

# プロテオーム解析を用いた免疫性神経疾患患者血清中の自己抗体の検索および免疫性神経疾患の医療費分析について

分担研究者 荻野美恵子 北里大学医学部 神経内科学

共同研究者 南 尚<sup>2)</sup>、長塩 亮<sup>2,3)</sup>、金澤直美<sup>1)</sup>、入江幸子<sup>1)</sup>、佐藤雄一<sup>2,3)</sup>

## 研究要旨

プロテオーム解析の手法を用いて、新規自己抗体の検索を行った。平成23年度は急性自律性感覚性運動性ニューロパチー(AASMN)を対象に行いAASMN患者群のみで反応を示す蛋白質スポットが15個検出され、7スポットについて蛋白質を同定し、Collapsin response-mediator protein (CRMP)-5など抗神経細胞抗体の標的抗原が含まれていた。平成24年度はギラン・バレー症候群/Fisher症候群の患者血清中の自己抗体を検出し、免疫標的抗原の同定を試みた。その結果、急性期のGBS/FS患者血清では、MS、NC群に比し、Annexin A1、Protein SETに対する自己抗体が有意に上昇していた。同様の手法を用いて症例数を増やすことにより新規抗原が同定できる可能性がある。

また、免疫性神経疾患は比較的高額治療を施行するため、医療費の自己負担やDPCにおける問題点につき検討した。CIDPのIVI g療法にはDPCにおける在院日数に影響を与えている可能性が示唆された。また、長期間におよび治療継続している症例も多く、生涯医療費を考えた上で公平な制度改革が望まれた。平成25年度は4月施行の障害者総合支援法にて難病が障害者として認められるようになり、「難病の患者に対する医療等に関する法律案」が検討されている。制度改革後の医療費自己負担について神経免疫疾患への影響を考察した。

### 1) 自己抗体の検索

【研究目的】 抗体が関与していることが推測される免疫性神経疾患においては、特定の自己抗体が明らかになれば診断のみならず病態や病勢を理解する一助となりうる。これまで以上に鋭敏に標的蛋白抗原を感知できるプロテオーム解析の手法を用い、AASMNおよびGBS/FSについて検索を試みた。

【対象および研究方法】 AASMN2例の患者血清およびGBS/FS8例急性期(AP)および回復期(RP)の血清を用いた。神経蛋白抗原として、ヒト Neuroblastoma 由来細胞株(SK-N-SH、LA1-5s)、ヒト Schwannoma 由来細胞株(YST-1、HS-Sch-2)の4細胞株から可溶性蛋白質を抽出し、アガロース二次元電気泳動法で分離し、血清を一次抗体に用いた免疫ブロット法を行い、血清中のIgG自己抗体を検出した。メンブレン上での自己抗体の反応を比較し、GBS/FS患者血清のみに認められた反応についてMALDI-TOF/TOF MSにより抗原蛋白質を同定した。さらに同定した膜蛋白について合成蛋白を

作製し、自己抗体の検出を試みた。得られたシグナル値は統計学的に解析を行った(Mann-Whitney U test ;  $P < 0.05$ )

【研究結果】 AASMN血清群のみで反応する7蛋白を同定したが、HSPA4、NEFLは炎症性疾患に多く認められる自己抗体の標的抗原であり、二次的な炎症反応を反映していると考えられた。CRMP-5は傍腫瘍性神経症候群で認められるため、神経障害に関与している可能性はあるが、AASMNの病態との関連を直接説明でき得るものではなかった。

GBS/FS患者血清群のみで自己抗体が反応を示す40スポット(39種類)の抗原蛋白質を同定した。GBS/FSのAPのみでみられた6種類の膜蛋白質(AnnexinA1, ProteinSET, Pronibitin, AnnexinA2, Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like, NAD(P)H dehydrogenase[quinone]1)を標的抗原の候補として、蛋白質合成を合成し、多数例の血清を用いてDot Blot解析を行ったところ、APのGBS/FS患者血清では、MS、NC群に比

1) 北里大学医学部神経内科学

2) 北里大学医療系研究科応用腫瘍病理学

3) 北里大学医療衛生学部臨床検査学

し、Annexin A1、Protein SET に対する自己抗体（の存在量）が有意に上昇していたが、RP とは有意差を認めなかった。他の4種類の自己抗体は、疾患群間で有意な差を認めなかった。

【考案】 Annexin A1、Protein SET はともに ホスホリパーゼ A2 の活性を阻害することで、抗炎症作用に関与することが報告されているが前者は、MS や SLE においても報告があることから、二次的な炎症を反映している可能性が考えられた。Protein SET 自己抗体の報告はなく、疾患特異性のさらなる評価が必要である。

【結論】 AASMN 血清中および GBS/FS 患者血清中の自己抗体の検出を試みた。抗 Annexin A1、抗 Protein SET 自己抗体はそれぞれ急性期の GBS/FS 患者血清中に多く含まれていた。

## 2) 免疫性神経疾患の医療費について

【研究目的】「難病の患者に対する医療等に関する法律案」について国会審議されているが、免疫性神経疾患の医療につきどのような特徴があり、今後の変化が予想されるかを検討した。

【対象および研究方法】「難治性疾患の医療費構造に関する研究班」にて平成 20 年～22 年に入手した支払基金・国保連合の全国レセプトデータをもとに分析を行った。

神経免疫疾患の中で疾患数が多く、高額治療を施行する可能性の高い多発性硬化症 (MS)、重症筋無力症 (MG)、慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (CIDP) を主な対象とした。

DPC において高額薬剤の使用が平均在院日数に影響を与えているのかにつき、全国レセプトデータから推測を試みた。さらに、ヒストグラム、高額となる内容、経年変化、医療機関の集中などを検討した。

また、現行制度から第 35 回難病対策委員会厚労省提出案 (表 1) に変わった場合の自己負担額の変化の分布を分析した。

表 1 第35回 原則

階層区分	年収の目安	一般	高額かつ長期	人工呼吸器等 装着者
低所得Ⅰ	～80万円	2500円	2500円	1000円
低所得Ⅱ	80～160万円	5000円	5000円	1000円
一般所得Ⅰ	160～370万円	10000円	5000円	1000円
一般所得Ⅱ	370～810万円	20000円	10000円	1000円
一定所得以上	810万円～	30000円	20000円	1000円

※「高額かつ長期」は月ごとの医療費総額が5万円を超える月が年間6回以上あるもの

【研究結果】 DPC において CIDP の IVIg 施行例の在院日数は 2 峰性を示し、損益分岐点まで入院させている例があることが示唆された。

特定疾患治療研究事業において MS および MG は件数的にも医療費的にも大きな割合を占めており、1 レセプト当たりの医療費も他の特定疾患に比較して高額である。

MS を例として医療費を詳細に調べると年齢階級別データでは年齢層によらずほぼ同額で、最も医療費がかかっているのは在宅 74.8% でありインターフェロン自己注射が大部分を占めることが推測された。また、都道府県間で差があった。

新制度の医療費自己負担は MS76.9%、MG80.5%、CIDP80.9% が負担増と予想され、特に区分 F,G で高額となる患者が多い。他には ALS64.1%、PD86.6%、56 疾患全体では、81.2% が負担増と推測された。

## 【考案】

本研究は階層分類や所得などレセプトデータからの推計で分析せざるを得ない点で限界がある。今後ナショナルデータベースでの検討が必要である。今後重症度分類での認定が予定されているが、これまでのレセプトデータでは抽出困難であり、医療費に与える影響予測は困難となると考える。

【結論】 制度改訂がどのような影響をおよぼすかを予測した上での検討が望まれる。

## 【文献】

荻野美恵子：医療経済学的視点からみた多発性硬化症治療の課題，多発性硬化症と視神経脊髄炎，吉良潤一編、中山書店、東京、2012、P291-301

## （倫理面への配慮）

本研究は北里大学の倫理規定を遵守し、倫理委員会の承認をえて行った。データは匿名化して提供され、個人を特定できる情報は含まれていない。

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

MMN と ALS におけるサイトカインプロファイル  
研究分担者：所属施設 徳島大学病院神経内科  
氏名：梶 龍兒

## 1. 研究目的

多巣性運動ニューロパチー (multifocal motor neuropathy:MMN) においては、GM1 などのガングリオシド抗体が検出されることや免疫グロブリン大量静注療法が有効なケースが存在することより、免疫学的機序が推定されている。しかし、その詳細は未だ不明であり、サイトカインに関してもほとんど報告がない。また、MMN は治療可能な疾患であるにもかかわらず、筋線維束攣縮があることや感覚症状の欠落により、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) と誤診されることがある。我々はサイトカインと MMN の病態の関連性を ALS と比較して検討するため、MMN と ALS 患者における血清ならびに髄液のサイトカイン・ケモカインを解析した。

## 2. 研究方法

血清と髄液について、対照群、疾患群 (MMN、ALS) のサイトカイン・プロファイルを比較した。

血清について、疾患群は改訂 EFNS/PNS 診断基準を満たす MMN 16 例と改訂 El Escorial 診断基準を満たす ALS 16 例を登録した (MMN 群は年齢  $43.0 \pm 15.3$  歳、男女比 14:2、罹病期間  $4.1 \pm 3.05$  年。ALS 群は年齢  $58.5 \pm 9.6$  歳、男女比 11:5、罹病期間  $1.1 \pm 0.8$  年)。疾患対照として 15 例を登録した (年齢  $34.9 \pm 16.2$  歳、男女比 7:8)。

髄液について、MMN12 例と ALS22 例、疾患対照 14 例を登録した (MMN 群は年齢  $44.3 \pm 15.0$  歳、罹病期間  $5.2 \pm 4.1$  年。ALS 群は年齢  $64.3 \pm 8.0$  歳、罹病期間  $1.21 \pm 9.3$  年。疾患対照群の年齢は  $68.9 \pm 10.4$  歳)。

Bio-Plex suspension array system (Bio-Rad, San Francisco, CA) を用いて、3 群の血清中のサイトカイン・ケモカイン 27 種 (IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGFbasic, G-CSF, GM-CSF, IFN $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MIP1a, MIP1b, PDGFb, RANTES, VEGF, TNF- $\alpha$ ) を測定した。Soluble TNF receptor (TNFR1) は ELISA キット (Cosmo Bio BMS03) を用いて測定した。統計解析は Kruskal-Wallis test および Dunn's Multiple Comparison Test によった。

(倫理面への配慮)

徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会において、本研究 (『免疫介在性ニューロパチーの病態解明に向けた研究』) の承認を取得している。

## 2. 研究結果および考察

### 2.1 MMN 患者のプロファイル

血清では MMN 患者は疾患対照と比較し、IL-1ra、IL-2、G-CSF、TNF- $\alpha$ 、TNFR1 が有意に増加していた。また ALS 群と比較しても、IL-1ra、G-CSF、TNF- $\alpha$  が有意に増加していた。

髄液では MMN 患者は疾患対照と比較し、IL-1ra のみが有意に増加していた。ALS と比較すると有意に増加しているものはなかった。

### 2.1 ALS 患者のプロファイル

血清では ALS 患者は疾患対照と比較し、IL-1ra が増加していた。

髄液では ALS 患者は疾患対照と比較し、IL-1ra、IL-4、IL-7、IL-12、Eotaxin、PDGF bb、RANTES が有意に増加していた。

血清では ALS 患者のサイトカインやケモカインの変動は乏しく、一方髄液では MMN 患者のサイトカインやケモカインの変動は乏しいことより、両者の鑑別に有用な補助検査となる可能性がある。MMN と ALS 患者ともに血清で IL-1ra が上昇していることより、両者に共通する免疫応答が存在する可能性がある。また TNF- $\alpha$  はギランバレー症候群 (AIDP) 患者の血清で上昇することが報告されている。MMN 患者の血清では Th1/Th2 関連のサイトカインに変化はなく、TNF- $\alpha$  は脱髄の影響で上昇している可能性もあるが、そのレセプターでもある TNFR1 が増加していることより、TNF- $\alpha$  が局所病変に関係している可能性がある。TNF- $\alpha$  は活性化マクロファージを含む様々な細胞から産生される。MMN では IVIg によって

改善が得られる事が多いが、そのメカニズムとして炎症性サイトカインの抑制やマクロファージ上の受容体抑制効果などがあると推察する。

### 4. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

MMN についてはサイトカイン・ケモカインプロファイルの報告はなく、今回 MMN の病態に関する新たな知見が得られた。TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインに変化を認めており、新たな治療方法への展開に発展する可能性もある。

### 5. 今後の展望

MMN と ALS 患者の血清プロファイルの結果については、臨床像の解析を追加し、現在論文投稿中である。髄液のプロファイルについてはサンプル数を増やした上で、論文投稿を行う予定である。

### 6. 結論

MMN 患者の血清では、IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  が有意に上昇していた。髄液では ALS についてサイトカイン・プロファイルで有意差を多く認め、鑑別に有用である可能性があった。

## 7. 研究発表

### 1) 国内

- ポスター発表 (0) 件  
口頭発表 (3) 件  
原著論文による発表 (3) 件  
それ以外 (レビュー等) による発表 (0) 件

### そのうち主なもの

#### 論文発表

1. 松井尚子:  
多巣性運動ニューロパチー:疫学と治療の実態  
臨床神経学 2012;52(11):920-922.
2. 松井尚子、宮城愛、梶龍児:  
多巣性運動ニューロパチー(MMN)の疫学・病態と治療  
日本臨床 2013;71(5):861-864.
3. 松井尚子、梶龍児:  
特集:末梢神経診療 Update  
MMN:疫学と治療の実態  
BRAIN MEDICAL 2013;25(3):45-48.

#### 学会発表

1. 松井尚子  
免疫性末梢神経障害 Update  
多巣性運動ニューロパチー:疫学と治療の実態  
第 53 回日本神経学会学術大会(シンポジウム),  
東京, 2012
2. 梶龍児  
多巣性運動ニューロパチーの病態・疫学と治療  
第 23 回日本末梢神経学会(イブニングセミナー),  
博多, 2012
3. 古川貴大、松井尚子、藤田浩司、和泉唯信、  
清水文崇、宮本勝一、高橋幸利、神田隆、楠進  
梶龍児:  
MMN および ALS におけるサイトカイン・  
プロフィール  
第 24 回日本神経免疫学会(ワークショップ), 軽井沢,  
2012

### 2) 海外

- ポスター発表 (0) 件  
口頭発表 (0) 件  
原著論文による発表 (4) 件  
それ以外 (レビュー等) による発表 (0) 件

### そのうち主なもの

#### 論文発表

1. Furukawa T, Nodera H, Shimatani Y, Watanabe O, Miyashiro A, Mori A, Matsui N, Nishida Y, Izumi Y, Kaji R.  
Hyperexcitability as a potential cause for diffuse lower motor neuron loss in Isaacs's syndrome.  
Neurology and Clinical Neuroscience, 2013; 1(4): 179-181.
2. Shimizu F, Omoto M, Sano Y, Matsui N, Miyashiro A, Tasaki A, Maeda T, Koga M, Kaji R, Kanda T.  
Sera from patients with multifocal motor neuropathy disrupt the blood-nerve barrier.  
J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2013
3. Matsui N, Miyashiro A, Shimatani Y, Nodera H, Izumi Y, Kuwabara S, Baba M, Komori T, Sonoo M, Mezaki T, Kawamata J, Hitomi T, Imai T, Kohara N, Arimura K, Arisawa K, Kusunoki S, Kaji R.  
Diagnostic spectrum of multifocal motor neuropathy.  
Clinical and Experimental Neuroimmunology, 2013; 4(2): 210-215.
4. Miyashiro A, Matsui N Shimatani Y, Nodera H, Izumi Y, Kuwabara S, Baba M, Komori T, Sonoo M, Mezaki T, Kawamata J, Hitomi T, Imai T, Kohara N, Arimura K, Hashimoto S, Arisawa K, Kusunoki S, Kaji R.  
Are multifocal motor neuropathy patients underdiagnosed? An epidemiological survey in Japan.  
Muscle Nerve, in press

#### 学会発表

特になし

## 8. 知的所有権の出願・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

重症筋無力症の病態解明：過形成胸腺ではハッサル小体が増加している

研究分担者：所属施設 徳島大学病院神経内科

氏名：梶 龍児

## 1. 研究目的

重症筋無力症 (Myasthenia Gravis, MG) 患者の胸腺内では、自己のアセチルコリン受容体様構造に反応する T 細胞の排除や制御の確立に問題があると考えられているが、その病態は不明である。なかでも胸腺の髄質では、自己反応性 T 細胞の負の選択による除去と、制御性 T 細胞 (regulatory T cells, Treg) の産生という少なくとも 2 つの点において、自己寛容の成立に重要な役割を担っている。MG 患者の胸腺内 Treg の産生は減少していないことをこれまでに報告した。そこで、MG の病態を考える上で、髄質の構成成分のひとつであるハッサル小体に注目した。

## 2. 研究方法

当施設および他施設にて胸腺摘出術を施行された MG 非合併 24 例 (小児胸腺、成人正常胸腺、成人胸腺腫) と MG 合併 25 例 (正常胸腺、過形成、胸腺腫) を対象とした。胸腺腫群については非腫瘍部分を解析に用いた。これらの胸腺から得た凍結組織切片について CD4、CD8 に加え、involucrin に対する抗体を用いた免疫染色の後、共焦点レーザー顕微鏡にて多重蛍光解析を行った。Involucrin 陽性細胞をハッサル小体として、1 髄質の大きさとその中にあるハッサル小体の数を ImageJ を用いて定量化した。またハッサル小体の周囲を ImageJ でトレースし、面積を測定した。さら

に、HE 染色、Involucrin/Ki-67 の免疫染色にて、ハッサル小体の形態的变化について観察した。

次に、RT-PCR により、胸腺組織の mRNA 発現量 (CCL19、CCL21、CHRNA1) を測定した。また CCL21 の発現部位を確認するため、CCL21/K14 の免疫染色を追加した。

(倫理面への配慮) 徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会において、本研究 (『重症筋無力症患者胸腺におけるハッサル小体の役割』) の承認を取得している。

## 3. 研究結果および考察

1) 髄質内でのハッサル小体の数は小児に比べ成人で減少していたが、MG 非合併の成人胸腺に比べ、MG 合併の過形成胸腺ではハッサル小体の数が有意に増加していた。

2) ハッサル小体の大きさについては、各群の間に有意差は認められなかった。

3) HE 染色において、MG の有無に関係なく、一部のハッサル小体内部に石灰化を認めたが、MG 合併の過形成胸腺においては、ハッサル小体の辺縁部に石灰化を認める傾向にあり、上皮細胞の分化に変調をきたしている可能性が示唆された。

4) Ki-67 はいずれの群においても、ハッサル小体にはほとんど発現していなかった。

5) CCL21 の mRNA 発現量は、胸腺腫群を除く、

MG 合併の過形成胸腺で有意に上昇していた。

6) CCL21 のシグナルはハッサル小体を含む髄質領域に多く発現しており、MG 合併の過形成胸腺では、MG 非合併の胸腺に比べ顕著であった。

ハッサル小体は髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cells, mTEC) の最終分化を反映する。また、CCL21 は mTEC に発現し、胸腺細胞の誘導に関与することが知られている。過形成胸腺では CCL21 が亢進し、高内皮静脈よりナイーブ B 細胞が誘導されることも報告されている。過形成胸腺では、何らかの理由で mTEC の最終分化が変調をきたし、CCL21 の発現が亢進することで、アセチルコリン受容体様構造に反応する自己反応性細胞の排除や制御に支障をきたしている可能性がある。

#### 4. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

今回のハッサル小体の解析により、mTEC の分化に何らかの変化がおこることで、MG の発症に関わっている可能性が推定された。ハッサル小体に関する研究は世界的にもまだ少ない。今後ハッサル小体を含む mTEC がどのように自己抗原を発現しているのか、さらに解析を進める必要がある。

#### 5. 今後の展望

本研究内容については論文が掲載予定となっている (Matsui N, et al. J Neuroimmunol. in press)。また国内のみならず国際学会で発表を行う予定である。

今後 mTEC の解析を行うことで、MG の病態解明が推進する可能性がある。

#### 6. 結論

MG 患者の過形成胸腺ではハッサル小体が増加していた

## 7. 研究発表

### 1) 国内

- ポスター発表 (1) 件
- 口頭発表 (2) 件
- 原著論文による発表 (2) 件
- それ以外 (レビュー等) による発表 (1) 件

### そのうち主なもの

#### 論文発表

1. 松井尚子、新田剛、高浜洋介：胸腺と免疫系形成:  
Brain and Nerve Vol.63 No.7,2011:679-684.
2. 宮城愛、梶龍児：脊髄炎の診断と治療 脊髄外科  
脳神経外科が識っておくべきエッセンシャル:  
メジカルビュー社 2011年5月10日第一版  
199-207.
3. 松井尚子、梶龍児：知っておきたい内科症候群  
ステイフパーソン(全身硬直)症候群:  
内科 2012:6:957-958.

#### 学会発表

1. 松井尚子、宮城愛、大東いずみ、野村芳子、  
高浜洋介、梶龍児：重症筋無力症患者胸腺における  
制御性T細胞とハッサル小体の役割。  
第52回日本神経学会学術大会(口演),名古屋,2011
2. 酒井和香、松井尚子、寺澤由佳、藤田浩司、佐藤  
健太、鎌田正紀、和泉唯信、梶龍児：  
50歳以上発症重症筋無力症における臨床像  
64歳迄 vs 65歳以上：  
第53回日本神経学会学術大会(ポスター),東京,2012
3. 松井尚子、大東いずみ、近藤和也、野村芳子  
梶龍児：重症筋無力症の過形成胸腺ではハッサル  
小体が増加している  
第24回日本神経免疫学会(シンポジウム),軽井沢,  
2012

### 2) 海外

- ポスター発表 (4) 件
- 口頭発表 (1) 件
- 原著論文による発表 (3) 件
- それ以外 (レビュー等) による発表 (0) 件

### そのうち主なもの

#### 論文発表

1. Nakane S, Fujita K, Shibuta Y, Matsui N,  
Harada M, Urushihara R, Nishida Y,  
Izumi Y, Kaji R.  
Successful treatment of stiff person

syndrome with sequential use of  
tacrolimus.

J Neurol Neurosurg Psychiatry

2013; 84(10):1177-1180.

2. Mitsui T, Kuroda Y, Ueno S, Matsui N, Kaji R.  
FK506 attenuates thymic output in patients with  
myasthenia gravis. Arch Med Sci 2013;  
30:9(6):1090-1096.
3. Matsui N, Ohigashi I, Tanaka K, Sakata M,  
Furukawa T, Nakagawa Y, Kondo K, Kitagawa T,  
Yamashita S, Nomura Y, Takahama Y, Kaji R.  
Increased number of Hassall's corpuscles in  
myasthenia gravis patients with thymic  
hyperplasia. Journal of Neuroimmunol, in press

#### 学会発表

1. Matsui N, Ohigashi I, Nomura Y, Takahama Y,  
Kaji R. Increased Hassall's corpuscles in thymic  
hyperplasia of myasthenia gravis patients.  
20<sup>th</sup> World Congress of Neurology,  
Marrakesh, Morocco, 2011
2. Matsui N, Ohigashi I, Kondo K, Nomura Y,  
Takahama Y, Kaji R. Increased Hassall's  
corpuscles in myasthenia gravis patients carrying  
thymic hyperplasia.  
11<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology,  
Boston, USA, 2012
3. Sakai W, Matsui N, Izumi Y, Kaji R. Clinical  
difference between myasthenia gravis patients  
with an onset age of 50-64 and over 65.  
European Federation of Neurological Societies,  
Stockholm, Sweden, 2012
4. Matsui N, Ohigashi I, Takahama Y. Increased  
Hassall's corpuscles in myasthenia gravis patients  
carrying thymic hyperplasia.  
41<sup>st</sup> Annual meeting of JNII, Kobe, Japan, 2012
5. Matsui N, Ohigashi I, Takahama Y, Kaji R.  
Increased Hassall's corpuscles in myasthenia  
gravis patients carrying thymic hyperplasia.  
Myasthenia 2013, Paris, France, 2013

## 8. 知的所有権の出願・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



分担研究者：所属施設 山口大学大学院医学系研究科神経内科学

氏名 神田 隆

## 1. 研究目的

(研究 1) Bickerstaff 型脳幹脳炎 (BBE) の本邦における実態把握と、脳幹脳炎の中での BBE の位置付けを明らかにする。

(研究 2) 視神経脊髄炎では抗アクアポリン 4 抗体が補体介在性にアストロサイトを傷害することが病態の本質であるが、一方で補体を介在しないアストロサイト機能障害の関与も注目されている。本研究では我々が樹立した AQP4 を強発現したヒトアストロサイト不死化細胞株 (hAST-AQP4) を用いて NMO 血清の AST への影響について細胞生物学的に検証した。

(研究 3) 多発性硬化症や視神経脊髄炎などの自己免疫性神経疾患では血液脳関門 (BBB) の破綻が発症、増悪の鍵となるエピソードである。本研究では我々が樹立したヒト BBB 由来血管内皮細胞株を用いて、多発性硬化症、視神経脊髄炎、ビッカースタッフ型脳幹脳炎、傍腫瘍性小脳変性症を合併した Lambert-Eaton 筋無力症候群患者血清が BBB を破綻させているか否かを検証し、その分子メカニズムを細胞生物学的見地から検証した。

## 2. 研究方法

(研究 1) 全国諸施設を対象に、過去三年間 (2006 年 10 月～2009 年 9 月) の脳幹脳炎患者数の症例数を問う調査票を郵送した。5 名の神経内科専門医 (古賀、楠、海田、郡山、神田) により協議・修正を重ねた上で、BBE の診断基準を作成した。推定 BBE 症例数と推定年間 BBE 発症数を算出するとともに、BBE 症例の臨床的特徴、および治療法の現状を調査した。

(研究 2) 我々が樹立した AQP4 M23 を強発現したヒトア

ストロサイト (AST) 不死化細胞株 (hAST-AQP4) を用いた。この細胞に NMO 患者血清を作用させ、AQP4 発現量の変化をウェスタンブロット法で解析し、XTT キットを用いて細胞傷害の程度を定量化した。

(研究 3) 我々が樹立したヒト BBB 構成内皮細胞株 (TY09) を用いた。当院、近畿大学神経内科、長崎大学神経内科で診断加療した患者血清を材料とした。(1) 臨床症状の増悪があり、頭部 MRI T1Gd で増強効果が確認できた急性期再発寛解型多発性硬化症 (RRMS) 5 例、IFN- $\beta$  で加療し 1 年以上再発がみられていない安定期 RRMS 6 例、IFN- $\beta$  で加療するも進行性経過で症状が増悪し、重症度スケール (EDSS) 4 以上となった 2 次進行型多発性硬化症 (SPMS) 6 例の血清を用いた。(2) 臨床症状の増悪がみられた急性期視神経脊髄炎 (NMO) 10 例、副腎皮質ステロイドで加療し 6 か月以上再発のみられていない安定期 NMO 5 例の血清を用いた。(3) ビッカースタッフ型脳幹脳炎 (BBE) 11 例と Miller Fisher 症候群 (MFS) 10 例の血清を用いた。(4) 抗 P/Q 型 VGCC 抗体陽性が確認された傍腫瘍性小脳変性症を合併した Lambert-Eaton 筋無力症候群 (PCD-LEMS) 患者 4 例と Lambert-Eaton 筋無力症候群 (LEMS 患者) 4 例の IgG を用いた。

## 3. 研究結果および考察

(研究 1) 独自に作成した診断基準を満たす BBE の発症数は全国で年間約 100 人と推計された。男性にやや多く (1.3:1)、30 歳代にピークがあり、BBE 以外の脳幹脳炎よりも若年発症であった。BBE の三主徴 (眼球運動障害、運動失調、意識障害) を除いた特徴は、四肢末梢の“しびれ (感)”での発症、口咽頭筋麻痺や腱反射

の低下・消失、四肢末梢での感覚障害、眼球運動における外転制限優位性であった。約 6 割の症例で発症後一週間以内に症状のピークを迎え、人工呼吸器管理を要したのは 2 割の症例であった。血中 IgG 抗 GQ1b 抗体の陽性率は 75%であった。治療として大部分の例において免疫グロブリン大量静注療法が行われ、発症 3 カ月後までに約 9 割の症例で良好な転帰をとっていた。

BBE 例の中でも「Definite BBE」とされた症例と比べ「Probable BBE」では、症状のピークまでの期間が比較的長い例が存在し、脳脊髄液蛋白の上昇・脳 MRI 異常の頻度が有意に高く、血中 IgG 抗 GQ1b 抗体の陽性率が低いなどの特徴があった。さらに Probable 例では、脳脊髄液の細胞数が中等度 (51/mm<sup>3</sup>) 以上に上昇している例が 13 例中 5 例 (38%) と比較的高頻度にみられた。一方、BBE の特徴として見出された神経徴候の多く (眼球運動制限の外転制限優位性、四肢末梢の“しびれ [感]、腱反射の低下・消失) は、Definite 例と比べ Probable 例ではみられにくい傾向にあった。

(研究 2) NMO 患者血清を hAST-AQP4 に作用させると AQP4 蛋白量は低下し、生細胞数は減少した。更に血清に併せて補体を添加すると更なる細胞死が惹起された。NMO 患者血清を作用させることで AST の TNF- $\alpha$  と IL-6 発現量が mRNA レベルで増加し、血清に併せて TNF- $\alpha$  と IL-6 に対する中和抗体を作用させることで AQP 蛋白量低下と細胞死がリバーシした

(研究 3) (1) 急性期 RRMS, SPMS 患者血清を用いた培養では TY10 の claudin-5 の発現、電気抵抗値が有意に低下したが、安定期 RRMS 患者血清を用いた培養では変化はなかった。(2) 急性期 NMO 患者血清を作用させると TY09 の claudin-5 の発現が低下し、電気抵抗値が低下したが、安定期 NMO 患者血清を作用させても変化がなかった。(3) BBE 患者血清を用いた培養では TY10 の claudin-5 の発現、電気抵抗値が低下したが、MFS 患者血清を用いた培養では効果がなかった。

(4) PCD-LEMS 患者からの精製 IgG を作用させると TY09 の claudin-5 蛋白量と電気抵抗値が濃度依存的

に低下したが、LEMS 患者からの IgG では効果はみられなかった。

#### 4. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

(研究 1) 本疫学調査の結果、本邦における BBE の年間発症数は約 100 名と推算された。2008 年の本邦の人口 (1 億 2770 万人) から単純に計算すれば、127 万人当たり一人が一年間で発症していることになる。この発症者数は、本邦での年間発症数が人口 10 万人あたり 1.15 人と推算されている GBS の約 1/15 に相当する数字である。男女比や発症年齢も GBS での調査結果と類似する結果が得られ、疫学調査からも BBE が GBS の類縁疾患であることが支持された。

脳幹脳炎の中でも BBE は三主徴 (眼球運動障害、運動失調、意識障害) に加え、四肢末梢の“しびれ (感)”での発症、口咽頭筋麻痺や腱反射の低下・消失、四肢末梢での感覚障害、眼球運動における外転制限優位性という特徴を有していた。さらに、症状のピークに至るまでの期間が短く、発症 3 カ月後までに約 9 割の症例で良好な転帰をとっていた。このような特徴は、特に IgG 抗 GQ1b 抗体陽性でかつ神経徴候が典型的な BBE (診断基準では「Definite BBE」に相当) で目立ち、一方で IgG 抗 GQ1b 抗体陰性例や臨床徴候が BBE として非典型的な例 (診断基準では「Probable BBE」に相当) においては、脳 MRI で異常所見がみられ、後遺症をきたしやすい傾向にあった。この結果は、「Definite BBE」とは異なる病因を有する症例が「Probable BBE」の中に一定の割合で含まれていることを強く示唆している。BBE 症例における IgG 抗 GQ1b 抗体陽性率は 75%であったが、残り 25%の症例で他の抗糖脂質抗体が検出される症例はごく少数であることが予想され、抗 GQ1b 抗体陰性 BBE の少なくとも半数程度は他の自己免疫性疾患 (神経 Behçet 病や急性散在性脳脊髄炎など) やウイルス性脳幹脳炎により BBE と類似する神経徴候を呈した症例である可能性が高いと考えられた。

(研究 2) 急性期 NMO 患者血清は補体非依存的に

ASTのAQP4の発現を低下させ、細胞傷害をきたすことが示された。血清によりASTから放出されるTNF- $\alpha$ とIL-6がAST傷害に関与している可能性が考えられた。(研究3)急性期RRMS/SPMS/急性期NMO/BBE/PCD-LEMS血清はBBBを破綻させたが、安定期RRMS/安定期NMO血清/MFS/LEMS/健常成人血清はBBB破綻を生じなかった。急性期RRMS/SPMS/急性期NMO/BBE/PCD-LEMSでは、BBB破綻が発症のトリガーとなり、かつそれぞれ疾患での臨床病型を規定する一因となっている可能性が考えられた。

- (1)特許取得  
なし
- (2)実用新案登録  
なし
- (3)その他  
なし

## 5. 今後の展望

(研究1)BBEの疫学的な背景が明らかとなり、病態の多様性も示されたことから、BBEに相応しい治療法が今後確立することが期待される。

(研究2)NMOでのAST細胞死の分子メカニズムを明らかとすることで、NMOに対する効率的な新規治療法開発につながる。

(研究3)MS, NMO, BBE, PCD-LEMSでのBBB破綻に重要な役割を果たす新規標的分子を同定することで、これらの疾患のBBBを標的とした新たな診断マーカーの確立や効率的な新規治療法の開発を目指す。

## 6. 結論

(研究1)BBEの診断基準を確立しBBEの疫学的な背景が明らかとなった。BBEは主として抗GQ1b抗体を伴う転帰良好な病態であるものの、一部は異なる病態により非典型的ながらBBEの臨床像をとり、予後不良例が含まれる疾患概念であることが明らかとなった。

(研究2)NMO患者血清が補体非依存的にAST細胞傷害をきたすことが示された。

(研究3)MS, NMO, BBE, PCD-LEMSではBBBの破綻が発症のトリガーとなり、臨床病型を規定する一因となりうることを示された。

## 8. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

## 7. 研究発表

### 1) 国内

口頭発表	27件
原著論文による発表	1件
それ以外（レビュー等）の発表	13件

そのうち主なもの

### 論文発表

- Maeda T, Sano Y, Abe M, Shimizu F, Kashiwamura Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Obinata M, Ueda M and Kanda T. 「Establishment and characterization of spinal cord microvascular endothelial cell lines」 Clin Exp Neuroimmunol (in press)

### 学会発表

- 古賀道明、楠 進、海田賢一、上原里程、中村好一、郡山達男、神田 隆「Bickerstaff型脳幹脳炎の全国疫学調査：脳幹脳炎の中での位置づけと臨床像・治療の現状」第53回日本神経学会学術大会。2012年5月22-15日、東京。
- 佐野泰照、大石真莉子、春木明代、清水文崇、安部真彰、前田敏彦、田崎彩子、神田 隆「血液脳関門を構成する内皮細胞がアストロサイトのAQP4蛋白発現に与える影響」第25回日本神経免疫学会学術集会。2013年11月27日、山口。
- Sano Y, Abe M, Shimizu F, Maeda T, Kashiwamura Y, Omoto M, Kawai M, and Kanda T「Novel human immortalized cell lines for the BBB/BNB research」第25回日本神経免疫学会学術集会。2013年11月28日、山口。
- 大石真莉子、佐野泰照、清水文崇、安部真彰、前田敏彦、田崎彩子、神田 隆「血液脳関門を構成する内皮細胞がアストロサイトのAQP4蛋白発現に与える影響の検討」第54回日本神経学会学術大会。2013年5月31日、東京。

### 2) 海外

口頭発表	4件
原著論文による発表	10件
それ以外（レビュー等）の発表	1件

そのうち主なもの

### 論文発表

- Koga M, Kusunoki S, Kaida K, Uehara R, Nakamura Y, Kohriyama T, Kanda T. Nationwide survey of patients in Japan with Bickerstaff brainstem encephalitis: epidemiological and clinical

characteristics. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2012; 83: 1210-1215.

- Koga M, Gilbert M, Takahashi M, Li J, Hirata K, Kanda T, Yuki N. GQ1b-seronegative Fisher syndrome: Clinical features and new serological markers. J Neurol 2012; 252: 1366-1374
- Shimizu F, Sano Y, Takahashi T, Haruki H, Saito K, Koga M, Kanda T. Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2012; 83: 288-297.
- Saito K, Shimizu F, Koga M, Sano Y, Abe M, Tasaki A, Maeda T, Haruki H, Suzuki S, Kusunoki S, Mizusawa H, Kanda T. Blood-brain barrier destruction determines Fisher/Bickerstaff clinical phenotypes: An in vitro study. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2013; 84: 756-765.
- Haruki H, Sano Y, Shimizu F, Omoto M, Tasaki A, Oishi M, Koga M, Saito K, Takahashi T, Nakada T, Kanda T. NMO sera down-regulate AQP4 in human astrocyte and induce cytotoxicity independent of complement. J Neurol Sci 2013; 331: 136-144.
- Shimizu F, Omoto M, Sano Y, Tasaki A, Matsui N, Miyashiro A, Koga M, Kaji R, Kanda T. Sera from multifocal motor neuropathy patients disrupt the blood-nerve barrier. J Neurol Neurosurg Psychiatry (in press)
- Tasaki A, Shimizu F, Sano Y, Fujisawa M, Takahashi T, Haruki H, Abe M, Koga M, Kanda T. Autocrine MMP-2/9 secretion increases the BBB permeability in neuromyelitis optica. J Neurol Neurosurg Psychiatry (in press)

### 学会発表

- Shimizu F, Sano Y, Takahashi T, Haruki H, and Kanda T. Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier.ECTRIMS, Amsterdam 21-23, Oct, 2011.
- Shimizu F, Sano Y, Haruki H, and Kanda T. The effect of advanced glycation end-products on blood-brain barrier. New Orleans, Neuroscience 13 Oct 2012.
- Koga M, Kanda T, Yuki N: GQ1b-seronegative Fisher syndrome: serological study. Biennial Meeting of the Peripheral Nerve Society, Potomac, Maryland, USA. June 25-29, 2011
- Haruki H, Sano Y, Shimizu F, Omoto M, Tasaki A, Oishi M, Koga M, Fukusako T, Kanda T. NMO sera down-regulate the expression of AQP4 in human astrocyte and induce cytotoxicity independent of complement. Neuroscience 2013 Nov.12, 2013 San Diego, USA

## 1. 研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)や視神経脊髄炎(neuromyelitis optica: NMO)をはじめとする脱髄性疾患の根本的な原因は未だ不明で、脱髄を来す機序も解明されていない。本研究では、分子遺伝学、臨床疫学、神経免疫学、神経放射線、神経病理学など多岐に渡る手法を用い、MS や NMO の病態を検討する。

## 2. 研究方法

### 【分子遺伝学・臨床疫学】

日本人 MS に影響する疾患感受性・抵抗性因子を、遺伝学的背景と環境中の普遍的な感染症の検索から調査した。*HLA-DRB1* および *DPB1* アリルを PCR-SSOP 法により決定した。また、ヘリコバクター・ピロリ、肺炎クラミジア、水痘帯状疱疹ウイルス、EB ウイルスに対する IgG 抗体を ELISA 法で測定した。また、MS および NMO の日本人コホートにおいて、全ゲノム領域を対象とした copy number variation (CNV) 相関解析を実施し、疾患関連 CNV を検討した。

### 【神経免疫学】

私たちは中枢と末梢の脱髄を来す疾患である Combined central and peripheral demyelination (CCPD) 患者における抗 neurofascin 抗体の存在を同定しており、その陽性率や臨床的特徴を検討した。

### 【神経放射線】

NMO/NMO spectrum disorder における脊髄長大病変 (Longitudinally Extensive Spinal

Cord Lesion: LESCL) を 3tesla MRI を用い、軸位断における病巣分布・特徴を詳細に解析した。

### 【神経病理学】

脱髄性疾患におけるコネキシン蛋白 (グリア細胞間でギャップ結合を形成する主要蛋白) の発現を病理学的に検討した。さらに、グリア細胞を介した軸索までの栄養供給に重要なグルコース・乳酸トランスポーターである GLUT や MCT の発現についても病理学的に検討した。

## 3. 研究結果および考察

### 【分子遺伝学・臨床疫学】

日本人脱髄性疾患では、疾患表現型に関わらず *DRB1\*0901* が共通の抵抗性遺伝子である一方、感受性遺伝子は表現型により異なっていた。MS では *DRB1\*0405* が感受性遺伝子となっており、その保有者は発症年齢が若く、軽症例が多かった。他方、*HLA-DRB1\*0405* を有さない MS 患者は、*DRB1\*1501* が感受性遺伝子で、EB ウイルス感染率が高く、典型的な脳病巣を有するなど欧米白人の MS と共通する特徴を示した。また、ヘリコバクター・ピロリや肺炎クラミジアなどの細菌は抗 AQP4 抗体陽性の NMO でのみ感受性因子となっていた。

CNV については、MS と NMO/NMOSD に共通して、T 細胞受容体(T cell receptor: TCR) $\alpha$  鎖の遺伝子領域に相関の強い欠失型 CNV を同定し、加えて MS においては TCR $\gamma$  鎖の遺伝子領域にも相関の強い欠失型

CNV を同定した。さらに、NMO/NMOSD では、上記 CNV を保有する亜群において、保有しない亜群と比較して血清抗アクアポリン 4(AQP4)抗体が陰性または有意に低力価を示し、Barkhof 基準を満たす脳病巣を有する割合が、当該 CNV を保有する亜群が保有しない亜群と比較して有意に多かった。以上から、特異的な TCR を保有する T 細胞が両疾患の病態に関わっていることが示唆された。

#### 【神経免疫学】

CCPD 患者血清中の抗 NF 抗体を測定したところ、ELISA 法では 7 例中 6 例(86%)、cell based assay では 7 例中 5 例(71%)で陽性であった。抗体陽性患者は血漿交換や IVIg が有効であった。Neurofascin は、ランヴェイエ絞輪および傍絞輪部に発現する蛋白であり、中枢・末梢神経ともに発現していることから、本抗体がミエリンと軸索との接合部を認識する事により中枢と末梢の脱髄を来した可能性が考えられた。また、抗体陽性患者に血漿交換や IVIg が奏功した事から、本抗体が病態の一端を担っている可能性が示唆された。

#### 【神経放射線】

灰白質病巣の分布は、抗 AQP4 抗体陽性例で前角 7/15 例 (46.6%)、中心灰白質 9/15 例 (75.0%)、後角 12/15 例 (80.0%) であった。抗体陰性例では前角 5/16 例 (31.3%)、中心灰白質 9/16 例 (56.3%)、後角 13/16 例 (81.3%) であった。白質病巣の分布は、抗体陽性例で前索 3/15 例 (20.0%)、側索 8/15

例 (53.3%)、後索 11/15 例 (73.3%) であった。抗体陰性例で前索 2/16 例 (12.5%)、側索 10/16 例 (62.5%)、後索 14/16 例 (87.5%) であった。LESCL は後方に好発する傾向にあった。また、軸位断での線形病巣は抗体陽性例で 4/15 例 (26.6%) で認め、抗体陰性例では認めなかった。脊髓の静脈は後方が太く豊富であるため、後方から炎症細胞が浸潤し、抗体陽性例では、AQP4 の豊富な灰白質や血管の走行に沿って線状に病巣が形成される可能性が示唆された。抗体陰性例では血管周囲から同心円状に炎症細胞が浸潤し、病巣が進展していく可能性が推察された。

#### 【神経病理学】

Baló 病では、Cx43 や Cx32、Cx47 は脱髄層、非脱髄層を含め広汎に発現低下が認められた。辺縁の早期病巣では MAG が先行する脱髄 (distal oligodendroglipathy 型) を認めたが、AQP4 や Cx43 も既に脱落していた。また、MS の急性期病巣でも AQP4 や Cx43 が脱落し、GFAP 陽性アストロサイトが残存する所見が認められた。NMO では、血管周囲性に抗体や沈着を伴い AQP4 や Cx43 が脱落するアストロサイトパチーを認めたが、一方で実質内に形成された急性期病巣では、distal oligodendroglipathy 型脱髄が認められた。脱髄性疾患では、AQP4 と Cx43 脱落を特徴とするアストロサイトパチーや、MAG 脱落を特徴とする脱髄が共通に生じており、Cx gap junction を介するグリア間

情報伝達の広汎な障害が病態に関与している可能性が示唆された。

GLUT や MCT については、MS 病巣では、炎症細胞浸潤が顕著な血管内皮細胞においても GLUT1 や MCT1 は比較的保たれていた一方、アストロサイトの MCT4 は発現の低下が認められた。GLUT3 は APP と同様に障害軸索で発現が亢進していた。アストロサイトを介した軸索までのエネルギー供給が障害されている可能性が示唆され、脱髄や軸索障害の形成や進展に寄与していることが推測された。

#### 4. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

今回の研究結果はいずれも新規性・独創性に富むものであり、MS や NMO の病態を考える上で重要な知見と思われる。多くの学会での受賞歴や口演発表など、国際的な評価も高い。現在国内外での共同研究も推進しており、MS 研究の発展に大きく貢献している。抗 neurofascin 抗体については学外施設から測定を受け入れており、診断補助としての社会貢献も行っている。

#### 5. 今後の展望

臨床疫学や遺伝学的研究は、国際共同研究でさらに推進していく予定である。また、神経病理学的に得られた知見を動物モデルや培養細胞実験など新たな手法を導入して詳細に検討し、病態解明や新規治療法開発を目指す。

#### 6. 結論

上記各々の研究から、脱髄性疾患における新たな疾患感受性因子や CNV の同定、抗 neurofascin 抗体の特徴、3 tesla MRI での脱髄病変分布の特徴、神経病理学的に脱髄病巣における広汎なコネクシン脱落や GLUT、MCT 発現変化など、多くの新知見を得ることができた。

#### 7. 研究発表

##### 1) 国内

口頭発表	50 件
原著論文による発表	1 件
それ以外（レビュー等）の発表	15 件
そのうち主なもの（5 件程度）	

##### 論文発表

- 1) 吉村怜、吉良潤一：  
多発性硬化症の疫学-全国臨床疫学調査からみえてきたもの. 医学のあゆみ 237: 284-290, 2011
- 2) 松下拓也、真崎勝久、鈴木諭、松岡健、米川智、呉曉牧、岩城徹、吉良潤一：視神経脊髄炎、多発性硬化症、Balo 病におけるアストロサイト障害の特徴. 臨床神経, 51: 898-900, 2011.
- 3) 真崎勝久:アストロサイトパチーと脳細胞間情報伝達機構の修復戦略. 臨床神経, 52: 1354-1356, 2012.
- 4) 松下拓也、吉村怜、小副川学、吉良潤一：第 4 回多発性硬化症全国臨床疫学調査による日本における多発性硬化症の治療実態の解析. 神経治療学 30: 67-70, 2013.
- 5) 佐藤眞也、吉良潤一：免疫性神経疾患の感受性因子と抵抗因子. 日本臨牀 71:

783-788, 2013.

学会発表

- 1) 松下拓也ら：視神経脊髄炎、多発性硬化症、Balo病におけるアストロサイト障害の特徴. 第52回日本神経学会学術大会, 2011.
- 2) 吉良潤一：多発性硬化症の大規模遺伝・環境因子が語る有病率増加の原因：発症増加を予防できるか. 第53回日本神経学会学術大会, 2012.
- 3) 真崎勝久：アストロサイトパチーと脳細胞間情報伝達機構の修復戦略. 第53回日本神経学会学術大会, 2012.
- 4) 佐藤眞也ら：視神経脊髄炎におけるT細胞受容体遺伝子のコピー数多型と表現型との関連. 第25回日本神経免疫学会学術集会, 2013.
- 5) 真崎勝久ら：脱髄性疾患におけるConnexin 43脱落は病態の急速な進行およびdistal oligodendrogliaopathy型脱髄と関連する. 第25回日本神経免疫学会学術集会, 2013.

2) 海外

口頭発表 30件

原著論文による発表 52件

それ以外（レビュー等）の発表 10件

そのうち主なもの（5件程度）

論文発表

- 1) Isobe N, Yonekawa T, Matsushita T, Kawano Y, Masaki K, Yoshimura S, Fichna J, Chen S, Furmaniak J, Smith BR, Kira J: Quantitative assays for anti-aquaporin-4 antibody with subclass analysis in neuromyelitis optica. *Multiple Sclerosis* 18:1541-1551, 2012.

- 2) Masaki K, Suzuki SO, Matsushita T, Yonekawa T, Matsuoka T, Isobe N, Motomura K, Wu XM, Tabira T, Iwaki T, Kira J: Extensive loss of connexins in Baló's disease: evidence for an auto-antibody-independent astrocytopathy via impaired astrocyte-oligodendrocyte/myelin interaction. *Acta Neuropathol* 123: 887-900, 2012.

- 3) Yoshimura S\*, Isobe N\*, Matsushita T, Yonekawa T, Masaki K, Sato S, Kawano Y, Kira J: Distinct genetic and infectious profiles in Japanese neuromyelitis optica patients according to anti-aquaporin-4 antibody status. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84: 29-34, 2013.

- 4) Kawamura N\*, Yamasaki R\*, Yonekawa T, Matsushita T, Kusunoki S, Nagayama S, Fukuda Y, Ogata H, Matsuse D, Murai H, Kira J: Anti-neurofascin antibody in patients with combined central and peripheral demyelination. *Neurology* 81: 714-722, 2013.

- 5) Masaki K, Suzuki SO, Matsushita T, Matsuoka T, Imamura S, Yamasaki R, Suzuki M, Suenaga T, Iwaki T, Kira J: Connexin 43 astrocytopathy linked to rapidly progressive multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *PLoS ONE* 8: e72919.

学会発表

- 1) Kira J: Nosology & Pathology of Opticospinal MS. *American Academy of Neurology* 2011.4.9~16 Hawaii.
- 2) Masaki K, Kira J: Molecular pathology of astrocytopathy in Baló's disease and



tumefactive MS. PACTRIMS 2012.9.13～  
15 北京.

- 3) Masaki K、Suzuki SO、Matsushita T、  
Matsuoka T、Suzuki M、Suenaga T、Tabira  
T、Iwaki T、Kira J: Early disruption of  
astrocytic connexins in multiple sclerosis,  
Baló's disease and neuromyelitis optica.  
ECTRIMS 2012.10.10～13 Lyon.
- 4) Kira J: Cutting Edges of MS & NMO.  
Keystone Symposium Multiple Sclerosis  
2013.1.11～16 USA.
- 5) Sato S: Genetic study of MS/NMO in  
Japan. PACTRIMS 2013 京都.
- 6) Masaki K: Rapidly progressive MS and  
gliopathy. PACTRIMS 2013 京都.

8 知的所有権の出願・取得状況（予定を  
含む

特記事項なし

3 その他

特記事項なし

## POEMS 症候群の新規治療：末梢血幹細胞移植とサリドマイド療法

分担研究分担者：所属施設 千葉大学大学院医学研究院神経内科学

氏名 桑原 聡

### 1. 研究目的

POEMS (クロウ・フカセ) 症候群は、形質細胞異常に伴い多発ニューロパチー・臓器腫大・内分泌異常・色素沈着・浮腫などの多彩な臨床症状を呈する全身性疾患である。当施設で取り組んでいる POEMS 症候群に対する新規治療である自己末梢血幹細胞移植を伴う高用量化学療法とサリドマイド療法の有効性・安全性について検討する。

### 2. 研究方法

#### (1) 対象

「65歳以下は移植療法、66歳以上あるいは臓器不全等により移植療法の適応にならない場合はサリドマイド療法を選択」という暫定的な方針を設定し、24例に移植療法、18例にサリドマイド療法 (サリドマイド+デキサメタゾンパルス) を行った。

#### (2) 方法

移植療法：末梢血幹細胞採取は G-CSF 単独またはシクロフォスファミド (4g/m<sup>2</sup>体表面積) 併用による前処置後に行った。自己末梢血幹細胞の前処置は、大量メルファラン投与 (140-200mg/m<sup>2</sup>体表面積) を行った。

サリドマイド療法：サイクルを 28 日間とし、サリドマイドは 200mg を day1-28 まで連日投与した。デキサメサゾン は 12mg/m<sup>2</sup> の大量投与を day1-4 に行った。

臨床症状・血清 VEGF 値の治療後の経時的推移を評価した。

#### 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倫理委員会および医学部附属病院の治験審査委員会の承認を得た。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。

### 3. 研究結果および考察

移植療法：1 例 (4%) の関連死を認めた。治療後、全例で臨床症状の改善及び血清 VEGF 値の減少を認めた。特に神経症状の改善は四肢麻痺の症例が歩行可能になるなど劇的であった。一方、5 年時点での無再発生存率は 60% であった。再発の無い群では、移植前になんらかの治療を行い、血清 VEGF 値が低い例が多かった。

サリドマイド療法：13 例 (57%) で VEGF 値は正常化、4 例で M 蛋白も陰性化し、TD 療法を中止または減量できた。うち 1 例は中止 21 ヶ月後に再発し、治療再開にて病勢をコントロールできた。4 例 (17%) では疾患の進行は抑制したものの、臨床症状の明確な改善・VEGF 値の減少とも得られなかった。6 例 (26%) では治療開始後も疾患は増悪し、全例死亡した。増悪例は治療開始前の重症度が高い傾向を認めた。サリドマイドニューロパチーの発現が 1 例に疑われた。

以上の結果より、移植療法・サリドマイド療法はいずれも POEMS 症候群に有効であると考えられた。しかし、移植後の再発抑制、サリドマイド非有効例への対策、サリドマイドの適応取得が今後の課題と考えられた。

サリドマイドの適応を骨髄腫から本症候群に拡大するための医師主導治験は、当施設が治験調整事務局となり既に実施中である。これまでの新規治療の試みにより得られたデータを元に、ランダム化プラセボ対照群間比較試験として企画し、間もなく終了予定である。

### 4. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

POEMS 症候群に対する新規治療の試みは米国・中国・フランス等において積極的に行われている。しかし、本研究のように、新規治療の

実績をランダム化群間比較試験へ発展させた例は皆無である。本症候群のような稀少疾患において、ランダム化比較試験を実現することは、今後のエビデンス構築に向けて大きな一歩となると考えている。

## 5. 今後の展望

本症候群の予後の改善を目標とした臨床研究・臨床試験を今後も継続的に行う。

本研究の現時点での課題である、移植後の再発抑制に関しては、移植前のサリドマイド療法による寛解導入の安全性と有効性に関する臨床試験を実施中である。また、非有効例への対策に関しては、早期診断による重症化の抑制をめざした啓発活動及び新規治療の探索を行っている。現時点での新規治療候補薬はレナリドミドである。

骨髄腫治療薬の進歩は目覚ましいものがあり、新規治療薬の本症候群への応用について、今後も検討を続ける。さらに、本症候群のレジストリシステムを構築し、自然歴の解明、臨床試験の効率化を目指す。最終的には、本邦発の診療ガイドラインの作成を目標とする。

## 6. 結論

POEMS 症候群において、移植療法、サリドマイド療法は有効である。稀少疾患においても、エビデンス構築を目標とした質の高い臨床研究が必要であり、今後もその実践を目標とする。

## 7. 研究発表

### (1) 国内

口頭発表	2 1 件
原著論文による発表	5 件
それ以外（レビュー等）による発表	8 件

そのうち主なもの

発表論文

1. 桑原聡： CIDP の電気生理学的特徴. 神経内科 2010;72:293-296.
2. 桑原聡： 難治性末梢神経障害の治療の進歩と展望：免疫性ニューロパチーと Crow-Fukase 症候群を中心に. 臨床神経 2010;50:219-224.

### (2) 海外

口頭発表	5 件
------	-----

原著論文による発表	1 7 件
それ以外（レビュー等）による発表	8 件

そのうち主なもの

発表論文

1. Kuwabara S, Yuki N. Axonal Guillain-Barré syndrome: concepts and controversies. *Lancet Neurol* 2013;12:1180-8.
2. Bae JS, Yuki N, Kuwabara S, Kim JK, Vucic S, Lin CS, Kiernan MC. Guillain-Barre syndrome in Asia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (in press).
3. Yonezu T, Ito S, Mori M, Ogawa Y, Makino T, Uzawa A, Kuwabara S. "Bright spotty lesions" on spinal magnetic resonance imaging differentiate neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Mult Scler* (in press)
4. Uzawa A, Mori M, Hayakawa S, Masuda S, Nomura F, Kuwabara S. Expression of chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *BMC Neurol* 2010;10:113.
5. Uzawa A, Mori M, Arai K, Sato Y, Hayakawa S, Masuda S, Taniguchi J, Kuwabara S. Cytokine and chemokine profiles in neuromyelitis optica: significance of interleukin-6. *Mult Scler* 2010;16:1443-52.
6. Uzawa A, Mori M, Ito S, Kuwabara S. Neurological picture. Isolated abducens and facial nerve palsies due to a facial collicular plaque in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011;82:85-6.

## 8. 知的所有権の出願・登録状況

特許取得・実用新案登録：なし

研究分担者：所属施設 信州大学医学部保健学科生体情報検査学講座  
氏名 高昌星

## 1. 研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)はヒトにおける中枢神経の脱髄疾患であり、その発症機序に中枢神経系の髄鞘に対する自己免疫が関与していると考えられているが、現在もなおその炎症抗原は不明である。MSでは自己免疫を誘導する因子は不明であるが何らかのウイルス感染がその引き金になっているものと考えられている。この観点より感受性マウスにMSに酷似した脱髄性病変を引き起こすタイラー脳脊髓炎ウイルス(Theiler' s murine encephalomyelitis virus: TMEV)による免疫性脱髄疾患の動物実験モデル(TMEV-induced demyelinating disease: TMEV)はMSの病因の解明及び治療の開発に非常に有用である。我々はこれまでの研究で、TMEV-IDDにはTh1及びTh17細胞が重要な役割を果たしていることを示してきた。我々はこのTMEV-IDDを用いてMSの新規治療候補となる薬剤を探索し、その抑制機構を検討してきた。

## 2. 研究方法

SJL/Jマウス雌6週齢の左大脳半球内にTMEV BeAn株を  $0.67 \times 10^6$  plaque forming unit (PFU) / $\mu$ l 接種し、TMEV-IDDマウスを作製した。TMEV-IDDの麻痺症状を6段階に分けてスコア化した。(0: 正常、1: 軽度の歩行障害、2: 中等度の歩行障害および後肢の麻痺、3: 重度の後肢麻痺、4: 重度の後肢麻痺および立ち直り反射の消失、5: 瀕死状態または死亡)

TMEV接種後41日目に各群のマウスから採取したCNSをすりつぶし、Percoll液によりリ

ンパ球、単球層を分離・回収し、Bürker-Turk計算盤にて細胞数を計測した。TMEV接種後41日目に各群のマウスからCNS浸潤細胞を回収し、TMEV抗原を用いて細胞を刺激した後、CD4, CD8, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-4, IL-10, IL-17を蛍光標識抗体にて常温・遮光条件で30分反応させた。その後、FACS Canto II Flow Cytometerを用いてCD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T細胞数、CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T細胞における炎症性サイトカイン産生細胞数を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は本学動物取り扱い規定に則り、動物愛護の観点から、苦痛を最小限にするため可能な限り麻酔等を用いて苦痛の除去に努めた。

## 3. 研究結果および考察

フマル酸ジメチル(DMF)投与群において、TMEV-IDDの臨床スコアが有意に抑制された( $p < 0.05$ ) (図1)。またDMF投与群において、CNS浸潤細胞数が有意に減少した( $p < 0.05$ ) (図2)。さらに、DMF投与により、CNS浸潤細胞中のIFN $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-17産生CD4<sup>+</sup>T細胞及び、IFN $\gamma$ 産生CD8<sup>+</sup>T細胞数が有意に減少した( $p < 0.05$ )。 $\alpha$ 4 integrin阻害薬HCA3551をTMEV-IDDに経口投与することにより、対照のMethocel投与群と比較して麻痺症状が有意に抑制された。組織学的解析では、脱髄が抑制された。

## 4. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

タイラー脳脊髓炎ウイルス (Theiler' s mu