of AQP4 and the IgG1 Fc region. After the amino acid sequences of the extracellular region of AQP4, loop A, C, and E were determined, a linker region was added. Then, the amino acid sequences were converted to nucleotide sequences, which was successfully inserted into an IRES vector.

研究分野：神経免疫

キーワード：視神経脊髄炎 アクアポリン4 融合タンパク B細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

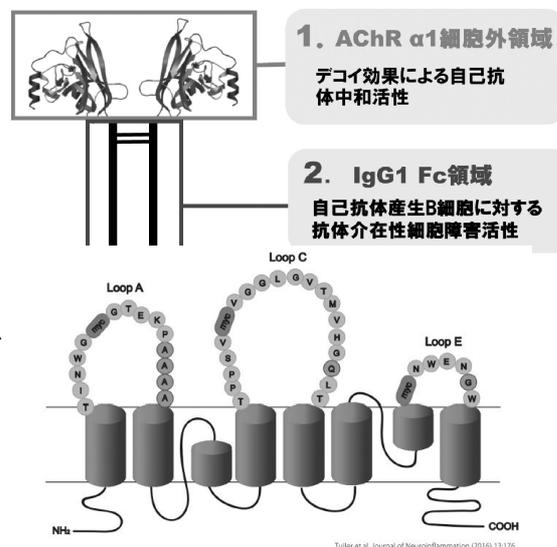
視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica、NMO) は近年、多発性硬化症から分離独立した疾患単位であり、視神経炎と脊髄炎を多くの場合繰り返す、重度の後遺症を来しやすい疾患である。NMO の病態は右図のように患者血清中に存在する、水分子チャネルアキュアポリン4 (aquaporin-4、AQP4) に対する自己抗体が中枢神経内アストロサイト足突起上の AQP4 を攻撃して生じることがこれまでの研究の蓄積で判明している。つまり抗 AQP4 抗体が病態の主要原因であり、これを抑制できれば病態を抑えられると考えられる。

### 2. 研究の目的

近年、抗 CD19/CD20 抗体など、B 細胞を標的とした治療の有効性が報告され、開発が進められているが、B 細胞系のほとんどを抑制してしまうため、必ずしも安全とは言えない。また、それらに抵抗性の一群は一部に存在すると想定され、新規の治療法の開発が待たれている。

もう一つの神経免疫疾患である重症筋無力症は抗アセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor、AChR) 抗体により発症する疾患であるが、本研究の分担研究者の医師である鷗沢顕之博士は、標的抗原である AChR の細胞外領域と IgG1 Fc 領域の融合タンパク AChR-Fc (右図) を重症筋無力症の動物モデルに投与し、重症度を評価し、重症度が改善する予備的結果を得ている (Neurotherapeutics. 2017;14:191-198.)

本研究では視神経脊髄炎を対象として Fc 融合蛋白の有効性と安全性を検討する。原因抗原 AQP4 は右図のような構造をしており、細胞外領域としてループ A、C、E が存在することが判明している。今回、上記の我々が保有している技術を応用し、AQP4 の細胞外ドメイン (AQP4loopX) と IgG1 Fc 領域を結合した AQP4loopX-Fc を作製し、抗 AQP4 抗体の中和作用を確認した上で動物モデルへの投与を行い、有効性と安全性を評価した上で、臨床応用を目指すことを本研究の目的とした。



### 3. 研究の方法

1) AQP4の細胞外ドメインとIgG1 Fc領域の融合タンパク質 (AQP4loopX-Fc) を作製する。これにはAChR-Fcで作成したヒトAChR構造 (1サブユニット細胞外ドメイン) 及びヒトIgG1のFc領域をリンカーアミノ酸配列で結合したリコンビナントプラスミドを参考に、ヒトAChR構造部分をヒトAQP4のloopA、loopC、loopEに置き換え、リンカーアミノ酸配列で結合したリコンビナントプラスミドを作製する。この際、視神経脊髄炎患者抗AQP4抗体はAQP4の立体構成を認識することが知られているため、loopXの前後にシステインを挿入し、ジスルフィド結合形成試薬を用いて、ループ状にするプラスミドも作製する。

2) AQP4loopX-FcのAQP4結合能 / 中和能の解析

我々はクライオ電子顕微鏡で AQP4 の構造解析を行ったグループ (J Mol Biol 2010;402:669-81) が作製したのと同じ方法で作成されたヒト AQP4 M1、M23 タンパク質を保有し、抗 AQP4 抗体の測定に関してはこれまでに ELISA (J Neuroimmunol 2008;196:181-7.)、FACS-cell



## 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 2件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                          |
|---|--------------------------|
| 1. 著者名<br>Wingerchuk DM, Fujihara K, Palace J, Berthele A, Levy M, Kim HJ, Nakashima I, Oreja-Guevara C, Wang KC, Miller L, Shang S, Sabatella G, Yountz M, Pittock SJ; PREVENT Study Group.                    | 4. 巻<br>89               |
| 2. 論文標題<br>Long-Term Safety and Efficacy of Eculizumab in Aquaporin-4 IgG-Positive NMOSD.   | 5. 発行年<br>2021年          |
| 3. 雑誌名<br>Ann Neurol.   | 6. 最初と最後の頁<br>1088-1098. |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/ana.26049.   | 査読の有無<br>有               |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する             |
| 1. 著者名<br>Sawai S, Mori M, Makino T, Nakano Y, Kuwabara S, Kamitsukasa I.   | 4. 巻<br>23               |
| 2. 論文標題<br>Severe orthostatic hypotension associated with lesions of the area postrema in neuromyelitis optica spectrum disorder.   | 5. 発行年<br>2021年          |
| 3. 雑誌名<br>eNeurological Sci.  | 6. 最初と最後の頁<br>100335     |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.ensci.2021.100335.   | 査読の有無<br>有               |
| オープンアクセス<br>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<br>-                |
| 1. 著者名<br>Hiraga A, Mori M, Kuwabara S.   | 4. 巻<br>27               |
| 2. 論文標題<br>Dementia and Parkinson-like syndrome with basal ganglia lesion in neuromyelitis optica spectrum disorders.   | 5. 発行年<br>2021年          |
| 3. 雑誌名<br>Neurocase.  | 6. 最初と最後の頁<br>223-226.   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1080/13554794.2021.1921222.   | 査読の有無<br>有               |
| オープンアクセス<br>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<br>-                |
| 1. 著者名<br>Asseyer S, Masuda H, Mori M, Bellmann-Strobl J, Ruprecht K, Siebert N, Cooper G, Chien C, Duchow A, Schliebeit J, Liu J, Sugimoto K, Uzawa A, Ohtani R, Paul F, Brandt AU, Kuwabara S, Zimmermann HG. | 4. 巻<br>7                |
| 2. 論文標題<br>AQP4-IgG autoimmunity in Japan and Germany: Differences in clinical profiles and prognosis in seropositive neuromyelitis optica spectrum disorders.  | 5. 発行年<br>2021年          |
| 3. 雑誌名<br>Mult Scler J Exp Transl Clin.   | 6. 最初と最後の頁<br>-          |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1177/20552173211006862.   | 査読の有無<br>有               |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する             |

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Masuda H, Mori M, Yokouchi H, Uzawa A, Uchida T, Muto M, Ohtani R, Aoki R, Yamamoto S, Kuwabara S.            | 4. 巻<br>93           |
| 2. 論文標題<br>Silent progression of brain atrophy in aquaporin-4 antibody-positive neuromyelitis optica spectrum disorder. | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>J Neurol Neurosurg Psychiatry.  | 6. 最初と最後の頁<br>32-40. |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1136/jnnp-2021-326386.   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |

〔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<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 鷗沢 顕之<br><br>(Uzawa Akiyuki)<br><br>(10533317)   | 千葉大学・医学部附属病院・助教<br><br><br><br>(12501)  |    |
| 研究分担者 | 桑原 聡<br><br>(Satoshi Kuwabara)<br><br>(70282481) | 千葉大学・大学院医学研究院・教授<br><br><br><br>(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 |
|---------|---------|