

**NMO sera down-regulate AQP4 in human  
astrocyte and induce cytotoxicity independent of  
complement**

(NMO 患者血清は補体非依存性にヒトアストロ  
サイト株の AQP4 発現低下と細胞傷害をきた  
す)

申請者氏名：春木 明代

申請者所属：山口大学大学院医学系研究科神経内科学

作成年月：平成 26 年 1 月 10 日

## 目次

要旨	3
----	---

### 研究の背景

1. はじめに
2. 視神経脊髄炎 (NMO) とは 疾患概念
3. アクアポリンの構造と機能
4. アストロサイトとアクアポリン 4
5. NMO の病理学的側面
6. NMO の病態と抗 AQP4 抗体
7. 細胞株を用いた実験系の報告
8. ヒトアストロサイト不死化細胞株について
9. NMO の病態におけるサイトカインの関与

目的	7
----	---

方法	8
----	---

結果	12
----	----

考察	23
----	----

結語	26
----	----

参考文献	27
------	----

## 要旨

視神経脊髄炎 (Neuromyelitis optica, NMO) 患者の血清中にはアストロサイト (AST) の足突起に局在するアクアポリン 4 (AQP4) に対する抗体が存在し, NMO 症状の発症および進展に深く関与している. 抗 AQP4 抗体が補体介在性に AST を傷害することが病態の本質とされているが, その詳細な機序は未だ不明である. このため, 抗 AQP4 抗体を用いた *in vitro* での AST 傷害機序の解明は NMO の病態を理解する有力な手段の一つとなりうる.

我々は, 抗 AQP4 抗体の AST に対する効果を検証する目的で, ヒト AST に温度感受性ラージ T 抗原をレトロウイルスを用いて導入し, 条件的不死化細胞株を作製した. 得られた AST 株にヒト AQP4 (M23) の cDNA をレトロウイルスを用いて導入し, AQP4 を強発現したヒト AST 不死化細胞株 (AQP4 導入 AST 株, hAST-AQP4 株) を樹立した. 同細胞株に NMO 患者血清および補体を作用させ, 形態学的変化, 細胞傷害の定量的解析, AQP4 の蛋白量の変化を免疫細胞化学的手法を用いて検討した. NMO 患者血清を作用させると AST の足突起が縮小し, AQP4 は AST の細胞質内に顆粒状に集積し, AST 細胞傷害を生じた. 補体を添加すると AST は膨化し, 死滅細胞は増加した. NMO 患者血清を作用させると AQP4 は mRNA レベル, 蛋白レベルで減少し, AQP4 の発現の減少に並行して AST 傷害, 死滅を生じ, 補体の介在でより一層のダメージが加わった. NMO 患者血清により AST では TNF $\alpha$ , IL-6 の mRNA は増加し, NMO 患者血清と TNF $\alpha$ , IL-6 の中和抗体を同時に作用させると AST の細胞傷害は阻害され, AQP4 蛋白量も正常化した. 抗 AQP4 抗体の補体介在性 AST 傷害以外に AST 自体が分泌する炎症性サイトカインによる autocrine 作用が AST 傷害をきたす機序の一つである可能性が考えられた. AST とヒト脳微小血管内皮細胞 (Brain microvascular endothelial cell, BMEC) との共培養では, BMEC 側に面した足突起への AQP4 蛋白の局在がみられた.

hAST-AQP4 株および BMEC を含むヒト血液脳関門構成細胞株を用いた *glio-vascular unit model* は, NMO の病態を解明する有力なツールとなりうるとともに, 炎症性サイトカインの産生を抑制することが治療法のひとつになる可能性が考えられた.



## 研究の背景

### 1. はじめに

視神経脊髄炎 (Neuromyelitis optica, NMO) は重度の視神経炎と横断性脊髄炎を特徴とする炎症性中枢神経疾患である。従来は多発性硬化症 (Multiple sclerosis, MS) の亜型とされてきたが、近年、NMO 患者の血清中には、中枢神経のアストロサイト (astrocyte, AST) の足突起に高密度に発現する水チャネルの一つであるアクアポリン 4 (aquaporin 4, AQP4) に選択的に結合する<sup>1)</sup>自己抗体 (NMO-IgG) が特異的に検出されることが判明し、MS とは異なる疾患であることが明らかになった<sup>2),3)</sup>。現在も NMO の発症メカニズムは解明されていないが、何らかの理由により血液脳関門 (Blood-brain barrier, BBB) が障害され、NMO-IgG や補体、白血球成分が中枢神経内に進入し、NMO-IgG が AST 上の AQP4 に結合し、AST が傷害され病態が進展していくと想定されている。したがって、NMO-IgG と培養 AST を用いた AST 傷害機序の解明は NMO の病態を解明する有力な手段の一つになりうると考えられる。本研究では NMO の病態解析に有用と考えられるヒト AST 株を樹立し、NMO 患者血清を用いて AST 傷害をきたす分子メカニズムの解析を行った。

### 2. 視神経脊髄炎 (NMO) とは

NMO は、重度の視神経炎と 3 椎体以上の長い横断性脊髄炎を特徴とする、再発性炎症性中枢神経疾患である<sup>4)</sup>。同じく、時間的、空間的に多発する中枢神経病変を呈する疾患として MS があり、NMO と MS の異同が長年議論されてきたが、2004 年、NMO 患者の血清中に中枢神経系の軟膜や血管周囲に特異的に反応する NMO-IgG が見出された<sup>3)</sup>。NMO-IgG は北米および日本の NMO 症例の 60~80% で陽性であったが、MS をはじめとする他の神経疾患ではすべて陰性であった。2005 年にその対応抗原が AST の足突起に高密度に発現する AQP4 であることが報告され<sup>1)</sup>、NMO-IgG は現在では実質的には抗 AQP4 抗体であると考えられている。AQP4 は水チャネルの一つで、脳や脊髄の AST の足突起に高密度に発現する膜蛋白である<sup>5)</sup>。培養細胞および剖検症例の検討により、NMO では補体介在性に抗 AQP4 抗体が AQP4 を標的として AST を傷害する疾患であることがわかり<sup>6),7)</sup>、臨床的にも脳脊髄液中グリア細胞線維性酸性タンパク質 (glial fibrillary acid protein, GFAP) が NMO 急性期で増加していることが報告され<sup>8)</sup>、臨床像のみならず病態としても NMO は MS とはまったく異なる疾患であることが明らかになってきた。このことから NMO は、AST を特異的に傷害する新たなカテゴリーの自己免疫疾患 (アストロサイトパチー) と考えられている<sup>9)</sup>。



### 3. アクアポリンの構造と機能

アクアポリン (aquaporin, AQP) は、水を選択的に通すチャネルとして同定された膜タンパクで、水を効率的に通す NPA ボックス (アスパラギン・プロリン・アラニンによる配列) と呼ばれる特徴的な配列を持つ膜 6 回貫通型蛋白である。1つの蛋白質が1つのチャネルを形成し、4量体をとることで機能的に安定している。哺乳類では AQP0 から AQP12 の 13 種類が報告されている。中でも AQP4 は中枢神経系に高発現していることが知られており、下垂体・視交叉上核といった脳室周囲器官、灰白質や白質などの血管周囲に多く発現し<sup>10), 11)</sup>、血管と脳実質、脳実質と脳脊髄液腔の双方向性の水の移動を調節している<sup>12), 13)</sup>。

### 4. アストロサイトとAQP4

AST には AQP1, AQP4, AQP9 が発現している。このうち、AQP4 は AST の足突起に多く発現する<sup>5)</sup>。AQP4 には開始コドンであるメチオニンの位置により、M1 と M23 のアイソフォームが存在する。AQP4 は 4 量体を一つの単位として存在するが、AQP4-M1 ではパルミトイル結合によるシステイン残基を含む構造を細胞内の N 末端に有するため、AQP4 の 4 量体単位同士での重合が阻害される<sup>14)</sup>。そのため、AQP4-M1 で構成された 4 量体の 95% は単独の膜内粒子として存在する。一方 AQP4-M23 で構成された 4 量体は 95% が集簇し、85% は 100 個以上の 4 量体がシート状に固まって存在することが知られている<sup>15)</sup>。AQP4-M23 は足突起に多く存在するが、AQP4-M1 ではこのような局在はみられず、AST 膜上全体に分布している。AQP4 は  $\beta$ -ジストログリカンや  $\alpha$ -ジストロフィンなどとともに、AST 膜上でアレイ構造 (orthogonal arrays of intramembranous particles, OAPs) と呼ばれる複合体を形成し、血管周囲での AST 自体の形態を維持するアンカー蛋白の一つと考えられている<sup>16), 17)</sup>。さらに、OAPs の周囲にはグルタミン酸トランスポーター (Excitatory Amino Acid Transporter, EAAT) の一つである EAAT 2 や内向き整流性カリウムチャネルである Kir 4.1 などが存在し、細胞内外の水を含む物質の出し入れなどにかかわっている。Nicchia らは、NMO-IgG が主にこの OAPs 構造を認識することを明らかにした<sup>18)</sup>。Crane らは HELA 細胞に M1 や M23 をそれぞれ導入した系を用いて、抗 AQP4 抗体はおもに AQP4-M23 を認識し、OAPs 構造に関連して結合することを示唆した<sup>19)</sup>。

### 5. NMO の病理学的側面

NMO の剖検脊髄標本を用いた免疫組織学的検討から、三須らは NMO 病変では AQP4 の染色性が低下しており、特に免疫グロブリンや活性化補体が沈着した小血管周囲で著明であることを報告した<sup>7), 20)</sup>。NMO 病変では、AQP4 同様、AST に特異的な GFAP の



染色性も低下していたが、髄鞘に特異的なミエリン塩基性タンパクは比較的保たれていた。また、NMOの急性増悪期に脳脊髄液GFAP濃度が著明に上昇することも報告されている<sup>8)</sup>。これらの知見は、MSと大きく異なり、NMOではAQP4を標的としたAST傷害が主な病態であることを示唆している。

## 6. NMOの病態と抗AQP4抗体

*In vitro*の実験系では、ウイルスベクターを用いてAQP4を強制的に発現させたHEK293細胞に対して、NMO患者血清による作用が検討された<sup>12),21)</sup>。抗AQP4抗体を投与すると、補体介在性の細胞障害 (complement dependent cytotoxicity, CDC) の結果細胞膜上に発現するAQP4が短時間で分解して減退し、細胞内に取り込まれること、AQP4が分解した後も細胞膜の構造は保たれて細胞自体は死なないこと、上清から抗AQP4抗体を除くとAQP4が再発現することなどが報告された。また、一次培養ASTを用いた検討では、抗AQP4抗体によって同細胞はネクローシスを起こして補体依存性に細胞死が誘導されることが報告された<sup>21)</sup>。

抗AQP4抗体により抗体依存性に細胞障害 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) が起こり、細胞間の接着能の低下やグルタミン酸トランスポーターであるEAAT2の発現が低下して、細胞外グルタミン酸の取り込み能が低下し、抗AQP4抗体によって機能的なAST障害を来すことが示唆された。また、一次培養系のASTと血管内皮細胞の共培養系を用いた検討では、AQP4は血管内皮に接着する面に対して極性を持って発現するが、補体介在性にAQP4が細胞質内へと取り込まれるとともにASTが形態変化を来し、BBBの透過性が充進して好中球などの炎症細胞の浸潤が促され、結果としてAST自体も抗体・補体依存性に障害されることが報告されている<sup>22)</sup>。

NMOでのAST傷害については、複数のグループが*in vitro*で抗AQP4抗体 (IgGサブクラスはIgG-1) が補体の活性化を介してASTを傷害することを報告している<sup>6), 21)-23)</sup>。実際のNMO症例において、視床下部や延髄最後野<sup>7), 12)</sup>、脊髓中心灰白質などAQP4が高密度に発現している部位に病変が生じやすいことも抗AQP4抗体がNMOの病因に密接に関わっていることを示唆していると思われる。

## 7. 細胞株を用いた実験系の報告

AST傷害の詳細なメカニズムを解析する上で、細胞株の樹立が必須となるが、これまで、*in vitro*の系でNMO病態解明のために用いられた細胞は、AQP4-M1強発現のHEK293細胞<sup>6), 21)</sup>、AQP4-M23強発現のHEK293細胞<sup>24)</sup>、ラットのprimary AST<sup>23)</sup>、マウスのprimary AST<sup>25), 26)</sup>、嚙歯類のAST<sup>21), 24)-26)</sup>であった。NMOはアストロサイトパチーであるが、ヒトAST株を用いて、AQP4の定量的解析をなされた報告はない。さらに、

NMO 病態解明のために、ヒト AST 不死化細胞株とヒト内皮細胞不死化細胞株との共培養がなされた報告もない。この理由として、ヒト primary AST は継代を重ねるとすぐに死滅するため、継続的な研究が困難であること、蛋白レベルで解析可能な十分量の AQP4 の発現が見られないという問題点が考えられた。

#### 8. ヒト AST 不死化細胞株について

温度感受性 SV40 ラージ T 抗原 (tsA58) を導入したラットから得られた AST 株は、33°C の条件下で培養すると SV40 が活性化し不死化するが、37°C の条件下にすると SV40 が不活化するという条件的不死化の特性、および生理的な機能も保持するという報告がある<sup>27), 28)</sup>。我々は、条件的不死化という手法をヒト AST 株に用いることで、継続的な研究が可能となった。

#### 9. NMO の病態に対するサイトカインの関与

AST は、細胞自身で IL-6, TNF $\alpha$  などのサイトカインを分泌すると報告されている<sup>29)~31)</sup>。また、NMO では急性増悪期の脳脊髄液や血中で IL-6 の濃度が著明に上昇しており<sup>32)</sup>、脳脊髄液 IL-6 濃度と脳脊髄液 GFAP 濃度の有意な相関も報告されている。また、実験的研究では、マウスの脊髄のスライスに NMO-IgG と IL-6, TNF $\alpha$  をあわせて作用させると、NMO-IgG のみを作用させた場合と比較して脊髄障害が増悪することが報告されている<sup>33)</sup>。これらの報告から、IL-6 や TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインが NMO の病態に関わっている可能性が考えられ、抗サイトカイン療法の有効性が期待される。

### 目的

NMO 患者の血清中には、AST の足突起に局在する AQP4 に対する抗体である NMO-IgG が存在し、NMO 症状の発症および進展に深く関与していると想定されているが、その発症メカニズムは、いまだ完全には解明されていない。このため、NMO の病態機序を解明することを目的としてヒト AST 株を樹立し、NMO 患者血清を用いて AST 傷害をきたす分子メカニズムの解析を行った。

### 方法

#### 1. 抗体と血清, 補体

一次抗体の polyclonal rabbit anti-AQP4 (H 80), polyclonal rabbit anti-GFAP, polyclonal goat anti-excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2), polyclonal mouse anti- $\beta$ -actin は Santa



Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, U.S.A.)から購入した。中和抗体の polyclonal anti-interleukin (IL)-6, anti-TNF $\alpha$  は R&D systems (Minneapolis, Minnesota, U.S.A.) から購入した。二次抗体の HRP 標識 Rabbit anti Goat IgG は Millipore (Billerica, Massachusetts, U.S.A.)より購入し、二次抗体の FITC Goat-Anti Rabbit IgG は Invitrogen (Carlsbad, California, U.S.A.) から入手した。

血清は5人の抗 AQP4 抗体陽性の NMO 診断基準を満たした<sup>4)</sup>患者および健常人から得た。抗 AQP4 抗体測定は既知の報告に基づいて測定した<sup>34)</sup>。簡潔に述べると、HEK293 細胞に AQP4 を強発現させ患者血清を反応させ、二次標識抗体を用いて間接蛍光抗体法で測定する方法 (cell-based assay) である。血清の採取に当たり、山口大学医学部倫理委員会による承認を得た後に患者本人への十分な説明を行い、研究への協力を文書で説明し同意を得た。個人が特定できないようにサンプルの匿名化に配慮し、プライバシーの保護に万全を尽くした。血清は NMO 発症から 7 日以内で使用まで -80°C 保存した。すべての血清は 56°C で 30 分間非働化処理を行った。

補体はウサギ補体を Cedarlane Laboratories (Burlington, Ontario, Canada) から入手した。

## 2. 培地と細胞

ヒト primary AST は Lonza (Walkersville, Maryland, U.S.A.) より購入した。DH-BNBs はヒト神経内膜内微小血管内皮不死化細胞株で我々がヒト坐骨神経から樹立した細胞株である<sup>35)</sup>。TY09 細胞は、ヒト脳微小血管内皮不死化細胞株で、我々がヒト正常大脳皮質から樹立したものである<sup>36)</sup>。Dulbecco's modified Eagle Medium は Sigma (Saint Louis, Missouri, U.S.A.) より購入し、抗生剤はペニシリン (100 U/ml, Sigma, Saint Louis, Missouri, U.S.A.)、ストレプトマイシン (100 $\mu$ l/ml, Sigma)、アンホテリシン B (25 ng/ml, Invitrogen, Grand Island, New York, U.S.A.) を添加し、FBS (Highclone, Logan, Utah, U.S.A.) を 10% になるように調整したものを AST 成長培地 (DMEM) とした。EBM-2 培地 (Cambrex, Walkersville, Maryland, U.S.A.) に添加因子である EGM-2 MV (Cambrex) を加え、FBS (Highclone, Logan, Utah, U.S.A.) を 20% になるように添加した。抗生物質としてペニシリン (100 U/ml, Sigma)、ストレプトマイシン (100  $\mu$ l/ml, Sigma)、アンホテリシン B (25 ng/ml, Invitrogen) の 3 者を各々の最終濃度になるよう添加したものを内皮細胞成長培地 (EGM-2) とした。

## 3. AQP4 導入ヒトアストロサイト株 (hAST-AQP4 株) の樹立

レトロウイルスベクターの pDON-AI 2 は TAKARA Bio Inc. (Shiga, Japan) より購入した。本ベクターは CMV IE promoter を有していた。温度感受性 SV40 T 抗原遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて細胞群に導入しヒトアストロサイト不死化細胞株 (hAST)



を樹立した. 新潟大学脳研究所より提供されたヒトAQP4 cDNA (M23) をhAST株に導入し, AQP4導入ヒトアストロサイト不死化細胞株 (hAST-AQP4株) を樹立した.

#### 4. 血清と補体によるヒトアストロサイト株への作用

hAST-AQP4 細胞群を  $4 \times 10^4$ /well コラーゲンコートされた 35mm dish (Iwaki, Tokyo, Japan) に播種し, 免疫組織化学染色およびRT-PCRに用いた. hAST-AQP4細胞群を  $1 \times 10^5$ /well コラーゲンコートされた 60mm dish (Iwaki) に播種し, ウェスタンブロットに用いた. 各々の dish に播種した後, 温度感受性ラージ T 抗原を不活化する目的で  $37^\circ\text{C}$  で 2 日間培養した. その後,  $56^\circ\text{C}$  30 分非働化させた抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者血清およびコントロールとして用いた健常者の血清を 10% の濃度として dish に添加し,  $4^\circ\text{C}$  で 1 時間培養後, ウサギの補体を最終濃度 10% になるように添加し,  $37^\circ\text{C}$  で 23 時間培養後, 免疫組織化学染色, ウェスタンブロットを行った. 補体を含まない血清のみを添加した dish は  $37^\circ\text{C}$  で 24 時間培養後, 免疫組織化学染色, ウェスタンブロットを行った.

#### 5. mRNA 抽出及び reverse transcription-polymerase chain reaction ( RT-PCR )

アストロサイトの Total RNA は, RNeasy<sup>®</sup> Plus Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて抽出した. Total RNA から single-stranded cDNA への RT と PCR は, StrataScript First Strand Synthesis System (STRATAGENE<sup>®</sup>, Cedar Creek, Texas, U.S.A.) と TAKARA PCR Thermal Cycler Dice (TakaRa) を用い, 20ng の Total RNA から Single-stranded cDNA を合成した. RT-PCR は特異的なプライマー (Table 1) を用いて増幅 ( $95^\circ\text{C}$  for 10 min, then at  $95^\circ\text{C}$  for 15 s and at  $55\text{-}60^\circ\text{C}$  for 1 min for 30 cycles) し,  $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$  のエチジウムブロマイドを含む 2% アガロースゲルを用い電気泳動し分離した.

Quantitative real-time PCR 解析は FullVelocity<sup>™</sup> SYBR Green QPCR Master MIX (STRATAGENE<sup>®</sup>) および, 既報告にある AQP4, G3PDH, IL-6, TNF $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ <sup>37-41</sup>) を用いて, Stratagene's Mx3005P (STRATAGENE<sup>®</sup>) を用いて増幅し ( $95^\circ\text{C}$  for 10 min, then at  $95^\circ\text{C}$  for 15 s and at  $60^\circ\text{C}$  for 1 min for 40 cycles), MxPro<sup>™</sup> (STRATAGENE<sup>®</sup>) を用い G3PDH で補正し相対的な定量を行った.

#### 6. Western blots analysis

ヒト primary アストロサイト, hAST株およびhAST-AQP4株をセルスクレイパーにて回収し, lysis buffer (0.1% sodium dodecyl sulfate, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, and 1% Triton-X (Sigma)), and protease inhibitor cocktail tablet (Roche, Basel, Schweiz) を用いホモジナイズした. ホモジナイズしたサンプルは  $4^\circ\text{C}$  14000rpm で 5 分間遠心分離を行い,

上清 (蛋白) を回収した。

ヒト大脳組織はプロテアーゼインヒビターを含む lysis buffer を添加した後、ホモジナイザーにてホモジネートし、遠心後、上清を回収した。蛋白濃度は Quick Start™ Bradford Dye Reagent.1x (BIO-RAD, Hercules, California, U.S.A.) により測定した。

20μgの蛋白を6molの尿素入り12%ゲルで電気泳動し、polyvinylidene difluoride membrane へ転写した。Blocking buffer (5% skimmed milk in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T)) で室温にて10分間ブロッキングした後、一次抗体を50倍希釈し室温で1時間作用させ、続いて2000倍で希釈した2次抗体を室温で1時間作用させた。Membrane をPBS-T で洗ったのち、chemiluminescence detection (ECL-Advance, Amersham, England) でバンドを検出した。各バンドの蛋白量はQuantity One software program (BIO-RAD) を用いて解析した。

## 7. 免疫組織化学染色

培養細胞を PBS で洗浄したのち 4%パラホルムアルデヒドで 30 分間常温固定した。PBS で洗浄したのち 0.5%TritonX-100 で 30 分間常温処理した後、PBS で洗浄し、3%FBS/PBS で 20 分間常温ブロッキングした。抗 AQP4 抗体 (一次抗体) を 0.1%FBS/PBS で 1:50 に希釈し、4℃オーバーナイトで反応させた。そののち PBS で洗浄し、anti-rabbit FITC 抗体 (二次抗体) を 0.1%FBS/PBS にて 1:100 で希釈し 1 時間常温で反応させ、fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan) にて観察した。

## 8. DiI-Ac-LDL の取り込み

TY09 細胞株を 10 mg/ml の acetylated low-density lipoprotein labeled 1,10-dioctadecyl-3,3,30,30-tetramethyl-iodo-carbocyanine perchlorate (DiI-Ac-LDL; Biogenesis, Poole, England) を含む培地で 37℃で 12 時間培養後、fluorescent microscope (Olympus) で観察した。

## 9. 細胞障害の解析 (XTT, Propidium iodide を用いて)

### XTT viability assay

XTT アッセイには tetrazolium-based viability assay (Cell proliferation kit II, XTT, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いた。hAST-AQP4 株を 96well に播種した後、10 倍希釈し非働化した抗 AQP4 抗体陽性患者血清およびコントロールとして健常成人の血清を添加し 37℃で 6 時間培養した。また、血清に補体を添加した場合は、血清を添加し 4℃で 1 時間培養後に 50 倍希釈した補体を添加した。37℃で 6 時間培養後



に 50 $\mu$ l の XTT 標識物質をそれぞれの well に添加し、37 $^{\circ}$ C で 4 時間培養した。励起波長 490nm, 蛍光波長 650nm で観察した。

#### Propidium iodide staining

抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者血清の細胞傷害を評価する目的で細胞傷害をきたした細胞が propidium iodide でピンク色に染色される細胞を解析した。hAST-AQP4 株を 96well に播種した後、10 倍希釈し非働化した抗 AQP4 抗体陽性患者血清およびコントロールとして健常成人の血清を添加し 37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。また、血清に補体を添加した場合は、血清を添加し 4 $^{\circ}$ C で 1 時間培養後に 50 倍希釈した補体を添加し 37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。その後 propidium iodide (Sigma) を最終濃度が 50 $\mu$ g/ml で添加後 5 分間室温で培養した。その後 4%パラホルムアルデヒドで固定し、細胞核を DAPI で染色した。propidium iodide で染色される細胞をカウントした。

#### 1 0 . 血清と抗 TNF $\alpha$ 中和抗体, 抗 IL-6 中和抗体による hAST-AQP4 株への影響

2.0 $\mu$ g/ml の抗 TNF $\alpha$  中和抗体, 抗 IL-6 中和抗体を NMO 患者血清と併用して hAST-AQP4 株に 37 $^{\circ}$ C で 24 時間作用させた後にタンパク抽出し、ウェスタンブロットで AQP4 蛋白量を解析した。細胞傷害の解析目的で XTT アッセイを行った。抗 AQP4 抗体陽性患者血清および中和抗体を hAST-AQP4 株に作用させ、50 $\mu$ l の XTT 標識物質をそれぞれの well に添加し、37 $^{\circ}$ C で 4 時間培養後、励起波長 490nm, 蛍光波長 650nm で観察した。

#### 1 1 . 統計解析

結果は平均  $\pm$  標準偏差で表し、有意差は Student's t-test 検定を用いた。P < 0.01 を有意差があるとした。

## 結果

### AQP4 導入ヒト AST 株 (hAST-AQP4 株) の樹立.

mRNA レベルでの AQP4 を primary AST, アストロサイト不死化細胞株, AQP4 導入アストロサイト株で RT-PCR を用いて検討した。ヒト大脳をポジティブコントロール, DH-BNBs をネガティブコントロールとした。

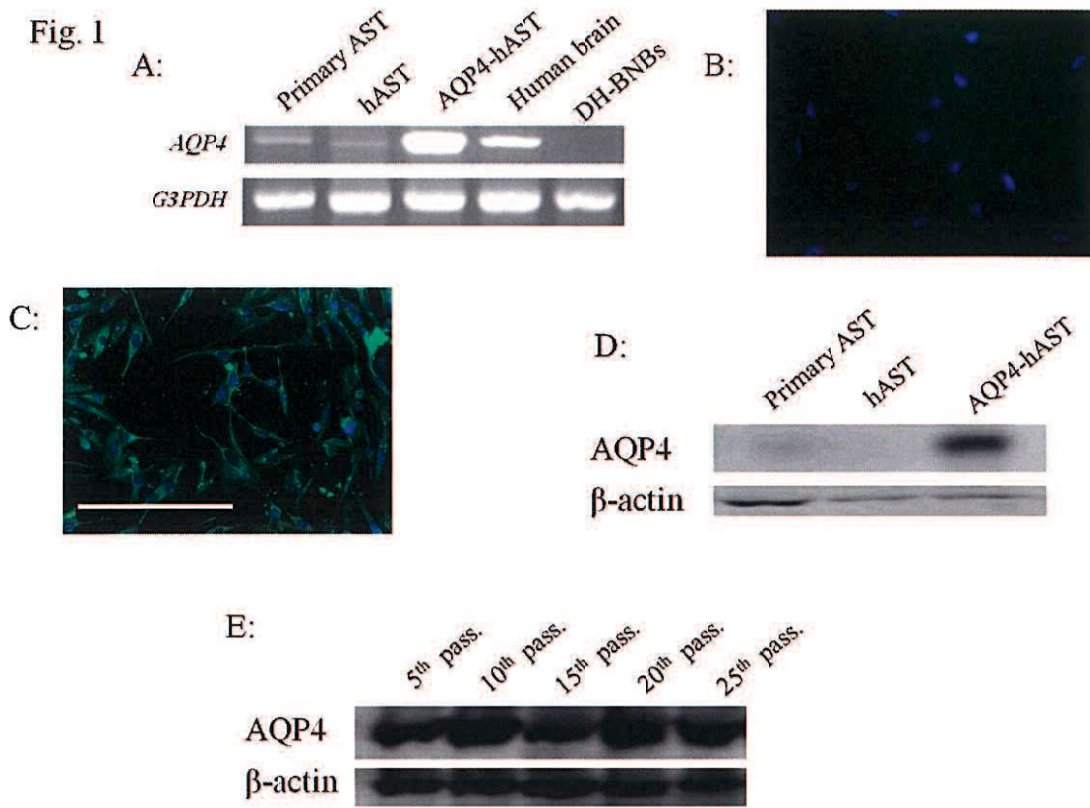
ヒト Primary アストロサイトと温度感受性ラージ T 抗原を導入したヒトアストロサイト不死化細胞株 (hAST) は AQP4 mRNA の発現を認めたが (Fig. 1A), 免疫染色とウェ

スタンプロットでは AQP4 蛋白は発現していなかった (Fig. 1B, 1D). ヒト primary アストロサイトと hAST 株は AQP4 蛋白量の定量的評価が不可能であるため, hAST 株に AQP4 M23 の cDNA を導入し, AQP4 導入アストロサイト株 (hAST-AQP4 株) を樹立した. hAST-AQP4 株は免疫染色においても (Fig. 1C), ウェスタンブロットにおいても (Fig. 1D) 蛋白レベルで十分量の AQP4 を発現し, 継代を重ねても AQP4 蛋白量に変化はなかった (Fig. 1E).

**Fig. 1 Characterization of stable astrocytic cell line expressing AQP4.**

A: The expression levels of AQP4 mRNA in primary astrocyte, hAST, and hAST-AQP4 were examined by RT-PCR. Human brain was used as a positive control and DH-BNBs were used as a negative control. B: The staining using anti-AQP4 antibodies against hAST did not confirm the expression of AQP4 at the protein level by immunocytochemistry. C: The expression of AQP4 protein was confirmed in hAST-AQP4 by immunocytochemistry. Scale bar corresponds to 200 $\mu$ m. D: Western blot analysis of AQP4 in primary AST, hAST and hAST-AQP4 demonstrated that only hAST-AQP4 expressed plenty of AQP4 protein (M23), but primary astrocytes and hAST did not. E: The amount of AQP4 protein in hAST-AQP4 did not decrease even after repeated passages. The WB analysis revealed that the late-passage cells (passage 25) expressed as much AQP4 protein as the early-passage cells (passage 5). DH-BNBs, human peripheral nerve microvascular endothelial cells.





### NMO 患者血清によるアストロサイト傷害.

NMO 患者血清による AST 傷害を検討するため, propidium iodide 法を用いて解析した. hAST-AQP4 株への正常血清のみ, NMO 患者血清のみ, 血清および補体添加後 37 度で 24 時間後に解析した. 核は DAPI で青に, 細胞障害をきたした細胞は propidium iodide でピンク色に染色されるが, 正常血清のみ (Fig. 2A), 正常血清および補体を添加した (Fig. 2B) 場合に細胞傷害は見られなかった. NMO 患者血清のみ (Fig. 2C, E) を添加した場合は細胞傷害を認め, NMO 患者血清に補体を添加した場合 (Fig. 2D, E) 細胞傷害の割合はさらに増加した (Fig. 2E).

また, 吸光度が生細胞数と相関する XTT を用いた定量的解析においても同様に, NMO 血清のみでも生細胞は減少し細胞傷害をきたしていたが, 補体の添加でさらに生細胞は減少した (Fig. 2F).

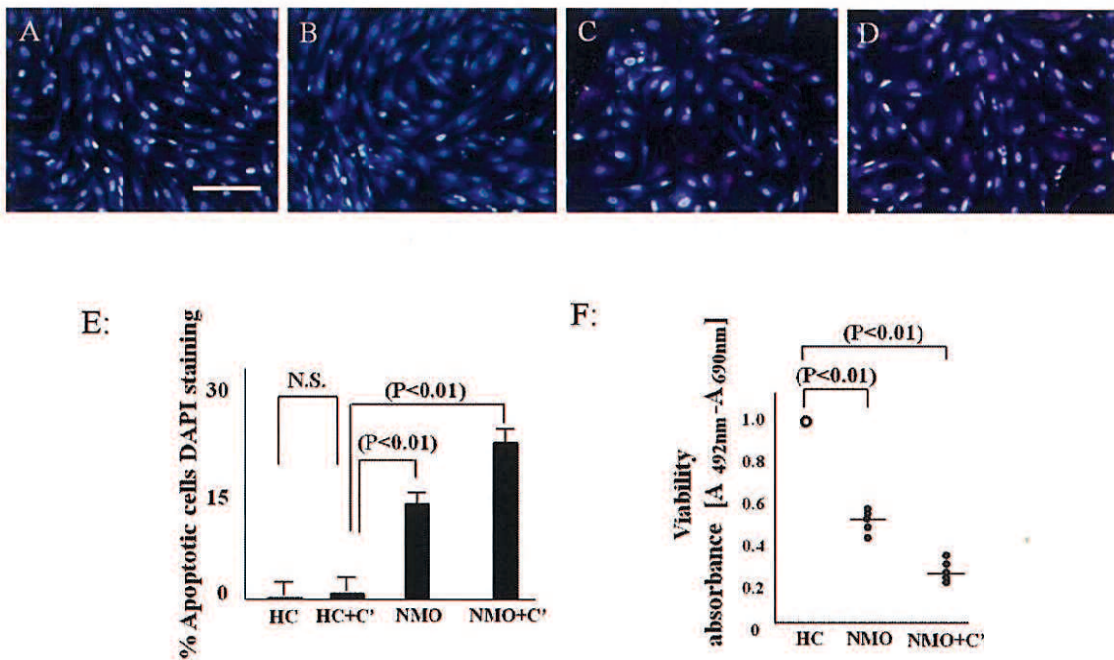
### Fig. 2 The toxicity of NMO sera on hAST-AQP4

Propidium iodide staining was shown (A-E). hAST-AQP4 cells were incubated with 10% HC



sera (A), HC sera and complement (B), NMO sera (C), and NMO sera and complement (D). Nuclei stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole appeared blue. Propidium iodide-positive cells appeared red. E: The cytotoxic effects of the NMO sera (NMO) with or without complement were demonstrated by the percentage of propidium iodide positive cells, as described in Materials and methods. Scale bar =100  $\mu$ m. F: XTT viability assay indicates that the survival rates of hAST-AQP4 decreased after the exposure of NMO sera. Furthermore, the decrease of viability of the cells became more pronounced after the exposure with NMO sera with complement. Values are given as the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments.

Fig. 2



NMO 患者血清によるアストロサイトの形態学的変化および AQP4 蛋白の局在への影響.

hAST-AQP4 株に NMO 患者血清を補体のあり, なしの 2 条件で添加し, 37 度で 24 時間経過後の形態学的変化を検討した. 培地のみコントロール (Fig. 3A) と比較すると, NMO 患者血清のみを加えた細胞株では, 一部円形化細胞もみられたが, AST の突起の横幅の狭小化を認めた (Fig. 3B). さらに補体を添加すると膨化, 円型化した (Fig.

3C).

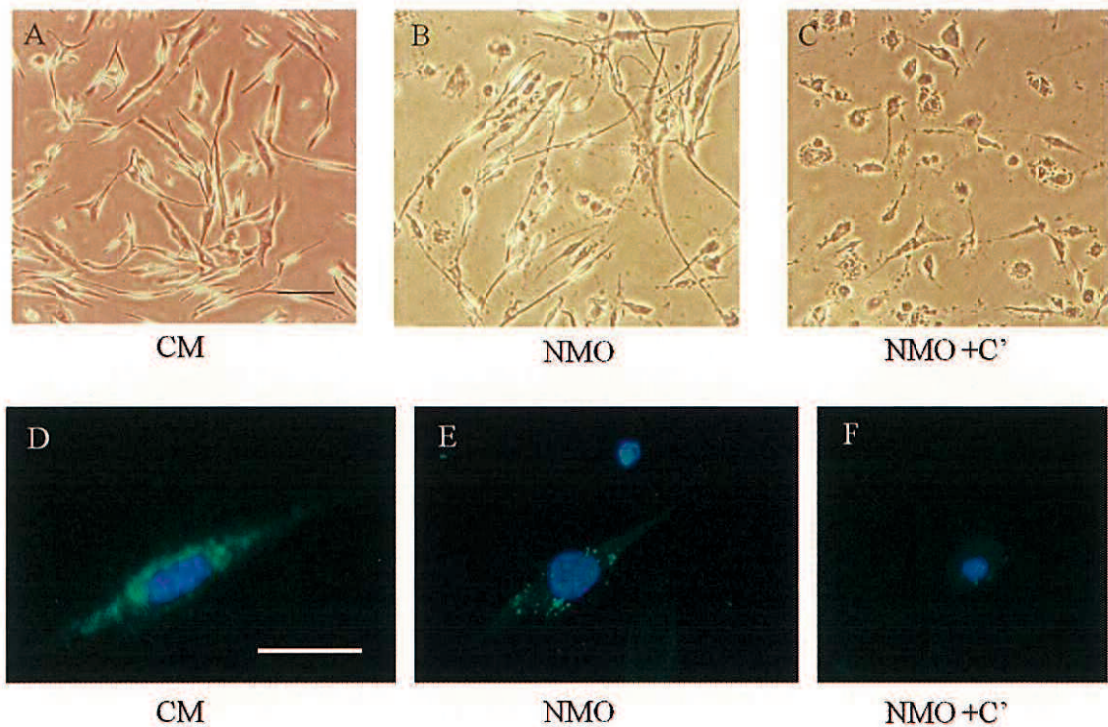
次に、NMO 患者血清による AQP4 蛋白の局在変化を検討した。AQP4 蛋白の局在変化を核は DAPI で青色に、AQP4 蛋白は抗 AQP4 抗体により緑色に染色する免疫組織化学染色により検討した。細胞膜に局在せずに全体に、斑状に AQP4 の染色性を認める正常血清を添加したコントロール (Fig. 3D) と比較して、NMO 患者血清を添加すると細胞質内に AQP4 が顆粒状に集積する傾向を認め (Fig. 3E)、さらに補体を添加すると、円形、膨化した AST 全体に淡く染色性がみられた (Fig. 3F)。

**Fig. 3 NMO sera alter astrocytic morphology and the localization of AQP4.**

A: hAST-AQP4 cells incubated in CM are shown. B: The cells incubated with NMO sera exhibited cellular swelling and extension of narrow processes. C: The cells became a round shape after the addition of complement to NMO sera (NMO+C'). D: Nuclei stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole appeared blue. AQP4 appeared green. Immunofluorescence image of hAST-AQP4 cells after the incubation in CM using anti-AQP4 antibodies showed diffuse staining of AQP4. E: The cells relocated into discrete foci and were seen as dot-like structures after the addition of NMO sera. F: The combination of NMO sera and complement (NMO+C') changed hAST-AQP4 into a round shape with only faint staining of AQP4. Scale bar represents 50 $\mu$ m.



Fig. 3



**NMO 患者血清は AQP4, EAAT2 蛋白量を減少させる。**

NMO 患者血清による mRNA レベルでの AQP4 の発現量の解析目的で hAST 株に NMO 患者血清を添加し real time PCR 法で解析した。NMO 患者血清を添加すると正常血清と比較して mRNA レベルで AQP4 の発現は低下した (Fig. 4A)。NMO 患者血清による AQP4 蛋白量の変化を解析する目的で NMO 患者血清を hAST-AQP4 株に添加しウェスタンブロット法で解析した。NMO 患者血清により AQP4 蛋白量は減少した (Fig. 4B)。また、NMO 患者血清による EAAT2 蛋白の発現量の変化についての解析をウェスタンブロット法で行ったところ NMO 患者血清により EAAT2 蛋白量は減少した (Fig. 4C)。

**Fig. 4 NMO sera decreased the amounts of AQP4 and EAAT2 in human astrocytes.**

A: The effect of NMO sera on the expression of AQP4 mRNA in hAST was examined by real time PCR. The relative expression levels of AQP4 mRNAs derived from the cells with NMO sera were lower than HC. The bar graph reflects the combined data from two independent experiments (mean  $\pm$  SEM, n=5). B: The effect of NMO sera on the expression of AQP4 protein in hAST-AQP4 was investigated by a western blot analysis. NMO sera significantly decreased the amount of AQP4 than HC. The bar graph reflects the combined densitometry data from three independent experiments (mean  $\pm$  SEM, n=5). C: The effects of NMO sera on the amount



of EAAT2 proteins in hAST-AQP4 were investigated using a Western blot analysis. NMO sera significantly decreased the amount of EAAT2 compared to HC. The bar graph reflects the combined densitometry data obtained from three independent experiments (mean  $\pm$  SEM, n=5).

Fig. 4 A:

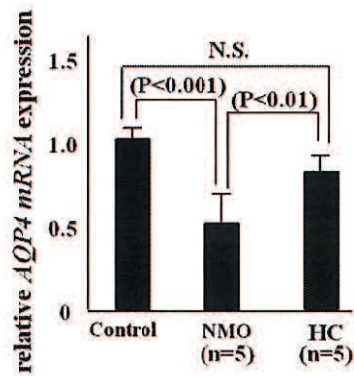


Fig. 4 B:

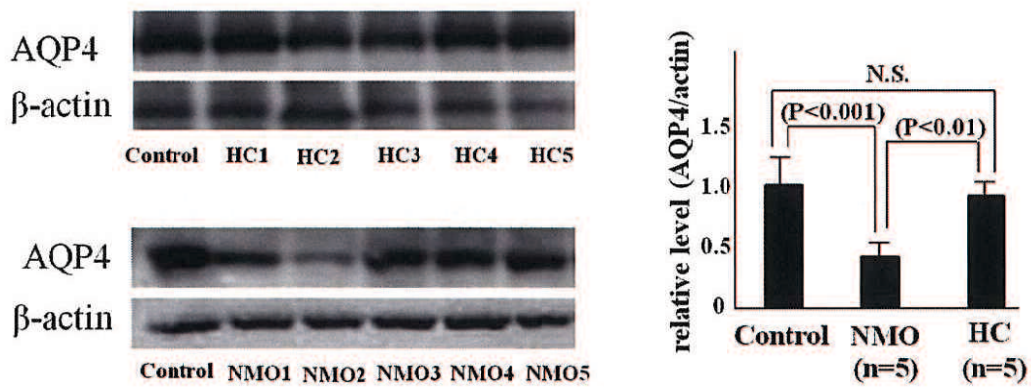
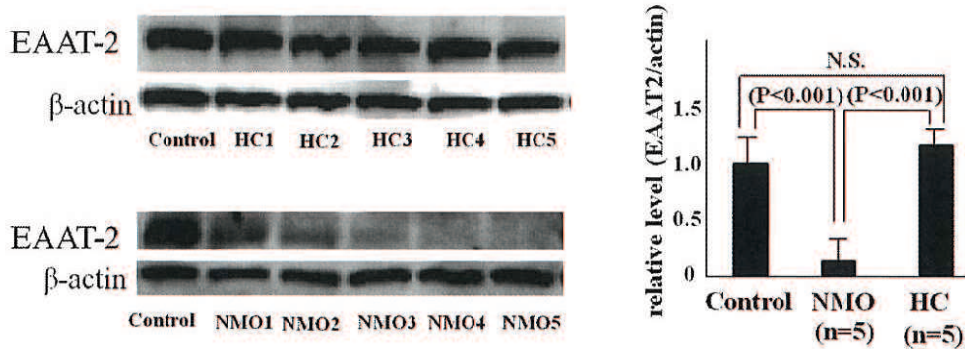


Fig. 4 C:



NMO 患者血清による細胞傷害および AQP4 蛋白量の減少には IL-6, TNF $\alpha$  が関与している。

NMO 患者血清がヒト AST での炎症性サイトカインの発現量に影響を与えているかどうかを解析するため, hAST-AQP4 株を用いて mRNA レベルでのサイトカインの発現量を real time PCR 法で解析した. NMO 患者血清の添加により, hAST-AQP4 株の TNF $\alpha$ , IL-6 は mRNA レベルで増加した. 一方, IL-1 $\beta$  の mRNA は変化を認めなかった (Fig. 5A).

TNF $\alpha$  および IL-6 の働きを阻害することで, AST 傷害や AQP4 蛋白量に影響を与えるかどうかを検討するため, NMO 患者血清と炎症性サイトカインに対する中和抗体をあわせて作用させ解析した. NMO 患者血清に併せて抗 TNF $\alpha$  中和抗体, 抗 IL-6 中和抗体を作用させると hAST-AQP4 株の細胞傷害は阻害された (Fig. 5B). NMO 患者血清に併せて抗 TNF $\alpha$  中和抗体, 抗 IL-6 中和抗体を作用させると, hAST-AQP4 株における AQP4 蛋白量の減少は阻害された (Fig. 5C, 5D).

**Fig. 5 TNF $\alpha$  and anti-IL-6 are involved in the reduction of AQP4 and cytotoxicity in hAST-AQP4.**

A: The effects of NMO sera on the expression of inflammatory cytokine mRNA in hAST-AQP4 were examined using real-time PCR. TNF $\alpha$  and IL-6 were up-regulated at the mRNA level following the incubation of the NMO sera. On the other hand, IL-1 $\beta$  mRNA was not affected by the NMO sera. The bar graph reflects the combined data obtained from two independent experiments (mean  $\pm$  SEM, n=5).



B: An XTT viability assay indicated that exposure to NMO sera with anti-TNF $\alpha$  and anti-IL-6 neutralizing antibodies did not affect cytotoxicity in hAST-AQP4. The values are presented as the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments.

C, D: Co-incubation of NMO sera and anti-TNF $\alpha$  or anti-IL-6 neutralizing antibodies did not significantly reduce the expression levels of AQP4.

Fig. 5 A:

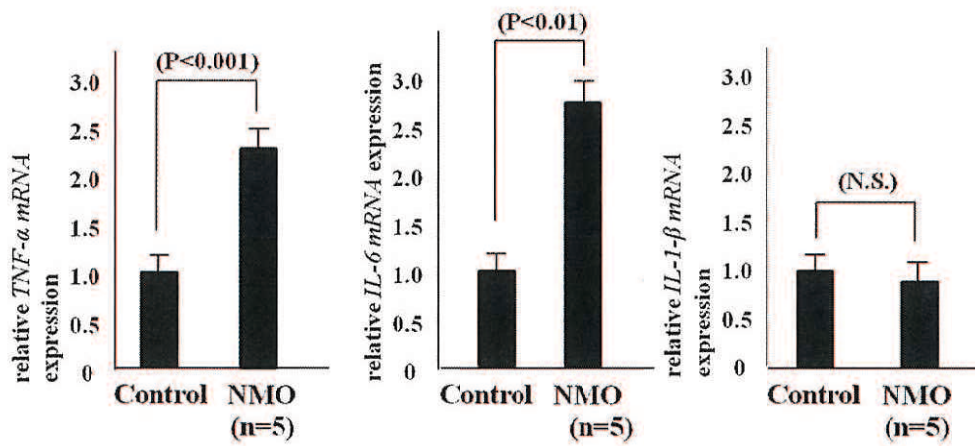


Fig. 5 B:

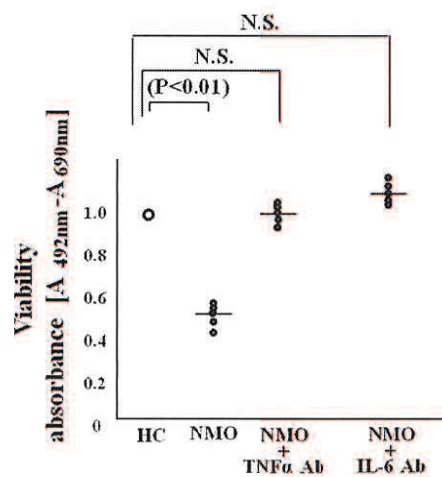


Fig. 5 C:

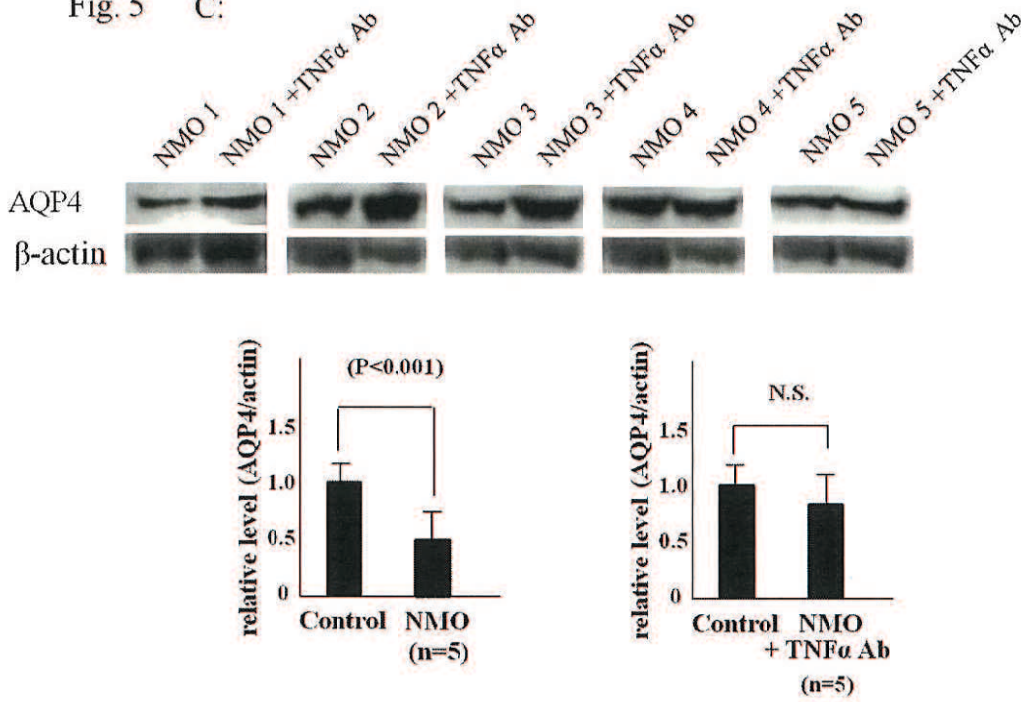
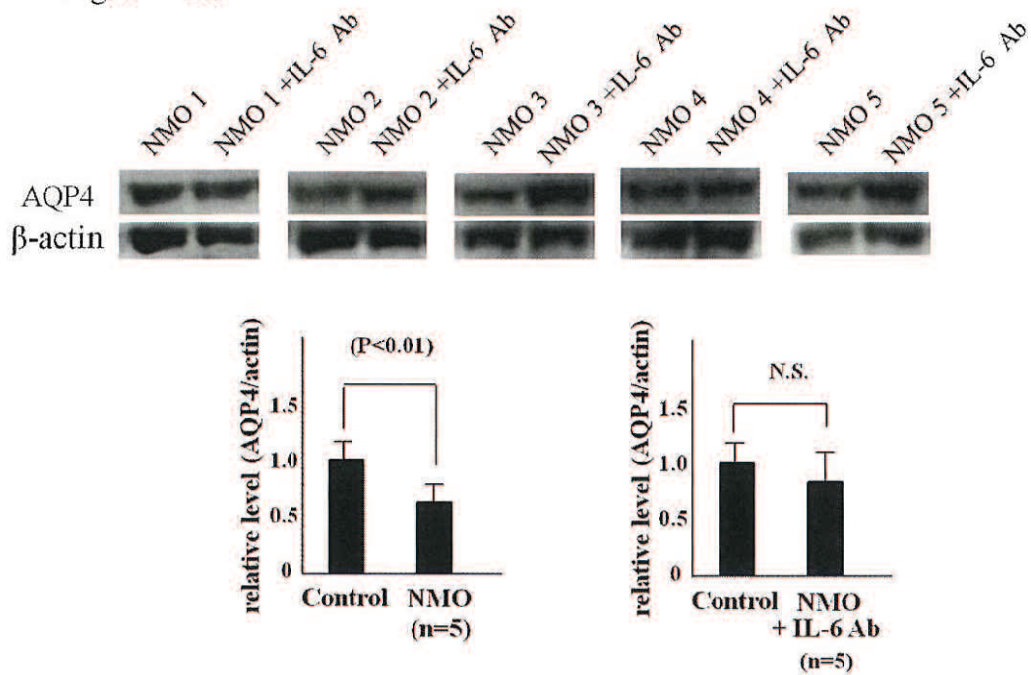


Fig. 5 D:





微小血管内皮細胞との共培養でヒトアストロサイトの AQP4 蛋白量は増加し、局在が変化した。

AQP4 蛋白は、BBB を構成する微小血管内皮細胞に接する AST の足突起に発現すると報告されていることから、微小血管内皮細胞との共培養による AQP4 局在への影響を検討した。

TY09 を collagen コートした dish に  $1 \times 10^5$ /well で播種し 33°C で培養した。コンフルエントになった後に cell culture insert 内に hAST-AQP4 株を  $1 \times 10^4$ /insert で播種し、33°C で 7 日間共培養を行った。hAST-AQP4 株がコンフルエントになった後に、TY09、hAST-AQP4 株の蛋白を抽出し、ウェスタンブロット法で解析した。共培養によって AQP4 蛋白量は増加した (Fig. 6A)。

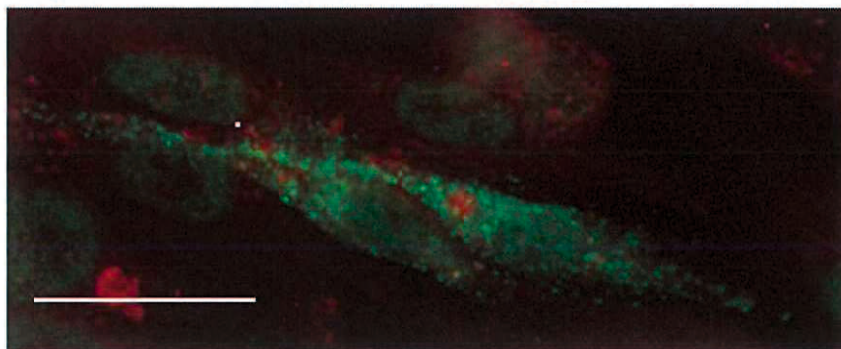
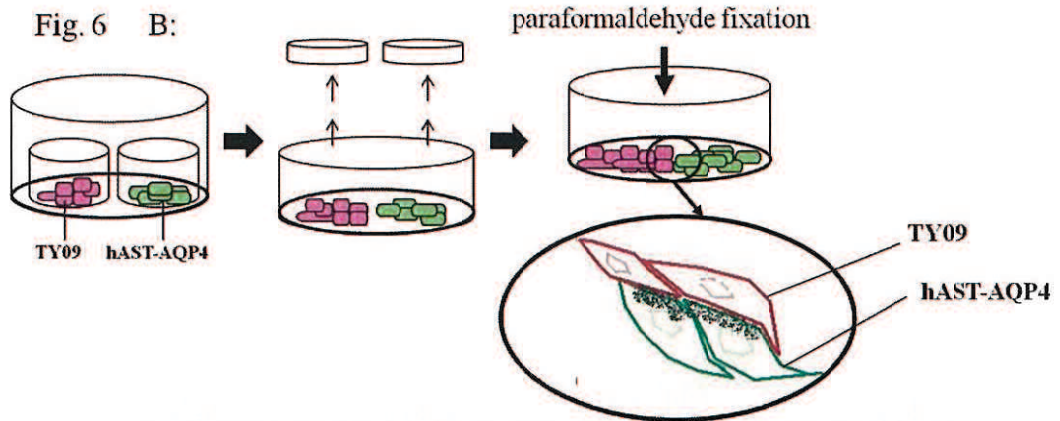
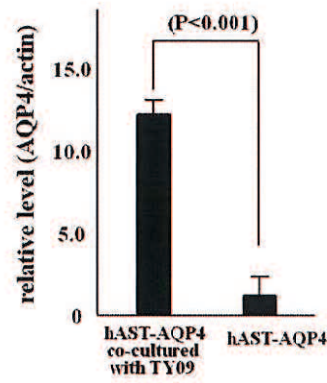
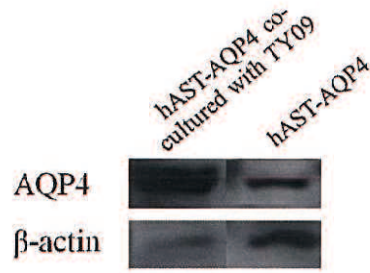
内皮細胞株と AST 株との共培養による AQP4 蛋白の局在変化を、免疫組織化学的に検討した。TY09 は赤色、hAST-AQP4 株は緑色に染色され、hAST-AQP4 株が TY09 に接触した hAST-AQP4 株の下側に面して、hAST-AQP4 株の細胞膜に顆粒状に AQP4 の染色性が集積する傾向であった (Fig. 6B)。

本結果により、in vitro の glio-vascular-unit モデルが in vivo の特徴を有していることが示された。あわせて、我々の結果から、AST の AQP4 蛋白の発現や局在が BBB を構成する微小血管内皮細胞の影響を受けることが示唆された。

**Fig. 6 The expression and localization of AQP4 protein are influenced by TY09 cells.**

A: TY09 cells ( $1 \times 10^5$ /well) were spread with ECM in a well of a collagen type-I coated 6-well plate (BD) and were incubated at 33°C. After becoming confluent, a cell culture insert for 6-well plate was put into the well and hAST-AQP4 cells ( $1 \times 10^4$ /well) were spread with CM into the top of the insert bottom. After 7-day co-culture at 33°C, total protein was extracted from hAST-AQP4 for WB analysis. AQP4 protein in hAST-AQP4 co-cultured with TY09 vastly increased than that in monoculture of hAST-AQP4 cells. The bar graph reflects the combined densitometry data from three independent experiments (mean  $\pm$  SEM,  $n=5$ ,  $P < 0.001$ ). B: The hAST-AQP4 and TY09 were spread and incubated as indicated. Thereafter, the cloning cups were taken away and the cells were further incubated. After these two cells contacted each other, the immunocytochemical analysis was performed. AQP4 in hAST-AQP4 mainly localized at the astrocytic membrane contacting to TY09. TY09 is stained with DiI-acetylated LDL (red) and hAST-AQP4 is stained with anti-AQP4 antibody (green). Scale bar represents 50  $\mu$ m.

Fig. 6  
A:





## 考察

NMOの発症メカニズムは、いまだ完全には解明されていないが、何らかの理由によりBBBが傷害され、抗AQP4抗体や補体、白血球成分が中枢神経内に進入し、抗AQP4抗体がAST上のAQP4に結合し、ASTが傷害され病態が進展していくと想定されている。抗AQP4抗体と培養ASTを用いたAST傷害機序の解明はNMOの病態を解明する有力な手段の一つになりうると考えられ、本研究ではNMOの病態解析に有用と考えられるヒトAST株を樹立し、NMO患者血清を用いてAST傷害をきたす分子メカニズムの解析を行った。

本研究で用いた、初代培養ヒトASTとtsA 58遺伝子を導入した不死化ヒトAST株は解析可能な程度の充分量のAQP4-M1蛋白やAQP4-M23蛋白を有しておらず、免疫染色およびウェスタンブロット法で検出できなかった (Fig. 1B, 1D)。このため、実験研究での解析可能なほどの充分量のAQP4蛋白を有するAQP4-M23を安定的に発現するAQP4導入ヒトAST株を樹立した。

AQP4-M23を選択したのは以下の理由による。AQP4はM1型とM23型の2種類のアイソタイプがあり、M1型と比較してM23型はN末端が22アミノ酸配列分短い。AQP4は4量体を形成しており、AQP4-M23の割合が高いほどよりこのAQP4の4量体が重合し、大きなアレイ構造であるOAPsがつくられる。M23型が膜上に発現した場合は直交配列格子を作り出すが、M1型のみが膜上に発現しても格子は作り出せず無秩序に配列する。抗AQP4抗体はおもにAQP4-M23を認識し、OAPs構造に関連して結合することが示され<sup>24)</sup>、<sup>42)</sup>、ラットの脳ではM1の3倍量のAQP4-M23蛋白量を有していると報告されている<sup>43)</sup>、<sup>44)</sup>。また、Nicchiaら<sup>18)</sup>は、NMO-IgGが主にこの格子構造を認識することを明らかにし、Craneら<sup>19)</sup>はHELA細胞にM1やM23をそれぞれ導入した系を用いて、NMO-IgGはおもにAQP4-M23を認識し、OAPs構造に関連して結合することを示唆した。

近年、NMO病態を解明する試みとして、NMO患者血清とAQP4を発現させた細胞株を用いた研究がなされるようになった。Hinsonらは、AQP4を強発現させたHEK293細胞に対してNMO患者血清による作用を検討した。その結果NMO-IgGを作用させるとAQP4が細胞膜から細胞質内に取り込まれる現象が生じた<sup>6)</sup>。この報告はNMOの病態を考えるうえで興味深いものではあるが、研究材料がASTではなく、HEK293細胞が用いられており、ヒトのAST上で発現するAQP4蛋白の動態を解析したものではなかった。また、同グループはNMO-IgGと培養ASTを用いたin vitro studyで、NMO-IgGがASTに結合すると、ASTに発現する興奮性アミノ酸トランスポーターのうちの一つであるEAAT2の発現が低下することを報告した<sup>21)</sup>。その結果脳内のグルタミン酸濃度が上昇し、神経細胞を含めた脳細胞が障害される機序を推察した。

しかし、この報告ではヒトのASTが材料として用いられているものの、AQP4自体の蛋白量の定量的な解析はなされていなかった。NMO-IgGや補体などの液性因子がASTに作用した後に、ASTのAQP4がどの程度のdown regulationをうけるのか、あるいは



ある種の薬剤を作用させた場合、どれぐらいの発現量が recover するのか、といった定量解析は重要であり、その観点から AQP4 蛋白のウェスタンブロットによる定量化は必須であると考えられる。しかし、上記の2つの報告はともに AQP4 蛋白を同定する手段として免疫染色しか行われておらず、その結果 AQP4 蛋白自体の発現量の変化については言及されていない。この理由の一つとして AQP4 蛋白をウェスタンブロットで同定することの手技的な困難さがあるものと我々は考えた。実際、本研究で行ったルーチンのウェスタンブロットでは、AQP4 を強発現させているにも関わらず、非常に淡いバンドしか得られなかった。そこでより明瞭なバンドを得るために、ウェスタンブロットの方法に改良を加えた。AQP4 は膜蛋白質であり、膜蛋白質を SDS-PAGE にて分離する場合、尿素を含むゲルを使用した方が明瞭なバンドが見られるとする報告<sup>45)</sup>に着目した。この改良によって AQP4 の発現をシャープで明瞭なバンドとして確認でき、定量化にも適したウェスタンブロットの系を確立することに成功した。

NMO 患者血清は BBB のタイトジャンクション分子の発現を減少させ、BBB の破綻に関与すると報告されている<sup>46), 47)</sup>。抗 AQP4 抗体は BBB 破綻後に脳内に流入し、AST の足突起に結合し病態機序が進展するとされている。本研究では、NMO 患者血清のみでヒト AST 株の傷害をきたし、mRNA レベルで IL-6、TNF $\alpha$  の産生を増加させることを明らかにした。過去の報告では、NMO 患者血清のみではラットやマウスの AST や AQP4-MI を導入した HEK293 細胞に対しては細胞毒性を有さず、補体加わって初めて細胞傷害をきたすと報告されている<sup>6), 21), 23), 48)</sup>。これらの結果の相違は、ヒトとげっ歯類では個体種が異なること、AST の M23 含有量が異なることが考えられる。抗 AQP4 抗体と M23 との結合力は、M1 との結合力よりもより強い<sup>19)</sup>。AQP4 導入 AST 株は十分量の M23 蛋白量を有しているため、抗 AQP4 抗体とより強固に結合し、影響を受けていることが考えられた。

AST は、細胞自身で IL-6 や TNF $\alpha$  などのサイトカインを分泌するとされている<sup>29)-31)</sup>。また、Uzawa らは、NMO では MS やその他の炎症性疾患コントロールと比較すると急性増悪期の脳脊髄液や血中で IL-6 の濃度が著明に上昇しており<sup>32)</sup> 脳脊髄液 IL-6 濃度と脳脊髄液 GFAP 濃度の有意に相関すると報告している。また Zhang らは、マウスの脊髄のスライスに NMO-IgG と IL-6、TNF $\alpha$  をあわせて作用させると、NMO-IgG のみを作用させた場合と比較して脊髄障害が増悪することが報告されている<sup>33)</sup>。本研究では、NMO 患者血清と IL-6 や TNF $\alpha$  に対する中和抗体をあわせて作用させると、AST 傷害が阻害されることが明らかとなった (Figure 5B)。これらの結果から、NMO 患者血清は AST からの IL-6 や TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインの分泌を促進し、これらのサイトカインが NMO の病態に関わっている可能性が考えられた。

今回の研究で、NMO 患者血清はヒト AST 株の AQP4 蛋白の発現量を減少させることが明らかになった (Figure 4B)。興味深いことに、Hinson らも NMO 患者血清はラットの胎児 AST で M23 および M1 AQP4 蛋白量を減少させることを明らかにしている<sup>24)</sup>。



彼らの報告する機序は、細胞膜上に発現する AQP4 が短時間で分解して減退し、細胞内に取り込まれることで AQP4 蛋白が減少するとされるが、われわれの結果からは NMO 患者血清は AST の AQP4 の発現を mRNA レベルで低下させるという機序も考えられた。

Zeng らは、AQP4 を欠く AST では、EAAT2 の発現も減少させると報告している<sup>49)</sup>。加えて、NMO の病変部で AST の EAAT2 が減少していることは、グルタミンの恒常性を破綻させ、ニューロンやオリゴデンドロサイトに傷害をきたすとされている<sup>21), 45)</sup>。興味深いことに、本研究においても AQP4 導入 AST 株では AQP4 蛋白量の減少に伴い EAAT2 蛋白量も減少を示している (Fig. 4C)。NMO 患者血清が IL-6 や TNF $\alpha$  を増加させ、AQP4 蛋白量や EAAT2 蛋白量を減少させるという複数の機序が NMO の病態進展に関与している可能性が考えられる。

AQP4 は、*in vivo* では BBB を構成する内皮細胞に面する AST の足突起に豊富に存在する。本研究では、ヒト AST 株とヒト微小血管内皮細胞株である TY09 株との共培養による AQP4 蛋白の分布への影響を検討した。AQP4 蛋白は AST 株の TY09 株に面する膜に局在する傾向がみられた (Fig. 6B)。この結果により、この *in vitro* の glio-vascular unit モデルが BBB を構成する *in vivo* の特徴を有していることが示された。さらに、AQP4-M23 蛋白を十分有する AQP4 導入 AST 株では、TY09 株との共培養で AQP4 蛋白量が増加することが明らかとなった (Fig. 6A)。NMO 病変部においても、減少した AQP4 の増加によって EAAT2 蛋白量も増加することが期待され、内皮細胞が放出する AST の AQP4 発現を増加させる液性因子を同定できれば治療に応用できる可能性もあり、重要な今後の研究課題であると考えられた。

## 結語

NMO 患者血清のみでも、AQP4-M23 を導入したヒト AST 株では傷害がみられることが明らかとなった。NMO 患者血清により AQP4 蛋白量は減少し、これは NMO の病理所見の分子学的裏付けとなる現象であると考えられる。AST の AQP4 蛋白量を増加させる未知の因子が NMO の新規治療法の開発に寄与する可能性がある。

本研究は「厚生労働省科学研究費補助金 難知性疾患克服研究事業 免疫性神経疾患に関する調査研究」の助成によりおこなった。

## 参考文献

- [1] Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, et al. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* 2005; 202: 473–477.
- [2] Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, et al. Spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol* 2007; 6: 805-815.
- [3] Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 2004; 364: 2106-2112.
- [4] Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, et al. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2006; 66: 1485-1489.
- [5] Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, et al. Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 367-378.
- [6] Hinson SR, Pittock SJ, Lucchinetti CF, et al. Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica. *Neurology* 2007; 69: 2221-2231.
- [7] Misu T, Fujihara K, Kakita A, et al. Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain* 2007; 130: 1224-1234.
- [8] Misu T, Takano R, Fujihara K, et al. Marked increase in cerebrospinal fluid glial fibrillar acidic protein in neuromyelitis optica: an astrocytic damage marker. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009; 80: 575-577.
- [9] Misu T, Fujihara K, Takahashi T, et al. Pathogenesis of neuromyelitis optica: aquaporin 4 autoimmunity and astrocytopathy. *Rinsho Shinkeigaku* 2010; 50: 872.
- [10] Oshio K, Binder DK, Yang B, et al. Expression of aquaporin water channels in mouse spinal cord. *Neuroscience* 2004; 127: 685-693.
- [11] Jung JS, Bhat RV, Preston GM, et al. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci USA*



- 1994; 91: 13052-13056.
- [12] Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 41 – 53.
- [13] Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 991-1001.
- [14] Suzuki H, Nishikawa K, Hiroaki Y, et al. Formation of aquaporin-4 arrays is inhibited by palmitoylation of N-terminal cysteine residues. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 1181-1189.
- [15] Furman CS, Gorelick-Feldman DA, Davidson KG, et al. Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 13609-13614.
- [16] Wolburg H. Orthogonal arrays of intramembranous particles: a review with special reference to astrocytes. *J Hirnforsch* 1995; 36: 239-258.
- [17] Amiry-Moghaddam M, Frydenlund DS, Ottersen OP. Anchoring of aquaporin-4 in brain: molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. *Neuroscience* 2004; 129: 999-10101.
- [18] Nicchia GP, Mastrototaro M, Rossi A, et al. Aquaporin-4 orthogonal arrays of particles are the target for neuromyelitis optica autoantibodies. *Glia* 2009; 57: 1363-1373.
- [19] Crane JM, Lam C, Rossi A, et al. Binding affinity and specificity of neuromyelitis optica autoantibodies to aquaporin 4 M1/M23 isoforms and orthogonal arrays. *Biol Chem* 2011; 286: 16516-16524.
- [20] Misu T, Fujihara K, Nakamura M, et al. Loss of aquaporin-4 in active perivascular lesions in neuromyelitis optica: a case report. *Tohoku J Exp Med* 2006; 209: 269-275.
- [21] Hinson SR, Roemer SF, Lucchinetti CF, et al. Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2. *J*

- Exp Med 2008; 205: 2473-2481.
- [22] Vincent T, Saikali P, Cayrol R, et al. Functional Consequences of Neuromyelitis Optica-IgG Astrocyte Interactions on Blood-Brain Barrier Permeability and Granulocyte Recruitment. *J Immunol* 2008; 181: 5730-5737.
- [23] Kinoshita M, Nakatsuji Y, Moriya M, et al. Astrocytic necrosis is induced by anti-aquaporin-4 antibody-positive serum. *Neuroreport* 2009; 25: 508-512.
- [24] Hinson SR, Romero MF, Popescu BF, et al. Molecular outcomes of neuromyelitis optica (NMO)-IgG binding to aquaporin-4 in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 1245-1250.
- [25] Ratelade J, Bennett JL, Verkman AS. Evidence against Cellular Internalization *in Vivo* of NMO-IgG, Aquaporin-4, and Excitatory Amino Acid Transporter 2 in Neuromyelitis Optica. *J Biol Chem* 2011; 286 (52): 45156-45164.
- [26] Marignier R, Nicolle A, Watrin C, et al. Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain* 2010; 133: 2578-2591.
- [27] Tetsuka K, Hosoya KI, Ohtsuki S, et al. Acidic amino acid transport characteristics of a newly developed conditionally immortalized rat type 2 astrocyte cell line (TR-AST). *Cell Struct Funct* 2001; 26: 197-203.
- [28] Terasaki T, Hosoya K. Conditionally immortalized cell lines as a new *in vitro* model for the study of barrier functions. *Biol Pharm Bull* 2001; 24: 111-118.
- [29] van Neerven S, Nemes A, Imholz P, et al. Inflammatory cytokine release of astrocytes *in vitro* is reduced by all-trans retinoic acid. *J Neuroimmunol* 2010; 229: 169-179.
- [30] Jack CS, Arbour N, Manusow J, et al. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* 2005; 175: 4320-4330.
- [31] Park C, Lee S, Cho IH, et al. TLR3-mediated signal induces proinflammatory cytokine and



- chemokine gene expression in astrocytes: differential signaling mechanisms of TLR3-induced IL-10 and IL-8 gene expression. *Glia* 2006; 53: 248-256.
- [32] Uzawa A, Mori M, Arai K et al. Cytokine and chemokine profiles in neuromyelitis optica : significance of interleukin-6. *Mult Scler* 2010; 16: 1443-1452.
- [33] Zhang H, Bennett JL, Verkman AS. Ex vivo spinal cord slice model of neuromyelitis optica reveals novel immunopathogenic mechanisms. *Ann Neurol* 2011; 70: 943-954.
- [34] Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I, et al. Establishment of a new sensitive assay for anti-human aquaporin-4 antibody in neuromyelitis optica. *Tohoku J Exp Med* 2006; 210: 307–313.
- [35] Kashiwamura Y, Sano Y, Abe M, Shimizu F, Haruki H, Maeda T, et al. Hydrocortisone enhances the function of the blood-nerve barrier through the up-regulation of claudin-5. *Neurochem Res* 2011; 36(5): 849-855.
- [36] Sano Y, Kashiwamura Y, Abe M, Dieu LH, Huwyler J, Shimizu F, et al. Stable human brain microvascular endothelial cell line retaining its barrier-specific nature independent of the passage number. *Clin Exp Neuroimmunol.* 2012; 3; 1-12.
- [37] Zhang ZL, Liu ZS, Sun Q. Expression of angiopoietins, Tie2 and vascular endothelial growth factor in angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4241-4245.
- [38] Tsao CW, Lin YS, Chen CC, et al. Cytokines and serotonin transporter in patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006; 30: 899-905.
- [39] León AJ, Gómez E, Garrote JA, et al. High levels of proinflammatory cytokines, but not markers of tissue injury, in unaffected intestinal areas from patients with IBD. *Mediators Inflamm* 2009; 2009: 1-10.
- [40] Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P, et al. Structure and functions of

- aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int Rev Cell Mol Biol* 2011; 287: 1-41.
- [41] Crane JM, Verkman AS. Determinants of aquaporin-4 assembly in orthogonal arrays revealed by live-cell single-molecule fluorescence imaging. *J Cell Sci* 2009; 122: 813-821.
- [42] Furman CS, Gorelick-Feldman DA, Davidson KG, et al. Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 13609-13614.
- [43] Neely JD, Christensen BM, Nielsen S, et al. Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels. *Biochemistry* 1999; 38: 11156-11163.
- [44] Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, et al. Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 14108-14113.
- [45] Roemer SF, Parisi JE, Lennon VA, et al. Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Brain* 2007; 130: 1194-1205.
- [46] Marignier R, Nicolle A, Watrin C, et al. Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain* 2010; 133: 2578-2591.
- [47] Shimizu F, Sano Y, Takahashi T, et al. Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 288-297.
- [48] Sabater L, Giralt A, Boronat A, et al. Cytotoxic effect of neuromyelitis optica antibody (NMO-IgG) to astrocytes: an in vitro study. *J neuroimmunol* 2009; 215: 31-35.
- [49] Zeng XN, Sun XL, Gao L, et al. Aquaporin-4 deficiency down-regulates glutamate uptake and GLT-1 expression in astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 2007; 34: 34-9.