

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) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) 抗 Neurofascin155 抗体関連中枢・末梢神経障害症候群 (CCPD/CIDP) の診療ガイドライン作成のための定量的抗体測定法の開発と基盤エビデンスの構築
(英語) Development of a quantitative measuring system to detect anti-neurofascin 155 antibodies and accumulation of evidence about anti-neurofascin 155 antibody-associated inflammatory demyelinating diseases
- 研究開発担当者 (日本語) 大学院医学研究院神経内科学 教授 吉良 潤一
所属 役職 氏名： (英語) Jun-ichi Kira, Professor, Department of Neurology, Neurological Institute Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 高精度で、簡易な検査法の確立 (ELISA 法の確立)
開発課題名： (英語) Development of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay to detect anti-neurofascin 155 antibodies
- 研究開発分担者 (日本語) 金沢医科大学医学部神経内科・神経内科学 教授 松井真
所属 役職 氏名： (英語) Makoto Matsui, Professor, Department of Neurology, Kanazawa Medical University
- 研究開発分担者 (日本語) 近畿大学医学部神経内科・神経内科学 教授 楠進
所属 役職 氏名： (英語) Susumu Kusunoki, Professor, Department of Neurology, Kinki University Faculty of Medicine
- 研究開発分担者 (日本語) 千葉大学医学部神経内科・神経内科学 教授 桑原聡
所属 役職 氏名： (英語) Satoshi Kuwabara, Professor, Department of Neurology, Graduate School of Medicine, Chiba University

- 研究開発分担者 (日本語) 九州大学大学院医学研究院神経内科学分野 助教 眞崎勝久
 所属 役職 氏名 : (英語) Katsuhisa Masaki, Assistant professor, Department of Neurology, Neurological Institute Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University
- 分担研究 (日本語) 暫定抗 NF155 抗体関連炎症性脱髄性疾患の診断基準の作成・全国疫学調査の実施, 抗 NF155 抗体陽性症例の電気生理学的解析法の確立
 開発課題名 : (英語) Development of tentative diagnostic criteria for anti-neurofascin 155 antibody-associated inflammatory demyelinating diseases and implementation of a nationwide validation study
- 研究開発分担者 (日本語) 金沢医科大学医学部神経内科・神経内科学 教授 松井真
 所属 役職 氏名 : (英語) Makoto Matsui, Professor, Department of Neurology, Kanazawa Medical University
- 研究開発分担者 (日本語) 近畿大学医学部神経内科・神経内科学 教授 楠進
 所属 役職 氏名 : (英語) Susumu Kusunoki, Professor, Department of Neurology, Kinki University Faculty of Medicine
- 研究開発分担者 (日本語) 千葉大学医学部神経内科・神経内科学 教授 桑原聡
 所属 役職 氏名 : (英語) Satoshi Kuwabara, Professor, Department of Neurology, Graduate School of Medicine, Chiba University
- 研究開発分担者 (日本語) 九州大学大学院医学研究院神経内科学分野 助教 眞崎勝久
 所属 役職 氏名 : (英語) Katsuhisa Masaki, Assistant professor, Department of Neurology, Neurological Institute Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University
- 分担研究 (日本語) 動物モデルの作成・動物モデルでの B 細胞を標的とした治療法の開発
 開発課題名 : (英語) Development of animal models and novel therapeutic strategies for anti-neurofascin 155 antibody-associated inflammatory demyelinating diseases
- 研究開発分担者 (日本語) 九州大学病院 神経内科 准教授 松下拓也
 所属 役職 氏名 : (英語) Takuya Matsushita, Associated professor, Department of Neurology, Kyushu University Hospital
- 研究開発分担者 (日本語) 九州大学大学院医学研究院神経内科学分野 准教授 山崎亮
 所属 役職 氏名 : (英語) Ryo Yamasaki, Associated professor, Department of Neurology, Neurological Institute Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

II. 成果の概要 (総括研究報告)

1. 高精度で、簡易な検査法の確立 (ELISA 法の確立)

研究協力施設である防衛医科大学校内科学講座 神経・抗加齢血管内科が中心となり、抗 neurofascin 155 (NF155) 抗体測定における ELISA の有用性を報告した (Kadoya M, et al. J

Neuroimmunol. 2016;301:16–22.)。リコンビナントヒト NF155 蛋白抗原に対する抗体を、慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー (CIDP) 191 例および対照群 119 例の血清を用いて ELISA により測定したところ、CIDP 191 例中 15 例 (8%) が極めて明瞭な反応性を示し、抗 NF155 抗体陽性と判定した。対照群 119 例は全て陰性であった。同 ELISA での測定結果は九州大学 神経内科で採用しているフローサイトメトリーを用いた cell-based assay での結果と一致し、両測定系の抗 NF155 抗体価に有意な正の相関を認めた。抗 NF155 抗体陽性例では、若年発症、遠位優位型、振戦・感覚性失調合併、髄液蛋白高値、IVIG 抵抗性、などの特徴を認め、既報告と合致した。今後も引き続きエピトープの同定を進め、より特異度の高い検査系の確立を目指す。

2. 暫定抗 NF155 抗体関連炎症性脱髄性疾患の診断基準の作成・全国疫学調査の実施、抗 NF155 抗体陽性症例の電気生理学的解析法の確立

血清抗 NF155 抗体を測定し陽性であった CIDP 31 例の解析を行った。95 例の同抗体陰性 CIDP と比較して有意差のある所見や頻度の高い所見を抽出し、既報告も考慮した上で暫定診断基準を策定した。抗 NF155 抗体陽性 CIDP 群は同抗体陰性 CIDP 群と比較して発症年齢は有意に若く (29.3 歳 vs. 49.3 歳, $p<0.0001$)、40 歳未満での発症は 74.2% (23/31) であった。遠位優位型の病型を呈する割合が優位に高く (51.6% vs. 14.7%, $p=0.0001$)、多巣性脱髄性感覚運動型の症例は同定できなかった。振戦 (48.4% vs. 14.1%, $p=0.0003$)、失調 (63.3% vs. 27.7%, $p=0.0008$)、深部感覚障害 (93.3% vs. 68.1%, $p=0.0072$) を有する割合が有意に高かった。脳脊髄液中の蛋白濃度が著明に高値であり (324 mg/dl vs. 104 mg/dl, $p<0.0001$)、200 mg/dl を超える陽性症例は 74.2% (23/31) で全例 100 mg/dl 以上であった。31 例全例で IgG4 サブタイプの抗 NF155 抗体が上昇していた。確認し得た 23 例の神経伝導検査結果は全例で EFNS/PNS の電気生理学的診断基準を「definite」に満たした。MRI neurography での異常所見、病理学的な異常所見を参考所見に加え抗 NF155 抗体関連ニューロパチーの暫定診断基準を策定した。暫定診断基準には電気生理学的な基準値も盛り込んだ。2017 年度には同診断基準の妥当性を検討するための全国調査の計画している。

3. 動物モデルの作成・動物モデルでの B 細胞を標的とした治療法の開発

抗 NF155 抗体陽性 CIDP 患者のリンパ球を採取し、全 RNA から cDNA を調製後、免疫ファージ抗体ライブラリーを構築する。その後、ファージディスプレイ法を用いてヒト NF155 特異的な一本鎖フラグメント (single chain variable fragment, scFv) を作製し、NF155 特異的 scFv を動物モデルへ移入することで病態を再現し、発症機序を解明し、画期的治療法を開発する。2016 年度は抗 NF155 抗体陽性 CIDP 患者のリンパ球を利用して抗体ファージライブラリーを構築した。

(1) Development of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay to detect anti-neurofascin 155 antibodies

Collaborating with Department of Neurology, Anti-aging and Vascular Medicine, National Defense Medical College, we reported the utility of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

using recombinant human neurofascin 155 (NF155). Sera from 191 patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP), 99 disease controls, and 20 healthy subjects were tested for anti-NF155 antibodies by ELISA. As a result, fifteen CIDP patients (8%) were anti-human NF155 antibody-positive whereas no disease controls or healthy subjects had positive results. In anti-human NF155 antibody-positive sera, anti-NF155 antibody levels measured by ELISA showed significant positive correlation with those measured by flow cytometric cell-based assay. Clinical features of anti-NF155 antibody-positive patients in this cohort were consistent with those in previous reports.

(2) Development of tentative diagnostic criteria for anti-neurofascin 155 antibody-associated inflammatory demyelinating diseases and implementation of a nationwide validation study

To develop tentative diagnostic criteria for anti-NF155 antibody-associated inflammatory demyelinating diseases, we retrospectively collated clinical and laboratory data from 31 CIDP patients with anti-NF155 antibodies and 95 CIDP patients without the antibodies, and compared the data between the two groups. IgG4 anti-NF155 antibody levels were increased in all CIDP patients with the antibodies. All anti-NF155 antibody-positive CIDP patients had generalized symmetric limb weakness and 93% had deep sensory impairment. Anti-NF155 antibody-positive CIDP patients had a significantly younger onset age, higher frequencies of tremor, ataxia and distal acquired demyelinating symmetric phenotype, and much higher cerebrospinal fluid (CSF) protein levels than anti-NF155 antibody-negative CIDP patients. Three-fourths of anti-NF155 antibody-positive CIDP patients developed the disease before 40 years of age. CSF protein levels were 200 mg/dl or more in 74% of the patients. All of the 23 anti-NF155 antibody-positive CIDP patients whose nerve conduction study findings were available met the definite EFNS/PNS electrophysiological criteria for CIDP. Marked symmetric hypertrophy of cervical or lumbosacral root/plexuses existed in all 14 anti-NF155 antibody-positive patients examined by MRI. Based on these findings, tentative diagnostic criteria were created. We are going to validate the criteria by a nationwide survey.

(3) Development of animal models and novel therapeutic strategies for anti-neurofascin 155 antibody-associated inflammatory demyelinating diseases

We plan to isolate pathogenic single chain variable fragment (scFv) against NF155 to develop animal models of anti-NF155 antibody-associated inflammatory demyelinating diseases. We have constructed an immunoglobulin V-gene phage-display library from the immunoglobulin repertoire of a patient with anti-NF155 antibody-positive CIDP.

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 6 件）

1. Kadoya M, Kaida K, Koike H, Takazaki H, Ogata H, Moriguchi K, Shimizu J, Nagata E, Takizawa S, Chiba A, Yamasaki R, Kira JI, Sobue G, Ikewaki K. IgG4 anti-neurofascin155

- antibodies in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: Clinical significance and diagnostic utility of a conventional assay. *J Neuroimmunol*. 2016; 301:16-22.
2. Koike H, Kadoya M, Kaida KI, Ikeda S, Kawagashira Y, Iijima M, Kato D, Ogata H, Yamasaki R, Matsukawa N, Kira JI, Katsuno M, Sobue G. Paranodal dissection in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with anti-neurofascin-155 and anti-contactin-1 antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017 Jan 10. pii: jnnp-2016-314895.
 3. Hiwatashi A, Togao O, Yamashita K, Kikuchi K, Ogata H, Yamasaki R, Yoneyama M, Kira JI, Honda H. Evaluation of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: 3D nerve-sheath signal increased with inked rest-tissue rapid acquisition of relaxation enhancement imaging (3D SHINKEI). *Eur Radiol*. 2017; 27:447-453.
 4. Morikawa M, Kuwahara M, Ueno R, Samukawa M, Hamada Y, Kusunoki S. Serological study using glycoarray to detect antibodies to glycolipids and glycolipid complexes in immune-mediated neuropathies. *J Neuroimmunol* 2016; 301: 35-40.
 5. Samukawa M, Kuwahara M, Morikawa M, Ueno R, Hamada Y, Takada K, Hirano M, Mitsui Y, Sonoo M, Kusunoki S. Electrophysiological assessment of Guillain-Barré syndrome with both Gal-C and ganglioside antibodies; tendency for demyelinating type. *J Neuroimmunol* 2016; 301: 61-64
 6. Kuwahara M, Samukawa M, Ikeda T, Morikawa M, Ueno R, Hamada Y, Kusunoki S. Characterization of the neurological diseases associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection and anti-glycolipid antibodies. *J Neurol* 2017; 264:467-475
 7. 清水 幹人, 甲田 亨, 中辻 裕司, 緒方 英紀, 吉良 潤一, 望月 秀樹. 単純血漿交換療法が奏功した抗 neurofascin 155 抗体陽性中枢末梢連合脱髄症の 1 例. *臨床神経学*. 2016, 57, 41-4.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Gangliosides and anti-ganglioside antibodies. Kusunoki S. Inflammatory Neuropathy Consortium 2016, Glasgow University, Glasgow, UK, 2016/6/21~2016/6/24 (国外, 口演)
2. 免疫性末梢神経障害, 楠 進, 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016/5/18~2016/6/2, 神戸国際会議場 (国内, 口演)
3. Antibodies to paranodal and juxtaparanodal proteins in CIDP and MMN, 桑原基, 森川みゆき, 上野莉乃, 寒川真, 濱田征宏, 楠 進. 第 57 回日本神経学会学術集会, 神戸国際会議場, 2016/5/18~2016/5/21, (国内, 口演)
4. 桑原基, 鈴木秀和, 吉良潤一, 楠 進. 免疫療法を施行した抗 Neurofascin 155 IgG4 抗体陽性 CIDP2 例における臨床経過と抗体価の推移, 第 34 回日本神経治療学会総会, 米子, 2016/11/3~2016/11/5 (国内, ポスター)
5. 抗 neurofascin155 抗体陽性 CIDP の臨床的特徴, 緒方英紀, 山崎亮, 樋渡 昭雄, 岡 伸幸, 河村 信利, 松瀬大, 楠 進, 吉良潤一, 第 112 回日本内科学会講演会 - 総会・年次講演会, 東京国際フォーラム, 2016/4/17. (国内, ポスター) .

6. Useful Laboratory Markers for Predicting Anti-Neurofascin155 Antibody Status Among Patients with Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy. Hidenori Ogata, Ryo Yamasaki, Nobuyuki Oka, Motoi Kuwahara, Hidekazu Suzuki, Susumu Kusunoki, Yohsuke Yagi, Takanori Yokota, Takuya Matsushita, Jun-ichi Kira. 第 57 回日本神経学会学術集会神戸国際会議場, 2016/5/19. (国内, 口演)
7. Valuable objective markers for Predicting Anti-Neurofascin155 Antibody Status Among CIDP Patients, poster, Hidenori Ogata, Ryo Yamasaki, Nobuyuki Oka, Motoi Kuwahara, Hidekazu Suzuki, Susumu Kusunoki, Yohsuke Yagi, Takanori Yokota, Takuya Matsushita, Jun-ichi Kira, Inflammatory Neuropathy Consortium 2016, Glasgow University, 2016/6/22. (国外, ポスター)
8. 抗 neurofascin155 抗体陽性 CIDP 症例における臨床・神経伝導検査・抗体検査所見の経時的変化からみた早期再発マーカーの同定, 口頭, 緒方 英紀、山崎 亮、吉良 潤一, 第 27 回日本末梢神経学会学術集会, 大阪国際会議場, 2016/8/26. (国内, 口演)
9. CIDP とランビエ絞輪部を標的とした自己抗体, 口頭, 緒方 英紀、山崎 亮、吉良 潤一, 第 27 回日本末梢神経学会学術集会, 大阪国際会議場, 2016/8/26. (国内, 口演)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当事項無し

(4) 特許出願

該当事項無し