

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
「多発性硬化症に対する新規分子標的治療法の開発」班
分担研究報告書

多発性硬化症に対する新規分子標的治療法の開発

研究代表者 山下 俊英 大阪大学 分子神経科学 教授

【研究要旨】

本研究の最終目標は、多発性硬化症(MS)の発症および病態形成を制御する分子標的治療薬を開発し、臨床応用を実現することである。MSは複数の神経症候が再発と寛解を繰り返し、比較的強い障害が残る例が少なくなく、根本的治療法が確立していないのが現状である。我々は、抗RGM抗体治療薬が、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発症を抑制し、さらに修復過程を促進することを見いだした。したがってRGM阻害剤は多発性硬化症の各病期に対する症状緩和に寄与するのみならず、根本的治療薬として有望である。我々は、脊髄損傷治療薬としてヒト型抗RGMモノクローナル抗体を製薬企業との共同開発で進めている。本研究では、RGMモノクローナル抗体のMSの急性増悪期および再発寛解型に対する薬剤としてのfeasibility studyを実施している。複数の実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルを用いて、各病期における薬効・薬理試験を行い、薬剤治療の最適条件を決定することが本研究の到達目標である。今年度の研究によって、自己免疫性脳脊髄炎におけるRGMの機能を明らかにした(Nature Med., 2011)。また、RGM中和抗体がEAEの発症を抑制すること、また症状の改善を促進することを明らかにした。さらに、抗体のin vivoでの効果のメカニズムを明らかにした。また再発時および寛解期のMS患者（21症例）のPBMCを用いて、PMAとionomycinによりT細胞を活性化し、RGM抗体を作用させると、T細胞の増殖および炎症性サイトカイン産生が抑制された。以上より、RGM中和抗体が多発性硬化症の各病期に対して有効であることを示し、薬剤の作用機序を解明した。特に臨床研究による結果は、MSに対する有効性を強く示唆する結果であり、今後の臨床応用を加速させるものである。本研究終了後、速やかに前臨床試験へ移行し、問題のないことを確認したうえで臨床治験に進む。本薬剤は多発性硬化症の根本的治療薬となりうる点で医学的に貢献するのみならず、特に「要介護状態」からの回復が可能になるという観点で、医学経済面での大きな貢献も望める。

A. 研究目的

本研究の最終目標は、多発性硬化症(MS)の発症および病態形成を制御する分子標的治療薬を開発し、臨床応用を実現することである。MSは複数の神経症候が再発と寛解を繰り返し、比較的強い障害が残る例が少なくなく、根本的治療法が確立していないのが現状である。我々はこれまで中枢神経系の再生阻害の分子機構の解明を行い、軸索再生阻害因子としてrepulsive guidance molecule (RGM)を同定し、様々な中枢神経疾患による神経症状を緩和する分子標的となることを見いだした(Neuron,

Nature Neurosci., J Cell Biol 3報, EMBO J, J Neurosci 6報など)。我々はexpression analysisを行い、RGMaが免疫系細胞である樹状細胞に発現していることを突き止めた。これにより、免疫制御におけるRGMaの役割の解析へと進んだ。抗RGM抗体治療薬が、実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症を抑制し、さらに修復過程を促進することを見いだした。したがってRGM阻害剤は多発性硬化症の各病期に対する症状緩和に寄与するのみならず、根本的治療薬として有望である。我々は、脊髄損傷治療薬としてヒト型抗RGMモノクローナル抗体を

製薬企業との共同開発で進めている。本研究では、RGMモノクローナル抗体のMSの急性増悪期および再発寛解型に対する薬剤としてのfeasibility studyを実施する。複数の実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルを用いて、各病期における薬効・薬理試験を行い、薬剤治療の最適条件を決定することを本研究の到達目標とする。本研究終了後、速やかに前臨床試験へ移行し、問題のないことを確認したうえで臨床試験に進む。本薬剤は多発性硬化症の根本的治療薬となりうる点で医学的に貢献するのみならず、特に「要介護状態」からの回復が可能になるという観点で、医学経済面での大きな貢献も望める。

B. 研究方法

具体的な実施項目は以下のとおりである。

4. RGMによるT cellの活性化の分子メカニズムの解析を行った。
5. マウスのEAEモデルを作成し、RGM中和抗体の投与による、その後の症状の改善の有無を評価した。さらに抗体の作用のメカニズムをin vivoで明らかにした。
6. 多発性硬化症のPBMCを用いて、RGM中和抗体の作用について検証した。さらに多発性硬化症の脳・脊髄の組織を用いて、蛋白発現解析を行った。

具体的な方法は以下の通りである。

- マウス：C57BL/6, SJL/J, CAG-EGFP mice, CD11b-DTR mice (age: 8–10 weeks)を用いた。
- EAEの作成：C57BL/6マウスに対してはMOG、SJL/Jマウスに対してはPLPで免疫し、慢性あるいは再発性のEAEを誘導した。RGM中和抗体を全身あるいはintrathecalに投与した。その後、EAE scoreおよび組織的な検討を行った。
- T cell proliferation assay：EAE 21日目に、splenocytesを採取し、MOG peptideで刺激し、BrdU incorporation

および炎症性サイトカインの測定を行った。

- Adoptive transfer 実験：bone marrow dendritic cellsを採取し、RGM siRNAあるいはcontrol siRNAをtransfectionすることで、RGMをノックダウンした。この細胞をrecipient miceに移入した。またEAEマウスにRGM治療を施したもの、施さなかったものから、脾細胞を採取し、再刺激を行った後に、CD4⁺ T細胞を分離し、recipient miceに移入した。
- CD4⁺ T cellsの増殖およびサイトカイン産生の解析：EAEマウスから脾臓を取り出し、BrdUの取り込みおよび炎症性サイトカインの産生を解析した。
- マウスに脊髄損傷を作製し、その後RGM中和抗体を腹腔内投与した。
- Rap1 pull down assay：Rap1のeffectorであるRalGDSを用いて、active Rap1を測定した。
- Lymphocyte-binding assay：T cellsのICAM-1-Fcへの結合を測定した。
- 組織を用いた免疫染色を行った。
- 多発性硬化症のPBMCを用いた解析：PBMCを用いて、cytokine analysisを行った。

(倫理面への配慮)

予定している組換えDNA実験と動物実験については、当該実験のための設備・体制は完備されている。組換えDNA実験については、関係法令を遵守して行った。また、動物の取扱いについては文部科学省および所属機関の指針に基づいて、所属機関の承認を得たうえで行われた。臨床研究については、血液採取対象者には研究の概要を説明の上、同意書を得ることとしており、所属機関の倫理委員会の審査を経ている。また、本研究はヘルシンキ宣言（2000年エジンバラ総会で改定）及び厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針（平成15年7月30日施行）の趣旨を尊重し計画されたものであり、

対象者個人の人権擁護を優先し、医の倫理的配慮をするものとする。また、その旨を対象者へと伝えるとともに、対象者への説明文書に下記の事項を明記し、対象者の人権擁護に配慮するものとする。

- 3) この研究に参加するかどうかは、対象者の自由意思によるものとし、参加しなくても不利益を受けることは一切ない。また、一旦同意した場合でも、不利益をこうむることなく、いつでも同意を撤回できる。
- 4) この研究での個人情報外部に漏れることがないように厳重に管理する。

C. 研究結果

まず樹状細胞でのRGMの役割について検証した。Bone marrow-derived dendritic cellsをLPSで刺激して活性化させると、RGMの発現が高まった(Figure 1a, b)。一方で、CD4⁺ T細胞にはRGMに対する受容体が発現していた(Figure 1c)。CD4⁺ T細胞をRGMで刺激すると、細胞内でRap1の活性化がおこり(Figure 1d)、それに伴ってICAM1への接着が強まった(Figure 1e; 参考図2)。これらの結果から、樹状細胞に発現するRGMがCD4⁺ T細胞を活性化し、免疫シナプスを強化することによって、CD4⁺ T細胞の活性化を促進することが示唆される。

次にin vivoでのRGMおよびその受容体neogeninの発現を検討した。EAEを発症したマウスの脊髄、リンパ節、脾臓で検証した。するとCD11c-positiveなmyeloid dendritic cells (DC)では、EAE発症によってRGMの発現上昇が起こった(Figure 2a; Supplementary Fig. 1a)。一方で、mPDCA-positiveなplasmacytoid DCでは、RGMの発現は認められたが、正常な状態とEAE発症後では、その発現レベルに変化はなかった(Figure 2b; Supplementary Fig. 1b)。さらにCD4⁺ T細胞では、定常的にneogeninが発現していた(Figure 2c; Supplementary Fig. 1c)。これらのCD4⁺ T細胞

では、EAE発症後においてRap1の活性が上昇していた(Figure 2d)。

多発性硬化症のautopsied samples (脳および脊髄) を用いて免疫染色を行った。CD83陽性のmature DCおよびCD209陽性のimmature DCにRGMが発現していることが示された(Figure 2e)。また多発性硬化症のPBMCにおけるCD3陽性T細胞にneogeninが発現していた(Figure 2f)。この発現はhealthy controlのPBMCでも同レベルで認められた(Figure 2g)。さらに多発性硬化症のautopsied samples (脳および脊髄) におけるCD3陽性T細胞にもneogeninが発現していた(Supplementary Fig. 1d)。

RGMの機能をin vivoで抑制するために、MOGによってEAEを惹起したマウスに、RGM中和抗体を全身投与した。当該抗体は7日後にspleenおよびlymph nodesに存在していた(Supplementary Fig. 2a)。RGM中和抗体を全身投与すると、神経症状の重症度(EAEスコア)の軽快が得られた(Figure 3 a-e)。しかしながらonsetを遅らせる効果は認められなかった。脳脊髄への炎症性細胞の浸潤は、RGM抗体投与によって有意に抑えられていた(Figure 3f-h)。それに伴い、脱髄も抑制され(Figure 3i)、神経軸索の損傷も軽快した(Figure 3j)。

以上のRGM中和抗体の効果は、樹状細胞に発現するRGMを中和抗体がブロックしたためと考えられる。このことを以下の実験で証明した。Bone marrow derived dendritic cells (BMDCs)で、RGMの発現をノックダウンさせた(Supplementary Fig. 2b)。このBMDCsを活性化し、recipient miceに移入した。そうするとコントロール群ではEAEが発症するが、RGMノックダウン群では、EAE症状が軽減し(Figure 4a)、炎症性細胞の浸潤が抑制された(Supplementary Fig. 2c)。さらにEAEマウスから採取したT細胞を他のマウスに移入すると、EAEが発症するが、RGM抗体投与を受けたEAEマウスから採取したT細胞を他のマウスに移入すると、EAEの発

症が抑えられた (Figure 4b)。これらの結果より樹状細胞のRGMがEAEの増悪を促進しているというメカニズムを明らかにした。

活性化を受けたCD4⁺ T細胞は、blood brain barrierを足場として、脳脊髄内に侵入する。RGM抗体が脳脊髄内への侵入を抑制しているかどうかを検証するために、in vitroおよびin vivoの系を確立し、実験を行ったが、結論はRGM抗体がCD4⁺ T細胞の脳脊髄内への侵入をブロックするものではないというものであった(Figure 4c-f)。

さらに、再発寛解を繰り返す実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスモデル (PLP-SJL) を用いて、RGM中和抗体がEAE症状の再発を抑制すること、また症状の寛解にも効果を発揮することを明らかにした (Figure 4g; 参考図3)。再発前に投与したRGM中和抗体は、脳および脊髄に到達することも示した(Supplementary Fig. 2d)。

次に、他の細胞におけるRGMaの役割について検証した。マクロファージはneogeninを発現するが、RGMaは発現しなかった(Supplementary Fig. 3a-d)。ミクログリアはRGMaを発現していることを、我々は過去に報告している。B細胞には、RGMaは発現していなかった(Supplementary Fig. 3c)。マクロファージに発現するneogeninを特異的に抑制するために、CD11b陽性細胞を消失させたCD11b-DTRマウスに、neogeninをノックダウンさせたマクロファージ(Supplementary Fig. 3e)を移入した。このマウスにMOGでEAEを誘導したが、wild typeのマウスと比べてEAEの重症度に差はなかった(Supplementary Fig. 4a)。

さらに中枢神経系に局在するミクログリアに発現するRGMを抑制するために、EAEを誘導したマウスに、intrathecalにRGM中和抗体を投与した。しかしながらコントロール抗体投与群と比較して、EAEの重症度に差はなかった(Supplementary Fig. 4b)。これらの結果より、RGM中和抗

体はミクログリアやマクロファージに作用して、効果を現しているのではないことが示唆される。

脊髄損傷させたマウスにRGM中和抗体を腹腔内投与しても、その後の運動機能の改善に差は認められなかった(Supplementary Fig. 4c)。この実験結果は、脊髄損傷下でのimmune modulationが機能改善に寄与しない可能性を示唆している。

In vitroでは、EAEマウスより採取したsplenocytesをMOGで刺激すると、T細胞の活性化による増殖および炎症性サイトカインの産生の亢進がおこるが、これらの反応をRGM抗体は顕著に抑制した (Figure 5a)。抗体はTh1およびTh17サイトカインを抑制したが、IL10は増加させたことから、EAEを増悪させるT細胞特異的に、抗体が抑制効果を有すると考えられた。

また再発時および寛解期のMS患者のPBMCを用いて、PMAとionomycinによりT細胞の増殖、炎症性サイトカイン産生を亢進させた時、RGM抗体を作用させると、T細胞の増殖およびサイトカイン産生を抑制することが明らかになった (Figure 5b)。

D. 考察

これまでの研究により、EAEおよび多発性硬化症におけるRGMの詳細なメカニズムが明らかとなった。すなわち、抗原提示細胞に発現しているRGMは、末梢と脳脊髄内でT細胞に働きかけて、抗原提示細胞によるT細胞の活性化およびサイトカインの産生を促進する。RGM中和抗体は、RGMの機能を阻止することにより、一連の反応をブロックし、脳脊髄炎症症状を緩和する (参考図4)。RGM中和抗体は多発性硬化症の各病期に対する症状緩和に寄与するのみならず、根本的治療薬として有望であることが、これらの知見より明らかになった。特にFigure 5の結果は、当初の期待を上回る成果であり、今後の開発研究を加速させるもので

ある。なお、以上の研究は、我々が開発した抗体を用いて行ったものである。

本研究課題において、抗 RGM モノクローナル抗体について、「多発性硬化症に対する根本的分子標的治療薬」としての feasibility study を実施し、薬剤治療の最適条件を見いだすことを到達目標としている。本研究終了後、前臨床試験へ移行し、問題のないことを確認したうえで臨床試験に進み、迅速に実用化を進めていく。中枢神経疾患による神経症状については現時点で有効な治療法が存在しないため、WHO は中枢神経疾患を「クオリティ・オブ・ライフを脅かす最大の要因である」と位置づけている。本薬剤は、中枢神経機能障害をもたらす多くの疾患をターゲットとする点で医学的に貢献するのみならず、「要介護状態」からの回復が可能になるという観点で、医学経済面での大きな貢献も望める。中枢神経疾患の医療費は2000年時点で、全世界で340億ドルと心疾患領域に次いで2番目に大きい市場であり、さらに医療費の伸び率の高い領域（16%）である。

E. 結論

今年度の研究によって、自己免疫性脳脊髄炎における RGM 中和抗体の作用メカニズム、ならびに RGM の EAE および多発性硬化症における役割を明らかにすることができた。次年度以降における研究開発の加速化が図られる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Muramatsu, R., Kubo, T., Mori, M., Nakamura, Y., Fujita, Y., Akutsu, T., Okuno, T., Taniguchi, J., Kumanogoh, A., Yoshida, M., Mochizuki, H., Kuwabara, S. and Yamashita, T. (2011) RGMa modulates T cell responses and

is involved in autoimmune encephalomyelitis. *Nature Medicine*, 17, 488-494.

2. Fujita, Y., Endo, S., Takai, T. and Yamashita, T. (2011) Myelin suppresses axon regeneration by PIR-B/SHP-mediated inhibition of Trk activity. *EMBO J.* 30, 1389-1401.

2. 学会発表

15. 山下俊英 (2011) 中枢神経障害後の神経回路再編成と機能回復のメカニズム、九州大学神経内科 2011年同門会 特別講演、博多 (2011. 7. 2)
16. 山下俊英 (2011) 中枢神経障害後の神経回路再編成と機能回復のメカニズムの解明、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 2011年夏のワークショップ、神戸 (2011. 8. 21-24)
17. 山下俊英 (2011) 脳・脊髄損傷後の神経回路修復を制御する分子メカニズム、東北大学加齢医学研究所セミナー、仙台 (2011. 9. 9)
18. 山下俊英 (2011) 軸索再生阻害因子によるシグナル伝達機構、東北大学加齢医学研究所遺伝子導入研究分野セミナー、仙台 (2011. 9. 9)
19. 山下俊英 (2011) 視神経の軸索再生阻害の分子機構とその制御による再生誘導、第22回日本緑内障学会総会 シンポジウム、秋田 (2011. 9. 23-25)
20. 山下俊英 (2011) 脳・脊髄はなぜ再生できないのか？、第29回大阪科学賞受賞記念講演、大阪 (2011. 11. 2)
21. 山下俊英 (2011) 中枢神経回路の修復と再生（中枢神経障害による後遺症を克服する治療戦略）、神奈川科学技術アカデミー教育講座、東京 (2011. 11. 4)
22. 山下俊英 (2012) 脳・脊髄障害後の神経回路修復を制御するメカ

- ニズム、第8回宮崎サイエンスキャンプ、宮崎(2012.2.18-19)
23. 山下俊英(2012) 中枢神経疾患と免疫制御、大阪大学蛋白研セミナー「神経疾患の克服に向けて」、大阪(2012.3.1-2)
24. Yamashita, T. (2011) Receptors and cell signaling cascades regulating reorganization of the neural network. International Receptor Symposium 2011, Kyoto, Japan (2011.4.2)
25. Yamashita, T. (2012) Intraspinal rewiring of the corticospinal tract is induced by target-derived BDNF and compensates lost function after brain injury. Ninth World Congress on Brain Injury, Edinburgh, Scotland (2012.3.21-25)
26. Yamashita, T. (2012) Biological mechanisms of neural rewiring regulation in the central nervous system. Seminar at Janssen Pharmaceutica NV, Beerse, Belgium (2012.3.26)
27. 村松里衣子、久保武一、森雅裕、中村由香、藤田幸、桑原聡、山下俊英(2011) RGMaによる多発性硬化症の発症および再発の制御、第34回日本神経科学大会、横浜(2011.9.14-17)
28. 村松里衣子、山下俊英(2012) 多発性硬化症における軸索再生阻害因子RGMの役割、日本薬学会第132年会、札幌(2012.3.29-31)

H. 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称：T細胞活性化阻害剤、これを含む医薬組成物およびT細胞活性化阻害物質のスクリーニング法 ①発明者：山下俊英、久保武一 ②出願日：平成21年12月9日（特願2009-279189） ③出願人：国立大学法人大阪大学、国立大学法人千葉大学

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
「多発性硬化症に対する新規分子標的治療法の開発」班
分担研究報告書

多発性硬化症に対する新規分子標的の解析

分担研究者 桑原聡 千葉大学 神経内科学 教授

分担研究者 森雅裕 千葉大学 神経内科学 講師

【研究要旨】

本研究の最終目標は、多発性硬化症(MS)の発症および病態形成を制御する分子標的治療薬を開発し、臨床応用を実現することである。MSは複数の神経症候が再発と寛解を繰り返し、比較的強い障害が残る例が少なくなく、根本的治療法が確立していないのが現状である。本研究では、RGMモノクローナル抗体のMSの急性増悪期および再発寛解型に対する薬剤としてのfeasibility studyを実施している。我々は、再発時および寛解期のMS患者（21症例）のPBMCを用いて、PMAとionomycinによりT細胞を活性化し、RGM抗体を作用させると、T細胞の増殖および炎症性サイトカイン産生が抑制されることを見いだした。以上より、RGM中和抗体が多発性硬化症の各病期に対して有効であることを示した。特にこの結果は、MSに対する有効性を強く示唆する結果であり、今後の臨床応用を加速させるものである。

A. 研究目的

本研究の最終目標は、多発性硬化症(MS)の発症および病態形成を制御する分子標的治療薬を開発し、臨床応用を実現することである。MSは複数の神経症候が再発と寛解を繰り返し、比較的強い障害が残る例が少なくなく、根本的治療法が確立していないのが現状である。我々はexpression analysisを行い、RGMaが免疫系細胞である樹状細胞に発現していることを突き止めた。これにより、免疫制御におけるRGMaの役割の解析へと進んだ。抗RGM抗体治療薬が、実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症を抑制し、さらに修復過程を促進することを見いだした。したがってRGM阻害剤は多発性硬化症の各病期に対する症状緩和に寄与するのみならず、根本的治療薬として有望である。本研究では、RGMモノクローナル抗体のMSの急性増悪期および再発寛解型に対する薬剤としてのfeasibility studyを実施する。本研究終了後、速やかに前臨床試験へ移行し、問題のないことを確認したうえで臨床治験に

進む。本薬剤は多発性硬化症の根本的治療薬となりうる点で医学的に貢献するのみならず、特に「要介護状態」からの回復が可能になるという観点で、医学経済面での大きな貢献も望める。

B. 研究方法

具体的な実施項目は以下のとおりである。

1. 多発性硬化症の PBMC を用いて、RGM 中和抗体の作用について検証した。さらに多発性硬化症の脳・脊髄の組織を用いて、蛋白発現解析を行った。

具体的な方法は以下の通りである。

- 組織を用いた免疫染色を行った。
- 多発性硬化症の PBMC を用いた解析：PBMC を用いて、cytokine analysis を行った。

(倫理面への配慮)

臨床研究については、血液採取対象者には研究の概要を説明の上、同意書を得ることとしており、所属機関の倫理委員

会の審査を経ている。また、本研究はヘルシンキ宣言（2000年エジンバラ総会で改定）及び厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針（平成15年7月30日施行）の趣旨を尊重し計画されたものであり、対象者個人の人権擁護を優先し、医の倫理的配慮をするものとする。また、その旨を対象者へと伝えるとともに、対象者への説明文書に下記の事項を明記し、対象者の人権擁護に配慮するものとする。

- 1) この研究に参加するかどうかは、対象者の自由意思によるものとし、参加しなくても不利益を受けることは一切ない。また、一旦同意した場合でも、不利益をこうむることなく、いつでも同意を撤回できる。
- 2) この研究での個人情報が入部漏れることがないように厳重に管理する。

C. 研究結果

多発性硬化症のautopsied samples（脳および脊髄）を用いて免疫染色を行った。CD83陽性のmature DCおよびCD209陽性のimmature DCにRGMが発現していることが示された。また多発性硬化症のPBMCにおけるCD3陽性T細胞にneogeninが発現していた。この発現はhealthy controlのPBMCでも同レベルで認められた。さらに多発性硬化症のautopsied samples（脳および脊髄）におけるCD3陽性T細胞にもneogeninが発現していた。

また再発時および寛解期のMS患者のPBMCを用いて、PMAとionomycinによりT細胞の増殖、炎症性サイトカイン産生を亢進させた時、RGM抗体を作用させると、T細胞の増殖およびサイトカイン産生を抑制することが明らかになった。

D. 考察

これまでの研究により、RGM中和抗体は多発性硬化症の各病期に対する症状緩和に寄与するのみならず、根本的治療薬として有望であることが、これらの知見

より明らかになった。特にRGM中和抗体がサイトカインの産生を抑制するとの結果は、当初の期待を上回る成果であり、今後の開発研究を加速させるものである。

E. 結論

これまでの研究によって、自己免疫性脳脊髄炎におけるRGM中和抗体の作用メカニズム、ならびにRGMの多発性硬化症における役割を明らかにすることができた。次年度以降における研究開発の加速化が図られる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Muramatsu, R., Kubo, T., Mori, M., Nakamura, Y., Fujita, Y., Akutsu, T., Okuno, T., Taniguchi, J., Kumanogoh, A., Yoshida, M., Mochizuki, H., Kuwabara, S. and Yamashita, T. (2011) RGMa modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis. Nature Medicine, 17, 488-494.

2. 学会発表

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
「多発性硬化症に対する新規分子標的治療法の開発」班
分担研究報告書

多発性硬化症に対する新規分子標的の解析

分担研究者 望月秀樹 大阪大学 神経内科学 教授

【研究要旨】

本研究の最終目標は、多発性硬化症(MS)の発症および病態形成を制御する分子標的治療薬を開発し、臨床応用を実現することである。MSは複数の神経症候が再発と寛解を繰り返し、比較的強い障害が残る例が少なくなく、根本的治療法が確立していないのが現状である。本研究では、RGMモノクローナル抗体のMSの急性増悪期および再発寛解型に対する薬剤としてのfeasibility studyを実施している。我々は、多発性硬化症のautopsied samples（脳および脊髄）を用いて免疫染色を行った。CD83陽性のmature DCおよびCD209陽性のimmature DCにRGMが発現していることを明らかにした。本結果は、RGMがMSの病態形成に関わっていることを示唆する結果である。

A. 研究目的

本研究の最終目標は、多発性硬化症(MS)の発症および病態形成を制御する分子標的治療薬を開発し、臨床応用を実現することである。MSは複数の神経症候が再発と寛解を繰り返し、比較的強い障害が残る例が少なくなく、根本的治療法が確立していないのが現状である。我々はexpression analysisを行い、RGMaが免疫系細胞である樹状細胞に発現していることを突き止めた。これにより、免疫制御におけるRGMaの役割の解析へと進んだ。抗RGM抗体治療薬が、実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症を抑制し、さらに修復過程を促進することを見いだした。したがってRGM阻害剤は多発性硬化症の各病期に対する症状緩和に寄与するのみならず、根本的治療薬として有望である。本研究では、RGMモノクローナル抗体のMSの急性増悪期および再発寛解型に対する薬剤としてのfeasibility studyを実施する。本研究終了後、速やかに前臨床試験へ移行し、問題のないことを確認したうえで臨床試験に進む。本薬剤は多発性硬化症の根本的治療薬となりうる点で医学的に貢献するのみならず、特に「要介護状態」からの回復が

可能になるという観点で、医学経済面での大きな貢献も望める。

B. 研究方法

具体的な実施項目は以下のとおりである。

1. 多発性硬化症の脳・脊髄の組織を用いて、蛋白発現解析を行った。

具体的な方法は以下の通りである。

- 組織を用いた免疫染色を行った。

（倫理面への配慮）

臨床研究については、所属機関の倫理委員会の審査を経ている。

C. 研究結果

多発性硬化症のautopsied samples（脳および脊髄）を用いて免疫染色を行った。CD83陽性のmature DCおよびCD209陽性のimmature DCにRGMが発現していることが示された。さらに多発性硬化症のautopsied samples（脳および脊髄）におけるCD3陽性T細胞にもneogeninが発現していた。

D. 考察

これまでの研究により、RGM 中和抗体は多発性硬化症の各病期に対する症状緩和に寄与するのみならず、根本的治療薬として有望であることが、これらの知見より明らかになった。

E. 結論

これまでの研究によって、RGM の多発性硬化症における役割を明らかにすることができた。次年度以降における研究開発の加速化が図られる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Muramatsu, R., Kubo, T., Mori, M., Nakamura, Y., Fujita, Y., Akutsu, T., Okuno, T., Taniguchi, J., Kumanogoh, A., Yoshida, M., Mochizuki, H., Kuwabara, S. and Yamashita, T. (2011) RGMa modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis. Nature Medicine, 17, 488-494.

2. 学会発表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍：該当なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Muramatsu, R., Kubo, T., Mori, M., Nakamura, Y., Fujita, Y., Akutsu, T., Okuno, T., Taniguchi, J., Kumanogoh, A., Yoshida, M., Mochizuki, H., Kuwabara, S. and Yamashita, T.	RGMa modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis.	Nature Medicine	17, 4	488-494	2011
Fujita, Y., Endo, S., Takai, T. and Yamashita, T.	Myelin suppresses axon regeneration by PIR-B/SHP-mediated inhibition of Trk activity.	EMBO J.	30, 7	1389-1401	2011

RGMa modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis

Rieko Muramatsu^{1,2,8}, Takekazu Kubo^{3,8}, Masahiro Mori⁴, Yuka Nakamura^{1,2}, Yuki Fujita^{1,2}, Tsugio Akutsu⁵, Tatsusada Okuno⁶, Junko Taniguchi⁴, Atsushi Kumanogoh⁶, Mari Yoshida⁷, Hideki Mochizuki^{2,5}, Satoshi Kuwabara⁴ & Toshihide Yamashita¹⁻³

In multiple sclerosis, activated CD4⁺ T cells initiate an immune response in the brain and spinal cord, resulting in demyelination, degeneration and progressive paralysis. Repulsive guidance molecule-a (RGMa) is an axon guidance molecule that has a role in the visual system and in neural tube closure. Our study shows that RGMa is expressed in bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) and that CD4⁺ T cells express neogenin, a receptor for RGMa. Binding of RGMa to CD4⁺ T cells led to activation of the small GTPase Rap1 and increased adhesion of T cells to intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). Neutralizing antibodies to RGMa attenuated clinical symptoms of mouse myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and reduced invasion of inflammatory cells into the CNS. Silencing of RGMa in MOG-pulsed BMDCs reduced their capacity to induce EAE following adoptive transfer to naive C57BL/6 mice. CD4⁺ T cells isolated from mice treated with an RGMa-specific antibody showed diminished proliferative responses and reduced interferon- γ (IFN- γ), interleukin-2 (IL-2), IL-4 and IL-17 secretion. Incubation of PBMCs from patients with multiple sclerosis with an RGMa-specific antibody reduced proliferative responses and pro-inflammatory cytokine expression. These results demonstrate that an RGMa-specific antibody suppresses T cell responses, and suggest that RGMa could be a promising molecular target for the treatment of multiple sclerosis.

In multiple sclerosis, activated CD4⁺ T cells specific for components of the myelin sheath initiate an immune response in the white matter of the brain and spinal cord¹, resulting in demyelination, degeneration and progressive paralysis. Dendritic cells in the peripheral tissues and the central nervous system (CNS) are responsible for T cell activation and helper cell differentiation. T cell activation depends on the interaction of T cell receptors (TCRs) with their cognate antigen peptide presented on the surface of antigen-presenting cells (APCs), including dendritic cells and macrophages. Regulated adhesion of T cells to APCs through leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) is a crucial step in the generation of a sustained TCR-mediated signal. The binding of integrins, including LFA-1, is also important for T cell trafficking into the brain². The small GTPase Rap1, which is activated by antigens and chemokines, is a potent stimulator of integrins, including LFA-1 (refs. 3,4), and promotes immunological synapse formation and leukocyte migration⁵.

RGMa is a membrane-bound protein that was originally identified as an axon guidance molecule in the visual system⁶. RGMa also has a role in laminar patterning in *Xenopus laevis* and chick embryos and in cephalic neural tube closure in mouse embryos⁷. Although RGMa is recognized as having a crucial role in the nervous system, we found that RGMa was expressed in dendritic cells by expression analysis in mice. This finding prompted us to investigate the role of RGMa in the

immune system. This study describes a previously unknown role of RGMa in modulating T cell-mediated immune responses.

RESULTS

RGMa regulates CD4⁺ T cell adhesion

We first examined whether RGMa is expressed in dendritic cells. Following stimulation with lipopolysaccharide (LPS), the level of mRNA encoding RGMa was increased in the BMDCs (Fig. 1a). Western blot analysis confirmed that full-length RGMa (50-kDa bands) and the proteolytically cleaved mature form of RGMa (35-kDa bands) were upregulated in LPS-stimulated BMDCs (Fig. 1b). We then assessed whether CD4⁺ T cells express receptors for RGMa. Human RGMa-Fc bound to splenic CD4⁺ T cells in a concentration-dependent manner (Fig. 1c). Therefore, RGMa is induced in activated BMDCs and CD4⁺ T cells express receptors for RGMa.

Next, we explored the effects of RGMa on CD4⁺ T cell adhesion. In T lymphocytes, TCR ligation results in the transient activation of Rap1 and an increase in the GTP-bound form of Rap1 at the interface of T cells and APCs, which potentiates subsequent T cell activation^{3,5}. Rap1 was activated 5 min after stimulation of splenocytes and CD4⁺ T cells with RGMa (Fig. 1d). As TCR-induced adhesion requires Rap1 activation^{3,4,8}, we determined whether the RGMa-induced

¹Department of Molecular Neuroscience, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan. ²Japan Science and Technology Agency, Core Research for Evolutional Science and Technology, Tokyo, Japan. ³Department of Neurobiology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan. ⁴Department of Neurology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan. ⁵Department of Neurology, Kitasato University School of Medicine, Kanagawa, Japan. ⁶Department of Immunopathology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan. ⁷Institute for Medical Science of Aging, Aichi Medical University, Aichi, Japan. ⁸These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to T.Y. (yamashita@molneu.med.osaka-u.ac.jp).

Received 11 August 2010; accepted 2 February 2011; published online 20 March 2011; doi:10.1038/nm.2321

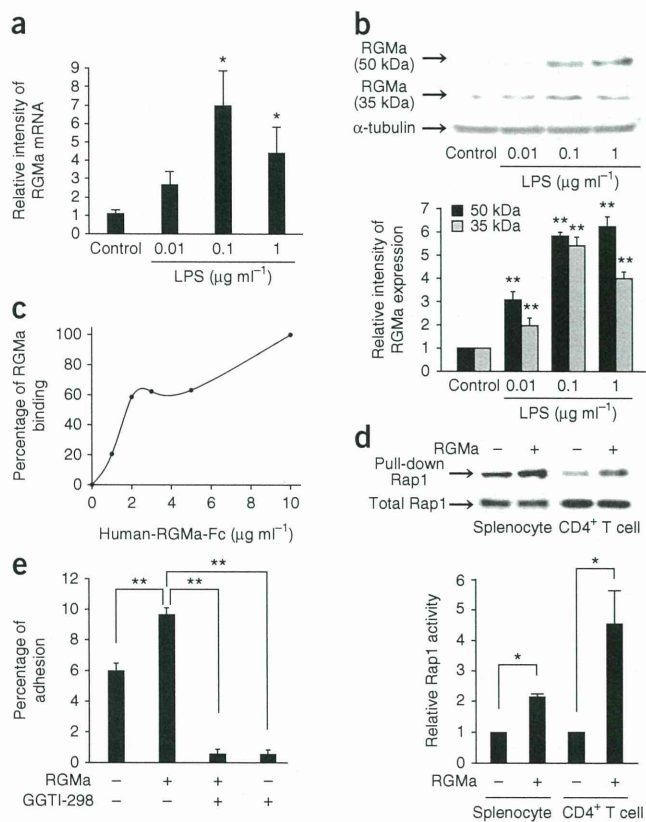


Figure 1 RGMa activates Rap1 and regulates CD4⁺ T cell adhesion.

(a) Quantitative RT-PCR showing relative expression level of mRNA encoding RGMa in LPS-stimulated BMDCs at the indicated concentrations for 24 h. (b) Western blot analysis of RGMa (50-kDa and 35-kDa bands; top rows) and α -tubulin (bottom row). Relative expression of RGMa in the BMDCs. (c) Binding of human RGMa-Fc to splenic CD4⁺ T cells. (d) Top, representative western blot images obtained with a Rap1 pull-down assay. The bottom graph shows the relative Rap1 activity, as determined by the band intensity of RalGDS-bound Rap1 normalized to that of total Rap1 in the lysates. (e) CD4⁺ T cell adhesion to ICAM-1 in the presence and absence of GGTI-298, a selective Rap1 inhibitor. Error bars are the mean \pm s.e.m. of three or four independent experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ by one-way analysis of variance followed by Tukey's test for a, b and e and by Student's *t* test for d.

CD209⁺ dendritic cells were immunoreactive for RGMa in the brain and spinal cord sections of individuals with multiple sclerosis (Fig. 2e), but not in sections from control brains (data not shown). To examine the expression of neogenin in human cells, we purified peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from individuals with relapsing-remitting multiple sclerosis. CD3⁺ T cells from these samples expressed neogenin at the time of relapse and during the remission phase (Fig. 2f). Neogenin expression did not differ in PBMCs from individuals with multiple sclerosis or healthy controls (Fig. 2g). Furthermore, neogenin was expressed in CD3⁺ T cells in brain and spinal cord sections from individuals with multiple sclerosis (Supplementary Fig. 1d).

RGMa-specific antibodies attenuate clinical signs in EAE

To determine whether RGMa inhibition alters the clinical severity of EAE, we intraperitoneally administered RGMa-specific antibodies¹⁰ or control rabbit IgGs to mice on days 7 and 10 after immunization with MOG. The antibody was detectable in the spleen and lymph nodes at day 7 after administration (Supplementary Fig. 2a). RGMa-specific antibody treatment reduced the clinical severity of the disease (Fig. 3a) and the percentage of mice that presented with clinical signs of EAE (Fig. 3b), but did not delay the day of onset of EAE clinical symptoms (Fig. 3c). However, the mean maximum EAE score (Fig. 3d) and the cumulative EAE scores (Fig. 3e) were lower in RGMa-specific antibody-treated mice as compared with control IgG-treated mice. These data show that RGMa-specific antibody treatment attenuates the severity of EAE.

RGMa-specific antibody treatment reduced the infiltration of cells in the spinal cord at day 21 after the induction of EAE in mice (Fig. 3f,g). The accumulation of CD4⁺, CD11b⁺, F4/80⁺, B220⁺, CD11c⁺ and mPDCA-1⁺ cells in the spinal cord (Fig. 3h) of EAE mice decreased as a result of treatment with the RGMa-specific antibody. Myelin loss and axonal damage in EAE mice was also reduced following treatment with the RGMa-specific antibody (Fig. 3i,j). Thus, RGMa-specific antibody treatment reduces inflammatory cell accumulation and histological damage following the induction of EAE.

A role for RGMa in T cell activation in EAE

To confirm whether RGMa expressed on dendritic cells modulates EAE, we carried out adoptive transfer experiments with MOG-pulsed BMDCs following RGMa knockdown. Transfection of BMDCs with RGMa siRNA downregulated RGMa expression (Supplementary Fig. 2b). Recipient C57BL/6 mice injected intravenously with RGMa siRNA-transfected, MOG-pulsed BMDCs had moderately reduced clinical disease scores as compared with mice injected with control siRNA-transfected, MOG-pulsed BMDCs

Rap1 activation alters T cell adhesion. RGMa-stimulated CD4⁺ T cells showed stronger adhesion to ICAM-1 when compared with the control CD4⁺ T cells (Fig. 1e). Moreover, a selective inhibitor of Rap1, GGTI-298, abolished RGMa-induced adhesive activity in CD4⁺ T cells. These results suggest that RGMa enhances the adhesive activity of CD4⁺ T cells through Rap1 activation.

Expression of RGMa and neogenin in EAE and multiple sclerosis

To assess the role of RGMa *in vivo*, we examined the expression of RGMa and neogenin, a receptor for RGMa, in the spleens, lymph nodes and spinal cord sections of C57BL/6 mice with EAE induced by MOG. Immunohistochemical analyses reveal that the majority of the CD11c⁺ cells in these tissues expressed RGMa weakly (Fig. 2a and Supplementary Fig. 1a). RGMa expression increased in CD11c⁺ cells after the induction of EAE (Fig. 2a and Supplementary Fig. 1a). Although RGMa was also expressed in mouse plasmacytoid dendritic cell antigen-1 (mPDCA-1)-positive cells in these tissues, its expression was unchanged after the induction of EAE (Fig. 2b and Supplementary Fig. 1b). Furthermore, CD4⁺ T cells in these tissues expressed neogenin. Expression of neogenin did not change during the observation period after the induction of EAE (Fig. 2c and Supplementary Fig. 1c). Next, we assessed Rap1 activity *in situ* to determine whether Rap1 is activated in CD4⁺ T cells in the CNS after induction of EAE. Activated Rap1 was present in CD4⁺ T cells in the cervical spinal cords of EAE mice but not in control mice (Fig. 2d).

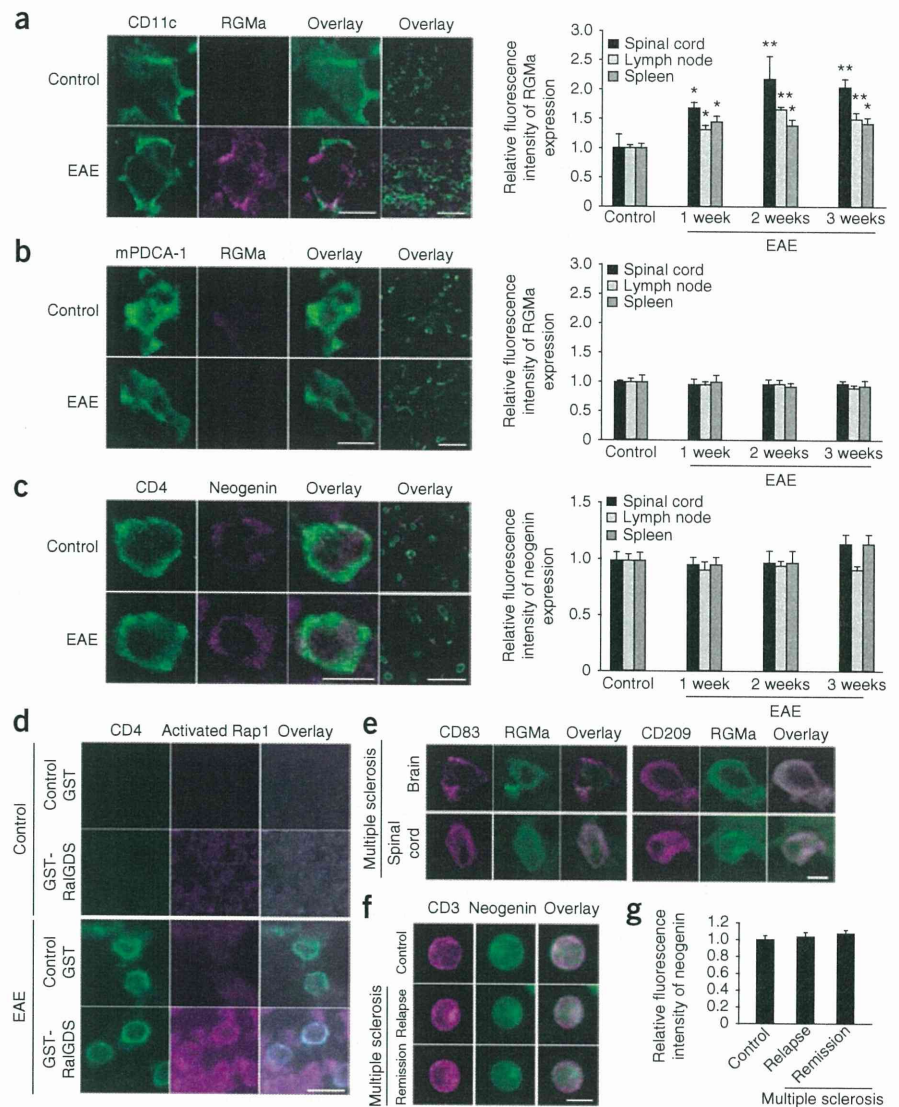
We performed immunohistochemical analyses on autopsied samples of brain and spinal cord obtained from eight individuals with multiple sclerosis. We evaluated the presence of mature and immature dendritic cells in these tissues by using antibodies to CD83 and CD209 (also known as DC-SIGN), respectively⁹. CD83⁺ and

Figure 2 Expression of RGMa and neogenin in MOG-induced EAE and multiple sclerosis tissue. **(a)** Frozen sections of the spleen immunostained for RGMa (labeled with Alexa Fluor 568) and CD11c (labeled with Alexa Fluor 488) in EAE and control mice. The graph shows the relative expression of RGMa in CD11c⁺ cells in the lymph node, spleen and spinal cord before (control) and 1, 2 and 3 weeks after immunization with MOG. $n = 37$ –51 cells for each mouse. $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$ by one-way analysis of variance followed by Tukey's test. **(b)** The sections (same sections as shown in **a**) of the spleen immunostained for RGMa (labeled with Alexa Fluor 568) and plasmacytoid dendritic cells (mPDCA-1) (labeled with Alexa Fluor 488). The graph shows the relative expression of RGMa in mPDCA-1⁺ cells. $n = 40$ –48 cells for each mouse. **(c)** Expression of neogenin (labeled with Alexa Fluor 568) in CD4⁺ T cells (labeled with Alexa Fluor 488) in the spleen. The graph shows the relative expression of neogenin in CD4⁺ T cells. **(d)** *In situ* Rap1 pull-down assay (labeled with Alexa Fluor 568) in CD4⁺ T cells (labeled with Alexa Fluor 488) in cervical spinal cord tissue sections of EAE and control mice. **(e)** Multiple sclerosis brain and spinal cord tissues sections double-labeled for RGMa (with Alexa Fluor 488) in combination with CD83 or CD209 (DC-SIGN) (labeled with Alexa Fluor 568) $n = 8$. **(f)** Expression of neogenin (labeled with Alexa Fluor 488) in human CD3⁺ cells (labeled with Alexa Fluor 568) in relapsing-remitting multiple sclerosis and healthy control PBMCs. **(g)** Relative fluorescence intensity of neogenin in the immunohistochemical analysis. Error bars represent the mean \pm s.e.m. of 3 or 4 independent experiments. Scale bars in **a–e**, 50 μ m for low (overlay images in **a**, **b**, and **c**) and 10 μ m for high (all other images) magnification images; scale bar in **f**, 5 μ m.

(Fig. 4a). The adoptive transfer of RGMa siRNA-transfected BMDCs resulted in reduced F4/80⁺ cell infiltration into the spinal cord at day 21 after EAE induction (Supplementary Fig. 2c).

To further address whether dendritic cell-derived RGMa has a role in T cell activation, we immunized C57BL/6 mice with MOG, followed by treatment with RGMa-specific antibodies or control antibodies at days -2, 0 and 5 after immunization. On day 10 after immunization, we collected cells from the spleen and draining lymph nodes of the treated mice, re-stimulated these cells with MOG peptide, purified CD4⁺ T cells from these cells and then adoptively transferred them into naïve recipient mice. The EAE clinical scores (see Supplementary Methods) were moderately reduced in C57BL/6 mice that were injected with CD4⁺ T cells from RGMa-specific antibody-treated EAE mice as compared with mice injected with CD4⁺ T cells from the IgG control antibody-treated mice (Fig. 4b).

Next, we assessed whether the RGMa-specific antibody directly inhibits T cell trafficking to the CNS. We immunized transgenic mice that ubiquitously express EGFP (CAG-EGFP mice) with MOG, isolated splenocytes from these mice 7 d after immunization and re-stimulated splenocytes with MOG for 3 d. We treated naïve recipient C57BL/6 mice with control IgG or RGMa-specific antibody 3 d before and at the time of transfer of the re-stimulated CD4⁺ T cells. At day 10 after adoptive transfer, there was no significant



difference in the infiltration of EGFP-labeled T cells into the CNS of control or RGMa-specific antibody-treated mice (Fig. 4c). Consistent with these *in vivo* observations, the RGMa-specific antibody did not inhibit adhesion of splenic CD4⁺ T cells from EAE mice to ICAM-1 *in vitro* (Fig. 4d). This result excludes the possibility that the antibody directly interfered with the adhesion of CD4⁺ T cells to ICAM-1. Furthermore, using an *in vitro* model of the blood-brain barrier consisting of brain-derived capillary endothelial b-End3 cells, splenic CD4⁺ T cells from MOG-EAE mice transmigrated more readily across the b-End3 cells than did CD4⁺ T cells isolated from EAE mice treated (*in vivo*) with the RGMa-specific antibody (Fig. 4e). However, transmigration of T cells was not altered following direct addition of RGMa-specific antibody *in vitro* to splenic CD4⁺ T cells (Fig. 4e). Because Rap1 activity is associated with increased adhesion of T cells, we measured Rap1 activity by pull-down assay and found that Rap1 activity was reduced in CD4⁺ T cells isolated from EAE-mice treated with the RGMa-specific antibody (Fig. 4f). However, we did not observe marked suppression of Rap1 activity following *in vitro* treatment of CD4⁺ T cells with the RGMa-specific antibody (Fig. 4f). Thus, we obtained no evidence suggesting that the RGMa-specific antibody directly modulates the trafficking of T cells to the CNS.

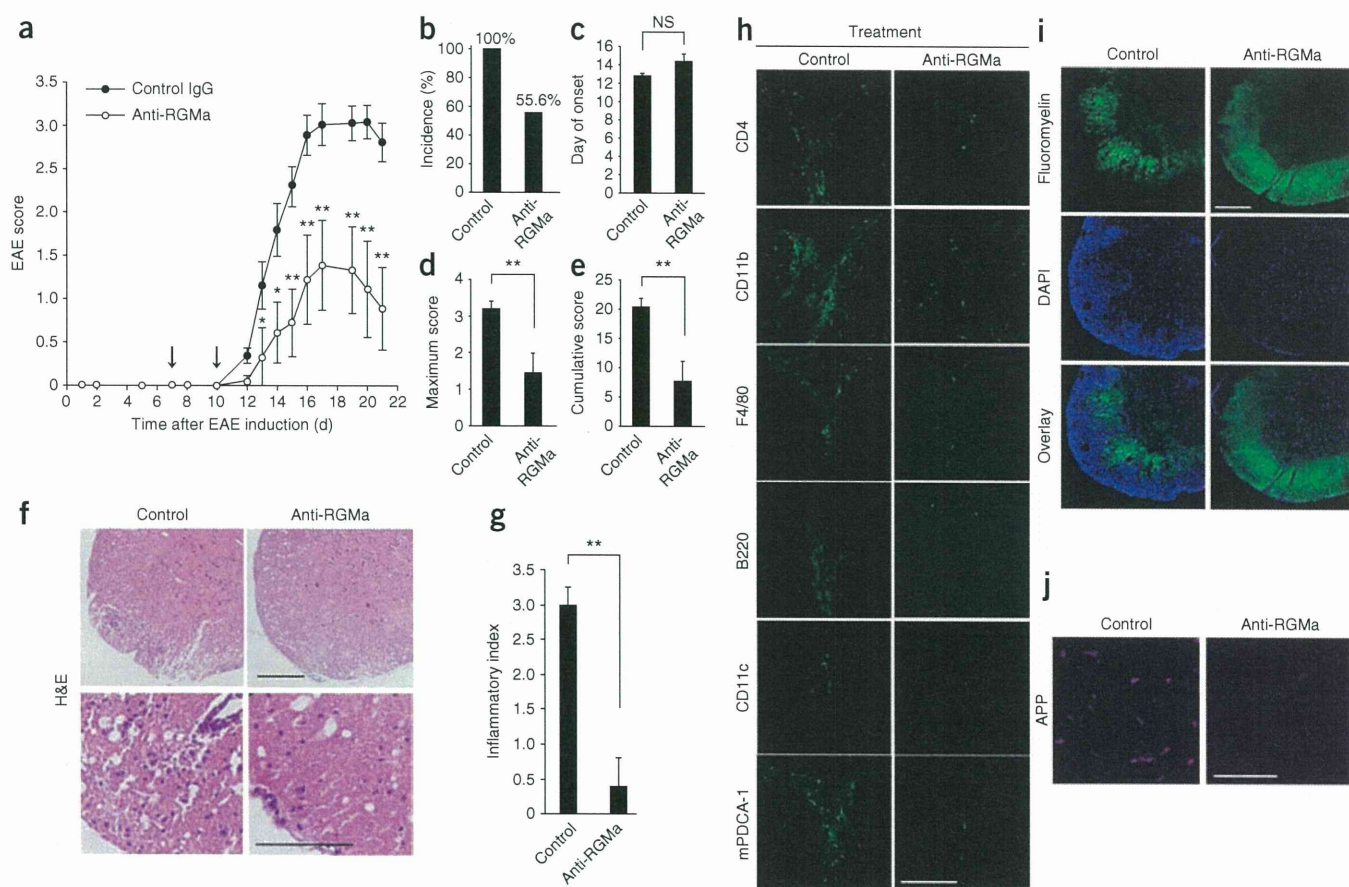


Figure 3 RGMa-specific antibody treatment reduces the severity of MOG-induced EAE. **(a)** Clinical EAE disease scores (EAE score) in mice treated with control IgGs ($n = 16$) and RGMa-specific antibodies (anti-RGMa; $n = 9$). Data represent the mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, and $**P < 0.01$ by Mann-Whitney's U test. The arrows represent the time points of antibody administration. **(b)** Incidence of EAE clinical signs in MOG-induced EAE mice treated with control IgGs or RGMa-specific antibodies. **(c)** The average day of disease onset between the two treatment groups. **(d)** The mean \pm s.e.m. of the maximum EAE score of each mouse with EAE. **(e)** The mean \pm s.e.m. of the cumulative EAE scores. $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$ by Student's t test. NS, not significant. **(f)** H&E staining of the cervical spinal cord in RGMa-specific antibody- and control IgG-treated mice. **(g)** Histological scores (inflammatory index; see **Supplementary Methods**) for the inflammatory lesions. Error bars represent the mean \pm s.e.m. (control IgG, $n = 6$; RGMa-specific antibody, $n = 5$). $*P < 0.01$ by Student's t test. **(h)** Representative images of CD4⁺, CD11b⁺, F4/80⁺, B220⁺, CD11c⁺ and mPDCA-1⁺ cells in the spinal cord of control IgG- and RGMa-specific antibody-treated EAE mice. **(i, j)** FluoroMyelin **(i)** and APP **(j)** staining in the spinal cord of IgG- and RGMa-specific antibody-treated mice. Scale bars in **f, h, i**, 200 μ m; scale bar in **j**, 100 μ m.

In contrast to MOG, which causes chronic EAE, proteolipid protein (PLP)_{139–151} peptide induces relapsing-remitting EAE in SJL/J mice, which depends on continued activation of T cells via endogenous myelin epitopes (epitope spreading)¹¹. We intraperitoneally administered the RGMa-specific antibody or control rabbit IgG to mice on days 25 and 28 after immunization with PLP_{139–151}. These time points correspond to the late stage of the first paralytic incident (a clinical feature of EAE). Treatment with the RGMa-specific antibody was moderately effective in reducing the clinical severity of relapses (**Fig. 4g**). Furthermore, it is known that T cell activation due to epitope spreading occurs directly in the CNS¹². Indeed, we detected the presence of the RGMa-specific antibody in sections of the brain and the spinal cord after intraperitoneal administration (**Supplementary Fig. 2d**), suggesting the RGMa-specific antibody inhibits the activation of T cells by local APCs, possibly dendritic cells, in the CNS.

The role of RGMa in macrophages and microglia

Next, we performed additional experiments to characterize the effects of RGMa in other cell types. Macrophages expressed neogenin

(**Supplementary Fig. 3a,b**) but not RGMa (**Supplementary Fig. 3c,d**), whereas microglia express RGMa (ref. 10). In B cells, B220 and RGMa did not colocalize in spinal cord sections of MOG-EAE mice (**Supplementary Fig. 3c**).

To assess whether the neogenin expressed in macrophages plays a role in EAE, we used CD11b-DTR mice in which macrophages can be selectively depleted¹³. To specifically knockdown neogenin in macrophages, we adoptively transferred macrophages with or without neogenin knockdown (**Supplementary Fig. 3e**) into CD11b-DTR mice after depletion of host macrophages. EAE was then induced via MOG immunization in the recipient mice. The clinical severity of the disease did not differ between the recipient mice with wild-type macrophages or macrophage-specific neogenin knockdown (**Supplementary Fig. 4a**). Next, we attempted to inhibit the RGM-neogenin signals in microglia in the CNS by delivering the RGMa-specific antibody or control IgG intrathecally. The clinical severity of the resultant MOG-induced EAE did not differ between the two mouse groups (**Supplementary Fig. 4b**). Thus, RGM-neogenin signals in macrophages and microglia do not appear to contribute significantly to the clinical course of EAE.

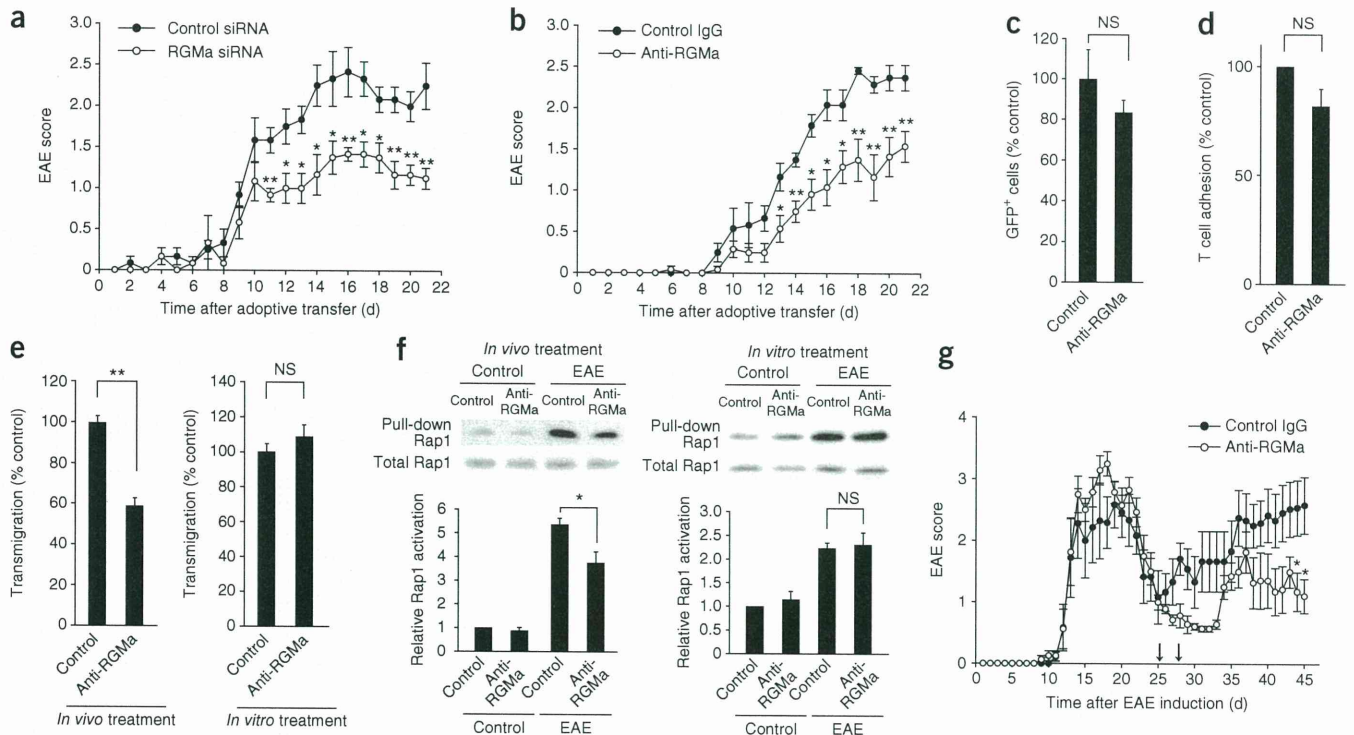


Figure 4 RGMa-specific antibody treatment suppresses T cell responses in EAE. **(a)** EAE scores in mice after adoptive transfer of MOG-stimulated BMDCs with or without RGMa knockdown. **(b)** EAE scores in mice after adoptive transfer of re-stimulated CD4⁺ T cells from donor mice immunized with MOG with or without the RGMa-specific antibody treatment (anti-RGMa). **(c)** Number of GFP-labeled CD4⁺ T cells in the brain sections of control recipient mice and mice treated with RGMa-specific antibody at day 10 after adoptive transfer of the re-stimulated EGFP-labeled CD4⁺ T cells. **(d)** Percentage of CD4⁺ T cells obtained from MOG-EAE mice that adhered to ICAM-1 in the presence of RGMa-specific or control antibodies *in vitro*. **(e)** Transmigration of CD4⁺ T cells across b-End3 cells. Left, CD4⁺ T cells from EAE mice treated *in vivo* with control IgG or RGMa-specific antibody; right, CD4⁺ T cells from EAE mice treated *in vitro* with control IgG or RGMa-specific antibody. **(f)** Top, representative western blots obtained by Rap1 pull-down assay. Bottom, relative Rap1 activity. **(g)** EAE scores after intraperitoneal injection of RGMa-specific antibody or control IgG in SJL/J mice immunized with PLP. Number of mice in each group: control siRNA: 5, RGMa siRNA: 5 (**a**); control IgG: 7, RGMa-specific antibody: 7 (**b**); control IgG: 5, RGMa-specific antibody: 5 (**c**); control IgG: 4, RGMa-specific antibody: 4 (**d**), each group: 4 (**e**); each group: 3 (**f**); and control IgG: 11, RGMa-specific antibody: 9 (**g**). Error bars in all panels represent the means \pm s.e.m.; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ as compared with control group by Mann-Whitney's *U* test for **a**, **b** and **g** and Student's *t* test for **c-f**.

Finally, to assess whether the effect of the RGMa-specific antibody on the peripheral immune system is specific to autoimmune CNS inflammation, we used a spinal cord injury (SCI) mouse model, as SCI elicits nonautoimmune CNS inflammation. We intraperitoneally administered the RGMa-specific antibody at 0 and 3 d after SCI. Intraperitoneal administration of the RGMa-specific antibody did not substantially enhance the recovery of locomotor activity after SCI (**Supplementary Fig. 4c**). Therefore, the results suggest that the effect of the RGMa-specific antibody is specific to autoimmune CNS inflammation.

RGMa-specific antibodies regulate T cell responses

Next, we sought to investigate whether RGMa-specific antibody treatment inhibits T cell activation and cytokine release. Splenocytes from MOG-immunized mice treated with RGMa-specific or control antibodies were isolated at day 21 after EAE induction and re-stimulated *in vitro* with the MOG peptide or with CD3-specific antibodies. RGMa-specific antibody treatment diminished the MOG-specific T cell proliferative response (**Fig. 5a**), reduced IL-2, IL-4, IFN- γ and IL-17 secretion and increased IL-10 secretion (**Fig. 5a**). We observed similar effects of RGMa-specific antibody treatment on the T cell proliferative response and cytokine secretion following *in vitro* stimulation with CD3-specific antibodies (**Supplementary Fig. 5a-c**).

Finally, we examined T cell proliferation and cytokine production by PBMCs isolated from 17 individuals with relapsing-remitting multiple sclerosis (eight during relapse and nine in the remission phase). RGMa-specific antibody treatment decreased the phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) plus ionomycin-induced T cell proliferative responses (**Fig. 5b**). PBMCs from individuals with clinically relapsing multiple sclerosis also expressed mRNA encoding IL-2, IL-4, IFN- γ and IL-17 following stimulation with PMA plus ionomycin (**Fig. 5b**). Addition of the RGMa-specific antibody reduced expression of these cytokine mRNAs, but did not affect cytokine expression in PBMCs that were not incubated with PMA plus ionomycin (**Fig. 5b**). The level of mRNA encoding IL-10 was increased in T cells incubated with PMA plus ionomycin and the RGMa-specific antibody (**Fig. 5b**). We obtained similar results in the PBMCs obtained from individuals with multiple sclerosis in the remission phase, although the effect of the RGMa-specific antibody on cytokine expression was attenuated (**Fig. 5b**). Therefore, the RGMa-specific antibody modulates T cell proliferative responses and cytokine expression in PBMCs from individuals with multiple sclerosis.

DISCUSSION

Treatment with the RGMa-specific antibody effectively suppresses T cell responses and attenuates the clinical course of EAE. Results obtained

Figure 5 T cell proliferation and cytokine production from MOG-EAE mice and PBMCs from humans with multiple sclerosis. **(a)** Top graph, MOG-specific proliferative responses in splenic cells obtained from mice treated with RGMa-specific antibody (anti-RGMa) or control IgG at d 21 after MOG immunization. Each bar represents the mean \pm s.e.m. (control IgG, $n = 6$; RGMa-specific antibody, $n = 5$). Bottom graphs, production of IL-2, IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-10 and TGF- β by spleen cells obtained from mice treated with RGMa-specific antibody or control IgGs. Each bar represents the mean \pm s.e.m. (control IgG, $n = 6$; RGMa-specific antibody, $n = 5$). * $P < 0.05$, and ** $P < 0.01$ by Student's t -test. **(b)** Relative levels of cell proliferation (top two graphs) and relative levels of cytokine mRNA (bottom graphs) from PBMCs stimulated with PMA plus ionomycin in the presence or absence of the RGMa-specific antibody. PBMCs were obtained from individuals with relapsing-remitting multiple sclerosis (8 in clinical relapse; 9 in clinical remission). Each error bar represents the mean \pm s.e.m.; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ by Student's t test.

by adoptive transfer experiments suggest that RGMa expressed in dendritic cells activates T cells in the peripheral tissues. However, RGMa-specific antibody also reduces the severity of relapses in PLP-induced EAE, suggesting that the RGMa-specific antibody may inhibit T cell activation by APCs in the CNS as well.

As RGMa-specific antibodies suppress the T cell responses induced by antibody to CD3 *in vitro*, it may provide a global immunosuppression strategy. However, as we did not observe an improvement in locomotor recovery after SCI following the intraperitoneal injection of the RGMa-specific antibody, the immunomodulatory effect of the antibody in SCI remains unexplained. Our results in PBMCs from patients with multiple sclerosis suggest that inhibition of RGMa reduces T cell proliferation and cytokine release. Notably, RGMa polymorphisms are associated with multiple sclerosis and correlate with the changes in IFN- γ and tumor necrosis factor expression in the cerebrospinal fluid of individuals with multiple sclerosis¹⁴.

The role of RGMa in limiting repair of the neural network should also be considered. Axonal damage is both an early event in the development of lesions in multiple sclerosis¹⁵ and EAE¹⁶ and a major determinant of clinical disability. Repair of the axonal damage induced by EAE is facilitated by selectively inhibiting the activities of Nogo-A, a myelin-derived inhibitor of axon growth¹⁷. Knockdown or inhibition of leucine-rich repeat and Ig domain-containing-1 (LINGO-1), a negative regulator of axonal myelination, promotes functional recovery in EAE¹⁸. Promoting the restoration of the injured neural network could also account for some of the beneficial effects of the RGMa-specific antibody. Future studies will be aimed at elucidating what

targets of the RGMa-specific antibody are necessary for the beneficial effects on EAE. Taken together, our findings suggest that RGMa may prove to be a promising molecular target for the treatment of multiple sclerosis.

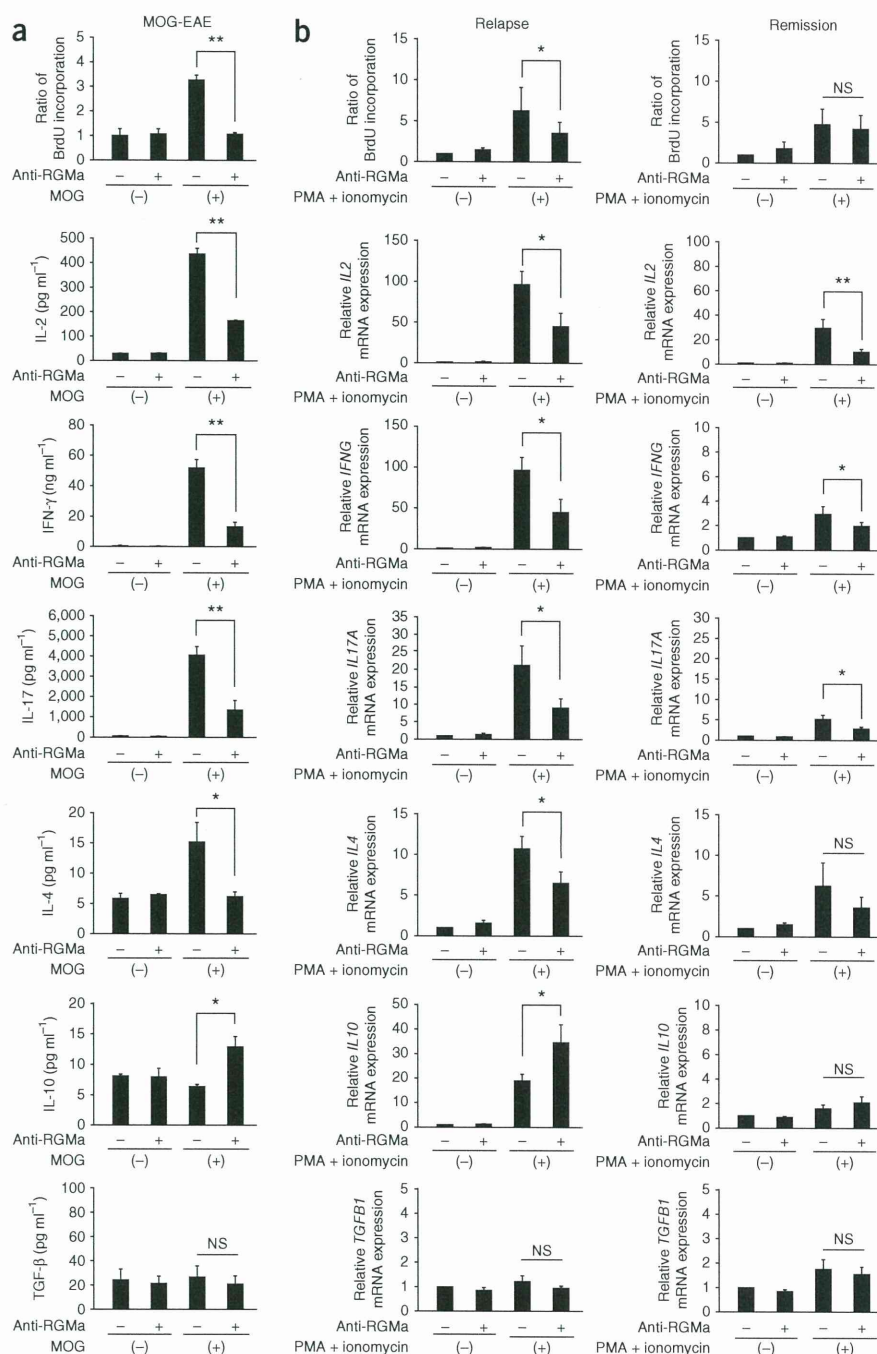
METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/naturemedicine/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Medicine website.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a Grant-in-Aid for Young Scientists (S) from the Japan Society for the Promotion of Sciences (19679007) to T.Y., and a Grant-in-Aid from Ministry of Health, Labour and Welfare to T.Y. We thank H. Hayakawa and members of the Yamashita laboratory for fruitful discussion and help.



AUTHOR CONTRIBUTIONS

T.K. performed preliminary experiments for expression analysis, behavioral and histological analysis of EAE, and cytokine production, and contributed to conceiving the study. Later, R.M. took over the work and performed all experiments, with the exception of the portions indicated below. Y.N. performed EAE induction, adoptive transfer experiments, immunohistochemical analyses and spinal cord injury experiments. Y.F. performed the lymphocyte binding assay, Rap1 activity assay and cytokine analysis. M.M., J.T. and S.K. performed experiments with PBMCs. T.O. helped with irradiation experiments. M.M., T.A., J.T., M.Y., H.M. and S.K. performed experiments with autopsy samples. T.K. and T.Y. conceived the project and developed the hypothesis. T.K., R.M., A.K. and T.Y. designed the experiments. A.K. and T.O. discussed the hypothesis and helped with data interpretation. T.Y. coordinated and directed the project and wrote the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/naturemedicine/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>.

1. Trapp, B.D., Ransohoff, R.M., Fisher, E. & Rudick, R. Neurodegeneration in multiple sclerosis: relationship to neurological disability. *Neuroscientist* **5**, 48–57 (1999).
2. Smith, A. *et al.* The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration. *Immunol. Rev.* **218**, 135–146 (2007).
3. Katagiri, K. *et al.* Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1956–1969 (2000).
4. Reedquist, K.A. *et al.* The small GTPase, Rap1, mediates CD31-induced integrin adhesion. *J. Cell Biol.* **148**, 1151–1158 (2000).
5. Katagiri, K., Hattori, M., Minato, N. & Kinashi, T. Rap1 functions as a key regulator of T-cell and antigen-presenting cell interactions and modulates T-cell responses. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1001–1015 (2002).
6. Stahl, B., Müller, B., von Boxberg, Y., Cox, E.C. & Bonhoeffer, F. Biochemical characterization of a putative axonal guidance molecule of the chick visual system. *Neuron* **5**, 735–743 (1990).
7. Yamashita, T., Mueller, B.K. & Hata, K. Neogenin and repulsive guidance molecule signaling in the central nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**, 29–34 (2007).
8. Suga, K. *et al.* CD98 induces LFA-1-mediated cell adhesion in lymphoid cells via activation of Rap1. *FEBS Lett.* **489**, 249–253 (2001).
9. Serafini, B. *et al.* Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake and interaction with proliferating T cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **65**, 124–141 (2006).
10. Hata, K. *et al.* RGMA inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury. *J. Cell Biol.* **173**, 47–58 (2006).
11. McRae, B.L., Vanderlugt, C.L., Dal Canto, M.C. & Miller, S.D. Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **182**, 75–85 (1995).
12. McMahon, E.J. *et al.* Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat. Med.* **11**, 335–339 (2005).
13. Duffield, J.S. *et al.* Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J. Clin. Invest.* **115**, 56–65 (2005).
14. Nohra, R. *et al.* RGMA and IL21R show association with experimental inflammation and multiple sclerosis. *Genes Immun.* **11**, 279–293 (2010).
15. Trapp, B.D., Ransohoff, R. & Rudick, R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr. Opin. Neurol.* **12**, 295–302 (1999).
16. Onuki, M., Ayers, M.M., Bernard, C.C. & Orian, J.M. Axonal degeneration is an early pathological feature in autoimmune-mediated demyelination in mice. *Microsc. Res. Tech.* **52**, 731–739 (2001).
17. Karnezis, T. *et al.* The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination. *Nat. Neurosci.* **7**, 736–744 (2004).
18. Mi, S. *et al.* LINGO-1 antagonist promotes spinal cord remyelination and axonal integrity in MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Med.* **13**, 1228–1233 (2007).

ONLINE METHODS

Mice. C57BL/6 (Japan SLC), SJL/J (Charles River), CAG-EGFP (Japan SLC) mice and CD11b-DTR mice (The Jackson Laboratory) (ages: 8–10 weeks; C57BL/6, SJL/J, and CAG-EGFP mice: male; CD11b-DTR mice: 7 male and 3 female) were bred and maintained. The Institutional Animal Care and Use Committees of Graduate School of Medicine, Chiba University and Osaka University approved all experimental procedures.

EAE induction. We induced EAE by subcutaneous injection of 200 μ l of an emulsion (1:1 PBS or complete Freund's adjuvant (CFA, Difco) containing 100 μ g of MOG_{35–55} peptide (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) (Greiner Bio-One) to C57BL/6 mice or PLP_{139–151} peptide (HSLGKWLGHDPDKF) (Greiner Bio-One) to SJL/J mice in PBS and 500 μ g of *Mycobacterium tuberculosis* extract H37Ra (Difco) in CFA. At 0 h and 48 h after immunization, mice received 200 ng of pertussis toxin intravenously (List Biological Laboratories). 400 μ g of RGMa-specific antibodies (28045F; IBL) or control antibodies (rabbit IgG; I5006; Sigma-Aldrich) were administered intraperitoneally to mice on days 7 and 10 after MOG immunization and on day 25 and 28 after PLP immunization. We generated RGMa-specific rabbit antisera against the synthetic peptide (residues 309–322) as the immunogen. The peptide sequence is specific to RGMa but has no similarity to the RGMb or RGMc sequence. The antisera were purified by affinity chromatography. The antibody blocked the inhibitory effect of RGMa on neurite growth¹⁰.

Adoptive transfer experiments. For adoptive transfer of BMDCs with RGMa knockdown, we intravenously injected mice with 6×10^5 cells per 0.1 ml live BMDCs pulsed *in vitro* with 100 μ g ml⁻¹ MOG_{35–55} for 4–6 h. We subcutaneously injected mice with 0.2 ml of CFA containing 500 μ g of *Mycobacterium tuberculosis*. Mice received 200 ng of pertussis toxin intravenously 0 h and 48 h after immunization.

We also immunized donor mice with MOG in CFA with or without the RGMa-specific antibody treatment (days -2, 0 and 5). On day 10 after immunization, we collected the spleens and draining lymph nodes, prepared single-cell suspensions and lysed red blood cells. Cells (5×10^6 cells per ml) were cultured with 40 μ g ml⁻¹ MOG_{35–55} peptide. After 3 d of culture, we collected cells and isolated CD4⁺ T cells by negative selection with a CD4⁺ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec). Sublethally irradiated (500 Gy) mice intravenously received the cells.

T cell proliferation and cytokine analysis. On day 21 after induction of EAE, we cultured splenocytes (5×10^5 cells per 0.1 ml) from these mice with in 96-well

plates in RPMI-1640 medium supplemented with glutamine (Gibco), sodium pyruvate (Gibco), penicillin (Gibco), streptomycin (Gibco), 2-ME (Wako) and 10% (vol/vol) heat-inactivated FBS (Gibco) for the proliferation assay. CD4⁺ T cells were re-stimulated with 20 μ g ml⁻¹ of MOG peptide or 5 μ g ml⁻¹ of CD3-specific monoclonal antibody (2C11; BD Biosciences). We estimated cell proliferation by measuring BrdU incorporation into the newly synthesized cellular DNA for 24 h with a cell proliferation enzyme-linked immunosorbent assay and BrdU (colorimetric) assay (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. To measure the production of IL-2, IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-10 and TGF- β , we cultured the splenocytes (2×10^6 cells per ml) obtained from the mice with EAE in 24-well plates with or without 20 μ g ml⁻¹ of MOG peptide or 5 μ g ml⁻¹ of the CD3-specific monoclonal antibody. We collected the supernatants after 72 h in culture. We then performed cytokine ELISAs according to the manufacturer's instructions (IL-2, IFN- γ , IL-17, IL-4: BioSource, Invitrogen; IL-10 and TGF- β , R&D Systems).

Human subjects. The research protocol was approved by the Human Use Review Committees of the Graduate School of Medicine, Chiba University; Kitasato University School of Medicine; and Aichi Medical University. Informed consent was obtained from all subjects. 17 individuals with relapsing-remitting multiple sclerosis were diagnosed according to the McDonald criteria¹⁹. We obtained samples from eight individuals (seven women; median age: 39.0 years; range: 24–57 years) during clinical relapse and nine individuals (eight women; median age: 37.5 years; range: 32–62 years) during clinical remission. These individuals were under no treatment at the time of study. We obtained autopsied brain and spinal cord tissues from nine individuals who died with relapsing-remitting multiple sclerosis. We excluded the tissue from one individual because of unsuccessful immunohistochemistry, and analyzed tissue from eight individuals with relapsing-remitting multiple sclerosis (six brains and two spinal cord samples; three women; median age: 56.5 years; range: 40–67 years). We obtained the control brain from a subject with polymyositis.

Statistical analysis. Data are presented as means \pm s.e.m. For EAE scores, significance among the groups was examined using Mann-Whitney *U* test. Other analyses were performed by one-way analysis of variance followed by Tukey's test or Student's *t* test. *P* values of <0.05 were considered significant.

Additional methods. Detailed methodology is supplied in the **Supplementary Methods**.

19. Polman, C.H. *et al.* Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann. Neurol.* **58**, 840–846 (2005).

Supplementary Information Titles

Journal: Nature Medicine

Article Title:	RGMa modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis
Corresponding Author:	Toshihide Yamashita

Supplementary Item & Number	Title or Caption
Supplementary Figure 1	Immunostaining for RGMa and neogenin in sections from MOG-EAE mice and individuals with MS.
Supplementary Figure 2	Distribution of RGMa-specific antibody in mice and knockdown of RGMa expressions.
Supplementary Figure 3	Determination of RGMa and neogenin expressions.
Supplementary Figure 4	Assessment of the <i>in vivo</i> mechanism of action of RGMa-specific antibody.
Supplementary Figure 5	T-cell responses to CD3-specific antibody in mice treated with RGMa-specific antibody or control IgG
Supplementary Methods	
Supplementary References	