

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461278

研究課題名(和文)免疫性脱髄性ニューロパチーの軸索脆弱性の病態解明：TAG-1の役割

研究課題名(英文) Analysis of axonal vulnerability in immune-mediated demyelination: a role of TAG-1 for remyelination.

研究代表者

飯島 正博 (IIJIMA, MASAHIRO)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座講師

研究者番号：40437041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経系の維持には軸索-髄鞘間の相互作用が重要な役割を担うことが指摘されている。我々はCIDPにおいて、傍ランビエ絞輪部に分布するTAG-1のアミノ酸置換が分子機能を修飾し、再髄鞘化機序にかかわることを過去に指摘した。今回、TAG-1を欠損した動物モデルに髄鞘構成成分より構成される抗原を人為的に導入して自己免疫性神経炎を惹起したところ、脱髄のみならず軸索障害が形態的・電気生理学的に顕在化することを示した。このことからTAG-1をはじめとする分子群は末梢神経の発生はもとより、傷害発生後の髄鞘再生にかかわる重要な要素であり、この破綻は不可逆性の病態をきたしうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Interaction between axon and myelin sheath has a crucial role for the maintenance of the peripheral nervous system. We have clarified that TAG-1, which specifically distributes on juxtaparanode, ameliorates the remyelinating process depends on non-synonymous amino acids changes through SNPs. In this study, we produce an experimental autoimmune neuritis model by inducing myelin-originated peptides with complete Freund adjuvant. This mice showed inflammatory demyelination followed by severe axonal degeneration. TAG-1 could work as a trigger for remyelination after demyelination. In addition, dysfunction of juxtaparnodal molecules would bring severe irreversible pathogenesis as like axonal degeneration.

研究分野：免疫性神経疾患

キーワード：免疫介在性ニューロパチー TAG-1 傍ランビエ絞輪部 脱髄 軸索障害 動物モデル 免疫性疾患 脳神経疾患

### 1. 研究開始当初の背景

慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー (CIDP) をはじめとする慢性進行性の脱髄性ニューロパチーは軸索障害の合併が難治・長期予後不良の主因として指摘されているが、脱髄に伴う軸索障害をきたす機序は解明されていない。我々は末梢神経の構成分子を主要な対象に、アミノ酸置換をきたす一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) 解析から治療反応性を規定する要因を解析し、傍ランビエ絞輪部に存在する TAG-1 (transient axonal glycoprotein-1) の重要性を指摘した (Iijima M, et al. *Neurology*. 2009;73:1348-52, Iijima M, et al. *J Peripher Nerv Syst*. 2011;Suppl 1:52-5) (図 1)。

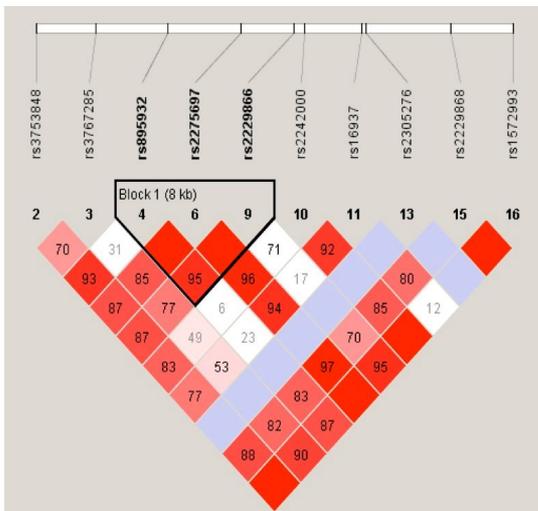


図 1. ヒト CIDP における免疫グロブリン療法に対する効果と一塩基多型連鎖不平衡解析。TAG-1 遺伝子に 3SNPs による連鎖不平衡ブロックが存在することが示された。

本研究では TAG-1 を中心に軸索および髄鞘の node-internode に特異的に分布する分子群を解析し、軸索脆弱性や軸索障害をもたらす病態の解明を試みた。

### 2. 研究の目的

IVIg 治療反応性に関連する TAG-1 SNPs には、nonsynonymous SNP が含まれるとともに、分子構造の 3 次元解析から他分子との相互作用に参与することが判明している (Iijima M, et al. *J Peripher Nerv Syst*. 2011;Suppl 1:52-5)。TAG-1 は軸索と髄鞘の両者に *trans* (双方向) に分布して相互作用し、軸索上では Kv channel の発現と分布を支配している (Traka M, et al. *J Cell Biol*. 2003 162:1161-72)。本研究では、TAG-1 のノックアウト (KO) マウスに対して髄鞘構成成分である 19 アミノ酸からなる P0 peptide による実験的自己免疫神経炎 (experimental autoimmune neuritis, EAN) を誘導し、軸索脆弱性と軸索障害をきたす病態機序の解明を目的とした。本研究では TAG-1 KO マウス

に EAN を惹起して軸索脆弱性モデルとして解析を進めるとともに、sciatic nerve の電気生理学的解析から、ヒトで認められる脱髄所見に関連する所見との類似性を検証する。さらに病変部 sciatic nerve の病理学的検討を行い、軸索障害の病態に TAG-1 がどのように関わるかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

対象とする動物モデルは TAG-1 ノックアウトマウス (C57BL/6J)。過去の報告より EAN 惹起にはオスの発症が優位であることを確認した。これより今回の実験系はすべてオスを用い、これらに pertussis toxin を加えた完全フロイントアジュバントとともに P0 peptide (180-199) を髄鞘標的抗原として 2 回に分割して皮下に投与した。評価項目は cage activity、foot printing 等の臨床評価と sciatic nerve における病理組織を行った。

### 4. 研究成果

TAG-1 KO マウスは高頻度の胎生致死および低い出生率が明らかとなり、本遺伝子は少なくとも胎生期において重要な機能を発現する可能性が示唆された。さらに出生後数週間以上にわたり野生型と比べて高度の体重減少を呈するなど、TAG-1 KO マウスに特徴的な臨床像が認められた。(図 2)



図 2. 上: 野生型、下: TAG-1 KO。出生時より運動機能に差異のない体格の差異を認める。

P0 peptide による EAN 惹起により、TAG-1 KO では顕著な後肢における筋萎縮が顕在化するとともに著大な体重減少をきたした (図 2)。同様に臨床スコア、foot printing 等の評価も EAN 惹起後の TAG-1 KO は顕著な増悪を呈した (図 3)。

病理学的所見として、EAN 惹起後の TAG-1 KO は活動性の脱髄ならびに patchy な繊維脱落を示し、ときほぐしでも軸索変性所見が顕在化する傾向を示した (図 4)。

以上の結果から、TAG-1 の欠損は運動機能に関して野生型と変わらないものの、脱髄後における再髄鞘化機序に深く関与する可能性が示された。本分子の欠如は不可逆的な二次性軸索変性への移行を促進し筋萎縮に至ることが示され、これらの結果は過去に我々

が報告した CIDP の治療反応性との関連性を

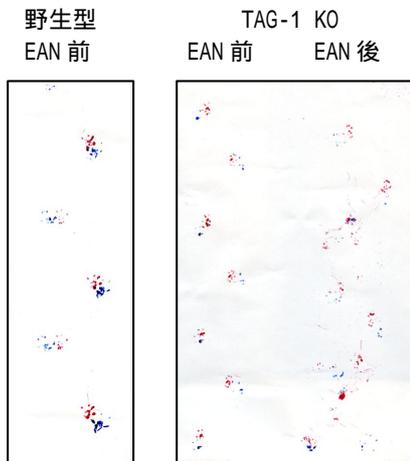


図 3. EAN 後の Foot printing (左:野生型、右:TAG-1 KO)。EAN 惹起前は野生型と同様の正常歩行所見を示すが、EAN 後は四肢を引きずる歩行障害が顕在化する。



図 4. EAN 惹起後 7 週間における野生型 (左) と TAG-1 KO (右) の後肢比較。肉眼的に顕著な筋萎縮を TAG-1 KO は呈する。

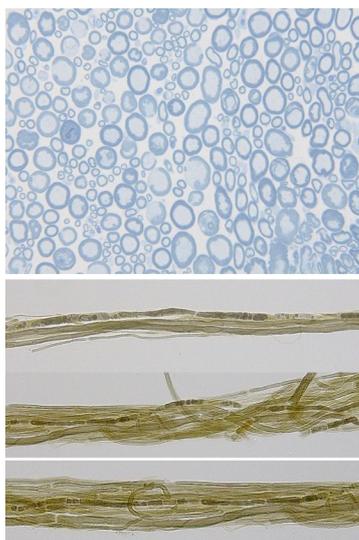


図 5. EAN 惹起後 7 週間におけるエポソール包埋トルイジンブルー染色 (上) とときほぐし標本 (右) とともに急性期における軸索変性所見が顕著に認められる。

強く示唆する (図 4, 5)。今後は治療抵抗性に対する治療開発に関して従来の免疫療法のみならず、再髄鞘化機転の観点からも本マウスにおける末梢神経障害の病態にアプローチする必要性があると考えられる。

また、今回の研究から得られた課題として、本実験系では抗原投与後数週間に免疫性神経炎が惹起される単相性経過を特徴とする。

モデル疾患としての CIDP は慢性進行性もしくは再発性経過を有することから、今回の EAN とは別の自己免疫機序の関与が否定できない。このことから今後は慢性進行性経過を示す動物系を導入し、EAN とは異なる機序による CIDP モデルと TAG-1 KO モデルとの交配から軸索脆弱性が示されるかの検討が必要と考えられた。

今までに、本研究に用いた EAN による自己免疫性末梢神経炎の誘導とは別に、あらたに non-obese diabetic (NOD) を背景とした B7-2 knockout マウスを入手しており、その臨床表現系に関する解析や経時的な病理所見の解析を開始している。本マウスは生後一定の期間において炎症性脱髄と二次性の有髄線維脱落を自然発症することが知られており、より慢性進行性の経過を反映する動物モデルとして期待されている (図 5)。

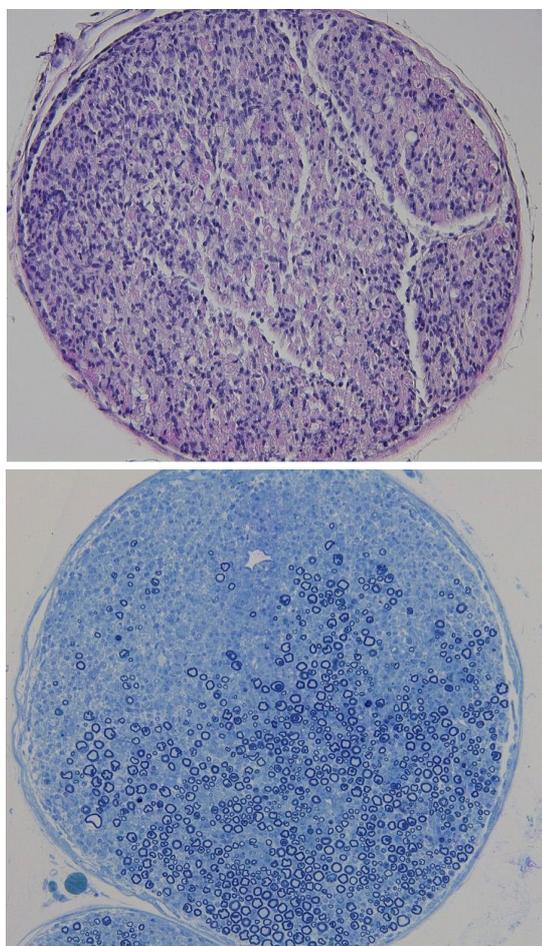


図 6. NOD B7-2 KO マウスの sciatic nerve における炎症細胞の浸潤と線維脱落を伴う脱髄像 (27 週齢)。

これに加えて本研究で用いた軸索脆弱性を特徴とする TAG-1 KO マウスとの NOD 戻し交配を開始した。Background を NOD B7-2 にすることにより自然発症の慢性脱髄性ニューロパチーの治療抵抗性に関する知見や新規治療法開発のための基盤が整ったと言える。今後は治療反応性はもとより、疾患そのものの病態解明を視野にさらなる解析を進める必要があると考えられた。

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 11 件)

1. Hashimoto R, Koike H, Takahashi M, Ohyama K, Kawagashira Y, Iijima M, Sobue G. Uncompacted Myelin Lamellae and Nodal Ion Channel Disruption in POEMS Syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015 ;74:1127-36. 査読あり
2. Ohyama K, Koike H, Takahashi M, Kawagashira Y, Iijima M, Watanabe H, Sobue G. Immunoglobulin G4-related pathologic features in inflammatory neuropathies. *Neurology*. 2015;85:1400-7. 査読あり
3. Koike H, Takahashi M, Ohyama K, Hashimoto R, Kawagashira Y, Iijima M, Katsuno M, Doi H, Tanaka F, Sobue G. Clinicopathologic features of folate-deficiency neuropathy. *Neurology*. 2015;84:1026-33. 査読あり
4. Kawagashira Y, Koike H, Ohyama K, Hashimoto R, Iijima M, Adachi H, Katsuno M, Chapman M, Lunn M, Sobue G. Axonal loss influences the response to rituximab treatment in neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy with anti-myelin-associated glycoprotein antibody. *J Neurol Sci*. 2015;348:67-73. 査読あり
5. Ohyama K, Koike H, Katsuno M, Takahashi M, Hashimoto R, Kawagashira Y, Iijima M, Adachi H, Watanabe H, Sobue G. Muscle atrophy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: a computed tomography assessment. *Eur J Neurol*. 2014;21:1002-10. 査読あり
6. Koike H, Yoshida H, Ito T, Ohyama K, Hashimoto R, Kawagashira Y, Iijima M, Sobue G. Demyelinating neuropathy and autoimmune hemolytic anemia in a patient with pancreatic cancer. *Intern Med*. 2013;52:1737-40. 査読あり
7. Tomita M, Koike H, Kawagashira Y, Iijima M, Adachi H, Taguchi J, Abe T, Sako K, Tsuji Y, Nakagawa M, Kanda F, Takeda F, Sugawara M, Toyoshima I, Asano N, Sobue G. Clinicopathological features of neuropathy associated with lymphoma. *Brain*. 2013;136:2563-78. 査読あり
8. Ohyama K, Koike H, Masuda M, Sone J, Hashimoto R, Tomita M, Kawagashira Y, Iijima M, Nakamura T, Watanabe H, Sobue G. Autonomic manifestations in acute sensory ataxic neuropathy: a case report. *Auton Neurosci*. 2013;179:155-8. 査読あり
9. Ohyama K, Koike H, Iijima M, Hashimoto R, Tomita M, Kawagashira Y, Satou A, Nakamura S, Sobue G. IgG4-related neuropathy: a case report. *JAMA Neurol*. 2013;70:502-5. 査読あり

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 難治性ニューロパチー治療に対する現状と展望 慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー. 飯島 正博. 第 33 回 日本神経治療学会 (2015 年 11 月 26-28 日, 名古屋国際会議場、愛知県 名古屋市)
2. EAN による脱髄に伴う軸索障害機序の解明. 飯島 正博, 小池 春樹, 川頭 祐二, 大山 健, 高橋 美江, 祖父江 元. 第 26 回日本神経免疫学会 (2014 年 9 月 4-6 日, 金沢歌劇座、石川県 金沢市)
3. 高度の神経肥厚を特徴とする CIDP の臨床的検討. 飯島 正博, 両角 佐織, 高橋 美江, 大山 健, 川頭 祐一, 小池 春樹,

- 祖父江 元. 第 25 回日本末梢神経学会 (2014 年 8 月 29-30 日, ホテル ルビノ京都堀川、京都府 京都市)
4. MORPHOLOGY OF NONMYELINATING SCHWANN CELLS IN CHRONIC INFLAMMATORY DEMYELINATING POLYNEUROPATHY. Koike H, Takahashi M, Ohyama K, Kawagashira Y, Iijima M, Sobue G. (Inflammatory Neuropathy Consortium. 2014. July 13-16<sup>th</sup>, (Dusseldorf) Germany)
5. MUSCLE ATROPHY IN CHRONIC INFLAMMATORY DEMYELINATING POLYNEUROPATHY: A COMPUTED TOMOGRAPHY ASSESSMENT. Ohyama K, Koike H, Katsuno M, Takahashi M, Hashimoto R, Kawagashira Y, Iijima M, Adachi H, Watanabe H, Sobue G. (Inflammatory Neuropathy Consortium. 2014. July 13-16<sup>th</sup>, (Dusseldorf) Germany)
6. TAG-1 ノックアウトによる再髄鞘化機転への影響と軸索脆弱性の解析. 飯島 正博, 高橋 美江, 大山 健, 橋本 里奈, 川頭 祐一, 小池 春樹, 祖父江 元. 第 55 回日本神経学会 (2014 年 5 月 18-21 日, 福岡国際会議場、福岡県 福岡市)
7. TAG-1 欠損マウスにおける実験的自己免疫性神経炎による臨床病理学的解析. 飯島 正博, 高橋 美江, 大山 健, 橋本 里奈, 川頭 祐一, 小池 春樹, 祖父江 元. 第 24 回日本末梢神経学会 (2013 年 8 月 23-24 日, 朱鷺メッセ、新潟県 新潟市)
8. TAG-1 ノックアウトマウスにおける EAN 誘導による軸索脆弱性の検討. 飯島 正

博, 小池 春樹, 川頭 祐一, 橋本 里奈, 大山 健, 祖父江 元. 第 54 回日本神経学会 (2013 年 5 月 29 日-6 月 1 日, 東京国際フォーラム、東京都 千代田区)

〔図書〕(計 8 件)

1. 【免疫性神経疾患-基礎・臨床研究の最新知見】免疫性末梢神経疾患 慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー(CIDP) CIDP の疫学・症状と神経症候. 飯島 正博, 祖父江 元. 日本臨床(0047-1852)73 巻増刊 7 免疫性神経疾患 Page (総ページ 883) 400-407(2015.09)
2. 【免疫性神経疾患-病態解明と治療の最前線】慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー(CIDP) CIDP の病態. 飯島 正博. 医学のあゆみ(0039-2359)255 巻 5 号 Page (総ページ 573) 421-425(2015.10)
3. 【GBS と CIDP-診療 New Standards】慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー(CIDP) 疫学、経過、予後と症候. 飯島 正博, 祖父江 元. Clinical Neuroscience(0289-0585)32 巻 3 号 Page (総ページ 111) 313-318(2014.03)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者:

飯島 正博 (Iijima, Masahiro)  
(名古屋大学・医学系研究科・寄附講座講師)  
研究者番号: 40437041

(2) 研究分担者:

祖父江 元 (Sobue, Gen)  
(名古屋大学・医学系研究科・特任教授)  
研究者番号: 20148315

川頭 祐一 (Kawagashira, Yuichi)  
(名古屋大学・医学部附属病院・病院助教)  
研究者番号: 40569779

小池 春樹 (Koike, Haruki)  
(名古屋大学・医学系研究科・准教授)  
研究者番号: 80378174