

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業
(英語) Research Project for Rare/Intractable Diseases

研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Establishment of tailor-made medicine by creating animal model of Neuromyelitis Optica (NMO)

研究開発担当者 (日本語) 大阪大学大学院医学系研究科・教授・熊ノ郷 淳
所属 役職 氏名： (英語) Osaka University Graduate School of Medicine, Professor, Atsushi Kumanogoh

実施期間： 27年 4月 1日 ～ 平成 28年 3月 31日

分担研究 (日本語) NMO 患者髄液からの AQP4 抗体遺伝子クローニング及び AQP4 抗体作成
開発課題名： (英語) Cloning of genes encoding AQP4 antibody and synthesis of monoclonal AQP4 antibodies

研究開発担当者 (日本語) 大阪大学大学院医学系研究科・教授・熊ノ郷 淳
所属 役職 氏名： (英語) Osaka University Graduate School of Medicine, Professor, Atsushi Kumanogoh

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学大学院医学系研究科・助教・奥野龍禎
所属 役職 氏名： (英語) Osaka University Graduate School of Medicine, Assistant Professor, Tatsusada Okuno

- 分担研究 (日本語) AQP4 抗体産生細胞株樹立及び NMO 患者由来リンパ球のライン化
開発課題名: (英語) Establishment of cell lines producing AQP4 antibody and CD4+ T-cell lines reactive to AQP4
- 研究開発分担者 (日本語) 大阪大学大学院医学系研究科・准教授・中辻裕司
所属 役職 氏名: (英語) Osaka University Graduate School of Medicine, Associate Professor, Yuji Nakatsuji
- 研究開発分担者 (日本語) 大阪大学大学院医学系研究科・教授・望月秀樹
所属 役職 氏名: (英語) Osaka University Graduate School of Medicine, Professor, Hideki Mochizuki
- 分担研究 (日本語) AQP 抗体投与による NMO 動物モデル作成
開発課題名: (英語) NMO animal model induced by administration of AQP4 antibody
- 研究開発分担者 (日本語) 大阪大学大学院医学系研究科・教授・望月秀樹
所属 役職 氏名: (英語) Osaka University Graduate School of Medicine, Professor, Hideki Mochizuki
- 分担研究 (日本語) 新規標的分子の同定
開発課題名: (英語) Identification of novel target molecules in the pathogenesis of NMO
- 研究開発分担者 (日本語) 近畿大学医学部・准教授・宮本勝一
所属 役職 氏名: (英語) Kinki University, School of Medicine, Associate Professor, Katsuichi Miyamoto
- 研究開発分担者 (日本語) 大阪府立急性期総合医療センター・医長・木下允
所属 役職 氏名: (英語) Osaka Genera Medical Center, head physician, Makoto Kinoshita

II. 成果の概要 (総括研究報告)

視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica; NMO) は繰り返す視神経炎と脊髄炎及び抗アクアポリン4 (AQP4) 抗体の出現を特徴とする中枢神経炎症性疾患である。極めて重篤であり、視神経炎でしばしば失明に至る上に3椎体以上に渡る長大な脊髄病変が頻発するため、一度の急性増悪で重篤な後遺症が残ることが多い。欧米に比しわが国に多く、平均発症年齢が約40歳であるため、大きな社会的損失の原因となっている。現在増悪期にはステロイドパルス療法や血液浄化療法、再発予防には経ロステロイドや免疫抑制剤が用いられているが、不十分であり、強力な治療の開発が切望されてきた。

NMO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。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。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と同時に新たな病態関連因子を同定し、治療法開発につなげることを目的としている。具体的には①NMO患者髄液からのAQP4抗体遺伝子クローニング ②リコンビナントAQP4抗体作成 ③NMO動物モデルでの治療ターゲット検討 ④新規標的分子同定を行った。

①に関しては研究期間を通じて述べ6人の患者の髄液からプラズマブラストのシングルセルクローニングを行ったが、そのうち2人からAQP4抗体遺伝子をクローニングできた。②に関してはNMO 2症例のAQP4抗体遺伝子を培養細胞に強制発現させてリコンビナントタンパク合成を行い、合計4クローンのAQP4抗体を作成した。③に関しては自然免疫系の治療標的としての可能性について、従来のパッシブトランスファーモデルを用いて検討を行い、NMO急性期においてインフラマゾームが治療標的になりうることを明らかにした。④に関してはSema4AがNMO患者の血液中で増加してヘルパーT細胞の活性化を介して病態と関係していること、mTORシグナルが炎症制御に重要な役割を果たすこと、glutamate oxaloacetate transaminase 2 (GOT2) が実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の脊髄神経細胞中で減少し、同モデルやMS/NMOのミトコンドリア障害に関与している可能性を見出した。

Neuromyelitis optica (NMO) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system caused by autoantibodies against the astrocyte water channel aquaporin 4 (AQP4-Ab). It predominantly affects spinal cord and optic nerves, characterized by the longitudinally extensive transverse myelitis extending three or more vertebral segments and severe optic neuritis with poor visual recovery. A majority of the patients with NMO has a relapsing progressive course, resulting in severe neurological disability including blindness and paralysis. Patients with NMO are distributed predominantly in Asian rather than in Western countries, and the median age of onset is 40 years. Therefore, it has become a problem that the physical disability causes substantial social loss in our country.

Acute relapse in NMO are treated with high-dose intravenous corticosteroids and plasmapheresis. As for relapse prevention, oral corticosteroids and immunosuppressive agents are used. However, despite use of these treatments, attacks and disease progression still occur. These problems make it urgent to develop novel and effective therapies.

Experimental animal models of NMO have provided a substantial contribution to understanding the pathogenic mechanisms and developing effective treatments. We established an animal model by passive transfer of NMO-IgG from patient serum into rats with experimental autoimmune encephalomyelitis, demonstrating the pathogenicity of AQP4-Ab. Furthermore, we reported that activation of complement-dependent pathway causes astrocytic necrosis. Therefore, AQP4-Ab and

complement-dependent cytotoxicity were established as targets for the treatment of NMO. In our study, we aim to improve the animal model closer to NMO pathomechanism, identify a novel pathogenic-related factor, and develop novel treatments. Specifically, it is as follows: (1) identifying DNA sequences of AQP4-Ab in plasmablast from cerebrospinal fluid of NMO patients by single-cell PCR, (2) generating recombinant AQP4-Ab, (3) investigating therapeutic targets based on animal models, (4) identifying novel biomarkers.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 2 件）

1. KIMURA T, NADA S, TAEGAHARA N, OKUNO T, NOJIMA S, KANG S, ITO D, MORIMOTO K, HOSOKAWA T, HAYAMA Y, MITSUI Y, SAKURAI N, SARASHINA KIDA H, NISHIDE M, MAEDA Y, TAKAMATSU H, OKUZAKI D, YAMADA M, OKADA M, KUMANOGOH A. Polarization of M2 macrophages requires Lamtor1 that integrates cytokine and amino-acid signals. Nat Commun. 2016, 7, 13130.
2. MORIMOTO K, BABA Y, SHINOHARA H, KANG S, NOJIMA S, KIMURA T, ITO D, YOSHIDA Y, MAEDA Y, SARASHINA-KIDA H, NISHIDE M, HOSOKAWA T, KATO Y, HAYAMA Y, KINEHARA Y, OKUNO T, TAKAMATSU H, HIRANO T, SHIMA Y, NARAZAKI M, KUROSAKI T, TOYOFUKU T, KUMANOGOH A. LRRK1 is critical in the regulation of B-cell responses and CARMA1-dependent NF- κ B activation. Sci Rep. 2016, 6, 25738.
3. 山下和哉, 奥野龍禎. 視神経脊髄炎. 日本アフェレシス学会雑誌. 2017;36:14-17

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

国内学会

1. 多発性硬化症患者における血清 Sema4A 値高値群の臨床的特徴. ポスター. 南波明子, 山下和哉, 甲田亨, 奥野龍禎, 熊ノ郷淳, 中辻裕司, 望月秀樹. 2016/5/19. 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016/5/19, 神戸.
2. The effect of aquaporin 4 antibody on the release of mitochondrial DNA. ポスター. KAZUYA YAMASHITA, AKIKO NAMBA, TORU KODA, TATSUSADA OKUNO, MAKOTO KINOSHITA, KATSUICHI MIYAMOTO, SUSUMU KUSUNOKI, YUJI NAKATSUJI, HIDEKI MOCHIZUKI. 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016/5/19, 神戸

3. 多発性硬化症患者における血清 Sema4A 高値群の臨床的特徴と、IFN-β 開始後 5 年間の NEDA 達成率. 口頭. 南波明子, 奥野龍禎, 甲田亨, 宮崎雄生, 新野正明, 宮本勝一, 楠進, 熊ノ郷淳, 中辻裕司, 望月秀樹. 第 28 回日本神経免疫学会学術集会, 2016/9/29, 長崎.
4. NMOSD 急性期においてミトコンドリア DNA は髄液中に増加しインフラマソームを活性化する. 口頭. 山下和哉, 奥野龍禎, 木下允, 宮本勝一, 楠進, 清水幹人, 南波明子, 中辻裕司, 望月秀樹. 第 28 回日本神経免疫学会学術集会, 2016/9/29-9/30, 長崎.
5. コハク酸はミトコンドリアストレスを介して多発性硬化症動物モデルを悪化させる. 口頭. 奥野龍禎, 高田和城, 山下和哉, 甲田亨, 望月秀樹, 中辻裕司. 第 28 回日本神経免疫学会学術集会, 2016/9/29-9/30, 長崎.
6. フェブキソスタットは神経細胞のミトコンドリア機能を回復し二次進行型 EAE を緩和する. ポスター, 清水幹人, J.A.Honorat, 奥野龍禎, 木下允, 高田和城, 甲田亨, 白倉尚, 田村みずほ, 中辻裕司, 望月秀樹. 第 28 回日本神経免疫学会学術集会, 2016/9/29-9/30, 長崎.

国際内学会

1. Elevation of serum Sema4A in neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD). KAORI SAKAKIBARA, TATSUSADA OKUNO, YUJI NAKATSUJI, HIDEKI MOCHIZUKI, ATSUSHI KUMANOGOH. 16th International Congress of Immunology. 2016/8/21-8/26, Melbourne, Australia.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 日本の免疫研究 熊ノ郷淳 駿台予備校広島校 2016年10月2日 国内

(4) 特許出願