

# 高次脳機能評価とスペクトラルドメイン光干渉断層計を使った

## NMO 病態の解析

分担研究者 西澤正豊<sup>1)</sup>

共同研究者 佐治越爾<sup>1)</sup>, 河内泉<sup>1)</sup>, 柳川香織<sup>1)</sup>, 横関明子<sup>1)</sup>  
豊島靖子<sup>2)</sup>, 高木峰夫<sup>3)</sup>, 柿田明美<sup>2)</sup>, 高橋均<sup>2)</sup>

### 研究要旨

欧米では多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) 患者の約半数に高次脳機能障害が存在し、社会生活と日常生活に影響を与えている可能性が指摘されている。一方、従来、大脳病変が比較的小さいとされていた neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOsd) における高次脳機能障害の実態は未だ明らかにされていない。そこで、NMOsd 患者を対象に、Rao' s Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests (BRBN) 日本語版を用いた高次脳機能評価を行い、さらにスペクトラルドメイン光干渉断層計 (Optical coherence tomography: OCT) を利用した網膜神経線維層 (Retinal nerve fiber layer: RNFL) の厚さ計測から神経軸索変性の可能性を検討した。NMOsd では MS と同様に高次脳機能障害が存在し、視神経炎の既往のない眼に RNFL 厚が菲薄化する群が存在すること、RNFL 厚は高次脳機能スコアとの間に相関が認められることから、再発・寛解という炎症・免疫機転による発作とは別個に、神経変性機転が存在する可能性が示唆された。今後、NMOsd における“normal-appearing brain lesion”の詳細な免疫学的、病理学的検索が期待される。

### 研究目的

欧米では多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) 患者の約半数に高次脳機能障害が存在し、就労をはじめとした社会生活と日常生活に影響を与えていることが報告されている<sup>1)</sup>。一方、neuromyelitis optica (NMO) における高次脳機能障害は、従来、大脳病変が比較的小さいとされていたため、その実態は不明のままであった。そこで我々は Rao' s Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests (BRBN) 日本語版を用いて NMO における高次脳機能障害を検討し、1) 本邦 NMO では MS と同頻度に高次脳機能障害が存在すること、2) その障害パターンは注意と情報処理速度および言語の学習と遅延再生を中核としていることを明らかにしてきた<sup>2)</sup>。

近年、眼科領域で開発された光干渉断層計 (Optical coherence tomography: OCT) は近赤外線を用いることで非侵襲的に網膜断層像を画像化する装置である。特に新しく開発されたスペクトラルドメイン OCT は、従来のタイムドメイン OCT と比較して、深さ分解能が

10 $\mu$ m から 5 $\mu$ m へ、撮影速度が 40-100 倍へと改善し、飛躍的に精度が向上したため、緑内障診療にとどまらず、神経内科領域でもアルツハイマー病や視神経炎の評価に有用である可能性、すなわち OCT を使用した網膜神経線維層 (Retinal nerve fiber layer: RNFL) の厚さ計測により、神経軸索変性の過程を非侵襲的かつ経時的に観察できる可能性が指摘されている。そこで本研究では、高次脳機能評価と OCT 検査の観点から、NMO における神経変性病態を検討した。

### 研究方法

同意が得られた NMOsd 9 例 (definite NMO 3 例, limited NMO 6 例), 改訂 McDonald 診断基準を満たす再発緩解型 MS 9 例を対象に、BRBN 日本語版を用いて高次脳機能を検討した。次にスペクトラルドメイン OCT (RTVue-100) を用いて RNFL 厚を測定し、1) 視神経炎既往の有無による RNFL 厚の変化、2) 視神経炎の既往のない眼の RNFL 厚と高次脳機能評価との相関を検討した。評価した対象

1) 新潟大学脳研究所神経内科学分野 2) 新潟大学脳研究所病理学分野  
3) 新潟大学大学院医歯学総合研究科視覚病態学分野

眼は NMOsd9 例 18 眼, MS9 例 18 眼であった。NMO, MS ともに視神経炎の既往のある眼が 6 眼, 視神経炎の既往のない眼が 12 眼であった。

## 研究結果

視神経炎の既往のある眼の RNFL 厚は, 既往のない眼と比較し, NMO, MS ともに有意に菲薄化を認めた (NMO  $P < 0.01$ , MS  $P < 0.05$ )。

視神経炎の既往のない眼では, 年齢とマッチさせた健常者データと比較し, NMO 症例の 25%, MS 症例の 33%の眼に RNFL 厚の菲薄化を認め, 視神経炎がなくとも RNFL 厚が菲薄化する群が NMO, MS 症例の中に存在していた。さらに, NMO において視神経炎の既往のない眼の RNFL 厚と高次脳機能スコア BRBN index (高値であるほど高次脳機能障害が強い) との間には負の相関を認めた ( $r = -0.74$ ,  $P < 0.01$ )。

## 考察

NMO, MS ともに視神経炎の既往のある眼の RNFL 厚は, 既往のない眼と比較し菲薄化を認めた<sup>3,4</sup>。この結果は既報を裏付けるものであり, 本研究で使用したスペクトラルドメイン OCT 検査は信頼性が高いことを示唆している。

これまで我々は, 欧州だけではなく本邦においても NMOsd 患者に高次脳機能障害が存在することが明らかにしてきた<sup>2</sup>。さらに本研究において NMO では視神経炎の既往のない眼に RNFL 厚が菲薄化する群が存在すること, RNFL 厚は高次脳機能スコアとの間に相関が認められることを明らかにした。これは RNFL 厚を菲薄化する要因, すなわち神経軸索変性機転が NMO の高次脳機能障害を引き起こしている可能性を示唆するものである。

MS では conventional MRI 検査で異常信号が検出されなくとも, 剖検病理標本にて軟膜側からの炎症細胞浸潤により誘導される皮質性脱髄<sup>5</sup>が多数存在し, 高次脳機能に影響を及ぼす可能性が指摘されている。一方, 本来, 大脳病変の少ないとされる NMOsd の高次脳

機能障害の機序は明らかではない。近年, magnetization transfer および diffusion tensor MRI 法により, NMOsd の “normal-appearing gray matter” における異常が明らかとなっている。今後, NMOsd における “normal-appearing brain lesion” の詳細な免疫学的, 病理学的検索の必要性が考えられる。

## 結論

NMOsd では MS と同様に高次脳機能障害が存在する。NMOsd では, 再発・寛解という炎症・免疫機転による発作とは別個に, 神経変性機転が存在する可能性が示唆された。

## 文献

1. Chiaravalloti ND, et al. Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2008;7:1139-1151
2. Saji E, et al. Neuropsychiatric presentation of neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology.* 2010;74 (Suppl. 2):A169
3. Naismith RT, et al. Optical coherence tomography differs in neuromyelitis optica compared with multiple sclerosis. *Neurology.* 2009;72:1077-1082
4. Ratchford JN, et al. Optical coherence tomography helps differentiate neuromyelitis optica and MS optic neuropathies. *Neurology.* 2009;73:302-308
5. Magliozzi R, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain.* 2007;130:1089-1104

## 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 Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests in Multiple Sclerosis (BRB-N)を用いた高次脳機能評価と疲労及びアパシー（やる気）の影響に関する研究

研究分担者 菊地誠志<sup>1)</sup>

共同研究者 新野正明<sup>1)</sup>，三船恒裕<sup>2)</sup>，大槻美佳<sup>3)</sup>，宮本勝一<sup>4)</sup>，河内泉<sup>5)</sup>，深澤俊行<sup>6)</sup>

協力施設 旭川赤十字病院，岩手医科大学，東北大学，新潟大学，埼玉医科大学総合医療センター，国立精神・神経医療センター，順天堂大学，東京女子医大，東京女子医大八千代センター，東海大学，千葉大学，金沢医科大学，国立病院機構宇多野病院，近畿大学，広島市民病院，山口大学，九州大学，国立病院機構長崎川棚医療センター

### 研究要旨

多発性硬化症（MS）患者では，病巣局在によって認知機能障害（失語，失認，失行，記憶障害，前頭葉障害）などを生じるほか，年余に渡る罹患によって全般的な認知機能障害を生じることが報告されている。その評価として，近年，Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests in Multiple Sclerosis (BRB-N) が欧米諸国で広く用いられるようになった。このバッテリーはMSで特に影響を受けやすい注意障害や記憶障害などの検出にすぐれ，現在，MSの認知機能評価や薬剤の効果判定にも用いられている。今回，全国規模でBRB-Nの日本語版を用いたMS患者の認知機能評価（主に健常者との比較），さらに，臨床所見との相関，また，疲労やアパシー（やる気）といった因子が高次機能に影響するかどうかを検討する。

### 背景・目的

多発性硬化症（以下MS）患者では，病巣局在によって認知機能障害（失語，失認，失行，記憶障害，前頭葉障害）などを生じるほか，年余に渡る罹患によって全般的な認知機能障害を生じることが報告されている。その評価として，近年，Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Test in Multiple Sclerosis (BRB-N) が欧米諸国で広く用いられるようになった<sup>1)</sup>。これは7つの下位テ

ストからなる認知機能テストバッテリーで，MSで特に影響を受けやすい注意障害や記憶障害などの検出にすぐれ，現在，MSの認知機能評価や薬剤の効果判定にも用いられている。最近ようやくこの検査の日本語版は作成され，日本人MS患者における高次機能評価が可能となった。

今回，全国規模でBRB-Nの日本語版を用いたMS患者の認知機能評価（主に健常者との比較），さらに，臨床所見との相関，また，疲労やアパシー（やる気）といった因子が高次機能に影響するかどうかを検討する。

- 1) 国立病院機構北海道医療センター
- 2) 北海道大学大学院文学研究科
- 3) 北海道医療大学心理科学部
- 4) 近畿大学神経内科
- 5) 新潟大学脳研究所神経内科学分野
- 6) さっぽろ神経内科クリニック

### 対象・方法

(1) MS 患者 (MS の診断基準としては、McDonald の診断基準 2005 年改訂版<sup>2)</sup>を用いる.)

(2) 除外基準

- ① 著しい構音障害, 視覚障害, 聴覚障害, 上肢筋力低下を認める患者 (応答や手を使用する評価項目があるため)
- ② 視神経脊髄炎 (NMO) 患者, 抗AQP-4 抗体陽性患者, 3椎体以上の脊髄病変を有する患者

(3) 観察および検査項目

各患者および健常者において, BRB-N, 疲労スケール, アパシースコアを調査する. その他, 高次機能, 疲労, アパシーにはうつも関係する可能性があるため, 可能な方にはうつ状態を評価するための BDI-II も施行. また, 臨床的データとの相関を観るため, 以下の項目について, 観察および検査を実施する.

- ① 患者基本情報: 年齢, 性別, 学歴
- ② 疾患に関する情報: 診断名, 病型, 重症度, 再発頻度, 治療内容, 血液・髄液検査所見, MRI 画像所見

(4) 評価項目

(A) 主要評価項目

BRB-Nで評価される高次機能のMS患者と健常対照者の比較検討

(B) 副次的評価項目

- ① BRB-Nと年齢, 性別との相関
- ② BRB-Nと重症度, 再発頻度, 治療内容などの臨床所見との相関
- ③ BRB-Nと疲労スケールの相関
- ④ BRB-Nとアパシースコアの相関
- ⑤ BRB-N, 疲労スケール, アパシースコアとBDI-IIの相関

(5) 目標症例数

全国でMS患者150例, 健常者150例

(倫理面への配慮)

本研究は北海道医療センター倫理審査委員会において承認を受けた (他協力施設においても倫理審査委員会での審議中, もしくは承認を得た). 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する.

現在の状況

現在, 北海道医療センターにて患者, 健常者の調査を開始している. 他の研究協力施設でも, 順次倫理審査委員会の審議承認後に調査を開始する予定である.

文献

1. Bever CT Jr, et al. The Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests for Multiple Sclerosis: a preliminary serial study. *Mult Scler.* 1995; 1: 165-9.
2. Polman CH, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol.* 2005; 58: 840-6.

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再発時の免疫動態の相違

班 員 松井 真<sup>1)</sup>  
共同研究者 荒谷信一<sup>1)</sup>、稲田紘之<sup>1)</sup>、長山成美<sup>1)</sup>、田中恵子<sup>1)</sup>  
小西哲郎<sup>2)</sup>

### 研究要旨

今回われわれは、MS と NMO 患者再発時における末梢血と髄液の免疫学的動態を比較検討し、中枢神経内の炎症反応に相違があるかどうかを追究した。さらに脊髄長大病変を呈さず抗 AQP4 抗体は陰性の spinal/opticospinal MS 患者と、両者ともに陽性の NMO 患者に絞り込んで解析することにより、抗 AQP4 抗体の存在が免疫応答を修飾する可能性について検討した。その結果、後者の解析では、CD8+CD11a<sup>-</sup>抑制性 T 細胞は NMO 末梢血中で MS に比して減少していることが判明した。一方、MS 髄液では B 細胞の増加が認められ、NMO 髄液では Th1 および Th2 細胞ともに MS 髄液よりも存在率が低かった。したがって、MS では中枢神経病態形成に B 細胞が関与している可能性とともに、NMO ではむしろ systemic immunity の制御機構に異常が存在する可能性が示唆された。

### 研究目的

多発性硬化症 (MS) と視神経脊髄炎 (NMO) は、標的抗原そのものが異なる別個の disease entity であるのか、あるいは、抗アクアポリン 4 (AQP4) 抗体の存在により、大きく病態が修飾された疾患スペクトラムに属するのか、議論の対象になっている。

一般に NMO の再発時の症状は重篤である。しかし、脱髄を含めた中枢神経系の組織破壊を引き起こす免疫病態が両者で異なるのか否かについての検討は、十分に行われていない。さらに、抗 AQP4 抗体がどのように病態形成に関与するのかについても、十分には解明されていない。

そこで、今回われわれは、MS と NMO 患者再発時における末梢血と髄液の免疫学的パラメータを比較検討するとともに、脊髄または視神経脊髄型 MS と NMO 患者を対象に解析することにより、抗 AQP4 抗体の存在が免疫応答を修飾する可能性について検討した。

### 対象

活動期の RRMS 患者 15 名 (男女比 8:7) と

1) 金沢医科大学神経内科学

2) 国立病院機構宇多野病院神経内科

急性増悪期 NMO 患者 7 名 (全員女性) で、免疫修飾薬やステロイドの治療は受けていない。MS 群は McDonald らの診断基準を満たし、且つ 3 椎体以上に渡る脊髄長大病変 (LESCL) は一度も出現せず、抗 AQP4 抗体陰性の患者である。NMO 群は脊髄炎と視神経炎に起因する症状/既往が存在し、LESCL と抗 AQP4 抗体の両者とも陽性の患者である。MS 患者で、脊髄あるいは脊髄視神経の症状のみを呈した患者は、4 名 (男女比 3:1) であった。

### 方法

急性期のステロイドパルス療法が行われる以前に採取した末梢血および髄液検体を対象とし、以下の項目を検索した。

CD3 成熟 T 細胞, CD19/20 B 細胞, Th1 細胞 (CD4+CCR5+, CD4+CXCR3+), Th2 細胞 (CD4+CCR3+, CD4+CCR4+), CD4+CD29+ helper inducer T 細胞, CD4+CD25<sup>high</sup> Treg, CD8+CD11a+ CTL, CD8+CD11a<sup>-</sup> suppressor T 細胞等の存在率 (Flow cytometry による)。

髄液検体では、細胞数・蛋白・アルブミン・IgG・IgG index を同時に測定した。

表 1

|                |                   | OSMS        | NMO         |             |
|----------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|
|                |                   | n = 4       | n = 7       |             |
| <b>末梢血</b>     |                   |             |             |             |
| CD8+CD11a- (%) | suppressor T cell | 9.6 ± 2.5   | 2.9 ± 2.8   | p = 0.0050  |
| <b>髄液</b>      |                   |             |             |             |
| 蛋白 (mg/dl)     |                   | 23.5 ± 3.4  | 56.3 ± 25.4 | p = 0.0434  |
| CD20+ (%)      | B cell            | 6.9 ± 4.8   | 1.2 ± 1.3   | p = 0.0383  |
| CD4+CCR4+ (%)  | Th2               | 18.4 ± 15.3 | 2.4 ± 3.6   | p = 0.0275* |
| CD4+CCR5+ (%)  | Th1               | 16.9 ± 6.2  | 6.9 ± 5.7   | p = 0.0309  |

\* by Mann-Whitney's U test

(倫理面への配慮)

本研究において個人情報保護に配慮してデータの匿名化を行い解析した。

結果

- 1) NMO 末梢血では、MS に比して CD11a 陰性の抑制性 CD8 細胞が有意に減少していた (2.9 ± 2.8% vs. 8.8 ± 4.5%)。
- 2) NMO 髄液は MS 髄液よりも蛋白レベルは高かったが (56.3 ± 25.4 vs. 28.9 ± 6.4 mg/dl)、細胞数はむしろ MS で有意に高かった (2.4 ± 2.0 vs. 7.3 ± 5.5/mm<sup>3</sup>)。
- 3) CD4+CD25<sup>high</sup> Treg の存在率は、末梢血・髄液ともに MS と NMO 間で相違はなかった。
- 4) 表現型を揃えた MS と NMO の比較では、NMO 群で、髄液中の B 細胞・CCR4 陽性 Th2 細胞・CCR5 陽性 Th1 細胞が MS よりも有意に低値を示した (表 1)。

- 2) 病変部位を揃えた解析により、MS における視神経・脊髄病巣の形成には、B 細胞および CD4 陽性ヘルパー T 細胞亜分画が担っている可能性が示唆された。一方、NMO では中枢神経内での免疫応答の特徴は見出せなかった。
- 3) したがって、MS と NMO では、中枢神経組織の炎症を促進する要因が異なる可能性がある。しかし、抗 AQP4 抗体の病的意義の解明には、典型的な MS と診断できる患者で同抗体陽性の患者や、LESCL を有し Wingerchuk らの改訂診断基準では NMO と診断できるが抗体陰性の患者群での中枢神経内の免疫動態を解析する事が糸口になると考えられた。

結論と考察

- 1) NMO では、systemic な免疫制御機構の障害が存在する可能性がある。

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

## 視神経脊髄炎のサイトカイン・ケモカインプロファイル

分担研究者 桑原 聡  
共同研究者 鶴沢 顕之、森 雅裕

### 研究要旨

NMO の患者血清中に抗 aquaporin-4 (AQP4) 抗体が存在することが発見されて以降、多数の研究の蓄積から視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica: NMO) と多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) は異なる疾患である可能性が示唆されているが、NMO における詳細な免疫学的背景の検討は十分にされていない。そこで我々は、NMO、MS の髄液中のサイトカイン・ケモカインプロファイルの解析及び、NMO の病態におけるサイトカイン・ケモカインの関与の検討を行った。NMO 患者 31 例、MS 患者 29 例、神経変性疾患 (疾患対照) 18 例を対象とし、Bio-Plex サスペンションビーズアレイシステムを用いて 27 種類のサイトカイン・ケモカインを同時に測定した。NMO の髄液中では IL-1ra、IL-6、IL-8、IL-13、G-CSF、IL-10 が有意に上昇しており、一方 MS の髄液では IL-9、FGF-b、GM-CSF、MIP-1b、TNF- $\alpha$ 、IL-10 が有意に上昇していた。NMO 髄液中で上昇していたサイトカインのうち、血清では IL-6 のみが上昇していた。また髄液中 IL-6 レベルは髄液中 GFAP ( $r=0.93$ )、髄液細胞数 ( $r=0.64$ )、抗 AQP4 抗体 ( $r=0.31$ ) と相関がみられた。本研究の結果からは NMO と MS のサイトカイン・ケモカインプロファイルは明らかに異なっており、両疾患は免疫学的に異なる疾患であると考えられた。また IL-6 は NMO の病態において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

### 研究目的

髄鞘をターゲットとする脱髄疾患の多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) と異なり、視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica: NMO) ではアストロサイトの障害が主体と考えられている<sup>1)</sup>。また MS の再発予防に有効である interferon- $\beta$  製剤が、NMO では無効または再発を助長する可能性があり<sup>2)</sup>、再発予防にはステロイドの内服が有効<sup>3)</sup>など、両疾患の治療反応性に相違がみられ、病態の相違が示唆される。細胞性免疫が主体の疾患と考えられている MS とは異なり、NMO は抗 AQP4 抗体の存在より、液性免疫が病態の首座と想定されるが、明確な結論は出ていない。

そこで、我々はサイトカインプロファイルの面から、NMO・MS の免疫学的基盤の差異を検討すること及び NMO の病態におけるサイトカインの関与を検討することを目的とし本研究を行った。

### 研究方法

#### (1) 対象

NMO患者31例(女性31例、年齢中央値48.7歳)、MS患者29例(女性22例、年齢中央値30.6歳)を対象とした。NMOはWingerchukの診断基準<sup>4)</sup>に、MSはMcDonald診断基準<sup>5)</sup>に基づいて診断した。疾患対照として非炎症性神経変性疾患

(other non-inflammatory neurological disorders: ONDs) 18例を対象とした。上記患者の髄液 (CSF) ・血清ペアを使用し、NMO、MS は急性期治療前の検体を使用した。

#### (2) 方法

Bio-Plex サスペンションビーズアレイシステム (BIO-RAD 社) を用いて 27 種類の急性期髄液中のサイトカインの測定を行い、NMO の臨床 parameters との相関を、Spearman の相関係数を用いて検討した。また NMO の髄液中で上昇していたサイトカイン項目については、血清濃度も測定した。

## 倫理面への配慮

本研究に際しては、千葉大学大学院医学研究院および医学部附属病院の倫理規定を遵守して行った。血清、髄液検体の利用に関しては患者からはインフォームド・コンセントを得た。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

27種類のサイトカイン・ケモカインのうち、NMOの髄液ではIL-1ra、IL-6、IL-8、IL-13、G-CSF、IL-10が上昇しており、一方MSの髄液ではIL-9、FGF-b、GM-CSF、MIP-1b、TNF- $\alpha$ 、IL-10が上昇していた。NMO髄液中で上昇していたサイトカインのうち、血清ではIL-6のみが上昇していたが、髄液血清比が著明に上昇しており、IL-6は主に中枢で産生されていると考えられた。また髄液中IL-6レベルは髄液中GFAP ( $r=0.93$ )、髄液細胞数 ( $r=0.64$ )、抗AQP4抗体 ( $r=0.31$ )と相関がみられた。

## 考察

NMOでは主にTh2系、Th17系、Treg系、MSではTh1系、Treg系のサイトカインの上昇を認め、両疾患のサイトカインプロファイルは異なっていた。しかしIL-17やIL-4に有意な差はなく、NMOにおいてTh17、Th2が病態に関与しているかどうかは慎重に判断する必要があると考えられた。NMOにおいてCSF IL-6は著明に高値で、臨床parameterと比較的よく相関していた。IL-6はEAEにおいて炎症反応を悪化させ<sup>6)</sup>、IL-6をノックアウトするとEAEの発症が抑制されることや、IL-6をラットの脊髄クモ膜下腔に投与すると、NO、PARPの活性化を介して軸索障害と脱髄を起こすこと<sup>7)</sup>などが報告されており、IL-6が直接的に中枢神経の障害に関与している可能性も考えられた。

NMOにおいてIL-6は中枢での炎症反応、アストロサイトの障害、抗AQP4抗体産生などNMOの病態と関係しており、NMOのbiomarkerとして有用な可能性がある。IL-6の産生機序、病態への関与を解明するためにはモデルマウスなどを用いた、さらなる研究の蓄積が必要と考えられる。

## 結論

サイトカイン・ケモカインプロファイルの結果から、NMOとMSは免疫学的に異なる疾患であると考えられた。IL-6はNMOの臨床parameterと相関があり、病態において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

## 文献

1. 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.
2. Uzawa A, Mori M, Hayakawa S, et al. Different responses to interferon beta-1b treatment in patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2010; 17: 672-676.
3. Watanabe S, Misu T, Miyazawa I, et al. Low-dose corticosteroids reduce relapses in neuromyelitis optica: a retrospective analysis. *Mult Scler.* 2007;13:968-74.
4. Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, et al. Revised diagnostic criteria for neuro- myelitis optica. *Neurology* 2006;66: 1485-1489.
5. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria." *Ann Neurol* 2005;58:840-846
6. Quintana A, Muller M, Frausto RF, et al. Site-specific production of IL-6 in the central nervous system retargets and enhances the inflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2009; 183: 2079-2088.
7. Kaplin AI, Deshpande DM, Scott E, et al. IL-6 induces regionally selective spinal cord injury in patients with the neuroinflammatory disorder transverse myelitis. *J Clin Invest* 2005; 115:2731-2741

## 健康危険情報

なし

## 知的所有権の出願・登録状況

特許取得・実用新案登録：なし



## 多発性硬化症 (MS) の診断・病態・治療マーカーとしての Sema4A

分担研究者 中辻裕司<sup>1)</sup>

共同研究者 奥野龍禎<sup>1) 2)</sup>、森谷真之<sup>1)</sup>、木下允<sup>1)</sup>、熊ノ郷淳<sup>2)</sup> 佐古田三郎<sup>3)</sup>

### 研究要旨

セマフォリン分子群は神経軸索ガイダンス分子としての働き以外に、免疫制御においても重要な働きをしていることが明らかとなってきた。Sema4A は樹状細胞に高発現し、T 細胞の活性化及び分化に重要な役割を果たすクラスIVの膜型セマフォリンであるが、我々はこれまでに、多発性硬化症 (MS) 患者血清において遊離型 Sema4A が特異的に高値を示し補助診断法となりうることを報告してきた。今回 MS の補助診断法となりうることを確認し、また、MS の早期とも考えられる CIS においても高値を示し早期診断にも有用であること、Sema4A は MS 患者単球、樹状細胞に高発現し、プロテアーゼで遊離型となることを示した。

また、臨床的に Sema4A 高値の MS 患者群においては Th17 偏倚が認められ、重症化傾向があり、インターフェロン (IFN) ベータ治療が有効ではないことが示された。

### 研究目的

多発性硬化症 (MS) の補助診断法として、脳脊髄液 (CSF) を用いたオリゴクローナルバンド (OCB) や IgG index があるが、より侵襲性の少ない末梢血でのバイオマーカーが待たれているところである。これまで我々は MS 患者血清中で Sema4A が高値となり、補助診断として有用であることを報告したが、さらに詳細にその有効性を確認し補助診断マーカーとして確立すること、MS において遊離型 Sema4A が高値となる機序を明らかにすることが目的である。

さらに重要なことは血清 Sema4A 高値の MS 患者における臨床的特徴を詳細に検討し、診断のみならず治療反応性を含めた予後の予測が可能かどうか検討することも目的である。

### 研究方法

対象は大阪大学医学部附属病院、市立豊中病院、大阪府立急性期・総合医療センターで診療した再発寛解型 MS (RR-MS)、CIS および他神経疾患 (OND) 患者。

膜貫通型蛋白である Sema4A が遊離型となる機序の解析にヒト単球細胞株 THP-1 を用いた。膜表面蛋白をビオチンラベルした後に、細胞ライセート及び培養上清を回収し、抗 Sema4A 抗体で免疫沈降し Streptavidin-POD でプロットし解析した。

DNA アレイ解析に関しては Sema4A 高値 MS3 名、低値 MS3 名および健常者 4 名の末梢血より RNA を精製し、Affymetrix 社 GeneChip を用いた。

治療反応性を含めた予後予測には、RR-MS59 例において測定された血清 Sema4A 値と、罹病

1) 大阪大学大学院医学系研究科神経内科学

2) 大阪大学微生物病研究所感染病態分野

3) 国立病院機構刀根山病院

期間、再発回数及び EDSS スコアとの相関を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は大阪大学臨床研究倫理審査委員会、市立豊中病院、大阪府立急性期・総合医療センター倫理委員会の承認の上、施行された。

## 研究結果

1) THP-1 細胞ライセートおよび培養上清において、それぞれ膜結合型および遊離型 Sema4A と考えられるバンドを認めた。

培養上清中の遊離型 Sema4A はメタロプロテイナーゼ阻害剤の添加により減少した。

DNA アレイ解析により Sema4A 高値 MS 群において ADAM 10、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMPs) 1, 9, 12, 25 の増加が認められた。

2) RRMS59 例での検討において、血清 Sema4A 高値群は Sema4A 低値群に比し有意に高い EDSS スコアを示した ( $p=0.046$ )。59 例のうち、IFN- $\beta$  が導入された 30 例における検討において Sema4A 高値群は低値群に比し有意に高い EDSS スコアを示し、その差は上記 59 例の場合と比べて、さらに顕著であった ( $p<0.001$ )。

## 考察

ヒト単球において、Sema4A はメタロプロテイナーゼの関与する shedding を受け遊離型となることが明らかになった。DNA アレイ解析より MS の病態へのかかわりが報告されているメタロプロテイナーゼと Sema4A の相関が認められた。

これまで我々は Sema4A 高値例には Th17 病態

が寄与していることを見出している。Th17 細胞が血液脳関門 (BBB) を通過しやすく、中枢での炎症機転を増幅する (Kebir et al. Nature Medicine 2007) ことや MMP9 が BBB 透過性を亢進させ、MS の病態に重要な役割を果たすこと (Rosenberg et al. Lancet 2005) も考慮すると、Sema4A は、BBB の透過性亢進を介して MS 病態に関与している可能性が考えられた。

さらに興味深いことに、Axtell らの IL-17 高値例では IFN- $\beta$  治療抵抗性であるという報告と一致して (Axtell et al. Nature Medicine 2010)、血清 Sema4A と重症化及び IFN- $\beta$  抵抗性との関連が示唆された。

血清 Sema4A 測定は早期診断だけではなく、予後や治療反応性の予測に有用である可能性が考えられた。

## 結論

Sema4A 高値 MS 患者においては、メタロプロテイナーゼ発現が増加し MS の病態に寄与していることが示唆された。

また血清 Sema4A 高値例は、より重症化し、さらに IFN- $\beta$  治療に対して抵抗性であることが示された。

今後 IFN- $\beta$  治療開始にあたって Sema4A 値を考慮する必要がある。

## 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

## 多発性硬化症髄液リンパ球の特性

研究分担者 山村隆<sup>1</sup>

共同研究者 佐藤和貴郎<sup>1</sup>、富田敦子<sup>1,4</sup>、市川大樹<sup>1</sup>、林幼偉<sup>1,2,3</sup>、岸田日帯<sup>4</sup>、三宅幸子<sup>1,2</sup>、岡本智子<sup>2,3</sup>、小川雅文<sup>2,3</sup>、村田美穂<sup>3</sup>、黒岩義之<sup>4</sup>、荒浪利昌<sup>1,2</sup>

### 研究要旨

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。昨年我々は、T 細胞サブセットを同定する細胞表面マーカーとして 4 種類のケモカイン受容体(CCR2 と CCR5、または CCR4 と CCR6)を用い、再発期 MS の髄液に浸潤している T 細胞サブセットの特徴を解析した。その結果、再発期 MS の髄液では、末梢血に比べ、CCR2 陽性 CCR5 陽性 CD4 陽性メモリー T 細胞が選択的に増加しており、なおかつ Matrix metalloproteinase(MMP)-9 と Osteopontin(OPN)を高発現する、潜在的に中枢神経系への浸潤能を有する細胞群であることを見出した。今年度は、この細胞群の MS 疾患特異性と自己反応性、さらに潜在的浸潤能の検証を行った。CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の頻度は、末梢血に比べ MS 髄液において有意に高いが、非炎症性および炎症性中枢神経疾患ではそのような傾向は見られないことが判明した。また、再発期 MS 患者末梢血の CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞は、ミエリン塩基性蛋白特異的に反応して IFN- $\gamma$  および IL-17 を産生した。その上、CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞は *in vitro* 基底膜モデルで、他の T 細胞と比較して浸潤能が有意に高いことも確認された。これらの結果より、CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞サブセットには MBP 特異的 T 細胞が集積しており、再発病態形成において重要な役割を果たしている可能性がある。

---

<sup>1</sup> 国立精神神経センター神経研究所免疫研究部

<sup>2</sup> 国立精神神経センター病院 MS センター

<sup>3</sup> 国立精神神経センター病院 神経内科

<sup>4</sup> 横浜市立大学大学院医学研究科 神経内科

## 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り、Th1 細胞と Th17 細胞の関与が示唆されている。昨年我々は、ケモカイン受容体(CCR2 と CCR5、または CCR4 と CCR6)を用いて T 細胞サブセットを同定し、再発期 MS の髄液中で末梢血中よりも、Th1 細胞と Th17 細胞の性質を併せ持つ CCR2 陽性 CCR5 陽性 CD4 陽性メモリー T 細胞が増加していることを報告した。この細胞は、Matrix metalloproteinase(MMP)-9 と Osteopontin(OPN)を高発現しており、中枢神経系への高い浸潤能を有すると考えられた。今年度は、この T 細胞サブセットの抗原特異性を明らかにすること、および *in vitro* 浸潤モデルにおいて実際に浸潤能を検証することを目的とした。

## 研究方法

MS 病態に重要と考えられる CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の機能および疾患特異性を明らかにする目的で以下の研究を行なった。

- (1) 対象: 年齢、性別のマッチした MS 患者 12 名、非炎症性中枢神経疾患 6 名、炎症性神経疾患(髄膜炎、脳炎など)患者 4 名、健常者 11 名である。
- (2) T 細胞サブセット頻度の解析: PBMC、あるいは髄液細胞を CCR2 と CCR5、または CCR4 と CCR6 で染色し、フローサイトメトリーを用いてメモリー CD4 陽性 T 細胞に占めるケモカイン受容体発現細胞の頻度を炎症性神経疾患の検体を加えて MS 患者と比較した。
- (3) 抗原特異性の検討: 再発期 MS 患者あるいは健常者の末梢血より CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞、またはこれを除いた T 細胞、メモリー T 細胞を分離し、卵白アルブミン(OVA)あるいはミエリン塩基性蛋白(MBP)存在下で抗原提示細胞と共培養し、培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA 法で測定した。
- (4) 浸潤能の検討: (3)と同様に細胞を分離し、抗 CD3/CD28 抗体で刺激後に、上層に基底膜成分を敷いた transwell<sup>®</sup>の通過能を比較した。

### (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) 炎症性神経疾患であっても、髄膜炎や脳炎の患者では CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の髄液中での増加が認められず、CCR2 陽性 CCR5 陽性細胞が MS で選択的に増加していることが再確認された。
- (2) 再発期 MS 患者では、CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞は MBP に特異的に反応し、著明な IFN- $\gamma$  産生を示した。MBP に対する IL-17 産生は、CCR2 陽性 CCR5 陽性細胞と、これを除いた分画の両者でみられたが、MBP 特異的ではなかった。また健常者ではどの分画においても MBP 特異的な反応はみられなかった。
- (3) CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞は、他の T 細胞サブセットよりも下層に移動した細胞数が有意に多く、高い浸潤能を持つ事が分かった。

## 考察

炎症性神経疾患患者検体も含めた解析の結果、MS 患者では CCR2 陽性 CCR5 陽性 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が再確認された。対象となったウイルス性髄膜炎や脳炎は CD8 陽性 T 細胞が主たる病態の疾患と考えられるため、より多種類の炎症性神経疾患との比較が望まれる。抗原特異性の検討の結果、CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞には MBP 特異的に反応し IFN- $\gamma$  と IL-17 を産生する細胞が多く、MS 病態形成に重要な細胞と考えられた。さらに刺激により、血液脳関門を裏打ちする基底膜成分を破壊し効率的に浸潤することが占められ、CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の高い MMP-9 産生能との関連が示唆された。以上より、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 陽性 CCR5 陽性 T 細胞は、MS 抗原特異的な細胞を多く含み、かつ浸潤能が高く、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。

## 研究発表

#### 論文発表

1. 富田敦子、荒浪利昌、山村隆. 2010年、MSの免疫病態のトピックス. Brain Medical 22 : 25-30.

#### 学会発表

1. Wakiro Sato, Atsuko Tomita, Youwei Lin, Masafumi Ogawa, Tomoko Okamoto, Miho Murata, Toshimasa Aranami and Takashi Yamamura: CCR2+ CCR5+ CD4+ T cells enriched in cerebrospinal fluid of relapsing multiple sclerosis patients strongly express matrix metalloproteinase-9 and osteopontin. Kobe: 14th International Congress of Immunology 2010, August 23.

2. 佐藤和貴郎、荒浪利昌、富田敦子、岡本智子、小川雅文、山村隆 : MMP9 を高発現する CCR2 陽性 CCR5 陽性細胞の多発性硬化症における重要性. 第 22 回日本神経免疫学会学術集会, 東京, 2010年3月18日.

3. 佐藤和貴郎、○富田敦子、荒浪利昌、山村隆 : 多発性硬化症病態におけるMMP9陽性CCR2陽性CCR5陽性T細胞の重要性. 第51回神経学会総会、東京、2010.5月21日.

#### 文献

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

(2) Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. Bartholomaeus I. et al. Nature 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 : なし  
実用新案登録 : なし

## 視神経脊髄炎 (NMO) における plasmablasts の役割

研究分担者 山村隆<sup>1,2</sup>

共同研究者 千原典夫<sup>1</sup>, 荒浪利昌<sup>1,2</sup>, 佐藤和貴郎<sup>1</sup>, 三宅幸子<sup>1,2</sup>, 林幼偉<sup>2,3</sup>, 小川雅文<sup>2,3</sup>, 岡本智子<sup>2,3</sup>

### 研究要旨

視神経脊髄炎(NMO)は主に視神経炎と脊髄炎を繰り返す中枢神経系の炎症性疾患である。近年 NMO では疾患特異的な抗アクアポリン 4 抗体 (抗 AQP4 抗体) が発見され、多発性硬化症との鑑別が容易になった。臨床、病理、あるいは動物モデルによる解析を通じて、抗 AQP4 抗体はその疾患マーカーであるのみならず、NMO の本体であるアストロサイト障害を惹起し病態とも関連が深いことが示唆されている。一方でこの抗 AQP4 抗体産生メカニズムは不明であった。今回、我々は患者末梢血を用いて、NMO に特有の B 細胞異常として plasmablasts の増加を発見した。Plasmablasts は末梢血における抗 AQP4 抗体の主な産生源であり、再発時に増加していた。In vitro 培養系において、plasmablasts の生存は主にインターロイキン 6 (IL-6) シグナルに依っていたことから、我々は plasmablasts を標的とした抗 IL-6 受容体抗体による NMO に対する治療の可能性を提唱する。

<sup>1</sup> 国立精神・神経医療研究センター (NCNP) 神経研究所 免疫研究部

<sup>2</sup> NCNP 多発性硬化症センター

<sup>3</sup> NCNP 病院 神経内科

【背景と目的】 NMO は主に視神経炎と脊髄炎を繰り返す中枢神経系の炎症性神経疾患である。NMO と多発性硬化症 (MS) は治療薬に対する反応性が異なり、両者を鑑別することは臨床の要点である。近年 NMO ではアストロサイトに高発現する水チャネルであるアクアポリン 4 (AQP4) に対する自己抗体が疾患特異的に上昇することが明らかになった。さらに臨床、病理、あるいは動物モデルの解析から、抗 AQP4 抗体はそれ自体がアストロサイト障害を惹起し病態に関与することが示唆されており、抗 AQP4 抗体陽性患者で NMO の診断基準を満たさない者も NMO spectrum disorder (NMOSD) として同様の

病態であるとする考えが広がっている。しかし抗 AQP4 抗体産生のメカニズムは未だに不明であり、病態に特化した治療法はない。今回我々は末梢血 B 細胞における抗 AQP4 抗体産生細胞群の同定に加えて、抗体産生を抑制する治療モデルの検討を行った。

【対象と方法】 本研究では年齢・性別をマッチさせた健常人 20 例、抗 AQP4 抗体陽性患者 (以下、抗体陽性患者) 24 例 (内 16 例は Wingerchuk 2006 の NMO 診断基準<sup>1)</sup> を満たし、8 例は満たさない再発性脊髄炎もしくは再発性視神経炎)、McDonald 診断基準<sup>2)</sup> を満たし RRMS の臨床病型をとる通常型 MS 患者

(以下、MS 患者) 17 例を対象とした。各々の末梢血単核球を分離し B 細胞亜分画の頻度をフローサイトメトリー (FACS) で解析した。また、B 細胞亜分画を単離し、その分子発現パターンおよび形態学的特徴を解析した。また培養上清中の抗 AQP4 抗体価はヒト AQP4 強制発現細胞を用いて FACS により測定した。次に B 細胞刺激性サイトカインを用いてその抗 AQP4 抗体産生への効果を解析した。

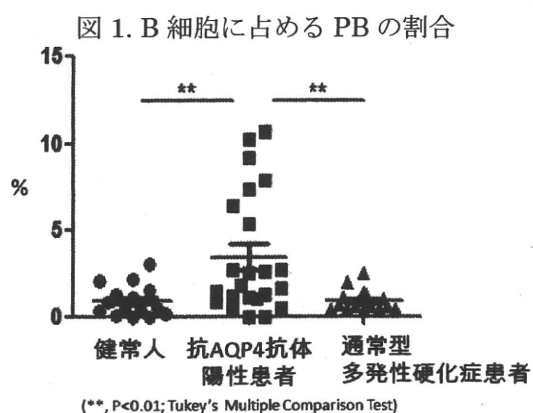
(倫理面への配慮)

本研究においては、NCNP の倫理委員会の承認を得た上で、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を行った。また、患者から得られた情報は当研究部でのみ使用し、厳重に保管されている。

### 【結果】

**Plasmablasts (PB; CD19<sup>int</sup>CD27<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>CD180<sup>-</sup>) が抗 AQP4 抗体陽性患者の末梢血で増加**

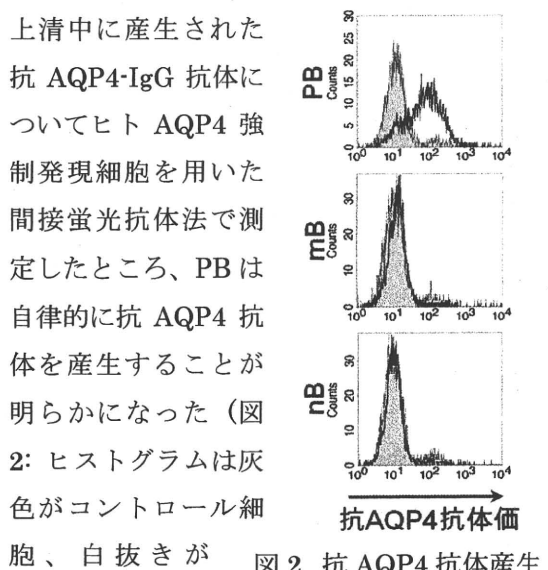
NMO における末梢血 B 細胞の特徴を解析するため、B 細胞を各種表面抗原 (CD19、CD27、CD38、CD180) を用いて単離した。抗体陽性患者では全 B 細胞に占める CD19<sup>int</sup>CD27<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>CD180<sup>-</sup> の細胞割合が健常人や MS 患者と比して有意に多く



(P<0.01 : 図 1)、NMO の再発時にはこの細胞の割合がさらに増加していた。また、プレドニゾロン内服治療を受けている抗体陽性患者と MS 患者におけるこの細胞割合も優位に抗体陽性患者で高かったことから、この細胞群は治療と関係なく NMO 病態への関連が示唆された。この細胞群は他の B 細胞より大型で偏在した核と豊富な細胞質を持ち形質細胞 [plasma cell] 様であったが、核が比較的大きく、クロマチン凝集が十分でないことから PB と考えられた。その転写因子発現パターンからも BLIMP-1 (B lymphocyte-induced maturation protein 1), IRF4 (Interferon regulatory factor 4) の発現が他のメモリー B 細胞 (mB; CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD38<sup>~low</sup>) やナイーブ B 細胞 (nB; CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) よりも高く、一方で PAX5 (Paired box gene 5) の発現が比較的低かったことから PB の特徴を有していた。

### PB は抗 AQP4 抗体産生細胞

次に、PB による抗 AQP4 抗体産生能を評価するため B 細胞亜分画を単離しインターロイキン 6 (IL-6) 存在下 (1ng/ml) で培養し、培養



AQP4 強制発現細胞に結合した IgG 量を反映しており、□-■が抗 AQP4 抗体価を示している)。さらにインターロイキン 21 (50ng/ml) + 抗 CD40 抗体 (1μg/ml) でポリクローナルな刺激を加えると mB も IgG を産生したが、その中に抗 AQP4 抗体は検出できなかった。同様の刺激で PB は mB と同程度の IgG を産生し、その中に抗 AQP4 抗体を含んでいることが明らかとなった。これらから PB が末梢血における主な AQP4 抗体産生細胞であると考えた。

#### PB の生存や抗 AQP4 抗体産生は IL-6 シグナル依存的

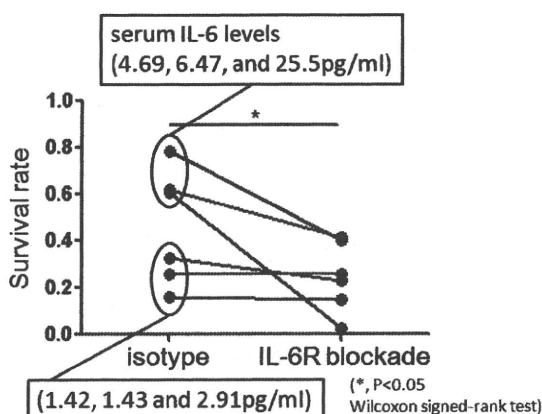
PB の活性化に影響を与える因子を同定するため PB を B 細胞刺激性サイトカイン (IL-6: 1ng/ml, BAFF (B cell-activating factor): 100ng/ml, APRIL (A proliferation-inducing ligand): 300ng/ml) 存在下で培養し、Propidium iodide で細胞生存を評価した。刺激に用いたサイトカインの内、IL-6 のみが PB の生存を促進した。また IL-6 は抗 AQP4 抗体産生を促進し、その効果は抗 IL-6 受容体抗体 (anti-IL-6R) で阻害された。さらに患者血清存在下の末梢血単核球細胞培養において、

anti-IL-6R (1μg/ml) により PB は減少し、特に血清 IL-6 高値の患者では著明であった。他の B 細胞亜分画には影響がなかった (図 3: Survival rate は培養後の全 B 細胞中の PB 細胞割合を培養前の細胞割合で割った値)。これらの結果から、NMO に対して PB を標的とした抗 IL-6 受容体抗体療法が有望であると考えた。

**【結論】** NMO では抗 AQP4 抗体が病態を悪化させることが示唆されている。この病態に特化した治療法としては抗体産生の抑制が有望であるが、現状はステロイド中心の全身治療である。今回、我々は抗 AQP4 抗体産生細胞である PB の特徴を解析し、同細胞を標的とする IL-6 受容体阻害療法の可能性を示した。

**【謝辞】** 本研究の対象患者の抗 AQP4 抗体陽性診断を行っていただいた、東北大学 藤原一男先生、高橋 幸利先生、および PB の morphological な解析についてご助言頂いた順天堂大学 広瀬 幸子先生、さらに検体採取にご協力頂いた国立精神医療研究センター神経内科 村田 美穂先生、スタッフの先生方に深謝いたします。

図 3. PB に対する anti-IL-6R の効果



#### 【研究発表】

原著論文

Chihara N, Aranami T, Sato W et al. (2011) Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. Proc Natl Acad Sci U S A 108 (9): 3701-3706

総説



1) 千原 典夫、山村 隆 (2010) 「神経疾患と炎症-多発性硬化症を中心に-」、『最新医学』、最新医学社、11月号、2390-2395

2) 千原 典夫、山村 隆 (2010) 「神経疾患と分子マーカー: 多発性硬化症」、『Clinical Neuroscience』、中外医学社、28巻12号、1396-1399

#### 主な学会発表

1) Chihara N, Aranami T, Sato W et al. Plasma cell-like B cells produce aquaporin 4 autoantibody in neuromyelitis optica. Kyoto: Neuroimmunology Kyoto Conference 2010, P-9

2) Chihara N, Aranami T, Sato W et al. Auto-reactive anti-aquaporin 4 antibodies are secreted from peripheral plasma cell-like B cells in neuromyelitis optica. Kobe: 14th International Congress of Immunology 2010, PP-038-38

3) Chihara N, Aranami T, Sato W et al. Plasma cell-like B cells produce aquaporin 4 autoantibody in neuromyelitis optica. Barcelona: 10th International Congress of Neuroimmunology 2010, PS16

4) 千原 典夫、佐藤 和貴郎、荒浪 利昌ら「視神経脊髄炎(NMO)におけるB細胞の役割について」東京: 第51回日本神経学会総会 2010, A14-1082

5) 千原 典夫、佐藤 和貴郎、荒浪 利昌ら「視神経脊髄炎(NMO)におけるB細胞の役割について」東京: 第22回日本神経免疫学会学術集会 2010, W1-3

#### 【文献】

1) Wingerchuk DM et al. (2006) Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica.

Neurology 66: 1485-1489

2) Polman CH et al. (2005) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". Ann Neurol 58: 840-846

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

## Neuromyelitis optica (NMO)患者血清が血液脳関門に及ぼす影響の解析

分担研究者 神田 隆<sup>1)</sup>

共同研究者 清水文崇<sup>1)</sup>, 佐野泰照<sup>1)</sup>, 春木明代<sup>1)</sup>, 高橋利幸<sup>2)</sup>, 前田敏彦<sup>1)</sup>, 安部真彰<sup>1)</sup>

### 研究要旨

【目的】視神経脊髄炎(NMO)での血液脳関門(BBB)の破綻の機序を明らかにする。【対象・方法】抗 AQP4 抗体陽性 NMO 血清 14 例をヒト脳由来微小血管内皮細胞株(TY10)に作用させた。(1) TY10 に AQP4 が発現しているかを western blot 法で確認した。(2) TY10 に NMO 血清と補体を作用させ、補体介在性の内皮細胞死が生じるかを検討した。(3) 抗 AQP4 抗体の BBB 破綻の関与を抗 AQP4 抗体価を低下させた血清を用い検証した。(4)抗 VEGF 中和抗体を NMO 血清に併せて TY10 に加え NMO 血清中の VEGF が BBB 破綻に関与するか検討した。【結果】(1) TY10 は AQP4 を発現していた。(2) NMO 血清と補体を併せて作用させても、補体介在性の内皮細胞死は生じなかった。(3) NMO 血清中の抗 AQP4 抗体価を低下させた血清を TY10 に作用させても、抗 AQP4 抗体価の低下がない血清を作用させたものと比較し、BBB 機能の破綻の程度に差が無かった。(4) 抗 VEGF 中和抗体を NMO 血清に併せて作用させると claudin-5 の発現が増加した。NMO 患者血清中に含まれる VEGF 値は健常人と比較し差はなかった。NMO 血清を内皮細胞に作用させると、内皮細胞から産生される VEGF の発現が増加した。【考察】NMO 血清中に存在する抗 AQP4 抗体以外の BBB 構成内皮に反応する液性因子が内皮細胞から autocrine に放出される VEGF を増加させ BBB を破綻させていると考えられた

### 【研究目的】

視神経脊髄炎 (Neuromyelitis optica, NMO)では患者血清中に抗アクアポリン 4 (AQP4)抗体が存在し、血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) の破綻を介して中枢神経内へ侵入した同抗体によるアストロサイトの傷害が病因の中核をなすものと考えられている。しかし、本症での BBB の破綻機序については明快な解答が得られていない。本年度は(1)BBB 構成内皮細胞が蛋白レベルで AQP4 を発現しているか否かを検証し、続いて(2)患者血清と補体を脳微小血管内皮細胞に作用させることで補体介在性の内皮細胞死が惹起されるか、(3)血清中に含まれる抗 AQP4 抗体が

BBB 機能の破綻に関与しているのか、(4)NMO 患者血清が BBB 破綻をきたす分子メカニズム、の 4 点につき、我々の樹立したヒト脳由来微小血管内皮細胞株(TY10)を用いた検討を行った。

### 【研究方法】

当院で抗 AQP4 抗体陽性を確認した急性期 NMO 14 例の血清を用いた。(実験 1) TY10 に AQP4 が発現しているかを western blot 法で確認した。(実験 2)TY10 に NMO 血清と補体を作用させ補体介在性の内皮細胞死が生じるかを検討した。(実験 3) AQP4 を高発現させたアストロサイト株に NMO 血清を作用させ、抗 AQP4 抗体価を低下させた血清と低下の無い血清の 2 つを用意した。それらを TY10 に作用させることで抗 AQP4 抗体が BBB 機能に及ぼす影響を検討した。(実験 4) 抗 VEGF 中和抗体を NMO 患者血清に併

1) 山口大学大学院医学系研究科神経内科学

2) 国立病院機構米沢病院神経内科

せて TY10 に作用させ、claudin-5 の発現の変化を Western blot 法で解析した。次に NMO 患者血清中に含まれる VEGF が健常人や C-MS 患者と比較し高値であるかを ELISA 法にて検討した。さらに、NMO 患者血清を TY10 に作用させ、内皮細胞が産生する VEGF が増加するかを Western blot 法で検討した。

(倫理面への配慮)

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。

#### 【研究結果】

(実験 1) TY10 は AQP4 を発現していた。

(実験 2) NMO 血清と補体を併せて作用させても、補体介在性の内皮細胞死は生じなかった。

(実験 3) NMO 血清中の抗 AQP4 抗体価を低下させた血清を TY10 に作用させても、抗 AQP4 抗体価の低下がない血清を作用させたものと比較し、BBB 機能の破綻の程度に差がなかった。

(実験 4) 抗 VEGF 中和抗体を NMO 血清に併せて作用させると claudin-5 の発現が増加し、NMO 血清中に含まれる VEGF が BBB 破綻に関与していることが明らかとなった。NMO 患者血清中に含まれる VEGF 値は、健常人や C-MS 患者と比較し有意な差はなかった。NMO 血清を内皮細胞に作用させると、内皮細胞から産生される VEGF の発現が増加した。

#### 【考察】

BBB 構成内皮細胞がアクアポリン 4 を発現していることより、NMO 血清中に含まれる抗 AQP4 抗体が BBB 機能を破綻させている可能性を想定し研究を進めた。しかし、NMO 血清を内皮細胞に作用させても補体介在性の内皮細胞死は引き起こされず、NMO 血清中の抗 AQP4 抗体価を低下させても BBB 機能の破綻の程度に差がなかった。したがって、NMO 患者血清中に存在する抗 AQP4 抗体以外の BBB 構成内皮細胞に反応する未知の自己抗体が BBB 機能を低下させていると考えた。BBB 構成内皮細胞に自己抗体が反応することで内皮細胞から放出される VEGF を増加させ、それが autocrine 的に内皮細胞に作用することで BBB 機能の低下を生じるメカニズムを推測した。今後、この未知の自己抗体が標的とする蛋白を 2 次元電気泳動及び蛋白質質量解析を用いて同定する予定である。併せて、抗アクアポリン 4 抗体が脳微小血管内皮細胞に及ぼす影響を更に解析する予定である。解析を用いて同定する予定である。

#### 【結論】

NMO 患者血清中に含まれる抗 AQP4 抗体以外の BBB 構成細胞に反応する自己抗体が、内皮細胞から放出される VEGF を増加させ BBB を破綻させていることが示された。

#### 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

## Aquaporin4 isoform の細胞内局在解析

班員 武藤多津郎<sup>1)</sup>

共同研究者 朝倉邦彦<sup>1)</sup>, 植田晃広<sup>1)</sup>, 木澤真努香<sup>1)</sup>, 河村直樹<sup>1)</sup>, 伊藤信二<sup>1)</sup>

### 研究要旨

視神経脊髄炎(NMO)患者血清中に存在する NMO-IgG 抗体の標的となる aquaporin4 (AQP4) の 2 つの isoform、AQP4M1 と AQP4M23 の細胞内局在を検討した。C 末端に EGFP または RFP 標識のついた AQP4M1 または AQP4M23 を発現する stable transformant を得た。各々の細胞を lipid rafts マーカーで染色したところ、AQP4M1 は lipid rafts マーカーと共存し、AQP4M23 は lipid rafts マーカーと共存しなかった。AQP4M1 および AQP4 M23 発現細胞からシヨ糖密度勾配法により lipid rafts 画分を精製し、Western blotting によりその局在を検討したところ、AQP4 M1 分子は lipid rafts 画分に存在し、AQP4 M23 はこの画分に存在しないことが示唆された。また、これらの細胞を NMO 患者血清(8 例)で染色したところ、AQP4 M1 と AQP4 M23 の染色強度はいずれの患者血清でも同じであり、差異は認められなかった。

### 研究目的

2004 年 Lennon らにより視神経・脊髄を侵す視神経脊髄炎(NMO)患者血清中に中枢神経系抗原と反応する抗体(NMO-IgG 抗体)が存在することが報告され、水チャンネルとして脳内、とくにアストロサイト突起に広く分布する aquaporin4(AQP4)がその抗原であることが示された。抗 AQP4 抗体は、NMO の診断のマーカーとして注目されているが、その病態への関与について詳細はいまだ不明である。

AQP4 は 323 個のアミノ酸からなる AQP4 M1 と N 末端が 22 個短い 301 個のアミノ酸からなる AQP4 M23 の 2 種類の AQP4 分子が存在し、生体内では AQP4 は AQP4M1 2 分子と AQP4 M23 2 分子が heterotetramer の状態で存在する。最近の AQP4 発現系における検討では、AQP4 M1 N 末端のシステイン残基部分がパルミトイル化されることが示さ

れ、AQP4 と lipid rafts との関連が示唆されている。今年度は、昨年度に引き続き AQP4 M1 と AQP4 M23 の発現ベクターを作製し、これらの細胞内における局在を検討した。

### 研究方法

ヒト AQP4 の全長 cDNA を ATCC より入手し、PCR 法により、AQP4 M1 と AQP4 M23 の 2 種類の cDNA の 5' 末端に Kozak 配列を挿入した後、蛍光色素(EGFP または RFP)を組み込んだ発現ベクターに挿入した。これらの発現ベクターを lipofection 法により、PC12(神経系細胞)、OS3(アストロサイト)、BHK-21(線維芽細胞)などの細胞株に transfection し、それぞれの AQP4 分子を発現させた stable transformant を作製した。

これらの細胞を、lipid rafts のマーカーで蛍光染色し、異なる蛍光を観察することにより、AQP4 の細胞内局在を検討した。さらに、stable transformant を

<sup>1)</sup> 藤田保健衛生大学脳神経内科学講座