

日本人 MS, NMO 患者の比較検討

1. 痙攣およびオリゴクローナル IgG バンドの頻度
2. 2004 年全国調査からみた生まれ月の比較

研究分担者 田中正美¹⁾

共同研究者 中野 仁¹⁾, 木下真幸子²⁾, 田原将行¹⁾, 松井 大¹⁾, 大封昌子¹⁾, 本山りえ¹⁾, 荒木保清³⁾, 中川正法³⁾, 田中恵子⁴⁾, 松下拓也⁵⁾, 吉良潤一⁵⁾, 小西哲郎²⁾

研究要旨

日本人 MS/NMO 患者を対象に痙攣と脊髄液オリゴクローナル IgG バンド(OCB)の頻度について比較するとともに、2004 年全国調査で得られたデータをもとに長い脊髄病変を有する群と有さない群との生まれ月についても検討した。

【目的】近年の NMO 概念の多発性硬化症(MS)/視神経脊髄炎(NMO)の治療はこの数年で大きく変化した。今後、MS では数多くの薬剤が導入されると思われるし、長期治療予後についても欧米から報告が相次いでいる。しかし、これらのデータをそのまま日本人に適応できる保証はない。昨年も両者を比較し、死亡場所や死因が両疾患で異なる可能性を示唆した。

MS では一般住民より痙攣が出現する頻度が高いことが知られているが、炎症病変の強い NMO との比較は報告がなく、NMO での痙攣の実態は不明である。また、日常診療で経験する OCB の頻度が従来の報告とは異なっているので、自験例について検討を行った。欧米では MS の生まれ月が以前より検討されているが、日本人のデータはない。そこで、日本人 MS 患者を対象とした 2004 年の全国調査のデータを解析し、3 椎体以上に連続する長い脊髄病変(LCL)の有無による違いについて検討した。

【対象と方法】

-
- 1) NHO 宇多野病院多発性硬化症センター
 - 2) 同神経内科
 - 3) 京都府立医大神経内科
 - 4) 金沢医大神経内科
 - 5) 九州大学神経内科

1. 2009年に当院に通院した、連続MS/NMO患者を対象に痙攣の頻度を、2008年10月から2011年7月までに初診したMS患者についてOCBを検討した。

2. 日本人MS患者を対象とした2004年の全国調査のデータを元に、3椎体以上に連続する長い脊髄病変(LCL)の有無による生まれ月について各群の中間値の年の全国一般住民のデータと比較検討した。

【結果】

1. 痙攣はMSで4/64例、NMOでは4/30例で認められた。これら8例全ての脳MRIで病変が認められた。再発でのみ痙攣が認められたのは、それぞれ2例、1例のみであった。MS/NMO発症前に痙攣が認められた患者はいなかった。

OCB陽性率はMS患者で17/31例(54.8%)で。男性7/1例(58.3%)、女性10/19例(52.6%)であった。

2. LCL(-)群とLCL(+群)の出生年

の中間値はそれぞれ昭和39年と32年で、一般住民の生まれ月と比較検討したところ、LCL(+群)では有意な変化はなかったが、LCL(-)群では1月と6月の95%信頼限界がそれぞれ(1.013-1.525)、(1.034-1.612)と増加していた。5月で減少していた理由は不明であるが、LCLの有無で生まれ月に偏りが認められ、外因の影響が示唆された。

【健康危険情報】 なし

【知的財産権の出願・登録状況】

特許取得:なし

実用新案登録:なし

多発性硬化症, 視神経脊髄炎患者の血漿中 osteopontin の検討

研究分担者：清水優子¹⁾

共同研究者：太田宏平²⁾、久保幸子¹⁾、大橋高志³⁾、小林正樹¹⁾、蒲澤千昌¹⁾、内山真一郎¹⁾

研究要旨

osteopontin (OPN) は酸性リン酸化タンパク質で、複数の matrix metalloproteinase が存在し、Th1 反応に促進的に作用する炎症性サイトカインで、インテグリンの結合部位をもつ。OPN は破骨細胞、マクロファージ、活性化 T 細胞、腫瘍細胞に発現し、癌転移、結核、サルコイドーシスなどの肉芽種性疾患の病勢マーカーとなっている。欧米の MS 血漿中 OPN の検討では寛解期と比較して再発期の OPN は高値であった。しかし、これまで日本人 MS、NMO の OPN の検討は十分に行われていない。今回我々は、日本人 MS、NMO の血漿中 OPN を測定し、疾患活動性と治療効果の biomarker としての有用性について検討した。その結果、血漿中 OPN は、健常者と比較し MS、NMO いずれも有意に高値。疾患活動性との検討では、MS、NMO ともに再発期は寛解期と比べ有意に高値で、MS では IFN 治療後有意に低下。疾患障害度との検討では、MS、NMO ともに EDSS と血漿中 OPN に有意な正の相関が認められ、再発寛解型 MS より二次進行性 MS 患者血漿中 OPN のほうが有意に高値であった。以上の結果から、血漿中 OPN は MS だけではなく NMO においても炎症、疾患活動性、障害度のマーカーとしての有用性が示唆された。

研究目的

osteopontin (OPN) は酸性リン酸化タンパク質で、活性化 CD4+T 細胞に発現し、Th1、Th17 反応に促進的に作用する炎症性サイトカインのひとつで、インテグリンの結合部位をもつ。OPN は、単球、マクロファージ、活性化 T 細胞、樹状細胞、腫瘍細胞に発現し、癌転移や結核、サルコイドーシスなどの肉芽種性疾患の病勢マーカーとなっている。欧米の MS 血漿中 OPN の検討では寛解期と比較し再発期の OPN は高値であった。しかし、これまで日本人 MS、NMO の OPN の検討は十分に行われていない。

今回我々は、日本人 MS、NMO の血漿中 OPN を測定し、疾患活動性と治療効果の biomarker としての有用性について検討した。

- 1) 東京女子医科大学神経内科
- 2) 東京理科大学理学部
- 3) 東京女子医科大学八千代医療センター神経内科

研究方法

対象：健常者 20 例（男女比 6 : 14、平均年齢 26.3 ± 2.8 歳）、MS と確定診断した患者 17 例（男女比 6 : 11、平均年齢 38.3 ± 10.4 歳、二次進行型 (SPMS) 6 例、再発寛解型 (RRMS) 11 例) の寛解期、再発期と Interferon(IFN)-β 治療後 2 年以上の寛解期、NMO 患者は 2006 年 Wingerchuk らの提唱した NMO 診断基準改訂版の診断基準¹⁾を満たした NMO 患者 16 例（男女比 1 : 15 平均年齢 43.3 ± 10.3 歳) の安定期、再発期で、いずれの患者も prednisolone (PSL) 単独か、もしくは azathioprine (AZT) の併用内服中であった。NMO 患者は全例抗 AQP4 抗体陽性である（抗 AQP4 抗体は東北大学神経内科 高橋利幸先生に依頼した）。

方法：血漿中 OPN 濃度は、Quantikine® Human OPN Immunoassay (R&D, MN, USA) を用い ELISA 法により測定し、①健常者、MS (再発期、寛解期、IFNβ 治療後)、NMO 患者 (再発、安定期) の病勢との比

較 (統計処理 : ANOVA/Kruskal-Wallis test)

②MS、NMO 患者血漿中 OPN と末梢血リンパ球 CD4+CXCR3+/CD4+CCR4+、CD8+CXCR3+/CD8+CCR4+との 相関、③ MS、NMO 患者血漿中 OPN と EDSS の相関 (2、3 の統計処理は Spearman 's rank correlation coefficient test を用いた) について検討した。

倫理面への配慮

本研究は東京女子医科大学の倫理委員会において承諾を得て行い、プライバシーの保護に十分配慮した。

結果

今回の検討では、血漿中 OPN は、MS、NMO いずれも健常者 ($33.76 \pm 26.56 \mu\text{l}$: mean \pm SD) と比較し、有意に高値であった。

疾患活動性と血漿中 OPN の検討では、MS 患者の再発期 ($69.24 \pm 36.85 \mu\text{l}$) では寛解期 ($61.64 \pm 16.31 \mu\text{l}$) と比べ、有意に高値で ($p < 0.05$)、IFN 治療後有意 ($59.02 \pm 15.71 \mu\text{l}$) に低下した ($p < 0.05$)。MS の病型について、SPMS ($93.28 \pm 19.76 \mu\text{l}$) は RRMS ($53.39 \pm 4.54 \mu\text{l}$) より血漿中 OPN は有意に高値であった ($p < 0.05$)。

NMO 患者血漿中 OPN は安定期 ($52.72 \pm 23.16 \mu\text{l}$) と比較し、再発期 ($76.86 \pm 30.18 \mu\text{l}$) に有意に高値であった ($p < 0.05$)。

MS では、CD4+CXCR3+/CD4+CCR4+および CD8+CXCR3+/CD8+CCR4+と血漿中 OPN に正の相関が認められたが ($r = 0.46$ 、 $p = 0.03$; $r = 0.54$ 、 $p = 0.009$)、NMO では相関は認められなかった ($r = 0.36$ 、 $p = 0.143$; $r = -0.28$ 、 $p = 0.305$)。MS、NMO ともに EDSS と血漿 OPN に正の相関が認められた (MS: $r = 0.52$ 、 $p = 0.015$ 、NMO: $r = 0.55$ 、 $p = 0.022$)。

考察

1. MS 患者血漿中 OPN : 再発期高値、IFN β 治療後低下したのは、OPN は活性化された CD4+T 細胞に発現し、Th1、Th17 亢進作用を有するが、IFN β 治療

による抑制効果を反映しており²⁾、OPN は MS において治療指標となりえると考えられた。2. NMO 患者血漿中 OPN は安定期と比較し、再発期に有意に高値となり、MS と同様に NMO においても血漿中 OPN は治療効果の指標となりえると考えられた。3. MS 血漿中 OPN と CD4+および CD8+Th1/Th2 関連性サイトカインに正の相関が認められたが、NMO では相関はみとめられなかった、これは NMO 患者では PSL、AZT 治療中のため、薬剤が影響していると考えられた。4. 血漿中 OPN は、SPMS では RRMS に比べ有意に高値を示し、NMO と MS ともに EDSS と有意な相関を示したことから、疾患活動性、障害度のマーカーの有用性が示唆された。

結語

MS、NMO 患者の血漿中 OPN について検討した。

今回の検討では、血漿中 OPN は、健常者と比較し MS、NMO いずれも有意に高値であった。疾患活動性と血漿 OPN の検討では、MS、NMO ともに再発期は寛解期と比べ、有意に高値であり、MS では IFN 治療後有意に低下した。疾患障害度と OPN の検討では MS、NMO ともに EDSS と血漿中 OPN に有意な正の相関が認められ、RRMS よりも SPMS 患者血漿中 OPN のほうが有意差をもって、高値を示した

以上の結果から、血漿中 OPN は MS だけではなく NMO においても炎症、疾患の活動性、障害度のマーカーとして有用である。

健康危険情報 なし

知的財産権の出願・登録状況 なし

参考文献

- 1) Wingerchuk DM, et al. Neurology 2006; 66 : 1485-1489.
- 2) Murugaiyan G, et al. J Immunol 2008; 181: 7480-7488

二次進行型多発性硬化症における CD5 陽性及び陰性 B 細胞 subset の検討

研究分担者 新野正明¹⁾

共同研究者 深澤俊行²⁾, 田代 淳¹⁾, 南 尚哉¹⁾, 藤木直人¹⁾, 土井静樹¹⁾, 菊地誠志¹⁾

1) 北海道医療センター

2) さっぽろ神経内科クリニック

研究要旨

多発性硬化症 (MS) の病態における B 細胞の役割に関しては、未だ不明な点が多い。最近 regulatory B cell という概念が提唱されているが、その定義も完全な一致を見ているわけではない。これまで我々は B 細胞からのサイトカイン産生や memory B 細胞や naïve B 細胞の研究を行ってきたが、最近、膠原病で注目されている CD5 陽性/陰性 B 細胞に注目し、その subset が二次進行型 MS 患者で健常者とどう異なるのかを検討した。その結果、IFN 未使用の二次進行型 MS において、CD5 陽性 B 細胞の割合は、健常者に比べ有意に低下していた。さらに、CD5 陽性 B 細胞においては、CD11a, CCR5, CD25, CD138 が、CD5 陰性 B 細胞では CD11a, CD23, CD38 の発現が健常者との違いが見られた。今後、これらの CD5 陽性及び陰性 B 細胞 subset の機能を検討することにより、B 細胞の MS への関与をより詳細に解明できる可能性がある。

背景・目的

これまで多発性硬化症 (MS) における免疫学的観点からの研究は精力的に行われているものの、B 細胞の MS における役割・影響に関しては、未知のことが多い。我々はこれまで、B 細胞からのサイトカイン産生や、memory/naïve B 細胞の MS における違いなどを中心に、B 細胞の MS における関与を探ってきた。一方、B 細胞における CD5 の意義に関しては、これまで膠原病を中心に研究が進められており、その関与が考えられている。我々は、再発寛解型 MS における CD5 陽性/陰性 B 細胞の検討を行ったが、特に有意な所見は見いだせなかった。しかしながら、これまでの研究でも CD5 陽性 B 細胞の割合は、MS の経過と共に低下してくる（逆に言えば、CD5 陰性細胞の割合が上昇してくる）との報告があり、二

次進行型 MS (SPMS) における CD5 に関する B 細胞の検討も必要と考え、今回、二次進行型 MS 患者において、CD5 陽性及び陰性 B 細胞 subset に違いがあるのかを検討した。

対象・方法

対象は IFN β 等の disease modifying therapy を使用していない SPMS 患者 15 例 (F/M=13/2) (IFN 非投与群)、IFN β を使用している SPMS 患者 11 例 (F/M=8/3) (IFN 投与群)、健常者 19 例 (F/M=15/4) である。尚、患者はいずれの群もステロイドや免疫抑制剤を使用していない。患者及び健常者から得られた末梢血を用いて、CD19-APC, CD5-FITC, CD11a-PE, CD49d-PE, CD-23-APC/Cy7, CD25-APC/Cy7, CD38-PerCP/Cy5.5, CD80-PE, CD86-PE,

CD138-PerCP/Cy5.5 , CCR5-PE , CXCR5-PerCP/Cy5.5 の各種抗体にて、フローサイトメトリーにより解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は北海道医療センター並びにさっぽろ神経内科クリニック倫理審査委員会において承認を受けた。研究については患者本人へ十分に説明を行い、文書で同意を得た。個人の情報は決して表に出ることがないように細心の注意を払い、プライバシーの保護には十分に配慮した。

結果

CD5 陽性 B 細胞の割合は、IFN 非投与群において健常者群よりも有意に低値であった。CD5 陽性及び陰性 B 細胞 subset に関しては、CD5 陽性細胞において、CD11a, CCR5, CD25, CD138 の発現が二次進行型 MS 群で健常者よりも低下しており、一方、CD5 陰性 B 細胞において、二次進行型 MS 群で CD11a の発現が低下していたほか、CD23, CD38 の発現が健常者よりも上昇していた。

考察

MS における B 細胞の CD5 に関する研究としてはいくつか報告されている。髄液中の CD5 陰性 B 細胞の割合が、MS では有意に低く、CD5 陽性 B 細胞の割合は anti-myelin antibody 産生と逆相関があるのではないかという報告がある¹⁾。一方、血中の CD5 陽性 B 細胞に関する研究では、MS の疾患活動性と B 細胞に占める CD5 陽性の割合が相関しており、経過と共に、その割合は減少してくるとの報告がある²⁾。また、その研究では、anti-MBP IgM 及び IgG 抗体と血中の B 細胞に占める CD5 陽性の割合が相関し

ているとも報告している²⁾。一方で、CD5 陽性及び陰性 B 細胞の中でどのような subset が MS に影響しているかに関しては報告がほとんど無く、今回検討された subset を中心に機能の解析が必要である。

結語

CD5 陽性 B 細胞の割合は、IFN 非投与群において健常者群よりも有意に低値であったが、これは二次進行型 MS に移行したため低下したのか、CD5 陽性 B 細胞の割合が低い群が二次進行型 MS に移行しやすいのか、今後の検討が必要である。今回の研究では CD5 陽性及び陰性 B 細胞における subset が SPMS において健常者と違いがあることが示唆されたことから、今後、これらの CD5 陽性及び陰性 B 細胞 subset の機能を検討することにより、B 細胞の MS への関与をより詳細に解明する必要性があると考えられる。

文献

1. Sellebjerg F, et al. Expansion of CD5⁺ B cells in multiple sclerosis correlates with CD80 (B7-1) expression. *Scand J Immunol.* 2002; 56: 101-107.
2. Seidi OA, et al. Expression of CD5 on B lymphocytes correlates with disease activity in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2002; 133: 205-210.

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

中枢神経系炎症性脱髄疾患における CCR6 発現 T 細胞の解析

分担研究者 西澤正豊¹⁾

共同研究者 河内 泉¹⁾, 佐治 越爾¹⁾, 柳川香織¹⁾, 荒川武蔵¹⁾, 横関 明子¹⁾
豊島 靖子²⁾, 柿田 明美²⁾, 高橋 均²⁾

研究要旨

近年, ゲノムワイド関連解析の成果により, 関節リウマチ, バセドー病, クローン病の発症に CCR6 遺伝子多型の関与が明らかになっている. CCR6 は T_H-17, Tc17, innate T (iT) 細胞を含めた interleukin (IL)-17 産生 T 細胞に発現し, CCL20 を認識することで細胞移動を誘導するケモカイン受容体の一つであることから, IL-17 産生 T 細胞が関与する自己免疫疾患では CCR6 が発症の鍵となる可能性がある. そこで IL-17 が重要な役割を果たす可能性が指摘されている中枢神経炎症性脱髄疾患において CCR6 発現 T 細胞動態を解析した. Neuromyelitis optica (NMO) では, 多発性硬化症 (MS) や健常者と比較して, 末梢血 CCR6⁺CD3⁺細胞頻度, CCR6⁺CD3⁺CD4⁺細胞頻度が減少していた. 以上から, NMO では血管器質化と免疫グロブリン・補体沈着, AQP4 発現消失に代表される液性免疫機構の他に, CCR6-CCL20 システムによる免疫学的監視機構の破綻が病態を修飾している可能性が示唆された. 自己免疫病態の形成と維持において NMO と MS は異なるスペクトラムを有する疾患であると考えられた.

研究目的

近年, ゲノムワイド関連解析の成果により, 関節リウマチ (RA), バセドー病, クローン病の発症に CCR6 遺伝子多型の関与が明らかになっている^{1,2}. CCR6 の発現量に影響を与える triallelic dinucleotide 遺伝子多型 (CCR6DNP) 3 種類 (TG, CG, CA) のうち, 最も発現量の高い CCR6DNP (TG/TG) が RA の発症に関与すること, 同多型をもつ RA 症例では血清 interleukin (IL)-17 が高値であることが報告されている. CCR6 は T_H-17, Tc17, innate T (iT) 細胞を含めた interleukin (IL)-17 産生 T 細胞に発現し, CCL20 を認識することで細胞移動を誘導するケモカイン受容体の一つであることから, IL-17 産生 T 細胞が関与する自己免疫疾患では CCR6 が発症の鍵となる可能性がある.

これまで我々は, 中枢神経系炎症性脱髄疾患の代表的疾患 neuromyelitis optica (NMO) の脊髄病変においてリンパ球浸潤形態を解析し, NMO の脊髄炎では髄内とその近傍の髄膜に, IL-17 産生細胞を含めた盛んな炎症細胞浸潤が存在することを明らかにしてきた. そこで我々は CCR6 発現 T 細胞動態とその機能解析

の観点から, MS と NMO の免疫病態学的違いを明らかにすることを目的とした.

研究方法

アクアポリン (AQP4) 抗体陽性 NMO 16 例, AQP4 抗体陰性 MS 22 例, 健常者 (HC) 30 例を対象に, CCR6, CXCR5 をはじめとした各種ケモカイン受容体の発現動態を解析した.

研究結果

NMO では, MS や HC と比較して, 末梢血 CCR6⁺CD3⁺細胞頻度, CCR6⁺CD3⁺CD4⁺細胞頻度が減少していた ($P < 0.05$). しかし CCR6⁺CD3⁺CD4⁺細胞頻度に差はなかった. 特に NMO では CCR6⁺CD3⁺CD4⁺CD161^{high}細胞群が著減していた. 一方, MS は HC と比較して, 同細胞群に有意な差を見出すことができなかった.

次に CXCR5 で代表される follicular helper T 細胞 (T_{FH}) の末梢血動態³を検討した. NMO と MS では, HC と比較して, T_{FH} の末梢血カウンターパートとされる CXCR5⁺T_H-2 (CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺CXCR3⁻CCR6⁻) と CXCR5⁺T_H-17

1) 新潟大学脳研究所神経内科学分野 2) 新潟大学脳研究所病理学分野

(CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁺) 細胞頻度に有意な差を見出すことはできなかった。

考察

NMOはその疾患特異抗体 NMO-IgG・AQP4 抗体^{4,5}の発見により, multiple sclerosis (MS) とは異なる疾患として分離・独立されつつある。その異同はいまだに論議されているが, 免疫病態学的には, 1) NMOで AQP4 抗体・補体を含めた液性免疫機構が病理形成に重要な役割を果たすこと, 2) NMOの髄液では IL-6, IL-1β⁶をはじめとした炎症性サイトカインが高値であること, 3) NMOの髄膜には IL-17 産生細胞を含めた盛んな炎症細胞浸潤をはじめとした「MSとの相違点」が徐々に明らかにされつつある。

我々は NMO の末梢血で T_{FH} 血中カウンターパート CXCR5⁺T_H-2 細胞群や CXCR5⁺T_H-17 細胞群の数的変化は乏しいが, CCR6⁺CD3⁺CD4⁺CD161^{high} 細胞群が著減していることを明らかにした。NMO 髄膜と脊髄実質には IL-17 産生細胞が存在することから, 1) 同細胞群が末梢血プールから標的臓器である大脳・脊髄・視神経に移動することで, IL-17-IL-6 amplifier (IL-17 と IL-6 刺激による IL-6 やケモカイン等の相乗的発現システム) が稼働し⁷, 炎症病理の形成と慢性炎症の増悪に関与している可能性, 2) 同細胞群が免疫調節機能を有するのであれば, 個体内で減少することで, AQP4 抗体産生源である plasmablast 細胞頻度を増加させている可能性が示唆された。今後, NMO, MS における同細胞群の詳細な機能解析が期待される。

CCR6 欠損マウスでは, 脳脈絡叢の上皮細胞に高発現する CCL20 を介した中枢神経内への T 細胞移行が阻害されることより, 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) が誘導され難いことが報告されている⁸。これは CCR6-CCL20 システムが中枢神経系内の免疫学的監視機構に関与している可能性を示唆するものであり, 今回, 我々の見出したヒト中枢神経炎症性脱髄疾患の末梢血における CCR6 陽性細胞群の数的変化は, CCR6-CCL20 システムによる免疫学的監視機構が中枢神経内で破綻している可能性が示唆された。

結論

NMO では血管器質化と免疫グロブリン・補体沈着, AQP4 発現消失に代表される液性免疫機構の他に, CCR6-CCL20 システムによる免疫学的監視機構の破綻が病態を修飾している可能性が示唆された。以上から自己免疫病態の形成と維持において NMO と MS は異なるスペクトラムを有する疾患である可能性が示唆された。

文献

1. Kochi Y et al. Nat Genet. 2010;42:515-519
2. Stahl EA et al. Nat Genet. 2010;42:508-514
3. Morita R et al. Immunity. 2011;34:108-121
4. Lennon VA et al. J Exp Med. 2005;202:473-477
5. Lennon VA et al. Lancet. 2004;364:2106-2112
6. Yanagawa K et al. Neurology. 2009;73:1628-1637
7. Murakami M et al. J Exp Med. 2011;208:103-114
8. Reboldi A et al. Nat Immunol. 2009;10:514-523

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

新しい抗アクアポリン 4 抗体測定系の確立に関する検討

研究分担者 松尾秀徳

共同研究者 樋口 理、中根俊成、白石裕一、福田 卓*、栢田智子*、本村政勝*

研究要旨

生物発光を原理とするカイアシルシフェラーゼ免疫沈降 (Gaussia Luciferase Immuno-precipitation: GLIP) 法を利用し、簡便で、高感度、且つ定量性を有した新しい抗 AQP4 抗体検出系を開発し、測定を行った。視神経脊髄炎 (NMO) の 25 検体中で抗体陽性と判定されたのは 23 検体であり、sensitivity は 92%であった。GLIP 法が AQP4 のような膜を複数回貫通しているチャンネル型分子に対する抗体の探索にも有効であることを示した

研究目的

視神経脊髄炎 (NMO) との強い関連が指摘されている抗アクアポリン 4 (AQP4) 抗体の検出は、NMO の診断のみならず、その治療戦略の策定を行う上でも重要な意味を持つ。しかし、臨床的に NMO が強く疑われても抗 AQP4 抗体が陰性的のために診断・治療における判断が困難な症例が少なからず存在する。これらの症例に関しては従来法の抗 AQP4 抗体測定感度の限界が一因である可能性も推測され、従来法と異なる抗体検出原理を有する新しい抗 AQP4 抗体測定系の開発が求められている。NMO の診断のみならず、NMO 治療法の選択や治療効果の判定を行う上で、患者血中の抗体量の変化を把握することは一定の意義がある。本研究では、我々が独自に開発した生物発光を原理とするカイアシルシフェラーゼ免疫沈降 (Gaussia Luciferase Immuno-

precipitation: GLIP) 法を利用し、簡便で、高感度、且つ定量性を有した新しい抗 AQP4 抗体検出系の確立を目指す。

対象・方法

過去に長崎大学第一内科およびその関連施設で診断された NMO 25 例、MS 43 例、脊髄炎 30 例、脳炎・ADEM 39 例、MG 30 例を対象とした。また、健常人 60 例の血清を用いてカットオフ値を設定した。

抗 AQP4 抗体の測定方法は以下の通りである。

- ① ヒト AQP4 (全長) の C 末端に GL が融合したリポーター分子 (AQP4-GL) をヒト培養細胞 293F に強制発現させた。
- ② AQP4-GL を可溶性画分として調製した。
- ③ 可溶性画分とヒト血清を一定時間反応させた後、プロテイン G セファロースによる免疫沈降を実施し、免疫沈降物中 GL 活性をルミノメータにより測定した。測定値としては relative luminescence units (RLU) を用いた。

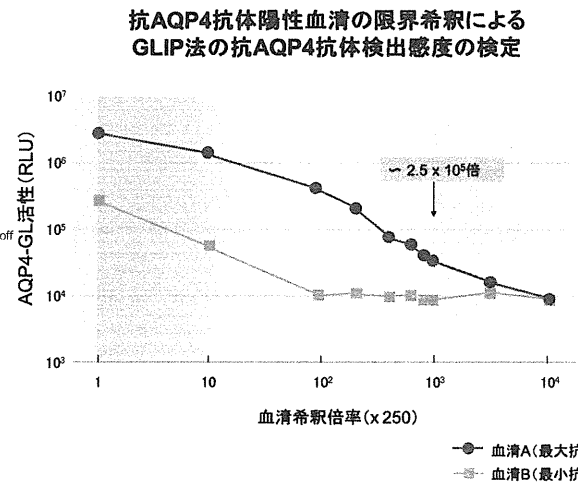
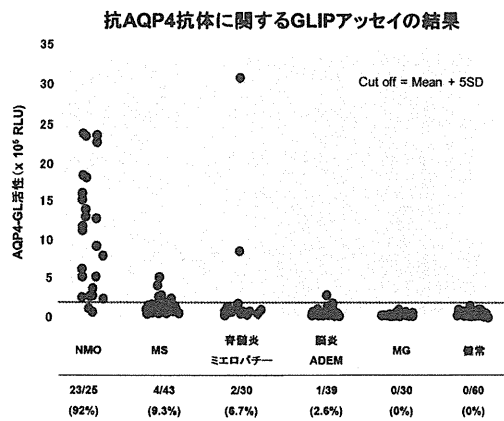
研究結果

NMO の 25 検体中で抗体陽性と判定されたの

国立病院機構長崎川棚医療センター神経内科
臨床研究部 *長崎大学第一内科

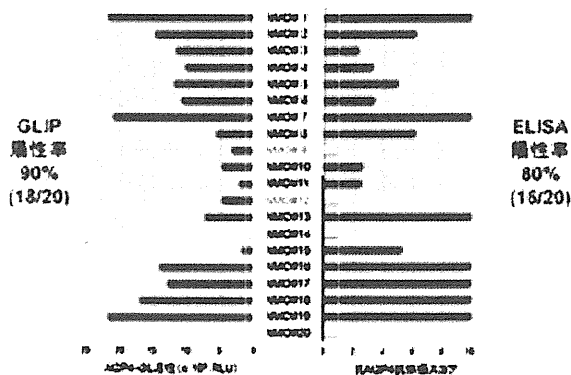
は 23 検体であり、sensitivity は 92%であった。また、MS の 43 検体中では 4 検体が陽性、脊髄炎の 30 検体では 2 検体が陽性、そして、脳炎の 39 検体では 1 検体が陽性という結果となった。一方、抗 AChR 抗体陽性の MG と診断された 30 検体については抗 AQP4 抗体は陰性であった。

も抗 AQP4 抗体量が低いと推測された(血清 B)を用いて、それぞれの血清を限界希釈し、GLIP 法を実施した。その結果、血清 A (赤線) の場合、少なくとも 25 万倍希釈された状態でも抗 AQP4 抗体が検出された。また、血清 B (青線) の場合、少なくとも 2500 倍希釈された状態でも抗 AQP4 抗体が検出された。



1) ELISA 法 (RSR 社) で既に抗 AQP4 抗体の測定が実施された 13 名の NMO 症例の血清 20 検体を対象に GLIP 法で抗体測定を実施した: ELISA 法で抗体陽性と判定された血清に関しては、GLIP 法においても 100%陽性という結果であった。一方、ELISA 法で陰性と判定された 2 症例については、GLIP 法では陽性という結果になった。

GLIP法及びELISA法による抗AQP4抗体検出感度の比較



2) 今回の検査において、最も抗 AQP4 抗体量が多いと推測された検体 (血清 A) と最

考察・結論

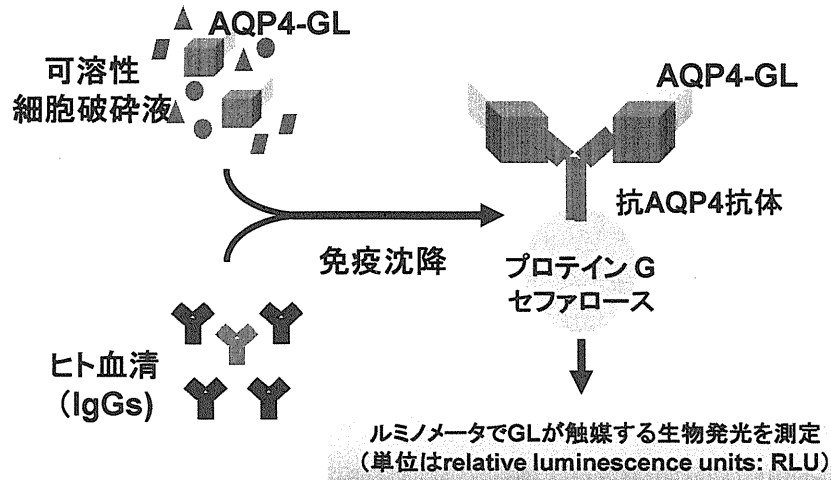
ELISA 法は定量性と測定操作の簡便性という点において、非常に優れた測定系であるが、抗体検出に関する感度という点においては、従来法である間接免疫蛍光染色法 (IF 法) の方が優れている。今回の実験結果は、GLIP 法が従来法である ELISA 法と IF 法のそれぞれの長所を兼ね備えた抗体測定法である可能性を示唆した。今後、より多くの検体を測定することで、これらの方法と感度・特異度を比較検討する必要がある。さらに、抗 AQP4 抗体測定系を確立するとともに、多検体処理に対応可能なシステムの構築を進める。

健康危険情報 なし

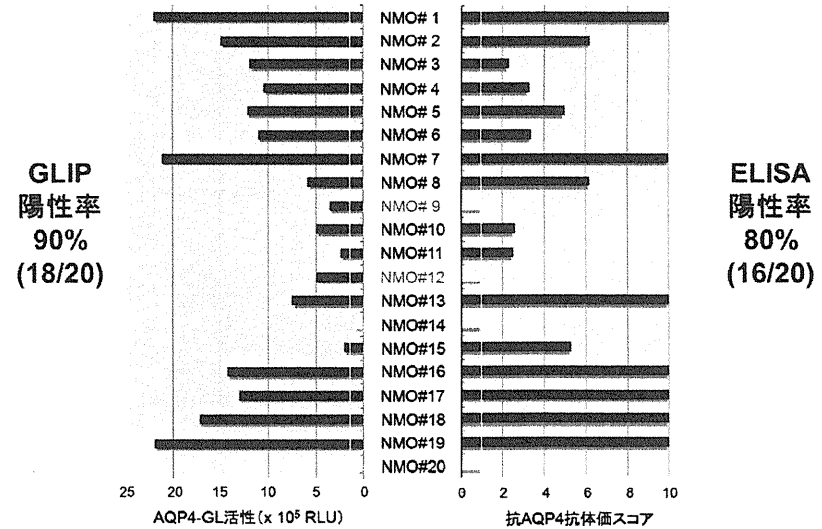
知的財産権の出願・登録状況 なし

新しい抗アクアポリン4抗体測定系確立に関する検討

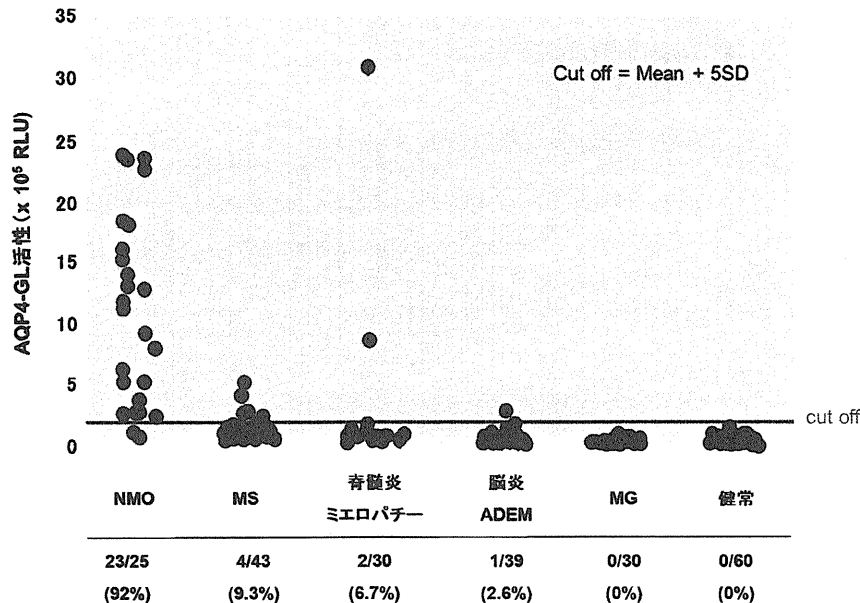
カイヤシルシフェラーゼ免疫沈降法 (Gaussia Luciferase Immunoprecipitation : GLIP)



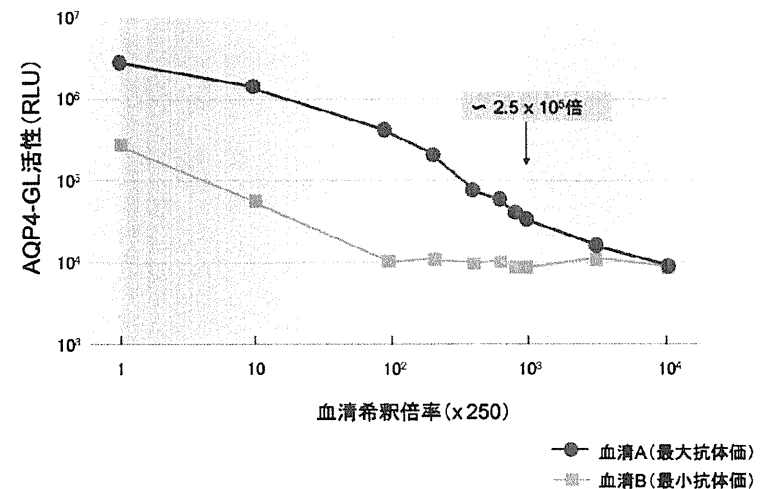
GLIP法及びELISA法による抗AQP4抗体検査結果の比較



抗AQP4抗体に関するGLIPアッセイの結果



抗AQP4抗体陽性血清の限界希釈による GLIP法の抗AQP4抗体検出感度の検定



Peptide array 法による AQP4 上の immunogenic site 同定の試み

分担研究者 桑原 聡

共同研究者 森 雅裕、鵜沢 顕之、増田 冴子、武藤 真弓

研究要旨

視神経脊髄炎 (NMO) 患者血清中の抗 aquaporin-4 (AQP4) 抗体が NMO の病態において極めて重要な役割を果たすことが明らかになっている。ただし、その病態機序の詳細な部分については解明されていない点が多々存在する。その一つに抗 AQP4 抗体の認識部位の問題がある。この問題にいくつかの先行の研究があるが、一定の見解が得られていない。今回、我々は hAQP4 の全領域をカバーするように、重複を持たせつつ 156 個の peptide を独自の peptide 作成機で作成、同一メンブレン上に固定し、それらに対する血清の反応を、抗 AQP4 抗体陽性の NMO ないし NMOsd22 名、抗 AQP4 抗体陰性の多発性硬化症 (MS) 2 名、正常対照 (NC) 6 名の血清を用いて検討した。NC の平均 + 2SD をカットオフとすると抗体陽性者が NMO 群 (NMO+NMOsd) で最も多く認められる peptide では 10 人 (45%) で陽性であった。この peptide を含め、多くの陽性者が認められる peptide は AQP4 の loop A の部分に偏在した。また、連続した部位の peptide で陽性となる患者が多く見られるのも loop A の部分であった。今回、AQP4 の立体構造に関する検討はしておらず、その関与も否定できないが、peptide からの検討では AQP4 の loop A が NMO/NMOsd 患者血清中抗 AQP4 抗体の main immunogenic site となっている可能性が示唆された。

背景・研究目的

視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica : NMO) の患者血清中に NMO-IgG が認められること、その NMO-IgG が water channel の aquaporin-4 (AQP4) を認識すること、また実際に患者血清中に抗 AQP4 抗体が認められることが報告されて以来、精力的に臨床・病理・免疫学と様々な側面から研究が行われ、本疾患の病態に関する知見が深まりつつある。ここまでの研究から、患者血清中抗 aquaporin-4 (AQP4) 抗体が疾患マーカーとなるのみならず、アストロサイトの足突起にある AQP4 を認識することが契機となって、補体介在性のアストロサイト傷害をきたすことが本疾患の中心的病態であると考えられている。

AQP4 は water channel protein であり 6 回膜貫通型蛋白で三つの細胞外ドメインを有する。また、その isoform b (M23 相当) は細胞膜上で square array を形成することが知られている。患者血清中の抗 AQP4 抗体が AQP4 のどの部位を認識するかについては既にいくつかの報告があり、細胞外ドメインとするものが多いものの、

細胞内ドメインを target とする報告や、上記の square array を認識するとする、など種々の報告があり、どこかに main immunogenic site があるのか、患者ごとに違うのかなど、その詳細は明らかになっていない。

本研究では NMO の患者血清中抗 AQP4 抗体が、AQP4 におけるどの部位を主に認識しているのかを peptide array 法を用い同定すること、およびその部位に対する抗体陽性 NMO に何らかの臨床的特徴があるかを明らかにすることを目的とした。

研究方法

Peptide array 法はメンブレン上にペプチドを固定し、それに対する反応を見るものであるが、今回我々は研究協力者である国松らが世界で初めて作成した automatic に peptide を合成しつつ同一メンブレンに固着させるメンブレン作成機を用い、AQP4 全長を重複を持たせつつ peptide に細分化し、それぞれへの抗 AQP4 抗体の反応を網羅的に解析した。

323mer human AQP4 isoform a (M1 相当) の N 末端より 14mer のアミノ酸配列を peptide

千葉大学医学研究院神経内科学 (神経内科)

を合成し、メンブレンに固着させ、以後 2mer ずつずらして 14mer のアミノ酸からなる 156 個の peptide を合成してはメンブレンに順に固着させた。

このメンブレンと血清中に全長 AQP4 蛋白に対する抗体が存在していることが ELISA 法により確認されている NMO ないし NMO spectrum disorder (NMOsd) 患者 22 名と、同抗体が陰性である多発性硬化症 (MS) 2 名と正常対照 (NC) 6 名から得られた血清を反応させ、さらに蛍光標識した IgG と反応させて、その蛍光強度を画像化し、画像からその濃度を読み取ることで、抗体価を半定量した。NC の mean+2SD をカットオフとして、NMO 群 (NMO+NMOsd) で陽性者が多い peptide に関し、AQP4 における位置を確認し、さらに抗 peptide 抗体陽性 NMO 群患者の臨床的特徴を解析した。また、NMO 群で陽性者の多い peptide に関し NMO 群と non-NMO 群 (MS+NC) で抗体価を比較した。

倫理面への配慮

本研究に際しては、千葉大学大学院医学研究院および医学部附属病院の倫理規定を遵守して行った。血清検体の利用に関しては患者からはインフォームド・コンセントを得た。

個人の情報は決して表に出ることがないように、またプライバシーの保護についても、十分に配慮した。

研究結果

1) NMO 群 22 人中の複数名で抗 peptide 抗体が陽性であった peptide は、2 人 (9%) で陽性であった peptide が 17 個、3 人 (14%) で陽性が 8 個、4 人 (18%) で陽性が 3 個、5 人 (23%) で陽性が 1 個、8 人 (36%) で陽性が 1 個、10 人 (45%) で陽性が 1 個であった。このうち、4 人以上で陽性を示した peptide 6 個につき、NMO 群と non-NMO 群の二群で抗 peptide 抗体を比較したところ、うち 1 個の peptide は二群間で $P=0.09$ と NMO 群で高い傾向を認めた。

2) さらにこのうち、連続した peptide で 4 人以上で陽性になる箇所は 1 箇所のみで、そこは 3 個の peptide が連続して 5 人 (23%)、8 人 (36%)、10 人 (45%) で陽性であり、割合としても他に

比し多い領域であった。また、1) で NMO 群で抗体価が高い傾向を示した peptide もこのうちの一つであり、かつここは細胞外ドメインである Loop A を含む領域であった。

3) LoopA を含む複数の peptide に対する抗体陽性 NMO 群患者と陰性 NMO 群患者に関し、臨床的情報を比較したが、明確な差異を認めなかった。

考察

これまでに、患者血清中抗 AQP4 抗体は通常の western blotting 法で AQP4 を認識できなくなることから、立体構造を認識する抗体と考えられている。確かに今回の peptide への反応では最も多く抗体陽性となった peptide でも約半数の NMO/NMOsd 血清と反応するのみであり、立体構造を加味すると違う結果になる可能性を否定できない。また、同抗体が M23 (isoform b) により形成される square array を認識するという報告¹⁾や、mutant への反応から Loop E が main target とする報告、さらには細胞内ドメインを認識するとする報告もある。ただし、今までに今回のような症例数での抗原認識部位の検討はされておらず、Loop A が immunogenic site となっている可能性もあり得ると考えた。

結論

Peptide array を用いた検討により抗 AQP 抗体陽性 NMO/NMOsd 患者血清の約半数は、AQP4 の LoopA を含む peptide に反応することが示され、同部位が抗 AQP4 抗体の main immunogenic site である可能性が示唆された。

文献

1. Nicchia GP, Mastrototaro M, Rossi A, et al. Aquaporin-4 orthogonal arrays of particles are the target for neuromyelitis optica autoantibodies. *Glia* 2009; 57: 1363-1373.

健康危険情報

なし

知的所有権の出願・登録状況

特許取得・実用新案登録：なし

視神経脊髄炎 (NMO) における plasmablasts の役割

研究分担者 山村隆¹

共同研究者 千原 典夫^{1,3}、松岡 貴子¹、佐藤 和貴郎¹、林幼緯²、岡本 智子²、小川 雅文²、戸田 達史³、三宅 幸子¹、大木 伸司¹、荒浪 利昌¹

研究要旨

視神経脊髄炎(NMO)は主に視神経炎と脊髄炎を繰り返す中枢神経系の炎症性疾患である。近年 NMO では疾患特異的な抗アクアポリン 4 抗体 (抗 AQP4 抗体) が発見され、多発性硬化症(MS)との鑑別が容易になった。臨床、病理、あるいは動物モデルによる解析を通じて、抗 AQP4 抗体はその疾患マーカーであるのみならず、NMO の本体であるアストロサイト障害を惹起し病態とも関連が深いことが示唆されている。一方でこの抗 AQP4 抗体産生メカニズムは不明であった。最近我々は NMO に特有の B 細胞異常として plasmablasts の増加を発見した。Plasmablasts は末梢血における抗 AQP4 抗体の主な産生源であり、再発時に増加していた。今回、我々は Plasmablasts が抗 AQP4 抗体陰性 NMO 患者においても増加しており、再発時には NMO 髄液にも増加していることを見いだした。Plasmablasts は抗 AQP4 抗体陽性・陰性に関わらず NMO と MS を区別するバイオマーカーとなり得る。Plasmablasts は再発時に末梢で抗 AQP4 抗体を産生するのみならず、炎症組織へ浸潤し病態に関与している可能性がある。

¹ 国立精神・神経医療研究センター (NCNP) 神経研究所 免疫研究部

² NCNP 病院 神経内科

³ 神戸大学 神経内科

【背景と目的】 NMO は主に視神経炎と脊髄炎を繰り返す中枢神経系の炎症性神経疾患である。NMO と多発性硬化症 (MS) は治療薬に対する反応性が異なり、両者を鑑別することは臨床の要点である。近年 NMO ではアストロサイトに高発現する水チャネルであるアクアポリン 4 (AQP4) に対する自己抗体が疾患特異的に上昇することが明らかになった。さらに臨床、病理、あるいは動物モデルの解析から、抗 AQP4 抗体はそれ自体がアストロサイト障害を惹起し病態に関与することが示唆されており、抗 AQP4 抗体はアストロサイト障害を引き起こし再発のきっかけになることから、抗 AQP4 抗体産生細胞を標的と

した治療法は病態に即していると考えられる。最近我々は MS 患者や健常人と比較して抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者末梢血に増加した未熟形質細胞(plasmablast: PB)が末梢血における主な抗 AQP4 抗体産生細胞であることを発見し報告した¹⁾。PB は分化段階の進んだ活性化 B 細胞で、この細胞の生存や抗 AQP4 抗体産生能は主にインターロイキン 6(IL-6) シグナルに依存していたことから、抗 IL-6 受容体抗体が抗 AQP4 抗体産生細胞を標的とした治療法になり得ると提唱している。

今回、我々は MS と異なる NMO 特有の B 細胞異常として PB に注目し、抗 AQP4 抗体陰性 NMO における PB 数を解析した。また、

末梢血で増加している PB がどこで病原性を発揮するのかについて末梢血と髄液内での比較解析を行った。

【対象と方法】本研究では年齢・性別をマッチさせた健常人 20 例、抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者（以下、抗体陽性患者）41 例（NMO spectrum disorder を含む）、抗 AQP4 抗体陰性で Wingerchuk 2006 診断基準²⁾を満たす NMO 患者 4 例、McDonald 診断基準³⁾を満たし RRMS の臨床病型をとる通常型 MS 患者（以下、MS 患者）17 例を対象とした。各々の末梢血単核球を分離し B 細胞亜分画の頻度やケモカインなどの表面分子発現をフローサイトメトリー（FACS）で解析した。

（倫理面への配慮）

本研究においては、NCNP の倫理委員会の承認を得た上で、全ての患者から書面によるインフォームドコンセントを得た上で採血を行った。また、患者から得られた情報は当研究部でのみ使用し、厳重に保管されている。

【結果】

PB が抗 AQP4 抗体陽性および陰性 NMO 患者の末梢血で増加

NMO における末梢血 B 細胞の特徴を解析するため、B 細胞を各種表面抗原（CD19、CD27、CD38、CD180）を用いて単離した。抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者のみならず、抗 AQP4 抗体陰性 NMO 患者においても全 B 細胞に占める PB（CD19^{int}CD27^{high}CD38^{high}CD180⁻細胞）の細胞割合が健常人や MS 患者と比して有意に多く（ $P < 0.05$ ）他の B 細胞亜分画であるナイーブ B 細胞（CD19+CD27-細胞）やメモ

リ B 細胞（CD19+CD27+CD38^{low-mid}CD180+細胞）の割合には各群間で差がなく、PB の割合は抗 AQP4 抗体陽性および陰性 NMO で差がなかったことから、少なくとも B 細胞において、抗 AQP4 抗体陰性 NMO は抗 AQP4 抗体陽性 NMO と同様の免疫背景を有していることが明らかとなった。

PB は NMO 再発時に髄液中に認められた
髄液細胞数は中枢神経炎症を反映し臨床に用いられる。髄液中の PB は NMO 再発時に MS と比して増加していた。髄液中にはメモリー B 細胞も認められたが、MS と比して差は認められなかった。寛解期と再発期で NMO 患者末梢血の PB を解析すると、再発時には PB の中でも CD138⁺HLA-DR^{high}PB の割合が増加しており、髄液中の PB はほぼ CD138⁺HLA-DR^{high} の亜分画であった。PB 上の CD138 と HLA-DR の発現は寛解期より再発期で増加しており PB の活性化マーカーと考えられる。この活性化した PB は髄液への浸潤能を持っていることが示唆された。

NMO 再発時に PB は CXCR3 を高発現する
PB は骨髄形質細胞と異なり組織への移動能力を有している。B 細胞の組織移行性を決めるケモカイン受容体として炎症組織への移行を司る CXCR3、骨髄への移行を司る CXCR4、リンパ節への移行を司る CXCR5 が知られている。寛解期 NMO 患者末梢血 B 細胞におけるこれらケモカインの発現はメモリー B 細胞やナイーブ B 細胞と比して PB では CXCR3 の発現が高く、CXCR4、CXCR5 の発現が低かった。再発時 NMO 患者末梢血 PB における CXCR3 の発現は寛解期と比して増加しており、一方で CXCR4 の発現には差がなかった。CD138⁺HLA-DR^{high}PB では CXCR3 発現は更に増加していた。このことから末梢組織

で活性化した PB は CXCR3 を高発現し髄液へ浸潤している可能性が示唆された。

【結論】 PB の増加は抗 AQP4 抗体陽性・陰性に関わらず NMO の病態を反映したバイオマーカーになり、特にインターフェロンβ治療などの免疫調整薬の適応を決める上で意義深いと考えられる。さらに PB は末梢血での増加や抗 AQP4 抗体産生能のみでなく、炎症組織移行性を持っていることが示唆され、NMO 病態に多方面で関与している可能性が高い。今後、PB の炎症組織での役割やその分化背景にある免疫病態についての解析を行うことで NMO 病態全体の理解が進むと考えられる。

【謝辞】本研究の対象患者の抗 AQP4 抗体陽性診断を行っていただいた、東北大学 藤原一男先生、高橋 幸利先生、および血液検体の提供にご協力頂いた順天堂大学 横山和正先生、横浜市立大学 岸田一帯先生、富田敦子先生、国立精神医療研究センター 神経内科 村田 美穂先生、スタッフの先生方に感謝いたします。

【研究発表】

総説

1) 千原 典夫、山村 隆 (2011) 「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-」、『臨床検査』、医学書院、55 巻 11 号、1241-1248

主な学会発表

1) Chihara N, Aranami T, Sato W et al. Interleukin 6 Signaling Enhances Anti-aquaporin 4 Autoantibody Production

from Plasmablasts in Neuromyelitis Optica.

Washington: Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS) 11th annual meeting, 2011, Concurrent Thematic Symposium :Pathogenic Role of Antibodies

2) 千原 典夫、佐藤 和貴郎、荒浪 利昌ら「視神経脊髄炎 (NMO) における未熟形質細胞の関与」名古屋: 第 52 回日本神経学会総会 2011, O5-306

3) 千原 典夫、佐藤 和貴郎、荒浪 利昌ら「視神経脊髄炎 (NMO) における plasmablasts の関与」東京: 第 23 回日本神経免疫学会学術集会 2011, W13-4

【文献】

1) Chihara N, Aranami T, Sato W et al. (2011) Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. Proc Natl Acad Sci U S A 108 (9): 3701-3706

2) Wingerchuk DM et al. (2006) Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. Neurology 66: 1485-1489

3) Polman CH et al. (2005) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". Ann Neurol 58: 840-846

健康危険情報 なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得 なし

実用新案登録 なし

AQP4 を介したアストロサイト障害機序の解析

班員 武藤多津郎¹⁾

共同研究者 朝倉邦彦¹⁾, 植田晃広¹⁾, 木澤真努香¹⁾, 河村直樹¹⁾, 伊藤信二¹⁾

研究要旨

aquaporin4 (AQP4) の 2 つの isoform、M1 と M23 に異なる蛍光色素の標識を付け、M1 と M23 を同時に恒常的に発現する細胞を作製し、蛍光顕微鏡および Western blotting で、M1 と M23 の同時発現を確認した。この細胞に NMO 患者血清を加えると一部の細胞の形態変化が観察されたが、M1 または M23 の単独発現系では形態変化は観察されなかった。Native gel 電気泳動および Western blotting で M1 と M23 の同時発現細胞を解析すると、その分子量から 4 量体を形成していることが確認された。ショ糖密度勾配超遠心法によるこれまでの解析では、M1 単独発現細胞では M1 は不溶性画分に存在し、M23 は不溶性画分に存在しないことが明らかとなっていたが、M1 と M23 を同時に発現させると M23 の一部が不溶性画分に移行していることが確認された。これはアストロサイトにおいて足突起の M1 と M23 の 4 量体がラフト(カベオラ)に発現していることを示唆し、抗体の存在下でこの存在様式の変化が病態発現と関連している可能性が示唆された。

研究目的

視神経脊髄炎(NMO)患者血清中に中枢神経系抗原と反応する抗体が存在することが報告され、水チャンネルとして脳内、とくにアストロサイト足突起に広く分布する aquaporin4(AQP4)がその抗原であることが示された。

AQP4 は 323 個のアミノ酸からなる M1 と N 末端が 22 個短い 301 個のアミノ酸からなる M23 の 2 種類の AQP4 分子が存在し、生体内では AQP4 は M1 2 分子と M23 2 分子が heterotetramer の状態で存在する。AQP4 発現系では、M1 または M23 の単独発現系であることがほとんどで、M1 と M23 を同時に発現するのは、M1 と M23 を含むプラスミドを同時にトランスフェクションした場合のみである。この場合、M1 と M23 が同じ比率で発現

することはほとんどなく、細胞毎にその発現比率はばらばらである。そこで、M1 と M23 を同時に一定の比率で発現させ、より生理的状态に近い実験系を作製し、AQP4 を介したアストロサイト障害に関する解析を行った。

研究方法

ヒト M1 と M23 の 2 種類の cDNA の 5' 末端に Kozak 配列を挿入した後、蛍光色素 (AcGFP または RFP) を 3' 末端に組み込んだ発現ベクターに挿入した。これらの発現ベクターから AQP4 と蛍光色素をコードする 2 つの遺伝子を PCR 法で増幅し、Gateway system (Invitrogen) を用いて、M1 と M23 の 2 つの遺伝子をそれぞれ別々のプロモーターを上流につけて 1 つの発現ベクターに挿入した。このベクターをリポフェクション法により、AQP4 を発現しない BHK-21 細胞株にトランスフ

¹⁾ 藤田保健衛生大学脳神経内科学講座

エクシジョンし、M1 分子とM23 分子を同時に発現させた細胞を作製した。

作製した細胞を蛍光顕微鏡で観察し、この細胞より蛋白を抽出して、発現している AQP4 分子を抗 AQP4 抗体による Western blotting で確認するとともに、Native gel electrophoresis により AQP4 分子の発現様式を解析した。また、シヨ糖密度勾配超遠心法により得られた画分を Western blotting で解析した。さらに、この細胞に非働化した NMO 患者血清を2%濃度で添加し、細胞の形態変化を観察し、細胞死の有無をトリパンブルー染色により検討した。

研究結果

M1 の C 末端に RFP、M23 の C 末端に AcGFP をつけた発現ベクターを作製し、BHK-21 細胞で stable transformant が得られた。この細胞は蛍光顕微鏡下では、赤い蛍光の M1 と緑色の蛍光の M23 が同時に発現していることが確認され、Western blotting でもその発現が確認された。

この細胞株に、非働化した NMO 患者血清を2%濃度で反応させたところ、一部の細胞は培養1-2 時間で接着性を失い浮遊した。形態変化した細胞をトリパンブルーで染色したが、細胞死は認められなかった。M1/RFP または M23/AcGFP を単独発現した細胞にも非働化した NMO 患者血清を2%濃度で加えたが、形態変化は認められなかった。

Native gel electrophoresis と抗 AQP4 抗体による Western blotting での M1 と M23 の同時発現細胞での解析では、AQP4 分子は 240kDa 以上の位置に認められ、シヨ糖密度勾配超遠心法による抗 AQP4 抗体と抗 GFP 抗体を用いた解析では、

M23 は可溶性画分と不溶性画分の両方の画分に存在した。

考察

これまで M1 または M23 の単独発現系での解析で、M1 分子は不溶性(ラフト)画分に存在し、M23 は不溶性画分には存在しないことを示してきた。今回の結果では、M1 と M23 を同時に発現させると4量体を形成し、M23 もラフト画分に移行し、4量体はラフト(カベオラ)に存在することが示唆された。

AQP4 の4量体は、興奮性アミノ酸のトランスポーターと複合体を形成しているとされ、M1 発現系では抗 AQP4 抗体により速やかに細胞内に取り込まれることが知られている。したがって、今回の結果から、抗 AQP4 抗体によりカベオラ内の AQP4 が endocytosis により急速に取り込まれてアストロサイトの障害をきたす可能性が示唆された。

結論

蛍光色素との融合蛋白として1つの細胞に M1 と M23 分子を同時に発現する細胞を作製した。この細胞では、AQP4 は4量体を形成し、NMO 患者血清添加により形態変化をきたしたが、M1 または M23 を単独で発現させた細胞では形態変化は認められなかった。このことから、NMO 患者では、血液脳関門を通過した抗体が、AQP4 4量体に結合し、直接的にアストロサイト足突起を障害している可能性が示唆された。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得:なし

実用新案登録:なし

抗 AQP4 抗体陽性患者血清によるアストロサイト細胞死とその機序について

研究分担者 神田 隆¹⁾
共同研究者 春木明代¹⁾, 佐野泰照¹⁾, 清水文崇¹⁾, 尾本雅俊¹⁾, 安部真彰¹⁾,
前田敏彦¹⁾, 齋藤和幸^{1),2)}, 中田 力³⁾

研究要旨

Neuromyelitis optica (NMO) は、抗 AQP4 抗体が補体介在性にアストロサイト (AST) を傷害することが病態の本質とされているが、その詳細な機序は未だ不明である。今回我々は、抗 AQP4 抗体の AST に対する効果を検証する目的で、AQP4 を強発現したヒト AST 不死化細胞株への NMO 患者血清と補体による AST の形態学的変化、AQP4 蛋白量の変化と、NMO 患者血清による AST のサイトカインの発現量の変化を生化学的に検討した。

NMO 患者血清により AST の突起は狭小化し、AQP4 は AST の細胞質内に顆粒状に集積し、AST 細胞傷害を生じた。さらに補体を添加すると AST 傷害は増強した。NMO 患者血清により AST の AQP4 は mRNA、蛋白レベルでの発現量は低下し、AST の TNF α 、IL-6 が増加した。NMO では NMO 血清自体が AST に対する傷害性を有し、補体介在性の AQP4 抗体の作用により、より一層の傷害へと進展する可能性が考えられた。

研究目的

Neuromyelitis optica (NMO) の病変部では、aquaporin-4 (AQP4) や glial fibrillary acidic protein (GFAP) の発現が低下し、血管周囲に抗体や補体の沈着を認めることから、抗 AQP4 抗体が補体介在性にアストロサイト (AST) を傷害することが病態の本質であると提唱されている¹⁾。一方、NMO 病変部で AQP4 が消失していたにもかかわらず GFAP の発現が保たれている部位がある²⁾ことから、NMO 病変部での AQP4 の脱落自体が、実際にアストロサイト死により生じているのか、アストロサイトの機能障害により生じているのかどうかは未だ解明されていない。このため、抗 AQP4 抗体を用いた *in vitro* での AST 傷害機序の解明は NMO の病態を理解する有力

な手段の一つとなり得るが、ヒト培養 AST にはウエスタンブロット法で解析可能な程度の十分量の AQP4 が発現していないなどの問題点がある。抗 AQP4 抗体の AST に対する効果を検証することを目的とし、我々が樹立した AQP4 を強発現したヒト AST 不死化細胞株 (hAST-AQP4 株) を用いて NMO 血清の AST への影響について生化学的、形態学的に分析した。

研究方法

初代培養ヒト AST に温度感受性ラージ T 抗原とヒト AQP4 (M-23) を導入して AQP4 を強発現したヒト AST 不死化株 (hAST-AQP4 株) を作成した。hAST-AQP4 株に抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者血清を添加し、hAST-AQP4 の形態学的変化および吸光度が細胞数と相関する XTT を用いて細胞傷害の程度を定

-
- 1) 山口大学大学院医学系研究科神経内科学
 - 2) 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学
 - 3) 新潟大学脳研究所 脳機能解析学分野

量的に解析した。AQP4 発現量の変化をウエスタンブロット法で解析し、局在変化は免疫細胞化学的手法を用いて検討した。mRNA レベルでの AQP4 変化を解析する目的で、AQP4 を強発現させていないアストロサイト株である hAST に NMO 血清を作用させ、*AQP4 mRNA* 量を検討した。NMO 患者血清を添加した hAST-AQP4 株におけるサイトカインの発現量の変化を real time PCR 法を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は山口大学医学部の倫理委員会において承認を受け、患者本人への十分な説明を行い、文書での同意を得ている。個人情報の保護に留意し、プライバシー保護には十分に配慮した。

研究結果

NMO 患者血清を hAST 株に作用させると、*AQP4 mRNA* は低下した。NMO 患者血清を hAST-AQP4 株に作用させると AQP4 の発現量は蛋白レベルで低下した。

hAST-AQP4 株に NMO 患者血清を作用させると、XTT による定量的解析において生細胞は減少し AST 傷害と一部で死滅する細胞もみられたが、補体を添加することでさらに生細胞の減少がみられた。hAST-AQP4 株に NMO 患者血清を添加すると AST は膨化せずに突起が狭小化し、AQP4 は細胞質内に顆粒状に集積した。補体を添加すると AST は膨化、円形化し、死滅した。

NMO 患者血清を hAST-AQP4 株に作用させると、AST の *TNF α* 、*IL-6 mRNA* は増加し、抗 AQP4 抗体の補体介在性 AST 傷害以外に AST 自体が分泌する炎症性サイトカインが AST 傷害をきたす機序の一つである可能性が考えられた。

考察

NMO は抗 AQP4 抗体の補体介在性 AST 傷害が一次的機序であると提唱されているが、補体を含まない抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者血清で細胞傷害をきたした報告例はない。また、NMO 血清がヒト AST 株の AQP4 蛋白量をどう変化させるのかをウエスタンブロット法を用いて解析した報告はなされていない。

本研究では、NMO 血清が AST の AQP4 の発現量を mRNA および蛋白レベルの双方で低下させることが明らかとなった。また、NMO 血清のみでも AST 傷害は生じ、補体の添加でより一層のダメージが加わった。

NMO の髄液中では IL-6 が上昇しており³⁾、Ex vivo での NMO 脊髄モデルに IL-6、TNF α を添加すると病巣が増悪した⁴⁾と報告されている。補体を含まない NMO 患者血清により AST が IL-6、TNF α を autocrine に分泌し、AST 自身を傷害する可能性も示唆された。すなわち、NMO 血清により AST の AQP4 蛋白量の減少や炎症性サイトカインの産生などを通じ、AST 傷害が発生し、補体介在性の機序が加わることにより、より一層の AST 傷害が生じる機序が考えられた。

結論

抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者血清はヒト AST 株の AQP4 の発現を低下させた。NMO 血清のみでも AST は傷害を受け、補体によりさらなる傷害へと発展することが示唆された。

文献

- 1) Misu T, Fujihara K, Kakita A et al (2007) Loss of aquaporin 4 in lesion of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain* 130: 1224-1234.
- 2) Roemer, S. F. , Parisi, J. E. , Lennon, V. A. et al (2007) Pattern-specific loss of aquaporin-4