

201231011B

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

平成22年度～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 山下 俊英

平成 25 (2013) 年 3 月

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

平成22年度～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 山下 俊英

平成 25 (2013) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告		
多発性硬化症に対する新規分子標的治療法の開発	-----	1
山下俊英		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	21
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	22

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 大学院医学系研究科 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。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。またRGMが神経細胞の突起の伸展および細胞死を制御してい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、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。

研究分担者

桑原聡 千葉大学 大学院医学研究院
神経内科学 教授

森雅裕 千葉大学 大学院医学研究院
神経内科学 講師

望月秀樹 北里大学 医学部 神経内科

学（平成23年11月より大阪大学 大学院医学系研究科 神経内科学 教授）

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

中枢神経系の再生障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. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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 21日目に、splenocytesを採取し、MOG peptideで刺激し、BrdU incorporationおよび炎症性サイトカインの測定を行った。
- Adoptive transfer 実験：bone marrow dendritic cellsを採取し、RGM siRNAあるいはcontrol siRNAをtransfectionすることで、RGMをノックダウンした。この細胞をrecipient miceに移入した。またEAEマウスにRGM治療を施したもの、施さなかったものから、脾細胞を採取し、再刺激を行った後に、CD4⁺ T細胞を分離し、recipient miceに移入した。
- CD4⁺ T cellsの増殖およびサイトカイン産生の解析：EAEマウスから脾臓を取り出し、BrdUの取り込みおよび炎症性サイトカインの産生を解析した。
- マウスに脊髄損傷を作製し、その後RGM中和抗体を腹腔内投与した。
- Rap1 pull down assay：Rap1のeffectorであるRalGDSを用いて、active Rap1を測定した。
- Lymphocyte-binding assay：T cellsのICAM-1-Fcへの結合を測定した。
- 組織を用いた免疫染色を行った。
- 多発性硬化症のPBMCを用いた解析：PBMCを用いて、cytokine analysisを行った。

(倫理面への配慮)

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。

- 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

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 日齢の大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試験に進み、迅速に実用化を進めていく。

中枢神経疾患による神経症状については現時点で有効な治療法が存在しないため、WHO は中枢神経疾患を「クオリティ・オブ・ライフを脅かす最大の要因である」と位置づけている。本薬剤は、中枢神経機能障害をもたらす多くの疾患をターゲットとする点で医学的に貢献するのみならず、「要介護状態」からの回復が可能になるという観点で、医学経済面での大きな貢献も望める。中枢神経疾患の医療費は 2000 年時点で、全世界で 340 億ドルと心疾患領域に次いで 2 番目に大きい市場であり、さらに医療費の伸び率の高い領域（16%）である。

E. 結論

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., Kubo, T., Mori, M., Nakamura, Y., Fujita, Y., Akutsu, T., Okuno, T., Taniguchi, J., Kumanogoh, A., Yoshida, M., Mochizuki, H., Kuwabara, S. and Yamashita, T. (2011) RGMa modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis. *Nature Medicine*, 17, 488-494.
2. Fujita, Y., Endo, S., Takai, T. and Yamashita, T. (2011) Myelin suppresses axon regeneration by PIR-B/SHP-mediated inhibition of Trk activity. *EMBO J.* 30, 1389-1401.
3. Muramatsu, R., Takahashi, C., Miyake, S., Fujimura, H., Mochizuki, H. and Yamashita, T. (2012) Neovessels formed through CNS inflammation promote

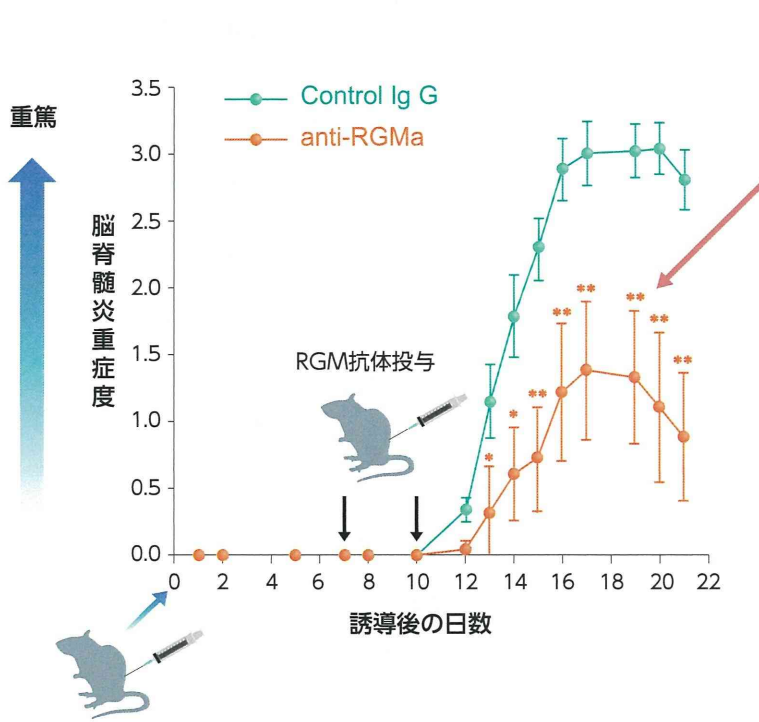
- neural rewiring. *Nature Medicine* 18, 1658-1664.
4. Muto, M., Mori, M., Sato, Y., Uzawa, A., Masuda, S., Kuwabara, S. (2013) Seasonality of multiple sclerosis and neuromyelitis optica exacerbations in Japan. *Multiple Sclerosis Journal*, 19, 378-379.
 5. Makino, T., Ito, S., Mori, M., Yonezu, T., 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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. 山下俊英 (2010) 中枢神経損傷後の機能回復と神経回路の修復、第540回北里医学会招待学術講演会、神奈川(2010. 4. 12)
 2. 山下俊英 (2010) 中枢神経損傷後の機能回復と神経回路の修復機構、九州大学統合生命科学特別セミナー、福岡(2010. 6. 4)
 3. 山下俊英 (2010) 中枢神経回路の修復と再生、神奈川科学技術アカデミー教育講座、東京(2010. 6. 9)
 4. 山下俊英 (2010) 脳・脊髄損傷後の神経回路修復のメカニズム、第1回Stroke Science Academy特別講演、福岡(2010. 6. 18)
 5. 山下俊英 (2010) 脳・脊髄損傷後の神経回路修復のメカニズム、宮崎大学大学院特別セミナー、宮崎(2010. 7. 9)
 6. 山下俊英 (2010) 脳・脊髄損傷後の神経回路修復のメカニズム、Neuro2010、神戸(2010. 9. 2-4)
 7. 山下俊英 (2010) 中枢神経損傷後の機能回復と神経回路の再生、九州大学大学院歯学研究院特別セミナー、福岡(2010. 10. 1)
 8. 山下俊英 (2010) 脳・脊髄損傷後の神経回路修復を制御する分子とそのシグナル伝達機構、名古屋大学グローバルCOE系統講義ニューロサイエンスコース、名古屋(2010. 12. 2)
 9. 山下俊英 (2010) Cell signaling cascades regulating restoration of neuronal network following injury to the central nervous system、BMB2010 (第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同大会)、神戸(2010. 12. 7-10)
 10. 山下俊英 (2010) 中枢神経障害後の神経回路再編成と機能回復のメカニズムの解明、CREST「脳神経回路の形成・動作原理の解明と制御技術の創出」研究領域 平成22年度ミーティング、東京(2010. 12. 24)
 11. 山下俊英 (2011) 中枢神経回路の修復機能と再生治療法の可能性、JPLA 医薬ライセンス協会 第229回月例会 招待講演、東京(2011. 1. 19)
 12. 山下俊英 (2011) 中枢神経障害後の神経回路再編成と機能回復のメカニズム、九州大学神経内科2011年同門会 特別講演、博多(2011. 7. 2)
 13. 山下俊英 (2011) 中枢神経障害後の神経回路再編成と機能回復のメカニズムの解明、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク2011年夏のワークショップ、神戸(2011. 8. 21-24)
 14. 山下俊英 (2011) 脳・脊髄損傷後

- の神経回路修復を制御する分子メカニズム、東北大学加齢医学研究所セミナー、仙台(2011. 9. 9)
15. 山下俊英 (2011) 軸索再生阻害因子によるシグナル伝達機構、東北大学加齢医学研究所遺伝子導入研究分野セミナー、仙台 (2011. 9. 9)
 16. 山下俊英 (2011) 視神経の軸索再生阻害の分子機構とその制御による再生誘導、第22回日本緑内障学会総会 シンポジウム、秋田 (2011. 9. 23-25)
 17. 山下俊英 (2011) 脳・脊髄はなぜ再生できないのか?、第29回大阪科学賞受賞記念講演、大阪 (2011. 11. 2)
 18. 山下俊英 (2011) 中枢神経回路の修復と再生 (中枢神経障害による後遺症を克服する治療戦略)、神奈川科学技術アカデミー教育講座、東京 (2011. 11. 4)
 19. 山下俊英 (2012) 脳・脊髄障害後の神経回路修復を制御するメカニズム、第8回宮崎サイエンスキャンプ、宮崎 (2012. 2. 18-19)
 20. 山下俊英 (2012) 中枢神経疾患と免疫制御、大阪大学蛋白研セミナー 「神経疾患の克服に向けて」、大阪 (2012. 3. 1-2)
 21. Yamashita, T. (2011) Receptors and cell signaling cascades regulating reorganization of the neural network. International Receptor Symposium 2011, Kyoto, Japan (2011.4.2)
 22. Yamashita, T. (2012) Intraspinal rewiring of the corticospinal tract is induced by target-derived BDNF and compensates lost function after brain injury. Ninth World Congress on Brain Injury, Edinburgh, Scotland (2012.3.21-25)
 23. Yamashita, T. (2012) Biological mechanisms of neural rewiring regulation in the central nervous system. Seminar at Janssen Pharmaceutica NV, Beerse, Belgium (2012.3.26)
 24. 村松里衣子、久保武一、森雅裕、中村由香、藤田幸、桑原聡、山下俊英 (2011) RGMa による多発性硬化症の発症および再発の制御、第34回日本神経科学大会、横浜 (2011. 9. 14-17)
 25. 村松里衣子、山下俊英 (2012) 多発性硬化症における軸索再生阻害因子RGMの役割、日本薬学会第132年会、札幌 (2012. 3. 29-31)
 26. 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)
 27. 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)
 28. 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)
 29. 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)
 30. 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)
 31. 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)
 32. 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)
 33. 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)
 34. 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)
35. 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)
36. 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)
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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β1b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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
- 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

(参考図)

RGM中和抗体投与は脳脊髄炎の発症を抑制した



脳脊髄炎の誘導

図1：自己免疫性脳脊髄炎を発症させたマウスに RGM 中和抗体を投与すると、発症が抑えられ、神経症状も軽快した。

RGMは抗原提示細胞によるT細胞の活性化を強める

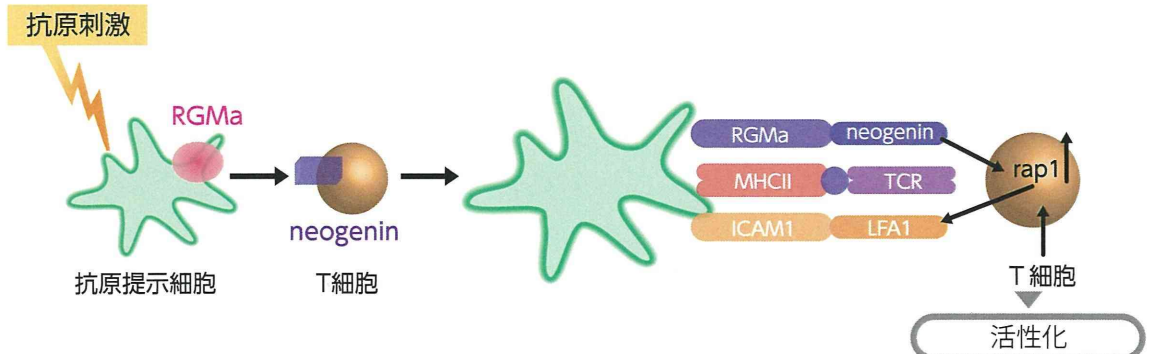


図2：抗原提示細胞は、抗原刺激を受けて、T細胞を活性化する。RGMは抗原提示細胞に発現しており、RGMの受容体であるneogeninはT細胞に発現している。RGMは、抗原提示細胞によるT細胞の活性化を促進する。その作用はT細胞の中でRap1が活性化されることによる。

RGM抗体は脳脊髄炎の再発を抑制した

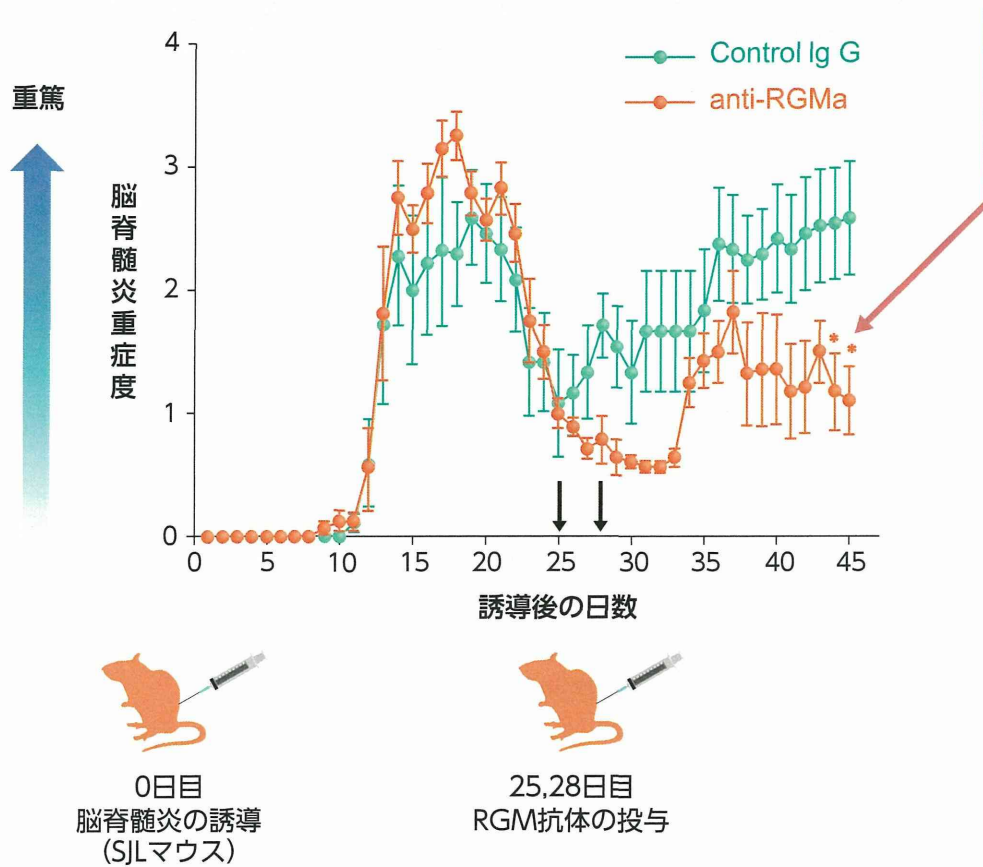


図3：再発性の自己免疫性脳脊髄炎を発症させたマウスに、最初の神経症状の発症がおさまった頃に RGM 中和抗体を投与すると、その後の再発を予防することができた。

RGMはT細胞の活性化を促進し、脳脊髄炎を増悪させる

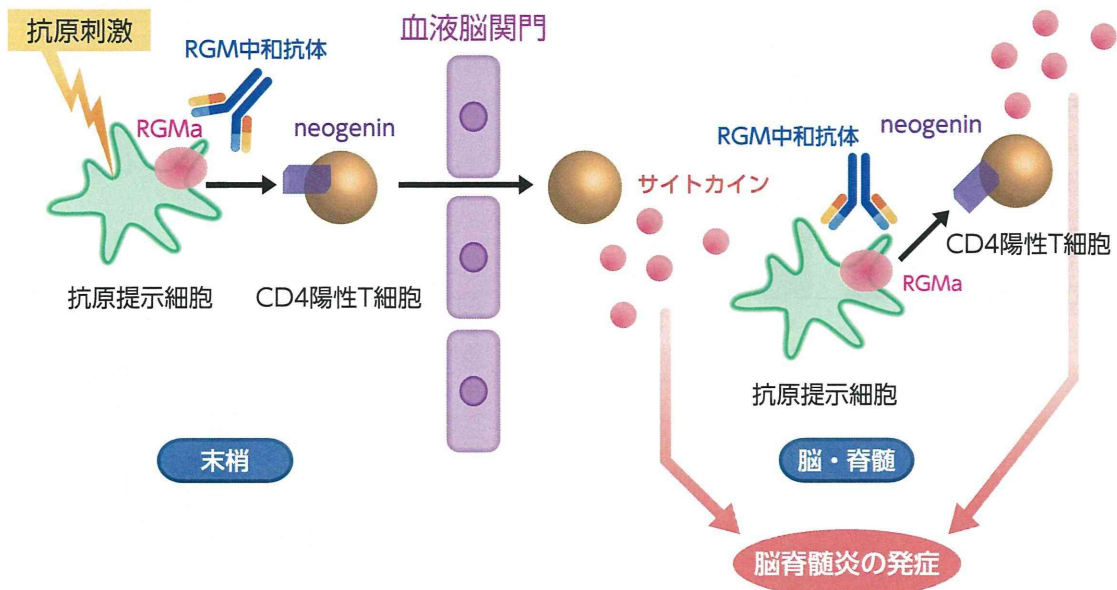
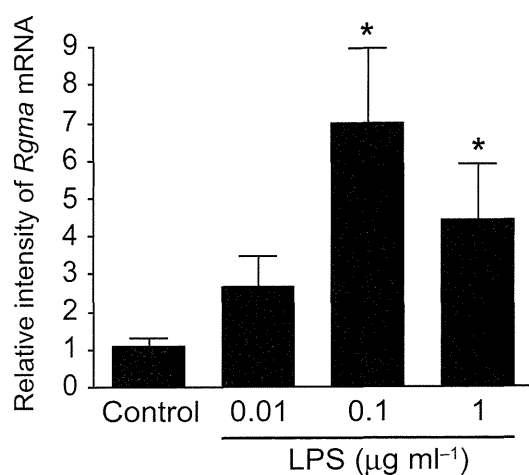


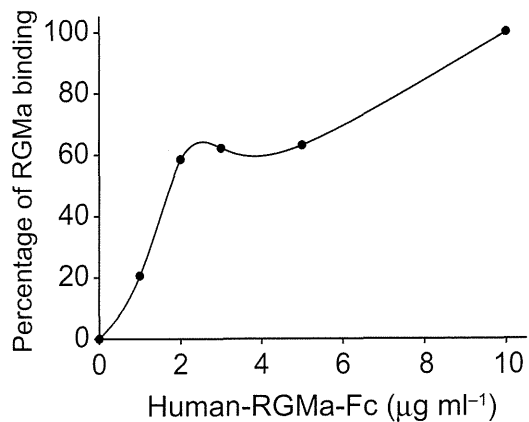
図4 : 抗原提示細胞に発現している RGM は、末梢と脳脊髄内で T 細胞に働きかけて、抗原提示細胞による T 細胞の活性化およびサイトカインの産生を促進する。RGM 中和抗体は、RGM の機能を阻止することにより、一連の反応をブロックし、脳脊髄炎症状を緩和する。

Figure 1

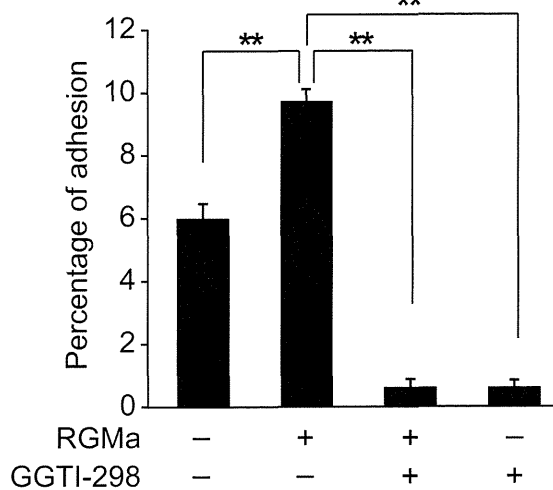
a



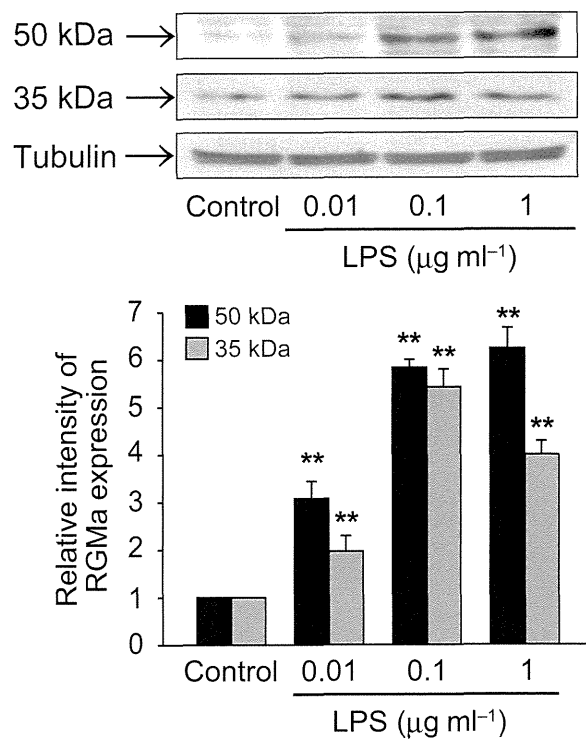
c



e



b



d

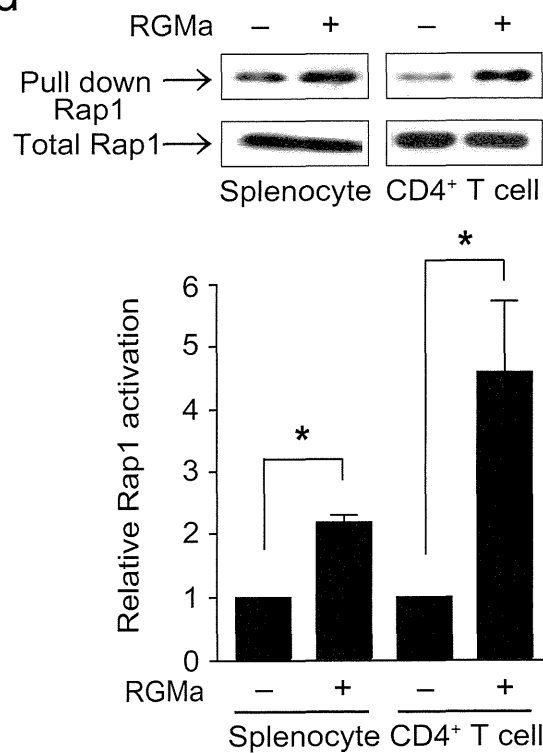


Figure 2

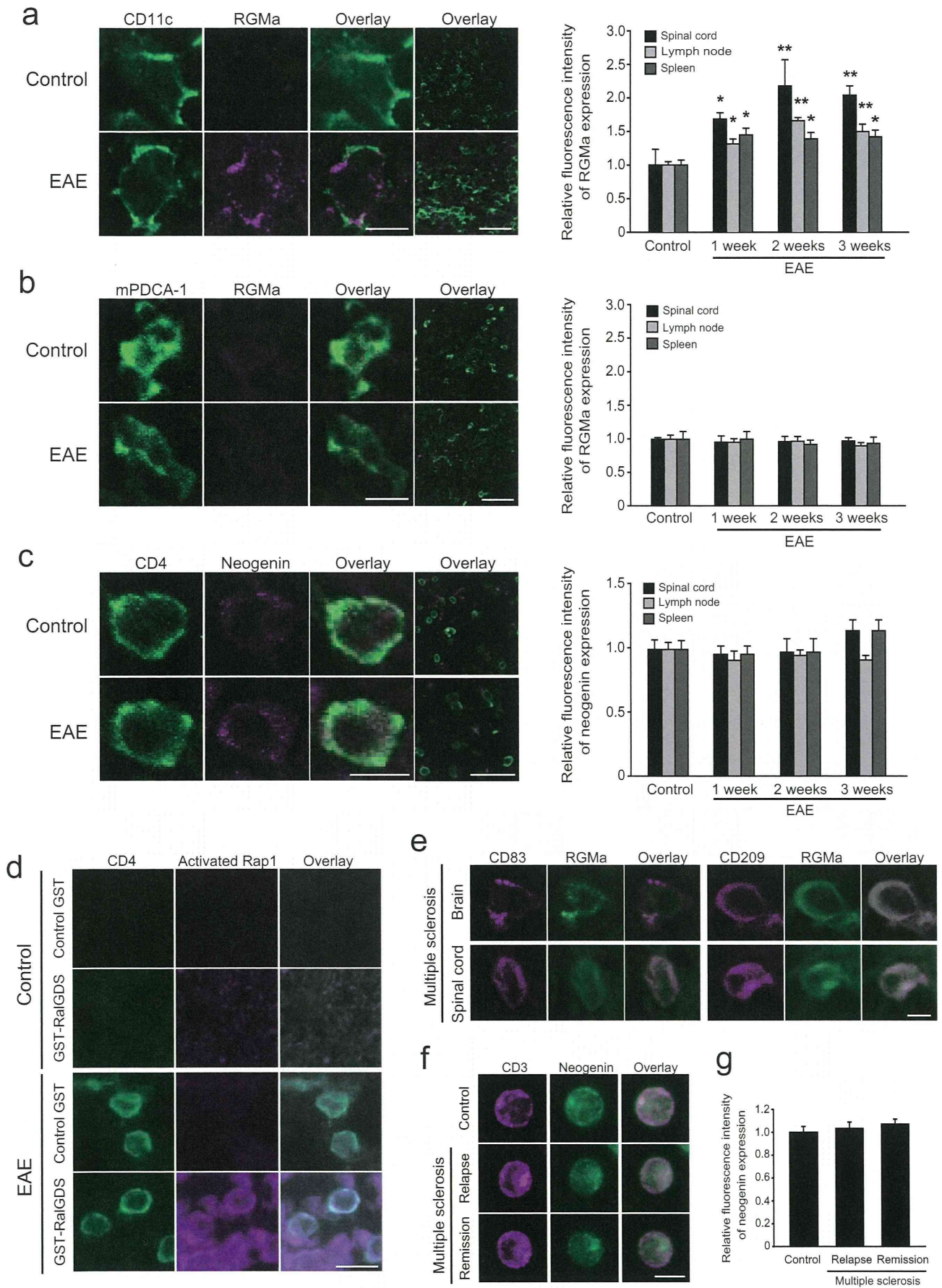


Figure 3

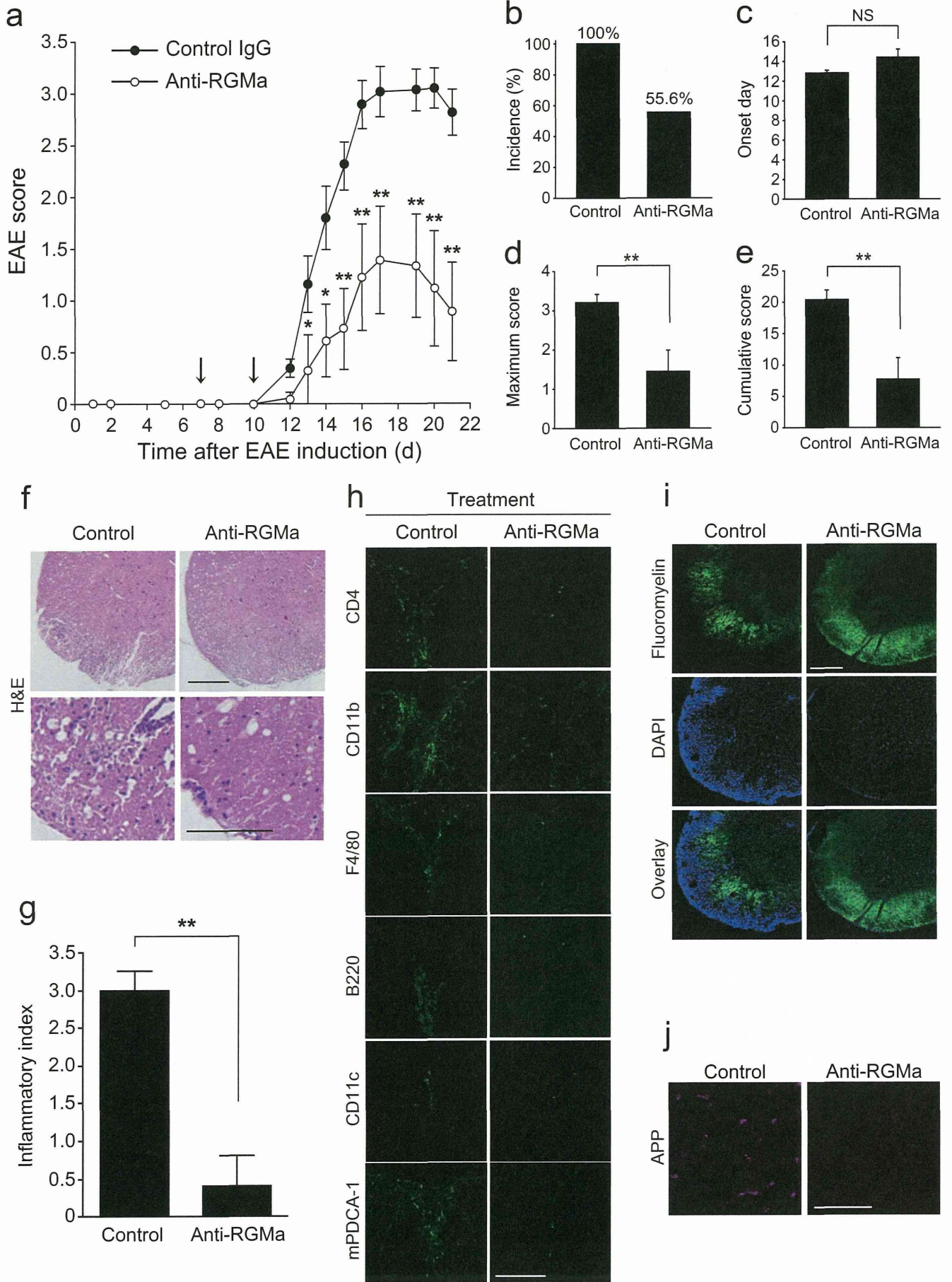


Figure 4

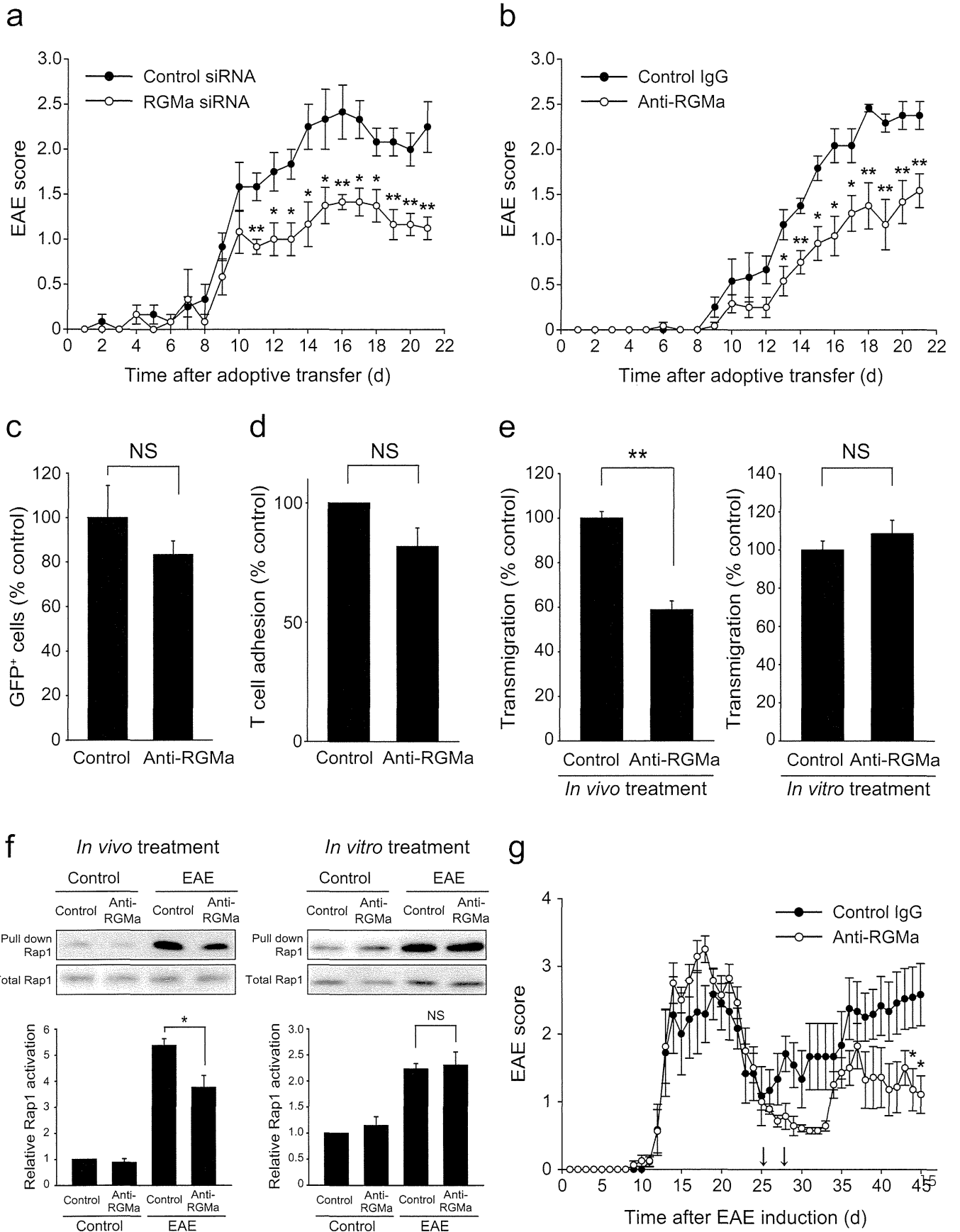
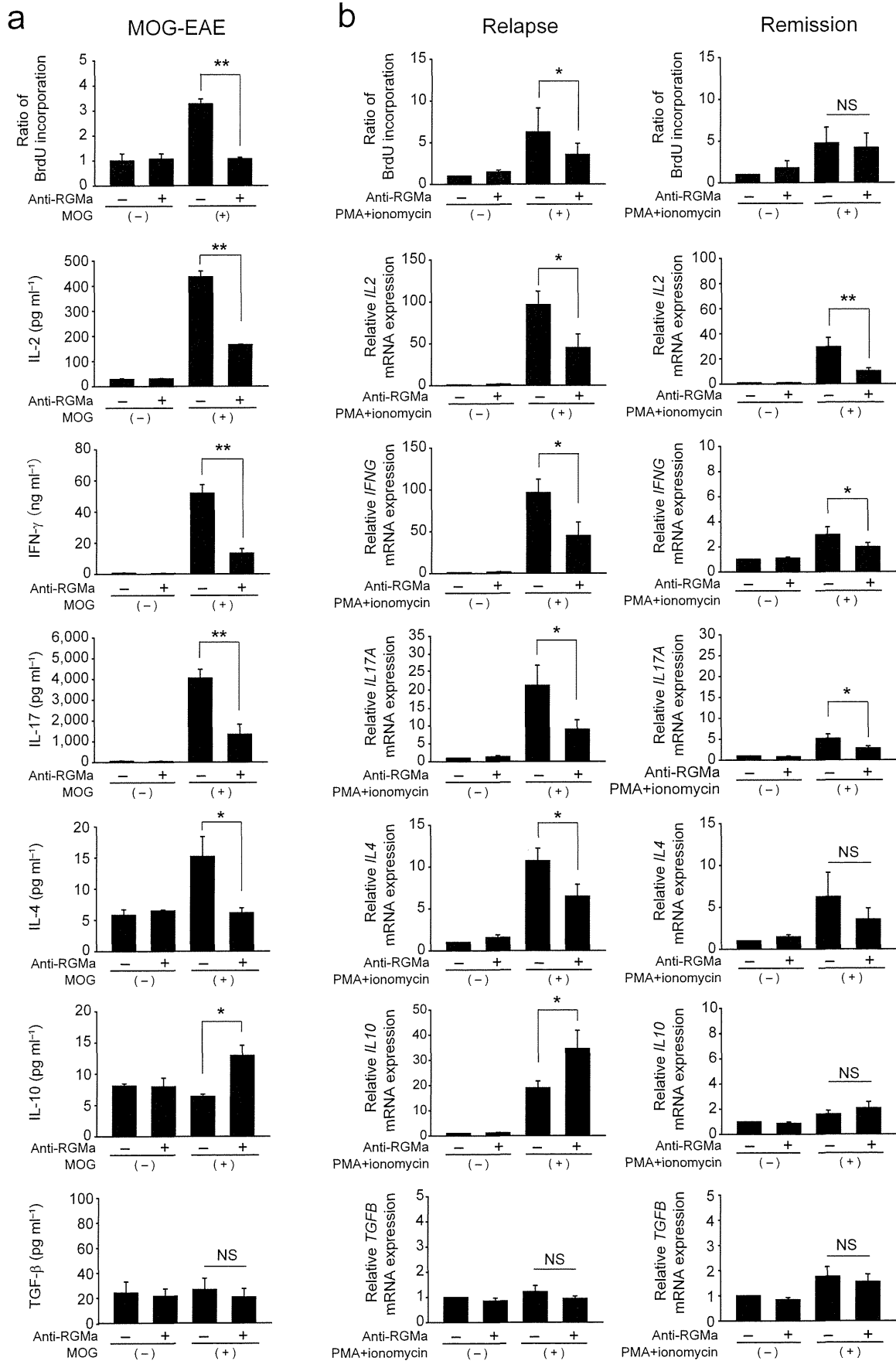


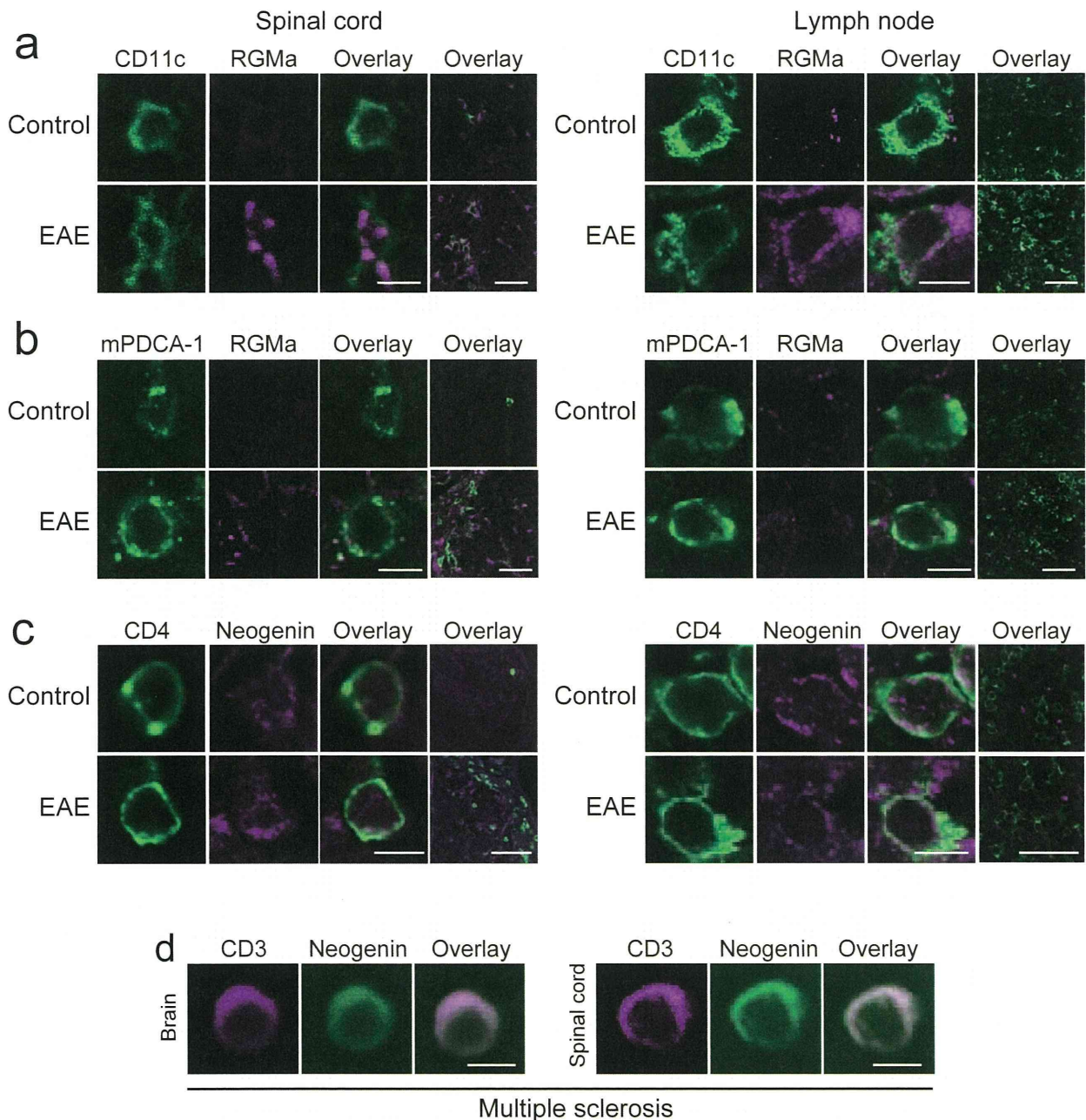
Figure 5



RGMa modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis

Rieko Muramatsu, Takekazu Kubo, Masahiro Mori, Yuka Nakamura, Yuki Fujita, Tsugio Akutsu, Tatsusada Okuno, Junko Taniguchi, Atsushi Kumanogoh, Mari Yoshida, Hideki Mochizuki, Satoshi Kuwabara and Toshihide Yamashita

Supplementary Information



Supplementary Figure 1. Immunostaining for RGMa and neogenin in sections from MOG-EAE mice and individuals with MS. (a–c) Immunostaining for RGMa and neogenin expressions in combination with CD11c (a), mPDCA-1 (b), and CD4 (c) in lymph node and spinal cord sections from MOG-EAE and control mice. For details, please refer to Fig. 2a–c. Scale bar, 10 μm for high and 50 μm for low magnification images. **(d)** Double-labeling of brain and spinal cord sections with MS for neogenin and CD3. $n = 8$, scale bar = 5 μm .