

201317079A

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業(神経・筋疾患分野)

アトピー関連脳脊髄・末梢神経障害の病態解明と画期的治療法の開発

平成 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 吉良 潤一

平成 26 (2014)年 5 月

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））
総括研究報告書

アトピー関連脳脊髄・末梢神経障害の病態解明と画期的治療法の開発

研究代表者：吉良 潤一 九州大学大学院医学研究院神経内科学 教授

研究要旨

申請者らはアトピー関連脳脊髄・末梢神経障害の病態解明、治療法開発のため、臨床研究(全国疫学調査、病理学的検討、生化学的検討)、基礎研究(モデルマウス作成および治療介入)を行っている。平成25年度は、3年計画の2年目として、病態解明の足がかりとなるモデルマウスの作成と解析を行ない、アレルギー素因マウスにおける感覚過敏症(アロディニア)の存在を世界で初めて確認した。マウス初代培養グリア細胞ではアストロサイトがCCL11(Eotaxin1)を発現し、末梢血好酸球の中樞神経系への浸潤に影響している可能性が示唆された。アトピー性脊髄炎剖検例の病理学的検討では多発性硬化症とは異なる病理像が見られた。最終年度は、末梢のアトピー性炎症が中樞神経系に影響を及ぼす機序の解析と、中枢のグリア炎症抑制による治療法開発を試みる。また実際の患者の脳磁図による感覚障害の詳細な解析等を紹介し、基礎研究、臨床研究を継続する。

研究分担者

楠 進 近畿大学医学部神経内科(近畿大学)教授
吉田 真理 愛知医科大学加齢医学研究所神経病理部門(愛知医科大学) 教授
桑原 聡 千葉大学大学院医学研究院神経内科学分野(千葉大学) 教授
錫村 明生 名古屋大学環境医学研究所神経免疫学(名古屋大学)教授
萩原 綱一 九州大学大学院医学研究院臨床神経生理学分野(九州大学)助教
松下 拓也 九州大学大学院医学研究院神経内科学(九州大学) 学術研究員
松瀬 大 九州大学大学院医学研究院神経内科学分野(九州大学) 助教
吉村 怜 九州大学大学院医学研究神経内科学分

野(九州大学)共同研究員

研究協力者

城戸 瑞穂 九州大学大学院歯学研究院 口腔解剖学分野(九州大学) 准教授

研究目的

アトピー関連脳脊髄・末梢神経障害には、アトピー性脊髄炎、Churg-Strauss 症候群(CSS)が含まれるが、さらに平山病や Hopkins 症候群においてもアトピー素因の病態への関与が報告され(Kira, Ochi, JNNP 2001)、広範囲な神経疾患病態にアトピー素因が関与している可能性が示唆されている。また、末梢における炎症が中枢神経グリア炎症を惹起することも知られているが、末梢におけるアレルギー炎症と中枢神経系の炎症を直接的に結びつける研究は

ない。

本研究では、これらのアトピー関連脳脊髄・末梢神経障害に共通する末梢のアレルギー炎症が中枢神経炎症を惹起するメカニズム解明のため、モデルマウス作成と解析を中心とした病態生理の解明を目指す。また、疾患毎に特徴的な病態を明らかにし、それらを標的とした治療法の開発を目的とする。

アトピー性脊髄炎は、我々が新診断基準 (Isobe et al, JNS 2012) を策定したことにより、現在まで原因不明と考えられていた脊髄炎が新たにアトピー性脊髄炎と診断され、症例数が増加する事が予想される。また、CSS や若年者を侵す平山病および Hopkins 症候群も年々増加しており、有効な治療法もない。これに伴い、患者本人の負担に加え、医療資源の問題や介護の問題も含めた社会的負担も大きく、原因究明と治療法の早期開発が急務である。その方策としての疾患モデル動物作成およびその解析は、可及的速やかに行われる必要がある。

研究方法

①アトピー性脊髄炎モデルマウスの作成 (吉良、錫村、城戸)

6週齢の雌 C57Bl/6 マウスに、週に一回卵アルブミン(OVA) 50 µg+ Alum 2 mg の腹腔内注射を行い3週後に OVA 100 µg の気道内吸入を5日間連続で行い気管支喘息を誘発した。また、別グループの同週齢マウスに対し、OVA 吸入のかわりに OVA 100 µg の背部塗布によるアトピー性皮膚炎誘導を行った。これらのアトピー性疾患モデルマウス中枢神経におけるグリア炎症を免疫組織学的に解析した。また感覚障害の有無を von-Frey filament を用いた行動実験にて確認した。

また、アトピー素因がマウス実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)モデルに及ぼす影響を調べるため、上記の気管支喘息モデルマウスに EAE を誘導し、臨床症状にアトピー素因が及ぼす影響を調査した。

②IL-9 の神経障害における役割の解析と抗 IL-9 療

法の開発 (錫村、吉良)

申請者らは、最近、IL-9 がアストロサイトからの CCL20 産生を介して自己反応性 Th17 細胞の中枢神経への移入を促進することを明らかにしている (J Immunol 2011)。アトピー性脊髄炎患者髄液で増加する IL-9 の神経障害における役割を培養細胞系やマウスの実験的自己免疫性脳脊髄炎系などで解析し、抗 IL-9 療法の開発を継続して行う。

また、中枢神経系で、アレルギー性シグナル応答を担当する細胞を同定するため、マウス初代培養グリア細胞を用いて解析をおこなった。

③アトピーに関連した臨床像の十分に解明されていない神経障害の解析 (吉良、楠、桑原、萩原)

アトピー性脊髄炎患者、CSS を含むアトピー関連末梢神経障害患者の 128 チャンネル脳波計による精密な脳波解析や脳磁図による解析を引き続き行う。

CSS 患者と CSS 以外のアトピー関連末梢神経障害患者とで末梢神経伝導検査や誘発電位検査による解析を行い比較する。

④髄液でのサイトカイン産生細胞の解析 (桑原、吉村)

髄液の網羅的サイトカイン・ケモカイン解析、髄液 T 細胞のケモカイン受容体解析、T 細胞内サイトカイン産生能測定、Th9 細胞の検出等を引き続き実施する。

⑤アトピー性脊髄炎剖検例での免疫病理学的解析 (吉田)

世界でも唯一のアトピー性脊髄炎剖検症例の脊髄を用いて、サイトカイン・ケモカイン、T 細胞、B 細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、軸索、髄鞘等の免疫染色による解析を行う。

⑥新診断基準による国際的な共同臨床疫学調査の実施 (吉良、楠、桑原)

新診断基準の自験例以外の日本人集団での感度、特異度の検証後に、アトピー性脊髄炎の報告がある海外施設 (韓国 Ajou University、イタリア Azienda

Ospedaliera University、英国 National Hospital for Neurology and Neurosurgery) と新規診断基準による共同臨床疫学調査を実施する。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学倫理委員会、千葉大学倫理委員会、近畿大学倫理委員会の承認を受けて実施予定。一部は既に承認されている。サイトカイン・ケモカイン等の測定データ、臨床情報は、決して外部に流出しないよう、厳重に保管する。その公表(学会発表や論文発表)に際しては、被検者の個人名が特定できないようプライバシーの保護に配慮する。動物実験では、九州大学医学部および名古屋大学動物実験倫理委員会の審査を受け、「動物保護及び保管に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管に関する基準」(総理府告示第6号)の規制に基づいて実施する。実験に使用するマウスなどの動物は、苦痛の軽減、排除の方法として、十分な麻酔を行った上で使用する。

研究結果

①アトピー性脊髄炎モデルマウスの作成(吉良、錫村、城戸)

気管支喘息モデルマウスでは感覚過敏症(アロディニア)が認められた(図1)。これらのマウス頸髄ではミクログリアは活性化し、それらの一部はIRF8を発現していた(図2)。また、同マウス脊髄後角における血管内皮細胞の活性化と血管周囲アストロサイトの活性化も認められた(図3)ことから、末梢血におけるアトピー性炎症が血管内皮やアストロサイトの活性化を介して脳内グリア炎症を惹起し、感覚過敏を誘発している可能性が強く示唆された。

アトピー性皮膚炎モデルマウスでは、とくに胸髄におけるミクログリアの活性化がみられた。このことは、末梢血液性因子のみならず、感覚性刺激もグリア炎症の誘発、増悪に関与していることを示唆した。

気管支喘息モデルマウスでは、さらにEAEの発症促進と重症化の傾向がみられた。通常EAEはTh1系のアレルギー機序が病態形成に深く関与し、Th2系アレルギーは逆に疾患を抑制すると考えられていたが、今回の結果ではEAE発症前のグリア炎症が疾患の早期発症、重症化に影響していることが考えられ、中枢神経炎症性疾患の重症化にグリア炎症が深く関わっていることが示唆された。

②IL-9の神経障害における役割の解析と抗IL-9療法の開発(錫村、吉良)

錫村研のParajuliらは、マウス脳由来の神経細胞、アストロサイト、ミクログリアのTh2サイトカイン産生能を比較し、アストロサイトのCCL11(eotaxin-1)産生を突き止めた(図4)。また、その受容体であるCCR2,3,5はミクログリアに発現し、実際にミクログリアの遊走能を促進し、グルタミン酸毒性の増強や活性酸素種(ROS)の産生を介した神経障害機序が示唆された。

③アトピーに関連した臨床像の十分に解明されていない神経障害の解析(吉良、楠、桑原、萩原)

萩原らはアトピー性脊髄炎患者6名について脳磁図(MEG)を用いた体性感覚誘発磁場の解析を行い、従来の体性感覚誘発電(SEP)検査では検出できない軽微な異常を同定した(図5)。このことは、従来アトピー性脊髄炎患者が主観的に訴える感覚障害を同定できなかったが、MEGを用いて客観的に評価することが可能となり、治療効果の確認などがより定量的に行えるようになった点で大変重要な発見であった。

④髄液でのサイトカイン産生細胞の解析(桑原、吉村)

錫村らは上記②の研究を継続している。桑原らは、平山病の重症度とアトピー素因(血清IgEレベル)の

相関を見だし、平山病の病態におけるアレルギー性機序の関与を強く示唆した。

⑤アトピー性脊髄炎剖検例での免疫病理学的解析
(吉田)

妊娠中期にアトピー性脊髄炎に罹患し、全経過1年2ヶ月で死亡した22歳女性の神経病理学的解析を行ったところ、頸髄から腰髄にかけて広く海綿状の変化を認め、髄鞘、軸索ともに脱落していた。炎症細胞の浸潤は免疫治療の影響により軽度であったが、アトピー性脊髄炎とその他の脊髄炎との病理学的違いを明らかにした。

⑥新診断基準による国際的な共同臨床疫学調査の実施(吉良、楠、桑原)

新診断基準(Isobe et al, JNS 2012)策定により、国際的に統一された診断が可能となった。これをもとに本邦自験例以外の症例検討および海外で報告のあった施設における共同臨床疫学調査を検討中。

考察

平成25年度は、前年度に引き続き患者データの蓄積や病態解明のためのモデルマウス開発・解析を行い、多方面で画期的な発見があった。とくに気管支喘息モデルマウスにおける感覚過敏症の証明と、血管内皮やアストロサイトの活性化を介した中枢グリア炎症の同定は世界初の発見であり、これまでは患者の主観的訴えでしかなかったアトピー性脊髄炎の感覚障害を動物モデルで再現できたことは大きな進歩であった。また、これを裏付けるように、実際の患者において、MEGを用いた研究で感覚異常を定量的に観察できるようになったことも重要な進歩であった。

アトピー性脊髄炎は比較的最近発見された疾患であるが、症例報告では好酸球浸潤を伴う脊髄炎の報

告が散見され、これらの一部にはアトピー性脊髄炎の診断基準を満たすものもある。今後のアレルギー性疾患増加と昨年度の新診断基準策定にともない、アトピー性脊髄炎の症例数も増加することが予想される。本年度も昨年来の研究を引き続き行い、新規治療法の開発を行う必要性が示された。

結論

3年計画の2年目として、昨年度の研究をさらにすすめ、臨床的および基礎的に、重要な発見があった。本年度はこれらの発見をより深く解析し、原因追求と治療法開発を継続的にこなそう。

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

① 吉良 潤一

アレルギー性炎症と中枢神経障害. 第8回順天堂眼アレルギー研究会 2014.2.26 東京.

② 王 冰、○山崎 亮、方 梅、城戸 瑞穂、吉良 潤一

末梢のアトピー素因による中枢神経系ミクログリアの活性化. 第18回グリア研究会 2013.10.26 仙台.

知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

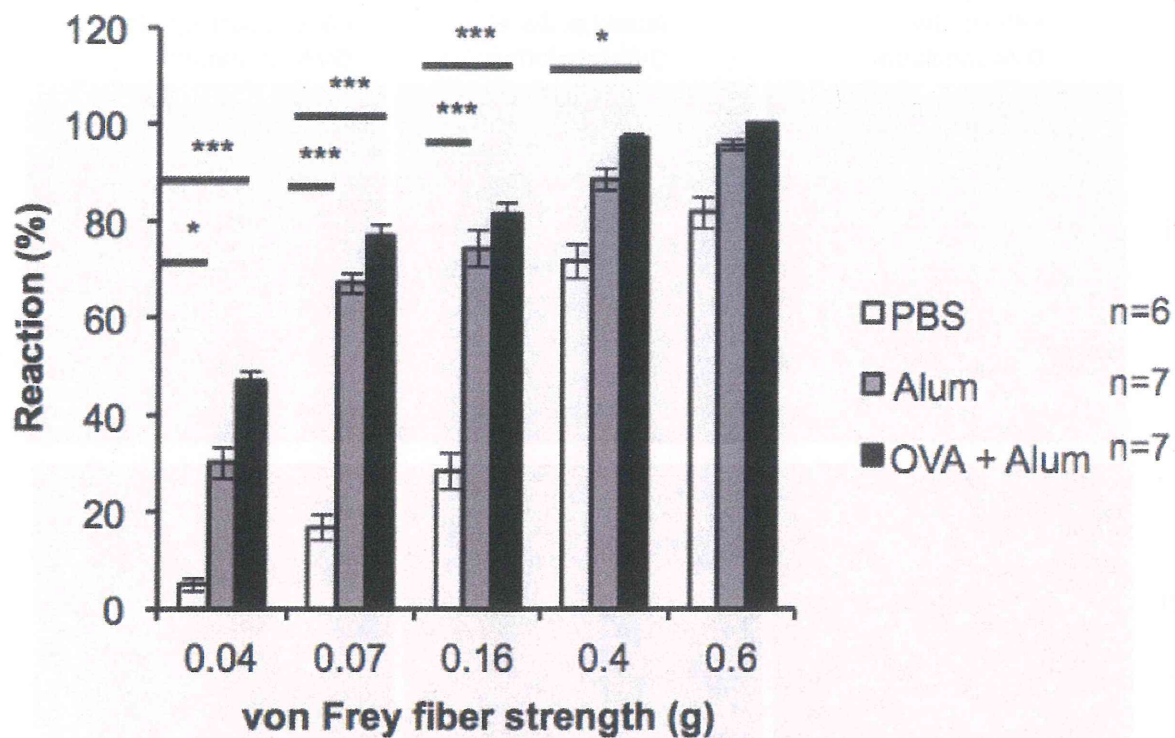


図1 気管支喘息モデルマウスにおける感覚過敏症。OVA+Alum群では、通常の反応閾値(0.16g)以下の強度で刺激した際の反応率亢進がみられる。

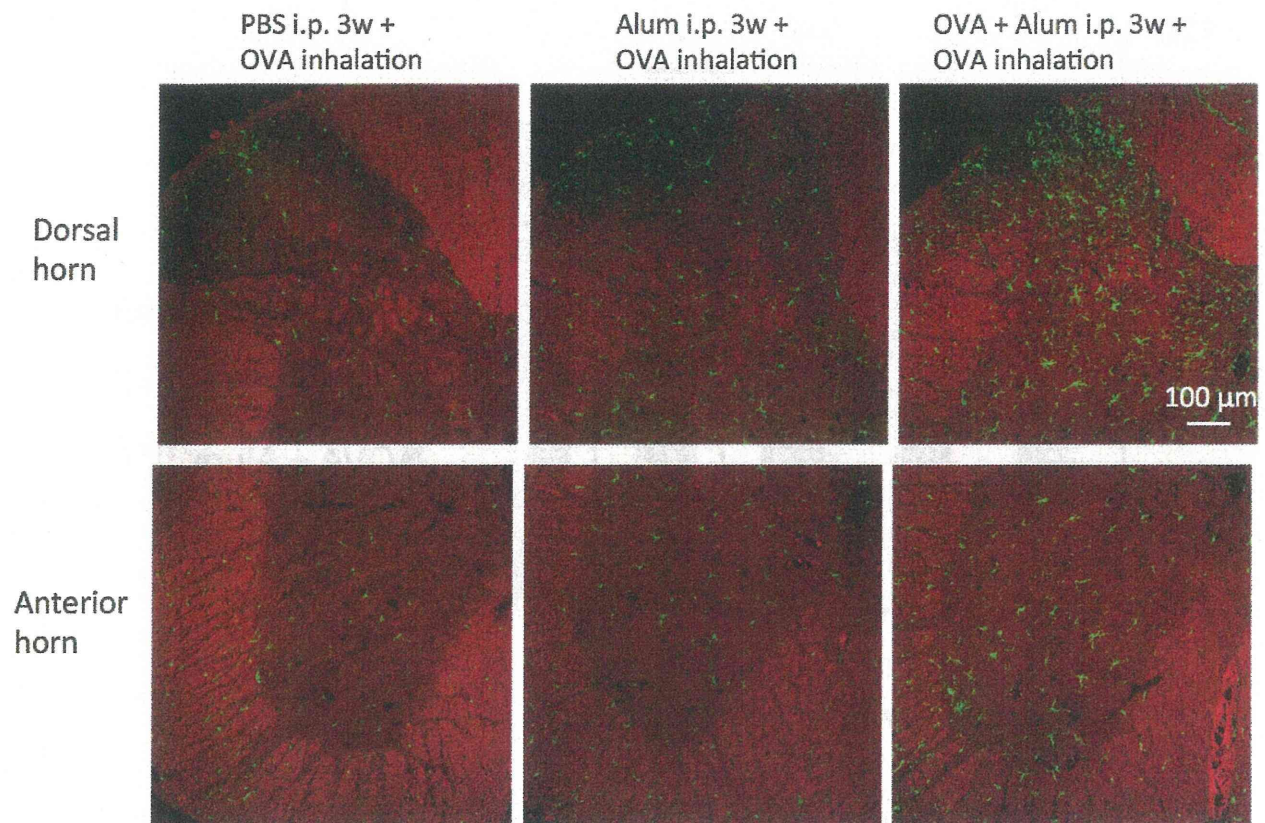


図2 気管支喘息モデルマウス頸髄のミクログリア活性化
赤: 髄鞘染色、緑: ミクログリア。OVA+Alum群で、頸髄後角におけるミクログリアの活性化がみられる

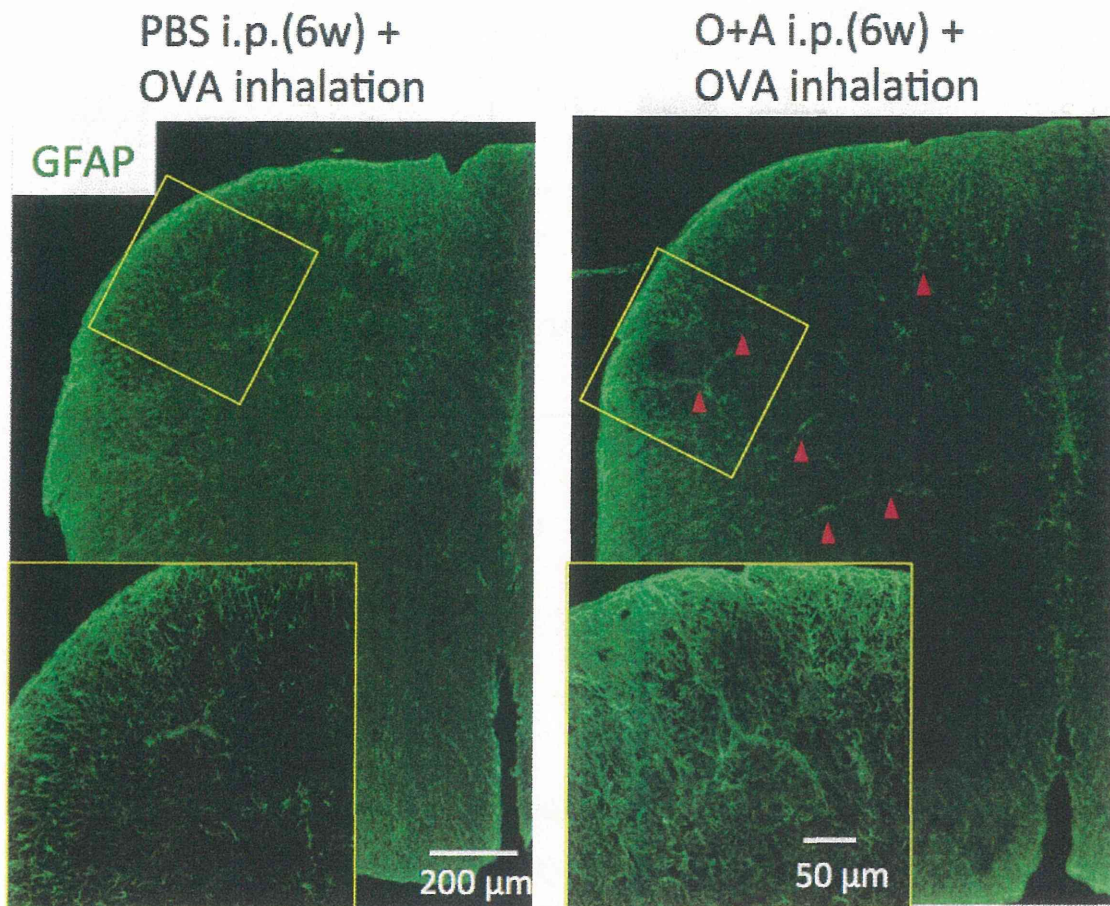
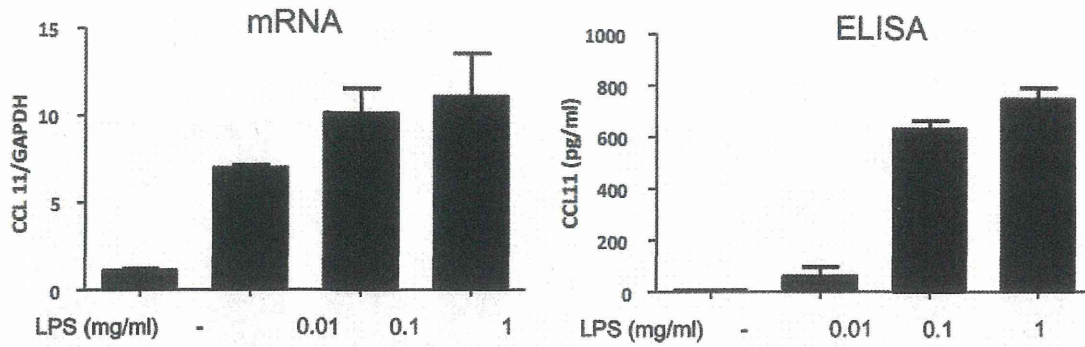


図3 気管支喘息モデルマウス頸髄のアストロサイト活性化
OVA+Alum群で、頸髄後角における血管周囲アストロサイトの
活性化がみられる。



Astrocytes

Microglia

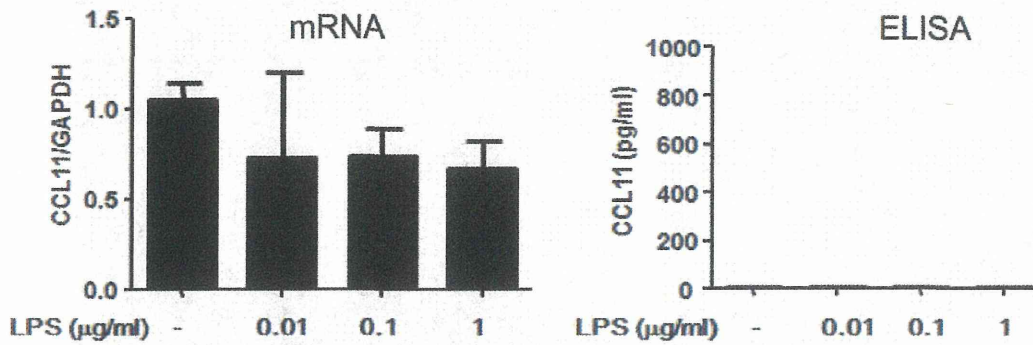


図4 培養アストロサイト・ミクログリアによるCCL11発現解析。アストロサイトは、LPS刺激に対し用量依存的にCCL11の発現亢進がみられるが、ミクログリアはほとんど発現していない。

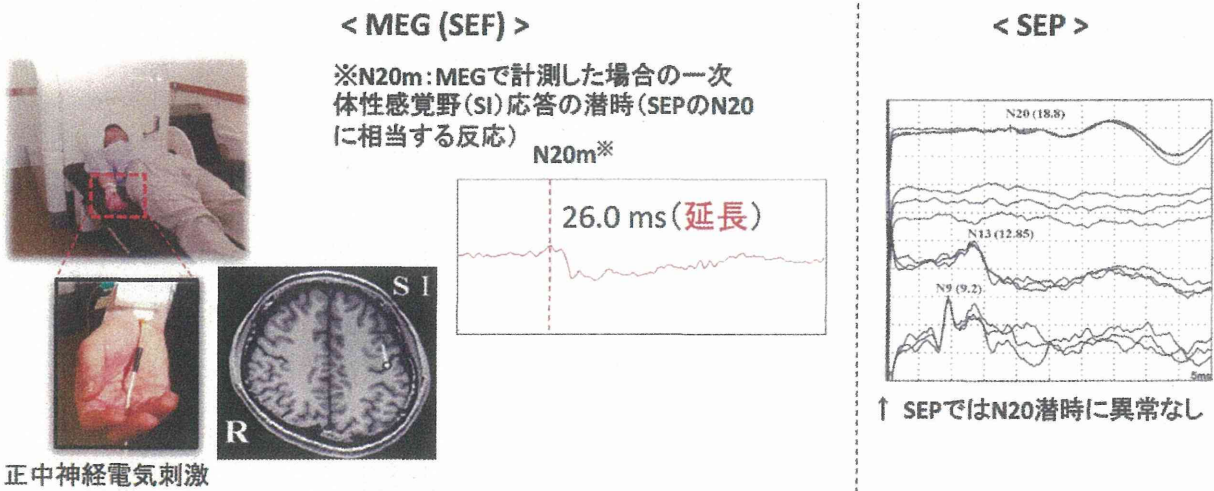


図5 アトピー性脊髄炎患者における感覚障害の電気生理学的検査。従来のSEPでは検出できなかった感覚障害を、MEGにて定量的に評価できた。

