

*HLA-DRB1\*01* (4.1% vs. 14.2%,  $p = 0.030$ ), *HLA-DRB1\*09* (10.8% vs. 29.1%,  $p = 0.003$ ) のアリル頻度が有意に低く, *HLA-DRB1\*12* のアリル頻度は有意に高かった (63.5% vs. 40.2%,  $p = 0.001$ ). 多重ロジスティック回帰分析では, *HLA-DRB1\*01* (adjusted odds ratio (OR) = 0.257, adjusted  $p = 0.039$ ), *HLA-DRB1\*09* (adjusted OR = 0.323, adjusted  $p = 0.010$ ) とともに有意に non-NMO MS のリスクを下げ, *HLA-DRB1\*04* は non-NMO MS のリスクを有意に増す (adjusted OR = 1.917, adjusted  $p = 0.041$ ) ことが明らかとなった.

NMO spectrum disorders 群では, 健常者群と比べ, *HLA-DRB1\*09* のアリル頻度が有意に少なく (5.9% vs. 29.1%,  $p = 0.003$ ), *HLA-DRB1\*12* のアリル頻度が有意に高かった (26.5% vs. 8.7%,  $p = 0.005$ ). 多重ロジスティック回帰分析においても *HLA-DRB1\*09* は有意に NMO spectrum disorders のリスクを下げ (adjusted OR = 0.178, adjusted  $p = 0.023$ ), *HLA-DRB1\*12* は NMO spectrum disorders のリスクを有意に増す (adjusted OR = 3.020, adjusted  $p = 0.030$ ) ことが分かった.

そこで, 両群において多重ロジスティック回帰分析で有意な作用を認めたアリルについて, *HLA-DRB1* アリル間の相互作用を解析した. Non-NMO MS 群において, *HLA-DRB1\*09* が non-NMO MS のリスクを下げる作用は, *HLA-DRB1\*09/15* の genotype で有意に強く (adjusted OR = 0.180, adjusted  $p = 0.024$ ), *HLA-DRB1\*04* が non-NMO MS のリスクを増す作用は, *HLA-DRB1\*04/04* (adjusted OR = 5.488, adjusted  $p = 0.001$ ), *HLA-DRB1\*04/14* (adjusted OR = 4.482, adjusted  $p = 0.022$ ), *HLA-DRB1\*04/15* (adjusted OR = 2.561, adjusted  $p = 0.043$ ) で有意に高かった. NMO spectrum disorders 群においては, *HLA-DRB1\*12* が NMO spectrum disorders のリスクを増す作用は, *HLA-DRB1\*12/15* で有意に高かった (adjusted OR = 10.775, adjusted  $p = 0.006$ ).

## 考察

Non-NMO MS 群における検討より, *HLA-DRB1\*1501* を含む *HLA-DRB1\*15* の MS に対する疾患感受性を *HLA-DRB1\*09* が抑制している可能性が示唆された<sup>3)</sup>.

Non-NMO MS に対する *HLA-DRB1\*01* の抵抗性は, Caucasian においても報告されており, *HLA-DRB1\*01* の MS に対する抵抗性は人種によらず共通した特徴である可能性が示唆された.

## 結論

- 1) Non-NMO MS 群, NMO spectrum disorders 群の両群に対する *HLA-DRB1\*09* の疾患抑制的な作用は, 両群に共通した遺伝学的要素である可能性がある.
- 2) Non-NMO MS 群に対する *HLA-DRB1\*04*, *HLA-DRB1\*01* の作用, NMO spectrum disorder 群に対する *HLA-DRB1\*12* の作用は, 各群に特異的である可能性がある.
- 3) *HLA-DRB1* アリルの作用は, 特定の対立遺伝子の影響を強く受けている.

## 文献

- 1) Ramagopalan SV, et al. *PLoS Genet* 2007; 3: 1607–13.
- 2) DeLuca GC, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 20896–901.
- 3) Isobe et al. *Mult Scler* 2010 (in press).

## 健康危険情報

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

特許取得: なし

実用新案登録: なし

# 多発性硬化症および、視神経脊髄炎患者の末梢血リンパ球 Th1/Th2 関連性ケモカインの病勢、治療による変化について

研究分担者：清水優子<sup>1)</sup>

共同研究者：太田宏平<sup>2)</sup>、久保幸子<sup>1)</sup>、大橋高志<sup>3)</sup>、小林正樹<sup>1)</sup>、蒲澤千昌<sup>1)</sup>、内山真一郎<sup>1)</sup>

1) 東京女子医科大学神経内科

2) 東京理科大学理学部

3) 東京女子医科大学八千代医療センター神経内科

## 研究要旨

ケモカインは白血球やリンパ球の細胞遊走を誘導するサイトカインの一種で、CXCR3 は選択的に活性化 Th1 細胞に発現しており、CCR4 は活性化 Th2 細胞に発現しており、CCR4+CD4+T 細胞は Th2 細胞、CXCR3+の CD4+T 細胞は Th1 細胞と考えられている。MS は Th1/Th2 バランスが Th1 優位で発症することは周知であるが、抗 AQP4 抗体陽性の NMO については、抗体などの液性因子が病態に関与していると示唆されており、MS とは病態機序が異なると考えられている。今回我々は MS、NMO 患者末梢血リンパ球の Th 1 関連性ケモカイン CXCR3、Th2 関連性ケモカイン CCR4 の発現を CD4+CXCR3+/CD4+CCR4、CD8+CXCR3+/CD8+CCR4 を用い病期、治療において比較検討した。その結果、MS の CD4+CXCR3+/CD4+CCR4+ は再発期>寛解期>IFN-β 治療で、従来の報告と同様であった。今回我々は CD8+ CXCR3+細胞を検討したが、CD8+ CXCR3+細胞は末梢・病巣への memory T 細胞遊走/分化に関連しており、MS では MRI の病巣数と CD8+CXCR3+に正の相関があり cytotoxic T 細胞と脳内の炎症活動性にとの関連性が報告されている。今回の結果では、MS、NMO ともに CD8+CXCR3+/CD8+CCR4+は再発期に高値で、CD8+CXCR3+は疾患活動性を反映する可能性が示唆された。

## 研究目的

中枢神経系の代表的な自己免疫疾患である多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) は、ミエリンを標的とした炎症性脱髄性疾患で、病因の候補のひとつとして細胞性免疫の 1 型ヘルパー T 細胞 (Type 1 helper T 細胞:Th1 細胞) と、液性免疫を担う 2 型ヘルパー T 細胞 (Type 2 helper T 細胞 : Th2 細胞) が低下し、Th1・Th2 バランスが Th1 にシフトしていることが発症に関わっていると考えられている。近年 MS との相違で注目されている、視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica : NMO) は、この疾患に特異的な抗アクアポリン-4 抗体が発見され、その病理像は MS では脱髄が主体なのに対して、NMO ではアストロサイトの障害が主体であり、脱髄は二

次的に引き起こされることが報告され、MS とは異なる疾患であるという概念が築かれつつある。しかし、その病態はいまだ不明な点が多い。今回われわれは末梢血リンパ球における Th1、Th1 関連性ケモカインの検討を行い、MS と NMO の病勢、治療による相違の有無について検討した。

## 研究方法

対象と方法：対象は、健常対象群 30 例 (平均年齢 30.1±6.7 歳)、MS と確定診断した当科患者 30 例 (平均年齢 36.7±12.1 歳、平均 EDSS 2.4±1.7) の、再発期、寛解期、Interferon (IFN) -β 治療 1 年後以上経過後について、また 2006 年 Wingerchuk らの提唱した NMO 診断基準改訂版の診断基準を満たした当科 NMO 患者 16 例 (平均年齢 45.1±14.9 歳、

平均 EDSS 4.0±2.7) の再発-寛解期において検討した。健常者および患者から末梢血リンパ球を抽出し、フローサイトメーターを用い、Th1 関連性ケモカインとして CXCR3、Th2 関連性ケモカインとし、CD4+Th1/Th2 : CD4+CXCR3+/CD4+CCR4、CD8+Th1/Th2 : CD8+CXCR3+/CD8+CCR4 について比較検討した。統計処理は、病勢と治療による変化は ANOVA/Kruskal-Wallis test を、EDSS との相関は Spearman's rank correlation coefficient test を用いた。

#### 倫理面への配慮

本研究は東京女子医科大学の倫理委員会において承諾を得て行い、プライバシーの保護に十分配慮した。

#### 結果

1. 健常者では CD4+CXCR3/CD4+CCR4+、CD8+CXCR3/CD8+CCR4+はそれぞれ平均値 1.73±0.45、23.48±13.59 で、MS では CD4+CXCR3/CD4+CCR4+、CD8+CXCR3/CD8+CCR4+ともに再発期(平均値 1.76±0.67、30.22±23.52) > 寛解期(平均値 1.46±0.44、17.40±13.47) > IFN-β 治療後(平均値 1.27±0.43、9.80±5.63) であった。特に IFN-β 治療後は有意に低下した (p<0.05)。2. NMO では CD4+CXCR3/CD4+CCR4+と CD8+CXCR3/CD8+CCR4+ともに再発期(平均値 2.28±0.40、50.40±35.66) は寛解期(平均値 1.78±0.55、19.62±10.14) に比較して有意に高値であった (P<0.01) 3. NMO の CD4+CXCR3/CD4+CCR4+と CD8+CXCR3/CD8+CCR4+の再発期の増加は MS より顕著であった。4. MS、NMO の寛解期において EDSS と CD4+CXCR3 /CD4+CCR4+、CD8+CXCR3/CD8+CCR4+に相関は認められなかった。

#### 考察

ケモカインを用いた MS の末梢血 Th1/Th2 の検討では、MS 再発期の CD4+T 細胞と CD8+ T 細胞の CCR4+発現は健常者に比べて有意に低下<sup>1)</sup>、CD4+CXCR3+細胞は MS >> 健常者、CD4+CXCR3+/CD4+CCR4+は MS 再発期 > 寛解期<sup>2)</sup> であり、今回の結果はこれまでの報告と同様であった。NMO の末梢血ケモカインの検討では、CCL17/TARC (Th2) は MS、OSMS では健常群に比べて有意に低下した<sup>3)</sup> との報告がある。今回我々は CD8+CXCR3+について検討したが、CD8+ CXCR3+細胞は末梢・病巣への memory T 細胞遊走と分化に関連しており、MS では MRI の病巣数と CD8+CXCR3+に正の相関があり cytotoxic T 細胞と脳内の炎症活動性との関連性が報告されている<sup>4)</sup>。今回我々の結果では MS、NMO ともに、CXCR3+/CCR4+の病期による差は CD8+T 細胞が顕著であり、病勢活動性を反映する可能性が示唆された。

#### 結語

MS、NMO 患者末梢血リンパ球の Th1 関連性ケモカイン CXCR3、Th2 関連性ケモカイン CCR4 の発現を CD4+、CD8+T 細胞について病期、治療において検討した。MS の CD4+CXCR3+/CD4+CCR4+ は再発期 > 寛解期 > IFN-β 治療で従来の報告と同様、IFN-β 治療後、有意に低下し、Th1/Th2 バランスが Th1 から Th2 へと誘導された。MS、NMO ともに CD8+CXCR3+/CD8+CCR4+は再発期に高値で、CD8+CXCR3+は疾患活動性を反映する可能性が示唆された。

健康危険情報 なし

知的財産権の出願・登録状況 なし

#### 参考文献

- 1) Misu T, et al. J Neuroimmunol 114(2001) 207-212
- 2) Nakajima H, et al. Eur Neurol 52(2004) 162-168
- 3) Narikawa K, et al. J Neuroimmunol 149(2004) 182-186
- 4) Fox RJ, et al. Mult Sci 14(2008) 1036-1043

# 多発性硬化症における B 細胞 Toll-like receptor 9 の発現およびその免疫調節性機能解析

研究分担者 菊地 誠志<sup>1)</sup>

共同研究者 廣谷 真<sup>2)</sup>, 新野正明<sup>2)</sup>, 矢口裕章<sup>2)</sup>, 佐々木秀直<sup>2)</sup>, 深澤俊行<sup>3)</sup>

## 研究要旨

近年、多発性硬化症(MS)を含む自己免疫疾患の発症、再燃における自然免疫の重要性が注目されている。Toll-like receptor (TLR) は自然免疫における病原体認識分子であるが、特に MS におけるその作用機構は十分に解明されていない。一方、最近、B 細胞は interleukin (IL)-10 産生により MS を含む自己免疫疾患を抑制する作用を持つことが報告された。そこで、今回我々は TLR9 のアゴニストである CpG DNA を用いて、サイトカイン産生能を中心に MS の B 細胞における TLR9 の免疫調節性機能に関して検討を行った。その結果、CpG DNA 刺激による B 細胞からの IL-10 産生は MS 患者において健常者と比較して有意に低下しており、また B 細胞の IL-10 産生はメモリー B 細胞における TLR9 発現に相関していた。B 細胞産生性 IL-10 は Th1 細胞、Th17 細胞、樹状細胞の機能を抑制することが報告されており、TLR9 を介した B 細胞への刺激は T 細胞なども含む MS の免疫動態に影響している可能性が考えられた。

## 研究目的

多発性硬化症(MS)の発症や再燃に関わる因子のひとつに感染が挙げられており、また近年の MS 有病率上昇の一因として衛生仮説が提唱されているが、これらは MS の免疫動態に自然免疫が深く関与している可能性を示唆する。Toll-like receptor (TLR) は自然免疫における病原体認識分子であるが、その機能は自然免疫にとどまらず獲得免疫もダイナミックに誘導することから近年注目されているレセプターである。自己免疫疾患における TLR の機能は疾患増悪と寛解のいずれにも働くことが報告されており、その詳細な作用機序は不明であるが、最近自己免疫性脳脊髄炎において TLR9 が免疫調節性機能を誘導する可能性が報告された<sup>1)</sup>。TLR9 は B 細胞と形質細胞様樹状細胞に発現し、非メチル

化 DNA (CpG DNA) がリガンドとして同定されている。

一方、B 細胞の液性免疫機能は古くから知られているが、近年 B 細胞のもつ免疫調節性機能が注目されている。その免疫調節の機序として B 細胞より産生される IL-10 の重要性が指摘され、MS では B 細胞の IL-10 産生が低下していることが報告されている<sup>2)</sup>。B 細胞の免疫調節性機能に関わる因子として、樹状細胞の関与や、B 細胞に発現する TLR、B 細胞受容体、CD40 が報告されている。

今回、我々は MS における TLR9 を介した B 細胞の免疫調節性機能について、特にサイトカイン産生に注目して検討した。

## 研究方法

再発寛解型 MS 患者 36 例 (再発期 6 例、寛解期 30 例) で寛解期症例は未治療 10 例、IFN  $\beta$ -1a 治療 10 例、IFN  $\beta$ -1b 治療 10 例) と健常者 10 例を対象とした。対象者の末梢血を採

1) 国立病院機構札幌南病院 神経内科

2) 北海道大学 神経内科

3) さっぽろ神経内科クリニック

取し、Flow cytometry を利用し CD19 陽性 B 細胞表面における CD27、CD80、CD86 と B 細胞内における TLR9 の発現を測定した。また、単核球を分離したのち、磁気ビーズで CD19 陽性 B 細胞を分離、0.25  $\mu$ M の CpG DNA (ODN2006) で 24 時間刺激し、ELISA にて上清中の IL-10、IL-12(p40)、TNF- $\alpha$ 、Lymphotoxin (LT) - $\alpha$  を測定した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は北海道大学医学部倫理委員会において承認を受けた。研究については患者本人へ十分に説明を行い、文書で同意を得ている。個人の情報は決して表に出ることがないように細心の注意を払い、プライバシーの保護には十分に配慮した。

### 研究結果

- (1) CpG DNA 刺激による B 細胞の IL-10 産生は MS 群で有意に低かった。
- (2) CpG DNA 刺激による B 細胞の IL-12 (p40) 産生は再発期 MS 群で有意に高かった。
- (3) CpG DNA 刺激による B 細胞の TNF- $\alpha$ 、LT- $\alpha$  産生は各群で有意差がなかった。
- (4) インターフェロン治療群と非治療群では CpG DNA 刺激による B 細胞のサイトカイン産生に有意な差を認めなかった。
- (5) メモリー B 細胞における TLR9 の Mean Fluorescence Intensity (MFI) は MS 群で有意に低かった。
- (6) メモリー B 細胞における TLR9 の MFI と B 細胞の IL-10 産生に有意な正の相関を認めた。

### 考察

ナイーブ B 細胞とメモリー B 細胞はいずれも TLR9 を介して IL-10 産生を誘導しうるが、CpG DNA は一般に TLR9 が高発現しているメモリー B 細胞へ直接的に作用し細胞分化を強

く誘導することが報告されている<sup>3)</sup>。今回の結果と併せ、MS のメモリー B 細胞における TLR9 発現の低下が IL-10 産生の低下に影響している可能性が考えられる。

また、B 細胞産生性 IL-10 は Th1 細胞、Th17 細胞、樹状細胞の機能を抑制し<sup>4-6)</sup>、また調節性 T 細胞の機能を亢進することが報告されており<sup>7)</sup>、TLR9 を介した B 細胞への刺激が T 細胞などを含む MS の免疫動態に影響している可能性が考えられる。

### 結論

MS では TLR9 を介した B 細胞の IL-10 産生が低下しており、TLR9 を介した B 細胞への刺激は T 細胞も含む MS の免疫動態に影響している可能性がある。

### 文献

- 1) Marta M, Andersson A, Isaksson M, et al. Eur J Immunol 2008; 38: 565-75.
- 2) Duddy M, Niino M, Adatia F, et al. J Immunol 2007; 178: 6092-9.
- 3) Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A, et al. Blood 2003; 101: 4500-4.
- 4) Moulin V, Andris F, Thielemans K, et al. J Exp Med 2000; 192: 475-82.
- 5) McGeachy MJ, Bak-Jansen KS, Chen Y, et al. Nat Immunol 2007; 8: 1390-7.
- 6) Korn T, Bettreli E, Gao W, et al. Nature 2007; 448: 484-7.
- 7) Mann MK, Maresz K, Shriver LP, et al. J Immunol 2007; 178: 3447-56.

### 健康危険情報

なし

### 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

## 多発性硬化症病態における MMP9 陽性 CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の役割

研究分担者 山村 隆<sup>1</sup>

共同研究者 荒浪 利昌<sup>1</sup>、佐藤 和貴郎<sup>1</sup>、富田 敦子<sup>1</sup>

### 研究要旨

多発性硬化症 (MS) は、ミエリン抗原特異的 T 細胞が介在する自己免疫疾患であると考えられている。MS の動物モデルでは、Th17 や Th1 サブセットが重要な役割を果たすが、MS 病態における T 細胞サブセットの重要性については、未だ一定の見解は得られていない。これまで我々は T 細胞サブセットの解析に、表面マーカーとしてのケモカイン受容体の発現パターンが非常に重要であることを報告している。本研究では、MS の再発期と非炎症性神経疾患 (NIND) 患者末梢血と髄液における、T 細胞サブセットの頻度を測定し、MS 病態における重要性を検討した。動物実験モデルでは最も高い病原性を示した Th17 サブセットは、MS と NIND の両方で、髄液での頻度が末梢血に比べて減少していることが判明した。一方、CCR2+CCR5+T 細胞は、MS 再発時においてのみ、末梢血よりも髄液での頻度が有意に高いことが判明した。CCR2+CCR5+T 細胞は、IFN- $\gamma$  と IL-17 両者の産生能を有し、マトロプロテイナーゼ 9 (MMP9) とオステオポンチン (OPN) を高発現していることが判明した。以上より、CCR2+CCR5+T 細胞は MS 病態形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

---

<sup>1</sup> 国立精神神経センター神経研究所免疫研究部

## 背景

多発性硬化症 (MS) は CD4 陽性 T 細胞が介在する自己免疫疾患であると考えられている。MS の動物モデルでは、Th17 や Th1 サブセットが重要な役割を果たすが、MS 病態における T 細胞サブセットの重要性については、未だ一定の見解は得られていない。Acosta Rodriguez ら<sup>1</sup>と我々<sup>2</sup>は、ヒト Th17 サブセットの解析において、その細胞表面マーカーとしてケモカイン受容体が非常に重要であることを報告した。Acosta Rodriguez らは CCR4+CCR6+、我々は CCR2+CCR5- と、それぞれ異なる 2 種類のケモカイン受容体を用いている。

本研究ではこれら 4 種類のケモカイン受容体で T 細胞サブセットを同定し、MS 病態との関連性を検討した。

## 研究方法

- (1) 対象：健常者 11 名と非炎症性神経疾患患者 6 名、再発期 MS 患者 9 名、寛解期 MS 患者 11 名より、末梢血単核球細胞 (PBMC) あるいは髄液細胞を分離し、メモリー CD4 陽性 T 細胞の解析を行った。
- (2) フローサイトメトリー：メモリー CD4 陽性 T 細胞サブセットの頻度解析および分離はフローサイトメトリーによって行った。
- (3) 炎症性サイトカイン ELISA：メモリー CD4 陽性 T 細胞をケモカイン受容体発現パターン毎にセルソーターで分離し、PMA/ionomycin で刺激後に、培養上清中の IFN- $\gamma$ 、IL-17 濃度を ELISA 法により測定した。
- (4) 定量的 RT-PCR：上記刺激後の細胞を回収し、定量的 RT-PCR 法を用いて MMP9 および OPN の遺伝子発現量を測定した。

### (倫理面への配慮)

本研究においては、全ての患者から書面によるインフォームドコンセントを得た上で採血、髄液採取を行った。また、患者から得られた情報は、連結可能匿名化後、当研究部でのみ使用し、厳重に保管されている。以上から、本研究は、倫理面への十分な配慮がなされている研究であると考えられる。

## 研究結果

- (1) CCR2+CCR5-T 細胞と CCR4+CCR6+T 細胞が顕著な IL-17 産生能を示し、CCR2-CCR5+ 細胞が IFN- $\gamma$  産生に優れていた。CCR2+CCR5+T 細胞は IL-17 と IFN- $\gamma$  の両者を産生する細胞群を含んでいた。
- (2) 再発期 MS および非炎症性疾患のいずれにおいても、Th17 細胞である CCR2+CCR5-T 細胞と CCR4+CCR6+T 細胞の頻度は髄液よりも末梢血中で高かった。
- (3) 再発期 MS および非炎症性疾患のいずれにおいても Th1 細胞である CCR2-CCR5+ 細胞は PBMC よりも髄液中で高頻度であった。一方、CCR2+CCR5+T 細胞は再発期 MS の髄液中でのみ増加しており、MS の再発病態と最も関連する可能性が示唆された。
- (4) 刺激により CCR2+CCR5+T 細胞は、他群よりも有意に MMP9 および OPN を高発現した。

## 考察

MS の動物実験モデルでは Th17 細胞が病態形成に重要とされている<sup>3</sup>が、MS 患者では Th17 細胞の中枢神経指向性は示されなかった。一方、CCR2+CCR5+T 細胞が再発期 MS の髄液中で選択的に増加していることを見出した。このサブセットは炎症性サイトカインである IFN- $\gamma$  と IL-17 の両者の産生能を有し、また、刺激により、Blood-Brain Barrier 破壊に関与すると考えられている MMP9 を高発現することが分かった。さらに、炎症性サイトカインケモカイン産生の促進や T 細胞の生存に働く OPN の発現も他群に比べて有意に高く、これらの機能を持つ CCR2+CCR5+T 細胞は MS 再発の病態形成に重要な役割を担っていると考えられた。

## 結論

再発期 MS の髄液で増加する CCR2+CCR5+T 細胞は、BBB の破綻や炎症性ケモカイン、サイトカイン産生の促進に関わる能力を有し、MS 病態において重要な役割を果たしていると考えられる。

## 文献

- (1) Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin

17-producing T helper memory cells. Eva V Acosta-Rodrigues et al. Nat Immunol. 2007

(2) Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5- phenotype. W.Sato et al. J.immunol.2007

(3) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Cua DJ

et al. Nature 2003

**健康危険情報**

なし

**知的財産権の出願・登録状況**

特許取得：なし

実用新案登録：なし



## 多発性硬化症における MAIT 細胞の動態

研究分担者 山村 隆 国立精神・神経センター 神経研究所 免疫研究部（部長）  
研究協力者 三宅幸子 国立精神・神経センター 神経研究所 免疫研究部（室長）  
研究協力者 宮崎雄生 国立精神・神経センター 神経研究所 免疫研究部（流動研究員）

### 研究要旨

Mucosal Associated Invariant T (MAIT)細胞は、MHCクラスIに類似するMR1分子と、B細胞および腸内常在細菌叢に発生が依存するユニークな細胞集団として注目されはじめた。本研究班では、MAIT細胞の多発性硬化症(MS)における動態と機能を検討した。MS患者末梢血中では寛解期にMAIT細胞の頻度が減少しており、再発時にはさらに減少が著しく、その頻度はMSの疾患活動性と相関した。健常人においてはMAIT細胞の頻度とCD4<sup>+</sup>NKT細胞、CD56<sup>bright</sup>Natural Killer細胞の頻度との間に正の相関関係が見られたが、MS患者ではこの相関はみられず、MAIT細胞はこれら免疫制御細胞と協調して免疫制御を行っていること、およびMSにおいてこのシステムのバランスがくずれている可能性が示唆された。健常人およびMS患者末梢血単核細胞よりMAIT細胞を除去するとphytohemagglutinin刺激に対するinterferon (IFN)- $\gamma$ 産生が増強したことから、MAIT細胞はT細胞からのIFN- $\gamma$ 産生を抑制していると考えられた。これらの結果から、MAIT細胞はMSの病態抑制に関与する重要な細胞集団であると考えられた。

### A. 研究目的

Mucosal associated invariant T (MAIT)細胞はヒトCD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> double negative T細胞の解析中にV $\alpha$ 24i natural killer T (iNKT)細胞とは異なるインバリアントT細胞抗原受容体(TCR)(V $\alpha$ 7.2-J $\alpha$ 33)を発現する細胞として同定され、iNKT細胞よりもその頻度が高いことが想定されていた。MAIT細胞は腸管粘膜に多く分布し、その分化には、MHC class Ib分子に属するMR1と、B細胞および腸内常在細菌叢を必要とするなど特異なT細胞集団であることなどが報告されている。われわれはMAIT細胞が多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)の病巣部に存在することを見いだし(Int Immunol 16, 223-30, 2003)、実験的自己免疫性脳脊髄炎において疾患抑制作用を持つことを示した(Nat Immunol 7, 987-94, 2009)。今回我々は、MAIT細胞を同定できる抗体を用いて、MSにおけるMAIT細胞の動態を検討したので報告する。

### B. 研究方法

対象は12名の健常人、および17名の寛解期MS患者である。末梢血単核細胞を分離の後、MAIT細胞の頻度、表面抗原、およびPhorbol-Myristate-Acetate (PMA)、

Ionomycin刺激に対するサイトカイン産生をフローサイトメーターで解析した。

(倫理面への配慮)

対象より血液サンプル採取は、文書を用いて説明し、同意を得た上で行った。その他個人情報の管理を含めて国立精神・神経センターの倫理規定に従った。

### C. 研究結果

末梢血 $\alpha$  $\beta$ T細胞に占めるMAIT細胞の頻度は健常人で4.18  $\pm$  0.64%, MS患者で2.19  $\pm$  0.40%であり、MS患者で有意に低値であった。さらに、MAIT細胞の頻度とCD4<sup>+</sup>V $\alpha$ 24NKT細胞、CD56<sup>bright</sup>Natural Killer (NK)細胞の頻度との間に正の相関が見られた。MAIT細胞は健常人、MS患者とも $\alpha$ 4 $\beta$ 1インテグリン、CCR5、CCR6を高発現し、PMA、Ionomycin刺激に対してInterferon (IFN)- $\gamma$ を高産生したが、Interleukin (IL)-4、IL-10、IL-17の産生は低値であった。

### D. 考察

ヒト末梢血中において、MAIT細胞は単一の $\alpha$ 鎖を発現する細胞としては非常に大きな細胞集団を形成していた。V $\alpha$ 24NKT細胞が末梢血T細胞の0.01~0.5%である

ことを考えるとMAIT細胞は極めて大きなポピュレーションであると言える。その頻度はMSの疾患活動性と関連して低下しており、MSの病勢を反映する疾患マーカーとして有用であると考えられた。加えて、CD4<sup>+</sup>NKT細胞、CD56<sup>bright</sup>NK細胞の頻度との相関関係から、MAIT細胞はこれら免疫制御細胞とシステムを形成し免疫制御を行っていること、およびMSにおいてこのシステムに乱れが存在する可能性が示唆された。さらにMAIT細胞はT細胞からのIFN- $\gamma$ 産生を抑制していることが示され、MSの病態抑制に関与することが推定された。一方で、MAIT細胞はCCR5、CCR6、 $\alpha$ 4 $\beta$ 7インテグリンを高発現し、これらを利用してMS病巣に浸潤すると考えられるが、炎症性サイトカインの存在下では自らIFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ を産生し炎症増強細胞として作用する可能性があり、MS病巣におけるMAIT細胞の役割を更に解明する必要があると考えられた。

#### E. 結論

寛解期MS患者末梢血中でMAIT細胞の頻度が減少していた。MAIT細胞はMSの病巣に浸潤しているが、病態における役割に関してはさらに解析が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Osoegawa, M., Kira, J., Fukazawa, T., Fujihara, K., Kikuchi, S., Matsui, M., Kohriyama, T., Sobue, G., Yamamura, T., Itoyama, Y., Saida, T., Sakata, T., Ochi, H., Matsuoka, T. The research Committee of Neuroimmunologic Diseases. Temporal changes and geographical differences in multiple sclerosis phenotypes in Japanese: nationwide survey results over 30 years. *Mult. Scler.* 15:159-173, 2009.
- 2) Ishizu, T., Kira, J., Osoegawa, M., Fukazawa, T., Kikuchi, S., Fujihara, K., Matsui, M., Kohriyama, T., Sobue, G., Yamamura, T., Itoyama, Y., Saida, T., Sakata, K. The Research Committee of Neuroimmunological Diseases: Heterogeneity and continuum of multiple sclerosis phenotypes in Japanese according to the results of the fourth nationwide survey. *J. Neurol. Sci.* 80:22-28, 2009.
- 3) Satoh, J.I., Tabunoki, H., Yamamura, T. Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. *Mult. Scler.* 15:531-541, 2009.
- 4) Klemann, C., Raveney, B., Klemann, A.K., Ozawa, T., von Hörsten, S., Shudo, K., Oki, S., Yamamura, T. Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates EAE. *Am. J. Pathol.* 174(6): 2234-2245 2009.
- 5) Theil, M.M., Miyake, S., Mizuno, M., Tomi, C., Croxford, J.L., Hosoda, H., Theil, J., von Hoersten, S., Yokote, H., Chiba, A., Lin, Y., Oki, S., Akamizu, T., Kangawa, K., Yamamura, T. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by Ghrelin. *J. Immunol.* 183: 2859-2866, 2009.
- 6) Fujita, M., Otsuka, T., Mizuno, M., Tomi, C., Gallagher, T.M., Yamamura, T., Miyake, S. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates experimental autoimmune encephalomyelitis via iNKT cell-dependent mechanism. *Am. J. Pathol.* 175: 1163-1123, 2009.
- 7) Croxford, J.L., and Yamamura, T. Back to the future for multiple sclerosis therapy: Focus on current and emerging disease-modifying therapeutic strategies. *Immunotherapy* 1: 403-424, 2009.
- 8) Miyake, S., and Yamamura, T. Ghrelin: friend of foe for neuroinflammation. *Discov Med* 8: 64-67, 2009.
- 9) Sakuishi, K., Miyake, S., Yamamura, T. NK cells and NKT cells in MS. *Molecular Basis of Multiple Sclerosis. The Immune System Series Results and Problems in Cell Differentiation*, Gramm U, ed, Springer-Verlag, Heidelberg, 2009, in press.
- 10) 山村 隆 : 多発性硬化症の分子標的医薬開発の現状. *BRAIN and NERVE*, 61 : 923-928, 2009.
- 11) 山村 隆, 千葉 健治: 自己免疫疾患の治療薬開発-病態の多様性を見据えて. *Yakugaku Zasshi* 129: 647-648, 2009.
- 12) 大木伸司, 山村 隆 : 多発性硬化症の病態形成とオーファン核内受容体 NR4A2. *臨床免疫・アレルギー科* 52: 111-118, 2009.
- 13) 宮崎雄生, 山村 隆 : NKT細胞と自己免疫. *医学のあゆみ* (最新・自己免疫疾患 Update - 研究と治

- 療の最前線) 3230: 651-656, 2009.
- 14) 大木伸司, 山村 隆: 多発性硬化症の病態解析から治療標的の同定へ. Jpn J Clin Immunol 32: 214-222, 2009.
  - 15) 山村 隆, 横手裕明, 三宅幸子: 腸内細菌と自己免疫. Current Insights in Neurological Sciences 17: 10-11, 2009.
  - 16) 山村 隆: 多発性硬化症. 連載 サイトカインと炎症性疾患・自己免疫疾患 - その病態における役割と治療展開-. 炎症と免疫. 18: 87-91, 2010.
  - 17) 荒浪利昌, 山村 隆: 多発性硬化症. 炎症・再生医学事典 (松島綱治、西脇徹編集) 朝倉書店, pp216-218, 2009.
  - 18) 岡本智子, 山村 隆: 脱髄性疾患. 急性散在性脳脊髄炎. 『神経疾患・診療ガイドライン - 最新の診療指針-』(編集 鈴木則宏) 総合医学社, pp195-197, 2009.
  - 19) 荒浪利昌, 山村 隆: EAE/experimental allergic encephalomyelitis. 「免疫の事典」(桂義元, 山本一彦, 小安重夫, 河本宏監修)、朝倉書店, pp26-218, 2009.

## 2. 学会発表

宮崎雄生, 三宅幸子, 山村 隆. ヒト末梢血における mucosal associated invariant T 細胞に関する研究. 第 37 回日本臨床免疫学会総会, 東京, 11, 13, 2009.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 1. 特許取得

なし.

### 2. 実用新案登録

なし.

### 3. その他

なし.

1.

# 多発性硬化症と視神経脊髄炎におけるアクアポリン4発現の多様性

研究分担者 吉良潤一<sup>1)</sup>

共同研究者 松岡健<sup>2)</sup>, 鈴木諭<sup>2)</sup>, 松下拓也<sup>1)</sup>, 磯部紀子<sup>1)</sup>, 真崎勝久<sup>1)</sup>, 米川智<sup>1)</sup>

## 研究要旨

NMO 10 例, NMO spectrum disorders 2 例, MS 5 例を対象に, 脱髄巢の AQP4 の発現低下が NMO に特異的であるのか免疫組織化学的に評価した. 脱髄巢を髄鞘食マクロファージが豊富な急性期, マクロファージが辺縁のみに存在する亜急性期, 消退した慢性期に分類した.

抗 AQP4 抗体陽性例を含む NMO 5 例, NMO spectrum disorders 1 例, 臨床病理学的に視神経脊髄病巣が存在しない症例を含む MS 2 例で, 急性期病巣の AQP4 発現が低下した. 血管周囲性補体, Ig 沈着を伴う病巣も存在した. 血管周囲の補体, Ig 沈着のみで AQP4 発現低下や脱髄が明らかでない病巣も認めた. NMO 5 例, MS 3 例では, 病期を問わず AQP4 発現は保たれ, 血管周囲への補体, Ig 沈着も無く, 壊死を伴う脱髄巢を認めた. AQP4 発現が他病巣で脱落する一方, 急性期視神経病巣で保持される NMO 例もあった.

抗 AQP4 抗体は視神経脊髄への病巣選択性や, 脱髄巢, 壊死巢の病理に一次的に関与しておらず修飾因子として働いている可能性が示唆された. (400 字程度)

## 研究目的

再発寛解型 neuromyelitis optica(NMO)の病理学的特徴として, 病巣での aquaporin-4(AQP4)の発現が選択的に脱落することが報告されている. 補体, 免疫グロブリン(IgG, IgM)が血管周囲に沈着し, それが AQP4 の発現低下と一致すること, また補体介在性に抗 AQP4-IgG<sub>1</sub> 抗体が AQP4 エンドサイトーシスを起こすことから, 抗 AQP4 抗体が病態に大きく関わっていると考えられている. しかし, NMO の病理学的特徴である壊死病巣では, 特に新鮮な病巣においてアストロサイト自体が存在しないことがあり, AQP4 発現低下の評価は慎重になされるべきである. また血管周囲の IgM 沈着が報告されるにも関わらず血清/髄液中に抗 AQP4-IgM 抗体は証明されていない.

一方, 多発性硬化症(MS)では, 急性期病巣において AQP4 の発現が亢進することが特徴とされるが, 慢性期病巣で AQP4 の発現が見られないことも報告されている.

今回, 我々は病巣での AQP4 発現低下が NMO に特異的かつ一次的であるのかを明らかにすることを目的とした.

## 研究方法

1964 年以降, 九州大学大学院医学研究院神経病理学にて臨床的病理学的に MS, NMO と診断された剖検例 15 例および天理よろづ相談所病院の抗 AQP4 抗体陽性が確定された剖検例 1 例を対象とした. 臨床的に NMO 10 症例, NMO spectrum disorders 1 症例(Wingerchuk らの診断基準 1999 & 2006), MS 5 症例(Poser 診断基準)と分類された. 対照群として, 重症筋無力症 2 症例, 痙性対麻痺 1 症例, 筋萎縮性側索硬化症(ALS) 6 症例, 脊髄小脳変性症(SCD) 1 症例, 筋ジストロフィー 1 症例, 血管炎 1 症例, 脳梗塞 1 症例, 脳炎 1 症例, 海馬硬化を伴う側頭葉てんかん 5 症例を検討した.

全ての標本を HE 染色と KB 染色で評価し, 脱髄巢には抗 AQP4 抗体, 抗 GFAP 抗体, 抗 CD68 抗体, 抗 C3 抗体, 抗 C9 抗体, 抗 IgM 抗体, 抗 IgG 抗体を用いた免疫染色を行った. 各病巣を, 髄鞘を貪食するマクロファージが豊富に存在する急性期, マクロファージが病巣中心に乏しく辺縁のみに存在する亜急性期, マクロファージが消退した慢性期に分類した.

脱髄病巣において, KB, GFAP, AQP4 脱落

1) 九州大学大学院医学研究院神経内科学

2) 九州大学大学院医学研究院神経病理学

範囲を半定量的に比較した。HE 染色および GFAP 染色でアストロサイトの存在が確認できるにも関わらず AQP4 発現が低下している場合を、AQP4 の選択的発現低下ないし脱落と判定し、アストロサイトが存在しない壊死病巣は判定から除外した。病巣・病期分類とは別に、補体、IgG、IgM の血管周囲性沈着を認めるが AQP4 脱落および脱髄が明らかでない病巣を別に解析した。

#### 研究結果

(1) NMO 5 症例、NMO spectrum disorders 1 症例、MS 2 症例において、急性期病巣での AQP4 発現低下を認めた。脱髄に比して、AQP4 の脱落は同程度かもしくはより広範囲であった。一方、NMO 5 症例、MS 3 症例においては、病期および視神経脊髄や大脳などの部位に関わらず、病巣における AQP4 発現低下は認めなかった。両群ともに壊死形成を伴う脱髄巣を認めた。

(2) 臨床的にも病理学的にも視神経脊髄病巣を認めない MS 症例においても、その脱髄巣に広範な AQP4 発現低下を認めた。

(3) 補体、IgM、IgG の血管周囲性沈着は急性期の AQP4 発現低下病巣の約 40%にみられたが、AQP4 が保持される病巣にはみられなかった。他方、慢性期で AQP4 が保持される病巣の約 6%に血管周囲性沈着を認めた。また AQP4 発現低下を認める症例群において、血管周囲の補体、IgM、IgG 沈着にも関わらず AQP4 の発現が保たれる病巣が存在した。脳炎、ALS、SCD においても血管周囲性沈着を認めた。

(4) ほとんどの急性期病巣において AQP4 発現低下がみられるにも関わらず、視神経急性期病巣において AQP4 発現が保持される NMO 1 症例が存在した。

#### 考察

NMO や MS といった病型に関わらず、病巣形成に AQP4 が関連する可能性がある群と、関連

が見られない群が存在した。抗 AQP4 抗体陽性症例や視神経脊髄病巣を伴わない MS 症例においても、脱髄に先行する AQP4 の発現低下が見られたことから、抗 AQP4 抗体は病巣形成に何らかの役割を果たしていることが考えられた。しかしながら、AQP4 発現低下を伴わない血管周囲への補体、免疫グロブリンの沈着もみられ、虚血など免疫系の介在とは独立した病巣形成機序が存在することも示唆された。

一方で、病期・病巣分布に関わらず、AQP4 が保持される群が病型を問わず存在した。この群では、血管周囲への補体、免疫グロブリンの沈着は確認できず、抗 AQP4 抗体とは別の病巣形成機序が示唆された。なお、両群とも壊死／空洞形成など高度の破壊性を呈することは共通であった。

これらのことは我々が臨床的見地から、NMO の全例が抗 AQP4 抗体陽性ではなく、むしろ NMO、MS といった臨床病型に関わらず抗 AQP4 抗体陽性症例が存在することから、AQP4 autoimmune syndrome of the CNS とでも位置づけるべき、古典的 NMO とは別スペクトラム群が存在する可能性を提唱したことに合致した。

#### 結論

抗 AQP4 抗体は NMO における視神経・脊髄といった病巣の選択性や、脱髄病巣、壊死病巣の病理に一次的な役割を果たしているとはいえ、修飾因子として働いている可能性が示唆された。

#### 健康危険情報

なし

#### 知的財産権の出願・登録状況

特許取得:なし

実用新案登録:なし

## 抗アクアポリン4抗体陽性例・陰性例の経過・予後の検討

研究協力者 小川 雅文<sup>1)</sup>

共同研究者 岡本 智子<sup>1)</sup>、山村 隆<sup>2)</sup>、村田 美穂<sup>1)</sup>、高橋 利幸<sup>3)</sup>

### 研究要旨

多発性硬化症 (MS) あるいは視神経脊髄炎と臨床診断した患者のうち抗 AQP4 抗体を測定した 83 名を対象とし歩行機能を主とする日常生活能力と視覚機能の経過・予後について検討した。抗 AQP4 抗体陽性例 (+群) 23 人 陰性例 (-群) 60 人。年齢は+群 50.1±14.1 歳、-群 46.7±13.0 と有意差なかった。男女比は+群は男 1 : 女 22、-群は男 16 : 女 44 で+群で女性の割合が高かった。日常生活能力については総合障害度 (EDSS) の 4.0 相当 (500m以上歩行不可能) 6.0 相当 (補助歩行 100m程度) 8.0 相当 (車いす生活、自操不可、身の回りの多くのことは可能)、視覚機能は Functional System (FS) の評価で 4 (片眼矯正視力 0.1 以上 0.2 未満) 5 (片眼矯正視力 0.1 未満) 片眼指数弁以下に至るまでの時間を生存分析で検討した。日常生活能力では+群と-群で障害に至るまでの期間に有意差は認めなかった。視覚機能は FS4 に至った例は+群 13/23 例 : -群 3/60、FS5+群 12/23 例 : -群 2/60、片眼指数弁以下+群 6/23 例 : -群 1/60 と明らかに+群で経過が悪く生存分析でも有意であった。今回の検討では抗 AQP4 抗体陽性例は陰性例に比べ歩行機能を主体とする日常生活能力の経過には大きな差がないが視覚機能障害は明らかに高度で初発時から視覚機能が重度に障害される例がみられ注意が必要である。

### 研究目的

近年、抗アクアポリン4 (AQP4) 抗体の存在が明らかにされ視神経脊髄炎では陽性であることが多く従来の多発性硬化症 (MS) とは異なる病態を持ち治療についてもステロイドが再発予防に有効であるなど様々な報告が続いている。通常 MS の機能評価には総合障害度 (EDSS) がよく用いられる。EDSS は各系統の Functional System (FS) と日常生活能力から求められる。しかし EDSS の値は各 FS の値より下回ることはないと設定されているためひとつの機能が重篤であると歩行が全く問題なくとも全体の EDSS スコア

がわるくなってしまう。視神経脊髄炎症例では片眼の機能を喪失しても歩行可能な例があり単純な EDSS の比較のみでは検討が不十分になりうる。

今回の検討では AQP4 陽性・陰性例の経過と予後を検討するため日常生活能力・歩行能力と視覚機能を分離して評価することにより詳細な検討を行った。

### 研究方法

当院に過去 3 年間に受診歴のある MS あるいは視神経脊髄炎と臨床診断した患者のうち抗 AQP4 抗体を測定しえた患者を対象とした。発症 1 年未満例、臨床情報が不十分な例、他の神経疾患合併例は除外した。抗 AQP4 抗体はすべて東北大学大学院医学研究科高橋利幸先生に測定していただいた。今回

1) 国立精神・神経センター病院神経内科

2) 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

3) 東北大学神経内科

は臨床症状や経過、治療内容、3椎体以上の脊髄病変の有無などにかかわらず抗AQP4抗体陽性と陰性でのみ分類した。経過、予後については日常生活能力については総合障害度 (EDSS) の 4.0 相当 (500m以上歩行不可能) 6.0 相当 (補助歩行 100m程度) 8.0 相当 (車いす生活、自操不可、身の回りの多くのことは可能) および Functional System (FS) の評価の視覚機能で 4 (片眼矯正視力 0.1 以上 0.2 未満) 5 (片眼矯正視力 0.1 未満) 片眼指数弁以下 についてそれぞれ治療を受けた後も回復せず後遺症として相当の状態に達した時期をカルテおよび聞き取り調査した。死亡例はなかった。統計は 2 群間の差は t 検定、 $\chi^2$  二乗検定を用いた。予後については生存分析をおこない Kaplan-Meyer 法を用いログランク検定を用い検討した。すべて危険率 5% 以下を有意とした。

## 研究結果

対象は抗 AQP4 抗体陽性例 (+群) 23 人 陰性例 (-群) 60 人。年齢は+群 50.1 $\pm$ 14.1 歳、-群 46.7 $\pm$ 13.0 と有意差はなかった。男女比は+群は男 1 : 女 22 と圧倒的に女性に多かったが-群は男 16 : 女 44 で明らかに+群で女性の割合が高かった。+群のうちインターフェロン投与を受けた症例のうち 2 例で明らかに投与後 EDSS が悪化していたがこの 2 例を除外しても統計結果はかわらなかった。インターフェロン投与が視神経炎を引き起こした症例もみられたがその後改善しており FS に影響を及ぼしていなかった。EDSS では+群と-群で障害に至るまでの期間に有意差は認めなかった。一方視覚機能は FS4 に至った例は+群 13/23 例 : -群 3/60、FS5+群 12/23 例 : -群 2/60、片眼指数弁以下+群 6/23 例 : -群 1/60 であった。明らかに+群で経過が悪く生存分析でも有意であった。初発時の視神経炎で指

数弁あるいはそれ以下と大きく障害される例も+群の 4 例でみられた。-群では初発から指数弁以下に一時的になってもある程度改善した 2 例があったがその後も永続的に障害された例はなかった。

## 考察

今回の検討では抗AQP4抗体陽性例は陰性例に比べ歩行能力を主体とした日常生活能力には経過や予後に差がないが視覚機能障害は非常に高度であった。視神経脊髄炎に対する従来の報告通り視神経炎は重篤で予後が悪いことが示された。一方歩行機能は長年にわたって歩行が保たれる例も多くみられた。初発時から視覚機能が強く障害されそのまま回復しない例があり診断・治療上注意が必要で初期から積極的な治療により後遺症をなるべく少なくするようにしなければならない。

## 結論

今回の検討では抗 AQP4 抗体陽性例は陰性例に比べ歩行機能を主体とする EDSS の経過には大きな差がないが視覚機能障害が明らかに高度であった。初発時から視覚機能が大きく損なわれる例がみられ診断・治療上注意が必要である。

## 健康危険情報

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

特許取得 : なし

実用新案登録 : なし

# LSCL を有する症例における抗 AQP4 抗体の有無による臨床的検討

班 員 埼玉医科大学総合医療センター 神経内科 野村 恭一  
共同研究者 埼玉医科大学総合医療センター 神経内科  
千葉大学大学院医学研究院 神経内科学※

小島 美紀, 王子 聡, 斉藤 あかね, 久保田 昭洋, 田島 孝士, 原 渉, 成川 真也  
伊崎 祥子, 吉田 典史, 井口 貴子, 山里 将瑞, 三井 隆男, 高濱 美里, 森 雅裕※

## 要旨

LSCL を有する症例において抗 AQP4 抗体(AQP4 抗体)の有無による臨床的特徴を比較検討した。対象は AQP4 抗体陽性群 21 症例, 陰性群 12 症例, 計 33 症例であった。性別の検討では両群共に女性に多く, 特に陽性群でより多かった。平均発症年齢の検討では両群に差はなかった。年間再発回数の検討では有意差をもって陽性群に多かった。髄液の細胞数・蛋白の検討では両群に有意差は認めなかった。病巣部位の検討では陽性群では視神経病変を半数に認めるが, 陰性群では視神経病変を認めなかった。脳病変の合併では両群に差はなかったが, 陽性群では tumefactive lesion を多く認め, 陰性群では ovoid lesion を多く認めた。LSCL の分布の検討では両群ともに頸椎・胸椎病変が多かったが, 陽性群では Th7/8/9 レベルを含む病巣が多く認めた。AQP4 抗体以外の自己抗体の合併の検討では有意差をもって陽性群において他の自己抗体の検出を多く認めた。その内訳は抗 Thyroglobulin 抗体, 抗甲状腺 Peroxidase 抗体の合併が高かった。

## 目的

AQP4 抗体陽性例では, 3 椎体以上の脊髄病変 (LSCL : long spinal cord lesion)を伴い, また tumefactive lesion, 視神経炎を認める場合が多いとされるが, AQP4 抗体陰性例においても同様な臨床病変・経過を来たす場合がある。今回我々は, LSCL を有する症例において血清 AQP4 抗体の有無による臨床的な特徴を明らかにするために

1) 性別, 発症年齢, 年間再発回数 (回数/観察期間), 2) 脳脊髄液所見, 3) LSCL 以外の病巣部位, 4) LSCL の分布, 5) 合併する他の自己抗体の出現の有無, 6) 免疫治療効果について, AQP4 抗体の陽性・陰性別に比較検討した。

## 対象・方法

LSCL を有する 33 症例を対象とし retrospective に検討した。病巣部位は MRI で確認された病巣について検討し, LSCL の高位診断は MRI における椎体高位で判定した。

埼玉医科大学総合医療センター 神経内科

〒350-8550 埼玉県川越市鴨田 1981



血清 AQP4 抗体 の測定は千葉大学医学部神経内科で行った。

また、倫理面への配慮として、患者本人への説明・同意を得たうえで血清 AQP4 抗体価の検討を行い、入院時期や内容などの特定がなされないように配慮した。

## 結果

性別、発症年齢、年間再発回数の検討では、性別は AQP4 抗体陽性群：21 症例 (63.6%，男性 2 例、女性 19 例)、AQP4 抗体陰性群：12 症例 (36.4%，男性 4 例、女性 8 例) であり、平均発症年齢は陽性群／陰性群は 48.4／49.8 歳であった。年間再発回数は陽性群／陰性群は 1.32／0.24 (回/年) であった。

脳脊髄液検査の検討では、細胞数・蛋白について検討。髄液細胞数は両群に明らかな差は認めなかった(陽性群／陰性群 40.5／99.6 細胞数/3)。髄液蛋白も両群に明らかな差は認めなかった(63.1／91.8 mg/dl)。細胞・蛋白に有意差はないものの陰性群でいずれも高値を示した

LSCL 以外の病巣部位では、視神経・脳病変について検討した。脳病変は大脳・小脳・脳幹病変・その他に分け、さらに大脳病変は tumefactive lesion, ovoid lesion に分類した。視神経炎の合併は陽性群では 11/21 例 (52.4%) で認めたが、陰性群では合併を認めなかった。脳病変は陽性群 28.6%，陰性群 33.3% に認め、その内訳は tumefactive lesion (陽性群／陰性群 50／25 %), ovoid lesion (17／50 %), 小脳病変 (17／25 %)・脳幹病変 (17／50 %), その他の脳梁病変 (33／0 %) であった。

LSCL の分布の検討では、頸椎病変(陽性群／陰性群) 62／58 %, 胸椎病変 76／83 %,

腰椎病変 0／25 % であった。特に胸椎病変において Th7/8/9 を含む病巣は 88／25% で陽性群において多く認めた (図 1)。

合併する他の自己抗体の検討は、抗 Thyroglobulin 抗体(ATG), 抗甲状腺 Peroxidase 抗体(TPO), 抗 SS-A/Ro 抗体(SS-A)を含む各種の自己抗体について検討した。自己抗体の合併頻度は陽性群 57%, 陰性群 17% であった。それぞれの自己抗体の合併頻度は(陽性群／陰性群) ATG 29／8%, TPO 14／0 %, SS-A 14／8% であった。

免疫治療効果の検討では、急性増悪期にはステロイド・パルス療法(IVMP : intravenous methylpredonison)を第一選択として施行し、IVMP で十分な改善が見られなかった症例では免疫吸着療法(IAPP : immuoadsorption plasmapheresis)を施行した。IVMP と IAPP との治療効果は、それぞれ(陽性群／陰性群) 86／83%, 100／80% であった。

## 参考文献

- 1) 野村 恭一, 他 : 厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業, 免疫性神経疾患に関する調査研究班・平成 19 年度報告書:82-84, 2008
- 2) 野村 恭一, 他 : 厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業, 免疫性神経疾患に関する調査研究班・平成 20 年度報告書:52-55, 2009

健康危険情報 なし

## 知的財産権の出願・登録状況

特許取得・実用新案登録: なし

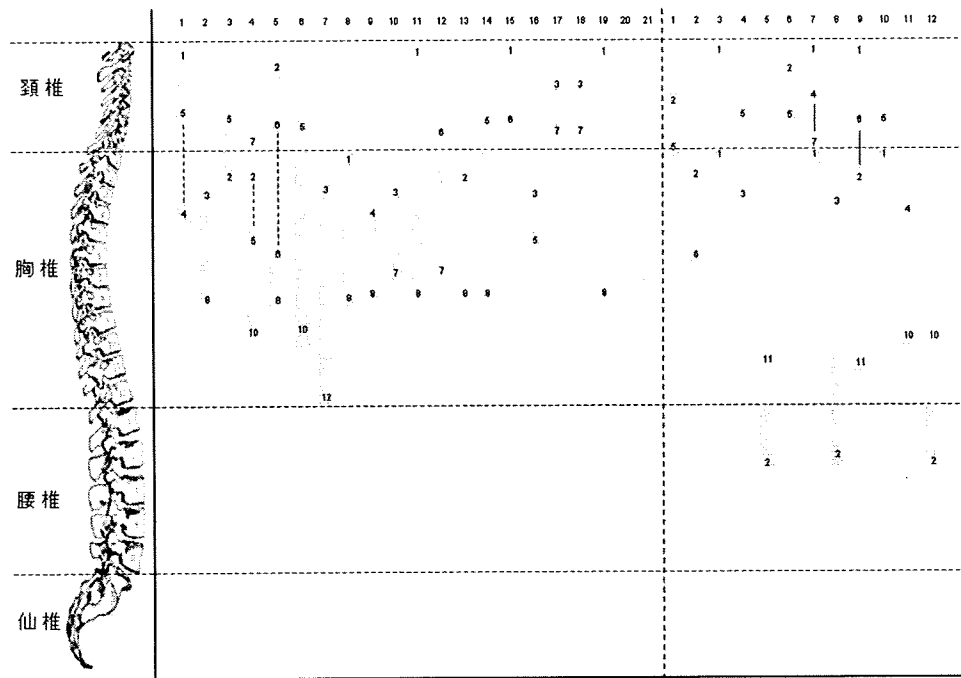


図 1. LSCL の分布

表 1. LSCL を有する症例における抗 AQP4 抗体の有無による臨床的特徴

	陽性	陰性
① 性別 発症年齢 (2回目以降を再発) 年間再発回数 (回数/観察期間)	女性 差はなし 多い	女性 差はなし 少ない
② LSCL以外の病巣部位 (MRI) ・視神経病変 ・脳病変	視神経病変 57% Tumefactive lesion 多い	視神経病変 なし Ovoid lesion 多い
③ LSCLの分布	頸椎・胸椎病変 Th 7/8/9を含むことが多い	頸椎・胸椎病変
④ 合併する他の自己抗体の出現頻度	多い (57%) ATG, SS-A, ds-DNA, TPOの合併が多い	少ない (17%)
⑤ 治療効果	ステロイド・パルス療法, 免疫吸着療法ともに両群に差なし	

## Neuromyelitis optica(NMO)における抗アクアポリン4抗体価の定量的解析

研究分担者 田中正美<sup>1)</sup>  
共同研究者 松井 大<sup>1),2)</sup>、太田潔江<sup>2)</sup>、田原将行<sup>1)</sup>、田中恵子<sup>3)</sup>、  
太田光熙<sup>4)</sup>、小西哲郎<sup>1)</sup>

### 研究要旨

近年、NMOの患者血清中に抗アクアポリン4 (AQP4) 抗体が存在することが発見され、抗AQP4抗体の測定は、NMOの診断に重要な項目となっている。今回、我々は、HEK293細胞によるシステムで抗AQP4抗体陽性と判断した症例を中心に、ELISAを用いて抗AQP4抗体価を定量的に評価し、ELISAによる抗AQP4抗体測定の有用性につき検討した。その結果、従来の方法で抗AQP4抗体陽性であった患者の82%がELISAでも陽性であり、ELISAは有用であると思われた。ただ、従来の方法で陽性であったが、ELISAで陰性になった症例も少数例ではあるが存在し、抗原の認識の問題と思われた。

### 研究目的

Neuromyelitis optica (NMO) は、視神経炎と脊髄炎を中心に再発と寛解をくりかえす病気で、近年NMOの患者血清中にNMO-IgGが同定され、これは水チャネルであるAQP4を認識することがわかった。Wingerchukらは2006年にNMOの診断基準を提唱し、抗AQP4抗体の測定は、NMOの診断に重要な項目となっている。

抗AQP4抗体の測定は、これまでヒ

トAQP4のcDNA全長をHEK293細胞にトランスフェクションし、細胞の表面に発現したAQP4と患者血清を反応させ、蛍光抗体を用いて測定する方法を用いてきた。しかし、この方法では、細胞を培養する必要があるため、多数のサンプルを解析するには労力がかかり、抗体価を定量的に評価できないなどいくつかの問題点があった。また、臨床的に、典型的なNMOが疑われながら、抗AQP4抗体陰性の症例や最初陰性でありながら陽性化する症例が存在し、これらの症例において抗体が存在しないのか、あるいは抗体の測定法の問題で抗体が陰性であるのかが不明であった。抗体価をELISA

- 
- 1) 国立病院機構宇多野病院神経内科
  - 2) 同 臨床研究部
  - 3) 金沢医科大学神経内科
  - 4) 神戸薬科大学病態生化学

にて定量的に評価できるようになれば、これらの症例の診断に役立つのみならず、治療効果の判定にも役立つものと思われる。

## 研究方法

2005年9月から2009年9月に当院に外来通院あるいは入院した抗AQP4抗体陽性患者77例、疑陽性と判断した8例、古典型多発性硬化症15例、対照群として他の神経疾患14例、神経疾患以外の患者34例を対象とした。

HEK293細胞を用いた抗AQP4抗体の測定は、従来の方法で行い(文献)、ELISAによる測定は、AQP4 autoantibody ELISA kitを用いた。

## 倫理面への配慮

発表に際しては、個人が特定できないよう配慮した。

## 研究結果

従来の方法で、抗AQP4抗体陽性であった77例のうち、ELISAで陽性であったのは、63例(抗体価:365.2±288 U/ml)で、陰性は14例であった。従来の方法で疑陽性と判定した8例のうち、ELISAで陽性であったのは2例であり、残り6例は陰性であった。従来の方法で抗体価が陰性であった古典型多発性硬化症15例は、ELISA

でも全例で陰性であった。対照群として用いた他の神経疾患患者14例、神経疾患以外の患者34例は全例で陰性であった。

## 考察

今回のELISAの方法により、従来の方法で抗AQP4抗体陽性であった患者の82%がELISAでも陽性であった。対照群48例では、全例で陰性であり、抗AQP4抗体測定にELISAは有用であると思われた。ただ、従来の方法で陽性であったが、ELISAで陰性になった症例も少数例ではあるが存在した。これは、抗原の認識の問題と思われた。

## 結論

ELISAは抗AQP4抗体測定に有用であると思われた。ただ、NMOが疑われELISAで抗AQP4抗体が陰性の場合は、従来の方法でも測定する必要があるように思われた。

## 文献

Tanaka K et al. Mult Scler. 13: 850-855.2007

## 健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし