

201128094B

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

ビッカースタッフ型脳幹脳炎の診断及び
治療方法の更なる推進に関する研究

平成22～23年度 総合研究報告書

研究代表者 神田 隆
(山口大学大学院医学系研究科神経内科学)

平成24(2012)年5月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

ビッカースタッフ型脳幹脳炎の診断及び
治療方法の更なる推進に関する研究

平成22～23年度 総合研究報告書

研究代表者 神田 隆
(山口大学大学院医学系研究科神経内科学)

平成24(2012)年5月

目次

I. 総合研究報告	
ビッカースタッフ型脳幹脳炎の診断及び治療方法の更なる推進に関する研究	1
山口大学大学院医学系研究科神経内科学 主任研究者 神田 隆	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	9
III. 研究成果の刊行物・別刷	13

I. 総合研究報告

ビッカーstaff型脳幹脳炎の診断及び治療方法の更なる推進に 関する研究

研究代表者 神田 隆 山口大学大学院医学系研究科神経内科学教授

研究要旨

・ビッカーstaff型脳幹脳炎(BBE)の本邦における実態を明らかにするため、全国疫学調査を行った。独自に作成した診断基準を満たす BBE の発症数は全国で年間約 100 人と推計された。男性にやや多く(1.3:1)、30 歳代にピークがあり、BBE 以外の脳幹脳炎よりも若年発症であった。BBE の三主徴(眼球運動障害、運動失調、意識障害)を除いた特徴は、四肢末梢の“しびれ(感)”での発症、口咽頭筋麻痺や腱反射の低下・消失、四肢末梢での感覚障害、眼球運動における外転制限優位性であった。約 6 割の症例で発症後一週間以内に症状のピークを迎え、人工呼吸器管理を要したのは 2 割の症例であった。血中 IgG 抗 GQ1b 抗体の陽性率は 75%であった。治療として大部分の例において免疫グロブリン大量静注療法が行われ、発症 3 カ月後までに約 9 割の症例で良好な転帰をとっていた。同疫学調査と自験例、文献例の解析に基づき、BBE 診断基準を作成した。

・BBE の病態に関する基礎研究では以下のような成果を得た。(1)BBE とミラーフィッシャー症候群(MFS)はいずれも抗 GQ1bIgG 抗体が病因と密接に関連していると考えられているが、両者の臨床表現型は大きく異なっている。この表現型の差異に関し、自己抗体の反応性の検索からは GQ1b そのものに特異性の高い抗体の上昇が、細胞学的解析からは液性因子により脳微小血管内皮細胞より autocrine に産生される MMP-9 と MMP-2 が、それぞれ BBE の病態形成において重要と考えられた。この 2 者が両者の表現型の違いに関与している可能性があることが明らかになった。(2)抗体介在性中枢神経炎症性疾患のプロトタイプとして NMO に注目し、NMO 末梢血において抗 AQP4 抗体産生能を有するプラズマブラストの増加を認めた。プラズマブラストの頻度測定は、BBE 液性免疫異常の評価方法として有用であることが示された。(3)先行感染病原体は、血清学的な検討により BBE 29 例中 11 例(38%)で同定され、ギラン・バレー症候群(GBS)と同様に BBE では、感染症が発症に関与していることが示された。一方で、GBS の主要な病原体による先行感染は、BBE 症例の 10%でしかみられず、BBE の原因となる病原体は GBS と大きく異なっていることが示された。

研究分担者

- ・楠 進(近畿大学医学部内科学講座神経内科部門教授)
- ・山村 隆(独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部部長)
- ・中村好一(自治医科大学地域医療学センター公衆衛生学部門教授)
- ・古賀道明(山口大学医学部附属病院神経内科学講師)

- ・海田賢一(防衛医科大学校内科学 3・神経内科学准教授)
- ・上原里程(自治医科大学地域医療学センター公衆衛生学部門准教授)

A. 研究目的

ビッカーstaff型脳幹脳炎(BBE)は、眼球運動や運動失調、意識障害を主徴とし、脳幹を病変の首座とする自己免疫疾患である。疾患区分は(9)神経系疾患または(16)免疫系疾患に該当する。希少疾患の特性として国内各施設に少数の患者が分散し、現時点では確立した診断基準、治療指針はない。このため、診断や治療

研究協力者

- ・郡山達男(広島市立広島市民病院神経内科主任部長)

に関する確固たる指針のないままに各医療施設の少ない経験に基づく加療ないし経過観察が行われているのが実情であり、早急な、かつ科学的根拠に基づいた治療環境の整備は急務である。本研究では、(1)BBEの本邦における実態把握と、脳幹脳炎の中でのBBEの位置付けを明らかにするための全国疫学調査、また、その結果を土台としたBBE診断基準の作成を中心課題とし、併せて(2)BBEの病因・発症機序を明らかにする目的で、1)抗GQ1b抗体の微細な反応性の検討、2)患者血清の血液脳関門/血液神経関門に対する効果の細胞学的検証、3)患者の液性免疫病態評価法の確立、4)先行感染の意義を明らかにすることを目的とした先行感染病原体の網羅的血清学的検討をおこなった。今まで全くなされていなかった本邦における患者実体の把握と診断基準の作成、病因の解明を通じて、患者数が少なく市場性に乏しい希少疾患であるBBEの新規治療法開発という厚生労働行政の主要課題の一つを達成することが本研究の最終目標である。

B. 研究方法

(1)全国疫学調査とBBE診断基準の作成

本研究では、一次調査でBBE症例に限らず脳幹脳炎症例を把握し、その結果に基づき二次調査で個々の脳幹脳炎症例の詳細な臨床情報を収集した。独自の診断基準に照らし合わせることでBBE症例を同定し、脳幹脳炎の中でのBBEの位置付けを明らかにできるように計画した。一次調査として、全国諸施設を対象に、過去三年間(2006年10月～2009年9月)の脳幹脳炎患者数の症例数を問う調査票を郵送した。調査対象施設として、脳幹脳炎患者を診る機会があると考えられる「神経内科」、「脳神経外科」、「内科」、「小児科」の4科のいずれかを標榜する全医療機関のうち、層化無作為抽出法(層は8つ)により全国から3,524機関を抽出した(抽出率約20%)。一次調査で過去三年間に脳幹脳炎症例を経験しているとの回答を得た医療機関を対象に二次調査を実施した。調査票では、臨床像(先行感染症状、ピーク時の神経所見・重症度、血中抗グングリオシド抗体、髄液、脳波、神経伝導検査、頭部MRI、転帰)のほか、治療法や各医療機関での診断名についても調査した。5名の神経内科専門医(古賀、楠、海田、郡山、神田)により協議・修正を重ねた上で、表に示すBBEの診断基準を作成した(本研究では「Definite」と「Probable」をBBEと定義)。推定BBE症例数と推定年間BBE発症数を算出するとともに、BBE症例の臨床的特徴、および治療

法の現状を調査した。

(2)BBEの病因・発症機序の解明

1)抗GQ1b抗体反応性の検討:2006年10月から2009年7月までに近畿大学神経内科に検査依頼のあった全ての抗GQ1b IgG抗体陽性例347例(BBE(n=20)、MFS(n=197)、GBS(n=78)、その他(n=52))を対象とした。BBE、MFS、GBSの3群間で、また意識障害が有る群(+)と無い群(-)とで、a)GQ1bとGT1aに対する相対的な抗体活性の強さ、b)GQ1bとGQ1b+PAに対する相対的な抗体活性の強さ、c)GQ1b、GT1a、GQ1b+PAに対する抗体価について比較した。

2)患者血清の血液脳関門/血液神経関門に対する効果の細胞学的検証:近畿大学神経内科にて確定診断したBBE患者11例と、当院にて確定診断したMFS患者10例の血清を使用した。BBE血清11例のうち8例でIgG抗GQ1b抗体が陽性で、MFS血清10例のうち9例でIgG抗GQ1b抗体が陽性であった。これらの血清を山口大学神経内科で樹立したBBB構成内皮細胞株(TY10)とBNB構成内皮細胞である不死化ヒト末梢神経由来微小血管内皮細胞株(PnMECs)に作用させた。15例の血清をTY10に作用させてバリア機能を反映すると言われている電気抵抗(TEER)値を測定した。用いる血清がBBE/MFS症例由来のいずれであるかわからない状況下で実験を行う事で、盲目性を確保した。患者血清3例ずつを両細胞株に作用させ、TJ関連蛋白分子であるclaudin-5とoccludinの変化をWestern blot法(WB)で検討した。併せてMMP-9とMMP-2のmRNAの発現量及び蛋白量の変化をreal-time PCR法とWB法で解析した。

3)患者の液性免疫病態評価法の確立:抗体介在性中枢神経炎症性疾患のプロトタイプとして視神経脊髄炎(NMO)末梢血検体を用い、自己抗体産生細胞の末梢血での解析法開発を試みた。年齢のマッチした抗AQP4抗体陽性患者24例、CMS患者19名、健常者20名を対象とした。末梢血単核細胞を分離し、蛍光標識抗体で染色し、B細胞亜分面の頻度を測定した。B細胞亜分面をフローサイトメーターで精製分離し、in vitroで培養し、培養上清の抗AQP4抗体価を測定した。

4)先行感染病原体の検索:近畿大学に検査目的で送付されたBBE患者血清29例と、対照として非自己免疫性神経・筋疾患の患者血清(N=33)を用いた。GBSの主要な原因とされる4つの病原体(*Campylobacter jejuni*、サイトメガロ

ウイルス、Epstein-Barr ウイルス *Mycoplasma pneumoniae*) の先行感染頻度を血清学的に検索した。さらに、これら以外の病原体 15 種に関しても検討した。

・倫理面への配慮: 本研究実施に際し、山口大学医学部附属病院医薬品等治験・臨床研究等審査委員会の承認を得た。近畿大学医学部、国立精神神経センターの各倫理委員会においても承認を受けた。プライバシーの保護には十分に配慮した。

C. 研究結果

(1) 全国疫学調査と BBE 診断基準の作成

一次調査の回答は、1,526 機関 (回答率 43.3%) から得られた。116 機関では過去三年間に脳幹脳炎症例を経験しており、症例数は累計 181 例 (男性 102 例、女性 79 例) であった。これらの結果をもとに、本邦における、当該期間 (3 年間) の脳幹脳炎の患者数は 704 人 (95%信頼区間 478-930 人) と推測された。

一次調査で報告された脳幹脳炎 181 例につき二次調査を各機関に依頼し、87 症例につき詳細な臨床情報の回答を得た (回答率 48.1%)。BBE の診断基準 (表) は 87 例中 37 例 (42.5%) が満たした (Definite BBE が 19 例、Probable BBE が 18 例)。このデータと一次調査での脳幹脳炎患者推計を踏まえると、調査対象期間三年間で BBE 推計症例は $704 \times (37/87) = 299$ 例と推計された。BBE が急性でかつ一過性の疾患であり予後良好であると考えられていることから、年間発症数 $\times 3 =$ 三年間の累計患者数と仮定すれば、年間 BBE 発症数は $299 \div 3 \approx 100$ 例と算出された。

BBE 例は男性にやや多く (1.3:1)、30 歳代にピークがあり、BBE 以外の脳幹脳炎よりも若年発症であった。BBE の三主徴 (眼球運動障害、運動失調、意識障害) を除いた特徴は、四肢末梢の“しびれ (感)”での発症、口咽頭筋麻痺や腱反射の低下・消失、四肢末梢での感覚障害、眼球運動における外転制限優位性であった。約 6 割の症例で発症後一週間以内に症状のピークを迎え、人工呼吸器管理を要したのは 2 割の症例であった。血中 IgG 抗 GQ1b 抗体の陽性率は 75% であった。治療として大部分の例において免疫グロブリン大量静注療法が行われ、発症 3 カ月後までに約 9 割の症例で良好な転帰をとっていた。

BBE 新規診断基準を作成した (別表参照)。

(2) BBE の病因・発症機序の解明

1) 抗 GQ1b 抗体反応性の検討: BBE と MFS は、抗 GQ1b 抗体価が抗 GT1a 抗体価より高い症例が 70% と 57.9% で、GBS の 38.5% と比べて高く ($p=0.015$)、BBE は抗 GQ1b 抗体価が +PA で増強する例が 35% で、MFS の 69.5% に比べて少なかった ($p=0.004$)。意識障害が有る例とない例とで、GQ1b と GQ1b+PA に対する抗体価に差はなかったが、意識障害がある例は抗 GQ1b 抗体価が PA 添加で増強する例が 35% で意識障害がない例の 62.7% と比べて少なかった ($p=0.026$)。

2) 患者血清の血液脳関門/血液神経関門に対する効果の細胞学的検証: TY10 に BBE の患者血清を作用させると TEER 値が有意に低下したが、MFS の患者血清を作用させても変化はなかった。TY10 に BBE の患者血清を作用させると claudin-5 の発現量が低下し、MMP-9 と MMP-2 の発現量が増加した。MFS の患者血清を作用させても、claudin-5、MMP-9、MMP-2 のいずれの発現量にも変化はなかった。

3) 患者の液性免疫病態評価法の確立: 健常者、CMS 患者と比較し、抗 AQP4 抗体陽性患者群において、CD180 陰性 CD38 強陽性 CD27 陽性 CD19 弱陽性 B 細胞の頻度が有意に増加していることが判明した。また、NMO のこの B 細胞分画はプラズマブラストであることが判明した。NMO プラズマブラストの培養上清にのみ、抗 AQP4 抗体活性を認めた。

4) 先行感染病原体の検索: 急性期の感染が示唆されたのは、BBE 29 例中 11 例 (38%) であり、対照群 (33 例中 5 例 [15%]) よりも高頻度であった ($P=0.04$: Fisher の直接確率法)。GBS の主要な病原体による先行感染は、BBE 症例の 10% でしかみられなかった。その他の病原体に関しては、水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) (BBE 3 例 [10%] vs 対照 0 例)、ムンプスウイルス (3 例 [10%] vs 2 例 [6.1%])、単純ヘルペスウイルス (HSV) (2 例 [6.9%] vs 1 例 [3.0%]) で IgM 特異抗体が検出され、*H. influenzae* は BBE 3 例 (10%) で急性期感染ありと判定された。特定の先行感染による、特徴的な臨床像や抗ガングリオンド抗体のパターンは見出せなかった。

表 ビッカースタッフ型脳幹脳炎の診断基準

以下の(1)(2)(4)をいずれも満たすものを Definite Bickerstaff 型脳幹脳炎とする。

(1)(4)、あるいは(2)(3)(4)を満たすものを Probable Bickerstaff 型脳幹脳炎とする。

(1) 以下の三徴候の全てが急性進行性にみられ、発症後 4 週以内にピークとなり、三カ月以内に軽快傾向を示す

(三徴候)

- ・両側外眼筋麻痺(左右対称性であることを原則とするが、軽度の左右差はあってもよい)
- ・運動失調
- ・意識水準の低下

(2) 血中 IgG 型 GQ1b 抗体陽性

(3) (1)の臨床的特徴のうち、一部が一致しない

- ・筋力低下・意識水準低下などのため運動失調の評価が困難である
- ・軽快傾向を確認できない
- ・外眼筋麻痺に高度の左右差がある場合(片側性など)
- ・意識水準の低下はないが、長径路徴候を示唆する所見(片側性感覚障害や錐体路徴候、痙性麻痺など)がある場合

(4) 以下の疾患(順不同)が各種検査(脳脊髄液、画像検査など)から除外できる

Wernicke 脳症、脳血管障害、多発性硬化症、視神経脊髄炎、急性散在性脳脊髄炎、神経 Behçet 病、神経 Sweet 病、下垂体卒中、ウイルス性脳幹脳炎、重症筋無力症、脳幹部腫瘍性病変、血管炎、ボツリヌス中毒、橋本脳症

D. 考察

(1) 全国疫学調査と BBE 診断基準の作成

本疫学調査の結果、我々の作成した診断基準を満たす BBE の本邦における年間発症数は約 100 名と推算された。2008 年の本邦の人口 (1 億 2770 万人) から単純に計算すれば、127 万人当たり一人が一年間で発症していることになる。この発症者数は、本邦での年間発症数が人口 10 万人あたり 1.15 人と推算されている GBS の約 1/15 に相当する数字である。男女比や発症年齢も GBS での調査結果と類似する結果が得られ、疫学調査からも BBE が GBS の類縁疾患であることが支持された。

(2) BBE の病因・発症機序の解明

1) 抗 GQ1b 抗体反応性の検討: BBE または意識障害を伴う例では、GT1a と比べて GQ1b により強く反応する抗体をもつ例が多く、GQ1b+PA よりも GQ1b そのものにより強く反応する抗体をもつ例が多かった。すなわち GQ1b そのものに特異性の高い抗体の上昇が示唆された。こうした反応性をもつ抗体の上昇が、中枢神経障害をきたす要因のひとつと考えられる。

2) 患者血清の血液脳関門/血液神経関門に対する効果の細胞学的検証: BBE の患者血清は BBB の機能を破綻させることが明らかとなった。BBE 患者血清を作用させると BBB 構成内皮細胞の MMP-9 と MMP-2 の発現が増加したことから、BBE では脳微小血管内皮細胞から autocrine に産生される MMP-9 と MMP-2 が BBB 機能の破綻に関与している可能性が想定された。

3) 患者の液性免疫病態評価法の確立: NMO 患者末梢血中で抗 AQP4 抗体産生能を有するプラズマブラストの増加を認めた。今回確立したフローサイトメリー技術を用いて、BBE 末梢血 B 細胞異常の有無を明らかにすることが重要であると考えられる。

4) 先行感染病原体の検索: 今回の検討で、GBS と同様に BBE でも感染症が発症に関与していることが示された。さらに、高頻度に急性期感染が示唆された病原体は VZV と *H. influenzae*、ムンプスウイルス、HSV であった。オランダで行われた検討結果では、GBS における VZV や *H. influenzae*、HSV の先行感染頻度はそれぞれ 1% 程度と報告されており (Jacobs et al. *Neurology* 1998)、ムンプス感染の先行感染頻度は明らかにされていない。これらの結果から、先行感染の観点からは、BBE は GBS と比べ多彩な病態であることが示された。

E. 結論

(1) 本邦における BBE の年間発症数は約 100 名と推算された。治療法として、大部分の例において免疫グロブリン大量静注療法が行われ、発症 3 カ月後までに約 9 割の症例で良好な転帰をとっていた。BBE 疫学調査をふまえ、BBE 診断基準を作成した。

(2) BBE とミラーフィッシャー症候群 (MFS) はいずれも抗 GQ1bIgG 抗体が病因と密接に関連していると考えられているが、両者の臨床表現型は大きく異なっている。この表現型の差異に関し、自己抗体の反応性の検索からは GQ1b そのものに特異性の高い抗体の上昇が、細胞学的解析からは液性因子により脳微小血管内皮細胞より autocrine に産生される MMP-9 と MMP-2 が、それぞれ BBE の病態形成において重要と考えられた。この 2 者が両者の表現型の違いに関与している可能性がある。

(3) NMO 末梢血において抗 AQP4 抗体産生能を有するプラズマブラストの増加を認めた。プラズマブラストの頻度測定は、BBE 液性免疫異常の評価方法として有用である可能性がある。

(4) GBS と同様に BBE でも感染症が発症に関与しているが、原因となる病原体は GBS と大きく異なっている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sano Y, Shimizu F, Abe M, Maeda T, Kashiwamura Y, Ohtsuki O, Terasaki T, Obinata M, Kajiwaru K, Fujii M, Suzuki M, Kanda T: Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood-brain barrier function. *J Cell Physiol* 225: 519-528 2010.

Ueda A, Shima S, Miyashita T, Ito S, Ueda M, Kusunoki S, Asakura K, Mutoh T: Anti-GM1 antibodies in axonal form of Guillain-Barré syndrome affect the integrity of lipid rafts. *Mol Cell Neurosci* 45: 355-362, 2010.

Kaida K, Kusunoki S. Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome: Mini-review. *J Neuroimmunol*, 2010; 223: 5-12.

神田 隆: 血液脳関門・血液神経関門. 特集免疫性神経疾患—新たな治療戦略へ向けて. *内科* 105: 846-851, 2010.

神田 隆: 血液脳関門の分子機構. 内皮細胞を中心に. *分子脳血管病* 9: 251-256, 2010.

海田賢一、楠 進. 神経疾患と分子マーカー: Guillain-Barré 症候群. *Clinical Neuroscience* 28: 1400-1404, 2010

Shimizu F, Sano Y, Abe M, Maeda T, Ohtsuki S,

- Terasaki T, Kanda T: Peripheral nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *J Cell Physiol* 226: 255-266, 2011.
- Sano Y, Kanda T: Isolation and properties of endothelial cells forming the blood-nerve barrier. *Methods Mol Biol* 686: 417-425, 2011.
- Kashiwamura Y, Sano Y, Abe M, Shimizu F, Haruki H, Maeda T, Kawai M, Kanda T: Hydrocortisone enhances the function of blood-nerve barrier through the up-regulation of claudin-5. *Neurochem Res* 36: 849-855, 2011.
- Shimizu F, Haruki H, Sano Y, Kanda T: Advanced glycation end-products induce basement membrane hypertrophy in endoneurial microvessels and disrupt the blood-nerve barrier by stimulating the release of TGF- β and vascular endothelial growth factor (VEGF) by pericytes. *Diabetologia* 54: 1517-1526, 2011.
- Shimizu F, Sano Y, Haruki H, Kanda T: Pericyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor increase in the expression of claudin-5 in the blood-brain barrier and the blood-nerve barrier. *Neurochem Res* 2011; 36: 849-855.
- Moriguchi K, Miyamoto K, Takada K, Kusunoki S: Four cases of anti-ganglioside antibody-positive neuralgic amyotrophy with good response to intravenous immunoglobulin infusion therapy. *J Neuroimmunol* 238: 107-109, 2011.
- Kusunoki S, Kaida K. Antibodies against ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and related disorders. *J Neurochem*, 2011; 116: 828-832.
- Kuwahara M, Suzuki S, Takada K, Kusunoki S. Antibodies to LM1 and LM1-containing ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol* 2011; 239: 87-90.
- Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, Yamamura T. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011; 108, 3701-3706.
- Koga M, Takahashi T, Kawai M, Fujihara K, Kanda T. A serological analysis of viral and bacterial infections associated with neuromyelitis optica. *J Neurol Sci* 2011; 300: 19-22.
- Zitman FMP, Greenshields KN, Kuijff ML, Ueda M, Kaida K, Broos LAM, Tio-Gillen AP, Jacobs BC, Kusunoki S, Willison HJ, Plomp JJ: Neuropathophysiological potential of Guillain-Barré syndrome: anti-ganglioside-complex antibodies at mouse motor nerve terminals. *Clin Exp Neuroimmunol* 2: 59-67, 2011.
- Kusunoki S, Kaida K: Antibodies against ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and related disorders. *J Neurochem* 116: 828-832, 2011.
- 神田 隆: 血液神経関門 update. *BRAIN and NERVE* 63: 557-569, 2011.
- 神田 隆: 血液脳関門・血液神経関門の破綻. *Neuroinfection* 16: 87-95, 2011.
- 清水文崇、安部真彰、神田 隆: 糖尿病性末梢神経障害の病態解明に向けたヒト血液神経関門 in vitro モデルの作製. *Peripheral Nerve* 22: 57-63, 2011.
- 楠 進. GBS とガングリオシド複合体抗体ー最近の知見ー. *Annual Review 神経* 2011 (鈴木 則宏 他、編、中外医学社、東京) pp293-299, 2011.
- 海田賢一、楠 進: 抗ガングリオシド抗体ーギラン・バレー症候群とその関連疾患における病態への関与ー. *日本臨床免疫学会誌* 34: 29-39, 2011.
- Mauri L, Casellato R, Ciampa MG, Uekusa Y, Kato K, Kaida K, Motoyama M, Kusunoki S, Sonnino S: Anti-GM1/GD1a complex antibodies in GBS sera specifically recognize the hybrid dimer of GM1-GD1a. *Glycobiology* 22: 352-360, 2012.
- Sakushima K, Tsuboi S, Yabe I, Hida K, Terae S, Uehara R, Nakano I, Sasaki H. Nationwide survey on the epidemiology of syringomyelia in Japan. *J Neurol Sci* 313: 147-152, 2012.
- Shimizu F, Sano Y, Takahashi T, Haruki H, Saito K, Koga M, Kanda T: Sera from neuromyelitis optica patients disrupt blood-brain barrier. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83: 288-297, 2012.
- Omoto M, Suzuki S, Ikeuchi T, Ishihara T, Kobayashi T, Tsuboi Y, Ogasawara J, Koga M, Kawai M, Iwaki T, Kanda T. Autosomal dominant tauopathy with parkinsonism and central hypoventilation. *Neurology* 78: 762-764, 2012.
- Koga M, Gilbert M, Takahashi M, Li J, Hirata K, Kanda T, Yuki N. GQ1b-seronegative Fisher syndrome: Clinical features and new serological markers. *J Neurol* (in press)
2. 学会発表
Haruki H, Sano Y, Shimizu H, Nakata T, Kanda

- T: Department of integrated neuroscience: Establishment of glio-vascular unit model to reveal of pathogenesis of neuromyelitis optica. Neuroimmunology Kyoto Conference 2010. Kyoto, August 21, 2010.
- Sano Y, Shimizu F, Haruki H, Saito K, Kanda T: Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood-brain barrier function. The First International Conference on Neural Tissue Culture. Seoul, Korea, June 25, 2010.
- Shimizu F, Sano Y, Haruki H, Kanda T: The effect of advanced glycation end-products on blood-nerve barrier. Neuroscience 2010. San-Diego, Nov 13, 2010.
- Kusunoki S. Gangliosides and ganglioside complexes as targets for Guillain-Barré syndrome. The Fourth ISN Special Neurochemistry Conference "Membrane Domains in CNS Physiology and Pathology", May 22-26, 2010, Erice, Italy
- Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Yamamura T: Plasma cell-like B cells produce aquaporin 4 autoantibody in neuromyelitis optica. Kyoto: Neuroimmunology Kyoto Conference 2010, August 21 2010.
- Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Yamamura T: Auto-reactive anti-aquaporin 4 antibodies are secreted from peripheral plasma cell-like B cells in neuromyelitis optica. Kobe: 14th International Congress of Immunology 2010, Kobe, August 23 2010.
- Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, Yamamura T: Plasma cell-like B cells produce aquaporin 4 autoantibody in neuromyelitis optica. 10th International Congress of Neuroimmunology 2010, Sitges (Barcelona), Oct.29, 2010.
- 古賀道明, 川井元晴, 高橋利幸, 尾本雅俊, 小笠原淳一, 根来 清, 神田 隆. Neuromyelitis optica 発症における感染症の関与. 第 51 回日本神経学会総会. 2010 年 5 月 20-22 日, 東京.
- 清水文崇, 佐野泰照, 富永 磨, 柏村陽子, 春木明代, 神田 隆: AGE が血液神経関門に及ぼす影響の解析. 第 51 回日本神経学会総会. 東京, 2010 年 5 月 20-22 日.
- 春木明代, 佐野泰照, 柏村陽子, 清水文崇, 神田 隆, 中田 力: NMO の病態解析のためのヒト glio-vascular unit model の作製. 第 51 回日本神経学会総会. 東京, 2010 年 5 月 20-22 日.
- 柏村陽子, 佐野泰照, 清水文崇, 春木明代, 神田 隆: 副腎皮質ステロイド薬が血液神経関門に及ぼす影響の解析. 第 51 回日本神経学会総会. 東京, 2010 年 5 月 20-22 日.
- 春木明代, 佐野泰照, 清水文崇, 神田 隆, 中田力: NMO の病態解析のためのヒト glio-vascular unit model の作製. 第 114 回山口大学医学会学術講演会. 宇部, 2010 年 7 月 17 日.
- 清水文崇, 佐野泰照, 斎藤和幸, 春木明代, 神田 隆: AGE による血液神経関門破綻メカニズムの解析. 第 21 回日本末梢神経学会総会. 仙台, 2010 年 9 月 4 日.
- 千原典夫, 佐藤和貴郎, 荒浪利昌, 宮崎雄生, 三宅幸子, 岡本智子, 小川雅文, 山村 隆: 視神経脊髄炎(NMO)における B 細胞の役割について. 第 22 回日本神経免疫学会学術集会, 東京, 2010 年 3 月 18 日
- 楠 進: 免疫性ニューロパチーの診療における抗ガングリオシド抗体の有用性. 第 28 回日本神経治療学会総会 (2010 年 7 月 15 日 ~16 日, 横浜)
- 宮本勝一, 元山真由美, 青砥聡子, 青松宏美, 桑原基, 鈴木聖子, 高田和男, 楠 進: 当院における抗ガングリオシド抗体測定動向. 第 21 回日本末梢神経学会学術集会 (2010 年 9 月 3 日 ~4 日, 仙台)
- Haruki H, Sano Y, Shimizu F, Nakata, Kanda T: Establishment of glio-vascular unit model to reveal of pathogenesis of neuromyelitis optica The 63rd American Academy of Neurology Annual Meeting, Honolulu, U.S.A. April 14, 2011
- Shimizu F, Sano Y, Takahashi Y, Haruki H, Kanda T: Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier. ECTRIMS, Amsterdam. Oc21-23t, 2011.
- Haruki H, Sano Y, Shimizu F, Nakata T, Kanda T: NMO sera and astrocyte cell death: an in vitro study. ECTRIMS, Amsterdam. Oc21-23t, 2011.
- Kusunoki S. Antibodies to glycoconjugates in autoimmune neuropathies. 42nd Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry, March 19-23, 2011, St. Louis, USA
- Kusunoki S, Suzuki S, Ueda M, Kuwahara M. Clinical relevance of the fine specificity of IgG anti-GQ1b antibodies. 2011 Meeting of the Peripheral Nerve Society, June 25-29, 2011, Potomac, MD, USA
- Kusunoki S, Suzuki S, Ueda M, Kuwahara M.

Clinical features associated with fine specificity of IgG anti-GQ1b antibodies. 136th Annual Meeting of the American Neurological Association, September 25-27, 2011, San Diego, CA, USA

Koga M, Kanda T, Yuki N: GQ1b-seronegative Fisher syndrome: serological study. Biennial Meeting of the Peripheral Nerve Society Potomac, Maryland, USA. June 25-29, 2011.

Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Yamamura T. Interleukin 6 Signaling Enhances Anti-aquaporin 4 Autoantibody Production from Plasmablasts in Neuromyelitis Optica Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS) 11th annual meeting, Washington, June.24, 2011.

清水文崇, 佐野泰照, 斎藤和幸, 春木明代, 前田敏彦, 安部真彰, 神田 隆: 視神経脊髄炎血清での血液脳関門破綻メカニズムの解析. 第 52 回日本神経学会学術大会. 名古屋, 2011 年 5 月 18-20 日.

清水文崇, 佐野泰照, 安部真彰, 前田敏彦, 斎藤和幸, 春木明代, 松井尚子, 梶 龍兒, 神田 隆: 多巣性運動ニューロパチー血清が血液神経関門に及ぼす影響の解析. 第 22 回日本末梢神経学会総会. 沖縄, 2011 年 9 月 2-3 日.

古賀道明, 高橋正樹, 結城伸泰, 神田 隆. ギラン・バレー症候群発症におけるカンピロバクター・シアル化の意義. 第 52 回日本神経学会学術大会. 2011 年 5 月 18-20 日, 名古屋.

古賀道明, 上田昌美, 楠 進, 神田 隆. ビッカースタッフ型脳幹脳炎における感染症の関与: ギラン・バレー症候群との差異. 第 23 回日本神経免疫学会学術集会. 2011 年 9 月 15-17

日, 東京.

楠 進. レビュートーク「神経免疫と臨床免疫: 現在の到達点」: 免疫性末梢神経疾患の基礎と臨床. 第 22 回日本神経免疫学会学術集会 (2010 年 3 月 17 日~19 日, 東京)

楠 進. ホットピックス: 自己抗体からみたニューロパチー. 第 52 回日本神経学会学術大会 (2011 年 5 月 18 日~20 日, 名古屋)

鈴木聖子, 桑原基, 楠 進. 抗 GQ1b 抗体の反応特異性と臨床徴候の関連. 第 52 回日本神経学会学術大会 (2011 年 5 月 18 日~20 日, 名古屋)

鈴木 聖子, 桑原 基, 上田 昌美, 高田 和男, 楠 進. MFS, BBE, GBS における抗 GQ1b 抗体の反応特異性と臨床徴候との関連. 第 23 回日本神経免疫学会学術集会 (2011 年 9 月 15 日~17 日, 東京)

楠 進. シンポジウム「機能性糖鎖: 基礎から疾患まで」 免疫性末梢神経障害と糖鎖に対する抗体. 第 84 回日本生化学会大会 (2011 年 9 月 21 日~24 日, 京都)

千原 典夫, 荒浪 利昌, 林幼偉, 岡本 智子, 小川 雅文, 戸田 達史, 山村 隆: 視神経脊髄炎(NMO)における plasmablasts の関与. 第 23 回日本神経免疫学会学術集会 2011, 東京, 2011 年 9 月 17 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
楠 進	GBS とガングリオシド複合体抗体 —最近の知見—	鈴木則宏 他	Annual Review 神経 2011	中外医学社	東京	2011	293-299
神田 隆	ギラン・バレー症候群		各疾患領域の 治療の現状とメ ディカル・ニーズ DATA BOOK	技術情報 協会	東京	2010	249-255

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Koga M, Gilbert M, Takahashi M, Li J, Hirata K, Kanda T, Yuki N.	GQ1b-seronegative Fisher syndrome: clinical features and new serological markers.	<i>J Neurol</i>	(in press)		2012
Kawai M, Shimizu F, Omoto M, Ogasawara J, Takahashi T, Kanda T	Neuromyelitis optica shows marked hypermetabolism in 18F-FDG positron emission tomography.	<i>Clin Exp Neuroimmunol</i>	(in press)		2012
Omoto M, Suzuki S, Ikeuchi T, Ishihara T, Kobayashi T, Tsuboi Y, Ogasawara J, Koga M, Kawai M, Iwaki T, Kanda T.	Autosomal dominant tauopathy with parkinsonism and central hypoventilation.	<i>Neurology</i>	78	762-764	2012
Shimizu F, Sano Y, Takahashi T, Haruki H, Saito K, Koga M, Kanda T.	Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier.	<i>J Neurol Neurosurg Psychiatry</i>	83	288-297	2012
Shimizu F, Sano Y, Saito K, Abe MA, Maeda T, Haruki H, Kanda T.	Pericyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor increase the expression of claudin-5 in the blood-brain barrier and the blood-nerve barrier	<i>Neurochem Res</i>	37	401-409	2012
Mauri L, Casellato R, Ciampa MG, Uekusa Y, Kato K, Kaida K, Motoyama M, Kusunoki S, Sonnino S.	Anti-GM1/GD1a complex antibodies in GBS sera specifically recognize the hybrid dimer of GM1-GD1a.	<i>Glycobiology</i>	22	352-360	2012

Sakushima K, Tsuboi S, Yabe I, Hida K, Terae S, <u>Uehara R</u> , Nakano I, Sasaki H.	Nationwide survey on the epidemiology of syringomyelia in Japan.	<i>J Neurol Sci</i>	313	147-152	2012
Kashiwamura Y, Sano Y, Abe M, Shimizu F, Haruki H, Maeda T, Kawai M, <u>Kanda T</u> .	Hydrocortisone enhances the function of the blood-nerve barrier through the up-regulation of claudin-5.	<i>Neurochem Res</i>	36	849-855	2011
<u>Koga M</u> , Takahashi T, Kawai M, Fujihara K, <u>Kanda T</u> .	A serological analysis of viral and bacterial infections associated with neuromyelitis optica.	<i>J Neurol Sci</i>	300	19-22	2011
Shimizu F, Sano Y, Haruki H, <u>Kanda T</u> .	Advanced glycation end-products induce basement membrane hypertrophy in endoneurial microvessels and disrupt the blood-nerve barrier by stimulating the release of TGF- β and vascular endothelial growth factor (VEGF) by pericytes.	<i>Diabetologia</i>	54	1517-1526	2011
Shimizu F, Sano Y, Abe M, Maeda T, Ohtsuki S, Terasaki T, <u>Kanda T</u> .	Peripheral nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors.	<i>J Cell Physiol</i>	226	255-266	2011
Sano Y, Shimizu F, Kawai M, Omoto M, Negoro K, Kurokawa T, Fujisawa H, Suzuki M, Okayama N, Suehiro Y, Hinoda Y, <u>Kanda T</u> .	p.Arg332Cys mutation of NOTCH3 gene in two unrelated Japanese families with CADASIL.	<i>Intern Med</i>	50	2833-2838	2011
西原秀昭, 小笠原 淳一, 古賀道明, 尾本雅俊, 川井元 晴, 神田 隆	IgG4関連自己免疫性膵炎による膵腫大 を呈したPOEMS症候群	<i>臨床神経</i>	51	417-421	2011
竹下幸男, 古賀道 明, 尾本雅俊, 小笠 原淳一, 川井元晴, <u>神田 隆</u>	感覚障害を主徴とし, 免疫グロブリン静 注療法により速やかに改善した遠位型 慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー の46歳男性例	<i>臨床神経</i>	51	478-481	2011
Moriguchi K, Miyamoto K, Takada K, <u>Kusunoki S</u> .	Four cases of anti-ganglioside antibody-positive neuralgic amyotrophy with good response to intravenous immunoglobulin infusion therapy.	<i>J Neuroimmunol</i>	238	107-109	2011

Kuwahara M, Suzuki S, Takada K, <u>Kusunoki S</u> .	Antibodies to LM1 and LM1-containing ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.	<i>J Neuroimmunol</i>	239	87-90	2011
Zitman FMP, Greenshields KN, Kuijf ML, Ueda M, Kaida K, Broos LAM, Tio-Gillen AP, Jacobs BC, <u>Kusunoki S</u> , Willison HJ, Plomp JJ.	Neuropathophysiological potential of Guillain-Barré syndrome anti-ganglioside-complex antibodies at mouse motor nerve terminals.	<i>Clin Exp Neuroimmunol</i>	2	59-67	2011
<u>Kusunoki S</u> , Kaida K.	Antibodies against ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and related disorders.	<i>J Neurochem</i>	116	828-832	2011
Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, <u>Yamamura T</u> .	Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica.	<i>Proc Natl Acad Sci U S A</i>	108	3701-6	2011
千原典夫, <u>山村 隆</u> :	ここまでわかった自己免疫疾患-多発性硬化症・視神経脊髄炎	<i>臨床検査</i>	55	1241-1248	2011
Sano Y, Shimizu F, Abe M, Maeda T, Kashiwamura Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Obinata M, Kajiwara K, Fujii M, Suzuki M, <u>Kanda T</u> .	Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood-brain barrier function.	<i>J Cell Physiol</i>	225	519-528	2010
Shimizu F, Sano Y, Abe M, Maeda T, Ohtsuki S, Terasaki T, <u>Kanda T</u> .	Peripheral nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors.	<i>J Cell Physiol</i>	217	388-399	2010
<u>神田 隆</u>	血液脳関門・血液神経関門. 特集免疫性神経疾患-新たな治療戦略へ向けて	<i>内科</i>	105	846-851	2010
<u>神田 隆</u>	血液脳関門の分子機構. 内皮細胞を中心に	<i>分子脳血管病</i>	9	251-256	2010
<u>神田 隆</u>	CIDPの治療選択	<i>Current Insights in Neurological Science</i>	18(2)	8-9	2010
Ueda A, Shima S, Miyashita T, Ito S, Ueda M, <u>Kusunoki S</u> , Asakura K, Mutoh T.	Anti-GM1 antibodies in axonal form of Guillain-Barré syndrome affect the integrity of lipid rafts.	<i>Mol Cell Neurosci</i>	45	355-362	2010

Kaida K, <u>Kusunoki S.</u>	Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome: Mini-review.	<i>J Neuroimmunol</i>	223	5-12	2010
千原 典夫、 <u>山村隆</u> :	神経疾患と炎症-多発性硬化症を中心に-	最新医学	11月号	2390-2395	2010
千原 典夫、 <u>山村隆</u> :	神経疾患と分子マーカー: 多発性硬化症	<i>Clinical Neuroscience</i>	28	1396-1399	2010
<u>古賀道明</u>	慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーの病態機序	内科	105	797-800	2010
<u>古賀道明</u>	ギラン・バレー症候群: 診断までの神経学的考え方	臨床と研究	87	838-842	2010

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

RESEARCH PAPER

Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood–brain barrier

Fumitaka Shimizu,¹ Yasuteru Sano,¹ Toshiyuki Takahashi,² Hiroyo Haruki,¹ Kazuyuki Saito,¹ Michiaki Koga,¹ Takashi Kanda¹

¹Department of Neurology and Clinical Neuroscience, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Ube, Japan
²Department of Neurology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Miyagi, Japan

Correspondence to

Dr T Kanda, Department of Neurology and Clinical Neuroscience, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1, Minamikogushi, Ube, Yamaguchi 7558505, Japan; tkanda@yamaguchi-u.ac.jp

Received 3 May 2011

Accepted 20 September 2011

Published Online First

19 November 2011

ABSTRACT

Objective In neuromyelitis optica (NMO), the destruction of the blood–brain barrier (BBB) has been considered to be the first step of the disease process. It is unclear whether sera from patients with NMO can open the BBB, and which component of patient sera is most important for this disruption.

Methods The effects of sera from aquaporin4 (AQP4) antibody positive NMO patients, multiple sclerosis patients and control subjects were evaluated for expression of tight junction proteins and for transendothelial electrical resistance (TEER) of human brain microvascular endothelial cells (BMECs). Whether antibodies against human BMECs as well as anti-AQP4 antibodies exist in NMO sera was also examined using western blot analysis.

Results Expression of tight junction proteins and TEER in BMECs was significantly decreased after exposure to NMO sera. However, this effect was reversed after application of an antivascular endothelial growth factor (VEGF) neutralising antibody. Antibodies against BMECs other than anti-AQP4 antibodies were found in the sera of NMO patients whereas no specific bands were detected in the sera of healthy and neurological controls. These antibodies apparently disrupt the BBB by increasing the autocrine secretion of VEGF by BMECs themselves.

Absorption of the anti-AQP4 antibody by AQP4 transfected astrocytes reduced AQP4 antibody titres but was not associated with a reduction in BBB disruption.

Conclusions Sera from NMO patients reduce expression of tight junction proteins and disrupt the BBB. Autoantibodies against BMECs other than anti-AQP4 antibodies may disrupt the BBB through upregulation of VEGF in BMECs.

INTRODUCTION

Neuromyelitis optica (NMO) is defined as an inflammatory CNS disease predominantly affecting the spinal cord and the optic nerves.¹ This disorder was long regarded as a variant of multiple sclerosis (MS), with distinctive pathological features.² A breakthrough in our understanding of NMO was identification of an autoantibody response with high sensitivity and specificity for the disease, which was found to be directed against the astrocytic water channel aquaporin 4 (AQP4).³ Several studies have suggested that the anti-AQP4 antibody is pathogenic and it also plays a key role in the development of NMO.^{4–11}

Circulating anti-AQP4 antibodies need to pass through the blood–brain barrier (BBB) in order to reach the CNS parenchyma, which is the site

affected by inflammation in this disease. Initiation of disease by transfer of these antibodies into normal animals has not been achieved to date¹² because the BBB restricts the entry of circulating anti-AQP4 antibodies into the CNS under normal conditions. Although destruction of the BBB causing leakage of anti-AQP4 antibodies and cytokines into the CNS space has been considered as a key step in the development of NMO, it remains unclear which components of patient sera is most important for disruption of the BBB. It is also unclear whether sera from an NMO patient containing circulating anti-AQP4 antibodies can open the BBB because no direct evidence has been presented indicating that the brain microvascular endothelial cells (BMECs), which comprise the BBB, express the AQP4 protein.^{13–14} Various circulating inflammatory cytokines, including tumour necrosis factor α (TNF α) and vascular endothelial growth factor (VEGF), which have already been reported to induce disruption of the BBB, may be the candidate molecules leading to the breakdown of the BBB.^{15–16} The existence of unknown pathogenic antibodies, apart from anti-AQP4 antibodies, may also cause BBB impairment.

The aim of the current study was to demonstrate the effects of sera from patients with NMO on impairment of BBB function and to clarify the roles of humoral factors, especially antibodies, against human BMECs, in the destruction of the BBB.

MATERIALS AND METHODS**Sera and antibody**

The acute phase sera from 14 consecutive NMO patients hospitalised at our institution were studied. All patients met the clinical criteria for NMO spectrum disorders.^{17–18} None of the NMO patients had antinuclear antibodies or SS-A/SS-B antibodies. The human anti-AQP4 antibody was detected in all patients by a procedure previously described by Takahashi.⁹ Blood samples were obtained within 7 days of onset and stored at -80°C until use. The sera from two patients who began plasma exchange (PE) treatment were also obtained. The acute phase sera from seven patients with conventional MS (C-MS), diagnosed by the McDonald criteria,¹⁹ were also used in this study. The sera from 15 patients with autoimmune inflammatory neurological diseases, including three patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus (NP-SLE), four patients with dermatomyositis, three patients with myasthenia gravis, three patients with multifocal motor neuropathy and two patients with microscopic polyangiitis were studied as inflammatory

disease controls. All NP-SLE, dermatomyositis and microscopic polyangiitis patients had antinuclear antibodies. In contrast, none of the myasthenia gravis and multifocal motor neuropathy patients had these antibodies. Sera from 12 patients with non-inflammatory neurological diseases, including four patients with amyotrophic lateral sclerosis, two patients with Parkinson's disease, four patients with cervical spondylosis and two patients with multiple system atrophy, were used as neurological disease controls. The sera from 12 healthy individuals also served as normal controls. All sera were incubated at 65°C for 30 min just prior to use. There were no statistically significant differences in the concentrations of IgG between the serum samples of the 14 NMO, 7 MS and 12 normal controls (means±SEM, NMO 1035±517 mg/dl; MS 1090±151 mg/dl; normal controls 1042±225 mg/dl) when the concentration of IgG in each of the samples was measured. The use of the patient's sera for this study was approved by the ethics committee of Yamaguchi University following the principles of the Declaration of Helsinki.

Cell culture and treatment

The immortalised human brain microvascular endothelial cells (BMECs) were generated previously.²⁰ Briefly, we previously established conditionally immortalised BBB derived endothelial cells, called TY08 cells, harbouring the temperature sensitive SV40 large T antigen (tsA58) protein.²⁰ The gene product of tsA58 is in an active conformation and binds to p53 at 33°C, thus facilitating the immortalisation of the cells, whereas the conformation of the gene product changes, leading to its degradation and the release of p53 when the cells are grown at 37°C. Therefore, these cells are conditionally immortal. The cells expressed all key tight junctional proteins, such as occludin, claudin-5, ZO-1 and ZO-2, and had low permeability to inulin across monolayers. All of the analyses were determined 3 days after the temperature shift from 33°C to 37°C. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), human fibroblasts and 293T cells were obtained from the Japan Health Sciences Foundation (Osaka, Japan) and human astrocytes were purchased from Lonza (Walkersville, Maryland, USA). BMECs were treated with culture medium containing 10% patient or healthy control sera in a humidified atmosphere of 5% CO₂/air. BMECs treated with culture medium with 10% fetal bovine serum (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) were used as controls. The mRNAs were extracted 24 h later, and total proteins were obtained a day later.

Reagents

The culture medium for BMECs consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) containing 100 U/ml penicillin (Sigma), 100 µg/ml streptomycin (Sigma), 25 ng/ml amphotericin B (Invitrogen, Grand Island, New York, USA) and 10% fetal bovine serum (Sigma). Polyclonal anti-claudin-5 and anti-occludin antibodies were purchased from Zymed (San Francisco, California, USA). The polyclonal anti-actin antibody was obtained from Santa Cruz (Santa Cruz, California, USA). The polyclonal anti-transforming growth factor β (TGFβ), anti-VEGF, anti-interleukin (IL)-6, anti-IL-17, anti-interferon γ (IFNγ) and anti-TNFα antibodies were purchased from R&D systems (Minneapolis, Minnesota, USA). Lysates of human claudin-5 transfected 293T cells and control 293T cells were purchased from Santa Cruz. A total of 5 µg of protein lysates were loaded for the western blot analysis.

Quantitative real time PCR analysis

Total RNA was extracted from BMECs using an RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Single stranded cDNA was created from 40 ng of total RNA using the StrataScript First

Strand Synthesis System (Stratagene, Cedar Creek, Texas, USA). The sequence of each human primer pair and its reference are as follows: sense primer 5'-CTG TTT CCA TAG GCA GAG CC-3' and antisense primer 5'-AAG CAG ATT CTT AGC CTT CC-3' for claudin-5²¹; sense primer 5'-TGG GAG TGA ACC CAA CTG CT-3' and antisense primer 5'-CTT CAG GAA CCG GCG TGG AT-3' for occludin²²; and sense primer 5'-GTC AAC GGA TTT GGT CTG TAT T-3' and antisense primer 5'-AGT CTT CTG GGT GGC AGT GAT-3' for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.²³ Quantitative real time PCR analyses were performed using a Stratagene Mx3005P (Stratagene) with Full-Velocity SYBR Green QPCR master mix (Stratagene). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as an internal standard. The samples were subjected to PCR analysis using the following cycling parameters: 10 min at 95°C followed by 40 cycles for 15 s at 95°C, 1 min at 60°C and 1 min at 72°C. The standard reaction curve was analysed by the MxPro (Stratagene) software programme and the relative quantity according to standard reaction curve (R_v) was calculated by computer according to the formula $R_v = R_{Gene} / R_{GAPDH}$.

Western blot analysis

Protein samples (10–20 µg) were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (Biorad, Hercules, CA, USA) and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham, Chalfont, UK). Expression of β-actin was used as an internal standard. The membranes were treated with blocking buffer (5% skimmed milk in 25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 125 mM NaCl, 0.5% Tween 20) for 1 h at room temperature and incubated with the relevant primary antibodies (dilution 1:100) for 2 h at room temperature. The membranes were then exposed to a peroxidase conjugated secondary antibody (1:2000), followed by a chemiluminescence reagent (Amersham), and exposure to X-Omat S films (Amersham) and quantification of the band intensity was obtained using the Fuji image analysis software package.

Immunocytochemistry

Cultured cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Wako, Osaka, Japan) and permeabilised with 100% methanol. Cells were subsequently incubated overnight with 5% serum (as relevant primary antibodies (dilution 1:20)) and then were incubated with a FITC labelled secondary antibody at a dilution of 1:200 for staining. Fluorescence was observed by a fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan). The nuclei were stained with DAPI, and the fluorescence was detected with a fluorescence microscope (Olympus). Image stacks were analysed with the localisation module of the Olympus software program (Olympus).

Transendothelial electrical resistance studies

Transwell inserts (pore size 0.4 µm, effective growth area 0.3 cm², BD Bioscience, Sparks, Maryland, USA) were coated with rat tail collagen type I (BD Bioscience). Transendothelial electrical resistance (TEER) values of cell layers were measured with a Millicell electrical resistance apparatus (Endohm-6 and EVOM; World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA). BMECs were seeded (1×10⁶ cells/insert) on the upper compartment and incubated with each medium (non-conditioned medium used as a control, conditioned medium contained 10% patient sera) for 24 h.

Studies with patient sera preincubated with neutralising antibodies against TNFα, IFNγ, VEGF, TGFβ, IL-6 or IL-17

BMECs were incubated with the sera from eight NMO patients containing 2.0 µg/ml of a neutralising antibody against TNFα,