

# 平成27年1月22日(木):2日目

8:45-9:30

HAM関連班会議(1)

座長-山野嘉久

37	15分	演題名 氏名	HAMの革新的な治療法となる抗CCR4抗体療法の実用化に向けた開発班およびHAMの革新的な医薬品等の開発促進に関する研究班 概要説明 山野嘉久(聖マリアンナ医科大学・難病治療研究センター)
38	10分	演題名 氏名	サルT細胞白血病ウイルス1型感染ニホンザルをモデルとした抗CCR4抗体の有効性解析 ○松岡雅雄(京都大学・ウイルス研究所)
39	10分	演題名 氏名	HAMにおけるTh1-like CD4+CCR4+T細胞の発生機構と病態形成への関わり 山野嘉久(聖マリアンナ医科大学・難病治療研究センター)、○新谷奈津美(聖マリアンナ医科大学・難病治療研究センター)
40	10分	演題名 氏名	HAMに対する抗CCR4抗体の有用性およびCCR4+CD8+T細胞の病的意義に関する検討 山野嘉久(聖マリアンナ医科大学・難病治療センター)、○佐藤知雄(聖マリアンナ医科大学・難病治療センター)

9:30-10:00

HAM関連班会議(2)

座長-久保田龍二

41	10分	演題名 氏名	HAM発症感受性を規定するウイルス型特異的転写制御因子の機能解析 ○齋藤峰輝(川崎医科大学・微生物学)
42	10分	演題名 氏名	網羅的プロテオーム解析を用いたHAM新規治療薬、診断薬標的分子の同定 ○植田幸嗣(東京大学・ゲノム制御医科学)
43	10分	演題名 氏名	HAMの歩行不安定症に対する歩行改善プログラムの有効性と今後の展望 中島 孝(新潟病院・神経内科)、○遠藤寿子(新潟病院・神経内科)

10:00-11:05

アトピー性脊髄炎班 班会議

座長-吉良潤一

44	5分	演題名 氏名	アトピー関連脳脊髄・末梢神経障害の病態解明と画期的治療法の開発研究班 概要説明 吉良潤一(九州大学・神経内科)
45	10分	演題名 氏名	アトピー性脊髄炎診断基準の作成とその基盤となる臨床免疫病理学的研究成績 ○吉良潤一(九州大学・神経内科)
46	10分	演題名 氏名	アトピー性皮膚炎と脊髄炎 楠 進(近畿大学・神経内科)、○宮本勝一(近畿大学・神経内科)
47	15分	演題名 氏名	アトピー関連サイトカインの中樞神経系での作用 ○錫村明生(名古屋大学・環境医学研究所)
48	15分	演題名 氏名	アトピー性脊髄炎動物モデルの作成と治療法の開発(1)Atopy-Related Allodynia(ARA) 吉良潤一(九州大学・神経内科)、○山崎 亮(九州大学・神経治療学)
49	10分	演題名 氏名	アトピー性脊髄炎動物モデルの作成と治療法の開発(2)アトピー性炎症の実験的自己免疫性脳脊髄炎への影響 吉良潤一(九州大学・神経内科)、○方 梅(九州大学・神経内科)

11:05-12:05 エビデンス班 一般演題(2)

11:05-11:35

免疫介在性脳炎

座長-横田隆徳

50	10分	演題名	抗NMDAR脳炎における髄液バイオマーカーの探索
		氏名	犬塚 貴(岐阜大学・神経内科老年学)、○木村暁夫(岐阜大学・神経内科老年学)
51	10分	演題名	抗NMDAR抗体の受容体結合特性と臨床的特徴についての検討
		氏名	松井 真(金沢医科大学・神経内科)、○田中恵子(金沢医科大学・神経内科)
52	10分	演題名	Bickerstaff脳幹脳炎の誘発電位による早期診断
		氏名	園生雅弘(帝京大学・神経内科)、○神谷久雄(帝京大学・神経内科)

11:35-12:05

肥厚性硬膜炎その他

座長-野村恭一

53	10分	演題名	ANCA陽性肥厚性硬膜炎に対する少量メトトレキサート併用療法の有用性と展望
		氏名	池田修一(信州大学・脳神経内科リウマチ膠原病内科)、○下島恭弘(信州大学・在宅療養推進学)
54	10分	演題名	免疫介在性肥厚性硬膜炎の原因とその地域集積性
		氏名	西澤正豊(新潟大学・神経内科)、○河内 泉(新潟大学・神経内科)
55	10分	演題名	効果期における $\alpha$ 4インテグリン阻害薬HCA3551の経口投与は、タイラーウイルス誘導性免疫性脱髄疾患を有意に抑制する
		氏名	高 昌星(信州大学・保健学科)、○平野雄大(信州大学大学院)

12:05-13:00

昼食およびエビデンス班以下全10班会議の事務連絡

13:00-14:35 免疫性ニューロパチー班 班会議

13:00-13:35

GBS/Fisher臨床/免疫病態

座長-楠 進

56	5分	演題名	免疫性ニューロパチーの治療反応性予測に基づく有効な治療戦略の構築研究班 概要説明
		氏名	楠 進(近畿大学・神経内科)
57	10分	演題名	LM1抗体陽性GBSの臨床的特徴
		氏名	楠 進(近畿大学・神経内科)、○桑原 基(近畿大学・神経内科)
58	10分	演題名	ギラン・バレー症候群亜型における先行感染と転帰との関連
		氏名	神田 隆(山口大学・神経内科)、○古賀道明(山口大学・神経内科)
59	10分	演題名	糖脂質複合による抗原抗体反応増強機序に関する検討
		氏名	千葉厚郎(杏林大学・神経内科)、○内堀 歩(杏林大学・神経内科)

13:35-14:05

CIDP

座長-梶 龍児

60	10分	演題名	CIDPの病態解明、治療法開発に向けた前向きコホート研究:臨床・ゲノム情報、生体試料リソース構築
		氏名	○祖父江元(名古屋大学・神経内科)
61	10分	演題名	CIDPの治療反応性と予後不良因子の探索:モデルマウスを用いた試み
		氏名	祖父江元(名古屋大学・神経内科)、○飯島正博(名古屋大学・神経内科)
62	10分	演題名	慢性炎症性脱髄性多発根神経炎における髄液中miRNAの網羅的発現解析
		氏名	横田隆徳(東京医科歯科大学・脳神経病態学)、○大久保卓哉(東京医科歯科大学・脳神経病態学)

14:05-14:35

末梢および中枢の脱髄

座長-神田 隆

63	10分	演題名	QT延長がある急性期ギラン・バレー症候群では、球麻痺による気管挿管を来しやすい
		氏名	野村恭一(埼玉医科大学総合医療センター・神経内科)、○鈴木理人(埼玉医科大学総合医療センター・神経内科)
64	10分	演題名	抗neurofascin 155抗体の慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー(CIDP)における意義と役割
		氏名	○吉良潤一(九州大学・神経内科)
65	10分	演題名	中枢病変を伴う末梢神経障害患者(EMRN)に見られる抗中性糖脂質抗体の抗原特異性
		氏名	○武藤多津郎(藤田保健衛生大学・脳神経内科)

14:35-14:40:閉会のあいさつーエビデンス班 班長 松井 真

## NMO 動物モデルの改良を目指して

研究代表者：大阪大学呼吸器免疫アレルギー内科 熊ノ郷淳

研究分担者及び協力者：大阪大学神経内科学 ○奥野龍禎 甲田亨、高田和城、南波明子、  
中辻裕司、望月秀樹

近畿大学神経内科学：宮本勝一、楠進

大阪府立急性期・総合医療センター：木下允、狭間敬憲

### 【背景及び目的】

動物モデルは NMO の病態機序解明に大きく寄与してきた。我々は患者由来の抗 AQP4 抗体を動物に移入する passive transfer model を確立し、抗 AQP4 抗体が病原性を持つこと、補体経路の活性化がアストロサイトのネクロシスを引き起こすことを証明した (Kinoshita et al. Neuroreport. 2009、Kinoshita et al. Biochem Biophys Res Commun. 2009、Kinoshita et al. Biochem Biophys Res Commun. 2010)。この結果は追試され、抗 AQP4 抗体及び補体経路の治療ターゲットとしての重要性が確立されてきた。しかしながら NMO 患者の末梢の細胞性免疫系を再現するようなモデルは未だ確立されておらず、脊髄長大病変は従来の動物モデルで再現できていなかったため、不十分な薬剤スクリーニングしかできていなかった。本研究では、これまで我々が作成してきた動物モデルを改良し、実際の病態をより反映した NMO 動物モデルを作成することにより新たな治療法の開発につなげるとことを目的としている。

### 【方法】

本研究には病原性を示す抗 AQP4 抗体の安定供給が必要であるため、既報のヒト由来モノクローナル抗体作成法に準拠し (Wrammert et al. Nature 2008)、患者由来抗 AQP4 抗体産生細胞株の作成を試みる。急性増悪時の NMO 患者 髄液中からプラズマブラスト (CD19+CD138+CD3-CD14-) をシングルセルソーティングして、RNA を抽出し、cDNA を作成する。ヒト IgG 特異的プライマーを用いて IgG 遺伝子を増幅し、発現ベクターに組み込む。細胞株にこのベクターを強制発現させ、培養上清で抗 AQP4 抗体の ELISA を行い、産生クローンを選択する。

### 【結果と今後の予定】

再発時の NMO 患者から採取した髄液プラズマブラストより cDNA ライブラリーを作成した。これらを発現ベクターに組み込んだ後、細胞株に強制発現させ、抗 AQP4 抗体産生クローンを選択していく。今後末梢血からも同様にして抗 AQP4 抗体産生クローン作成を行う。抗 AQP4 抗体を安定して精製できるようにすれば、投与方法や投与する動物の背景を工夫することにより、より実際の病態を反映した NMO 動物モデル作成を試みる。

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）

平成 26 年度 委託業務成果報告書（業務項目）

視神経脊髄炎動物モデル作成によるテーラーメイド治療の確立

担当責任者：奥野 龍禎

（大阪大学医学系研究科 神経内科学 助教）

担当責任者：熊ノ郷 淳

（大阪大学医学系研究科 呼吸器・免疫アレルギー内科 教授）

研究協力者：甲田 亨

（大阪大学医学系研究科 神経内科学 医員）

新たなNMO動物モデル確立に向けた準備及び既存モデルを用いたNMO治療開発

NMO患者由来リンパ球のライン化～AQP4抗体産生細胞株樹立

## 研究要旨

視神経脊髄炎（NMO）は重篤な視神経炎と脊髄炎を主徴とする中枢神経炎症性疾患であるが、日本をはじめとする東アジアで頻度が高く、本邦で病態を解明して独自の治療戦略を立てていく必要がある。

これまでの研究でAQP4抗体をMSのモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）に移入するパッシブトランスファーモデルや脳内へのAQP4抗体注入モデルが作成されてきた。その結果補体依存性あるいは抗体依存性細胞障害によるアストロサイト障害が病態に重要な役割を果たすことが明らかになったが、従来のモデルではNMOの最大の特徴である重篤な脊髄長大病変や視神経炎を再現できていないなどの問題点が残されていた。

このような問題を解決するため、本研究ではより実際の病態を反映した NMO モデルの確立を目指している。そのためには病原性の高い AQP4 抗体が必要であるが、本年度は AQP4 抗体産生細胞株樹立法の確立に重点を置いて研究を行った。ヒト末梢血からシングルセル RT-PCR 法を用いてモノクローナル抗体を樹立する方法 (Wrammert et al. Nature 2008) を髄液に応用し、NMO 患者の緊急入院時に採取した髄液の残りからプラズマブラストをシングルセルソーテングして、単一細胞由来の IgG 遺伝子をクローニングする方法を確立した。

## A. 研究目的

NMOは重篤な視神経炎と脊髄炎を主徴とする中枢神経炎症性疾患である。重篤であるのが特徴であり、病態の解明と治療の開発が切望されている。NMOは本邦で頻度が高くMSとは病態も治療反応性も異なる疾患であるため、本邦で独自の治療戦略を立てていく必要がある。これまでの研究で動物モデルが作成されたが、従来のモデルではNMOの最大の特徴である重篤な脊髄長大病変や視神経炎を再現できていないなどの問題が残されていた。本研究ではより実際の病態を反映した動物モデル作成を目指す。

## B. 研究方法, 結果及び考察

本研究では多量の病原性の高いAQP4抗体が必要である。当初は患者のAQP4抗体産生プラズマブラストを用いる計画であったが、より効率的にAQP4抗体を精製するためにヒト末梢血からシングルセルRT-PCR法を用いてモノクローナル抗体を樹立する方法 (Wrammert et al. Nature 2008)を髄液に応用した。概要は以下の通りである。

- ①残余髄液からFACS AriaによりCD19+CD138+プラズマブラストを一個毎に分離する(シングルセルソーティング)
- ②RNAを抽出後、特異的プライマーでIgG重鎖及び軽鎖遺伝子を増幅させる(シングルセルRT-PCR)。
- ③IgG遺伝子を制限酵素で切断後発現ベクターに挿入し、細胞株に強制発現させる。
- ④培地内AQP4抗体の産生はAQP4強制発現細胞株を用いたcell based assayによりスクリーニングする。
- ⑤AQP4抗体遺伝子を強制発現させたHEK293細胞を培養し、培地からモノクローナルAQP4抗体を精製する。

現在のところNMO増悪で緊急入院した大阪大学医学部附属病院神経内科の症例を延べ2例、大阪府立急性期総合医療センター神経内科の症例を1例に対してシングルセルRT-PCR法を適用した。1例目は大阪大学医学部附属病院神経内科でフォロー中の37歳女性である。眠気が出現した後、右手のしびれ感が出現し、緊急入院となった。脳MRIでは第三脳室周囲がFlair法で高信号域を示し、更に頸髄にT2高信号域と造影をされる病巣を認めた(図1)。緊急で施行した髄液の細胞数は66(内リンパ球64)/mm<sup>3</sup> 蛋白99mg/dlであった。髄液細胞を遠心後分離し、抗CD19、CD138、CD14、CD3抗体で染色を行い、FACS Ariaを用いて解析したところ、CD19+ CD138-(メモリーB細胞)が0.9%、CD19+ CD138+(プラズマブラスト)が0.1%見られたため(図2)、CD19+ CD138+分画に対してシングルセルソーティングを行った。

もう1例も大阪大学医学部附属病院神経内科でフォロー中の38歳女性である。嘔気と難治性吃逆が出現し、頭部MRIを撮影したところ延髄最後野にFLAIRで高信号域を認めた(図3)。髄液検査を行ったところ細胞数は1/mm<sup>3</sup> 蛋白40mg/dlであったが、同様にFACS Ariaを用いて解析したところ、CD19+ CD138-(メモリーB細胞)が1.2%、CD19+ CD138+(プラズマブラスト)が0.3%見られ(図4)、プラズマブラストの割合が増加していた。前回同様CD19+ CD138+分画に対してシングルセルソーティングを行った。

これら2例に加え府立急性期総合医療センターの1症例から、多数の髄液プラズマブラスト由来IgG遺伝子をクローニングしている。今後AQP4抗体のスクリーニングを行っていく。AQP4抗体スクリーニング用のAQP4強制発現HEK293細胞は既に作成済みであるが、ELISAでも確認を行っていく予定である。既存モデルを用いたNMO治療開発については別項に記

載する。

### (倫理面への配慮)

NMO の余剰髄液を使用する研究は当該施設の倫理委員会にて承認されている。

### E. 結論

患者残余髄液中プラズマブラストよりシングルセルRT-PCR法を用いてモノクローナル抗体産生細胞株を樹立する方法を確立した。同手法により病原性の高いAQP4抗体作成が可能になるため、NMO動物モデルの改良に役立つと思われる。

### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Tada S, Okuno T, Hitoshi Y, Yasui T, Honorat J, Takata K, Koda T, Shimagami H, Chi-Jing C, Namba A, Sugimoto T, Sakoda S, Mochizuki H, Kikutani H, Nakatsuji Y.

Partial suppression of M1 microglia by Janus kinase 2 inhibitor does not protect against neurodegeneration in animal models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation* 2014 11:179

2. Takata K, Kato H, Shimosegawa E, Okuno T, Koda T, Sugimoto T, Mochizuki H, Hatazawa J, Nakatsuji Y. 11C-acetate PET imaging in patients with multiple sclerosis *PLoS One*. 2014 9:e111598

3 中辻裕司、奥野龍禎 望月秀樹 インターフェロン  $\beta$ . 多発性硬化症のパラダイムシフト. *Clinical Neuroscience* (中外医学社) 2014 32: 1296-8.

#### 2. 学会発表

1. 奥野龍禎、甲田亨、宮本勝一、中辻裕司、高田和城、オノラ ジョセフ、木下允、楠進、熊ノ郷淳、望月秀樹 血清 Sema4A 高値を示す NMO spectrum disorders の特徴 第 55 回日本神経学会学術大会 2014 年 5 月 福岡

2. 奥野龍禎、甲田亨、宮本勝一、高田和城、中辻裕司、熊ノ郷淳、望月秀樹。血清 Sema4A 高値を示す NMOSd の特徴について。第 26 回日本神経免疫学会 2014 年 9 月 金沢

3. 甲田亨、奥野龍禎 MS/NMO における免疫セマフォリン Sema4A 疾患バイオマーカーとしての役割ー 第 26 回日本神経免疫学会 2014 年 9 月 金沢

4. Koda T, Okuno T, Takata K, Honorat JA, Sakoda S, Kumanogoh A, Nakatsuji Y, Mochizuki H Investigation of Sema4A as a biomarker for treatment selection for multiple sclerosis 12th ISNI congress 2014 Oct Germany

### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 残余髄液からのモノクローナル AQP4 抗体樹立法

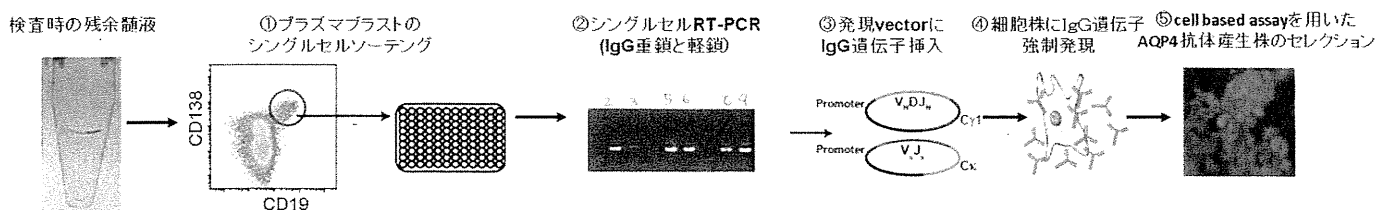
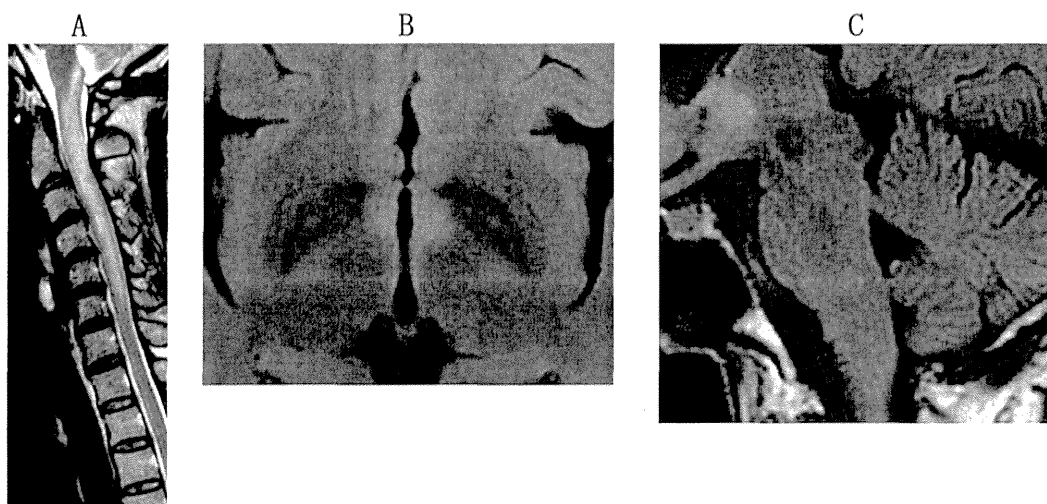
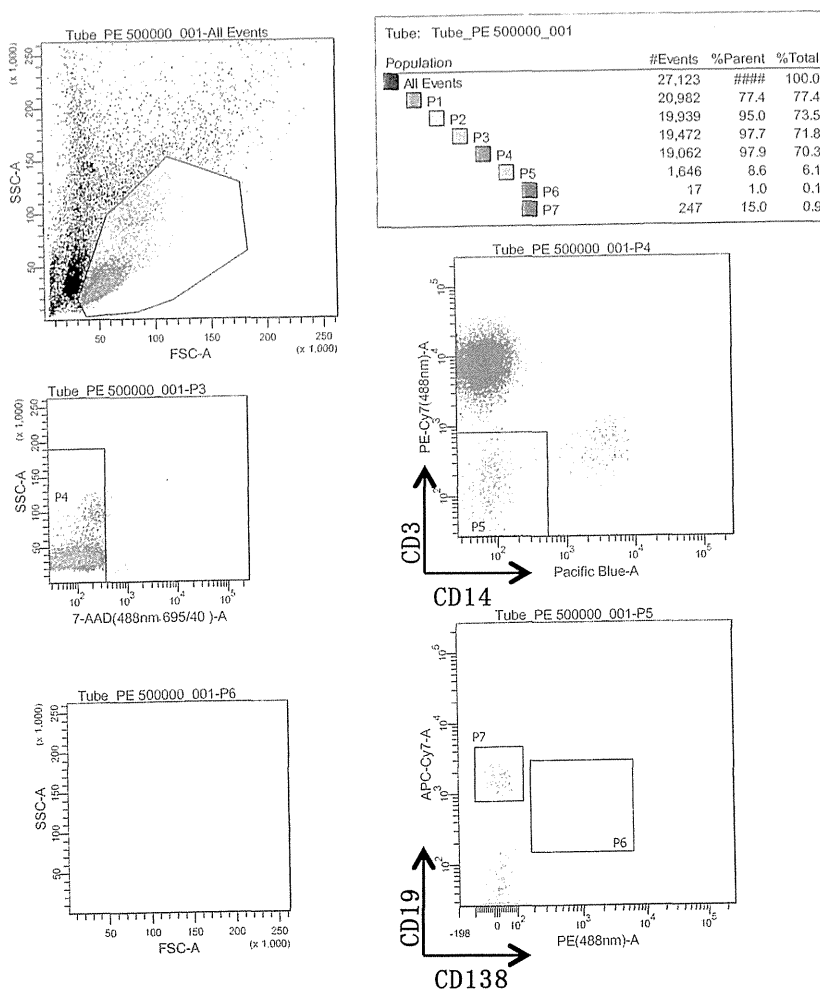


図1 発症時頸髄MRI及び再発時頭部MRI（1例目）



- A. 初発時には頸髄に長大病変が見られた（T2強調画像、矢状断）。  
 B, C. 再発時に第三脳室に病変が出現した（FLAIR、B:軸位断、C:矢状断）

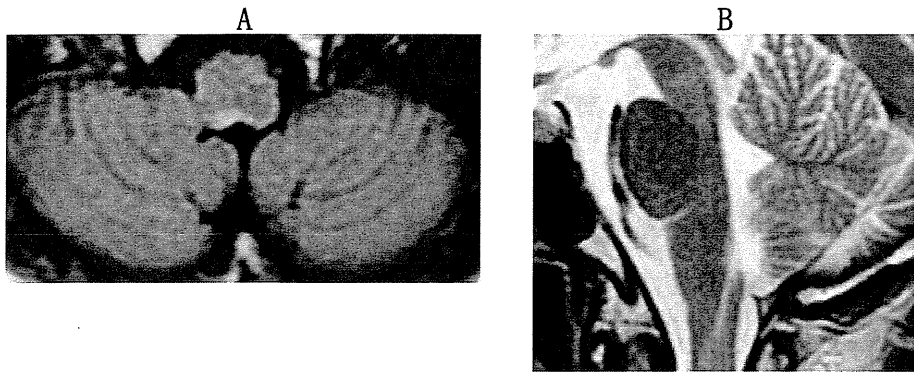
図2 再発時に採取した髄液細胞のフローサイトメトリーによる解析（1例目）



プラズマブラスト分画（P6, CD19+CD138+）は全体の0.1%である。

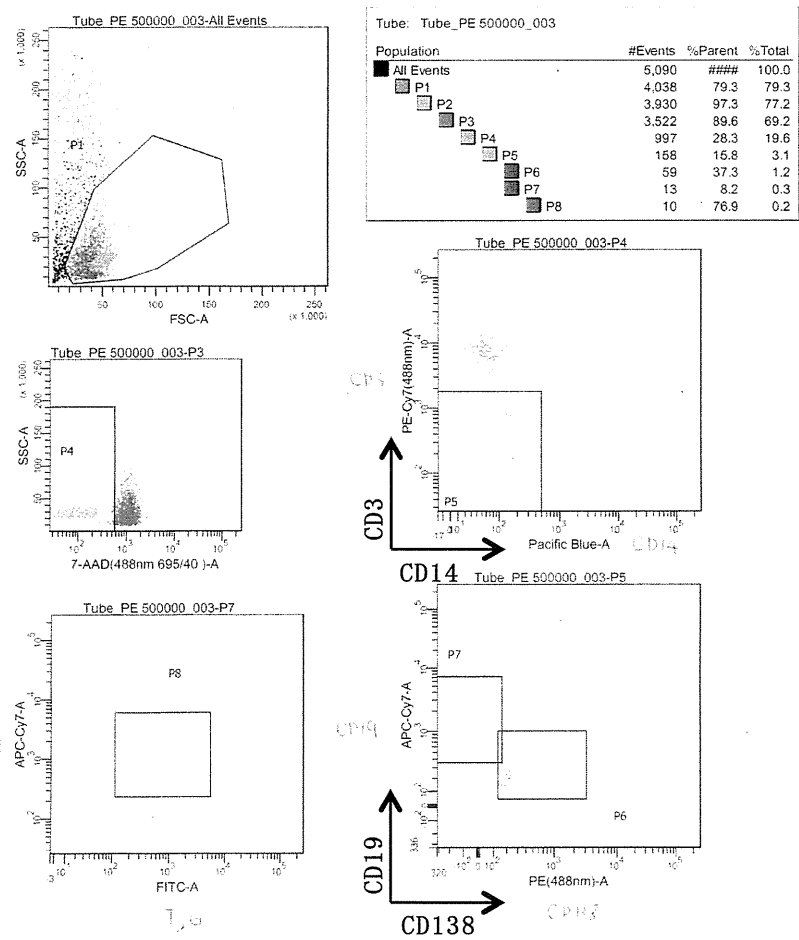


図3 難治性吃逆出現時頭部MRI（2例目）



A ; 延髄最後野に病変を認める（FLAIR、軸位断）。  
 B; 延髄背側部から脊髄に伸びる病変を認める（T2強調画像、矢状断）

図4 再発時に採取した髄液細胞のフローサイトメトリーによる解析（2例目）



プラズマブラスト分画（P6, CD19+CD138+）は全体の1.2%である

視神経脊髄炎動物モデル作成によるテーラーメイド治療の確立

担当責任者： 木下 允

（大阪府立急性期・総合医療センター 神経内科）

新たな NMO 動物モデル作成に向けた準備

（NMO 患者由来検体収集及び解析～新規病態関連因子 Sema4A の同定）

## 研究要旨

NMOは重篤な視神経炎と脊髄炎を主徴とする中枢神経炎症性疾患であるが、日本をはじめとする東アジアで頻度が高く、本邦で病態を解明して独自の治療戦略を立てていく必要がある。我々は、これまでに患者由来のAQP4抗体をMSのモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)にpassive transferすることで、NMOでみられるアストロサイト障害を再現した動物モデル作成に成功しているが、従来のモデルは最大の特徴である重篤な脊髄長大病変や視神経炎を再現できていないなどの問題点があり、有用な治療指針の策定や新規治療薬のスクリーニングが十分にできていなかった。そこで、本研究ではより実際の病態を反映したNMOモデルの確立と動物モデルを用いた新規治療薬の開発を目標としている。そのためには病原性の高いAQP4抗体を作成することに加え、新規の病態関連因子を同定し、動物モデルに応用していくことが必要である。これまでの研究で、我々はMS患者において免疫セマフォリンSema4Aが血清中で高値を示すことを見いだしているが、今年度の研究でNMOにおいてもMSと同様、Sema4Aが血中で増加することを明らかにした。Sema4AはT細胞活性化等を通じて、NMOの病態に関与している可能性が推定された。

## A. 研究目的

視神経脊髄炎 (NMO) は重篤な視神経炎と脊髄炎を主徴とする中枢神経炎症性疾患であり、アストロサイトに発現するアクアポリン4に対する自己抗体(AQP4抗体)が補体依存性に組織障害を来す重篤な疾患である。

我々は、患者由来のAQP4抗体をMSのモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)に移入することで、疾患モデル作成に成功しているが、従来のモデルではNMOの最大の特徴である重篤な脊髄長大病変や視神経炎を再現できていないなどの問題点があり、本研究ではより実際の病態を反映したNMOモデルの確立と動物モデルを用いた新規治療薬の開発を目指している。

一方で、MSおよびNMOはTh細胞が病態の中心的役割を担っているとの認識が近年確立しつ

つあり、我々はMS患者血清中ではセマフォリン分子の一つSema4AがMS患者血清中で増加し、Th細胞の活性化と関連していることを既に見出している。本研究ではNMO患者におけるセマフォリンの役割の解析を試みた。

## B. 研究方法

NMOモデル開発において根幹となる、NMO患者髄液サンプルは、大阪大学医学部附属病院神経内科より2例、また大阪府立・急性期総合医療センター神経内科より1例行った。同回収した髄液サンプルからは、プラズマブラストをシングルセルソーティングにより分離し、AQP4特異的抗体産生株を同定するためRT-PCR法により抗体遺伝子クローニングを行った。

さらに、NMO患者における血清セマフォリン

解析を行うため患者サンプルは、大阪大学医学部附属病院神経内科より18例、近畿大学医学部からは20例、大阪府立・急性期総合医療センター神経内科からは3例大阪大学に送付しサンドイッチELISA法にて解析を行った。同結果は、各臨床情報（年齢、症状、画像所見、自己抗体を含む血液検査結果、再発回数、EDSS）と比較検討している。またNMO患者におけるSema4A産生メカニズム解析を行うため、大阪大学医学部において末梢血中の血球におけるSema4Aの発現強度を各血球サブセットについてFACS解析した。

#### （倫理面への配慮）

NMOの余剰髄液、血清、及び血球を使用する研究は当該施設の倫理委員会にて承認されている。

### C. 研究結果

#### 1) NMO患者プラズマブラストを使用したNMO動物モデル作成

大阪大学医学部附属病院神経内科より2例、および大阪府立・急性期総合医療センター神経内科より1例、髄液中のプラズマブラストをFACSによりシングルセルソーティングを行った。また同サンプルよりAQP4特異的抗体産生株を同定するためRT-PCR法により分離された単一プラズマブラストの抗体遺伝子クローニングを施行した。今後は、各株がAQP4特異的抗体を産生しているか同定するため、AQP4強制発現HEK細胞を使用する予定であり、同HEK細胞の作成は既に終了している。

#### 2) NMO患者におけるセマフォリン分子の解析

各関連施設より回収した計41症例中、2007年WingerchuckのNMO spectrum disorder (NMOsd) 診断基準に合致する26症例血清Sema4Aの値をELISA法にて解析し、Sema4A高値群 (>2500U/ml) と低値群の臨床的特徴を検討した。その結果、NMOsd初発時には半数の症

例が血清Sema4A高値となることが分かった（図1）。さらに、Sema4A高値群では、抗SS-A、SS-B抗体の陽性率が高い傾向にあった。一方で、発症年齢・中枢神経内での初発部位には明らかな差が両群にて認められなかった。

既報告にて、MS患者ではCD11c、HLADR共陽性の単球・樹状細胞集団にSema4Aが発現していることが知られており、NMO患者PBMCにおいても今回のFACS解析にて、CD11cおよびHLADR共陽性の単球・樹状細胞に高発現していることが確認できた（図3）。一方で、CD4、CD8、CD19陽性のリンパ球集団におけるSema4Aの発現は低かった。

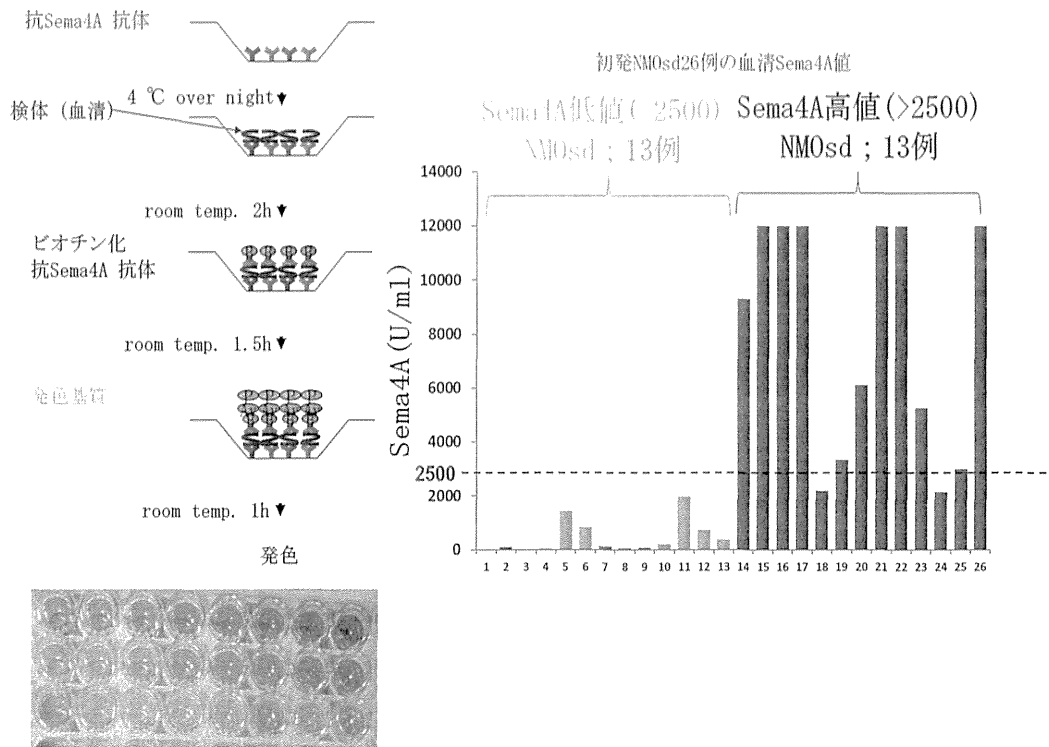
### D. 考察

NMO患者髄液からプラズマブラストのシングルセルソーティングを行うことで、各抗体特異的遺伝子クローニングを行うことが可能であった。本手法は、今後NMO動物モデル作成において非常に有用な手法であると考えられた。また、NMO患者において、末梢血単球/樹状細胞ではSema4Aの発現上昇がみられ、さらにNMO初発時に血清Sema4A高値となる傾向が今回の解析で明らかとなった。Sema4Aは元々T細胞活性化因子として同定された免疫セマフォリンであることから、NMO病態機序にSema4AがT細胞活性化を通じて関わっている可能性が示唆された。

### E. 結論

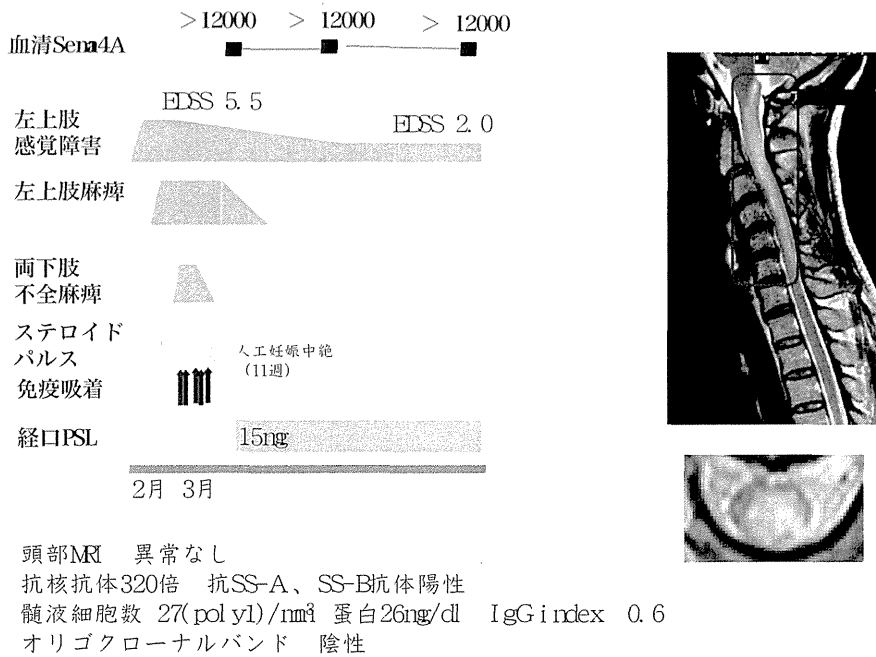
NMO患者より回収した髄液サンプルよりプラズマブラスト分離および抗体遺伝子クローニングは予定どおり進行しており、今後AQP4特異的抗体のスクリーニングを行い効率的な動物モデル作成を行う予定である。またNMO患者において、Sema4Aは初発時に高値となることが分かり、今後NMOにおけるその病態意義解析をすすめていく。

図 1. NMOsd 初発時における血清 Sema4A



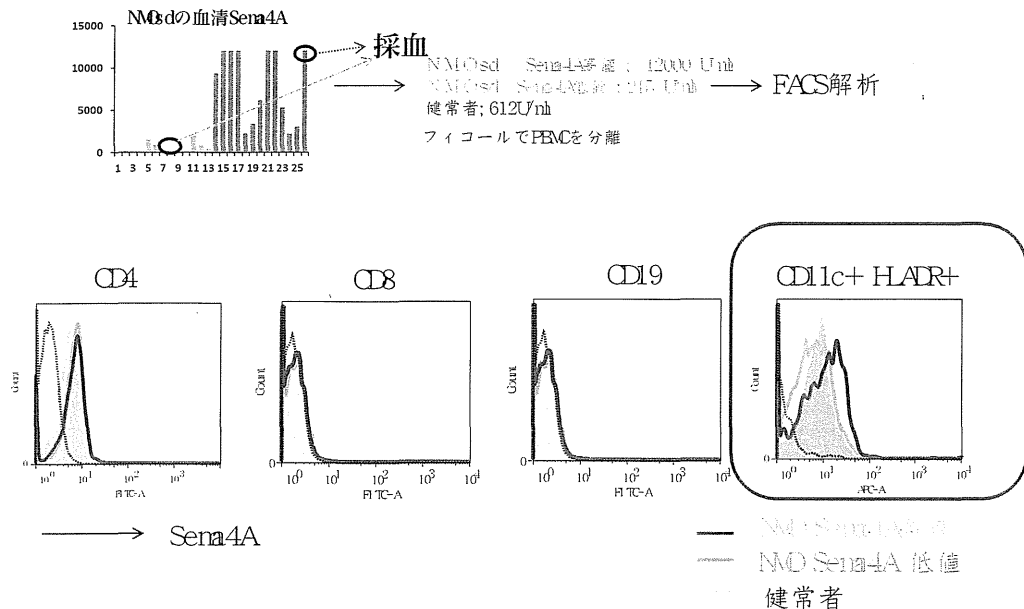
ELISA法を用いてNMO患者の初発時の血清Sema4Aを測定。血清Sema4A高値を半数例で認める。

図 2. Sema4A が発症時高値であった 35 歳女性



妊娠8週の35歳女性。血清Sema4A高値を示した。初発時、脊髓長大病変を示し重度の麻痺・感覚障害を認めた。

図 3. NMO 患者末梢血における Sema4A の発現



Sema4A高値及び低値NMO患者と健常者からそれぞれPBMCを採取しFACSを用いてSema4Aの発現を解析するとCD11c+ HLADR+の単球にてSema4Aの高発現が認められた。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takata K, Tomita T, Okuno T, Kinoshita M, Koda T, Honorat JA, Takei M, Hagihara K, Sugimoto T, Mochizuki H, Sakoda S, Nakatsuji Y. Dietary Yeasts Reduce Inflammation in Central Nerve System via Microflora. *Ann Clin Transl Neurol* 2015 2:56-66.
2. Koda T, Okuno T, Takata K, Honorat JA, Kinoshita M, Tada S, et al. Sema4A inhibits the therapeutic effect of IFN-beta in EAE. *Journal of neuroimmunology* 2014 268:43-9.
3. Kinoshita M, Takeda K. Microbial and dietary factors modulating intestinal

regulatory T cell homeostasis. *FEBS Letters*. 2014 588:4182-7.

### 2. 学会発表

1. Okuno T, Koda T, Miyamoto K, Takata T, Honorat JA, Kinoshita M, Tada S, Mochizuki H, Kusunoki S, Kumanogoh A and Nakatsuji Y. Elevation of serum Sema4A in neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOsd) *12th ISNI congress* 2014 Oct Germany

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

視神経脊髄炎動物モデル作成によるテーラーメイド治療の確立

担当責任者：宮本 勝一

新たな NMO 動物モデル作成に向けた準備及び既存モデルを用いた NMO 治療開発  
NMO 患者由来検体収集及び解析～抗神経髄鞘抗体の検討

### 研究要旨

NMO は重篤な視神経炎と脊髄炎を主徴とする中枢神経炎症性疾患であるが、日本をはじめとする東アジアで頻度が高く、本邦で病態を解明して独自の治療戦略を立てていく必要がある。NMO の重症度や治療反応性を予測するバイオマーカーは存在せず、その開発は治療戦略を立てる上で重要である。

中枢性神経免疫疾患の血清や脳脊髄液において神経髄鞘に対する抗体が検出されることがある。これまで、血清中抗 MOG 抗体、抗 PLP 抗体、抗 MBP 抗体などの抗体と臨床症状との関連が報告されているが、一定の見解は得られていない。本研究では、近畿大学医学部附属病院にて診療を行なった視神経脊髄炎（NMO）患者 30 例、およびコントロール症例に対して、これらの抗神経髄鞘抗体を ELISA 法にて測定した。血清抗神経髄鞘抗体陽性 NMO 患者は 5 例で、いずれも再発を繰り返す EDSS4.5 を超える重症例であった。NMO 患者において、血清抗 MOG 抗体 IgG、抗 PLP 抗体 IgG、抗 MBP 抗体 IgG 抗体価と重症度（EDSS）が相関した。本結果より、血清抗神経髄鞘抗体価が神経傷害の程度を反映している可能性があり、NMO 重症度の指標となる可能性がある。

### A. 研究目的

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) や視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica: NMO) において、血清および脳脊髄液にて神経髄鞘に対する抗体が検出されることがあり、病態との関連が指摘されている。血清中抗 MOG 抗体、抗 PLP 抗体、抗 MBP 抗体などは脱髄や再発頻度との関連が報告されており、NMO では健常者に比べ抗体陽性者の頻度が高いことが報告されている (Reindl M et al. Brain 1999, Bergaer T et al. N Engl J Med 2003 等)。また、抗 MOG 抗体は、抗 AQP4 抗体陰性 NMO で陽性になる患者群が存在し、急性散在性脳脊髄炎との関連についても議論されている (Mader S et al. J Neuroinflammation

2011)。

しかしながら、これらの抗体の存在意義について明確な結論に達しているとは言えず、さらなる解析が求められている。本研究では、NMO における抗神経髄鞘抗体と臨床症状や各検査所見との関連について検証した。

### B. 研究方法

対象患者は、近畿大学医学部附属病院にて診療を行なった NMO 患者 30 例と、コントロールとして、MS 30 例、他神経免疫疾患 30 例、正常対照 30 例について、症状ピーク時の血清中の抗体価を ELISA 法にて測定した。抗原は MBP 83-99、PLP183-199、MOG35-55 の各ペプチドを用い、正常対照の OD 値 +3SD 以上を

陽性とした。抗 AQP4 抗体、および B cell activating factor (BAFF) は検査会社の ELISA 法にて測定した。NMO 患者血清の一部は大阪大学に送付し Sema4A を測定すると共に既存モデル作成に用いられた。

#### (倫理面への配慮)

本研究は近畿大学医学部の倫理委員会にて承認されている。

### C. 研究結果

NMO 5 例、MS 1 例で抗神経髄鞘抗体が陽性であった。他神経免疫疾患やコントロールはすべて陰性であった。NMO の抗髄鞘抗体陽性例は、髄液細胞数が多く、抗 AQP4 抗体以外の自己抗体陽性数も多かった (表 1)。NMO の陽性抗体の内訳は、抗 MOG 抗体 IgM と抗 PLP 抗体 IgM であったが、5 例とも再発を繰り返す女性患者で、EDSS は 4.5 を超えていた (表 2)。また NMO では、血清抗 MOG 抗体 IgG、抗 PLP 抗体 IgG、抗 MBP 抗体 IgG 抗体価と臨床症状 (EDSS) が正の相関を示した (図 1)。抗 MOG 抗体陽性例は、視神経炎再発時に陽性になる傾向があった (図 2)。抗 AQP4 抗体価や BAFF と抗神経髄鞘抗体価に相関性はみられなかった。

### D. 考察

NMO は抗 AQP4 抗体が関与する液性免疫主体の

疾患である。AQP4 が豊富に存在するアストロサイトの傷害を介して結果的に脱髄を生じるとされており、その過程において抗神経髄鞘抗体が上昇するものと考えられる。本研究では重症度と抗神経髄鞘抗体価が相関していたことから、同抗体価が神経傷害の程度を反映し、NMO の重症度の指標となる可能性がある。また、抗 MOG 抗体は視神経炎再発時に陽性になる傾向があったことから、視神経炎と関係する可能性がある。これは、MOG\_TCR tg マウスは視神経炎を自然発症するという研究 (Bettelli E et al. J Exp Med 2003) や、Cell-based assay (CBA) による抗 MOG 抗体測定結果 (Sato DK et al. *Neurology* 2014) など、これまでの報告と同様の結果である。本研究では ELISA 法にて測定したが、CBA による測定法との感度差については検討する必要がある。

### E. 結論

簡便な ELISA 法による抗神経髄鞘抗体測定によって、NMO の重症度を予測できる可能性がある。

今後のさらなる検討が必要である。

表 1 抗 MOG 抗体陽性例と陰性例の比較

	抗体陽性 (n=5)	抗体陰性 (n=25)
年齢	42.0±14	53.0±17
男女比	0:5	2:13
脳病変	80%	64%
重度視神経炎	40%	32%
長大脊髄炎	40%	64%
髄液細胞数	270±282	75±149
髄液IgG	8.9±4.8	9.4±6.1
EDSS	6.8±1.4	5.1±3.0
再発回数(年)	1.86±0.77	1.72±1.28
陽性自己抗体数	2.80±1.60	0.50±0.96

表 2 抗 MOG 抗体陽性 NMO

患者	年齢/性別	診断	EDSS	IgM	IgG
1	20/F	NMO	6	MOG, PLP	negative
2	60/F	NMO overlapping APS	7	MOG, PLP, MBP	negative
3	52/F	NMO	8.5	negative	MOG, PLP, MBP
4	48/F	NMO	8	negative	PLP, MBP
5	32/F	NMO	4.5	MOG	negative

図 1 抗神経髄鞘抗体価と EDSS

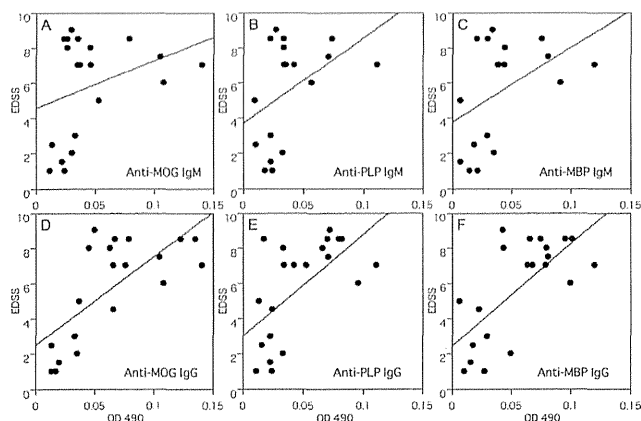
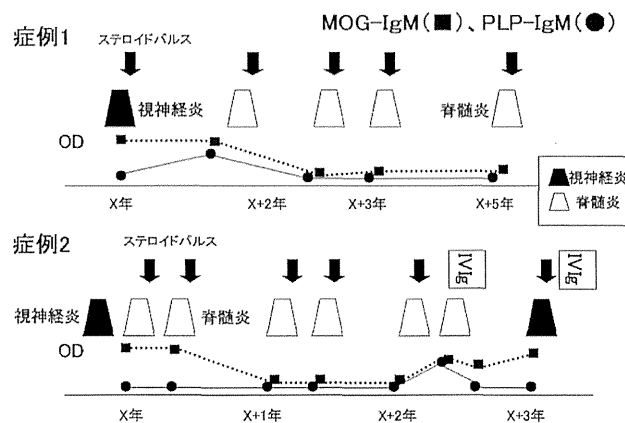


図 2 抗神経髄鞘抗体価の推移



F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyamoto K, Tanaka N, Moriguchi K, Ueno R, Kadomatsu K, Kitagawa H, Kusunoki S. Chondroitin 6-O-sulfate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glycobiology*. 2014 24: 469-75.

2. Araki M, Matsuoka T, Miyamoto K, Kusunoki S, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Aranami T, Yamamura T. Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica. *Neurology*. 2014 82:1302-6.

3. 宮本勝一. 視神経脊髄炎の最近の話題. *日本臨床免疫学会会誌* 2014 37:468-74.

4. 宮本勝一. 多発性硬化症・視神経脊髄炎の疫学. 特集 多発性硬化症と視神経脊髄



- 炎. *日本臨牀* (日本臨牀社) 2014 72:1903-8.
5. 宮本勝一. C5:エクリズマブ. 特集 分子を撃つ. 神経疾患治療の新しい水平線. *Brain and Nerve*. 2014 66:1191-9.
6. 宮本勝一. 対症療法. 多発性硬化症のパラダイムシフト. *Clinical Neuroscience* (中外医学社) 2014 32:1296-8.
7. 宮本勝一, 高田和男, 三井良之, 楠 進. 痙性疼痛治療と理学療法のバランスに苦慮した多発性硬化症. *神経治療学* 2014 31: 659.
8. 寒川真, 山岸裕子, 加藤茉里, 桑原基, 宮本勝一, 楠 進. 妊娠期の視神経脊髄炎関連疾患 2 例の治療経験. *神経治療学* 2014 31: 659.
9. 景山卓, 宮本勝一, 尾崎彰彦, 近藤誉之, 奥宮太郎, 神辺大輔, 末長敏彦. Cyclosporin A による視神経脊髄炎の再発予防効果の検討 続報. *神経免疫学* 2014 19: 163.
10. 上野莉乃, 宮本勝一, 森口幸太, 門松健治, 楠 進. 実験的脳脊髄炎の病態におけるプロテオグリカンの検討. *神経免疫学* 2014 19:153.
11. 宮本勝一, 上野莉乃, 森口幸太, 義江修, 楠 進. ケモカイン受容体 CCR4 阻害薬を用いた実験的自己免疫性脳脊髄炎の治療. *神経免疫学* 2014 19:122.

## 2. 学会発表

1. Miyamoto K, Saigo K, Kadomatsu K, Kitagawa H, Kusunoki S. Proteoglycan and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *International Symposium on Glyco-Neuroscience. Jan.* 2014, Awaji, Japan.
2. Miyamoto K, Ueno R, Kadomatsu K, Kitagawa H, Kusunoki S. Chondroitin 6-O-sulfate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *2014 Joint ACTRIMS-ECTRIMS Meeting.* 2014 Sep, Boston, USA
3. Ueno R, Miyamoto K, Moriguchi K, Kadomatsu K, Kusunoki S. Role of proteoglycan in experimental autoimmune encephalomyelitis. *139th Annual Meeting American Neurological Association.* 2014 Oct. Baltimore, USA.
4. Miyamoto K, Ueno R, Moriguchi K, Tanaka N, Yoshie O, Kusunoki S. Chemokine receptor blockade for the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *第55回 日本神経学会学術大会.* 2014年 福岡

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）

平成 26 年度 委託業務成果報告書（業務項目）

視神経脊髄炎動物モデル作成によるテーラーメイド治療の確立

担当責任者 望月 秀樹

（大阪大学医学系研究科 神経内科学 教授）

研究協力者 甲田 亨

（大阪大学医学系研究科 神経内科学 医員）

マウスへの患者由来血球トランスファーによるNMOモデル作成準備

## 研究要旨

NMOは重篤な視神経炎と脊髄炎を主徴とする中枢神経炎症性疾患であるが、日本をはじめとする東アジアで頻度が高く、本邦で病態を解明して独自の治療戦略を立てていく必要がある。これまでの研究でAQP4抗体をMSのモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)に移入するパッシブトランスファーモデルや脳内へのAQP4抗体注入モデルが作成され、補体依存性あるいは抗体依存性細胞障害によるアストロサイト障害がNMO病態に重要な役割を果たすことが明らかになった。同モデルはこれまでのNMOの治療開発に大きく寄与しているが、NMO患者の免疫吸着後のカラムからのIgG精製を要する。本年度は使用済みカラムを集め、IgG精製を行って十分なNMOモデルが作成できるように準備を行った。

NMO では AQP 4 抗体が重要な役割を果たすが、AQP4 反応性 T 細胞も NMO の病巣の炎症環境を作り出すのに大きく寄与することが報告されている。実際ラットにおいてはAQP4 反応性 T 細胞は astrocytic glia limitans に炎症を起こすことが報告されている。したがって患者由来の AQP4 反応性 T 細胞セルラインを樹立し、動物モデル作りに応用していく必要がある。今年度はセルラインを作るための末梢血単核球を集めた。

## A. 研究目的

視神経脊髄炎（NMO）は重篤な視神経炎と脊髄炎を主徴とする中枢神経炎症性疾患である。重篤であるのが特徴

であり、病態の解明と治療の開発が切望されている。NMOは本邦で頻度が高くMSとは病態も治療反応性も異なる

疾患であるため、本邦で独自の治療戦略を立てていく必要がある。

これまでの研究でAQP4抗体を EAE に移入するパッシブトランスファーモデルや脳内へのAQP4抗体注入モデルが作成されてきて病態解明や治療法確立に寄与してきた。本研究ではこれらのモデルを用いて新たな治療ターゲットを検討するとともに、動物モデルの改良の為に、AQP4反応性T細胞セルラインを作成することを目的としている。

#### B, C, D. 研究方法, 結果及び考察

NMO モデルを作成するには多量の IgG を NMO 患者の免疫吸着後のカラムから精製する必要がある。今年度は大阪大学医学部附属病院に入院した患者に使用したカラム (TR350) から IgG を 1M NaCl バッファーで IgG を溶出し、脱塩後、Hitrap Protein G Column で再度吸着した。吸着した IgG は 1M glycine HCl バッファー (PH2.7) で溶出し 1M Tris Hcl で中和し、再び脱塩処理を行い精製した。

T細胞のライン化にはAQP4ペプチドが必要であるが、AQP4のエピトープはまだ完全に明らかになっていないため、ヒトAQP4の配列をソフトウェアで分析し、11種類のペプチドを作成した (図1及び表1)。また同意を得た上で10例の患者由来PBMCを凍結した。

また同意を得た上で NM010 例、MS20 例、健常者 10 例の患者由来血液にヘパリン添加を行い、フィコール分離を行って、末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) を分離した。PBMC は (Hanks' Balanced Salt solution, HBSS) で洗浄後セルバーカーに懸濁し、凍結保存した。凍結した PBMC は一度解凍して PMA+ionomycin あるいは CpgDNA+抗 CD40 抗体で刺激し、IFN- $\gamma$ 、IL-4, IL-10 などのサイトカインを凍結する前の PBMC と同様に産生することを確認した。

#### (倫理面への配慮)

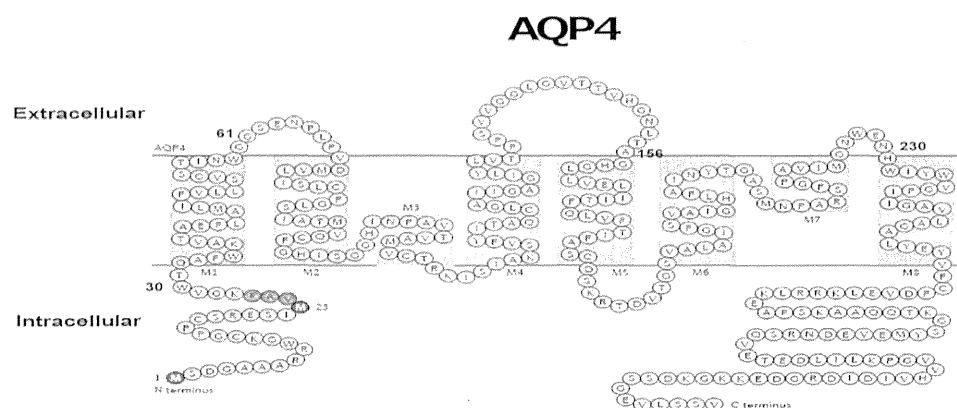
NMO の使用済みカラム、及び血球を使用する研究は当該施設の倫理委員会にて承認されている。

#### E. 結論

十分な量の NMO 患者由来 IgG を精製した。今後パッシブトランスファーや脳内注入を行うことにより、NMO モデルを作成し、Sema4A をはじめとする病態関連因子や、新規治療ターゲットを標的とした治療実験を行っていく予定である。

患者由来PBMCを凍結融解してもB細胞やT細胞に大きな変化は見られなかった。今後凍結保存した患者及び健常者由来PBMCを用いてAQP4反応性T細胞ラインを作成していく。

図 1. アクアポリン 4 (AQP4) の構造



Papadopoulos et al. Nature Review Neuroscience 2013

AQP4 は 8 回膜貫通蛋白で M21 と M23 の 2 つの isoform が存在する

表 1. 作成した AQP4 ペプチド配列

ペプチド	配列
hAQP4 23-37	MVAFKGVWTQAFWKA
hAQP4 31-47	TQAFWKAVTAEFLAMLI
hAQP4 45-60	MLIFVLLSLGSTINWG
hAQP4 60-80	GGTEKPLPVDMLISLCFGLS
hAQP4 104-124	MVCTRKI SIAKSVFYIA AQCL
hAQP4 125-135	GAIIGAGILYL
hAQP4 131-140	GILYLVTPPS
hAQP4 135-160	LVTPPSVVGGGLGVTMVHGNLTAGHGL
hAQP4 161-175	LVELIITFQLVFTIF
hAQP4 211-230	SMNPARSFGPAVIMGNWENH
hAQP4 261-280	RFKEAFSKAAQQTKGSYMEV

ヒト AQP4 の配列をソフトウェアで分析し上記 11 種類のペプチドを合成した。