

## 血液脳関門に注目した多発性硬化症の新規バイオマーカーの探索

班 員 神田 隆

共同研究者 清水文崇, 竹下幸男, 門野ちひろ, 佐野泰照, 前田敏彦

山口大学大学院 医学系研究科 神経内科

### 【研究要旨】

多発性硬化症 (Multiple sclerosis: MS)では, 血液神経関門 (blood-brain barrier: BBB)の破綻が病態を惹起する重要な初期変化となる。本研究では, 個々の MS 患者由来 IgG が BBB 構成内皮細胞とアストロサイトに対して生物学的活性を及ぼすかを, NF- B p65 免疫染色をベースとしたハイコンテンツイメージングシステムと 10kDa-デキストラン透過性アッセイを用いて検討した。(1) BBB 血管内皮に急性期/進行型 MS 患者血清由来 IgG を作用させる, (2) アストロサイトに急性期/進行型 MS の髄液由来 IgG を作用させると, 有意な NF- B p65 核内移行の増加が確認できた。これらの自己抗体の対応抗原を同定することで, MS の新規診断マーカーや新規治療につながる可能性が考えられた。

### 【背景・目的】

多発性硬化症 (Multiple sclerosis: MS)では獲得免疫と自然免疫の両者が複雑に絡みあっていると考えられる<sup>1)</sup>。MS の病態を反映する新規バイオマーカーが確立できれば, 患者に病態にあった治療薬選択が可能となる。

血液脳関門(blood-brain barrier: BBB)の破綻は再発寛解型 MS, 進行型 MS の両者で病理学的に認められる。BBB は内皮細胞, ペリサイト, アストロサイトの 3 つの細胞から構成され, 中枢神経内の恒常性を維持している。BBB の破綻は流血中の未知の中枢神経系細胞に対する自己抗体や炎症性サイトカインなどの液性因子の中枢神経内流入を促進させ, 進行型 MS での中枢神経内の自然免疫破綻を惹起する重要な要因となりうる。

MS では髄液中の免疫グロブリン G (IgG) index が上昇し, オリゴクローナルIgG バンド

が検出されることが知られており, 髄腔内で IgG 産生が増加することが示唆されている。更に近年 B 細胞に対するモノクローナル抗体が MS 治療に有効であることも報告されており, 液性因子の病態への関与が注目されている。本研究では, MS では液性因子による BBB 破綻が MS 病態の上流にあると考え, BBB を破綻させる新規自己抗体を同定することを目的とする。まず個々の患者由来 IgG が BBB 構成内皮細胞・アストロサイトに対して生物学的活性を及ぼすかを, NF- B p65 免疫染色をベースとしたハイコンテンツイメージングシステムを用いて検討した。次に我々がこれまでに同定した視神経脊髄炎での BBB を破綻させる自己抗体である GRP78 抗体<sup>2)</sup>が MS 患者から同定されるかを検討した。

### 【研究方法】

当科で樹立した BBB 構成内皮不死化細胞

1) 山口大学神経内科

株 (TY10) とアストロサイト (AST) を用いた MS 患者と健常成人の血清と髄液から IgG を精製し TY10, AST に作用させ, NF- B p65 の核内移行率をハイコンテンツイメージングシステムを用いて定量化した. 急性期 MS 患者 9 例, 二次進行性 MS 患者 14 例, 安定期 MS 患者 15 例, 健常成人 10 例, 疾患コントロール 11 例を用いた. 次に, 96 ウェルプレートに細胞を均一に培養し, 患者 IgG, あるいは健常成人 IgG を作用させた後に細胞を固定し, NF- B p65 の免疫染色をおこなった. In cell analyzer 2000 (GE ヘルスケア) を用いて, それぞれのウェルごとに約 1000 細胞以上をカウントし NF- B p65 核内移行のパーセンテージを定量化した. 併せて血清採取時の患者情報を収集した. 患者血清から GRP78 抗体が検出されるかを, リコンビナント蛋白を電気泳動し患者血清を 1 次抗体, 抗ヒト IgG を 2 次抗体としてウェスタンブロット法を用いて検討した.

(倫理面への配慮)

患者由来 IgG を使用するに当たり, 山口大学医学部倫理委員会による承認を得た. 個人が特定できないようにサンプルを匿名化し, プライバシーの保護に配慮した.

#### 【研究結果】

二次進行性 MS 患者血清から精製した IgG を作用させると安定期 MS 患者群, 健常者群と比べて BBB 構成内皮細胞とアストロサイトの NF- B p65 核内移行率が有意に高かった. 二次進行性 MS 患者髄液から精製した IgG を作用させると BBB 構成内皮細胞とアストロサイトの NF- B 核内移行率が増加した. 急性期 MS 患者群では健常者と比べて, 血清 IgG では BBB 血管構成細胞, 髄液 IgG ではアストロサイトの NF- B p65 核内移行率に有意な変化を認めた. GRP78 抗体は MS 37 例中

6 例(16%)で陽性であった.

#### 【考察】

二次進行性 MS 患者からの IgG は BBB 血管構成細胞とアストロサイトを活性化させ, 生物学的活性があることが示された. 現在, 免疫沈降法とプロテオーム解析を応用した「living cell based antibody binding assay」を用いて, BBB 構成内皮細胞に結合する MS 患者の自己抗体の標的分子を同定している. 併せて RNA 次世代シーケンスを用いて, MS 患者自己抗体が BBB 構成内皮細胞に及ぼす下流のシグナル変化を網羅的に解析する予定である.

#### 【結論】

二次進行性 MS 患者 IgG は BBB 構成内皮細胞とアストロサイトに生物学的活性があることが明らかとなった. この IgG が結合する標的分子を同定することで二次進行性 MS への進展を予測する新たなバイオマーカーの探索や新規治療法へ向けた標的分子の同定に利用できる.

#### 【文献】

1. Lassmann H et al. Nat Rev Neurol 2012; 8: 647-56.
2. Shimizu F et al. Sci Transl Med 2017; 9 (397): pii: eaai9111

#### 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