

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591247

研究課題名(和文) アストロサイト病変モデルにおける二次性脱髄機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of the pathomechanism of secondary demyelination in primary astrocytopathy model

研究代表者

三須 建郎 (Misu, Tatsuro)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00396491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：視神経脊髄炎(NMO)は、主に中枢神経系のアストロサイトに発現するアクアポリン4(AQP4)に対する自己抗体が関与する炎症性疾患である。アストロサイト傷害により脱髄を来すと考えられているが充分には分かっていないため、本研究ではAQP4抗体を用いて脳脊髄炎モデルを作成して検討を行った。

本研究で作成されたモデルは、再現性良くNMOに矛盾しないAQP4やアストロサイトの脱落を認め、脱髄は遅発性に生じることが明らかとなった。初期の血管中心性のアストロサイト病変は抗体の用量依存性に拡大傾向を示し、病変の拡大に伴い好中球の浸潤が確認され、脱髄の進展にはAQP4抗体のみではなく炎症の関与が重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Neuromyelitis optica (NMO) is an autoimmune inflammatory disease by anti-aquaporin 4 (AQP4) antibody mainly targeting against astrocyte foot processes in the central nervous system (CNS). However, the mechanism of demyelination is not well resolved.

In this project, we have studied the mechanism of astrocytopathy and demyelination by passive transfer model of AQP4 antibody on rodent experimental encephalomyelitis. This model is featured by highly reproducible and typical astrocytopathy lesion like post-mortem cases of NMO. It is revealed that demyelination is secondarily produced after the induction of astrocytopathy lesion, and the lesion development is highly associated with infiltration of inflammatory cells, especially neutrophil.

研究分野：神経内科学

キーワード：神経免疫 脱髄 アストロサイト アクアポリン

## 1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎 (NMO) は視神経と脊髄に病変の首座を有する炎症性疾患であるが、近年、当科と Mayo Clinic との共同研究により、特に視神経と脊髄に病巣が出現する NMO 患者の中に中枢神経の血管周囲や軟膜に特異的に反応する抗体 (NMO-IgG) が存在することが見いだされ、NMO-IgG は星状神経細胞に存在するアクアポリン 4 (AQP4) に特異的に反応することが明らかとなった。さらに、我々は NMO の剖検脊髄におけるアクアポリン 4 の免疫組織学的検討を行い、NMO 剖検脊髄の活動期病変においては、補体 (茶色) の沈着がみられ、その血管周囲では AQP4 (ピンク) の発現が欠落していること、さらに早期 NMO 病変においては AQP4 およびアストロサイトのマーカーである GFAP が欠落する一方、髄鞘蛋白は保たれており、脱髄に先行してアストロサイト障害が起こる病態である事を報告した。すなわち、NMO は一次性にアストロサイトを標的とする疾患と考えられ、MS とは根本的に異なる病態を有する疾患である事が病理学的に示唆されたが、そのアストロサイト傷害機序や脱髄機序は充分には解っておらず、疾患の病態研究や治療研究に用いる動物モデルが求められている。

## 2. 研究の目的

本研究では、AQP4 抗体を用いた中枢神経局所における新たなアストロサイト傷害モデルを作成し、アストロサイトの傷害機序ならびに二次性に生じる脱髄機序を明らかにすることを目的としている。AQP4 抗体を用いて実験的脳脊髄炎 (EAE) モデルを作成するとともに、カテーテルを用いた脊髄腔内局所注入モデルを作成し、抗体動態に応じた免疫病態を解析する。病理学的に AQP4/GFAP 脱落病変の有無を検証し、さらにその際に出現するアストログリアやミクログリア等の免疫動態を免疫組織学的に検証する。病態に関連する

分子を蛋白レベルで病態促進因子の特定を試み、それらを抑制する治療的研究の発展を念頭に置いている。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト由来抗 AQP4 抗体の精製

NMO 患者や対照群患者の血清・血漿を非働化 (56 °C・30 分)・ろ過 (0.45 μm) 処理後、希釈して Protein G にアブライし、溶出・ゲル濾過・ろ過の過程を経て、10 mg/mL の調整後に保存する。

### (2) NMO 剖検標本

AQP4 抗体陽性 NMO 剖検例を研究対象として準備している。

モデル動物で得られた因子のヒト脳における発現を免疫組織化学的に検証する。

### (3) 実験的 T 細胞+AQP4 抗体導入モデル

週齢 8 週の雌 Lewis ラット (CrI:CrIj) の両足背にミエリン塩基性蛋白 Myelin basic protein (MBP) 100 μg と結核死菌 complete freund 's adjuvant (CFA) 100 μg を混ぜたエマルジョンを皮下注射すると、約 2 週間で EAE が生じ、上行性麻痺が誘発される (EAE)。臨床症状もしくは 10g/day の体重減少が出現した時点で血液脳関門が破綻したものとして、NMO 患者血清から精製した抗 AQP4 抗体をラットに腹腔内投与する。抗体投与量は段階的に振り分けて検討する。抗体投与後 2 日でラットを解剖、NMO 病変の好発部位である大脳 (脳室周囲、視床下部、視索)、視神経、脳幹 (最後野)、脊髄の他、AQP4 の存在する腎臓、筋肉、肺、胃を含め、パラフィン標本および凍結標本を作成し急性期の病理評価を行う。

### (4) 免疫組織化学

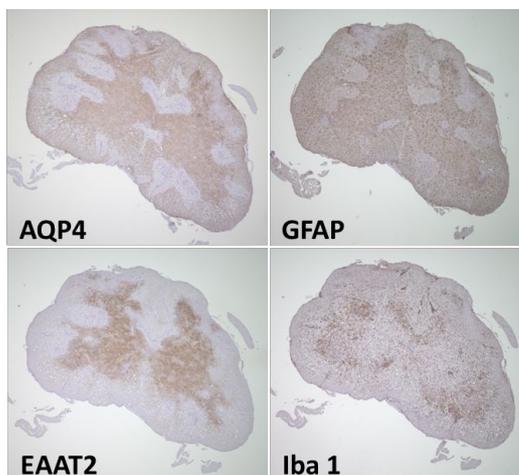
パラフィン包埋されたヒトやラット標本を用い、切片を 3-5 μm 厚にて作成。切片は、染色前に脱パラフィン処理 (キシレン 20 分 × 2 回) 後、96% エタノールに浸漬。Hydrogen peroxide 混 Methanol にて内因性 Peroxidase

をブロック後、さらに 10%FCS 混 PBS にて非特異反応をブロック。抗原賦活法としては、1mM EDTA 10mM Tris pH8.5 あるいは 0.1mM クエン酸溶液 (pH6) を用いて煮沸して施行した (60-90 分)。一次抗体 (Mouse, Rabbit or Goat) を添加し 8h 後に PBS にて洗浄し、Envision ポリマー試薬 (Mouse, Rabbit) あるいは Biotin-Avidin (ABC 法) 試薬を用いた。発色基質としては、Diaminobenzidine (DAB) や Fuchsin, Vector blue を用いる。

#### 4. 研究成果

##### (1) 再現性の高い NMO モデルの作成

我々は、本研究によりヒト由来 AQP4 抗体ないし AQP4 の細胞外ドメインを認識する特異的リコンビナント抗体を用いて、極めて再現性の高い NMO モデルの作成を行う事に成功した。この抗体による NMO 病変は、ヒト NMO 剖検脳脊髄標本で見られる特徴をほぼ網羅しており、典型的な AQP4 や GFAP の染色性の脱落と、アストロサイト機能蛋白の 1 つである EAAT2 の発現が低下する NMO の特徴を再現していた。病変は特徴的な血管中心性病変を認め、各病変は相互に癒合して脊髄や視神経、脳幹部など、NMO 患者で診られやすい病変分布を呈していた (下図)。



##### (2) NMO モデル解析による脱髄機序

本モデルにおいて、AQP4 の脱落に比して脱髄は軽い事は剖検脳における解析と同様であったが、急性期に AQP4 の脱落が生じるのに

対して、脱髄は遅発性に生じる事が明らかとなった。この点は、脱髄が AQP4 抗体による初期アストロサイトパチー病変の形成後、何らかの二次的な代謝異常ないし二次的炎症により脱髄を来すことが示唆された。

##### (3) 好中球の病態への関与

ヒト剖検脳における解析により、好中球や好酸球が病変組織に浸潤して病態に関わることが示唆されているが、実際に動物モデルでも再現良くこれらの細胞が関与するとの研究結果は出ていなかった。今回、AQP4 抗体の用量依存性に病変が拡大し、その際に好中球が病変の拡大に関与することが示唆された。今後、好中球等の炎症を抑える事が病態の抑制に重要と考え、治療法の開発に寄与することが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(雑誌・論文) (全 29 件)

- 1 Geis C, Ritter C, Ruschil C, Weishaupt A, Grünwald B, Stoll G, Holmoy T, Misu T, et al. Exp Neurol. 2015 Mar;265:8-21. (査読有り)
- 2 Fujihara K, Misu T. AQP4 in biopsied demyelinating lesions as a diagnostic clue to NMOSD and MS: final answer? Neurology. 2015 Jan 13;84(2):110-1. (査読有り)
- 3 Ikeda K, Kiyota N, Kuroda H, Sato DK, Nishiyama S, Takahashi T, Misu T, et al. Mult Scler. 2015 Apr;21(5):656-9. (査読有り)
- 4 Misu T, Sato DK, Nakashima I, Fujihara K. MOG-IgG serological status matters in paediatric ADEM. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2015 Mar;86(3):242. (査読有り)
- 5 Takanashi Y, Misu T, Oda K, et al. Audiological evidence of therapeutic effect of steroid treatment in neuromyelitis optica with hearing loss. J

- Clin Neurosci. 2014 Dec;21(12):2249-51. (査読有り)
- 6 Bradl M, Kanamori Y, Nakashima I, Misu T, Fujihara K, Lassmann H, Sandkühler J. Pain in neuromyelitis optica--prevalence, pathogenesis and therapy. Nat Rev Neurol 2014;10:529-36. (査読有り)
- 7 Kaneko K, Sato DK, Misu T, et al. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis with multiphasic demyelination. Ann Neurol 2014;76:462-4. (査読有り)
- 8 Sawada J, Orimoto R, Misu T, et al. Mult Scler. 2014 ;20(10):1413-6. (査読有り)
- 9 Sato DK, Callegaro D, de Haidar Jorge FM, Nakashima I, Nishiyama S, Takahashi T, Simm RF, Apostolos-Pereira SL, Misu T, et al. Ann Neurol. 2014 Aug;76(2):305-9. (査読有り)
- 10 Pohl M, Kawakami N, Kitic M, Bauer J, Martins R, Fischer MT, Machado-Santos J, Mader S, Ellwart JW, Misu T, et al. T cell-activation in neuromyelitis optica lesions plays a role in their formation. Acta Neuropathol Commun. 2013 24;1(1):85. (査読有り)
- 11 Lucchinetti CF, Guo Y, Popescu BF, Fujihara K, Itoyama Y, Misu T. The pathology of an autoimmune astrocytopathy: lessons learned from neuromyelitis optica. Brain Pathol. 2014 Jan;24(1):83-97. (査読有り)
- 12 Kitic M, Hochmeister S, Wimmer I, Bauer J, Misu T, et al. Intrastratial injection of interleukin-1 beta triggers the formation of neuromyelitis optica-like lesions in NMO-IgG seropositive rats. Acta Neuropathol Commun. 2013;1(1):5. (査読有り)
- 13 Ramadhanti J, Huang P, Kusano-Arai O, Iwanari H, Sakihama T, Misu T, et al. A novel monoclonal antibody against the C-terminal region of aquaporin-4. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 2013 Aug;32(4):270-6. (査読有り)
- 14 Sato DK, Nakashima I, Takahashi T, Misu T, Waters P, Kuroda H, Nishiyama S, Suzuki C, Takai Y, Fujihara K, Itoyama Y, Aoki M. Aquaporin-4 antibody-positive cases beyond current diagnostic criteria for NMO spectrum disorders. Neurology. 2013 Jun 11;80(24):2210-6. (査読有り)
- 15 Misu T, Höftberger R, Fujihara K, et al. Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica. Acta Neuropathol. 2013 Jun;125(6):815-27. (査読有り)
- 16 Takai Y, Misu T, et al. Two cases of lumbosacral myeloradiculitis with anti-aquaporin-4 antibody. Neurology. 2012 Oct 23;79(17):1826-8. (査読有り)
- 17 Kuroda H, Fujihara K, Takano R, Takai Y, Takahashi T, Misu T, et al. Increase of complement fragment C5a in cerebrospinal fluid during exacerbation of neuromyelitis optica. J Neuroimmunol. 2013 Jan 15;254(1-2):178-82. (査読有り)
- 18 Kitley J, Leite MI, Nakashima I, Waters P, McNeillis B, Brown R, Takai Y, Takahashi T, Misu T, et al. Prognostic factors and disease course in aquaporin-4 antibody-positive patients with neuromyelitis optica spectrum disorder from the United Kingdom and Japan. Brain. 2012 Jun;135(Pt 6):1834-49. (査読有り)
19. 西山 修平, 三須 建郎, 中島 一郎, 藤原 一男. 【アストロサイトをめぐる最近の話題】 視神経脊髄炎(NMO)における

- アストロサイトの役割. 神経内科. 2013;79(2):257-61. (査読なし)
20. 三須 建郎, 藤原 一男. 【免疫性神経疾患-基礎・臨床研究の最新知見-】 視神経脊髄炎(NMO) 視神経脊髄炎の病態メカニズム. 日本臨床. 2013;71(5):823-8. (査読なし)
21. 三須 建郎, 藤原 一男. 【神経内科検査のみかた-脳のイメージングを中心に】 神経内科のトピックス 多発性硬化症と NMO の違い. Modern Physician. 2013;33(5):663-7. (査読なし)
22. 三須 建郎, 藤原 一男. 視神経脊髄炎の免疫病態. 臨床免疫・アレルギー科. 2013;60(1):104-8. (査読なし)
23. 三須 建郎. MS の病理(第 1 回) Prototypic MS. MS Frontier: 多発性硬化症の先端情報誌. 2013;2(2):62. (査読なし)
24. 高井 良樹, 三須 建郎, 高橋 利幸, 中島 一郎, 藤原 一男. 【Antibody Update】 NMO 関連疾患と抗 AQP4 抗体. BRAIN and NERVE: 神経研究の進歩. 2013;65(4):333-43. (査読なし)
25. 三須建郎、高橋利幸、中島一郎、藤原一男. 【神経疾患のバイオマーカー】 視神経脊髄炎のバイオマーカー. 脳と神経 64 巻 5 号:525-535,2012. (査読なし)
26. 西山修平、三須建郎、中島一郎、藤原一男. T 細胞を標的とした自己免疫疾患の治療. 多発性硬化症治療におけるフィンゴリモド. 炎症と免疫 20 巻 6 号 562-567、2012 (査読なし)
27. 高井良樹、三須建郎、高橋利幸、中島一郎、藤原一男. 【脊髄疾患の新しい話題】 視神経脊髄炎における脊髄病変. 神経内科 77 巻 1 号 : 49-57,2012. (査読なし)
28. 西山修平、三須建郎、佐藤ダグラス、中島一郎、藤原一男【NMO spectrum と AQP4 の病態意義】 NMO の治療. 神経内科 76 巻 6 号 : 564-568,2012. (査読なし)
29. 高井良樹、三須建郎、高橋利幸、中島一郎、藤原一男. 【NMO spectrum と AQP4 の病態意義】 NMO における AQP4 の病態意義. 神経内科 76 巻 6 号 : 543-548,2012. (査読なし)
- [学会発表](計 15 件)
1. Tatsuro Misu. Pathology of Neuromyelitis optica. Sendai Conference (2012.7.14)(トラスティー仙台、宮城)
2. Tatsuro Misu. Pathological features of Aquaporin-4 autoimmunity with cytotoxic edema: the lesson from neuromyelitis optica and related disorders. ISBRA World Congress (2012.9.10) (札幌コンベンションセンター、札幌)
3. 三須建郎、佐藤ダグラス、中島一郎、高橋利幸、藤原一男. 東北大学における AQP4 抗体陰性 NMOSD. 第 11 回 MS ワークショップ (2012.9.22)(ホテル日航、軽井沢)
4. 高井良樹、三須建郎、小林正樹、渡邊みか、中島一郎、清水優子、糸山泰人、藤原一男、青木正志. 腫瘍様炎症性脱髄性疾患におけるアストロサイト破壊性病巣. 第 53 回日本神経学会学術大会 2012 年 5 月 22 日~25 日 (東京国際フォーラム、東京)
5. 三須建郎、藤原一男、高井良樹、西山修平、中島一郎、糸山泰人、青木正志、ラスマン・ハンス. 視神経脊髄炎アストロサイト病変における Clasmotodendrosis の意義. 第 40 回 臨床神経病理懇話会 2012 年 11 月 17 18 日 (三重大学、三重)
6. 高井良樹、三須建郎、渡邊みか、隈部俊宏、鈴木博義、中島一郎、糸山泰人、富永悌二、青木正志、藤原一男. 同心円状脱髄病変を来した Baló 病様中枢性炎症性脱髄性疾患の一生検例. 第 53 回 日本神経病理学会総会 2012 年 6 月 28 日~30 日

(朱鷺メッセ、新潟)

7. 西山修平、三須建郎、高橋利幸、中島一郎、糸山康人、青木正志、藤原一男。ヒトアストロサイト一次培養細胞に対する視神経脊髄炎患者 IgG・補体の影響。

第 53 回日本神経学会学術大会 2012 年 5 月 22 日～25 日(東京国際フォーラム、東京)

8. 三須建郎、高井良樹、高橋利幸、中島一郎、糸山泰人、藤原一男、青木正志。NMO における非中枢神経系病変。第 53 回日本神経学会学術大会 2012 年 5 月 22 日～25 日(東京国際フォーラム、東京)

9. 高井良樹、三須建郎、中島一郎、高橋利幸、鈴木靖士、糸山泰人、藤原一男、青木正志。脊髄円錐・馬尾に病変を認めた抗アクアポリン 4 抗体陽性視神経脊髄炎の 2 症例。

第 24 回日本神経免疫学会学術集会 2012 年 9 月 20 日～21 日(軽井沢プリンスホテル、長野)

10. 西山修平、三須建郎、菅野直人、高橋利幸、中島一郎、青木正志、藤原一男。NMO ヒトアストロサイト一次培養細胞に対する視神経脊髄炎患者 IgG・補体・補体防御因子の影響。第 24 回日本神経免疫学会学術集会 2012 年 9 月 20 日～21 日(軽井沢プリンスホテル、長野)

11. 西山亜由美、西山修平、三須建郎、中島一郎、青木正志、藤原一男。NMO 急性期治療としてリツキシマブが有効であった 1 例。

第 24 回日本神経免疫学会学術集会 2012 年 9 月 20 日～21 日(軽井沢プリンスホテル、長野)

12. 三須建郎 NMO における myelinopathy 第 26 回日本神経免疫学会 2014 年 9 月 4 日～6 日(金沢歌劇座、金沢)

13. 三須建郎 グリアから見た MS/NMO 日本神経免疫学会 2014 年 9 月 4 日～6 日(金沢歌劇座、金沢)

14. 黒澤和大、三須建郎、高橋利幸、中島一郎、藤原一男、青木正志 患者血清 NMO-IgG

を用いた NMO モデルラット作成の試み

日本神経病理学会 2014 年 6 月 5 日～7 日(学術総合センター、東京)

15. 三須建郎 NMO 病変の多様性

日本神経病理学会 2014 年 6 月 5 日～7 日(学術総合センター、東京)

〔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〕

ホームページ等

東北大学大学院多発性硬化症治療学寄附講座

<http://www.ms.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三須建郎(MISU, Tatsuro)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 00396491