

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 2 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462760

研究課題名(和文) 抗アクアポリン4抗体陽性視神経脊髄炎に対する基礎的病態解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Basic approach to elucidate pathogenesis and develop innovative therapy for anti-aquaporin-4 seropositive optic neuritis.

研究代表者

毛塚 剛司 (KEZUKA, TAKESHI)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00287137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：CGRP遺伝子導入樹状細胞を用い、実験的自己免疫性視神経炎(EAON)に対する遺伝子治療の可能性について検討した。細胞注入群において、EAONの発症率は対照群の80%と比較すると、CGRP遺伝子導入群では50%と有意に抑制された。また、EAONの病理組織学的評価においても対照群に比べ有意に抑制した。CGRP遺伝子導入群から得られた脾細胞培養上清ではIL-10が高値となった。さらに、抗アクアポリン4抗体陽性視神経炎患者血清を採取し、二次元電気泳動(2D-DIGE)を行い、protein AMBPおよびNicotin-1が患者血清と正常血清との間でスポット上の差を認めた。

研究成果の概要(英文)：A human CGRP-expressing plasmid was constructed, and used to transfect mouse bone marrow-derived matured DC (mDC) by electroporation methods. For gene therapy, Experimental autoimmune optic neuritis (EAON) developed in 50% of mice in the CGRP-transfected group compared with 80% in the mock-transfected group, and the mean pathological score for EAON was 1 in the CGRP-transfected group compared with 2 in the mock-transfected group. IL-10 production by spleen cells in the CGRP-transfected group increased independent of MOG concentration, compared with the mock-transfected group. Collected serum from the patients with anti-aquaporin-4 seropositive optic neuritis was measured the protein level using 2D-DIGE. The protein levels of AMBP and Nicotin were elevated in the serum collected from the patients with anti-aquaporin-4 seropositive optic neuritis.

研究分野：神経眼科

キーワード：抗アクアポリン4抗体陽性視神経炎 視神経脊髄炎 二次元電気泳動 アストロサイト マウス実験的  
自己免疫性視神経炎 タンパク解析 樹状細胞療法

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患の1つと考えられている視神経炎は、10万人中2人程度の比較的まれな疾患であるが、そのうち10%程度は治療薬であるステロイドに抵抗性で失明を余儀なくされる。ステロイド抵抗性視神経炎の中でも、抗aquaporin 4 (AQP4)抗体陽性もしくは抗myelin-oligodendrocyte glycoprotein(MOG)抗体陽性の場合、ステロイド治療に反応しにくかったり再発したりする。これらの抗体特異的視神経炎はアジア人に多いとされるが、まだ本邦では疫学的に実態数が把握できていない状況である(この視神経炎疫学調査においては平成27年度から厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業である「神経免疫学的視点による難治性視神経炎の診断基準の作成：班長 北里大学 石川均」として調査中である)。

難治性視神経炎マウスモデルでは、その発症機序として自己免疫性機序が最も重要であり、機能的な視力低下に続いて視覚誘発電位(VEP)が低下し、神経グリア細胞、特にミクログリアがまず視神経内に侵入して病態を引き起こすことを証明した。さらに、視神経炎マウスはIL-10などの抑制性サイトカインや神経ペプチドであるCGRPを遺伝子導入した樹状細胞を静脈内に注入すると、抗原非特異的に炎症局所に集簇し、炎症を抑制することが判明した。次に応募者らは、ヒト抗AQP4抗体陽性視神経炎患者血漿から抽出したIgGをマウスに注入し、マウス抗AQP4抗体陽性視神経炎を作成して、その病態機序には抗AQP4抗体と補体が結合して神経グリア細胞の1種であるアストロサイトを攻撃することを発見した。マウスを用いた抗体特異的難治性視神経炎の発症機序はほぼ解明が終了し、抗AQP4抗体陽性視神経炎では、中枢神経内のアストロサイトが標的細胞となり、抗MOG抗体陽性視神経炎では中枢神経内のオリゴデンドロサイトが標的細胞であった。

マウスモデルの発症機序を踏まえ、ヒト難治性視神経炎である抗体特異的視神経炎の臨床経過の調査を行った。抗AQP4抗体陽性視神経炎は、複数回発症した場合にステロイド治療がほとんど無効となり、抗体を除去する治療を行わないと寛解しなかった。また抗MOG抗体陽性視神経炎ではステロイド治療に反応するが、ステロイド治療を終了するとすぐに視神経炎が再発し、抗体を除去しないかぎり視神経炎を繰り返してしまうことが判明し、これらの抗体は通常単独で存在するが、どちらも存在する症例もみられた。このように抗体特異的視神経炎に対する臨床所見は判明したが、それらの視神経炎では抗体そのものだけが視神経障害をきたしているのか、それとも他の機序を介して視神経障害を起こしているのか、まだ判明していない。

## 2. 研究の目的

難治性視神経炎の疾患は血清中の特異抗体を測定することにより判別できるが、他に失明に結びつく要素のある蛋白があるかは不明である。そこで、マウス視神経炎モデルの視神経組織および特異抗体陽性視神経炎患者の血清や髄液サンプルを用いて、二次元電気泳動(2D-DIGE)によるスクリーニングを行い、疾患特異的新規マーカーを網羅的に探索する。

## 3. 研究の方法

実験1：実験的自己免疫性視神経炎モデル(EAON)の作成および視神経のタンパク解析  
➤EAE-EAONの作成方法の手順：使用動物はC57BL6/Jマウス(8~10週)を用いた。ミエリン蛋白(MOG35-55)をジメチルスルホキシドとアジュバントを混和させ、頸部皮下に注射させ、(300µg/匹)同時に百日咳トキシン(100µl/マウス)を腹腔内投与した。  
➤EAE-EAONマウス免疫21日めに屠殺して視神経のみを摘出する。同時に正常対照群として、非免疫マウスを屠殺して同様に視神経を摘出した。

➤EAE-EAON マウス免疫21日めに屠殺して視神経のみを抽出した。この時、視神経炎を発生しているかどうかHE 染色を行って確認するとともに、抗CD3抗体や抗GFAP 抗体、抗MBP抗体、抗Iba-1抗体などの免疫染色を行い、視神経炎の免疫動態を解析した。さらに視神経組織および所蔵リンパ節細胞を抗原刺激して、培養上清をFACS もしくはELISA で免疫学的解析を行った。

➤EAE-EAONマウスから抽出された視神経をホモジネートして、検体とした。

➤視神経由来の検体を用いて二次元の蛍光差ジェル電気泳動を行う。ラベリングはレッドとグリーンに分けた。

➤免疫マウス視神経由来タンパク、正常マウス視神経タンパクとの間のタンパク質表現比率を解析した。さらに特異的に表された点はMALDI-TOF 質量分析によって分析を行った。

➤質量分析によって既知の神経特異的なタンパク質と比較検討した後に、免疫マウス視神経由来タンパクの量的図と正常マウス視神経タンパクと比較して、表現型としてのレベルの差を判定した。

実験2：抗AQP4抗体陽性視神経炎または抗MOG抗体陽性視神経炎患者血清の採取および二次元電気泳動を用いた新規疾患特異的タンパクの同定

➤同意が得られた抗AQP4抗体陽性視神経炎または抗MOG抗体陽性視神経炎患者から血液10cc を採取し、血清成分に分離して実験に用いた。

➤ヒト検体を用いた2D-DIGEスクリーニング：血清抗AQP4抗体陽性もしくは血清抗MOG抗体陽性タンパク質の二次元の蛍光差ジェル電気泳動を行った。ラベリングはレッドとグリーンに分けた。

➤血清抗AQP4抗体陽性もしくは血清抗MOG抗体陽性タンパク質、正常血清との間のタンパク質表現比率を解析した。そして、特異的に表された点はMALDI-TOF質量分析によって分

析を行った。

➤質量分析によって既知の神経特異的なタンパク質と比較検討した後に、血清抗AQP4抗体陽性タンパクの量的図と血清抗MOG抗体陽性と比較して、表現型としてのレベルの差を判定した。

実験3：同定された特異的タンパクを標的としたマウス自己免疫性視神経炎を用いた治療

➤同定された疾患特異的タンパクに対する抗体もしくはsiRNAを作成もしくは購入し、MOG免疫マウス視神経炎モデルに対して抗体もしくはsiRNAを注入し、視神経炎の抑制効果を検討した。

➤MOG免疫マウス由来の脾細胞もしくは所属リンパ節細胞を培養し、得られた上清から種々のサイトカイン（IFN- $\gamma$ 、IL-17、IL-10など）を測定し、培養細胞からFoxP3 陽性細胞のようなregulatory細胞を検出した。

実験4：同定された疾患特異的タンパクの難治性視神経炎における陽性率の調査

➤特発性視神経炎患者から得られた血清中に、同定された疾患特異的タンパクが含まれている陽性率を調査した。

#### 4. 研究成果

AQP4 抗体陽性かつステロイドパルス療法不応例である視神経脊髄炎（NMO）患者症例から、血漿交換療法時に発生した廃棄血漿を患者の同意の下に回収し、IgG 分画の抽出精製した（東京医科大学倫理委員会承認番号1971）。

##### 1. NMO 血漿のアストロサイトへの障害の検討 -in vivo モデル-

C57BL6/J マウスを用いて、ミエリン蛋白（MOG35-55）を強化検疫し、（300  $\mu$ g/匹）同時に百日咳トキシン（100  $\mu$ l/マウス）を腹腔内投与し、EAE-EAON（実験的自己免疫性視神経炎モデル）を作成した。患者血漿を IgG カラム NMO-IgG をマウスに免役する 2 日前から 2 回、100mg/匹の割合で腹腔内投与した。免疫 14 日目にマウスを屠殺して、視神経の

アストロサイトの障害を H-E 染色で確認すると同時に、GFAP 染色で評価した。また視神経炎に対して、Optomotry™ でマウスの視力測定を行い、臨床的にスコア評価を行ったところ、NMO-IgG 投与マウス群で視力の低下が認められた。

## 2. NMO-IgG のマウスアストロサイトの反応性を検討 -in vitro モデル-

NMO-IgG 内に抗 AQP4 抗体が含まれているため、NMO-IgG はアストロサイト上に存在する AQP4 を認識することが予想される。このため、大脳皮質由来のアストロサイトを新生児マウスより単離し培養して、アセトン固定後に以下の抗体と反応させ、免疫染色法で評価した。結果は、実験群（アストロサイト：GFAP-FITC（マウス由来）+抗ヒト IgG 抗体）においてアストロサイト上の AQP4 と反応し、染色されることを確認した。培養上清サイトカインを ELISA、フローサイトメトリーを用いて測定したが、有意なサイトカイン上昇は得られなかった

3. ex vivo モデルの作製（実験 1）と NMO-EAON に対する高濃度 IgG 投与実験を ex vivo モデルや in vivo モデルを用いて解析した。AQP4 抗体陽性かつステロイドパルス療法不応例である視神経脊髄炎（NMO）患者症例から、血漿交換療法時に発生した廃棄血漿を患者の同意の下に回収し、IgG 分画の抽出精製した（東京医科大学倫理委員会承認番号 1971）。

## NMO-IgG のアストロサイト障害性の検討 -ex vivo モデル-

マウス視神経を採取したのち 24 時間、酸素化した培養液内に加えて、1) - 5) の条件で培養を行った。1) 培養液のみ（髄液の組成と同等）、2) 正常人血清（10 µg/ml）、3) NMO-IgG（300 µg/ml）4) 補体（10% Pooled Normal Human Complement, Novi 社）、5) NMO-IgG + 補体である。評価としては、アストロサイトの障害の程度を GFAP 染色を用い

て病理組織学的に行った。使用抗体は、アストロサイトの染色として GFAP 染色、HRP-Labelled Polymer, DAB(発色試薬)である。健常者血清、補体、NMO-IgG 群で GFAP 染色面積が増加し、NMO-IgG+補体投与群では、GFAP 染色面積が有意に減少していることが判明した。

## 4. NMO-EAON の ex vivo、in vivo モデルを用いた高濃度 IgG 投与による発症抑制実験

NMO-EAON の in vivo、ex vivo モデルを昨年度の方法で作成して、視神経組織の培養下でヒト IgG 0.5-1.0mg/ml + ヒト NMO-IgG + 補体を加えて、組織の変化を解析した。組織染色はアストロサイトの生存率を中心に検討した。NMO-EAON の in vivo モデルは NMO-IgG の状態によるものか、発症率にバラツキがあり、高濃度 IgG 投与実験の陽性コントロールとして問題があった。一方、実験 1 で示した ex vivo モデルについては、高濃度 IgG の in vitro 投与により、NMO-IgG+補体群で抑制された GFAP 染色面積が一定量の割合で復元された。

## 5. in vivo モデルを用いた EAON に対する細胞治療

免疫後 1 日目の細胞注入群において、EAON の発症率は対照群の 80%と比較すると、CGRP 遺伝子導入群では 50%と有意に抑制された。また、EAON の病理組織学的評価においても対照群に比べ有意に抑制した(CGRP 遺伝子導入群：対照群 = 1 : 2)。EAE-EAON 発症直前である 9 日目の細胞注入群では、EAE の臨床学的評価(CGRP 遺伝子導入群：対照群 = 1.5 : 3) および EAON の病理組織学的評価(CGRP 遺伝子導入群：対照群 = 1 : 2)は有意に抑制された。遅延型過敏反応 (DH) は CGRP 遺伝子導入成熟樹状細胞の注入により抑制された。CGRP 遺伝子導入群から得られた脾細胞培養上清では IL-10 が高値となり、さらに脾細胞の制御性 T 細胞のマーカーである CD4+CD25+Foxp3 の発現が有意に高値を示した。

## 6. 二次元電気泳動を用いた抗アクアポリン 4 抗体陽性視神経炎の病態解析

抗アクアポリン 4 抗体陽性視神経炎患者血清を採取し、二次元電気泳動 (2D-DIGE) を行い、原因タンパクの同定を試みたところ、protein AMBP および Nicotin-1 が患者血清と正常血清との間でスポット上の差を認めた。一方、特発性視神経炎患者から得られた血清では正常血清と差が見られなかった。他に、Adiponectin、Carbonic anhydrase 1、Carbonic anhydrase 2 で抗アクアポリン 4 抗体陽性視神経炎と正常血清とのわずかな差を認めたが、有意差はなかった。抗アクアポリン 4 抗体陽性視神経炎患者血清と正常血清との間で有意差が見られた protein AMBP および Nicotin-1 タンパクにおいて、抗アクアポリン 4 抗体陽性視神経炎の病態と関与するか確かめるために、患者血清を用いて ELISA を行った。12 検体を用いて正常血清と比較検討したところ、protein AMBP では両者に差を認めなかった。一方、Nicotin-1 タンパクでは正常血清に比べて抗アクアポリン 4 抗体陽性視神経炎患者血清において、増加傾向がみられた。

## 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 7 件)

毛塚剛司 . 抗 MOG 抗体 眼科の立場から . 特集 視神経症と自己抗体との関連 . 眼科 査読無、59, 2017, 7-12.

毛塚剛司 . 視神経炎 . 特集/眼科における薬物療法パーフェクトガイド . MB OCULI . 査読無、No.48, 2017, 128-133.

Matsuda R, Kezuka T, Umazume A, et al. Clinical Profile of Anti-Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibody Seropositive Cases of Optic Neuritis. Neuroophthalmology. 査読有、39, 2015, 213-219.

毛塚剛司 視神経炎の病態理解と治療方針 . 診療指針のパラダイムシフト . 眼科 査読無、56,2014,272-276.

毛塚剛司 抗アクアポリン 4 抗体陽性視神経炎 . 特集 / 視神経炎のよりよい治療 . MB OCULI . 査読無、No.13,2014, 20-26.

毛塚剛司 視神経脊髄炎 神経眼科における免疫学的進歩 . 神経眼科 査読無、31, 2014,5-12.

毛塚剛司 抗 AQP4 抗体陽性視神経炎 . 眼科 査読無、56, 2014, 929-935.

[学会発表](計 8 件)

毛塚剛司、石川均、後関利明、他、抗MOG抗体陽性視神経炎調査班 . 抗ミエリンオリゴデンドロサイトグリコプロテイン抗体陽性視神経炎の診断と治療 難治性視神経症の診断・治療に対する最近の考え方 第70回日本臨床眼科学会 2016.11.3-6 京都

毛塚剛司、藤田聖也、馬詰朗比古、他 . 視神経炎における血清抗アクアポリン 4 抗体測定法の比較検討 . 第 120 回日本眼科学会総会 2016.4.7-10 仙台

毛塚剛司、石川均、後関利明、他、抗MOG抗体陽性視神経炎調査班 難治性視神経炎全国調査 計画および導入について - 第 54 回日本神経眼科学会 2016.11.25-26 宮崎

Kezuka T. What is aquaporin 4 seropositive optic neuritis? New concepts of ocular inflammation and immunology. 13<sup>th</sup> Congress of International Ocular Inflammation Society. September 26, 2015. San Francisco. USA.

毛塚剛司 臨床眼科学 : 今が旬 ! 視神経炎の今 第 69 回日本臨床眼科学会 2015 年 10 月 22-25 日 名古屋

毛塚剛司 視神経疾患の最前線 : 視神経炎治療の最前線 第 69 回日本臨床眼科学会モーニングクルーズ 2015 年 10 月 22-25 日 名古屋

毛塚剛司、藤田聖也、馬詰朗比古、他．視神経炎における血清中ミエリン塩基性タンパク濃度と視機能異常との関係．第 53 回日本神経眼科学会総会 2015.11.6-7. 大宮

\*Kezuka T, Matsunaga Y, Umazume A, et al.Characterization of microcystic macular edema in patients with optic neuritis. AAO annual meeting 2015. Las Vegas, USA. 2015.11.14-17. (\*Received the highest grades by the annual meeting program committee and selected as Best Posters.)

〔図書〕(計 4 件)

毛塚剛司．視神経炎．MEDICAL VIEW,眼科診療マイスター 診断と治療 編集：飯田知弘、中澤 徹、堀 裕一 2017, p.282-285.

毛塚剛司．視神経炎と多発性硬化症．医学書院 編集：三村治、谷原秀信．知っておきたい神経眼科診療 眼科臨床エキスパート,2016, p.36-45.

毛塚剛司．医学書院 抗アクアポリン 4 抗体陽性視神経炎．今日の眼疾患治療指針第 3 版 編集：大路正人、後藤浩、山田昌和、野田徹, 2016, p.638-639.

毛塚剛司．自己免疫性視神経炎．日本臨牀社 別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.34 免疫症候群(Ⅰ)(第 2 版), 2015, p530-534.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

毛塚 剛司 (KEZUKA, Takeshi)  
東京医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：00287137

### (2)研究分担者

松永 芳径 (MATSUNAGA, Yoshimichi)  
東京医科大学・医学部・兼任助教  
研究者番号：20421050

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )