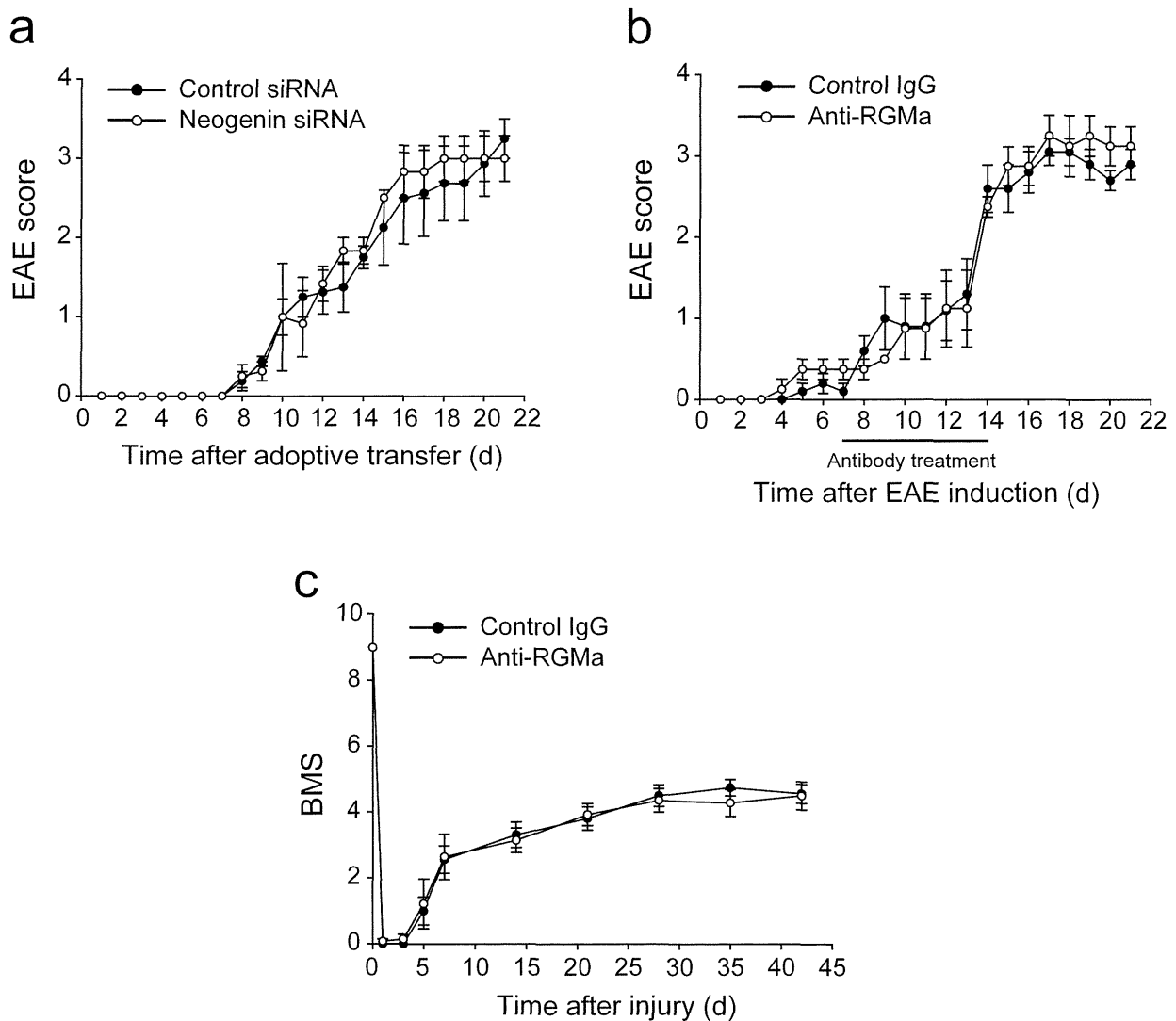


Supplementary Figure 3. Determination of RGMa and neogenin expressions. (a) Binding of human RGMa-Fc (indicated concentrations) to CD11b⁺ cells in the spleen. (b) Relative expression of *Neo1* mRNA by RT-PCR analysis in CD4⁺ T cells and CD11b⁺ cells from the mouse spleen. The values represent the mean \pm SEM of three independent experiments. (c) Immunostaining for RGMa in B220⁺ cells or F4/80-positive macrophages from the spleen of MOG-EAE mice. Scale bar, 10 μm for high and 50 μm for low magnification images. (d) Western blots for RGMa expression in CD11b⁺ macrophages isolated from the spleen of MOG-EAE mice and in the brain. (e) Western blots for detecting neogenin expression in neogenin siRNA-transfected BMMØs. The graph shows the relative expressions of neogenin. ** $P < 0.01$ by Student's *t*-test.



Supplementary Figure 4. Assessment of the *in vivo* mechanism of action of RGMA-specific antibody. (a) EAE scores in the CD11b-DTR mice that received adoptive transfer of macrophages with neogenin siRNA or control siRNA transfection (control siRNA, $n = 5$; neogenin siRNA, $n = 5$). (b) The progression of MOG-induced EAE in C57BL/6 mice after intrathecal administration of RGMA-specific antibody or control IgG in the cervical spinal cord (control IgG, $n = 4$; RGMA-specific antibody, $n = 5$). (c) BMS scores determined at the indicated time points after spinal cord contusion injury in mice intraperitoneally injected with control IgG or RGMA-specific antibody (control IgG, $n = 8$; RGMA-specific antibody, $n = 7$). All values represent the mean \pm SEM (Mann–Whitney's U test).

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。

5. 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。
6. 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。
7. 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。
8. T cell における RGM 中和抗体の作用の解析を行った。

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 2 1 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)

施行した組換え 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た。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)。

この結果は、RGM中和抗体が、樹状細胞のみならず、T細胞にも直接作用して、その活性化を制御している可能性を示唆している。本研究では、RGM中和抗体のT細胞に対する作用のメカニズムを明らかにすることを到達目標として、研究を進めた。まずhelper T細胞におけるRGMの発現を調べた。Th2細胞にはRGMの発現が認められなかったが、Th1細胞、Th17細胞にはRGMが発現していた。Th1、Th2、Th17細胞への分化について検証してみたところ、RGMおよびRGM中和抗体は影響を示さなかった。しかしながらTh17細胞には、胎児18日齢の脳皮質神経細胞の突起伸展を促進する作用があり、その効果はRGM中和抗体で抑制できることが明らかになった。この結果は、RGMが神経突起の

伸展を促進していることを示唆している。さらに Th17 細胞は、大脳皮質神経細胞の細胞死を誘導する効果を有することを明らかにした。さらにこの効果は、RGM 中和抗体で抑制されることも示した。これらの結果は、Th17 細胞に発現する RGM が、大脳皮質神経細胞の突起の伸展および細胞死に関与することを示すものである。

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た。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治療に進み、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

本研究によって、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。今後の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., Takahashi, C., Miyake, S., Fujimura, H., Mochizuki, H. and Yamashita, T. (2012) Neovessels formed through CNS inflammation promote neural rewiring. *Nature Medicine* 18, 1658-1664.

2. 学会発表

1. 山下俊英 (2012) 中枢神経回路の障害と修復を制御する生体システム、広島大学大学院セミナー、広島 (2012. 4. 13)
2. 村松里衣子、山下俊英 (2012) 新生血管による神経回路の再生と機能回復、第 53 回日本神経学会学術大会、東京 (2012. 5. 22-25)
3. 山下俊英 (2012) 中枢神経回路の障害と修復を制御する生体システム、横浜市立大学大学院医学研究科大学院医学セミナー、横浜 (2012. 6. 22)
4. 山下俊英 (2012) 中枢神経回路の障害と修復を制御する生体システム、Neuroscience Seminar in

- Kyoto、京都(2012. 7. 21)
5. 山下俊英(2012) 中枢神経回路の障害と修復を制御する生体システム、12th Cradiovascular Metabolism and Aging Conference 特別講演、東京(2012. 8. 3)
 6. 山下俊英(2012) 中枢神経回路の障害と修復を制御する生体システム、第1回大阪大学神経難病フォーラム、大阪(2012. 8. 25)
 7. Yamashita, T. (2012) Biological mechanisms of neural rewiring regulation in the central nervous system. 大阪大学神経科学懇話会(2012.9.28)
 8. 山下俊英(2012) 外傷後の神経回路の再編成、第22回国際痒みシンポジウム、東京(2012. 10. 6)
 9. 山下俊英(2012) 中枢神経回路の障害と修復を制御する生体システム、神経組織の成長・再生・移植研究会 第27回学術集会、東京(2012. 10. 27)
 10. Fujita, Y., Yamashita, T. (2012) RGMa modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis. 第41回日本免疫学会学術集会 (2012.12.5-7)
 11. Muramatsu, R., Yamashita, T., (2012) Neovessels formed through CNS inflammation promote neural rewiring. 第20回日本血管生物医学会 (2012.12.5-7)
 12. 山下俊英(2013) 中枢神経回路の障害と修復を制御する生体システム、旭川医科大学 第5回教育研究推進センター講演会、旭川(2013. 3. 4)
 13. 山下俊英(2013) 中枢神経回路の障害と修復を制御する生体システム、大阪大学蛋白質研究所セミナー 「中枢神経研究を拓く新しい潮流」、吹田(2013. 3. 8)
 14. 山下俊英(2013) 中枢神経回路の障害と修復を制御する生体システム、第2回Japan Vascular Medicine Meeting、名古屋(2013. 3. 30)
- 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

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. Muto, M., Mori, M., Sato, Y., Uzawa, A., Masuda, S., Kuwabara, S. (2013) Seasonality of multiple sclerosis and neuromyelitis optica exacerbations in Japan. *Multiple Sclerosis Journal*, 19, 378-379.
 2. Makino, T., Ito, S., Mori, M., Yonezu, T., Ogawa, Y., Kuwabara, S. (2013) Diffuse and heterogeneous T2-hyperintense lesions in the splenium are characteristic of neuromyelitis optica. *Multiple Sclerosis Journal*, 19, 308-315.
 3. Uzawa, A., Mori, M., Muto, M., Masuda, S., Kuwabara, S. (2012) When is neuromyelitis optica diagnosed after disease onset? *Journal of Neurology*, 259, 1600-5.
 4. Uzawa, A., Mori, M., Takahashi, Y., Ogawa, Y., Uchiyama, T., Kuwabara, S. (2012) Anti-N-methyl D-aspartate-type glutamate receptor antibody-positive limbic encephalitis in a patient with multiple sclerosis. *Clinical Neurology Neurosurgery*, 114, 402-404.
 5. Okada, S., Takarabe, S., Nogawa, S., Abe, T., Morishita, T., Mori, M., Nishida, J. (2012) Persistent hiccups followed by cardiorespiratory arrest. *Lancet*, 380(9851), 1444.

2. 学会発表
1. 鶴沢 顕之, 森 雅裕, 増田 冴子, 武藤 真弓, 桑原 聡. NMO の臨床経過 2006 年版改定診断基準の有用性の検討. 第 53 回日本神経学会学術大会. 2012 年 5 月 24 日. 東京.
2. 森 雅裕, 鶴沢 顕之, 増田 冴子, 武藤 真弓, 桑原 聡. 多発性硬化症と視神経脊髄炎における抗 GluR 抗体. 第 53 回日本神経学会学術大会. 2012 年 5 月 23 日. 東京.
3. 米津 禎宏, 伊藤 彰一, 森 雅裕, 鶴沢 顕之, 小川 喜胤, 牧野 隆宏, 桑原 聡. 特発性急性横断性脊髄炎の脊髄 MRI 所見の検討 MS、NMO との比較. 第 53 回日本神経学会学術大会. 2012 年 5 月 25 日. 東京.
4. 山本 達也, 森 雅裕, 鶴澤 顕之, 柳澤 充, 内山 智之, 桑原 聡. 多発性硬化症と視神経脊髄炎における排尿症状の違い. 第 65 回日本自律神経学会総会. 2012 年 10 月 25 日. 東京.
5. 武藤 真弓, 鶴沢 顕之, 増田 冴子, 森 雅裕, 桑原 聡. 多発性硬化症と視神経脊髄炎における季節性の検討. 第 24 回日本神経免疫学会学術集会. 2012 年 9 月 21 日. 長野.
6. 増田 冴子, 森 雅裕, 鶴沢 顕之, 武藤 真弓, 内田 智彦, 桑原 聡. 多発性硬化症に対するインターフェロン β 1b 治療中に発症した多腺性自己免疫症候群 3 型の一例. 第 24 回日本神経免疫学会学術集会. 2012 年 9 月 21 日. 長野.
7. 鶴沢 顕之, 森 雅裕, 谷口 順子, 増田 冴子, 武藤 真弓, 内田 智彦, 桑原 聡. 神経免疫実験モデル 抗 HMGB1 抗体は EAE の重症度を抑制する 多発性硬化症に対する新規治療応用の可能性. 第 24 回日本神経免疫学会学術集会. 2012 年 9 月 21 日. 長野.
8. 森 雅裕, 鶴沢 顕之, 増田 冴子, 武藤 真弓, 内田 智彦, 桑原 聡. NMO Peptide array 法を用いた NMO 患者血清中抗 AQP4 抗体の AQP4 上認識抗原の解析. 第 24 回日本神経免疫学会学術集会. 2012 年 9 月 20 日. 長野.
9. 森 雅裕, 鶴沢 顕之, 増田 冴子, 武藤 真弓, 桑原 聡. Peptide array 法による AQP4 上の immunogenic site 同定の試み. 厚生労働省「免疫性神経疾患に関する調査研究班 平成 23 年度班会議」. 2012 年 1 月 25 日. 東京.
10. Mori, M., Uzawa, A., Masuda, S., Muto, M., Kuwabara, S. Peptide Array Analysis for Detection of Immunogenic Site on Aquaporin-4 in Neuromyelitis Optica. 13th Asian Oceanian Congress of Neurology, June 4, 2012, Melbourne.

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。今後の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. Muramatsu, R., Takahashi, C., Miyake, S., Fujimura, H., Mochizuki, H. and Yamashita, T. (2012) Neovessels formed through CNS inflammation promote neural rewiring. *Nature Medicine* 18, 1658-1664.

2. 学会発表

これらの病理学的な検索は、独立法人国立病院機構刀根山病院との共同研究である。我々は、病理学的検索を推進するべく、刀根山病院と共同し大阪大学 neuro CPC を設立し、定期的を開催している。多発性硬化症においても詳細な病理学的検討をさらに行う予定である。

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., <u>Mori, M.</u> , Nakamura, Y., Fujita, Y., Akutsu, T., Okuno, T., Taniguchi, J., Kumanogoh, A., Yoshida, M., <u>Mochizuki,</u> <u>H.</u> , <u>Kuwabara,</u> <u>S.</u> and <u>Yamashita, T.</u>	RGMa modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis.	Nature Medicine	17, 4	488-494	2011
Muramatsu, R., Takahashi, C., Miyake, S., Fujimura, H., Mochizuki, H. and <u>Yamashita,</u> <u>T.</u>	Neovessels formed through CNS inflammation promote neural rewiring.	Nature Medicine	18, 11	1658-1664.	2012
Fujita, Y., Endo, S., Takai, T. and <u>Yamashita, T.</u>	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

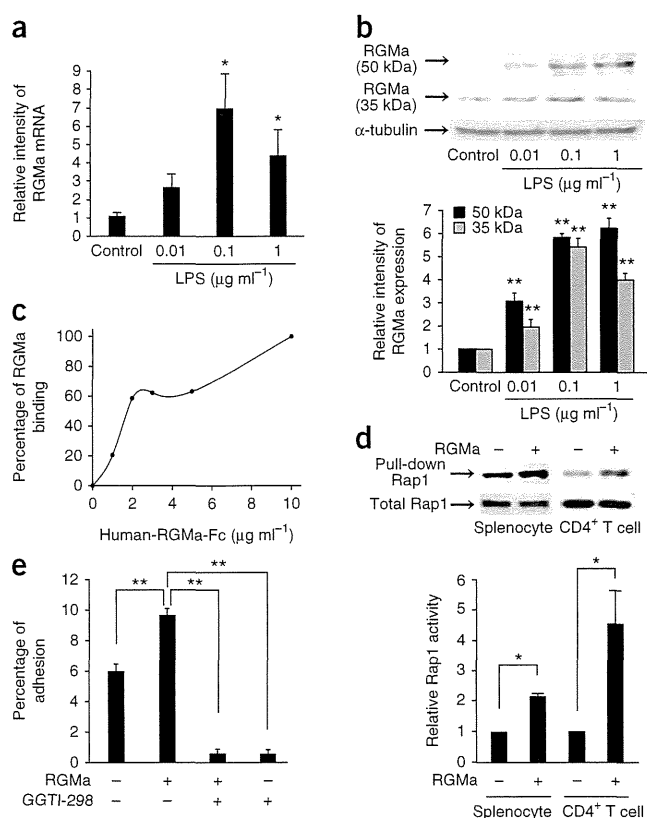


Figure 1 RGMa activates Rap1 and regulates CD4⁺ T cell adhesion.

(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

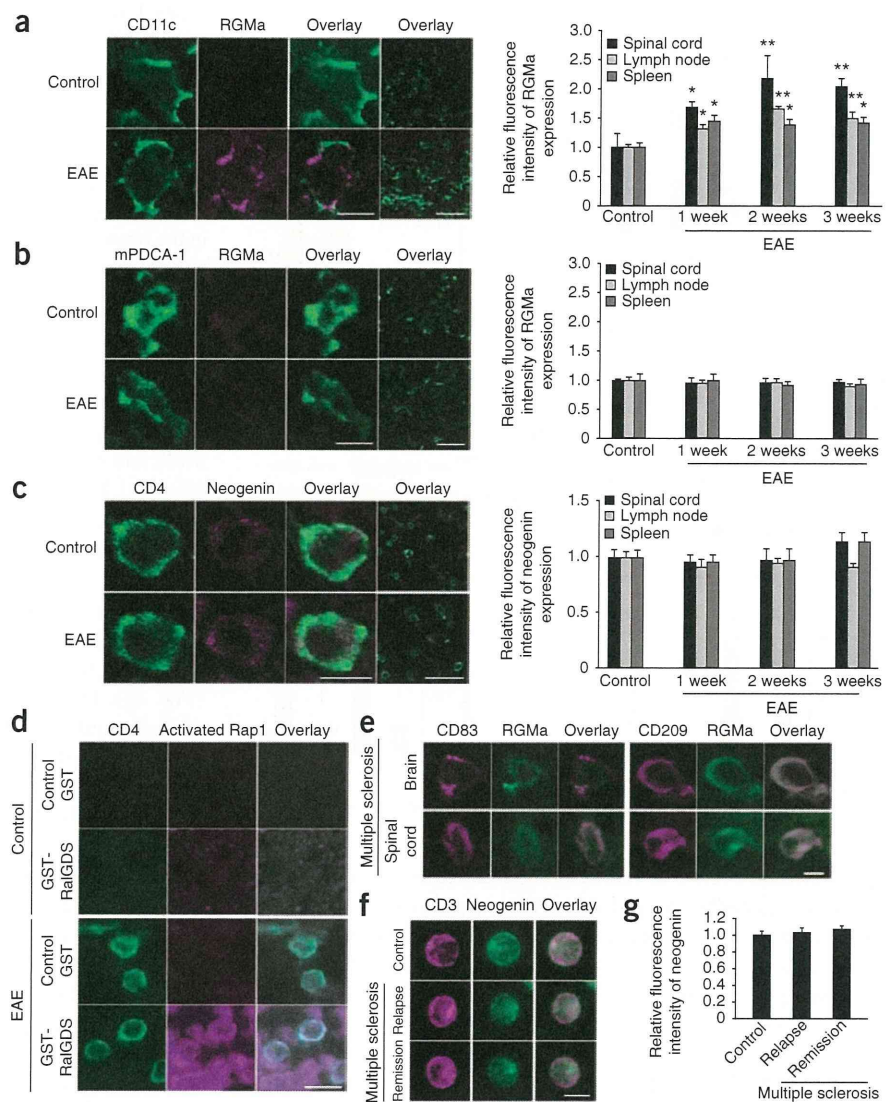
Rap1 activation alters T cell adhesion. RGMa-stimulated CD4⁺ T cells showed stronger adhesion to ICAM-1 when compared with the control CD4⁺ T cells (Fig. 1e). Moreover, a selective inhibitor of Rap1, GGTI-298, abolished RGMa-induced adhesive activity in CD4⁺ T cells. These results suggest that RGMa enhances 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 relapsing-remitting multiple sclerosis and healthy control PBMCs. **(g)** Relative fluorescence intensity of neogenin in the immunohistochemical analysis. Error bars represent the mean ± s.e.m. of 3 or 4 independent experiments. Scale bars in **a–e**, 50 μm for low (overlay images in **a**, **b**, and **c**) and 10 μm for high (all other images) magnification images; scale bar in **f**, 5 μm.



(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.



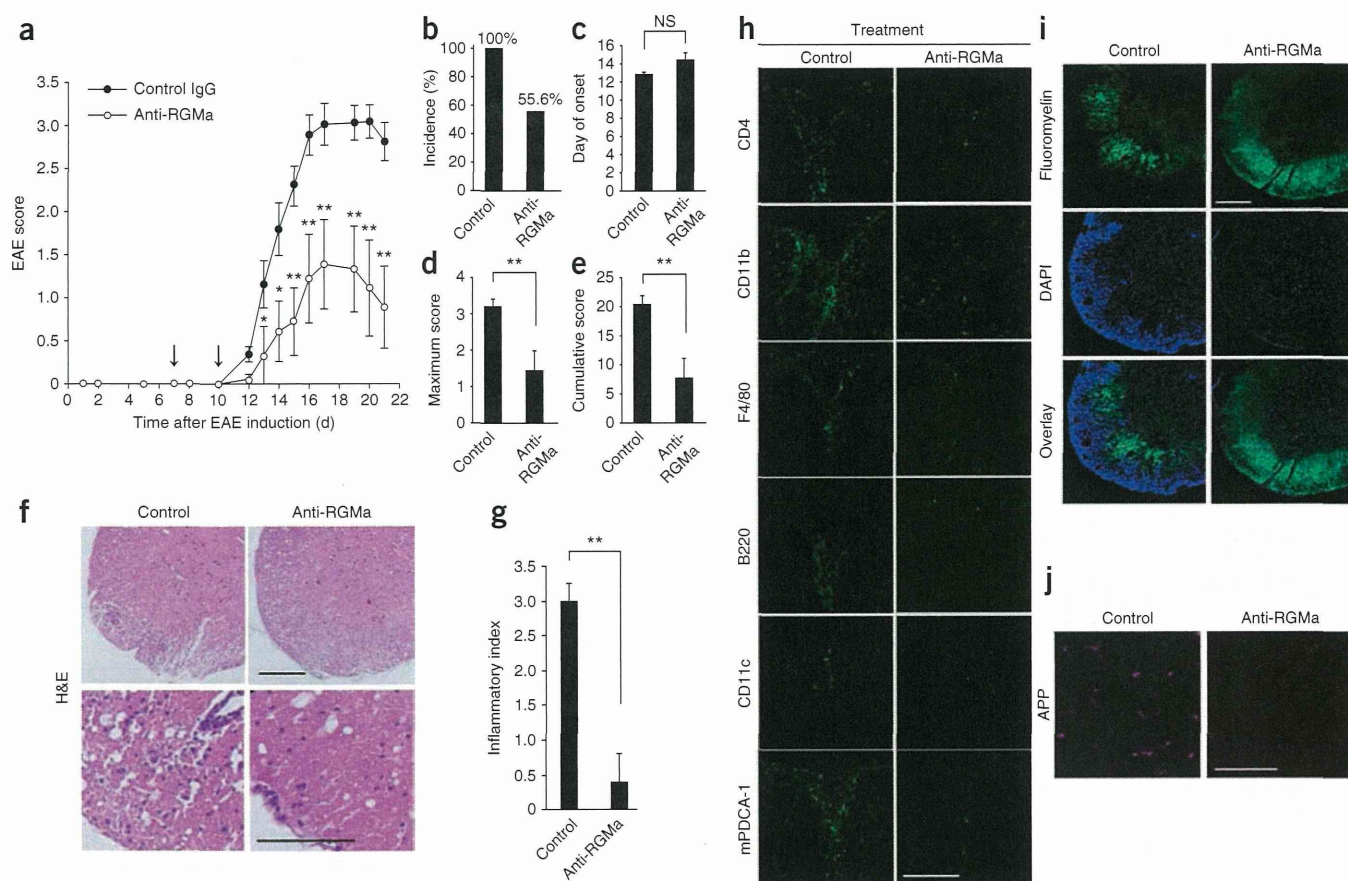


Figure 3 RGMa-specific antibody treatment reduces the severity of MOG-induced EAE. **(a)** Clinical EAE disease scores (EAE score) in mice treated with control IgGs ($n = 16$) and RGMa-specific antibodies (anti-RGMa; $n = 9$). Data represent the mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, and $**P < 0.01$ by Mann-Whitney's 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.

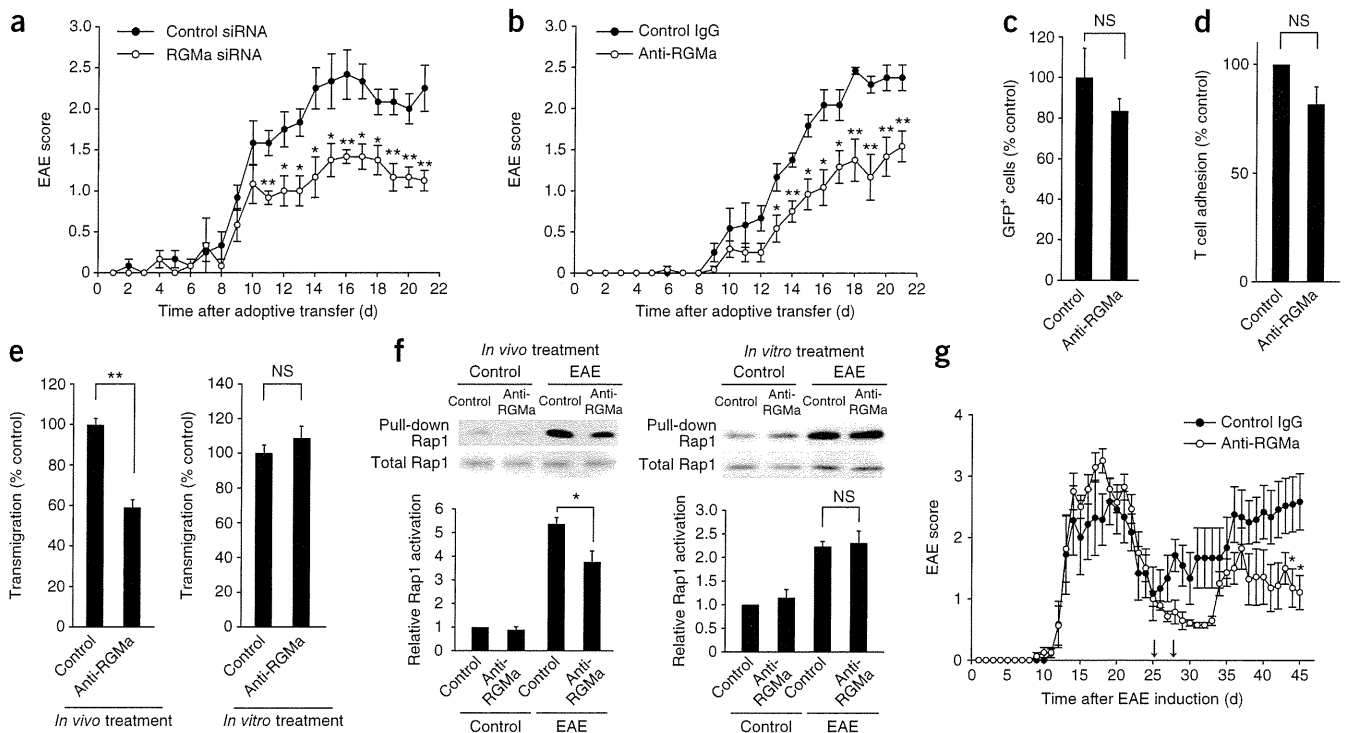


Figure 4 RGMa-specific antibody treatment suppresses T cell responses in EAE. **(a)** EAE scores in mice after adoptive transfer of MOG-stimulated BMDCs with or without RGMa knockdown. **(b)** EAE scores in mice after adoptive transfer of re-stimulated CD4⁺ T cells from donor mice immunized with MOG 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

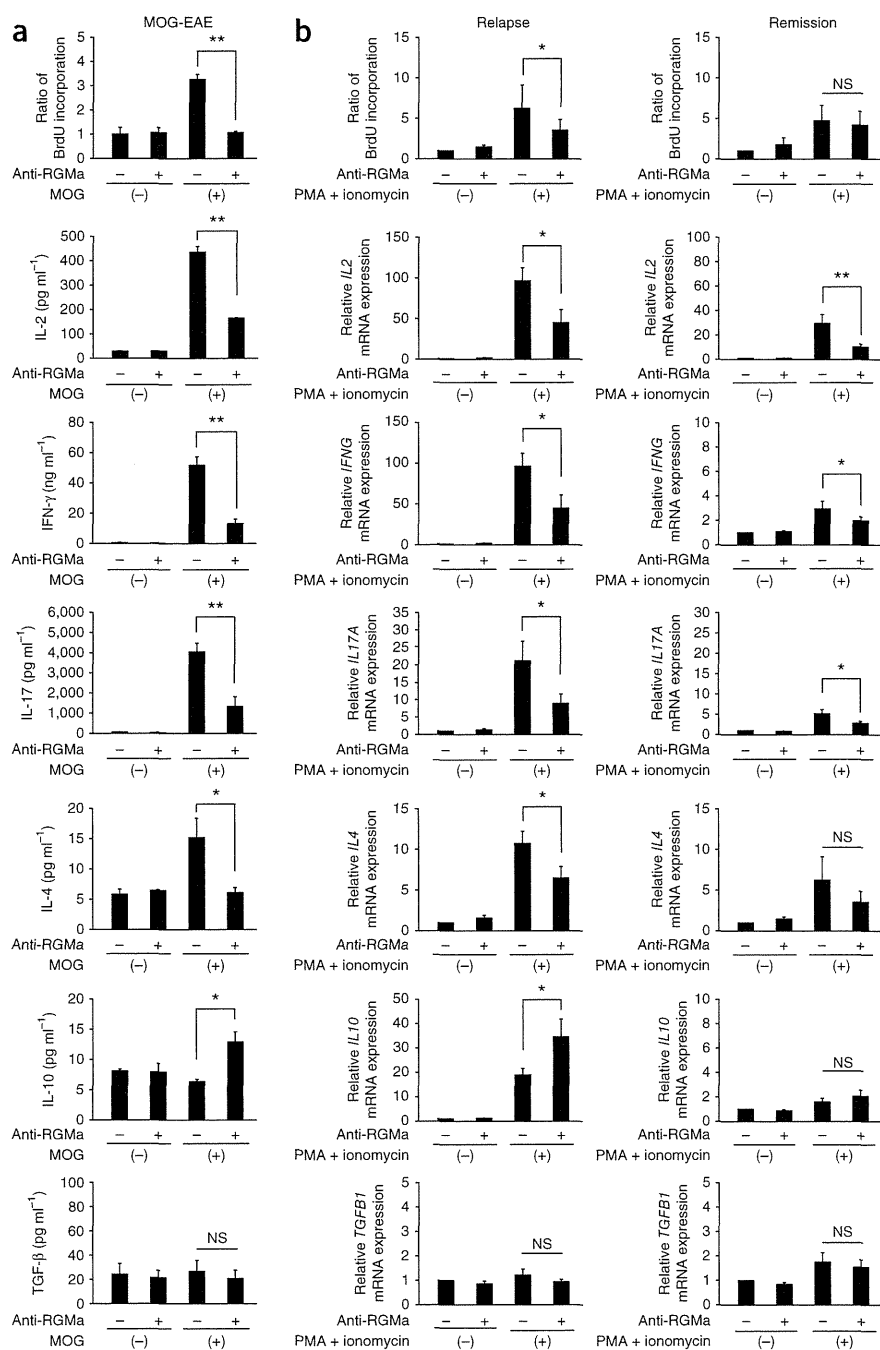
Treatment with the RGMa-specific antibody effectively suppresses T cell responses and attenuates the clinical course of EAE. Results obtained

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.