

抗 Neurofascin155 抗体関連疾患における
中枢神経障害に関する研究

やまざき けいし
山崎 啓史

(神経病学専攻)

防衛医科大学校

令和4年度

目次

	頁
第1章 緒言	1
第1節 慢性炎症性脱髄性多発根神経炎と中枢末梢連合脱髄症の疾患概念.....	1
第2節 抗絞輪部/傍絞輪部抗体の発見と autoimmune nodopathy の確立.....	2
第3節 抗 NF155 抗体の関連臨床スペクトラムと CCPD への関与.....	4
第4節 本研究の目的.....	6
第2章 対象ならびに方法	8
第1節 実験1：抗 NF155 抗体の中枢神経曝露と臨床病型の関連の解析.....	8
第2節 実験2：慢性髄腔内受動免疫モデルを用いた抗 NF155 抗体陽性 IgG の中枢神経障害作用の解析	10
第3章 結果	20
第1節 実験1	20
第2節 実験2	21
第4章 考察	25
第1節 髄腔内における抗 NF155 抗体の臨床的意義(実験1).....	25

第2節 抗NF155抗体陽性患者IgGの生物学的作用から推察される中枢神経障害合併規定因子(実験2).....	26
第3節 今後の展望.....	29
第5章 結論.....	32
謝辞.....	33
略語一覧.....	34
引用文献.....	36
図表.....	44

第1章 緒言

第1節 慢性炎症性脱髄性多発根神経炎と中枢末梢連合脱髄症の疾患概念

免疫介在性脱髄を来す疾患は、多発性硬化症(multiple sclerosis : MS)に代表される中枢神経脱髄疾患と、慢性炎症性脱髄性多発根神経炎(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: CIDP)に代表される末梢神経脱髄疾患に大別される。

CIDP は、慢性進行経過の後天性免疫介在性末梢神経脱髄を特徴とする疾患である。1958年のAustin¹による副腎皮質ステロイド反応性を有する再発性末梢神経障害32例のレビューを皮切りに類似症例が蓄積され、1982年にDyckら²により、緩徐進行経過ないし再発寛解経過の四肢対称性・びまん性運動感覚障害を呈する臨床像、多巣性炎症性末梢神経脱髄の病理像を特徴とする疾患概念としてCIDPの呼称でまとめられた。その後、この典型像とは障害分布ないし障害様式が異なる非典型例³⁻⁵が報告され、いずれも慢性進行経過の炎症性末梢神経脱髄という共通の特徴を有することからCIDPの亜型に組み入れられた。European Academy of Neurology/Peripheral Nerve Society (EAN/PNS)による2021年の診療ガイドライン⁶では、前述の典型像をTypical CIDP、これと障害様式が異なる5病型をCIDP variantsとして定義された。その成立過程を振り返ってもCIDPは多様な病態を包含し、Heterogenousな症候群の特性を強く有する。

また、中枢神経、末梢神経の炎症性脱髄疾患においては、しばしば両者のオーバーラップがみられる⁷。MSにおける末梢神経脱髄の合併、あるいはCIDPにおける中枢神経病変の合併といった報告があり⁸⁻¹¹、このような中枢、末梢神経

脱髄を共に来すものは中枢末梢連合脱髄症(combined central and peripheral demyelination: CCPD)とよばれる。このオーバーラップの機序としては、① 中枢・末梢神経系両者に共通する抗原を介した一連の免疫応答による、② 共通の自己免疫疾患感受性因子により合併した別個の免疫疾患の重複である、③ 相互に無関係な偶発合併症である、といった仮説が想定されている⁷。しかし、症例数の少なさや明確な診断基準がないことから大規模な研究は行われておらず、CCPD が独立した疾患単位と見做せるかも結論が出ていない。

第2節 抗絞輪部/傍絞輪部抗体の発見と autoimmune nodopathy の確立

Ranvier 絞輪(node of Ranvier)は、有髄神経における跳躍伝導の機能的支持基盤となる非ミエリン化間隙である。この node との関係から神経線維は絞輪部(node region)、傍絞輪部(paranode region)、近接傍絞輪部(juxta-paranode region)絞輪間部(inter node)の4つのセグメントに分けられ¹²、各部位に特殊化された分子構造を有する¹³。例えば、絞輪部軸索表面に発現する細胞接着因子 neurofascin (NF)186 蛋白は、neuronal cell adhesion molecule や gliomedin と共同して電位依存性 Na⁺チャネルの絞輪部への局在に働く¹⁴。傍絞輪部では軸索上に contactin (CNTN)1 および contactin-associated protein (Caspr)1 蛋白、髄鞘担当細胞上に NF155 蛋白が局在し、3者が複合体を形成することで軸索 - 髄鞘接着と絞輪部構造の形成を担う^{15,16}。近接傍絞輪部では CNTN 2 と Caspr2 が結合することで電位依存性 K⁺チャネルの同部への集簇に働く¹⁷。髄鞘組織による絞輪間部の絶縁状態に加え、これらの組織学的特徴が裏打ちする細胞内外イオン交換の局在化が有髄線維での跳躍伝導において重要な分子機構として関与し、実際に絞輪部/傍絞輪部蛋白のノックアウトマウスを用いた研究では脱髄病理

の惹起と神経伝導速度の低下が示されている¹⁸⁻²⁰。

2010年代初頭より、CIDP患者の末梢神経病理において絞輪部構造の破綻が指摘され^{21,22}、上述の知見との相同性から炎症性末梢神経脱髄疾患における絞輪部/傍絞輪部蛋白を標的とした免疫病態が注目され始めた。2012年に、Devauxら²³がCIDP患者由来血清の30%にマウス坐骨神経の絞輪部/傍絞輪部に対するIgG抗体を認めることを報じ、以降NF155蛋白²⁴⁻²⁷、CNTN1蛋白^{28,29}、Caspr1蛋白³⁰に対するIgG抗体が陽性となるCIDP症例の報告が複数の施設より相次いだ。このような過程を経て、CIDPの一部における抗絞輪部/傍絞輪部蛋白抗体を介した液性免疫病態の関与が広く認知された。これらの抗体陽性例はしばらくCIDPのサブグループとして扱われたが、主に抗NF155抗体、抗CNTN1抗体陽性例の蓄積と関連臨床像の解析が世界的に推進された結果、同抗体陽性例は陰性例に比しCIDPの第一選択治療、特に免疫グロブリン静注療法(intravenous immunoglobulin: IVIg)に治療抵抗性であり³¹、CIDPの古典的病理像であるマクロファージ介在性脱髄の所見を認めない^{32,33}といった特徴が明らかとなった。以上の知見から、抗絞輪部/傍絞輪部蛋白抗体陽性の末梢神経障害は、CIDPとは異なる治療特性および病理像を有する疾患群として整理され、最新のEAN/PNSガイドラインでautoimmune nodopathy (AN)としてCIDPから独立した⁶。

Heterogenousな症候群においては、病態の細分化とそれに基づいた治療戦略の最適化が必要となる。CIDPからのANの独立は、症候群から抗体の存在をもとに特定の疾患単位を切り分けることに成功した好例と言え、CIDPとの治療反応性の差異も明らかにされたことから治療戦略の最適化に寄与するところが大きい。現在本邦においてANを対象とした医師主導治験が進行中である³⁴。

なお、絞輪部から絞輪間部に分類される各構造は中枢神経組織でも認められ、それら中枢の絞輪部周辺構造を障害する疾患も存在するが、本稿では特に断りのない限り CIDP 類似の末梢神経脱髄のみを来す抗絞輪部/傍絞輪部蛋白抗体陽性例を AN と記載する。

第3節 抗 NF155 抗体の関連臨床スペクトラムと CCPD への関与

先に触れたように、NF155 蛋白は末梢神経組織において傍絞輪部 Schwann 細胞表面に発現する細胞接着因子であり、軸索表面上の CNTN1/Caspr1 複合体と heterophilic に結合して septate-like junction (梯子状の微細構造で接着される細胞間接着様式³⁵)を形成し、Schwann 細胞 terminal loop と軸索間の距離を短縮することで両者の接着に働いている³⁶。

AN の代表病型として抗 NF155 抗体陽性 AN の臨床像は国内外で詳細に解析されており、抗体陰性 CIDP 症例との対比により、

- (1) Typical CIDP または遠位型 CIDP variant (distal CIDP) 類似の末梢神経障害を来す。
- (2) 振戦、深部覚障害を高頻度に認める。
- (3) IVIg の効果が乏しい。
- (4) 著明な脳脊髄液(cerebrospinal fluid: CSF)蛋白濃度の上昇を認める。
- (5) 抗体の IgG サブクラスは通常 IgG4 優位である。
- (6) 著明な神経根肥厚を来す。

といった特徴が確認された²⁵⁻²⁷。患者腓腹神経の超微細構造の解析では、NF155 蛋白の局在に一致し、傍絞輪部において Schwann 細胞 terminal loop と軸索表面とが解離する axo-glial detachment の所見が確認された³⁷。Manso ら³⁸は、ラッ

トを用いた受動免疫モデルにより、抗 NF155 抗体陽性 AN 患者血清 IgG4 の髄腔内投与が、運動症状、脊髄前根神経における複合筋活動電位および運動神経伝導速度の低下、末梢神経組織中の NF155 蛋白発現量低下、傍絞輪部構造の短縮ないし欠如した Ranvier 絞輪の増加を惹起することを示し、IgG4 型抗 NF155 抗体の AN における病原性を証明した。以上の知見の蓄積から、抗 NF155 抗体陽性 AN は同抗体を病原抗体とした免疫病態を共有し、共通の臨床像を示す一つの疾患単位として認知されている。

一方、NF155 蛋白はオリゴデンドロサイトにも発現し¹⁶、中枢神経組織においても傍絞輪部での septate-like junction の形成を担っている。抗 NF155 抗体は、むしろ MS で最初に報告され³⁹ 中枢神経炎症性脱髄との関連が研究されるも、その後の検討で健常対照と抗体陽性率の有意差を認めず病的意義の確立に至らなかった経緯がある⁴⁰。しかしながら、抗 NF155 抗体陽性 AN の症例蓄積の過程で、CCPD の一部でも同抗体が陽性となることが指摘され⁴¹⁻⁴³、同抗体が中枢/末梢神経脱髄を同時に惹起し CCPD と関連する可能性について近年改めて注目されている。

抗体介在性の中枢神経障害の生起には、病原抗体が血液脳関門を超えて標的抗原に到達する必要があり、種々の自己抗体関連脳脊髄炎で病原抗体の CSF 中への出現が確認される⁴⁴。CCPD 症例においても抗 NF155 抗体を CSF 中から検出した報告⁴¹があり、同抗体の中枢神経病変への関与を支持する。加えて、

(1) 抗 NF155 抗体は末梢神経傍絞輪部障害作用を有することが動物モデルで確認され³⁸、髄鞘担当細胞は異なるが同様の分子機構を有する中枢神経傍絞輪部に対しても同抗体の病的作用が予測される。

(2) Kawamura ら⁴¹は CCPD 7 例中 5 例、Ogata ら⁴²は 11 例中 5 例で血清抗

NF155 抗体陽性だったと報告している。少数例の検討ではあるが高い抗体陽性率が確認され、同抗体と CCPD 病型の強い関連が推測される。

- (3) 血漿交換療法や抗 CD20 モノクローナル抗体製剤 Rituximab の投与によって中枢/末梢神経病変両者の改善を得た抗 NF155 抗体陽性 CCPD の報告^{41,45}から、自己抗体を介した両神経系の障害が推測される。

上記の知見に基づき、抗 NF155 抗体が中枢/末梢神経両者の傍絞輪部を障害する機序が、同抗体陽性 CCPD の病態として想定されてきた。

しかし、CCPD 患者由来抗 NF155 抗体が直接の中枢神経障害作用を有するかは未検討である。かつ、上記の知見はその他の自己抗体が CCPD 病態に関与する可能性を否定していない。MS との脳 MRI 画像所見の対応性から抗 NF155 抗体陽性 CCPD での中枢神経病変も炎症性脱髄巣と推測されているが、剖検例を欠き組織学的実証はなされていない。また、抗 NF155 抗体陽性例は多くが AN すなわち末梢神経単独の障害を示す⁴⁰一方で CCPD は稀であり、この病態の差異の背景を詳細に解析した既報はない。

以上より、抗 NF155 抗体陽性例における中枢神経障害の実態は明らかにされておらず、中枢神経障害と同抗体の直接の因果関係の有無、および同抗体陽性例が異なる臨床表現型を示す要因は未解明である。

第 4 節 本研究の目的

前述の背景から、本研究では抗 NF155 抗体陽性例が中枢神経病変を呈する機序として、以下の 3 つを想定した。

中枢神経病変の病原抗体が抗 NF155 抗体である場合に想定される機序：

機序(1) CSF 中の抗 NF155 抗体力価が一定の閾値を超えると、その量的作用

の結果として中枢神経障害を生じる。

機序(2) 認識エピトープやエフェクター機能といった抗 NF155 抗体の病的作用が症例間で異なり、この抗体の質的差異が中枢神経障害の有無を規定する。

中枢神経病変の病原抗体が抗 NF155 抗体でない場合に想定される機序：

機序(3) CCPD では、抗 NF155 抗体以外に中枢神経を障害する自己抗体が存在する。

機序(1)-(3)の検証として、in vivo における患者免疫グロブリンの中枢神経障害作用に着目し、実患者 CSF を用いた臨床的解析、および受動免疫動物を用いた基礎医学的検討を行った。この解析により抗 NF155 抗体関連疾患における中枢神経障害合併の規定因子が示されれば、同抗体陽性症例の臨床転帰の予測に関して有益な情報を提供可能である。また、疾患単位として未確立である CCPD の病態の一部を解明する端緒となり、CIDP から AN が独立する過程で得られたような、heterogenous な症候群である炎症性脱髄疾患診療における治療戦略の最適化に寄与する知見が得られるのではないかと考えた。

本研究の目的は、① CSF 中の抗 NF155 抗体と臨床像の相関の解析、② 同抗体陽性患者由来 IgG をマウス髄腔内へ持続投与する受動免疫モデルを用いた中枢神経障害作用の解析、以上 2 つの実験を行い、抗 NF155 抗体関連疾患における中枢神経病変合併の規定因子を解明することである。

なお、本研究は防衛医科大学校倫理委員会の承認(受付番号：4074)、動物実験倫理委員会の承認(受付番号：21005)を得て実施した。各血清・CSF 検体の研究への二次利用、および臨床情報の収集については、患者および健常対象者より説明文書を用いてインフォームド・コンセントを取得した。

第2章 対象ならびに方法

第1節 実験1：抗NF155抗体の中樞神経曝露と臨床病型の関連の解析

実験1では、実患者における抗NF155抗体の中樞神経曝露の程度、すなわちCSF中の抗NF155抗体力価と臨床像との関連を解析し、中樞神経病変形成に同抗体が関与しているか否かを検証した。

対象

2014年から2020年の6年間に当科で炎症性ニューロパチー関連自己抗体測定を行った症例のうち、後述する enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により血清IgG型抗NF155抗体陽性だった23例を抽出した。このうち、同時期に採取したCSFが評価可能だった7例を抽出し、各症例に由来する血清、CSF検体を解析対象とした。

加えて、血清IgG型抗NF155抗体陰性のCIDP診断例3例に由来するCSF検体を抽出し、ELISAによるCSF中の抗NF155抗体(CSF-NF155抗体)測定系確立のための予備実験に使用した。

解析項目

解析対象7例由来の血清検体について、抗NF155抗体のIgGサブクラス構成をELISA法によりスクリーニングし、同抗体が既報告に合致してIgG4優位であることを確認した。各検体に紐づけられたアンケートより由来症例の臨床情報および臨床検査値等を参照した。CSF-NF155抗体の補正OD値(corrected OD value: cOD値)をELISA法で決定し、臨床情報との相関を統計学的に解析した。

ELISA

血清抗 NF155 抗体測定は Kadoya²⁷ らの先行報告に基づき実施した。

- (1) 抗原のリコンビナントヒト NF155 蛋白(R&D systems, MN, USA)を 4 μ g/ml の濃度で phosphate buffered saline (PBS)に溶解した。抗原液を EIA/RIA プレート(Corning, NY, USA)に 1 ウェルあたり抗原 200 ng となるよう加え、4°Cで一晩静置し固層化した。コントロールのウェルには PBS 50 μ l のみを同様に静置した。
- (2) ウェルに残った抗原液および PBS を捨て、PBS で希釈した 1%ウシ血清アルブミン液(1% BSA /PBS)を 100 μ l加えて室温で2時間ブロッキングした。
- (3) ブロッキング液を捨て、1%BSA/PBS で 200 倍希釈した血清 50 μ l を一次抗体として、室温で2時間反応させた。
- (4) 一次抗体を捨て、0.05%の Tween 20 (MP Biomedicals, CA, USA)を添加した PBS (PBS-T) 300 μ l で3回洗浄したのち、1%BSA/PBS で500倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG-Fc 抗体(MP Biomedicals) 50 μ l を二次抗体として、室温で1.5時間反応させた。
- (5) 二次抗体を捨て、PBS-T 300 μ l で3回洗浄し、100 μ l の O-phenylenediamine (40mg/dl で pH5.0 リン酸-クエン酸緩衝液に溶解)で2分間発色した。
- (6) 8N 硫酸(50 μ l)を加え、Microplate Reader (Bio-Rad, CA, USA)で波長 490nm の吸光度(optical density: OD)を測定した。抗原を入れたウェルとコントロールのウェルの OD 値の差分を cOD 値として算出した。1検体あたり抗原およびコントロールのウェルを各2ウェルずつ測定し、cOD 値はその平均値で決定した。cOD 値が 0.2 以上の血清を、IgG 型抗 NF155 抗体陽性と判定した。

血清抗 NF155 抗体 の IgG サブクラス については、上記手順の二次抗体をペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG1/2/3/4 抗体(Thermo Fisher scientific, MA, USA, 希釈倍率 : IgG1/2/4…500 倍 IgG3…1500 倍)に変更して得られた値を各サブクラスの cOD 値とし、0.2 以上を当該 IgG サブクラスの抗 NF155 抗体陽性と判定した。

ELISA による CSF 中の抗 NF155 抗体検出法は確立されていない。本検討では血清抗 NF155 抗体の ELISA 測定系を応用し、一次抗体を CSF に変更することで CSF-NF155 抗体活性を測定した。予備実験として、解析対象症例の一部および抗 NF155 抗体陰性 CIDP 症例由来の CSF 検体を用いて、上記手順の一次抗体を 25/50/100/200 倍希釈 CSF とした際の希釈倍率と cOD 値の関係を表すグラフを作成した。これに基づいて一次抗体希釈濃度を検討し、25 倍希釈 CSF を用いて得られた値を CSF-NF155 抗体 cOD 値として採用した。

統計解析

CSF-NF155 抗体 cOD 値を説明変数として、各血清/CSF 由来症例から得られた臨床検査値との相関を、分散表を用いた単回帰分析で解析した。統計学的計算には JMP Pro14 (SAS institute, NC, USA)を用い、有意水準が 0.05 未満の場合に、統計学的有意差ありと判定した。

第 2 節 実験 2 : 慢性髄腔内受動免疫モデルを用いた抗 NF155 抗体陽性 IgG の中枢神経障害作用の解析

既知の自己免疫性脳炎における病原抗体の多くは IgG クラスに属し、その他の免疫グロブリンクラスの抗体は極めて稀である⁴⁴。実験 2 では、抗 NF155 抗

体陽性例における中枢神経障害は IgG 抗体によると前提を置いて、Manso ら³⁸ の抗 NF155 抗体陽性 AN 病態再現を目的とした動物実験を参考に、患者由来 IgG を用いた慢性髄腔内受動免疫マウスモデルを作成し、表現型を行動学的、組織学的に比較した。なお、Manso らは抗 NF155 抗体の優位サブクラスである IgG4 のみを投与したが、本研究では、抗 NF155 抗体は IgG4 以外のサブクラスも存在すること、IgG4 型抗 NF155 抗体以外の自己抗体が中枢神経病変形成に関与する可能性もあること、以上の 2 点を考慮して患者血清由来の全 IgG を投与するものとした。

投与 IgG の内訳

実験動物の中枢神経系に投与するヒト IgG は、以下の各試料を用いた (patient No. は実験 1 の表 1 参照) :

- (a) CSF-NF155 抗体が高力価の CCPD 症例(patient 6)血清由来
- (b) CSF-NF155 抗体が測定感度以下の AN 症例(patient 3)血清由来
- (c) 上記(a)から抗 NF155 抗体を選択的に除去したもの
- (d) 健常対照ヒト (Healthy control: HC) 3 例血清由来

これらの試料を投与した個体を比較することで、緒言に記した機序(1)-(3)の検証を試みた。

なお、上記の CCPD 血清および AN 血清は、事前に当科保存マウス馬尾凍結組織標本に反応させ、抗ヒト pan-neurofascin 抗体(R&D systems, MN, USA ; 100 倍希釈)で対比染色を加えた免疫蛍光染色により、マウス神経組織の傍絞輪部に反応する IgG 抗体を有する血清であることを確認し使用した。

投与試料の作成

〈血清 IgG の精製、投与試料の調整〉

Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit (Thermo Fisher scientific)を用いて、各血清から精製 IgG 溶液、すなわち、CCPD 症例血清由来 IgG (CCPD-IgG)、AN 症例血清由来 IgG (AN-IgG)、HC 血清由来 IgG (HC-IgG)を得た。Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher scientific)により各精製 IgG 溶液の蛋白量を同定したのち、人工 CSF(組成 NaCl 122mM, KCl 3.1mM, NaHCO₃ 5mM, KH₂PO₄ 0.4mM, CaCl₂ 1.3mM, MgSO₄ 1.0mM, D-glucose 10mM)に 1.4 mg/ml の濃度で混和し、投与試料とした。

〈抗 NF155 抗体吸収 CCPD-IgG 投与試料の作成〉

投与 IgG の(c)として用いる抗 NF155 抗体吸収処理 CCPD-IgG (NF^{(-)CCPD-IgG)を、下記手順により作成した。}

- (1) ELISA で用いたりコンビナントヒト NF155 蛋白抗原液を EIA/RIA プレートに 1 ウェルあたり抗原 400 ng となるよう加え、ELISA と同様に固層化、1% BSA /PBS でブロッキングを行った。
- (2) ブロッキング液を破棄し、試料への BSA 混入を可及的に避けるため 0.1% BSA/PBS 300 μl で 1 回洗浄した。
- (3) CCPD-IgG を 1 ウェルあたり 100 μl 加え、1 時間室温で振盪したのち上清を回収して未使用の抗原固層化済みウェルに移した。同工程を 6 回繰り返し serial incubation した。6 ウェル目の反応終了後、4°Cで一晩静置した。
- (4) 上清を回収し、NF^{(-)CCPD-IgG として扱った。}

なお、得られた NF^{(-)CCPD-IgG は、第 1 節に示す血清抗 NF155 抗体測定手}

順のうち一次抗体を 20 倍希釈 CCPD-IgG および NF^{(+)CCPD-IgG} に変えて測定を行い、吸収処理前後での抗 NF155 抗体力価を比較した。抗 NF155 抗体が測定感度以下となっていることを確認し、その他の精製 IgG 溶液と同様に 1.4mg/ml の濃度で人工 CSF に混和し、投与試料とした。

実験動物

8~12 週齢の雄性 BALB/c マウス (Japan SLC, Shizuoka, Japan) 28 頭を用いた。すべてのマウスは、明期および暗期がそれぞれ 12 時間 (明期：7-19 時、暗期：19-7 時)、自由摂餌、自由飲水の環境下で飼育した。

1 頭を、脳組織可溶化液の作成に供した。

4 頭を、髄腔内試料分布様式の確認を目的とした予備実験に使用し、coumarin 色素混和人工 CSF を投与した。

23 頭 (体重 27.1 ± 2.4 g) を、CCPD-IgG 投与群 (n=7)、AN-IgG 投与群 (n=7)、HC-IgG 投与群 (n=7)、NF^{(+)CCPD-IgG} 投与群 (n=2) に分け、以降の投与実験を行った。

慢性髄腔内試料投与実験 (図 1 A)

3 種混合麻酔 (ミダゾラム 5mg/ml、ドミトール 1mg/ml、ベトルフェール 5mg/ml、それぞれ Sandoz, Nippon Zenyaku, Meiji Seika Pharma より購入) の腹腔内投与による全身麻酔下において、脳定位固定装置 (NARISHIGE, Tokyo, Japan) にマウスを固定した。イソジンで術野を消毒し、頭頸部背側正中の皮膚を約 1.0 cm 切開した。皮下を鈍性剥離して頭蓋骨を露出し、マウス脳アトラス⁴⁶を参考に右側脳室上にあたる部位 (Bregma から尾側 0.22 mm、右側 1 mm) で穿頭した。ポリエチレンチューブ (外径 0.61 mm, Becton Dickinson, NJ, USA) を用

いて自作したカニユーレを穿頭部から脳表より 2 mm の深さまで刺入し、右側脳室内にカニユーレ先端を留置した。切開創から皮下を尾側に向かって鈍性剥離し皮下ポケットを作成、浸透圧ポンプ Alzet® osmotic pump (Alzet, CA, USA) を置き、カニユーレを介して各投与試料を 7.1 μ l/日の速度で持続投与した。

予備実験として coumarin 色素を投与した個体は、10 日間生存させたのちに後述する方法で灌流固定し、色素沈着分布を肉眼的に観察した。各 IgG 試料の投与個体は、28 日間生存させ、以降の行動学的、組織学的解析に用いた。

行動学的評価

各 IgG 投与群に対し、髄腔内投与開始前日および開始後 7, 14, 28 日後 (baseline, day 7, 14, 28) の時点で行動解析を行った。foot print test および accelerating rotarod test を用い、運動機能の経時変化を評価した。測定はすべて明期の時間帯に実施し、それぞれの個体から得られた各観察時点における測定値の平均を統計解析に使用するものとした。

〈foot print test〉 (図 2)

Brooks らの手法⁴⁷に従い実施した。マウスを保定した状態で前肢の足裏に赤、後肢の足裏に黒のアクリル塗料を塗布した。記録用紙上 (横 8 cm、縦 42 cm) に塗料をつけたマウスをおき、長辺方向に沿って歩行させた。同様の測定を 1 観察時点あたり 2 回以上繰り返し、停止および方向転換なく直進する、同一歩行内の連続した最良の 3 歩を抽出して解析に用いた (図 2 A)。解析項目は前後肢の歩幅および歩隔とした (図 2 B)。歩幅は連続する 2 つの同側 foot print 中心点間の距離と定義した。歩隔は一側前/後肢 foot print 中心点から、最も近い連続する 2 つの対側前/後肢 foot print の中心点を結ぶ直線までの距離と定義した。

〈accelerating rotarod test〉

マウス用 rotarod (Muromachi Kikai, Tokyo, Japan)を使用した。Rotarod を設置したチャンバー内にマウスを 10 分間おき順化させたのち、初速 3 rpm から 30 rpm まで、1 秒あたり 0.45 rpm で加速する回転ロッド上においた。訓練施行として、マウスが初めてロッド上より落下するまで強制歩行させた。十分な休息を与えてから同様の操作を行い、マウスが測定開始からロッド上より落下するまでの潜時を、300 秒を上限として測定した。300 秒を超えてマウスがロッド上に滞在する場合は記録値を 300 秒として扱った。1 観察時点あたり同様の測定を 3 回繰り返した。

組織学的評価

下記の手法でヒト IgG のマウス脳組織への沈着様式を評価し、各群で比較した。ヒト IgG 沈着の有無及びその分布様式の評価には、3,3'-Diaminobenzidine (DAB)発色による免疫組織化学染色を用いた。ヒト IgG 沈着対象細胞の同定には、免疫蛍光多重染色による、ヒト IgG シグナルと各種中枢神経細胞マーカーとの共局在性評価を用いた。染色工程を終了した切片は、光学顕微鏡 BZX-710 (Keyence, Osaka, Japan)により観察した。

〈凍結切片の作成〉

28 日間の IgG 試料投与が終了したマウスを、3 種混合麻酔の過剰投与により深麻酔状態とし、左心室より PBS を灌流して脱血後、体重 2 倍量の 4%パラホルムアルデヒド(paraformaldehyde: PFA)/0.1M リン酸緩衝液(phosphate buffer: PB) (pH 7.4)を灌流して組織を固定した。全脳を摘出し、4% PFA/PB に 4°C で 24 時間浸漬して後固定した。続いて PB を溶媒とした濃度 10%、20%、30%の

スクロース溶液に段階的に 4°C で浸漬して置換し、凍結保護を行った。組織をクリオマウント (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) に包埋して凍結し、クライオスタット (Bright instruments, Cambs, UK) を用いて、カニューレ刺入部近傍の側脳室および線条体を含む、厚さ 10 μ m の冠状組織切片を作成した。切片は CREST コートスライドガラス (Matsunami Glass, Osaka, Japan) に載せ、-80°C で使用時まで保存した。

〈免疫組織化学染色〉

- (1) 組織切片を風乾し、L.A.B. Solution (Polysciences, PA, USA) により抗原賦活化を行った。PBS で 10 倍希釈し 0.1% TritonX-100 を添加した正常ヤギ血清 (10% NGS-T) を 1 時間室温で反応させ、続いて Avidin/Biotin blocking kit (Vector, CA, USA) を用いて内因性ビオチンブロッキングを加えた。
- (2) 一次抗体として Can Get Signal[®] immunostain B 液 (Toyobo, Osaka, Japan) で 250 倍希釈したビオチン標識抗ヒト IgG 抗体 (Vector) を 4°C で一晩反応させた。
- (3) 3% H₂O₂/PBS に室温で 5 分間浸し、内因性ペルオキシダーゼを不活化した。
- (4) Elite ABC kit (Vector) を用いてペルオキシダーゼ標識アビジン - ビオチン複合体を形成し、DAB により発色させ可視化した。

〈免疫蛍光多重染色〉

- (1) 各組織切片に対し、免疫組織化学染色の (1)-(3) と同様の処理を行った。
- (2) Tyramide SuperBoost[™] kit (Thermo Fisher scientific) を使用し、ヒト IgG を AlexaFluor[™]488 で可視化した。
- (3) 10% NGS-T で希釈した各種の市販抗マウス中枢神経組織マーカー抗体を、

4°Cの暗所で一晩反応させた。

- (4) 10 % NGS-T で希釈し、4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI)を添加した蛍光標識二次抗体を室温、暗所で1時間反応させ、(3)で反応させた市販抗体の可視化および細胞核の対比染色を行った。

〈使用抗体一覧〉

免疫組織染色に用いた市販抗体は以下のとおりである。末尾に使用時の希釈倍率を示す。

Goat anti-human IgG antibody, biotinylated (Vector) (1:250)

Rabbit anti- glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody (abcam) (1:250)

Chicken anti-myelin basic protein (MBP) antibody (Aves) (1:500)

Rabbit anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) antibody (abcam) (1:100)

Rhodamine Red TM-X conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody (Jackson) (1:300)

Rhodamine Red TM-X conjugated donkey anti-chicken IgY antibody (Jackson) (1:100)

Western blot assay

未侵襲、試料未投与のマウスをイソフルランにより安楽死させ断頭後、全脳を摘出し、氷冷 PBS に浸漬して洗浄した。プロテアーゼ阻害剤カクテル cOmpleteTM mini (Roche, Basel, Switzerland)および 1mM Na₃VO₄を添加した氷冷 T-PERTM (Thermo Fisher scientific)を、全脳重量あたり 10 倍量加えた。パワーホモジナイザー(As One, Osaka, Japan)を用いて氷冷下で均一化し、遠心分離(13000×g, 5min, 4°C)して上清を回収、マウス全脳組織可溶化液(mouse brain lysate: MB-lysate)とした。

ドデシル硫酸ナトリウムおよびポリアクリルアミドゲルを使用した電気泳動

法(sodium dodecyl sulfate -polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE)により、各投与 IgG のマウス脳組織由来抗原への反応様式の差異を比較した。すなわち、

- (1) Sample buffer (pH6.8 Tris-HCl、SDS、glycerol、2-mercaptoethanol、bromophenol blue、蒸留水より組成)に懸濁して MB-lysate 抗原液(2 mg/ml)を作成し、100°Cで5分間加熱処理した。
- (2) ポリアクリルアミドゲル(4~15% mini protean TGX gel[®]、Bio-Rad)のレーンに、MB-lysate 抗原 40 μ g がのるように抗原液を注入し、0.02A の定電流条件で電気泳動を行った。
- (3) Trans-blot-turbo システム(Bio-Rad)を用いて泳動後のゲルを PVDF 膜に転写し、0.05%Tween 添加トリス緩衝生理食塩水 (Tween in Tris buffered saline: TBS-T) で希釈した 3%BSA 溶液(3%BSA/TBS-T)で1時間ブロッキングした。
- (4) ブロッキング後、PVDF 膜を 3%BSA/TBS-T で 600 倍に希釈した患者血清または 1000 倍希釈した市販抗マウス/ラット NF155 抗体(Gene Tex, CA, USA)を一次抗体として、4°Cで一晩インキュベートした。
- (5) 一次抗体を捨て、PVDF 膜を TBS-T で 3 回洗浄したのち、3%BSA/TBS-T で 1000 倍に希釈した TidyBlot western blot detection Reagent (Bio-Rad)を二次抗体として、室温で1時間インキュベートした。
- (6) 二次抗体を捨て、PVDF 膜を TBS-T で 3 回洗浄し、Western BLoT Ultra Sensitive HRP Substrate (Takara Bio, Shiga, Japan)を PVDF 膜に反応させて化学発光し、ChemiDoc[™] イメージングシステム (Bio-Rad)を用いてバンドを検出した。

(7) 得られた画像は、ImageJ (National institute of health, MD, USA)の rolling ball アルゴリズムによる背景除去およびコントラスト増強処理を加えて、反応血清ごとに比較した。

統計解析

Brooks ら⁴⁷の報告に従い、CCPD-IgG、AN-IgG、HC-IgG 投与群の行動実験結果を統計解析した。foot print test の各パラメータは正規分布連続データとして扱い、各観察時点の3群間有意差をANOVAで評価したのち、有意差を認められた観察時点について、HC-IgG 投与群をコントロールとしたDunnettの検定で事後解析を行った。accelerating rotarod の落下潜時平均値は非正規分布連続データとして扱い、各観察時点での3群間有意差をWilcoxon順位和検定で評価した。統計学的計算にはJMP Pro14 (SAS institute)を用い、有意水準が0.05未満の場合に、統計学的有意差ありと判定した。

第3章 結果

第1節 実験1

ELISAによる脳脊髄液中抗NF155抗体測定法の確立

図3に、血清抗NF155抗体陽性AN/CCPD例、および同抗体陰性CIDP例由来のCSF希釈系列を一次抗体とした際の、CSF希釈濃度とCSF-NF155抗体cOD値の関係をプロットしたグラフを示す。血清抗体陽性例では、検討した範囲で最も高濃度であるCSF25倍希釈時においてcOD値が0.00~0.78に分布し、CSF-NF155抗体活性の症例間の差異が明瞭に表現された(図3A)。陰性コントロールのCIDP3例では、25倍希釈としても非特異的なcOD値増加は確認されなかった(図3B)。この結果から、本実験ではCSF25倍希釈時のCSF-NF155抗体cOD値を解析値として採用した。

CSF-NF155抗体と臨床像の相関

CSFの評価が可能であったIgG型抗NF155抗体陽性7例の、臨床情報とCSF-NF155抗体の測定結果を表1にまとめる。AN診断例5例、CCPD診断例2例が解析可能だった。CIDP診断基準に照らした際の末梢神経障害病型は、AN症例では3例がDistal CIDP、2例がTypical CIDPの様式であったのに対し、CCPD症例では2例ともTypical CIDPだった。AN症例はいずれも最終診察時のmodified Rankin Scale⁴⁸が1または2であった一方、CCPDは2例とも4と重症度が高かった。血清抗NF155抗体のIgGサブクラス構成は解析対象7例すべてでIgG4優位であり、既報告²⁶に一致した。また、7例中6例でIgG2、2例でIgG1サブクラスの抗NF155抗体が陽性の結果だった。

CSF-NF155 抗体の cOD 値(平均)は、CCPD 病型 0.78~1.25 (1.02)、AN 病型 0.00~0.43 (0.06)であり、CCPD 病型で高い傾向を示した。末梢神経障害病型ごとに比較した場合、Distal CIDP 型 0.00~0.09 (0.06)、Typical CIDP 型 0.18~1.25 (0.66)であり、Typical CIDP 型末梢神経障害の場合に高い傾向を認めた。また、CSF-NF155 抗体 cOD 値は髄液蛋白量との有意な正の相関(図 4 A、寄与率 0.66、 $p=0.026$)を示し、CCPD 2 例ではデータ欠損のため評価不能だったが、AN 5 例については血液脳関門ないし血液神経関門破綻の指標である Q albumin 値(髄液アルブミン濃度を血清アルブミン濃度で除した値)とも有意な正の相関(図 4 B、寄与率 0.92、 $p=0.011$)を認めた。

第 2 節 実験 2

髄腔内慢性試料投与実験系の確立、投与試料の作成

予備実験として、前述の方法により経側脳室的に coumarin 色素混和人工髄液を持続髄腔内投与し、10 日間生存させたのち灌流固定して中枢神経組織を肉眼的に観察した。生存期間中、実験動物は術操作による麻痺などの異常は呈さず、脳室および脳脊髄表面全般への coumarin 色素沈着が認められた(図 1 B C)。以上の結果より、マウスに対する浸透圧ポンプを用いた経側脳室的持続試料投与は、長期生存可能かつ、中枢神経系への安定した慢性試料曝露が可能な実験系であることを確認した。

CCPD 血清、AN 血清、HC 血清のマウス馬尾凍結組織標本に対する反応性を検討した免疫蛍光染色の結果を図 5 に示す。CCPD 血清および AN 血清では市販抗ヒト pan-neurofascin 抗体の反応性と共局在するヒト IgG 反応を認め(図 5 A B)、一方 HC 血清では同様のシグナルを認めず(図 5 C)、今回選択した CCPD

症例、AN 症例の血清 IgG はマウス神経組織の NF155 蛋白にも反応性を有することを確認した。このうち、CCPD-IgG、AN-IgG、HC-IgG それぞれの投与試料を作成した。CCPD-IgG 投与試料に対して抗 NF155 抗体吸収処理を加え、NF⁽⁺⁾CCPD-IgG を取得した。ELISA 法による吸収前後の抗 NF155 抗体 cOD 値の比較では、NF⁽⁺⁾CCPD-IgG において同抗体が測定感度以下となっていることが確認された(図 6)。

各 IgG 投与がマウスに及ぼす行動表現型の変化

NF⁽⁺⁾CCPD-IgG 投与群は試料量の制限により複数個体の作成が困難であったため評価対象から除外し、CCPD-IgG、AN-IgG、HC-IgG 投与群の 3 群(各 n=7)より得たデータを解析した。

Foot print test では、各群の day28 時点の後肢歩隔(平均±標準偏差)について、CCPD-IgG 投与群 30.5±6.5 mm、AN-IgG 投与群 24.9±3.0 mm、HC-IgG 投与群 24.2±3.6mm であり 3 群間有意差を認めた($p=0.047$) (表 2)。一方で、全観察時点で前肢の歩幅および歩隔、後肢の歩幅に明らかな 3 群間有意差を認めなかった。CCPD-IgG および HC-IgG 投与群代表例の後肢歩隔の経時変化(図 7 A)と、HC-IgG 投与群をコントロールとした Dunnett の検定による事後解析結果(図 7 B)を示す。day14 にかけては 3 群とも類似の経時変化であった一方、CCPD-IgG 群のみ day14 から day28 にかけて後肢歩隔が拡大傾向を示した。加えて day28 時点の事後解析では、CCPD-IgG 投与群でコントロールに比し有意な後肢歩隔拡大を認め($p=0.043$)、AN-IgG 群では同様の有意差はなかった($p=0.95$)。

Accelerating rotarod test では、baseline, day7, 14, 28 のいずれの観察時点にお

いても、落下潜時の3群間有意差を認めなかった(表 3)。Baseline 時点の落下潜時四分位範囲は、CCPD-IgG 投与群 128 - 260 秒、AN-IgG 投与群 116 - 170 秒、HC-IgG 投与群 110 - 255 秒と未侵襲の状態でも個体間のばらつきが大きく、個体差のデータへの影響が推察された。この影響を可及的に除去するため各個体の baseline 時点からの落下潜時変化量を day7, 14, 28 時点について解析し、いずれの時点においても3群間有意差は認められなかった(図 8)。

各 IgG の脳組織沈着様式の差異

まず、CCPD-IgG、AN-IgG、HC-IgG 投与群の脳組織に対する沈着様式を免疫組織化学染色により解析した。CCPD-IgG 投与個体では複数の細かく枝分かれした突起を持つ小型の細胞に、選択的にヒト IgG が沈着する像を認めた(図 9 A)。一方、AN-IgG および HC-IgG 投与群では、投与 IgG の脳室表面(図 9 B)やカニューレ刺入経路(図 9 C)に、無構造かつ非選択的なヒト IgG の沈着ないし残留を認めるのみであり、CCPD-IgG 投与群で見られた特定の小径細胞への投与 IgG の沈着は確認されなかった。

免疫蛍光染色においても免疫組織化学染色での所見に一致し、CCPD-IgG 投与群において小径の枝分かれした突起を持つグリア細胞様の細胞へのヒト IgG 沈着が再現性をもって確認された。この IgG 沈着は、ミクログリアの細胞マーカーである Iba1 の染色性と明瞭に共局在した(図 10 A)。一方で、脳組織での NF155 発現細胞であるオリゴデンドロサイトマーカー MBP との共局在性は認めず(図 10 B)、アストロサイトマーカー GFAP との共局在性も認められなかった(図 10 C)。

CCPD-IgG 脳組織沈着への抗 NF155 抗体の関与の有無

CCPD-IgG が NF155 蛋白局在に一致せずミクログリアに沈着した機序として、① 抗 NF155 抗体を介した免疫応答が副次的にミクログリアによる抗体の捕捉を惹起した可能性、② 同抗体以外の脳組織反応性 IgG を介した現象である可能性、以上の 2 つが想定された。そこで CCPD-IgG 投与個体と NF⁽⁺⁾CCPD-IgG 投与個体の脳組織を免疫蛍光染色で比較し、組織 IgG 沈着への抗 NF155 抗体の関与の有無を検討した。結果、NF⁽⁺⁾CCPD-IgG 投与個体においても、CCPD-IgG 投与個体と同様に Iba1 と共局在するヒト IgG 沈着が認められ(図 11)、抗 NF155 抗体を除去してもミクログリアへの CCPD-IgG の免疫反応性は保持されていた。

マウス脳組織可溶化液を用いた Western blot assay では、CCPD 血清を反応させた際、市販抗 NF155 抗体による約 155kDa の蛋白に対する反応バンドとは異なる、70~80kDa、40kDa 近傍の分子量の蛋白への CCPD 血清 IgG の反応が認められた。一方で AN 血清、HC 血清、市販抗 NF155 抗体の反応レーンには同様のバンドは確認されなかった(図 12)。

第4章 考察

第1節 髄腔内における抗 NF155 抗体の臨床的意義(実験1)

結果の解釈

計7例と少数を対象としており統計学的な2群比較は不可能だったが、CCPD症例でCSF中から高力価で抗NF155抗体を検出し、同病型において中枢神経系に対する抗NF155抗体を介した免疫応答が生じていることを示唆する結果が得られた。また、CSF-NF155抗体活性と髄液蛋白量、Q albumin値の有意な正の相関を認め、抗NF155抗体が中枢神経病変の有無に関わらず血液脳関門、血液神経関門の破綻の程度に応じて血清中からCSFへ移行しているものと推定された。

CSF-NF155 抗体の臨床的意義

上記の結果はCCPD症例CSFより抗NF155抗体が検出されたとする先行研究⁴¹に対応するものであり、一定量の抗体が血清から髄腔内に移行した場合に中枢神経病変を合併してCCPD病型をとることが示唆された。加えて、AN症例においてもCCPDに比し低力価でCSF-NF155抗体が検出された点より、髄腔内に抗NF155抗体が存在しても抗体量が少なければ中枢神経病変を生じない、あるいは不顕性になることが示唆された。すなわち、抗NF155抗体陽性例では、髄腔内に到達した抗体量の多寡により中枢神経病変合併の有無が分けられている可能性があると考えた。

また、本検討では、末梢神経遠位の障害を主とするDistal CIDPよりもTypical CIDPの末梢神経障害様式をとる症例でCSF-NF155抗体が高力価だった。

Typical CIDP では神経根周囲および末梢神経遠位側の障害が併存すると考えられており⁴⁹、神経根近位は髄腔に接しているため抗体の CSF への移行経路となり得る。上述の結果は抗 NF155 抗体の髄腔内移行に神経根近位の障害による血液神経関門の破綻が関与することを示唆すると考えた。先行研究においても、抗 NF155 抗体陽性 AN 症例の CSF 中に特定のサイトカインが増加することを指摘した報告がある⁵⁰。同抗体陽性例における、神経根障害に伴った液性因子の CSF 移行は既報内でも観察されていた可能性があり、前述の推論を支持する。

以上の考察に基づき、実験 2 では抗 NF155 抗体が髄腔内に到達したことを前提として、同抗体の中枢神経組織に対する生物学的影響を検証する動物実験を行った。なお、髄腔内抗 NF155 抗体量が中枢神経障害合併に関与することが推察されたが、一方で同抗体の CSF への出現自体は病型をまたいで確認され CCPD に特異的な現象ではないことを示す結果とも捉えられた。このため、症例間の抗 NF155 抗体機能の差異、もしくは同抗体とは別個の自己抗体といった髄腔内抗体量以外の要因が中枢神経病変合併に関与する可能性も検証可能な条件設定を行った。

第 2 節 抗 NF155 抗体陽性患者 IgG の生物学的作用から推察される中枢神経障害合併規定因子(実験 2)

種々の自己免疫性脳脊髄炎疾患で患者 IgG を用いた受動免疫モデルの報告があり、一部では血液脳関門を超えて病原抗体を中枢神経組織に到達させるため髄腔内投与が行われている⁵¹⁻⁵³。本実験では DeVos らの手法⁵⁴を参考に、経側脳室的に各 IgG 試料を投与した。

結果の解釈

CCPD-IgG、AN-IgG、HC-IgG 投与群の行動解析結果の比較では、day28 時点の foot print test において、HC-IgG 投与群に比し CCPD-IgG 投与群で有意な後肢歩隔の拡大が確認された。Foot print test における歩容変化は行動学的に運動症状の指標として扱われ、歩隔の拡大は脊髄小脳変性症モデルマウスで認められた報告⁵⁵があることから運動失調を示すパラメータと考えられる。同様の行動表現型変化は AN-IgG 投与群では確認されず、長期間にわたり持続髄腔内投与された CCPD-IgG は AN-IgG とは異なる病的作用を有し、協調運動障害を惹起することが示された。一方で、同じく協調運動の評価手法である rotarod では有意差を認めなかった。Rotarod では協調運動の他にも筋力等が交絡要因となるため、2つの行動解析手法の結果が一致しなかったものと考えた。

各 IgG 投与による組織所見の解析結果では、AN-IgG および HC-IgG と異なり、CCPD-IgG はミクログリアに選択的に組織沈着することが示された。中枢神経組織における NF155 蛋白発現細胞であるオリゴデンドロサイトには CCPD-IgG の沈着はなく、吸収処理による抗 NF155 抗体除去を事前に行ったうえで投与した際もミクログリアへの CCPD-IgG 沈着は変わらず認められた。このことから、CCPD-IgG のミクログリアへの免疫反応性は、抗 NF155 抗体以外の中枢神経組織抗原を認識する IgG 抗体によるものであることが示唆され、western blot assay でも NF155 以外のマウス脳組織由来蛋白を認識する IgG 抗体が CCPD 血清中に確認された。

抗 NF155 抗体陽性例における中枢神経障害合併規定因子

一連の検討により、① マウス髄腔内に投与された CCPD-IgG はミクログリ

アに沈着し、運動機能障害を惹起する、② AN-IgG では同様の行動表現型変化および組織学的所見を認めない、③ CCPD-IgG のミクログリア沈着は抗 NF155 抗体非依存的な反応である、④ CCPD 血清は AN 血清と異なり抗 NF155 抗体以外の IgG 型抗脳組織由来蛋白抗体を含有する、以上の 4 点が示された。

上記に基づき、第 1 章第 4 節で論じた機序(1)-(3)それぞれの妥当性を考察する。①②は、等量を髄腔内に投与した場合でも抗 NF155 抗体陽性 IgG が由来症例の病型によって異なる病的作用を示すことを示唆している。これは、髄腔内抗 NF155 抗体量(機序(1))よりも、同抗体機能の差異(機序(2))または同抗体以外の液性因子(機序(3))が中枢神経病変の有無を分けている可能性を支持する。加えて、③④より CCPD-IgG の組織反応性は同抗体以外の併存 IgG 抗体の作用によると考えられ、機序(3)に合致する結果である。すなわち、抗 NF155 抗体関連疾患における CCPD/AN 病型の別は、同抗体の直接的な作用ではなく、それ以外の中枢神経組織を標的とする IgG 抗体が併存するか否かにより規定されるものと考えた。

上記の知見は、複数の自己抗体の併存という要素によって、抗 NF155 抗体陽性例が AN のみならず CCPD というより広い関連臨床スペクトラムを示すことを傍証している。興味深いことに、中枢神経炎症性疾患の病原抗体として確立されている抗 myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)抗体や抗 aquaporin4 (AQP4)抗体陽性患者において、末梢神経障害を合併し血清抗 NF155 抗体陽性だった症例も報告されている^{56,57}。同じく抗 MOG 抗体および抗 AQP4 抗体陽性患者での検討で、血清 IgG 中に血液脳関門障害作用を有する別個の自己抗体が併存しともに病態に関与する、すなわち、特定の免疫病態の完成に複数の病原抗体が共同して働き得ることを指摘する報告もある^{58,59}。これらの臨床的観察お

よび基礎的研究結果は、上述の推論を支持するものと考えられる。

加えて、本研究で確認された抗 NF155 抗体陽性患者血清での複数の病的自己抗体の併存は、自己組織に対する免疫寛容破綻を惹起する背景因子の存在を想定させる。例えば、複数の抗 NF155 抗体陽性 AN 患者コホートにおいて、class II human leukocyte antigen(HLA)に属する HLA-DRB 1*15 アレルを高率に認めたとの報告がある^{60,61}。種々の HLA class II アレルが自己免疫疾患感受性因子として知られ、HLA-DRB 1*15 アレルは全身性エリテマトーデス⁶²、全身性強皮症⁶³、MS との関連⁶⁴が指摘されている。これを一例とした何らかの疾患感受性因子が抗 NF155 抗体陽性患者において複数の免疫病態の重複、中枢/末梢神経障害の併発に重要な役割を果たしている可能性がある。

また、実験 1 の結果で論じたように抗 NF155 抗体陽性 CCPD 症例は同 AN 症例に比し長期的な機能予後が悪い傾向が認められている。

以上を総括し、抗 NF155 抗体陽性症例の診療にあたり、その他の自己抗体の検索が中枢病変合併、およびその後の重症化といった臨床転帰の予測に資する可能性があると考えた。加えて、緒言に記したごとく疾患概念の確立されていない CCPD の少なくとも一部に、共通の疾患感受性因子を背景に複数の免疫病態が重複することで中枢末梢神経系両者の障害を合併するに至った患者群が含まれることが示唆された。

第 3 節 今後の展望

本研究は、抗 NF155 抗体陽性患者における併存自己抗体と CCPD 病型との関連性を指摘するものである。しかしながら、本研究では疾患頻度と血清検体量の希少性により投与 IgG の由来症例を CCPD、AN 各 1 症例ずつしか選択でき

なかった。今回得られた知見が抗 NF155 抗体陽性疾患に広く一般化できるかの確認が課題であり、投与 IgG の由来症例を増やした検討が必要である。

AN-IgG、HC-IgG 投与群間で行動表現型の差異を認めず、Manso ら³⁸の示した抗 NF155 抗体による運動機能障害が再現されなかった点も本研究の限界である。先行研究では抗 NF155 抗体の主要サブクラスが IgG4 であることから患者血清 IgG4 分画のみを精製して投与している。一方、本研究では抗 NF155 抗体以外の病原抗体の存在、あるいは IgG4 サブクラス以外の抗 NF155 抗体が病原性を有する可能性も考慮して全 IgG を投与した。この結果、試料中の病原性を有する抗 NF155 抗体濃度が、先行研究に比して低くなっていた可能性がある。そのため IgG 濃度または総投与量が不足し、同抗体由来の病的作用が検出されなかった可能性は否定できない。今回は保有血清検体量の制限で困難だったが、今後、さらに高濃度あるいは長期間の IgG 投与による実験を検討する必要があると思われる。

また、本研究で見られたミクログリアへの IgG 沈着は、ミクログリア由来抗原を標的とした IgG 抗体の存在を想定させる。ミクログリアは貪食能や液性因子分泌といった種々の生理応答を介して中枢神経組織の恒常性維持、病的状態での炎症担当細胞として機能する⁶⁵。ミクログリアの炎症性中枢神経脱髄疾患への関与としては、活性化ミクログリアによる酸化ストレスが MS でのオリゴデンドロサイト障害に関与するとの報告⁶⁶や、抗 AQP4 抗体陽性視神経脊髄炎におけるアストロサイト障害に活性化ミクログリアが関与するとの指摘⁶⁷がある。今回用いた CCPD 症例では上述のミクログリアに対する IgG 抗体の作用により、炎症反応の誘導、またはミクログリアの活性化といった機能修飾が加えられて中枢神経病変を呈していた可能性がある。今後、各種ミクログリア活性化マー

カーを用いた免疫組織染色や発現解析などの手法で、ミクログリア機能状態変化の有無を検討していきたい。

一方で、ミクログリアはスカベンジャー細胞としての性格を持つ。そのため、前述の IgG 沈着はミクログリア上の抗原への免疫反応ではなく、ミクログリアによる病原抗体の二次的な捕捉、貪食を反映している可能性もあるが、今回の研究からは結論付けることができなかった。今後、ミクログリア培養細胞を用いた免疫組織染色、またはその蛋白可溶化液による免疫沈降法といった手法により、今回見出した併存自己抗体がミクログリア由来蛋白を標的抗原とするかを検証する実験計画が必要である。

第5章 結論

- 1：抗 NF155 抗体は、CCPD、AN 両者において血液脳/神経関門破綻の程度に応じ CSF に出現する。
- 2：髄腔内投与された CCPD 症例 IgG は、抗 NF155 抗体非依存的にミクログリアへ沈着し、AN 症例 IgG と異なる病原性を示す。
- 3：CCPD 症例血清は AN 症例血清と異なり、抗 NF155 抗体以外の IgG 型抗脳組織由来蛋白抗体を含有する。
- 4：抗 NF155 抗体陽性症例の CCPD/AN の病型の別は、同抗体以外の抗中枢神経組織抗体の有無により分けられるものと考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、ご指導ならびに本論文のご高閲を賜りました防衛医科大学校 内科学講座教授 池脇克則先生、同准教授 鈴木一詩先生、同助教 本郷悠先生、同解剖学講座教授 小林靖先生、同生理学講座教授 守本祐司先生、埼玉医科大学総合医療センター脳神経内科教授 海田賢一先生、以上の先生方に深謝申し上げます。

また、実験手法に関する日々のご指導を賜りました防衛医科大学校防衛医学研究センター助教 小牟田縁先生、同解剖学講座実験助手 渡辺まゆみ様、対象症例の臨床情報および検体をご提供いただきました各施設の先生方、臨床情報および検体を解析する機会を与えてくださった患者様方に、厚く御礼を申し上げます。

略語一覽

Ab	antibody
AN	autoimmune nodopathy
BSA	bovine serum albumin
Caspr	contactin-associated protein
CCPD	combined central and peripheral demyelination
CIDP	chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy
CNTN	contactin
cOD	corrected optical density
CSF	cerebrospinal fluid
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
EAN/PNS	European Academy of Neurology/Peripheral Nerve Society
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GFAP	glial fibrillary acidic protein
HC	healthy control
HLA	human leukocyte antigen
Iba1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
Ig	immunoglobulin
IQR	interquartile range
IVIg	intravenous immunoglobulin
MB-lysate	mouse brain lysate

MBP	myelin basic protein
mRS	modified Rankin Scale
MS	multiple sclerosis
NA	no available data,
NF	neurofascin
NGS	normal goat serum
OD	optical density
OP	osmotic pump
PBS	phosphate buffered saline
PFA	paraformaldehyde
PVDF	poly vinylidene di-fluoride
Qalb	Q albumin
SD	standard deviation
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate -polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	Tris buffered saline

引用文献

- 1 AUSTIN JH. RECURRENT POLYNEUROPATHIES AND THEIR CORTICOSTEROID TREATMENT: WITH FIVE-YEAR OBSERVATIONS OF A PLACEBO-CONTROLLED CASE TREATED WITH CORTICOTROPHIN, CORTISONE, AND PREDNISONE. *Brain* 1958; **81**: 157–192.
- 2 Dyck PJ, O'Brien PC, Oviatt KF, Dinapoli RP, Daube JR, Bartleson JD, Mokri B, Swift T, Low PA, Windebank AJ. Prednisone improves chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy more than no treatment. *Ann Neurol* 1982; **11**: 136–141.
- 3 Saperstein DS, Amato AA, Wolfe GI, Katz JS, Nations SP, Jackson CE, Bryan WW, Burns DK, Barohn RJ. Multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy: The Lewis–Sumner syndrome. *Muscle & Nerve* 1999; **22**: 560–566.
- 4 Katz JS, Saperstein DS, Gronseth G, Amato AA, Barohn RJ. Distal acquired demyelinating symmetric neuropathy. *Neurology* 2000; **54**: 615–615.
- 5 Donaghy M, Mills KR, Boniface SJ, Simmons J, Wright I, Gregson N, Jacobs J. Pure motor demyelinating neuropathy: deterioration after steroid treatment and improvement with intravenous immunoglobulin. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 1994; **57**: 778–783.
- 6 Bergh PYKV den, Doorn PA van, Hadden RDM, Avau B, Vankrunkelsven P, Allen JA, Attarian S, Blomkwist-Markens PH, Cornblath DR, Eftimov F, Goedee HS, Harbo T, Kuwabara S, Lewis RA, Lunn MP, Nobile-Orazio E, Querol L, Rajabally YA, Sommer C, Topaloglu HA. European Academy of Neurology/Peripheral Nerve Society guideline on diagnosis and treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: Report of a joint Task Force—Second revision. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2021; **26**: 242–268.
- 7 Kamm C, Zettl UK. Autoimmune disorders affecting both the central and peripheral nervous system. *Autoimmunity Reviews* 2012; **11**: 196–202.
- 8 Bouchard C, Lacroix C, Planté V, Adams D, Chedru F, Guglielmi J-M, Said G. Clinicopathologic findings and prognosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 1999; **52**: 498–498.
- 9 Rotta FT, Sussman AT, Bradley WG, Ram Ayyar D, Sharma KR, Shebert RT. The

- spectrum of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Journal of the Neurological Sciences* 2000; **173**: 129–139.
- 10 Gartzon K, Katzarava Z, Diener H-C, Putzki N. Peripheral nervous system involvement in multiple sclerosis: Peripheral nervous system involvement in multiple sclerosis. *European Journal of Neurology* 2011; **18**: 789–791.
 - 11 Suanprasert N, Taylor BV, Klein CJ, Roforth MM, Karam C, Keegan BM, Dyck PJB. Polyneuropathies and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 2019; **30**: 284–290.
 - 12 Peles E, Salzer JL. Molecular domains of myelinated axons. *Current Opinion in Neurobiology* 2000; **10**: 558–565.
 - 13 Stathopoulos P, Alexopoulos H, Dalakas MC. Autoimmune antigenic targets at the node of Ranvier in demyelinating disorders. *Nat Rev Neurol* 2015; **11**: 143–156.
 - 14 Eshed Y, Feinberg K, Poliak S, Sabanay H, Sarig-Nadir O, Spiegel I, Bermingham JR, Peles E. Gliomedin Mediates Schwann Cell-Axon Interaction and the Molecular Assembly of the Nodes of Ranvier. *Neuron* 2005; **47**: 215–229.
 - 15 Sherman DL, Tait S, Melrose S, Johnson R, Zonta B, Court FA, Macklin WB, Meek S, Smith AJH, Cottrell DF, Brophy PJ. Neurofascins Are Required to Establish Axonal Domains for Saltatory Conduction. *Neuron* 2005; **48**: 737–742.
 - 16 Tait S, Gunn-Moore F, Collinson JM, Huang J, Lubetzki C, Pedraza L, Sherman DL, Colman DR, Brophy PJ. An Oligodendrocyte Cell Adhesion Molecule at the Site of Assembly of the Paranodal Axo-Glial Junction. *J Cell Biol* 2000; **150**: 657–666.
 - 17 Traka M, Goutebroze L, Denisenko N, Bessa M, Nifli A, Havaki S, Iwakura Y, Fukamauchi F, Watanabe K, Soliven B, Girault J-A, Karageorgos D. Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *Journal of Cell Biology* 2003; **162**: 1161–1172.
 - 18 Boyle MET, Berglund EO, Murai KK, Weber L, Peles E, Ranscht B. Contactin Orchestrates Assembly of the Septate-like Junctions at the Paranode in Myelinated Peripheral Nerve. *Neuron* 2001; **30**: 385–397.
 - 19 Thaxton C, Pillai AM, Pribisko AL, Dupree JL, Bhat MA. Nodes of Ranvier Act as Barriers to Restrict Invasion of Flanking Paranodal Domains in Myelinated Axons.

Neuron 2011; **69**: 244–257.

- 20 Pillai AM, Thaxton C, Pribisko AL, Cheng J-G, Dupree JL, Bhat MA. Spatiotemporal Ablation of Myelinating Glia-Specific Neurofascin (NfascNF155) in Mice Reveals Gradual Loss of Paranodal Axoglial Junctions and Concomitant Disorganization of Axonal Domains. *J Neurosci Res* 2009; **87**: 1773–1793.
- 21 Cifuentes-Diaz C, Dubourg O, Irinopoulou T, Vigny M, Lachkar S, Decker L, Charnay P, Denisenko N, Maisonobe T, Léger J-M, Viala K, Hauw J-J, Girault J-A. Nodes of Ranvier and Paranodes in Chronic Acquired Neuropathies. *PLoS ONE* 2011; **6**: e14533.
- 22 Pollard JD, Armati PJ. CIDP - the relevance of recent advances in Schwann cell/axonal neurobiology. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2011; **16**: 15–23.
- 23 Devaux JJ, Odaka M, Yuki N. Nodal proteins are target antigens in Guillain-Barré syndrome. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2012; **17**: 62–71.
- 24 Ng JKM, Malotka J, Kawakami N, Derfuss T, Khademi M, Olsson T, Linington C, Odaka M, Tackenberg B, Prüss H, Schwab JM, Harms L, Harms H, Sommer C, Rasband MN, Eshed-Eisenbach Y, Peles E, Hohlfeld R, Yuki N, Dornmair K, Meinl E. Neurofascin as a target for autoantibodies in peripheral neuropathies. *Neurology* 2012; **79**: 2241–2248.
- 25 Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-Garcia R, Diaz-Manera J, Pardo J, Ortega-Moreno A, Sedano MJ, Gallardo E, Berciano J, Blesa R, Dalmau J, Illa I. Neurofascin IgG4 antibodies in CIDP associate with disabling tremor and poor response to IVIg. *Neurology* 2014; **82**: 879–886.
- 26 Ogata H, Yamasaki R, Hiwatashi A, Oka N, Kawamura N, Matsuse D, Kuwahara M, Suzuki H, Kusunoki S, Fujimoto Y, Ikezoe K, Kishida H, Tanaka F, Matsushita T, Murai H, Kira J. Characterization of IgG4 anti-neurofascin 155 antibody-positive polyneuropathy. *Ann Clin Transl Neurol* 2015; **2**: 960–971.
- 27 Kadoya M, Kaida K, Koike H, Takazaki H, Ogata H, Moriguchi K, Shimizu J, Nagata E, Takizawa S, Chiba A, Yamasaki R, Kira J, Sobue G, Ikewaki K. IgG4 anti-neurofascin155 antibodies in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: Clinical significance and diagnostic utility of a conventional assay. *Journal of Neuroimmunology* 2016; **301**: 16–22.
- 28 Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-Garcia R, Martinez-Hernandez E, Diaz-Manera J, Suárez-Calvet X, Navas M, Araque J, Gallardo E, Isabel Illa. Antibodies to contactin-1 in

- chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: Contactin-1 in Aggressive CIDP. *Ann Neurol* 2013; **73**: 370–380.
- 29 Miura Y, Devaux JJ, Fukami Y, Manso C, Belghazi M, Wong AHY, Yuki N, for the CNTN1-CIDP Study Group. Contactin 1 IgG4 associates to chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with sensory ataxia. *Brain* 2015; **138**: 1484–1491.
- 30 Doppler K, Appeltshauer L, Villmann C, Martin C, Peles E, Krämer HH, Haarmann A, Buttman M, Sommer C. Auto-antibodies to contactin-associated protein 1 (Caspr) in two patients with painful inflammatory neuropathy. *Brain* 2016; **139**: 2617–2630.
- 31 Cortese A, Lombardi R, Briani C, Callegari I, Benedetti L, Manganelli F, Luigetti M, Ferrari S, Clerici AM, Marfia GA, Rigamonti A, Carpo M, Fazio R, Corbo M, Mazzeo A, Giannini F, Cosentino G, Zardini E, Currò R, Gastaldi M, Vegezzi E, Alfonsi E, Berardinelli A, Kouton L, Manso C, Giannotta C, Doneddu P, Dacci P, Piccolo L, Ruiz M, Salvalaggio A, De Michelis C, Spina E, Topa A, Bisogni G, Romano A, Mariotto S, Mataluni G, Cerri F, Stancanelli C, Sabatelli M, Schenone A, Marchioni E, Lauria G, Nobile-Orazio E, Devaux J, Franciotta D. Antibodies to neurofascin, contactin-1, and contactin-associated protein 1 in CIDP. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2019; **7**: e639.
- 32 Vallat J-M, Magy L, Corcia P, Boulesteix J-M, Uncini A, Mathis S. Ultrastructural Lesions of Nodo-Paranodopathies in Peripheral Neuropathies. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2020; **79**: 247–255.
- 33 Koike H, Katsuno M. Macrophages and Autoantibodies in Demyelinating Diseases. *Cells* 2021; **10**: 844.
- 34 Shimizu S, Iijima M, Fukami Y, Tamura N, Nakatochi M, Ando M, Nishi R, Koike H, Kaida K, Koga M, Kanda T, Ogata H, Kira J-I, Mori M, Kuwabara S, Katsuno M. Efficacy and Safety of Rituximab in Refractory CIDP With or Without IgG4 Autoantibodies (RECIPE): Protocol for a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *JMIR Res Protoc* 2020; **9**: e17117.
- 35 Spiegel I, Peles E. Cellular junctions of myelinated nerves (Review). *Molecular Membrane Biology* 2002; **19**: 95–101.
- 36 Bhat MA, Rios JC, Lu Y, Garcia-Fresco GP, Ching W, Martin MSt, Li J, Einheber S, Chesler M, Rosenbluth J, Salzer JL, Bellen HJ. Axon-Glia Interactions and the Domain

- Organization of Myelinated Axons Requires Neurexin IV/Caspr/Paranodin. *Neuron* 2001; **30**: 369–383.
- 37 Koike H, Kadoya M, Kaida K, Ikeda S, Kawagashira Y, Iijima M, Kato D, Ogata H, Yamasaki R, Matsukawa N, Kira J, 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; **88**: 465–473.
- 38 Manso C, Querol L, Lleixà C, Poncelet M, Mekaouche M, Vallat J-M, Illa I, Devaux JJ. Anti-neurofascin-155 IgG4 antibodies prevent paranodal complex formation in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 2019; **129**: 2222–2236.
- 39 Mathey EK, Derfuss T, Storch MK, Williams KR, Hales K, Woolley DR, Al-Hayani A, Davies SN, Rasband MN, Olsson T, Moldenhauer A, Velhin S, Hohlfeld R, Meinl E, Linington C. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *Journal of Experimental Medicine* 2007; **204**: 2363–2372.
- 40 Kira J, Yamasaki R, Ogata H. Anti-neurofascin autoantibody and demyelination. *Neurochemistry International* 2019; **130**: 104360.
- 41 Kawamura N, Yamasaki R, Yonekawa T, Matsushita T, Kusunoki S, Nagayama S, Fukuda Y, Ogata H, Matsuse D, Murai H, Kira J. Anti-neurofascin antibody in patients with combined central and peripheral demyelination. *Neurology* 2013; **81**: 714–722.
- 42 Ogata H, Matsuse D, Yamasaki R, Kawamura N, Matsushita T, Yonekawa T, Hirofumi M, Murai H, Kira J. A nationwide survey of combined central and peripheral demyelination in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016; **87**: 29–36.
- 43 Devaux JJ, Miura Y, Fukami Y, Inoue T, Manso C, Belghazi M, Sekiguchi K, Kokubun N, Ichikawa H, Wong AHY, Yuki N. Neurofascin-155 IgG4 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 2016; **86**: 800–807.
- 44 Graus F, Titulaer MJ, Balu R, Benseler S, Bien CG, Cellucci T, Cortese I, Dale RC, Gelfand JM, Geschwind M, Glaser CA, Honnorat J, Höftberger R, Iizuka T, Irani SR, Lancaster E, Leypoldt F, Prüss H, Rae-Grant A, Reindl M, Rosenfeld MR, Rostásy K, Saiz A, Venkatesan A, Vincent A, Wandinger K-P, Waters P, Dalmau J. A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *The Lancet Neurology* 2016; **15**: 391–404.
- 45 Sokmen O. A case with Neurofascin-155 IgG antibody-associated combined central and peripheral demyelination: Successfully treated with anti-CD20 monoclonal antibody.

Clinical Neurology and Neurosurgery 2021; **210**: 106961.

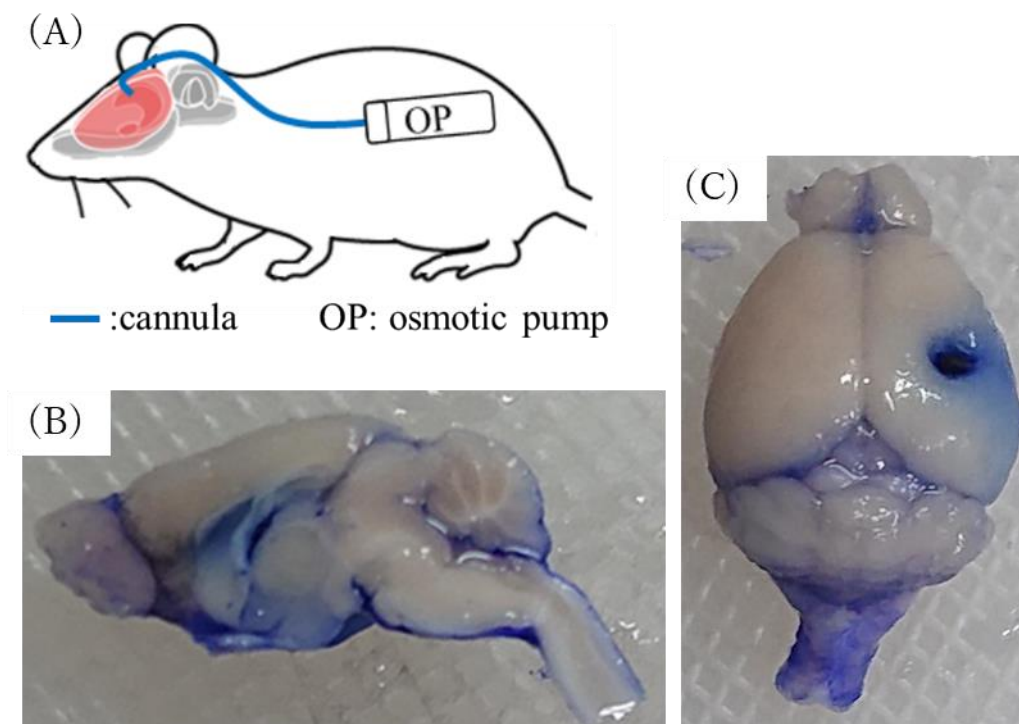
- 46 Paxinos G, Franklin KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, 2001.
- 47 Brooks SP, Trueman RC, Dunnett SB. Assessment of Motor Coordination and Balance in Mice Using the Rotarod, Elevated Bridge, and Footprint Tests. *Current Protocols in Mouse Biology* 2012; **2**: 37–53.
- 48 van Swieten JC, Koudstaal PJ, Visser MC, Schouten HJ, van Gijn J. Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients. *Stroke* 1988; **19**: 604–607.
- 49 Kuwabara S, Misawa S. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: Clinical subtypes and their correlation with electrophysiology: CIDP subtypes and electrophysiology. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 2011; **2**: 41–48.
- 50 Ogata H, Zhang X, Yamasaki R, Fujii T, Machida A, Morimoto N, Kaida K, Masuda T, Ando Y, Kuwahara M, Kusunoki S, Nakamura Y, Matsushita T, Isobe N, Kira J. Intrathecal cytokine profile in neuropathy with anti - neurofascin 155 antibody. *Ann Clin Transl Neurol* 2019; **6**: 2304–2316.
- 51 Geis C, Weishaupt A, Hallermann S, Grünewald B, Wessig C, Wulsch T, Reif A, Byts N, Beck M, Jablonka S, Boettger MK, Üçeyler N, Fouquet W, Gerlach M, Meinck H-M, Sirén A-L, Sigrist SJ, Toyka KV, Heckmann M, Sommer C. Stiff person syndrome-associated autoantibodies to amphiphysin mediate reduced GABAergic inhibition. *Brain* 2010; **133**: 3166–3180.
- 52 Saadoun S, Waters P, Bell BA, Vincent A, Verkman AS, Papadopoulos MC. Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice. *Brain* 2010; **133**: 349–361.
- 53 Wright S, Hashemi K, Stasiak L, Bartram J, Lang B, Vincent A, Upton AL. Epileptogenic effects of NMDAR antibodies in a passive transfer mouse model. *Brain* 2015; **138**: 3159–3167.
- 54 DeVos SL, Miller T. Direct Intraventricular Delivery of Drugs to the Rodent Central Nervous System. *JoVE* 2013; **75**: 50326.
- 55 Perkins EM, Suminaite D, Clarkson YL, Lee SK, Lyndon AR, Rothstein JD, Wyllie DJA, Tanaka K, Jackson M. Posterior cerebellar Purkinje cells in an SCA5/SPARCA1 mouse

- model are especially vulnerable to the synergistic effect of loss of β -III spectrin and GLAST. *Hum Mol Genet* 2016; **25**: 4448–4461.
- 56 Jia K, Zhang X, Zhang L-J, Li L-M, Qi Y, Yi M, Zhang C, Yang C-S, Yang L. Anti-neurofascin-155 antibody-positive neuromyelitis optica spectrum disorders. *Journal of the Neurological Sciences* 2019; **398**: 16–18.
- 57 Rinaldi S, Davies A, Fehmi J, Beadnall HN, Wang J, Hardy TA, Barnett MH, Broadley SA, Waters P, Reddel SW, Irani SR, Brilot F, Dale RC, Ramanathan S. Overlapping central and peripheral nervous system syndromes in MOG antibody-associated disorders. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2020; **8**: e924.
- 58 Shimizu F, Schaller KL, Owens GP, Coteleur AC, Kellner D, Takeshita Y, Obermeier B, Kryzer TJ, Sano Y, Kanda T, Lennon VA, Ransohoff RM, Bennett JL. Glucose-regulated protein 78 autoantibody associates with blood-brain barrier disruption in neuromyelitis optica. *Sci Transl Med* 2017; **9**: eaai9111.
- 59 Shimizu F, Ogawa R, Mizukami Y, Watanabe K, Hara K, Kadono C, Takahashi T, Misu T, Takeshita Y, Sano Y, Fujisawa M, Maeda T, Nakashima I, Fujihara K, Kanda T. GRP78 Antibodies Are Associated With Blood-Brain Barrier Breakdown in Anti-Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibody-Associated Disorder. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2022; **9**: e1038.
- 60 Martinez-Martinez L, Lleixà MaC, Boera-Carnicero G, Cortese A, Devaux J, Siles A, Rajabally Y, Martinez-Piñeiro A, Carvajal A, Pardo J, Delmont E, Attarian S, Diaz-Manera J, Callegari I, Marchioni E, Franciotta D, Benedetti L, Lauria G, de la Calle Martin O, Juárez C, Illa I, Querol L. Anti-NF155 chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy strongly associates to HLA-DRB15. *J Neuroinflammation* 2017; **14**: 224.
- 61 Ogata H, Isobe N, Zhang X, Yamasaki R, Fujii T, Machida A, Morimoto N, Kaida K, Masuda T, Ando Y, Kuwahara M, Kusunoki S, Nakamura Y, Matsushita T, Kira J. Unique HLA haplotype associations in IgG4 anti-neurofascin 155 antibody-positive chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Journal of Neuroimmunology* 2020; **339**: 577139.
- 62 Sirikong M, Tsuchiya N, Chandanayingyong D, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, Luangtrakool K, Srinak D, Thongpradit R, Siriboonrit U, Tokunaga K. Association of HLA-DRB1*1502 - DQB1*0501 haplotype with susceptibility to systemic lupus

- erythematosus in Thais. *Tissue Antigens* 2002; **59**: 113–117.
- 63 He D, Wang J, Yi L, Guo X, Guo S, Guo G, Tu W, Wu W, Yang L, Xiao R, Li Y, Chu H, Lai S, Jin L, Zou H, Reveille JD, Assassi S, Mayes MD, Zhou X. Association of the HLA-DRB1 with Scleroderma in Chinese Population. *PLoS ONE* 2014; **9**: e106939.
- 64 Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M, Shah TS, Patsopoulos NA, Alfredsson L, Anderson CA, Attfield KE, Baranzini SE, Barrett J, Binder TMC, Booth D, Buck D, Celius EG, Cotsapas C, D'Alfonso S, Dendrou CA, Donnelly P, Dubois B, Fontaine B, Fugger L, Goris A, Gourraud P-A, Graetz C, Hemmer B, Hillert J, International IBD Genetics Consortium (IIBDGC), Kockum I, Leslie S, Lill CM, Martinelli-Boneschi F, Oksenberg JR, Olsson T, Oturai A, Saarela J, Søndergaard HB, Spurkland A, Taylor B, Winkelmann J, Zipp F, Haines JL, Pericak-Vance MA, Spencer CCA, Stewart G, Hafler DA, Ivinson AJ, Harbo HF, Hauser SL, De Jager PL, Compston A, McCauley JL, Sawcer S, McVean G. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet* 2015; **47**: 1107–1113.
- 65 Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci* 2020; **14**: 198.
- 66 Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Hoftberger R, Botond G, Esterbauer H, Binder CJ, Witztum JL, Lassmann H. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 2011; **134**: 1914–1924.
- 67 Chen T, Lennon VA, Liu YU, Bosco DB, Li Y, Yi M-H, Zhu J, Wei S, Wu L-J. Astrocyte-microglia interaction drives evolving neuromyelitis optica lesion. *Journal of Clinical Investigation* 2020; **130**: 4025–4038.

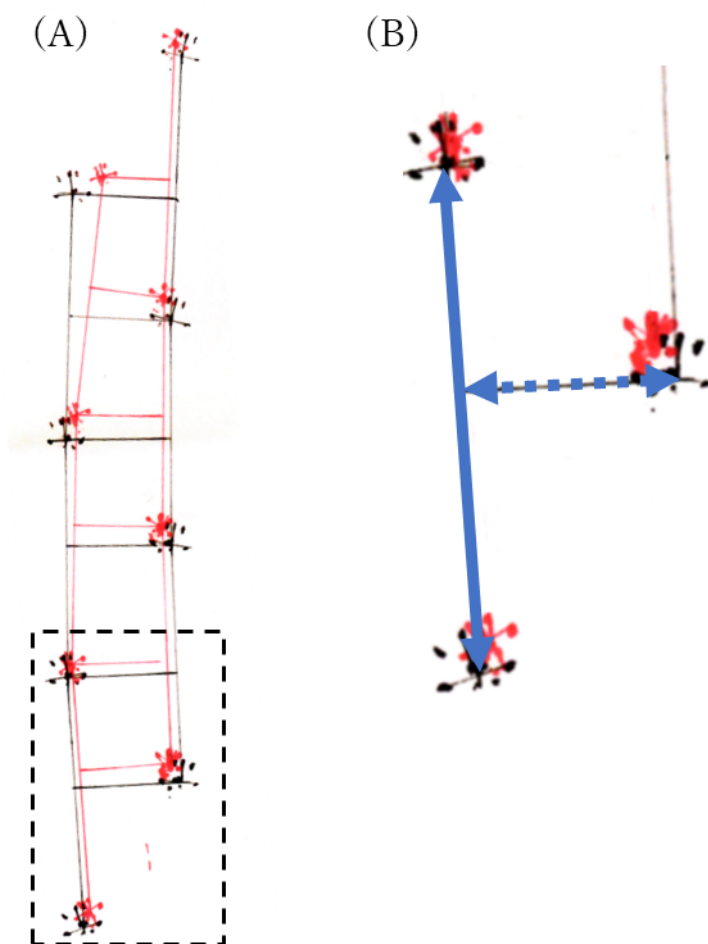
図表

図 1 髄腔内投与経路と試料の髄腔内分布様式



(A) 本研究で用いた慢性髄腔内 IgG 投与実験における、試料投与経路の模式図。
(B),(C) coumarin 混和人工 CSF を 10 日間髄腔内投与した個体から得た脳組織の、正中矢状断面(B)、および背側表面(C)の肉眼所見。右大脳表面のカニューレ刺入部を介して、脳室内および脳表面に広く coumarin 色素の分布を認め、投与試料の広範な髄腔内分布が確認された。

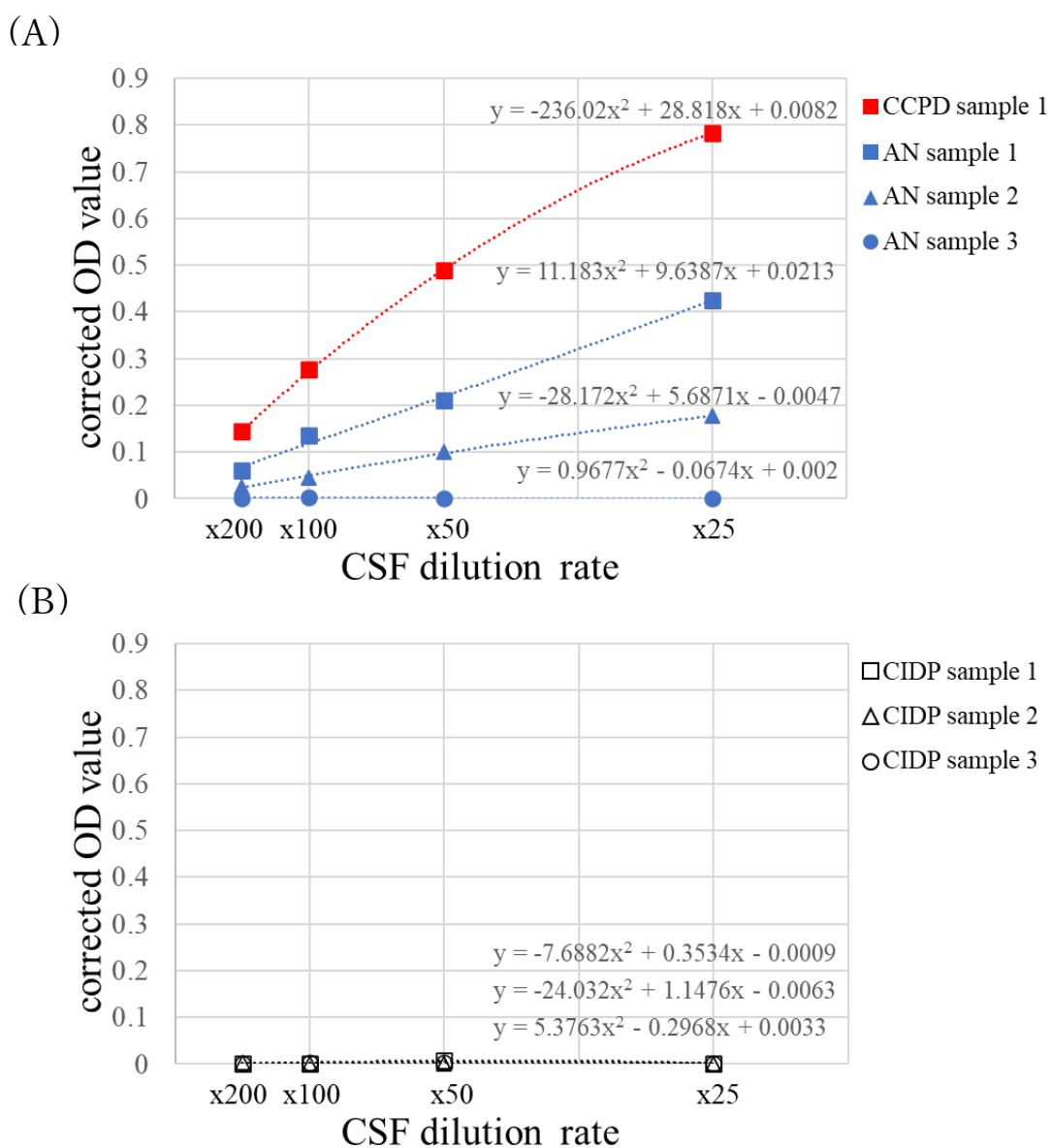
図 2 foot print test の解析手法



(A) 未手術個体の Foot print test で得られた歩容の例示。赤が前肢、黒が後肢の足跡である。図示のように停止・方向転換なく直進する最良の3歩サイクルを解析に用いた。

(B) (A)破線内の拡大図。各矢印で後肢についての解析項目を例示している。青の実線矢印が歩幅(stride length)、破線矢印が歩隔(base width)を表す。

図 3 CSF 希釈濃度と CSF-NF155 抗体 cOD 値の関係

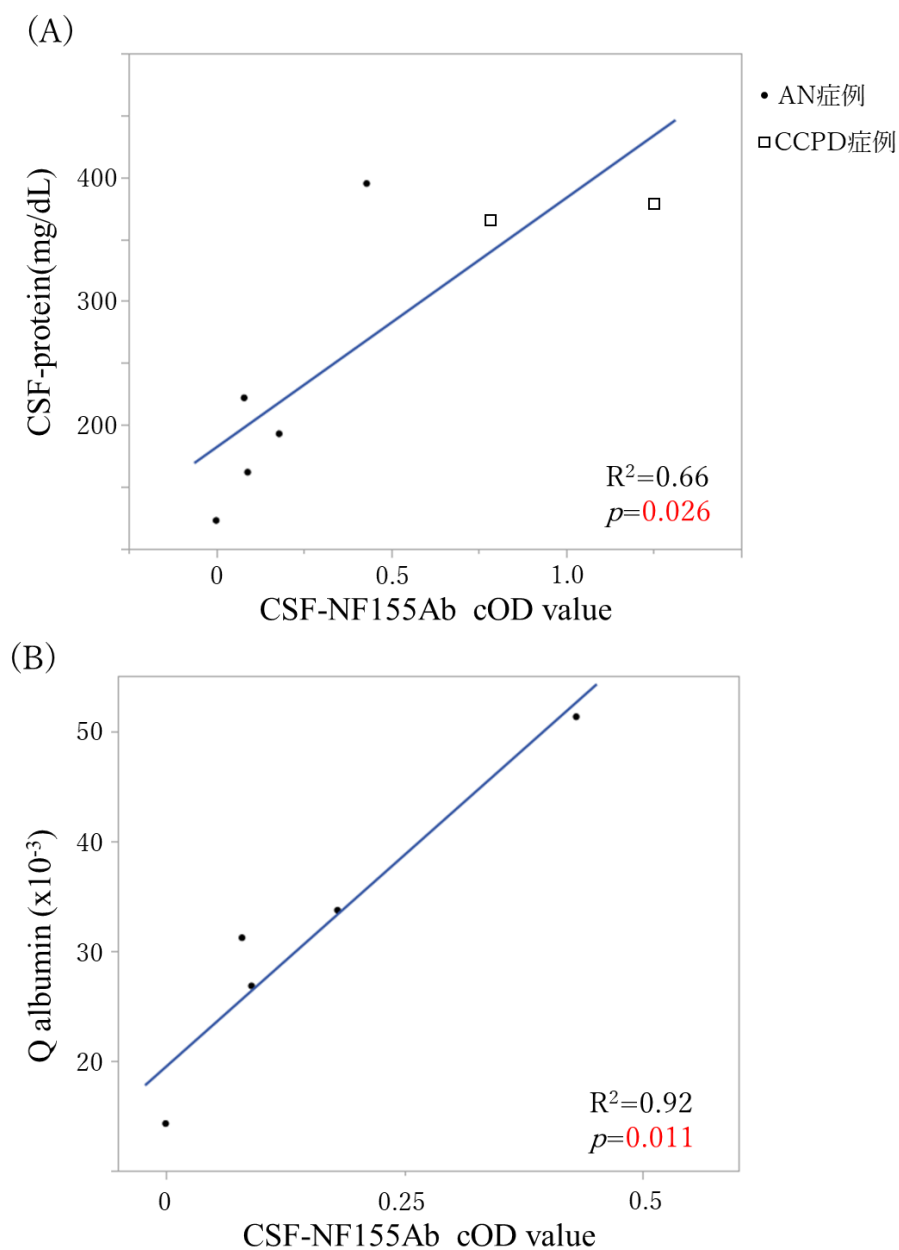


患者 CSF 希釈系列(1:25, 1:50, 1:100, 1:200 希釈)を一次抗体とした ELISA による、CSF 希釈倍率(x 軸)と CSF-NF155 抗体 cOD 値(y 軸)の関係。

(A)は血清抗 NF155 抗体陽性代表例、(B)は同抗体陰性 CIDP 例に由来する CSF の結果であり、各サンプルについての二項式近似曲線を破線で示す。

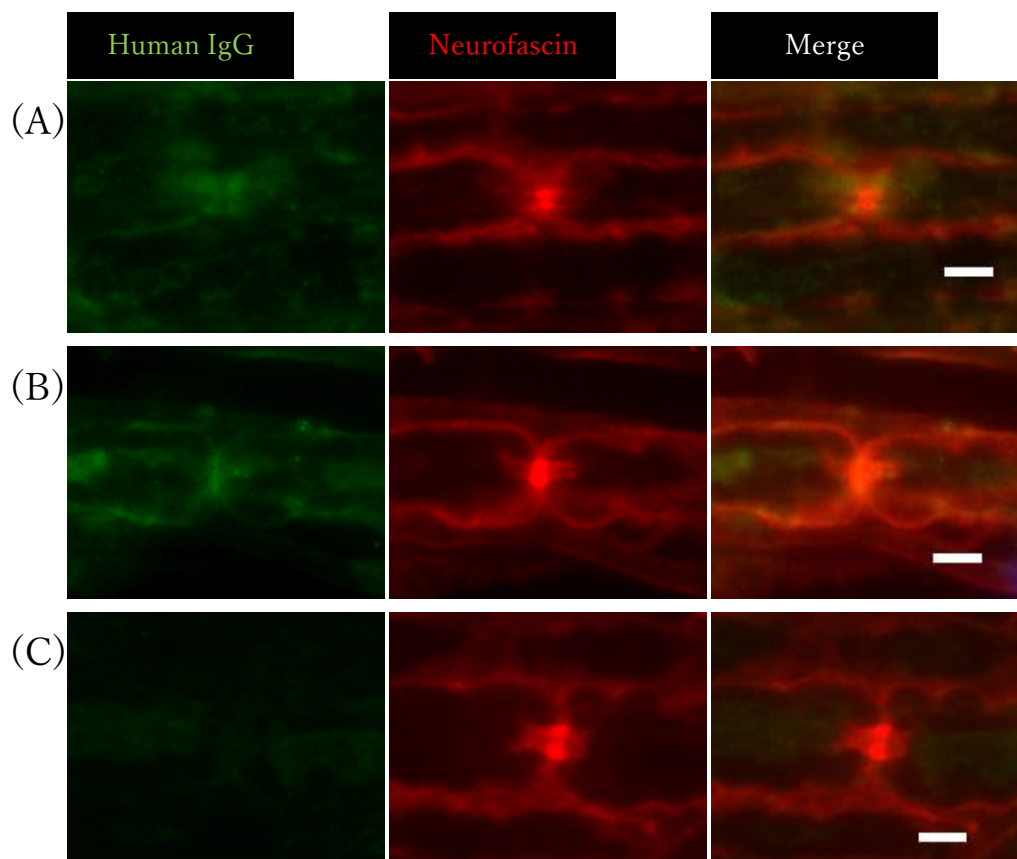
検討範囲で最も高濃度である 1:25 希釈とした際に、(A) 抗体陽性症例間の CSF-NF155 抗体 cOD 値が最も明瞭に分離され、かつ、(B) 抗体陰性コントロールでの非特異的な cOD 値上昇も観察されなかった。

図 4 CSF-NF155Ab 抗体力価と髄液所見の相関



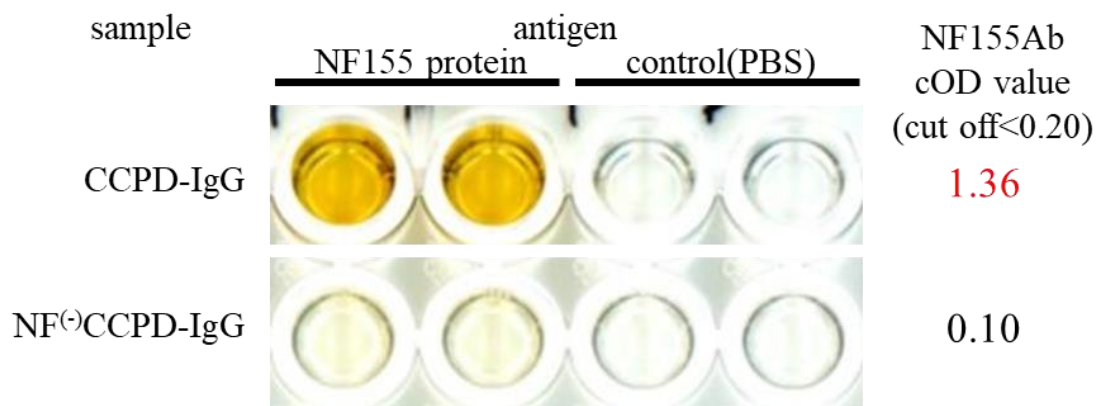
CSF-NF155 抗体 cOD 値と(A)CSF 蛋白量、(B) Q albumin 値、2 者の相関を示した図。グラフ右下に寄与率 R^2 および有意水準 p 、青の実線で単回帰分析による回帰直線を示す。いずれにおいても有意な正の相関が認められた。

図 5 各血清 IgG のマウス神経組織傍絞輪部に対する免疫反応性



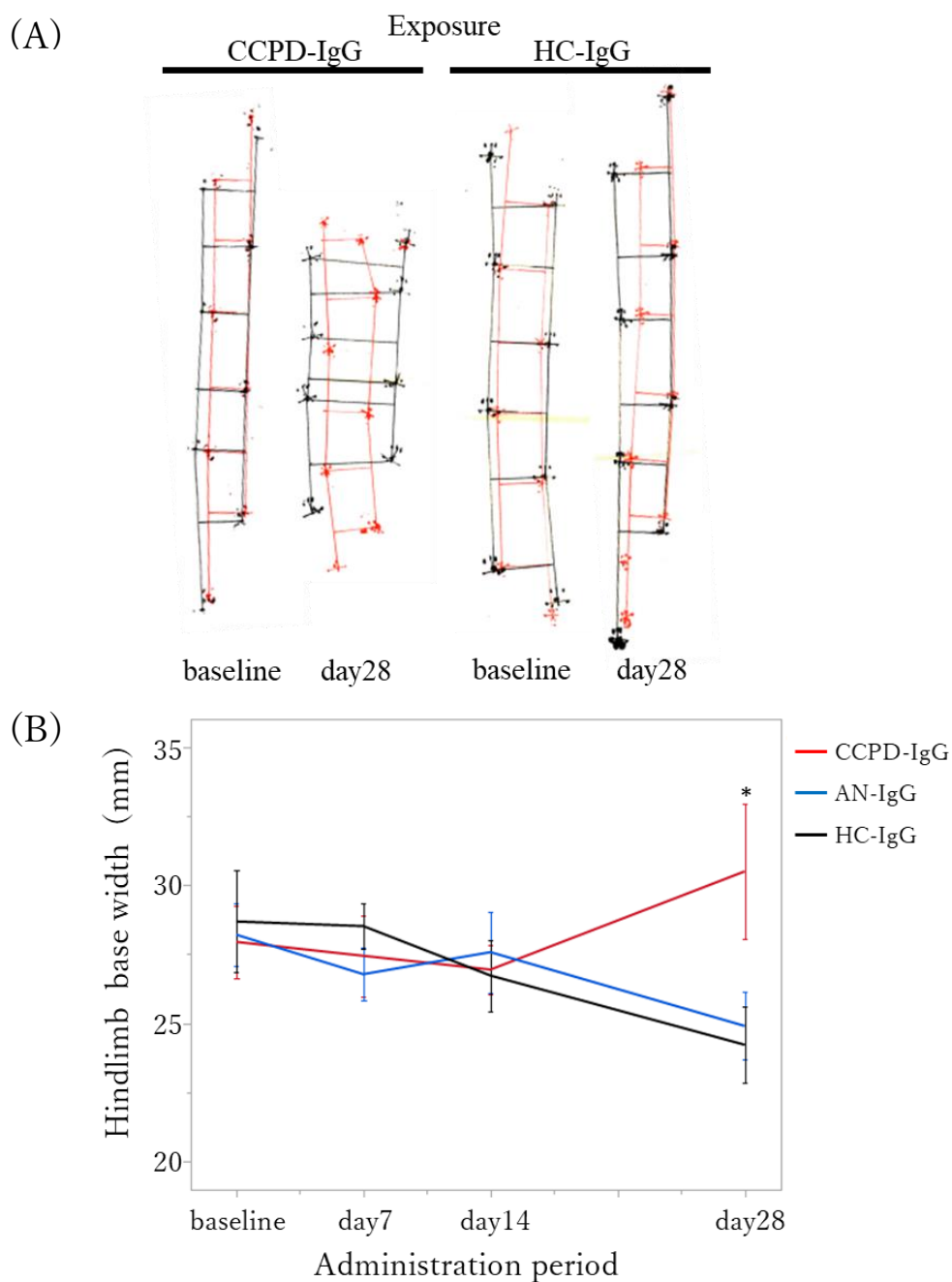
当科保有マウス馬尾凍結組織標本を用いた、(A)CCPD 症例 Patient 6 血清、(B)AN 症例 Patient 3 血清、(C)HC 血清、それぞれの傍絞輪部への IgG 反応性を評価した免疫蛍光多重染色結果。絞輪部周囲を拡大して示す(scale bar : $5 \mu\text{m}$)。100 倍希釈血清および市販抗 pan-neurofascin 抗体(R&D systems)を反応させたのち、FITC 標識 streptavidin を反応させた biotin 標識抗ヒト IgG 抗体、および Rhodamine 標識抗ニワトリ IgY 抗体により可視化している。CCPD 血清および AN 血清中の IgG は、neurofascin の局在に一致して傍絞輪部に対する免疫反応性を有することが確認された。

図 6 CCPD-IgG に対する抗 NF155 抗体吸収処理の確認



抗 NF155 抗体吸収処理前後の、抗 NF155 抗体 ELISA 測定による cOD 値の変化を示した図。CCPD-IgG を反応させたウェルでは明瞭な NF155 蛋白に対する反応が確認された一方、吸収処理後の NF⁽⁻⁾CCPD-IgG では cOD 値の陽性カットオフ 0.2 を下回り、抗 NF155 抗体が測定感度以下まで除去されていた。

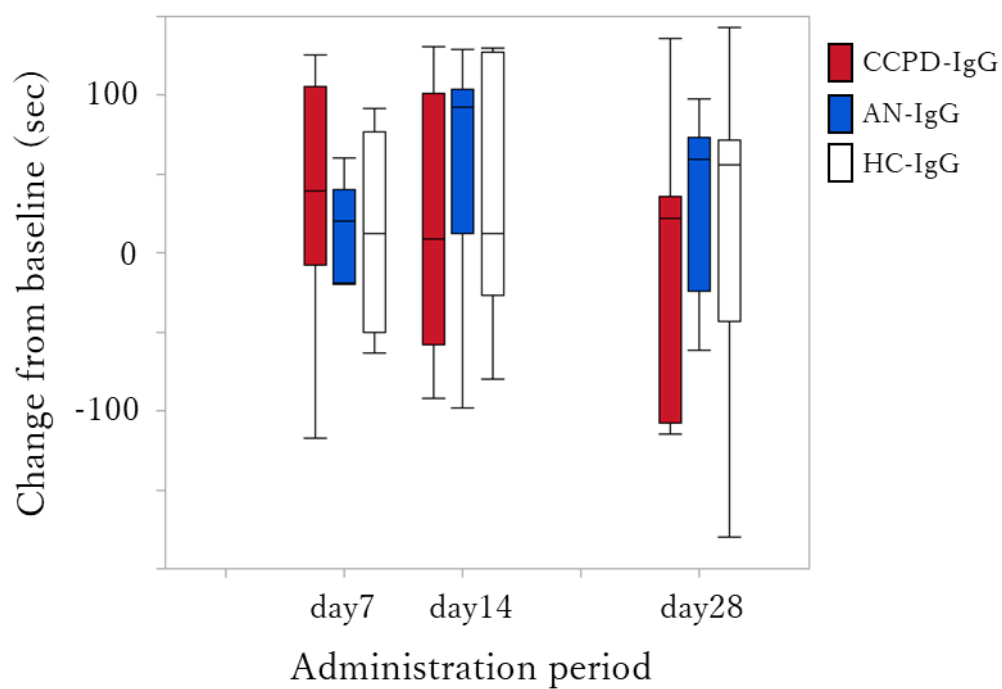
図 7 foot print test における各群の後肢歩隔の経時変化



(A) CCPD-IgG および HC-IgG 投与群代表例の歩容変化。赤が前肢、黒が後肢の足跡である。CCPD-IgG 投与群では day28 時点で後肢歩隔が拡大している。

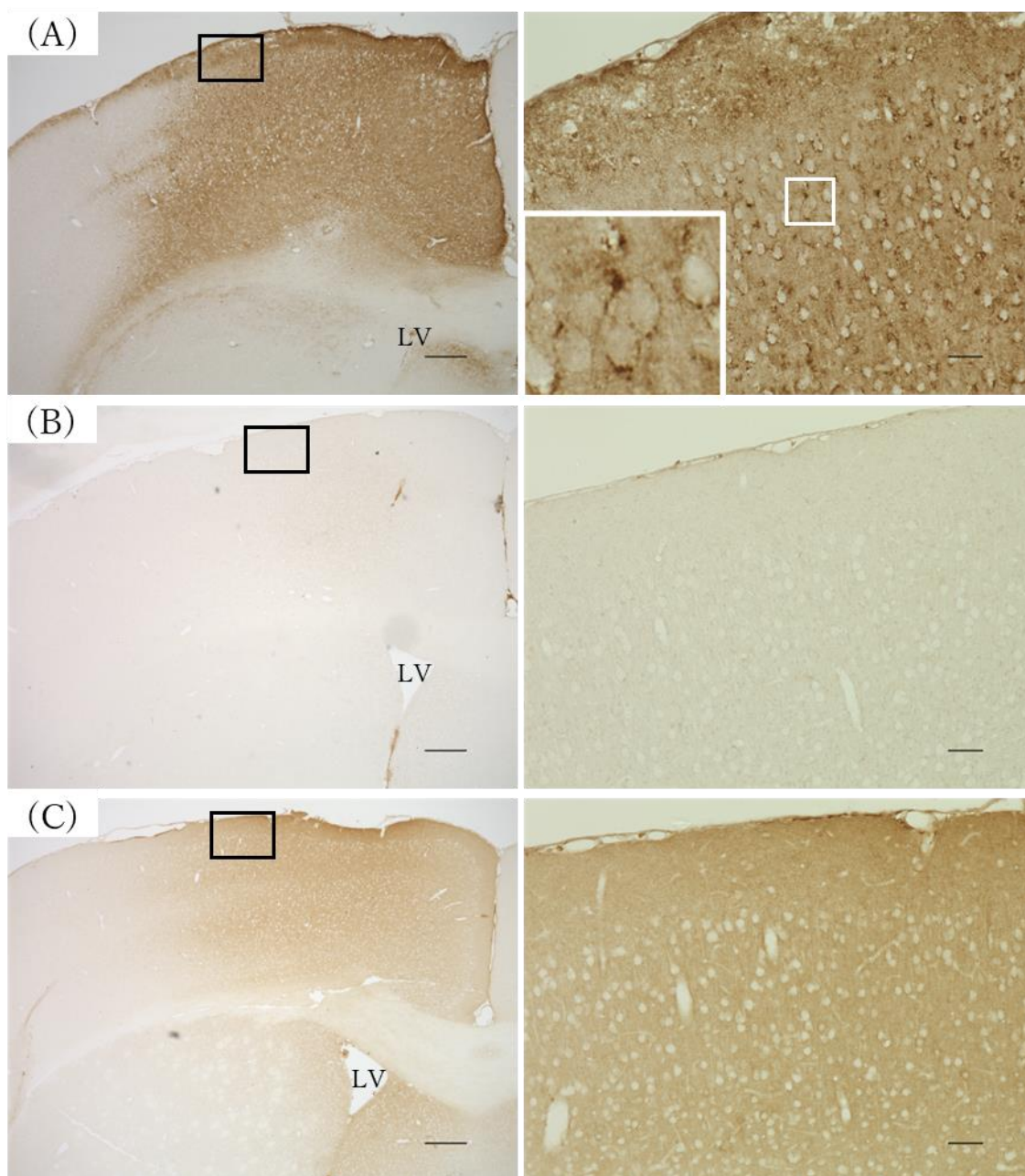
(B) 後肢歩隔の、Dunnett の検定による事後解析結果。実線は各群の後肢歩隔平均値の推移、error bar は各群の標準誤差である。Day28 時点で CCPD-IgG 投与群は HC-IgG 投与群より有意に後肢歩隔が拡大していた(*: $p < 0.05$)。一方で、AN-IgG 群では同様の有意差はなかった。

図 8 accelerating rotarod test の落下潜時変化量



accelerating rotarod test における、baseline 時点に比した各個体の落下潜時変化量を、day7, 14, 28 時点について解析したグラフ。いずれの観察時点においても統計学的な 3 群間有意差は検出されなかった。

図 9 各投与 IgG の組織沈着様式

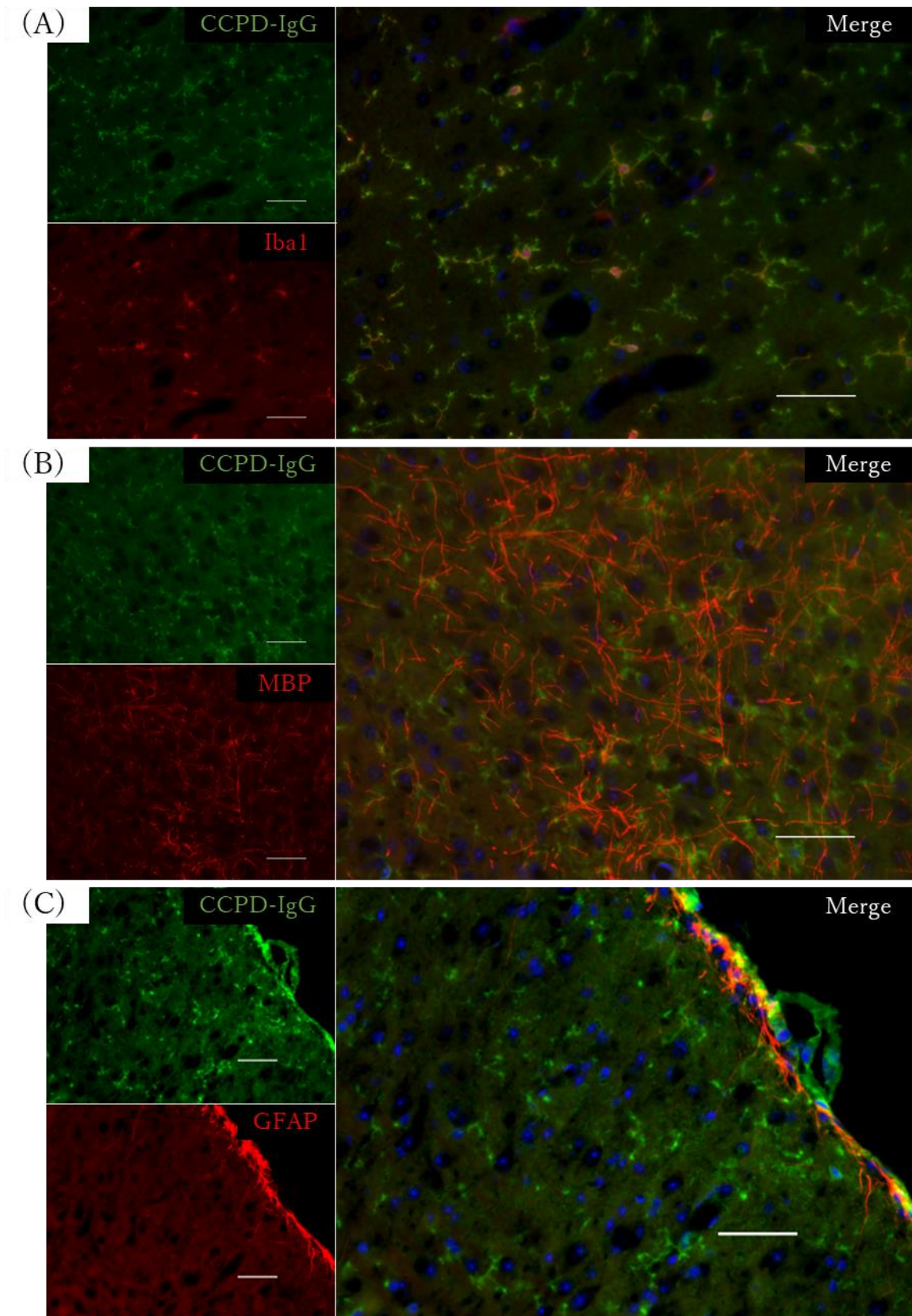


免疫組織化学染色による、各投与 IgG のマウス脳組織沈着様式の解析結果。(A) CCPD-IgG、(B) AN-IgG、(C) HC-IgG 投与個体の右側脳室周囲であり、左に弱拡大(4 倍視野、scale bar: 300 μ m)、右に黒枠内の強拡大(20 倍視野、scale bar: 50 μ m)の像を示す。(A) 強拡大像の白枠に示すように、CCPD-IgG 投与群では細かい枝分かれを有する小径細胞へのヒト IgG 沈着を認めた。

(B), (C) カニューレの刺入部周囲や側脳室表面に無構造な IgG 沈着を認め、非特異的な組織 IgG 残留と思われた。一方で、CCPD-IgG 投与群で見られた細胞種選択的な IgG 沈着は認めなかった。

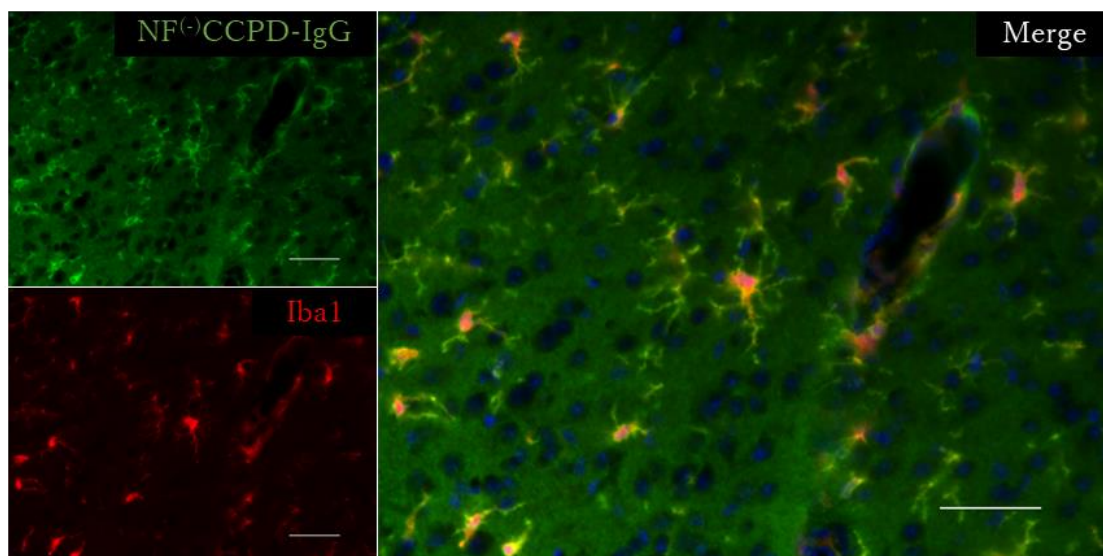
LV: lateral ventricle

図 10 CCPD-IgG の沈着対象細胞の解析



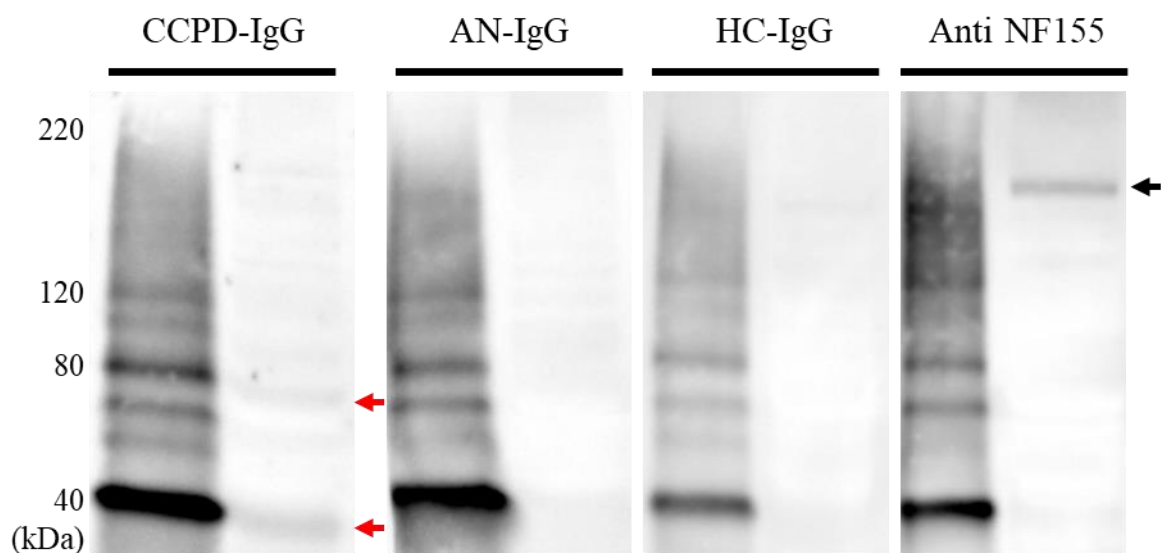
CCPD-IgG 沈着対象細胞の同定を目的とした免疫蛍光多重染色結果。CCPD-IgG 投与個体側脳室周囲白質の強拡大像(40倍視野、scale bar: 50 μ m)であり、ヒト IgG の沈着部位と、(A)ミクログリアマーカーIba1、(B)オリゴデンドロサイトマーカーMBP、(C)アストロサイトマーカーGFAP、それぞれの共局在性を評価している。複数の枝分かれする突起を有する小径細胞への CCPD-IgG の沈着は、MBP、GFAP の局在と一致せず、Iba1 と明瞭に共局在していた。

図 11 抗 NF155 抗体吸収処理の CCPD-IgG 脳組織沈着への影響



NF⁽⁻⁾CCPD-IgG 投与個体の側脳室周囲の強拡大像(40 倍視野、scale bar: 50 μ m)。投与に先立って吸収処理により抗 NF155 抗体を CCPD-IgG から除去しても、NF⁽⁻⁾CCPD-IgG は CCPD-IgG 同様にミクログリアへ沈着した。

図 12 Western blot assay におけるマウス脳由来蛋白への各 IgG の反応性



マウス脳組織由来蛋白に対する、各症例血清 IgG の反応を解析した western blot の結果。左から、CCPD、AN、HC 血清、および市販抗 NF155 抗体を反応させたメンブレンである。各メンブレンには size marker(左レーン)、マウス全脳蛋白可溶化液(右レーン)の泳動済み蛋白が転写されている。

市販抗 NF155 抗体反応メンブレンにおける NF155 蛋白の分子量に一致した 155kDa 付近のバンド(黒矢印)とは異なり、CCPD 症例血清 IgG では 70-80kDa および 40kDa 近傍のバンド(赤矢印)が検出された。

表 1 CSF-NF155 抗体解析対象の臨床プロフィール

Pt.	Age	Diagnosis	Type of neuropathy	mRS at diagnosis	mRS at last visit	IVIg response	CSF protein (mg/dl)	Qalb (x10 ⁻³)	NF155-Ab(cOD) Serum	NF155-Ab CSF	NF155-Ab IgG subclass profile
1	69	AN	Distal	3	2	NA	123	14.3	0.33	0.00	IgG4
2	27	AN	Distal	2	2	good	222	31.2	0.74	0.08	IgG4>IgG2
3	63	AN	Distal	2	1	NA	162	26.8	0.63	0.09	IgG4>IgG2
4	58	AN	Typical	2	2	good	193	33.7	0.82	0.18	IgG4>IgG2>IgG1
5	58	AN	Typical	2	2	poor	395	51.3	0.97	0.43	IgG4>IgG2
6	17	CCPD	Typical	2	4	poor	366	NA	1.09	0.78	IgG4>IgG2 > IgG1
7	44	CCPD	Typical	4	4	good	378	NA	1.32	1.25	IgG4 > IgG2

血清、髄液を共に解析可能だった抗 NF155 抗体陽性患者 7 例の、臨床プロフィール。AN 症例の最終診察時の modified Rankin Scale は 1~2 だった一方、CCPD 症例は 2 例とも 4 だった。CSF-NF155 抗体 cOD 値の平均値は、診断病名ごとに比較すると CCPD で 1.02、AN で 0.16、末梢神経障害病型ごとに比較すると、Typical CIDP 型で 0.66、Distal CIDP 型で 0.06 だった。

Ab: antibody, AN: autoimmune nodopathy, CCPD: combined central and peripheral demyelination, mRS: modified Rankin Scale, IVIg: intravenous immunoglobulin, NA: no available data, Type of neuropathy: CIDP 診断基準に照らした際の末梢神経障害病型, Qalb: Q albumin

表 2 各 IgG 投与群における foot print test の経時変化

Administration period		baseline			day7			day14			day28			
parameter	exposure	mean	SD	<i>p</i>	mean	SD	<i>p</i>	mean	SD	<i>p</i>	mean	SD	<i>p</i>	
stride length	forelimb (mm)	CCPD-IgG	59.6	4.0	0.50	53.7	5.9	0.07	52.2	7.4	0.93	51.5	9.6	0.41
		AN-IgG	54.7	9.3		53.7	5.0		53.3	3.2		57.6	4.9	
		HC-IgG	57.4	8.5		47.6	5.0		52.9	4.9		52.9	9.0	
	hindlimb (mm)	CCPD-IgG	58.2	4.8	0.44	52.8	6.0	0.15	51.4	8.7	0.98	51.3	8.5	0.32
		AN-IgG	53.2	8.7		51.7	5.3		52.2	3.5		57.4	4.3	
		HC-IgG	55.6	7.5		47.0	5.5		51.6	5.4		51.1	10.2	
base width	forelimb (mm)	CCPD-IgG	19.1	2.5	0.87	18.8	2.8	0.52	18.6	1.3	0.42	19.6	2.3	0.56
		AN-IgG	18.5	2.5		17.6	1.2		20.4	1.6		18.2	1.6	
		HC-IgG	18.7	2.0		19.1	3.2		20.3	4.2		19.0	2.8	
	hindlimb (mm)	CCPD-IgG	28.0	3.5	0.94	27.5	3.9	0.55	27.0	2.4	0.88	30.5	6.5	<0.05
		AN-IgG	28.2	3.0		26.8	2.5		27.6	3.6		24.9	3.0	
		HC-IgG	28.7	4.9		28.5	2.2		26.7	3.4		24.2	3.6	

CCPD, AN, HC-IgG 投与群の foot print test の結果。上段に歩幅(stride length)、下段に歩隔(base width)の各時点における 3 群間有意差の検定結果を示す。前後肢の歩幅および前肢の歩隔には全観察時点を通して 3 群間有意差を認めなかった一方、後肢歩隔では day28 時点において 3 群間有意差を認めた($p=0.047$)。

SD: standard deviation

表 3 各 IgG 投与群における accelerating rotarod test の経時変化

Administration period		baseline			day7			day14			day28		
parameter	exposure	median	IQR	<i>p</i>	median	IQR	<i>p</i>	median	IQR	<i>p</i>	median	IQR	<i>p</i>
fall latency (sec)	CCPD-IgG	178	128 - 260	0.48	234	191 - 275	0.08	208	185 - 259	0.52	188	148 - 214	0.90
	AN-IgG	139	116 - 170		168	111 - 239		207	178 - 261		186	173 - 214	
	HC-IgG	146	110 - 255		186	115 - 214		184	156 - 237		199	103 - 243	
change from baseline (sec)	CCPD-IgG				-39.7	-8.0 - 105.7	0.51	9.0	-58.0 - 101.3	0.67	21.7	-107.3 - 35.7	0.45
	AN-IgG				20.0	-18.7 - 40.3		92.3	-12.7 - 104.0		59.7	-23.9 - 73.7	
	HC-IgG				12.7	-50.3 - 76.7		12.3	-26.7 - 127.3		56.0	-43.0 - 71.3	

CCPD, AN, HC-IgG 投与群の accelerating rotarod test の結果。上段に落下潜時、下段に各個体の baseline からの落下潜時変化量を用いた 3 群間有意差の検定結果を示す。落下潜時、および落下潜時変化量は、いずれも全観察時点を通して 3 群間有意差を認めなかった。

IQR: interquartile range