

## 視神経脊髄炎患者血清が血液脳関門破綻をきたす分子メカニズムの解析

分担研究者 神田 隆<sup>1)</sup>

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

### 研究要旨

【目的】視神経脊髄炎(NMO)での血液脳関門(BBB)破綻の機序を明らかにする。【対象・方法】抗 AQP4 抗体陽性急性期 NMO 血清 10 例, 安定期 NMO 血清 5 例をヒト脳由来微小血管内皮細胞株(TY10)に作用させた。(1)急性期 NMO 血清を TY10 に作用させ, BBB 破綻への関与を検討した。(2)MMP-2/9 活性阻害剤を NMO 患者血清に併せて TY10 に作用させ, claudin-5, 電気抵抗値, NaF 透過性の変化を解析した。(3)患者血清の MMP-2/9 値を ELISA 法で測定した。(4)急性期 NMO 血清を TY10 に作用させ, MMP-2/9 の変化を western blot 法で解析した。(5)急性期 NMO 血清から精製した IgG を TY10 に作用させ BBB 破綻をきたすかを検討した。(6) 安定期 NMO 血清を TY10 に作用させ BBB 破綻に関与するかを検討した。【結果】(1)急性期 NMO 血清を作用させると TY10 の BBB 機能が低下した。(2) NMO 患者血清に MMPs 活性阻害剤を加えると TY10 の BBB 機能が改善した。(3) NMO 血清と正常血清で血清中 MMP-2/9 濃度に有意差はなかった。(4) NMO 血清を作用させると TY10 の MMP-2/9 蛋白量が増加した。(5) NMO 患者血清由来 IgG を TY10 に作用させても claudin-5, MMP-2/9 の蛋白量に変化はなかったが, VCAM-1 の蛋白量は IgG 濃度依存性に増加した。(6)安定期 NMO 血清を TY10 に作用させると VCAM-1 の蛋白量は増加したが, MMP-2/9 の発現に変化なかった。【考察】急性期 NMO 患者血清中に存在する自己抗体以外の何らかの液性因子が, 内皮細胞から autocrine に放出される MMP-2/9 を増加し BBB を破綻する機序が考えられた。

### 【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。我々はこれまでに視神経脊髄炎患者血清が BBB を破綻させること, 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

未知の自己抗体が, 内皮細胞から autocrine に放出される VEGF を増加させ BBB を破綻させていることを報告したが, VEGF 以外の液性因子が BBB 破綻に関与する可能性も十分に想定できる。NMO 患者血清が BBB 破綻をきたすメカニズムを生理活性物質や自己抗体に着目し検証した。

### 【研究方法】

当科で診断加療した抗 AQP4 患者血清を材料とし, 我々が樹立したヒト BBB 構成血管内皮不死化細胞株(TY10)に対する効果を検討した。臨床症状の増悪がみられた急性期 NMO 10 例, 副腎皮質ステロイドで加療し6ヶ月以上再発がみられていない安定期 NMO 5 例, 対照として健常成人

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

10 例の血清を用いた。(実験 1) 急性期 NMO 血清を TY10 に作用させ、claudin-5, VCAM-1 の変化を western blot 法で解析した。(実験 2) MMPs 活性を阻害する作用のある GM6001 を急性期 NMO 血清に併せて TY10 に作用させ、claudin-5 の蛋白量, 電気抵抗値, NaF 透過性の変化を解析した。(実験 3) 患者および正常血清の MMP-2/9 値を ELISA 法で測定した。(実験 4) 急性期 NMO 血清を TY10 に作用させ、MMP-2/9 の変化を western blot 法で解析した。(実験 5) 急性期 NMO 血清から精製した IgG を TY10 に作用させ、IgG 分画が BBB 破綻に関与するかを検討した。(実験 6) 安定期 NMO 血清を TY10 に作用させ、claudin-5, VCAM-1, MMP-2/9 の蛋白量の変化を western blot 法で解析した。

(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を匿名化し、プライバシーの保護に配慮した。

#### 【研究結果】

(実験 1) 急性期 NMO 血清を作用させると TY10 の claudin-5 の発現が低下し、VCAM-1 の発現が増加した。(実験 2) 急性期 NMO 血清に GM6001 を加えると TY10 の claudin-5 蛋白量が増加、電気抵抗値が上昇し、NaF 透過性が低下した。(実験 3) NMO 血清と正常血清で血中 MMP-2/9 値に有意差はなかった。(実験 4) 急性期 NMO 血清を作用させると TY10 の MMP-2/9 の蛋白量が増加した。(実験 5) NMO 血清由来 IgG を TY10 に作用させても claudin-5, MMP-2/9 の発現に変化はなかった。VCAM-1 蛋白量は

IgG 濃度依存性に増加した。(実験 6) 安定期 NMO 血清を TY10 に作用させると VCAM-1 の蛋白量は増加したが、MMP-2/9 の蛋白量に変化はなかった。

#### 【考察】

急性期 NMO 血清が BBB の tight junction 関連分子の発現を低下させ、バリアー機能を低下させたが、安定期 NMO 血清では変化がなかった。急性期 NMO 血清により BBB 構成内皮より放出される MMP-2/9 蛋白量が増加し、MMPs 活性阻害剤を作用させると NMO 血清による BBB 破綻が修復された。NMO 患者由来 IgG を作用させても BBB 機能に変化がなかったことより、BBB 構成内皮に急性期 NMO 血清中の自己抗体以外の液性因子が反応することで内皮細胞から放出される MMP-2/9 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。また、急性期 NMO、安定期 NMO 血清中に含まれる自己抗体が BBB 構成内皮細胞の VCAM-1 蛋白量を増加させた。NMO 患者血清中に含まれる BBB 構成内皮に対する自己抗体により BBB での VCAM-1 の発現上昇を介して病的 T 細胞の脳内侵入を惹起させる機序が推測された。

#### 【結論】

急性期 NMO 患者血清に含まれる BBB 構成内皮に反応する自己抗体以外の液性因子が、内皮細胞から放出される MMP-2/9 を増加させて 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

## 脂質ラフトを標的としたアストロサイト障害抑制

協力班員 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>, 河村直樹<sup>1)</sup>, 新美芳樹<sup>1)</sup>, 伊藤信二<sup>1)</sup>

### 研究要旨

aquaporin4(AQP4)の2つの isoform, AQP4M1 と AQP4M23 に異なる蛍光色素の標識を付け、AQP4M1 と AQP4M23 を同時に恒常的に発現する細胞を作製し、ショ糖密度勾配超遠心法によるこれまでの解析では、AQP4M1 と AQP4M23 が脂質ラフト画分に存在することを確認していたが、今回、コレステロールのキレート剤である methyl- $\beta$ -cyclodextrin で細胞を処理すると、AQP4M1 と AQP4M23 は脂質ラフトの画分と可溶性画分に存在することが明らかとなった。またこの細胞をコレステロール合成阻害剤であるスタチンで処理しても同様の結果が得られた。未処理の細胞に NMO 患者血清を加えると一部の細胞の形態変化が観察されたが、methyl- $\beta$ -cyclodextrin やスタチンで処理した細胞では患者血清による形態変化は観察されなかった。このことからアストロサイト足突起の脂質ラフトを標的として、AQP4 分子の脂質ラフトへの局在を減少させることにより抗 AQP4 抗体の作用を軽減させ NMO 病態を軽減させる可能性が示唆された。

### 研究目的

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足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。

AQP4は323個のアミノ酸からなる AQP4M1 と N 末端が22個短い301個のアミノ酸からなる AQP4M23 の2種類の AQP4 分子が存在し、生体内では AQP4 は AQP4M1 2分子と AQP4M23 2分子が heterotetramer の状態で存在し、中枢神経系ではアストロサイト足突起に発現しているとされている。昨年度この AQP4 の2つの isoform を同時に発現する系を作製し、AQP4 M1/M23 同時発現細胞では、AQP4 のほとんどが脂質ラフト

に発現することを明らかにした。そこで、本年度は脂質ラフトを標的としたアストロサイト障害抑制の可能性について検討した。

### 研究方法

ヒト AQP4M1 と AQP4M23 の cDNA の3'末端にそれぞれ蛍光色素 RFP と AcGFP を組み込んだ発現ベクターを、リポフェクション法により AQP4 を発現しない線維芽細胞株 BHK-21、アストロサイト細胞株 OS-3 にトランスフェクションし、AQP4M1 分子と M23 分子を同時に恒常的に発現する細胞を用いた。発現する s

作製した AQP4 M1/M23 発現細胞をコレステロールのキレート剤である methyl- $\beta$ -cyclodextrin (2.5~5.0mM) で処理して脂質ラフトを破壊したのち、ショ糖密度勾配法によ

<sup>1)</sup> 藤田保健衛生大学脳神経内科学講座

り脂質ラフト画分とその他の画分を分離し、抗 AQP4 抗体によるウエスタンブロット法で AQP4 分子の局在の変化を調べた。また、同様に methyl- $\beta$ -cyclodextrin (2.5~5.0mM) で処理した AQP4 M1/M23 発現細胞に、非働化した NMO 患者血清を 2%濃度で添加し、細胞の形態変化を観察し、細胞死の有無をトリパンブルー染色により検討した。

さらに、AQP4 M1/M23 発現細胞を、コレステロール合成阻害剤 simvastatin 20 $\mu$ g/ml を加えて 0~72 時間培養し、この細胞に非働化した NMO 患者血清を 2%濃度で添加し、細胞の形態変化を観察し、細胞死の有無をトリパンブルー染色により検討した。

## 研究結果

methyl- $\beta$ -cyclodextrin 処理をした AQP4 M1/M23 発現細胞では、ショ糖密度勾配法による画分の解析で、処理前に AQP4 は M1 と M23 のいずれも TritonX-100 不溶性の脂質ラフト画分に存在していたが、methyl- $\beta$ -cyclodextrin 処理後 24 時間で、その多くの同分子は可溶性画分に移動し、AQP4 分子の局在が変化することが確認された。この結果をもとに、AQP4 M1/M23 発現細胞を methyl- $\beta$ -cyclodextrin で 24 時間処理した後に非働化した NMO 患者血清を添加しても、形態変化をきたさず、トリパンブルー染色で細胞死は観察されなかった。

simvastatin で AQP4 M1/M23 発現細胞を処理しても、処理前に AQP4 は TritonX-100 不溶性の脂質ラフト画分に存在していたが、処理 24 時間で、methyl- $\beta$ -cyclodextrin と同様に可溶性画分と脂質ラフト画分の両方に局在が変化す

ることがショ糖密度勾配法で確認された。simvastatin 処理した細胞に、非働化した NMO 患者血清を 2%濃度で反応させたが、細胞の形態変化はきたさなかった。また、NMO 患者血清で処理した細胞をトリパンブルーで染色したところ、細胞死は認められなかった。

## 考察

methyl- $\beta$ -cyclodextrin によって脂質ラフトを壊すことにより、AQP4 分子の局在が変化し、NMO 患者血清による形態変化が認められた細胞が、NMO 患者血清を加えても形態変化をきたさないことが示された。また、同様の結果が simvastatin 投与により得られたことから、スタチンはアストロサイト足突起の脂質ラフトを標的として、AQP4 分子の脂質ラフトへの局在を減少させることにより抗 AQP4 抗体の作用を軽減させ NMO 病態を軽減させる可能性が示唆され、スタチンによる治療の可能性が示唆された。

## 結論

脂質ラフトを壊すことにより、AQP4 分子の局在が変化し、抗 AQP4 抗体の作用を軽減させ NMO 病態を軽減させる可能性が示唆され、スタチンによる治療の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

## FTY720 の中枢神経系細胞に対する直接作用

分担研究者 錫村明生<sup>1)</sup>

共同研究者 竹内英之<sup>1)</sup>, 土井由紀子<sup>1)</sup>, 野田裕美<sup>1)</sup>, 川ノ口潤<sup>1)</sup>,  
Bijay Parajuli<sup>1)</sup>, 菌部佳史<sup>1)</sup>, 水野哲也<sup>1)</sup>,

### 研究要旨

多発性硬化症に対する新規経口治療薬 FTY720 (fingolimod) の薬効機序として、スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体への結合を介した二次リンパ組織からのリンパ球の移出抑制と、それに伴う自己反応性 T 細胞の中枢神経系への浸潤抑制が主に考えられている。それ以外の薬効機序として、動物実験での検討により、オリゴデンドロサイトやアストロサイトへの直接作用について報告されているが、それ以外の中枢神経系細胞についての検討は乏しい。そこで、我々は、マウス初代培養細胞を用いて、ミクログリアおよびニューロンに対する FTY720 の直接作用について検討を行った。ミクログリアやニューロンは 5 種類全ての S1P 受容体を発現していた。FTY720 は濃度依存的に、活性化ミクログリアからの炎症性サイトカインの産生を抑制し、神経栄養因子の産生を増加させた。また、ニューロンに対しては、BDNF の産生を濃度依存的に増加させ、アミロイド  $\beta_{1-42}$  によるニューロン死を抑制した。以上の結果から、FTY720 はリンパ球のみならず、ミクログリアおよびニューロンにも直接作用して、神経保護作用を発揮することが明らかとなった。FTY720 は、多発性硬化症のみならず、神経変性疾患に対しても有効な経口治療薬となる可能性が考えられる。

### 研究目的

多発性硬化症に対する新規経口治療薬 FTY720 (fingolimod) は、スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体へ作用し、二次リンパ組織からのリンパ球の移出を抑制し、副次的に自己反応性 T 細胞の中枢神経系への浸潤を抑制することにより、多発性硬化症の再発抑制効果を発現すると考えられている。中枢神経系細胞への薬理作用として、これまで動物実験などでの検討により、オリゴデンドロサイトやアストロサイトへの直接作用について報告されているが、それ以外の中枢神経系細胞についての検討は乏しい。

そこで、我々は、マウス初代培養を用いて、ミクログリアおよびニューロンに対する FTY720 の直接作用について検討を行った。

### 研究方法

すべての動物実験は、動物愛護の観点より、名古屋大学動物実験委員会の指針に則して行われた。

C57BL/6J マウス初代混合グリア細胞より分離したミクログリアと、大脳皮質初代ニューロンを用いて以下の検討を行った。

- (1) ミクログリアにおける S1P 受容体の発現を RT-PCR とフローサイトメトリーで評価した。リポ多糖で

<sup>1)</sup>名古屋大学環境医学研究所神経免疫学

活性化させたミクログリアへ FTY720 を投与し、炎症性サイトカインおよび神経栄養因子の発現を RT-PCR、ELISA および Western Blotting で評価した。

- (2) ニューロンにおける S1P 受容体の発現を RT-PCR、免疫染色および Western Blotting で評価した。さらに、ニューロンへ FTY720 を投与し、神経栄養因子の発現を RT-PCR、ELISA および Western Blotting で評価した。
- (3) アルツハイマー病の原因タンパクの一つであるアミロイド  $\beta_{1-42}$  によるニューロン死に対する FTY720 の抑制効果を顕微鏡下で評価した。

## 研究結果

- (1) ミクログリアは 5 種類全ての S1P 受容体を発現しており、FTY720 の直接作用を受け得る。FTY720 は濃度依存的に、活性化ミクログリアからの炎症性サイトカインの産生を抑制し、神経栄養因子の産生を増加させる<sup>1)</sup>。
- (2) ニューロンも 5 種類全ての S1P 受容体を発現しており、FTY720 の直接作用を受け得る。FTY720 は濃度依存的に、ニューロンからの BDNF の産生を増加させ、アミロイド  $\beta_{1-42}$  によるニューロン死を抑制する。

## 考察・結論

FTY720 はリンパ球のみならず、ミクログリアおよびニューロンにも直接作用して、神経保護作用を発揮することが明らかとなった。

FTY720 は、多発性硬化症のみならず、

アルツハイマー病をはじめとする神経変性に対しても有効な経口治療薬となる可能性が示唆された。

## 文献

1. Noda H, et al., Fingolimod phosphate promotes the neuroprotective effects of microglia. *J Neuroimmunol.* 2013 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

# 多発性硬化症における Fingolimod の末梢血 B 細胞サブセットへの作用

研究分担者 山村 隆<sup>1,2)</sup>  
共同研究者 中村雅一<sup>1,2)</sup>, 松岡貴子<sup>1,2)</sup>, 山口広美<sup>1)</sup>, 小澤智子<sup>1)</sup>, 平川泰子<sup>1)</sup>, 三宅幸子<sup>1,2)</sup>,  
荒木 学<sup>1,2,3)</sup>, 岡本智子<sup>2,3)</sup>, 林 幼偉<sup>1,2,3)</sup>, 小川雅文<sup>2,3)</sup>, 村田美穂<sup>3)</sup>, 荒浪利昌<sup>1,2)</sup>

## 研究要旨

Fingolimod はリンパ球の二次リンパ組織から末梢血への移行をブロックすることにより多発性硬化症 (MS) の再発を抑制すると推測されている。近年, MS 病態における B 細胞, 特にメモリー B 細胞 (mB) の重要性が示唆されている。我々は MS 患者末梢血を用いて同薬の B 細胞サブセットへの作用をフローサイトメトリーにより解析した。同薬により mB 中の CD38 中等度陽性, 及び強陽性活性化サブセットが優先的に減少し ( $p < 0.05$ ), 両サブセットにおける増殖マーカー Ki-67 陽性細胞の有意な減少が認められた ( $p < 0.05$ )。プラズマブラスト (PB) では中枢神経浸潤能の高い CD138 陽性サブセットの頻度が有意に増加した ( $p < 0.05$ )。MS 再発時には自己反応性 mB は二次リンパ組織にて活性化, 増殖した後に末梢血へ移行すると考えられ, 活性化 mB 中の増殖細胞への優先的な作用は再発抑制の機序の一つと推測される。一方で, 同薬は PB 介在性病態には有効ではない可能性が示唆される。

## 研究目的

Fingolimod はスフィンゴシン 1 リン酸受容体-1 (S1P1) の機能的アンタゴニストであり, 多発性硬化症 (MS) において自己反応性リンパ球の二次リンパ組織から末梢血への移行をブロックすることにより再発を抑制すると推測されている。<sup>1</sup> 同薬による末梢血 Central memory Th17 細胞減少の報告はあるが,<sup>2</sup> 何れのリンパ球サブセットへの作用が治療効果発現に重要であるかは特定されていない。

近年, Rituximab による MS 再発抑制効果より<sup>3</sup> MS 病態における B 細胞の働きが注目されており, 中でも MS 髄液中主要サブセットであるメモリー B 細胞 (mB) の重要性が示唆される。<sup>4</sup> 一方, プラズマブラスト (PB) 介在性病態である視神経脊髄炎 (NMO)<sup>5</sup> は Fingolimod により悪化することが

示唆されており,<sup>6,7</sup> 同薬の mB と PB への作用の相違が疑われる。しかし, 同薬の B 細胞サブセットへの影響の詳細は不明である。

そこで, 我々は同薬による MS 末梢血 B 細胞サブセットの頻度, 活性化状態, 及び表現型の変化を解析し効果発現機構を検討した。

## 研究方法

- 1) 対象: Clinically definite MS (CDMS) 9 名とコントロールとしての CDMS 6 名, 健常者 3 名。
- 2) 定量的 RT-PCR: 健常者末梢血中の CD19 陽性 B 細胞サブセット, 即ち, ナイーブ B 細胞 (CD27<sup>-</sup>), mB (CD27<sup>+</sup>CD180<sup>+</sup>), PB (CD27<sup>+</sup>CD180<sup>-</sup>CD38<sup>high</sup>) における S1P1-mRNA の発現量を評価した。
- 3) フローサイトメトリー: CDMS 9 名の Fingolimod 投与前, 及び 2 週間後の末梢血を用いて各 B 細胞サブセットの頻度, 活性化状態, 及び表現型の変化を評価した。活性化状態の評価には活性化マーカー CD38, HLA-DR を用いた。PB の表現型は分化マーカー CD138, 炎症性ケモカイン

- 
- 1) 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
  - 2) NCNP 多発性硬化症センター
  - 3) NCNP 病院 神経内科

受容体 CXCR3 を用いて分類した。さらに、同薬投与群、及び非投与群の末梢血 mB サブセットでの増殖マーカーKi-67 陽性細胞の頻度も測定した。

#### (倫理面への配慮)

本研究計画は当センター倫理委員会の承認を受けており、被検者より書面にてインフォームドコンセントを得た。個人情報に連結可能匿名化された後厳重に保管され、データ発表の際は、個人を特定されないよう細心の注意を払った。

#### 研究結果

- 1) 健常者末梢血各 B 細胞サブセットにおいて中等度の S1P1-mRNA の発現を認めた。
- 2) Fingolimod 投与 2 週間後の MS 患者末梢血単核細胞における各 B 細胞サブセット頻度の有意な低下を認めた ( $p < 0.05$ )。
- 3) mB では同薬投与 2 週間後の CD38 中等度陽性 (CD38<sup>int</sup>)、及び強陽性 (CD38<sup>high</sup>) サブセット頻度の有意な低下を認めた ( $p < 0.05$ )。CD38 弱陽性 (CD38<sup>low</sup>) サブセットに比して CD38<sup>int</sup>、及び CD38<sup>high</sup> サブセットでは HLA-DR の平均蛍光強度が高く、CD38<sup>high</sup> サブセットと CD38<sup>low</sup> サブセットとの間に有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。
- 4) CD38<sup>low</sup> サブセットに比して CD38<sup>int</sup>、CD38<sup>high</sup> 両サブセットにおける Ki-67 陽性細胞頻度が高く、この頻度は同薬投与により有意に減少することが示唆された ( $p < 0.05$ )。
- 5) PB では同薬投与 2 週間後の CD138 陽性細胞頻度の有意な増加 ( $p < 0.05$ )、及び同サブセットにおける CXCR3 陽性細胞頻度の有意な増加を認めた ( $p < 0.05$ )。

#### 考 察

Fingolimod は MS 末梢血各 B 細胞サブセットを有意に減少させるが、同薬に対する高感受性、及び抵抗性サブセットの存在が明らかとなった。前者として CD38<sup>int</sup>、及び CD38<sup>high</sup> 活性化 mB が特定

され、特に増殖細胞の二次リンパ組織からの移行が有意に抑制されることが示された。MS 再発時には二次リンパ組織において自己反応性 mB が活性化、増殖した後に末梢血に移行し中枢神経に浸潤すると考えられる。従って、同薬のこの作用は MS 再発抑制に寄与すると推測される。一方、同薬抵抗性サブセットとして CD138 陽性 PB が特定され、同サブセットにおける CXCR3 の発現亢進を認めた。我々は NMO 再発時に CD138 陽性 PB が CXCR3 依存性に中枢神経に浸潤することを報告した。<sup>8</sup> 従って、同薬は中枢神経浸潤能の高い PB サブセットへの作用が弱いことが示唆される。

#### 結 論

Fingolimod の活性化 mB 中の増殖細胞への優先的な作用は MS 再発抑制の機序の一つと推測される。同薬は PB 介在性病態には有効ではない可能性が示唆される。

#### 文 献

1. Cohen JA, et al. Ann Neurol 2011; 69: 759-777.
2. Mehling M, et al. Neurology 2010; 75: 403-410.
3. Hauser SL, et al. N Engl J Med 2008; 358: 676-688.
4. Corcione A, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 11064-11069.
5. Chihara N, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108: 3701-3706.
6. User's guide for Gilenya® in Japan (by Novartis)
7. Min JH, et al. Mult Scler 2012; 18: 113-115.
8. Chihara N, et al. 12<sup>th</sup> Annual Meeting of FOCIS, Vancouver, Canada, 2012.

#### 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



## 多発性硬化症での Fingolimod 投与中に出現した 血球減少への薬剤継続の工夫

班員                      NHO 宇多野病院多発性硬化症センター                      田中正美  
共同研究者  
NHO 宇多野病院多発性硬化症センター                      朴 貴瑛, 本山りえ, 田原将行  
NHO 宇多野病院                      小西哲郎  
金沢医科大学神経内科                      田中恵子

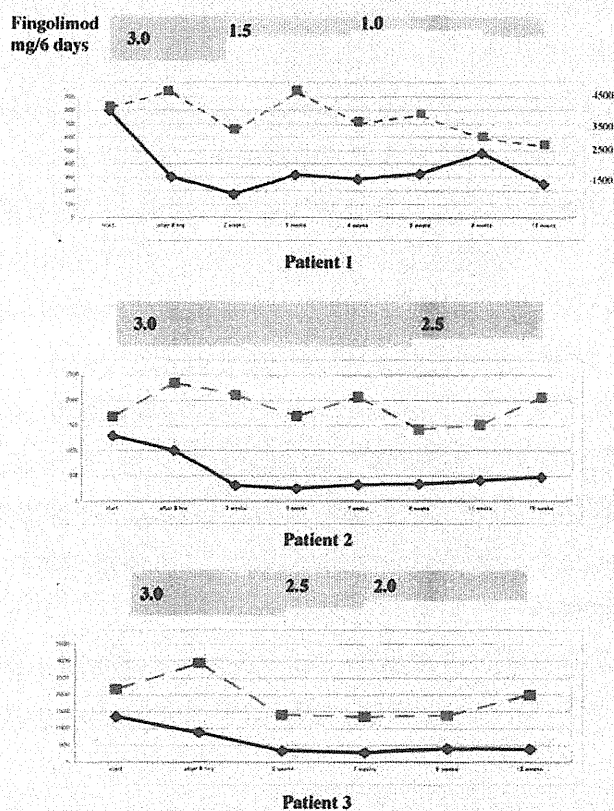
【目的】 再発寛解型多発性硬化症(以下、RRMS)の再発予防に対する初の内服薬として Fingolimod (FTY)が 2011 年 11 月末に国内でも発売された。心臓に対する有害事象(徐脈)や血球貪食症候群による死亡、作用機序の曖昧さ、長期投与への安全性など不安も少なくない。しかし、従来の自己注射を要求されるインターフェロン(IFN)β製剤に比して、1日1回内服という容易さとIFNβを遙かに凌駕する効果により期待が大きい。FTYはリンパ節に特定のリンパ球サブセットを閉じこめることでRRMSの再発予防に効果があると考えられているため、末梢血中のリンパ球数減少は避けられない。添付文書でも $200/\text{mm}^3$ 以下が持続した場合は薬剤の中断を勧告している。FTYの半減期は長いけれども、長期間薬剤を中断することにより血中から薬剤が消失してしまうと、再開する際に投与初日の徐脈のリスクを再び負うことになってしまう。このリスクを避け、治療継続を目的に、薬剤の服用スケジュールの調整により有害事象としての血球減少を避ける方法を考案した。機序は不明だが、時に好中球が $1000/\text{mm}^3$ 以下になることもあり、同様に検討を行った。

FTYは半減期が長いので、血中濃度が平衡状態に達するまで4週間以上必要だが、逆に投与スケジュールを調整することで平衡状態に達した際の最高血中濃度を調整可能である。

【対象・方法】 2011年12月以降、FTYを投与したRRMS患者のうち、血中濃度が平衡状態に達する前にリンパ球数が $200/\text{mm}^3$ 以下に低下するおそれのあった2例と同様に好中球が $1000/\text{mm}^3$ 以下に低下しそうになった1例を対象に内服スケジュール(週に1-3日休薬したが、血中濃度の変動をできるだけ避けるために、週に複数日休薬する際には連続しないように心がけた)を調整した。

【結果】 0.5mgカプセルを6日間に3-6日内服した場合、平衡状態に達した際の最高血中濃度は6日間の合計内服量に比例することが計算上判明した。リンパ球数は最

高血中濃度に比例することが予想されるため、リンパ球数の変化を見ながら投与方法(週に 1-3 日休薬)を調整することで中止せずに継続可能であった。好中球が過度に減少することも同様に避けることが可能であった。投与後の 11 ヶ月間、再発はない。【結論】週に 1-3 日(毎日曜日とか毎月水金に休薬とか)によりリンパ球数減少や好中球数減少による中断・中止を避けることが可能である。この投与法はあくまでも FTY の中止を避けることを目的としたものであり、有効性の証明はまだない。



文献: 田中正美、越智香保. 多発性硬化症への fingolimod の適応条件. 神経内科; 2011;75:304.:  
 田中正美、朴 貴瑛、本山りえ、田中恵子. 多発性硬化症へのフィンゴリモド治療-どのように使用する  
 か? 神経内科 2012;76:390-7: 田中正美、朴 貴瑛、本山りえ、田中恵子. フィンゴリモドを投与した  
 多発性硬化症患者における末梢血リンパ球の変化-CD62L 陽性細胞の著減-. 神経内科  
 2012;77:109-13.: 田中正美. 多発性硬化症へのフィンゴリモド治療-補遺. 神経内科 2012;77:444.

## 選択的 S1P 受容体作動薬 ONO-4641 の再発寛解型多発性硬化症患者を対象としたプラセボ対照二重盲検比較試験 (DreaMS、国際共同第 II 相試験) の試験成績

齋田孝彦<sup>1</sup>、野村恭一<sup>2</sup>、近藤誉之<sup>3</sup>、田中正美<sup>4</sup>、DreaMS 国内研究グループ

<sup>1</sup>関西多発性硬化症センター (入野医院、京都民医連中央病院) ; <sup>2</sup>埼玉医科大学総合医療センター・神経内科 ; <sup>3</sup>康生会武田病院・神経内科 ; <sup>4</sup>NHO 宇多野病院・神経内科

**【目的】** ONO-4641 は、S1P 受容体のサブタイプ 1 及び 5 に対して選択的に作用する S1P 受容体作動薬である。既存薬 fingolimod は、サブタイプ 1 及び 3~5 に作用することから、より安全性と有効性が高い薬剤を目指して開発が進められている。本試験では、再発寛解型多発性硬化症 (RRMS) 患者に対して ONO-4641 を 26 週間経口投与し、有効性及び安全性を評価した。

**【対象・方法】** 407 名 (うち日本人 38 名、欧米人が主体) の RRMS 患者 (年齢 : 18 ~55 歳、EDSS スコア : 0~5.5、2 年以内に 2 回以上の再発、または 1 年以内に 1 回以上の再発、または 3 カ月以内に撮影した MRI にて 1 個以上のガドリニウム (Gd) で増強された病変が認められた患者) をプラセボ群、ONO-4641 0.05 mg 群、0.1 mg 群または 0.15 mg 群に均等に割り付けた (図 1)。被験者は治験薬を 1 日 1 回、26 週間経口服用した。造影 MRI 評価は、スクリーニング時、開始直前 (BL)、6、10、14、18、22 及び 26 週目に実施した。

**【結果】** 投与 10 週から 26 週の間、4 週毎に撮影された 5 回の MRI で、累積 Gd 増強病巣数 (主要評価項目) は、プラセボ群と比較して実薬 3 群ではいずれも統計学的有意に低値を示した ( $p < 0.001$ )。プラセボ群では平均累積造影病巣数が 8.3 であったのに対し、ONO-4641 0.05 mg 群、0.1 mg 群及び 0.15 mg 群ではそれぞれ 1.5、0.7、1.9 であり、プラセボ群と比較した抑制率はそれぞれ 82%、92%、77%であった (図 2-a)。また、Gd 増強病巣が認められなかった被験者の割合を経時的に確認したところ、ONO-4641 投与群ではプラセボ群と比較して投与 6 週から有効性が認められ、既存薬に較べ投与後速やかに効果が現れる可能性が示唆された (図 2-b)。ONO-4641 は用量依存的にリンパ球数を抑制した。

プラセボ群と比較し、実薬群で多く認められた有害事象は正常値上限 3 倍以上の ALT 増加であった。また、第二度房室ブロック (モービッツ I 型) が 0.1 mg 群及び 0.15 mg 群で認められ、心房細動が 0.15 mg 群において 1 件認められた。初回投与後の心拍数減少について、0.1 mg 群及び 0.15 mg 群では既存薬と同程度であったが、0.05 mg 群ではその作用が弱い可能性が示唆された。感染症、呼吸器障害及び呼吸機能障害発現率は、4 群間で同様であった。

**【結論】** 本試験は、MS 領域では初めて日本を含めた国際共同治験として実施され、患者数の少ない難病での治験のあり方の、今後の一つのモデルとなると考えられる。

ONO-4641 投与群ではプラセボ群と比較して、累積 Gd 増強病巣数を統計学的有意に減少させた。また、安全性に大きな問題はなく、0.15 mg 群までの忍容性が確認された。既存薬と比べて高い安全性が期待され、現在第Ⅲ相試験の準備が進められている。

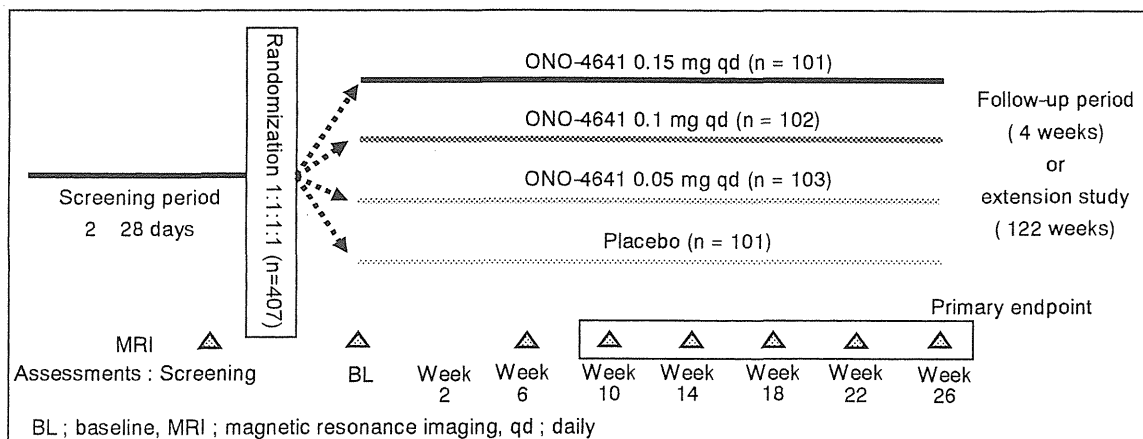


図 1 試験デザイン及びスケジュール概要

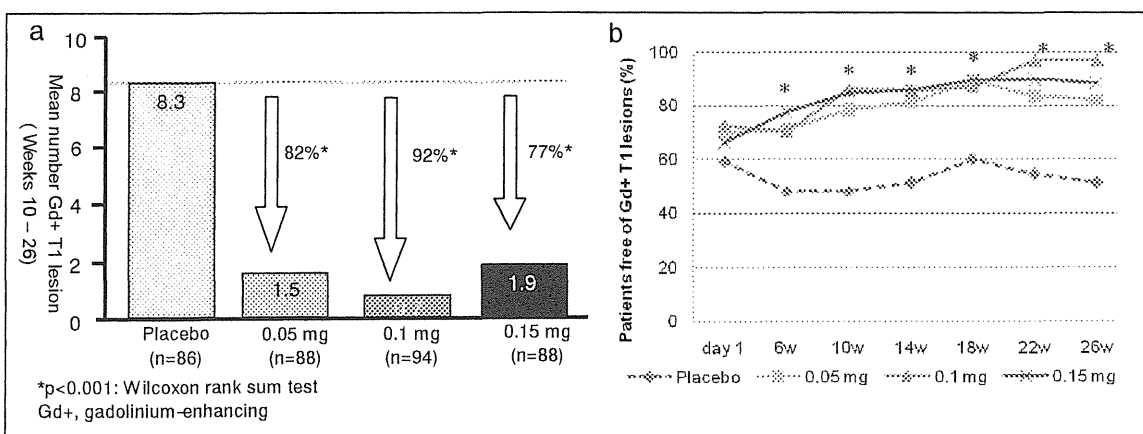


図 2 a. 投与 10 週から 26 週の間撮影された MRI での累積 Gd 増強病巣数

b. Gd 増強 MRI 病巣が認められなかった被験者の割合の推移

#### 参考資料

1. Vollmer TL. et al. A double-blind, placebo-controlled, Phase II, 26-week DreaMS trial of a selective S1P receptor agonist ONO-4641 in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. Poster presented at AAN, New Orleans, April 2012.
2. Zipp F et al. Efficacy and safety of the S1P receptor agonist ONO-4641 in patients with relapsing remitting multiple sclerosis: results of a 26-week, double-blind, placebo-controlled, Phase II trial (DreaMS). Poster presented at ECTRIMS, Lyon, October 2012.

## 多発性硬化症治療効果予測マーカーSema4A の IFN- $\beta$ 治療抵抗性に関する検討

分担研究者 中辻裕司<sup>1)</sup>

共同研究者 甲田亨<sup>1)</sup>、オノラ ジョセフ<sup>1)</sup>、高田和城<sup>1)</sup>、多田智<sup>1)</sup>、奥野龍禎<sup>1)</sup>、  
望月秀樹<sup>1)</sup>、木下允<sup>2)</sup>、熊ノ郷淳<sup>3)</sup>、佐古田三郎<sup>4)</sup>

### 研究要旨

再発寛解型多発性硬化症 (RRMS) 患者血清で Sema4A が有意に上昇しており、特に一部の患者では Sema4A が著明高値を示す。しかもこの高値群では IFN- $\beta$  治療が無効である<sup>1)</sup>。今後前向き多施設共同研究が必要であるが、Sema4A 高値患者に IFN- $\beta$  治療を選択することは倫理的に望ましくないと考え、まず MS のモデル動物である実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を利用し Sema4A 高値群の IFN- $\beta$  治療抵抗性を検証した。EAE は IFN- $\beta$  治療により軽症化したが、リコンビナント Sema4A を投与した Sema4A 高値 EAE 群では IFN- $\beta$  治療効果が打ち消された。本研究によりヒトで認められた Sema4A 高値群の IFN- $\beta$  治療抵抗性がモデル動物においても再確認された。今後は MS の診断後は Sema4A を測定し、早期に IFN- $\beta$  無効例を見出し、適切な治療を導入できる可能性があると考えられる。

### 研究目的

我々は先行研究で、クラス IV セマフォリン Sema4A が RRMS 患者血清において有意に増加し、さらに IFN- $\beta$  治療により Sema4A 高値群は低値群に比べ明らかに重症度が進行する、つまり Sema4A 高値患者には IFN- $\beta$  が無効、あるいは逆に増悪を助長することを報告した<sup>1)</sup>。このことから Sema4A 高値 MS 患者の治療については従来の第一選択治療薬である IFN- $\beta$  療法が適切でないことが考えられる。これまで Sema4A が IFN- $\beta$  治療に直接影響を与えるエビデンスはなく、ランダム化比較試験にて Sema4A 高値患者では IFN- $\beta$  治療が無効であることを検証することが重要であるが、

Sema4A 高値例では増悪が懸念されるためプロスペクティブスタディーは倫理的に遂行できない。そこで我々は今回 MS のモデル動物 EAE を利用してリコンビナント Sema4A の IFN- $\beta$  治療に及ぼす影響を検証した。

### 研究方法

・実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) は、8-10 週齢雌の C57BL/6 マウスに、MOG<sub>35-55</sub> ペプチド 200  $\mu$ g を完全フロイントアジュバント (CFA) とともに免疫し、百日咳毒素を投与し誘導した。免疫時より IFN- $\beta$ -1b 治療群と PBS 投与群とに分け、更にリコンビナント Sema4A Fc 投与群とコント

1) 大阪大学大学院医学系研究科神経内科学

2) 大阪大学免疫制御学

3) 大阪大学呼吸器・免疫アレルギー内科学

4) 国立病院機構刀根山病院

ロール IgG 投与群に分け、計 4 群で検証を行った。IFN- $\beta$ -1b は免疫時より 1 日おきに  $1 \times 10^4$  単位を 10 日目まで腹腔内投与し、Sema4A に関してはリコンビナント Sema4A Fc を免疫時に  $40 \mu\text{g}$ 、免疫後 1、3、5、7、10 日目に  $20 \mu\text{g}$  静脈内投与した。

・臨床症状の評価と組織学的解析。クリカルスコアを用いた重症度の観察を行い、HE 染色と KB 染色にて炎症細胞浸潤と脱髄の評価を行った。

## 研究結果

(1) Sema4A の IFN- $\beta$  治療抑制効果。IFN- $\beta$  治療にて EAE の重症度は軽症化するが、IFN- $\beta$  治療に Sema4A Fc 投与を行うと、IFN- $\beta$  の治療効果は打ち消される、もしくはかえって症状が増悪し、Sema4A が IFN- $\beta$  の治療効果を打ち消すことが明らかとなった。

(2) 組織学的解析。HE 染色・KB 染色での組織学的解析から IFN- $\beta$  治療を行った群では EAE 脊髄の炎症細胞浸潤が抑制され脱髄も軽減されたが、IFN- $\beta$  治療に Sema4A 投与を行った群では炎症細胞浸潤の抑制や脱髄の軽減は認められなかった。

## 考察

MS においては早期治療導入が予後を改善する<sup>2</sup>。しかし、MS 治療の第一選択薬で

ある IFN- $\beta$  には無効例が存在し、その治療効果判定には半年から 1 年程度の期間が必要である。IFN- $\beta$  治療を受けていた Sema4A 高値患者では症状の進行が認められたこと、および同様の傾向が今回の動物モデルでも確認されたことから、Sema4A 高値患者は IFN- $\beta$  治療抵抗群である可能性が高い。今後 MS 診断時に Sema4A を測定することで IFN- $\beta$  抵抗患者をより早期に見出し適切な治療を導入できる可能性がある。さらに Sema4A 高値 MS 患者で IFN- $\beta$  以外の薬剤の効果を検証する必要がある。

## 結論

Sema4A はモデル動物 EAE においても IFN- $\beta$  の治療効果を打ち消すことが明らかとなった。Sema4A は MS の IFN- $\beta$  治療効果予測マーカーとして有用であると考えられる。今後多施設共同臨床研究が必要である。

## 文献

- 1) Nakatsuji Y, Okuno T et al. Elevation of Sema4A implicates Th cell skewing and the efficacy of IFN- $\beta$  therapy in multiple sclerosis. *Journal of Immunology* 188: 4858-65, 2012
- 2) BENEFIT Study Group. Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event

suggestive of multiple sclerosis. Lancet  
370(9585):389-97, 2007

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許出願：なし

実用新案登録：なし

## 多発性硬化症・視神経脊髄炎に対する新規治療ターゲットとしての HMGB1 の可能性

分担研究者 桑原聡

共同研究者 鵜沢顕之、森雅裕、谷口順子、増田冴子、武藤真弓、内田智彦

### 研究要旨

視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica: NMO) と多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) は中枢神経内に再発性に炎症を来す自己免疫疾患である。近年、生体に免疫反応を誘導する Alarmin の一つである high mobility group box 1 (HMGB1) の研究が各種自己免疫疾患において多くなされ、新規治療ターゲットとして期待されている。今回、我々は NMO/NMO 関連疾患 42 例、再発寛解型 MS 30 例、非炎症性神経疾患(non-inflammatory neurological diseases: NINDs)30 例の髄液中の HMGB1 濃度を測定し、臨床パラメーターとの相関を検討した。その結果、NMO、MS で髄液 HMGB1 が有意に上昇しており、中枢の炎症パラメーターと相関していた。さらに NMO においては髄液 IL-6、Qalb、GFAP とも相関を認め、髄液 HMGB1 が中枢の炎症、血液脳関門破綻、アストロサイトの障害に関与していることが示唆された。また MOG で免疫した experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)マウスに抗 HMGB1 モノクローナル抗体を 5 日間腹腔内投与したところ、血清 IL-17 の up-regulation が抑制され、EAE の重症度・炎症が軽減した。本研究の結果からは、HMGB1 は炎症メディエーターとして、NMO、MS の病態に関与しており、HMGB1 の制御はサイトカインや炎症の抑制につながることを示唆された。HMGB1 は将来的に NMO、MS などの自己免疫性炎症性疾患の治療標的として有用な可能性があると考えられた。

### 背景・研究目的

High mobility group box 1 (HMGB1) は通常、核内の DNA 結合蛋白として存在しているが、一旦、核から細胞外に放出されると、周辺細胞に発現しているレセプター (TLR2, 4, 9, RAGE) に作用し、炎症メディエーターとして働くことが知られている<sup>1</sup>。また、刺激された免疫細胞からの放出されるのみでなく、有核細胞が壊死やアポトーシスに陥った場合にも、HMGB1 は受動的に細胞外に放出される<sup>2</sup>。近年、この細胞外の HMGB1 が、炎症反応を誘導するなど、重要な役割を果たしていることが様々な自己免疫性疾患で報告されている<sup>3,4</sup>。HMGB1 が NMO(neuromyelitis optica), MS(multiple sclerosis)の病態、特に中枢神経内の炎症反応に関与しているかどうか明らかにすること、また MS のモデル動物である experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)を用いて HMGB1 を標的とした治療が NMO、MS に応用可能かどうかを明らかにすることを目的とした。

### 研究方法

- 1) NMO/抗 AQP4 抗体陽性 NMO 関連疾患 42 例、MS30 例、非炎症性神経疾患(non-inflammatory neurological diseases: NINDs)30 例の髄液中の HMGB1 濃度を測定し、臨床パラメーターとの相関を検討した。
- 2) MOG で免疫した EAE マウスに抗 HMGB1 モノクローナル抗体 (20  $\mu$ g/匹) を連続 5 日間腹腔内投与し(day 11-15)、EAE の血清中のサイトカイン濃度、EAE の重症度、EAE の病理学的所見に変化が見られるか検討した。

### 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、またプライバシーの保護についても、十分に配慮した。また動物実験においては、実験計画は千葉大学動物実験委員会の許可を受けており、実験動物取り扱いに関する国内法を遵守して行った。



## 研究結果

1) 髄液中の HMGB1 濃度は NMO( $3.56 \pm 3.76$  ng/ml)で、MS( $1.43 \pm 0.82$  ng/ml)や NINDs( $0.85 \pm 0.21$  ng/ml)と比較して高く( $P < 0.001$ )、さらに MS は NINDs より高値であった( $P < 0.001$ )。NMO、MS において HMGB1 濃度は髄液細胞数と強く相関しており(NMO,  $r = 0.832$ ,  $P < 0.001$ ; MS,  $r = 0.800$ ,  $P < 0.001$ )、NMO においては髄液 IL-6 ( $r = 0.506$ ;  $P = 0.001$ )、髄液 GFAP( $r = 0.511$ ;  $P = 0.001$ )、髄液/血清アルブミン比(QAlb) ( $r = 0.680$ ;  $P < 0.001$ )と有意に相関していた。

2) EAE への抗 HMGB1 モノクローナル抗体 (20 $\mu$ g/匹)の投与は血清 IL-17 の産生亢進を抑制し、EAE の clinical score を有意に低下させた。また病理学的に脊髄の炎症細胞浸潤・脱髄を軽減させ、HMGB1 の核内から細胞外の放出が抑制された。

## 考察

HMGB1 は炎症細胞や、死滅細胞から分泌されることで、炎症を引き起こす<sup>1</sup>。EAE や MS では、マクロファージやミクログリアが HMGB1 を産生し、中枢神経内の炎症の biomarker として有用と報告されている<sup>5</sup>。全身性エリテマトーデスや慢性関節リウマチなど他の自己免疫疾患でも HMGB1 の病態への関与が報告されている<sup>3,4</sup>。本研究では NMO、MS において髄液 HMGB1 は有意に上昇し、髄液細胞数と強い相関を認めることから、HMGB1 は中枢神経内の炎症のメディエーターとなっている可能性があると考えられた。また NMO において、髄液 HMGB1 濃度と髄液 GFAP・髄液 IL-6 に有意な相関があったことから、抗 AQP4 抗体介在性のアストロサイトの障害により、HMGB1 が受動的に放出されている可能性も考えられた。さらに HMGB1 濃度は MS より NMO でより上昇しており、炎症の程度が NMO で強いことと一致しており、治療標的としても NMO の方が有用な可能性があることが示唆された。

また抗 HMGB1 モノクローナル抗体の治療効果の報告が敗血症、脳梗塞、関節炎、自己免疫性心筋炎などのモデル動物でなされている。本研究では MS のモデルマウスで抗体治療の有効性を初めて明らかにした。抗 HMGB1 モノクローナル抗体は EAE の急性期において、中枢神経内の HMGB1 を中和することで、炎症反応を抑

制し、重症度を軽減すると考えられた。さらに EAE の発症には IL-17 が重要であると考えられており、抗 HMGB1 モノクローナル抗体の投与により血清 IL-17 の産生が抑制されたことも EAE の病態を軽減させる要因になっていると考えられた。

## 結論

HMGB1 は炎症メディエーターとして、NMO、MS の病態に関与している可能性がある。また HMGB1 は NMO、MS の急性期の治療標的として有用なことが示唆された。

## 文献

1. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C917-24.
2. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002;418:191-5.
3. Abdulahad DA, Westra J, Bijzet J, et al. High mobility group box 1 (HMGB1) and anti-HMGB1 antibodies and their relation to disease characteristics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R71.
4. Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, et al. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* 2003;48:971-81.
5. Andersson A, Covacu R, Sunnemark D, et al. Pivotal advance: HMGB1 expression in active lesions of human and experimental multiple sclerosis. *J Leukoc Biol* 2008;84:1248-55.

## 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

## Neuromyelitis optica spectrum disorders(NMOsd)増悪期に対する

### ステロイドパルス療法の有効性を予測する因子に関する検討

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, 人工腎臓部※1

千葉大学 大学院医学研究院 神経内科※2

東北大学大学院医学系研究科 多発性硬化症治療学寄附講座※3

王子 聡, 石塚 慶太, 遠藤 綾亮, 鈴木 理人, 久保田 昭洋, 田島 孝士, 成川 真也,  
吉田 典史, 山里 将瑞, 三井 隆男, 深浦 彦彰, 永峯 大輔※1, 佐々木 裕介※1,  
山口 由美子※1, 金山 由紀※1, 木場 藤太※1, 小川 智也※1, 松田 昭彦※1,  
森 雅裕※2, 高橋 利幸※3, 藤原 一男※3

#### 要 旨

Neuromyelitis optica spectrum disorders(NMOsd)は Astrocyte end foot を標的とする再発性の自己免疫性 Astrocytopathy であり, 重症の視神経, 脊髄病変を主徴とする疾患である. NMOsd 増悪期における治療の第 1 選択はステロイドパルス療法(Intravenous methylprednisolone : IVMP)であるが, IVMP の治療効果は症例によって大きく異なる. 本研究において我々は NMOsd 増悪期に対する IVMP 治療効果の有無を早期から予測し, IVMP 治療抵抗性症例での Plasmapheresis(PP)の必要性を判断するために種々の因子について検討した. IVMP 治療効果の判定は EDSS(Kurtzke Expanded Disability Status Scale)の変動を用いて判定した.  $\Delta$ EDSS から non R-NMOsd と治療反応性 NMOsd(R-NMOsd)の 2 群に分け, 1) 年齢, 2) 性別, 3) 再発回数, 4) EDSS, 5) 病巣部位, 6) 他の自己抗体の合併の有無, 7) PSL 内服量(mg/day), 8) IVMP 量, 9) 増悪から IVMP 開始までの期間(day), 10) 髄液細胞数(CSF-cell), 11) 髄液タンパク(CSF-TP), 12) 髄液 LDH(CSF-LDH), 13) 髄液/血清 alb 比(Qalb : Quotient of CSF/Serum albumin $\times$ 103), 14) 髄液/血清 IgG 比(QIgG : Quotient of CSF/Serum IgG $\times$ 103)について後ろ向きに比較検討した. non R-NMOsd 10, R-NMOsd 11 例であった. R-NMOsd と比較して non R-NMOsd において有意に高値を認めた変数は EDSS( $p < 0.05$ ), CSF-TP( $p < 0.01$ ), Qalb( $p < 0.01$ ), QIgG( $p < 0.01$ )であった. IVMP 治療効果を目的変数, 治療効果を説明変数とした Univariate Logistic regression analysis は IVMP 治療効果を有意に説明しうる変数として EDSS, CSF-TP, Qalb, QIgG(各々  $p < 0.05$ )を示した. これらの 4 変数を説明変数とした変数増加法 Stepwise Logistic analysis は IVMP 治療抵抗性の有無を有意に説明しうる変数として QIgG のみを選択した(Odds ratio 4.08, 95%Confidence interval(95%CI)[1.356-12.253],  $p = 0.012$ ). QIgG は BBB 破綻を有する NMOsd 増悪期における重症度と IVMP 治療抵抗性の有無を判断するための定量的な指標の 1 つとして有用である.

## 目的

NMOsd 増悪期の治療方針の多くは、ステロイドパルス療法 (IVMP : intravenous methylprednisolone) が第 1 選択であり、IVMP 治療抵抗性症例ではアフレスシス (PP) を要する。IVMP 治療効果は症例によって大きく異なるが、その有効性を予測する因子に関する検討は殆どなされていない。病初期において IVMP 治療抵抗性症例を予測しうることは PP の必要性を含めた増悪期の治療戦略を立てる上で有用であると考えられる。今回我々は NMOsd 増悪期に対する IVMP 治療効果の有無を早期から予測し、IVMP 治療抵抗性症例での PP を含めた追加治療の必要性を判断しうる因子について明らかとすることを目的とする。

## 対象・方法

NMOsd 増悪期 21(女性 18)例を対象とした。NMOsd の診断は Wingerchuk 診断基準を満たし 4), かつ血清抗 AQP4 抗体が陽性である症例と定義した。治療方針は IVMP を第 1 選択とし、IVMP 治療抵抗性症例 (non Responder-NMOsd : nonR-NMOsd) では PP を施行する方針とした。治療効果の判定は EDSS(Kurtzke Expanded Disability Status Scale) の変動を用いて判定した。少なくとも 3.0g 以上の IVMP 治療から 5~7 日後における EDSS の改善 ( $\Delta$ EDSS) が 0.5 未満の場合を nonR-NMOsd と定義した。 $\Delta$ EDSS から nonR-NMOsd と治療反応性 NMOsd(R-NMOsd) の 2 群に分け、1) 年齢、2) 性別、3) 再発回数、4) EDSS、5) 病巣部位、6) 他の自己抗体合併の有無、

-----  
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

7) PSL 内服量 (mg/day), 8) IVMP 量, 9) 増悪から IVMP 開始までの期間 (day), 10) 髄液細胞数 (CSF-cell), 11) 髄液タンパク (CSF-TP), 12) 髄液 LDH (CSF-LDH), 13) 髄液/血清 alb 比 (Qalb : Quotient of CSF/Serum albumin  $\times 10^3$ ), 14) 髄液/血清 IgG 比 (QIgG : Quotient of CSF/Serum IgG  $\times 10^3$ ) について後ろ向きに比較検討した。IVMP 治療効果予測の検討では、これらの項目を説明変数、IVMP 治療効果の有無を目的変数として解析した。なお血性髄液は除外した。Mann-Whitney U-test,  $\chi^2$  test, Univariate・Multivariate Logistic regression analysis, Spearman Rank-Order Correlation を用いて、p-value < 0.05 を統計学的に有意と判定した。

## 結果

nonR-NMOsd 11, R-NMOsd 10 例であった。2 群間の比較では IVMP 量に差はなかった。nonR-NMOsd において髄液タンパク、IgG-Index, Qalb, QIgG が有意に高値であった (各々 p < 0.01)。さらに 14 項目の各変数と IVMP 治療効果の有無との関連性について IVMP 治療効果の有無を目的変数、13 変数を説明変数として Univariate Logistic regression analysis を用いて解析した。Univariate Logistic regression analysis は IVMP 治療効果を有意に説明しうる変数として EDSS, CSF-TP, Qalb, QIgG (各々 p < 0.05) を示した (Table 1)。これらの 4 変数が nonR-NMOsd に寄与する Odds ratio (OR) [95%CI, p-value] は、それぞれ EDSS 1.539 [1.006-2.353, 0.047], CSF-TP 1.188 [1.015-1.390, 0.032], Qalb 2.008 [1.113-3.623, 0.021], QIgG 4.076 [1.356-12.253, 0.012] であり、QIgG が最も高値であった。Univariate Logistic

regression analysis において有意な関連性を認めた4項目のうち最もIVMP治療効果の有無に関連する変数を multivariate Logistic regression analysis を用いて検索した。IVMP 治療抵抗性の有無を目的変数、EDSS、CSF-TP、Qalb、QlgG を説明変数とした変数増加法 Stepwise Logistic analysis はIVMP 治療抵抗性の有無を有意に説明しうる変数として QlgG のみを選択した(OR 4.08, 95%CI[1.356-12.253], p=0.012)。以上の結果から検討した14項目の中ではIVMP治療抵抗性の有無に最も関連する因子は QlgG であることが示された。すなわち増悪期において QlgG 高値を示す NMOsd 症例はIVMP 治療抵抗性 NMOsd 症例である。

## 考察

これまでに NMOsd 増悪期におけるIVMP 治療効果を予測する因子に関する検討はなされていない。本研究の目的は NMOsd 増悪期に対するIVMP 治療効果の有無を早期から予測する因子を明らかにすることである。本研究において R-NMOsd と nonR-NMOsd の2群間における14項目についての比較検討では、R-NMOsd と比較して non R-NMOsd 症例において EDSS(p<0.05)、CSF-TP(p<0.01)、Qalb(p<0.01)、QlgG(p<0.01)の4項目が有意に高値であった。さらに14項目の各変数とIVMP 治療効果の有無との関連性についての Univariate Logistic regression analysis はIVMP 治療効果を有意に説明しうる変数として2群間で比較検討の結果と同様に EDSS、CSF-TP、Qalb、QlgG(各々 p < 0.05)を示した(Table 1)。変数増加法 Stepwise Logistic analysis は、これら4項目のうちIVMP 治療抵抗性の有無を有意に説明しうる変数として QlgG のみを選択した。以上のことから検

討した14項目の中ではIVMP治療抵抗性の有無に最も関連する因子は QlgG であることが示された。

NMO の病態は明らかにされていないが、AQP4 抗体や補体をはじめとする液性免疫と、リンパ球をはじめとする細胞性免疫が複雑に関与し、その病態を形成すると想定されている。

Nishiyama らは NMO 発症以前から長年にわたり血清中に AQP4 抗体が存在しながら NMO が発症せずに経過した AQP4 抗体キャリア 34 歳女性例を報告し、血清 AQP4 抗体の存在のみでは NMO は発症せず、NMO 発症の契機の一つとして何らかの病因による血液脳関門(Blood Brain Barrier : BBB)の破綻が必要であり、それに伴い中枢神経内(central nervous system : CNS)へ流入する AQP4 抗体を含む液性因子、リンパ球をはじめとする細胞性免疫など種々の病原性物質が複雑に関連し、NMO の病態形成に関連する可能性を考察している。

Shimizu らは NMO 増悪期における BBB 破綻を来す病態について Human brain microvascular endothelial cells(BMECs)を用いて検討を行った。AQP4 抗体や各種血清サイトカインをはじめとする NMO 患者血清に含まれる種々の液性因子のうち、NMO 患者血清の 71.4%に抗内皮細胞抗体が存在すると報告し、BBB 破綻に関連する因子として抗内皮細胞抗体と vascular endothelial growth factor(VEGF)を指摘している。抗内皮細胞抗体が BMECs を活性化し、BMECs 自身からの VEGF の自己分泌を促進する結果、BBB 破綻をもたらすと報告している。彼らは BBB 破綻に伴い AQP4 抗体をはじめとする液性因子が CNS 内へ流入する結果、NMO