

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591265

研究課題名(和文) CIDPにおける軸索 グリア接合を標的とした新規自己抗体介在性の脱髄機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel autoantibodies against axo-glial junctions in chronic inflammatory demyelinating radiculopolyneuropathy

研究代表者

河村 信利 (Nobutoshi, Kawamura)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00432930

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)：慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー(CIDP)の病態解明を目指し、私たちはランビエ絞輪周辺の軸索-グリア接合に關与する膜蛋白に着目し新規自己抗体を探索した。結果、neurofascin 155 (NF155) に対する自己抗体が電気生理学的に確実なCIDPのうち18%で陽性となることが明らかとなった。陽性症例の一部では中枢性脱髄を伴っており、両神経系の脱髄病変に対する抗NF155抗体の關連が示唆された。その他抗NF155抗体陽性CIDPは陰性CIDPと比較して、若い発症年齢、遠位対称型、振戦、高い脳脊髄液蛋白が特徴であり画像上、頸部および腰部神経根が著明に肥厚することも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified that 18% of patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP) were positive for antibodies against neurofascin 155 (NF155), which is cell-adhesion molecule and located around nodes of Ranvier. The anti-NF155 antibody-positive CIDP patients had significantly younger onset age, more frequent occurrence of distal acquired demyelinating symmetric phenotype and tremor, longer distal and F wave latencies, greater cerebrospinal fluid protein levels, and greater cervical root diameters than anti-NF155 antibody-negative CIDP patients. Marked symmetric hypertrophy of cervical and lumbosacral roots/plexuses was present in all the anti-NF155 antibody-positive CIDP patients examined by MRI neurography. A part of the anti-NF155 antibody-positive CIDP patients also had demyelination in the central nervous system, which suggested that this autoantibody could induce combined central and peripheral demyelination.

研究分野：神経免疫学

キーワード：神経免疫 自己抗体 慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー ランビエ絞輪

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性脱髄性疾患は、急性散在性脳脊髄炎 (acute disseminated encephalomyelitis) や多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) に代表される中枢神経系脱髄と、Guillain-Barré 症候群 (GBS) や慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー (chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: CIDP) に代表される末梢神経系脱髄に大別されるが、稀に中枢・末梢神経系いずれにも脱髄がみられることがあり、中枢末梢連合脱髄症 (Combined central and peripheral demyelination: CCPD) として報告されている。いずれの疾患も自己免疫異常が病態に関与していると想定されているが、疾患との関連が明らかにされている標的抗原はごく一部にすぎない。

近年ランビエ絞輪部周辺の分子機構の解明が進み、炎症性脱髄性疾患の標的抗原としての一面に注目が集まっている。本研究で注目した neurofascin (NF) は細胞結合膜蛋白であり NF155 および NF186 という二種類の主要アイソフォームが存在する。NF186 はランビエ絞輪部と軸索起始部の軸索側から発現する一方で NF155 は傍絞輪部に存在し、中枢神経系ではオリゴデンドロサイト、末梢神経系では Schwann 細胞から発現する。

### 2. 研究の目的

「CIDP, CCPD では NF が自己免疫反応の標的となり、伝導障害、軸索・髄鞘の離解、脱髄性変化をきたす」との仮説を検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 標的抗原のスクリーニング

ラット坐骨神経の切片、もしくはときほぐし線維への患者血清および髄液 IgG 結合性を免疫組織化学染色で評価した。

#### (2) Western blot 法・免疫吸着

ラット脳、坐骨神経から抽出したライセートを電気泳動で展開し CIDP, CCPD 症例の血清 IgG が結合するか確認した。さらに患者血清にラットリコンビナント NF155 蛋白を加え、免疫吸着を行なった後に再度 Western blot 法で評価した。

#### (3) フローサイトメトリーを利用した抗 NF155 抗体測定系の確立

リコンビナントヒト NF155 もしくは NF186 を強制発現する Stable cell line を樹立した。その cell line を血清とともにインキュベーション(一次染色)した。その後蛍光色素結合抗ヒト IgG 抗体とインキュベーションし、二次染色を行った。フローサイトメーターで細胞の平均蛍光強度を測定することで抗体価を決定した(図)。

#### (4) IgG サブクラスの確認

抗 NF155 抗体陽性症例において、上記のフローサイトメトリー法を用いて IgG サブクラスの確認を行った。

(5) 炎症性脱髄性疾患における陽性率の検討および抗 NF155 抗体陽性症例における臨床像の評価

2004 年～2014 年に九州大学病院を受診および入院した EFNS/PNS ガイドラインによる電気生理学的診断基準の診断基準を「definite」で満たす CIDP 症例 50 例においてフローサイトメトリー法で抗 NF155 抗体および抗 NF186 抗体を測定した。MS 32 例、GBS 26 例、健常者 (HCs) 30 例も同様に測定した。なお、診断基準が確定していない CCPD 症例については CIDP の範疇とした。また抗 NF155 抗体陽性症例と陰性症例の臨床像を比較する際には他院の陽性症例 4 例を含めた。

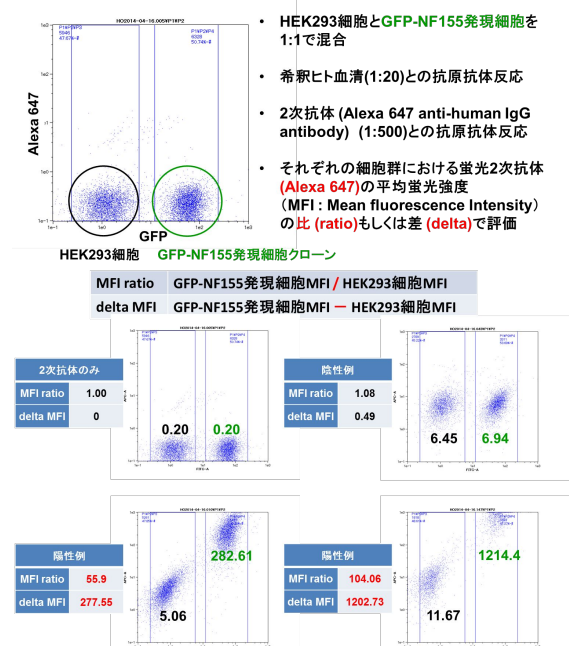


図. フローサイトメトリーを利用した抗 NF155 抗体測定

### 4. 研究成果

最初に標的タンパクをスクリーニングするため、CCPD 症例の免疫学的標的部位の同定を目的として CCPD 症例の血清を Sprague-Dawley ラットの坐骨神経組織に滴下し、その染色パターンを確認した。その結果患者血清はランビエ絞輪部・傍絞輪部と一致した染色性を認め、その染色パターンは抗 NF 抗体によるパターンと一致していた。NF は中枢・末梢いずれにも存在することから、臨床症状とも矛盾しないと考えられた。次にラット中枢神経ライセート、末梢神経ライセートと CCPD 患者の血清中自己抗体の反応性を Western blot 法で確認したところ、CCPD 患者血清中の抗体はラット中枢・末梢

神経ライセートと結合してバンドを形成し、それは抗 NF155 抗体が成すバンドと一致した。さらに、患者血清にラット recombinant NF155 蛋白を加え、免疫吸着を行なった後、その血清を用いて再度 Western blot 法で評価したところ、前述のバンドは消失した。このことより、患者血清中の抗体は NF155 蛋白と結合することが証明された。

その後、フローサイトメトリーを利用した抗 NF155, NF186 抗体測定系の確立し多数の症例を測定した結果、CCPD 症例のみならず、CIDP 症例においても抗 NF155 抗体陽性症例が確認された。当院における各種炎症性脱髄性疾患症例で陽性率を検討したところ、抗 NF155 抗体の陽性率は CIDP 18.0% (9/50), MS 0% (0/32), GBS 3.8% (1/26) HCs 0% (0/30)であった。抗 NF186 抗体については測定する限りにおいて明らかな陽性例は同定できなかった。抗 NF155 抗体陽性 CIDP 症例における IgG サブクラスはいずれも IgG4 優位であった。他院の症例 4 例を含めた抗 NF155 抗体陽性 CIDP 13 例は、陰性 CIDP 症例と比較し、発症年齢が有意に若く、遠位対称型である割合と振戦を有する割合が有意に高く、脳脊髄液中の蛋白が有意に増加していた。末梢神経伝導検査では抗体陽性群は陰性群より遠位潜時および F 波潜時が有意に延長していた。MRI neurography で確認し得た 7 例の抗 NF155 抗体陽性 CIDP 全例において頸髄ならびに腰髄神経根の対称性肥厚を認め、同抗体陰性 CIDP より有意に頸髄神経根が肥大していた。抗体陽性 13 例を治療反応群と抵抗群に分類した場合、IVIg に加えてステロイドを併用している割合が治療反応群で有意に高かった。抗 NF155 抗体陽性 CIDP 13 例のうち中枢神経脱髄を有するのは 3 例であった。

私たちは当初、CCPD 症例で抗 NF155 抗体陽性症例を同定したが、多数の炎症性脱髄性疾患症例で測定を重ねた結果、CIDP 症例においても陽性になることが明らかとなった。これまでの研究結果からは、抗 NF155 抗体陽性症例では末梢神経障害は必発する一方、中枢神経脱髄はその一部で合併すると推察される。この点については更に症例を蓄積した上で最終的な結論を出す必要がある。今後はエピトープの同定や、動物モデルの開発を進めていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Kawamura N, Yamasaki R, Yonekawa T,

Matsushita T, Kusunoki S, Nagayama S, Fukuda Y, Ogata H, Matsuse D, Murai H, Kira J. Anti-neurofascin antibody in patients with combined central and peripheral demyelination. *Neurology*. 2013;81:714-22. 査読有

DOI: 10.1212/WNL.0000000000000015

Yamasaki R. Anti-neurofascin antibody in combined central and peripheral demyelination. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2013; 4 suppl.1: 68-75. 査読有

DOI: 10.1111/cen3.12061

Ogata H, Matsuse D, Yamasaki R, Kawamura N, Matsushita T, Yonekawa T, Hirokuni M, Murai H, Kira J. A nationwide survey of combined central and peripheral demyelination in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2015 Feb 11 査読有 DOI: 10.1136/jnnp-2014-309831

緒方 英紀, 山崎 亮, 中枢末梢連合脱髄症と抗 neurofascin 抗体, 末梢神経, 査読有, Vol.25, No. 1, 2014, pp. 59-65.

Kawamura N. Neurofascin: a novel target for combined central and peripheral demyelination. *Rinsho Shinkeigaku*. 2014;54:978-80. 査読有

DOI: 10.5692/clinicalneuro.54.978.

〔学会発表〕(計 9 件)

緒方 英紀, 松瀬 大, 河村 信利, 山崎 亮, 米川 智, 今村 志穂子, 松下 拓也, 楠 進, 錫村 明生, 吉良 潤一  
中枢・末梢連合脱髄症における抗 neurofascin 抗体陽性率の検討および全国臨床疫学調査: 第 54 回 日本神経学会学術大会 2013.5.30 東京国際フォーラム

(ポスター)

緒方 英紀, 松瀬 大, 松下 拓也, 河村 信利, 山崎 亮, 飛松 省三, 楠 進, 錫村 明生, 吉良 潤一  
中枢・末梢連合脱髄症における全国臨床調査報告および抗 neurofascin 抗体陽性率の検討: 第 24 回 日本末梢神経学会学術集会 2013.8.23 朱鷺メッセ

(口演)

Ogata H, MD, Yamasaki R, MD, PhD, Matsuse D, MD, PhD, Kawamura N, MD, PhD, Yonekawa T, MD, Matsushita T, MD, PhD, Imamura S, MS, Kusunoki S, MD, PhD, Nagayama S, MD, PhD, Fukuda Y, MD, PhD, Murai H, MD, PhD, Kira JI, MD, PhD. Combined Central and Peripheral

Demyelination: Diagnostic Value of Anti-Neurofascin Antibody and the First Nationwide Survey In Japan : the 6th Pan-Asian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis 2013.11.8 Kyoto. ( oral, poster )

緒方 英紀, 松瀬 大, 松下 拓也, 河村 信利, 山崎 亮, 楠 進, 吉良 潤一  
中枢・末梢連合脱髄症(CCPD)における全国臨床疫学調査成績と抗 neurofascin(NF)抗体陽性率の検討: 第 111 回日本内科学会講演会 2014.4.12 東京国際フォーラム  
(口演, ポスター)

緒方英紀, 松瀬大, 河村信利, 松下拓也, 山崎亮, 吉良潤一  
炎症性脱髄性疾患における特異度の高い抗 neurofascin 抗体測定法の開発  
第 55 回 日本神経学会学術大会 2014.5.22 福岡 (口演)

Ogata H, Yamasaki R, Matsuse D, Kawamura N, Matsushita T, Kira J. Prevalence and characteristic features of anti-human neurofascin 155 antibody-associated chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: 2015 American Academy of Neurology Annual Meeting. 2015.4.23 Washington DC. (poster)

〔図書〕(計 5 件)

緒方 英紀, 山崎 亮, 吉良 潤一, 中外医学社, Annual Review 2015 神経, 2015: 206-11.

〔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

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

河村 信利 (Kawamura Nobutoshi)

九州大学・大学病院・特任講師

研究者番号: 432930

### (2)研究分担者

吉村 怜 (Yoshimura Satoshi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 20596390

### (3)研究分担者

松瀬 大 (Matsuse Dai)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 70596395