

201419077A

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 26 年度 総括研究報告書

研究代表者 吉良 潤一

平成 27 (2015)年 5 月

目 次

I. 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.....1
吉良 潤一

II. 研究成果の刊行に関する一覧表.....12

III. 研究成果の刊行物・別冊.....13

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

星野 友昭 久留米大学内科学講座呼吸器神経膠原病内科部門（久留米大学）教授

城戸 瑞穂 九州大学大学院歯学研究院 分子口腔解剖学分野（九州大学）准教授

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治療学（九州大学）准教授

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

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 26 年度は、3 年計画の 3 年目として、前年度までに世界で初めて作成に成功したアトピー関連感覚過敏症（atopy-related allodynia, ARA）モデルマウスの病態解析と治療に成功した。マウス初代培養グリア細胞ではアストロサイトは疾患促進的に、ミクログリアは神経炎症を増悪させている可能性が示唆された。臨床的には、脊髄炎患者の 0.85%がアトピー素因を有し、そのうち 2 例がアトピー性脊髄炎の診断基準を満たしていた。実際の患者サンプルの病理学的・生化学的解析から、従来はアトピー素因との関連性が低いと考えられてきた神経炎症性疾患でも、アレルギー性の病態機序が関与している可能性が考えられた。本研究がさらに発展することで、従来見逃されてきた ARA を始めとするアトピー関連神経障害の診断および治療法開発がさらに進み、将来の障害者数減少や労働力の確保に貢献できると思われた。

A. 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

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。

本研究課題では、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神経障害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。さらに、本疾患患者でとくに多く (80%程度) 認められるアロディニアや神経障害性疼痛については MRI 画像などで異常を認めないことも多いので、患者自体が医療従事者に訴えていない可能性もあり、潜在的な患者は想定よりも多い可能性が高い。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。

平成 26 年度は、平成 24, 25 年度に世界で初めて作成に成功したアトピー関連アロディニアモデルマウスの解析をさらに進めた。また、分担研究者らは、マウス初代培養系におけるグリア細胞のサイトカイン発現解析、アトピー性脊髄炎患者における脳磁図を用いた脳機能解析、アレルギー疾患患者における脊髄炎の有病率検討、アトピー性脊髄炎剖検組織の病理学的解析、平山病患者血清中のアレルギー関連サイトカインレベル解析、気管支喘息患者における炎症性サイトカインと神経障害との関連性解析などを行い、疾患の病態生理

解明および治療法開発を目的として研究を行った。

B. 研究方法

(1) アトピー性脊髄炎モデルマウスの作成と解析 (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 μ g + Alum 2 mg の腹腔内注射を行い 3 週後に OVA 100 μ g 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。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。さらに、これらのマウスからミクログリアを単離し、RNA マイクロアレイアッセイを行い疾患モデルマウスミクログリアで発現修飾されている遺伝子の探索と病理学的解析、ミノマイシンやブロムワレリル尿素を用いたグリア細胞の機能抑制による治療を試みた。

(2) アトピー関連サイトカインの中枢神経系での作用 (錫村、吉良)

C57BL/6 新生仔由来の混合グリア細胞培養より、ミクログリア・アストロサイトを分離し、神経細胞はその皮質神経細胞の一次培養を用いた。各細胞について、アトピー関連サイトカインとその受容体の発現を RT-PCR、ELISA あるいは Western Blotting により検討した。

(3) アトピー性皮膚炎と脊髄炎の合併症例の解析 (楠)

アトピー性脊髄炎は、アレルギー科の医師 (眼科、皮膚科、耳鼻科) には周知されていないため、実態が把握されていない可能性が高い。2005 年から 2014 年に近畿大学医学部附属病院を受診した患者で、カルテ病名上でアトピー性疾患と脊髄炎の合併例がどの程度存在するか、またその臨床像を解析した。

(4) 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、桑原、萩原）

アトピー性脊髄炎患者の 128 チャ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、前年度に引き続き行った。

(5) 平山病患者血清におけるアレルギー炎症関連サイトカインの解析（桑原）

平山病の悪化リスクとしてのアトピー素因について明らかにするため、平山病 12 例、正常対照 12 例について、血清サイトカイン・ケモカイン 27 種類の同時測定を行った。

(6) 脱髄疾患が疑われた剖検例での免疫病理学的解析（吉田）

脱髄疾患の病理学的解析はあまり頻繁に行われていない。本研究では 4 例の脳生検標本において脱髄疾患が疑われた症例の病理学的解析を通してその浸潤細胞種類等の特徴や病態を解析した。

(7) 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。

（倫理面への配慮）

C. 研究結果

(1) アトピー性脊髄炎モデルマウスの作成と解析（吉良、錫村、城戸）

気管支喘息モデルマウスでは神経障害性疼痛、アロディニアを認めた（図 1）。これらのマウス脊髄では、ミクログリアやアストロサイトの増殖、活性化を認め、いわゆるグリア炎症が惹起されていた（図 2）。また、血管内皮細胞の活性化および血液脳関門の破綻が見られた。これらのマウス脊髄からミクログリアを単離し、遺伝子発現パターンを網羅的に解析したところ、対照群と比較し幾つかの経路が活性化していた（図 3）。また、受容体レベルでは EDNRB をコードする遺伝子の優位な発現上昇が見られた。実際にモデルマウスの脊髄でも本受容体の発現亢進を免疫染色およびウエスタンブロットで確認した。また、本受容体はミクログリアよりアストロサイトでより強い発現増加をみとめた。EDNRB のリガンドである ET-1 の血中レベルは、気管支喘息マウスで有意に上昇していた。さらに ET-1 は気管支喘息マウスの肺胞でも発現亢進していたことから、本マウスのグリア炎症になんらかの関連性があると思われる。ミノサイクリン 30 mg/kg/day の連日腹腔内投与によりアロディニアは軽減し、脊髄グリア炎症も抑制された。ミノサイクリンによる治療では血中 ET-1 や脊髄 EDNRB 蛋白発現レベルは変動していなかったことから、ミノサイクリンは ET-1/EDNRB 経路とは異なる機序で症状軽減をもたらした可能性が高い。ブロムワレリル

尿素はさらに著名なアロディニア軽減効果が得られたが、治療群はコントロール群よりもさらに刺激に対する反応率が低下していたことから、アロディニア特異的というよりも麻酔作用が反応を鈍らせている可能性が高いと思われた。

(2) アトピー関連サイトカインの中樞神経系での作用 (錫村、吉良)

C57BL/6 新生仔由来の混合グリア細胞培養より、ミクログリア・アストロサイトを分離し、神経細胞はその皮質神経細胞の一次培養を用いた。各細胞について、アトピー関連サイトカインとその受容体の発現を RT-PCR、ELISA あるいは Western Blotting により検討した。

CCL11 (eotaxin-1) はアストロサイトにより産生され、その受容体 (CCR3, CCR5) はミクログリアに発現し、これらの遊走および活性酸素種 (ROS) の発現亢進に寄与していた。IL-9 は T 細胞から発現し、中樞神経内での発現は見られないが、その受容体 (IL-9R と IL-2R γ) はアストロサイトが発現し、同細胞の CCL20 発現を促進した。CCL20 は Th17 細胞の BBB 通過を誘導した。また、IL-19 はミクログリアが発現し、受容体 (IL-20R α/β) もミクログリアが発現していたことから、オートクリン的に働くと思われた。また、IL-19 欠損マウスミクログリアは炎症性サイトカインの発現が亢進していたことから、IL-19 は炎症抑制的に働くことが示唆された (図 4)。

(3) アトピー性皮膚炎と脊髄炎の合併症例の解析 (楠)

アトピー性脊髄炎は、アレルギー科の医師 (眼科、皮膚科、耳鼻科) には周知されていないため、実態が把握されていない可能性が高い。2005 年から 2014 年に近畿大学医学部附属病院を受診した患者で、カルテ病名上でア

トピー性疾患と脊髄炎の合併例がどの程度存在するか、検討するため、アトピー性皮膚炎患者 10238 例、脊髄炎関連疾患 529 例を渉猟した。このうち、アトピー性皮膚炎と脊髄炎関連疾患の合併は 5 名であった。3 名はヤケヒョウヒダニ特異的 IgE 抗体が陽性であった。5 例中 1 例はアトピー性脊髄炎の診断基準を満たし、1 例は「疑い」であった。いずれの症例も単相性の経過で、ステロイドパルス治療が有効であった (表 1)。また、末梢神経障害患者 521 例中、アトピー性皮膚炎患者は 3 名であったが、いずれもその原因が明らかで免疫介在性とは言い難いものであった。

アトピー性皮膚炎患者の 0.05% に脊髄炎を合併し、脊髄炎患者の 0.85% にアトピー性皮膚炎を合併していた。アトピー性皮膚炎以外のアトピー性疾患に関しても同様の調査が必要であろう。

(4) 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、桑原、萩原)

アトピー性脊髄炎患者の一次および二次体性感覚野、SI (エスワン) と SII (エスツー) についての脳磁計を用いた検討。AM 患者 7 名について正中神経刺激による誘発磁場反応を記録した。結果、SI については、頸髄から末梢の病変の影響が反映されたため、潜時延長や誘発不能例が認められた。ただし、ルーチンで行っている SEP よりも Area 3b の活動に特異的であるため、異常の頻度はやや高いと考えられた。SII の異常については、N20m の異常がある場合にみられ、やはり SI へ到達するまでの末梢の影響が大きいと考えられた。ただ、先行研究において、MS では SII の反応が保たれていることが多かったので、代償機転の差など、何らかの病態の違いを反映している可能性は否定できない (図 5)。

(5) 平山病患者血清におけるアレルギー炎症関連サイトカインの解析 (桑原)

平山病患者血清中の Eotaxin、MCP-1、RANTES、MIP-1b は有意に上昇していた (図 6)。Eotaxin、RANTES は好酸球遊走・アレルギー性炎症に関与する。好酸球は MMP-9 などを通じて collagen 産生に抑制的に作用し、硬膜管の成長発達に影響する可能性が考えられた。今後は、重症度、EMG 脱神経所見との関連を解析するとともに、急性期 (進行期) における抗アレルギー療法が奏功する可能性について検討する予定である。

(6) 脱髄疾患が疑われた剖検例での免疫病理学的解析 (吉田)

2013 年と 2014 年に脳腫瘍が疑われ脳生検が施行され、病理学的に脱髄疾患が疑われた 4 症例を検討した。

結果：炎症細胞浸潤、好酸球、Creutzfeldt cell (C cell) の有無、MBP、AQP4、GFAP の染色性などを検討した。脱髄疾患には急性期の浮腫性変化より脳腫瘍が疑われる症例 (Tumefactive MS) があり、鑑別上注意を要する。脱髄疾患の急性期 (発症後 1~2 ヶ月以内) では、血管周囲性の炎症細胞に、好酸球の出現が高頻度にみられた。好酸球出現は多発性硬化症の病理像として成書に記載されているが、剖検例で観察することは稀であり特記すべき所見であった。Creutzfeldt cell は、脱髄疾患に特異性はないが、比較的好くみられる astrocyte の変化であり、3 例に確認された (図 7)。数ミリ程度の小切片の脳生検診断には限界があること (サンプルエラー)、ステロイド治療などによる修飾や病勢の変化により病理診断が困難になることにも留意する必要があると思われた。

D. 考察

平成 26 年度は、3 年間の最終年度として、

アトピー性脊髄炎の病態を解明すべく、マウスモデルの解析を中心に、培養細胞系、神経生理臨床検査、疫学調査、病理学的検査を行った。

アトピー素因モデルマウスにおけるアロディニアは再現性が高い。現在までに知られているアロディニアモデル動物としては、足底への Complete Freund's Adjuvant (CFA) や Carageenan 等の注射、関節炎の作成、神経結紮モデル、UV 照射、虚血、糖尿病モデル等あり、また髄腔内への刺激物質投与 (NMDA、オピオイド、ATP、LPS 等) でもアロディニアを誘発できる (Sandkuhler, *Physiol Rev* 2009)。今回の研究で、上記に加え新たに気管支喘息などの末梢アレルギー炎症がアロディニアを誘発し、驚いたことに脊髄におけるグリア炎症を伴っていた。また、内皮細胞の活性化や血液脳関門の破綻を伴っていたことから、末梢のアレルギー炎症がなんらかの経路を介して中枢のグリア炎症を惹起したものと考えられた。錫村らの研究でも、実際の患者髄液中で上昇している CCL11 や IL-9 が実際にグリア炎症の惹起に関係していることが培養系で証明され、本疾患におけるグリア炎症の重要性がうかがえる。最新の実験手法を用いてモデルマウス脊髄のミクログリアを抽出し、発現遺伝子を解析したところ、エンドセリン 1 (ET-1) 受容体の発現亢進を認め、免疫染色にて本受容体がアストロサイトにより多く発現していること、気管支喘息モデルマウスの肺組織では ET-1 自体の発現が亢進し、血中レベルも上昇していることなどから、末梢から中枢への橋渡し物質として ET-1 が強く示唆された。また、ミノサイクリンによる治療では内皮細胞の活性化やグリア炎症が抑制され、アロディニアが軽減したことから、アロディニアの成因にグリア炎症が深く関わっていることが裏付けられた。ミノサイクリン治療では血中 ET-1 レベルの減少は見られなかった

ことから、ET-1によって惹起された内皮細胞の活性化がミノサイクリンによって抑制され、中枢のグリア炎症をブロックしたことによりアロディニアを抑制したものと思われた。

臨床的には、楠らによって脊髄炎患者の0.85%にアレルギー疾患を併発し、5例中2例はアトピー性脊髄炎の診断基準にほぼ合致していたことが報告された。九大以外からの報告は初めてで、今後の症例蓄積が期待される。アトピー性脊髄炎患者では、MRI異常を呈さない症例も多いことから、実際の患者数はもっと多いことが考えられる。気管支喘息やアトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎などアトピー素因を持つ患者におけるアロディニアの有病率はさらに増える可能性が強く示唆された。アトピー性脊髄炎の診断において、しばしば多発性硬化症との鑑別が問題になるが、萩原らは脳磁図を用いた神経生理学的解析で両疾患の差異を指摘しており、今後の診断制度の上昇が期待されている。また、桑原らは、従来は機械的な刺激が発症要因とされていた平山病患者髄液中のアレルギー関連サイトカインの上昇を報告した。急性期の抗アレルギー治療が奏功する可能性を示唆していた。既存の神経炎症性疾患におけるアレルギー炎症の関与の可能性を指摘する重要な報告であった。吉田らの病理学的解析では、脱髄性疾患の生検病理組織における好酸球の浸潤を認めた。従来から脱髄性疾患病理組織中の好酸球浸潤は教科書レベルで指摘されていたが、実際に多発性硬化症と診断されている病理標本中で好酸球の浸潤が証明されたことは重要な意義がある。

E. 結論

平成26年度の研究により、アレルギー疾患に伴う中枢・末梢神経障害の原因が部分的に解明され、治療法の提案ができたことは、非常に有意義であった。また、従来は軽微な兆候

として見逃されていた可能性が高いアロディニアや、アレルギー炎症とは関連性が低いと考えられてきた疾患の病態生理に、末梢のアレルギー性機序やグリア炎症の関与が疑われたことは、今後の診断・治療における大きなパラダイムシフトともなりうる発見であった。本年度の研究成果は、今後のアトピー関連中枢・末梢神経障害の臨床診断・治療に大きく貢献できるものと思われた。

[参考文献]

- 1) Kira J, Ochi H. Juvenile muscular atrophy of the distal upper limb (Hirayama disease) associated with atopy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001;70(6):798-801.
- 2) Isobe N, Kanamori Y, Yonekawa T, Matsushita T, Shigeto H, Kawamura N, Kira J. First diagnostic criteria for atopic myelitis with special reference to discrimination from myelitis-onset multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2012;15:316(1-2):30-5.
- 3) Sandkühler J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev*. 2009;89(2):707-58.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Jin S, Sonobe Y, Kawanokuchi J, Horiuchi H, Cheng Y, Wang Y, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A. Interleukin-34 restores blood-brain barrier integrity by upregulating tight junction proteins in endothelial cells. *PLoS One*. 2014; 23;9(12):e115981.
- 2) Wang Y, Jin S, Sonobe Y, Cheng Y, Horiuchi H, Parajuli B, Kawanokuchi J,

Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A. Interleukin-1 β induces blood-brain barrier disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes. PLoS One. 2014; 14;9(10):e110024.

山崎 亮, 吉良 潤一. アトピー性脊髄炎. In: 水澤 英洋・編. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ 神経症候群(第2版)II, 大阪, 株式会社日本臨床社, 2014;p822-826.

2. 学会発表 (国内)

1) Wang B, Yamasaki R, Kido M, Masaki K, Kira J: Allodynia and microglial activation induced by peripheral atopic diathesis. 第55回日本神経学会学術大会 2014. 5. 21~24 福岡.

2) 山崎亮、王氷、藤井敬之、城戸瑞穂、津田誠、井上和秀、吉良潤一: 気管支喘息モデルマウスはミクログリア活性化とアロディニアを生じる. 第25回日本末梢神経学会学術集会 2014. 8. 29~30 京都.

3) Wang B, Yamasaki R, Kido M, Masaki K, Kira J: Peripheral atopic diathesis induces microglial activation and

allodynia. 第26回日本神経免疫学会 2014. 9. 4~6 石川.

4) Yamasaki R, Wang B, Fujii T, Kido M, Tsuda M, Inoue K, Kira J: Atopic inflammation induces microglial activation and tactile allodynia.

第37回日本神経科学大会 2014. 9. 11~13 神奈川.

(海外)

1) Yamasaki R, Wang B, Fang M, Fujii T, Kido M, Kira J: Atopic inflammation induces microglial activation and tactile allodynia. CSHL Conference on Glia in Health & Disease 2014. 7. 17-7. 21 New York.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

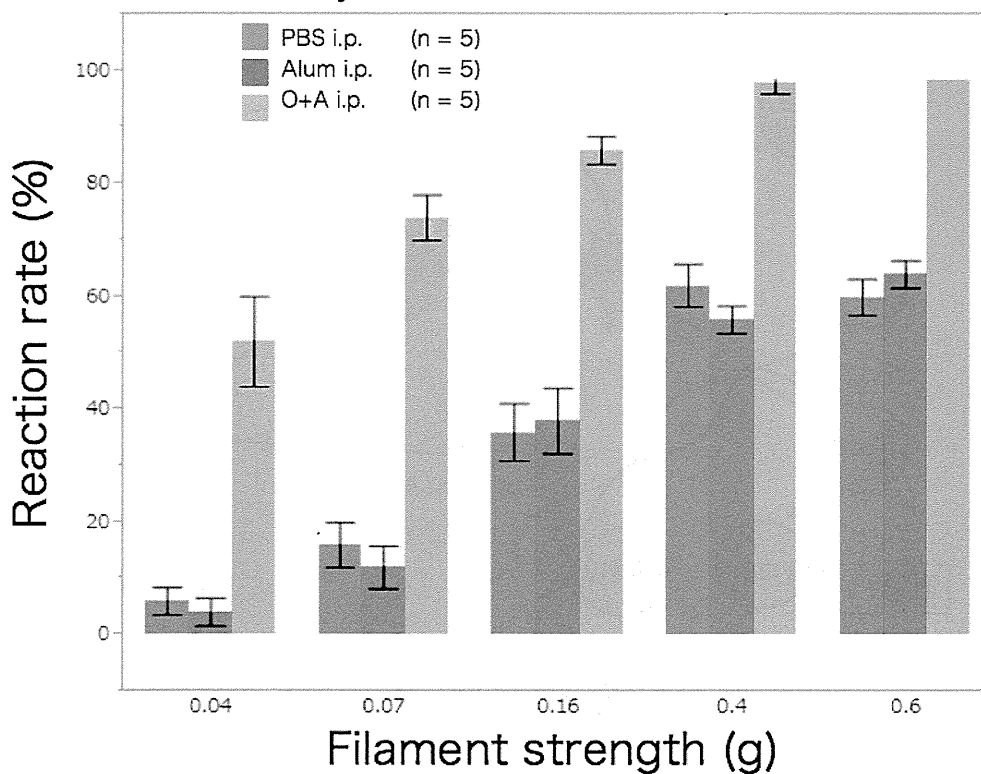
1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他



*:p<0.05(One way ANOVA, Tukey post hoc test)

図1: 気管支喘息マウスにおけるアロディニア

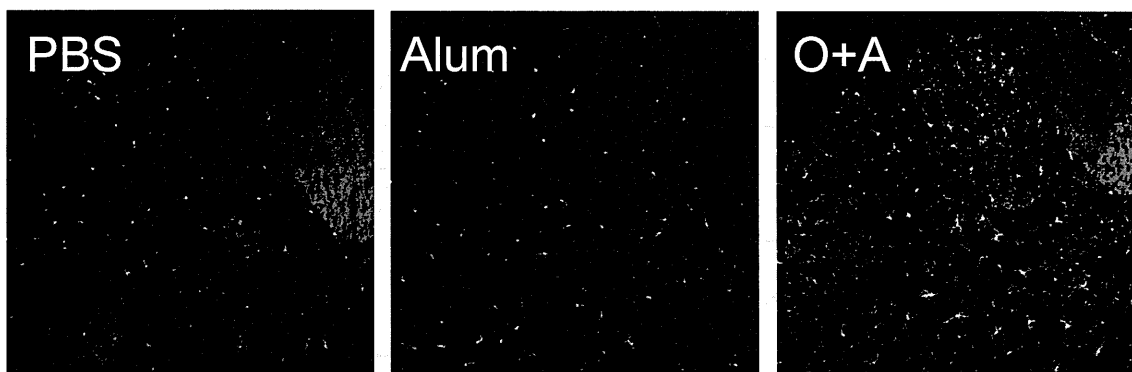


図2: 気管支喘息マウス腰髄後角ミクログリアの増加
 PBS: 対照、Alum: アジュバントのみ、O+A: 気管支喘息

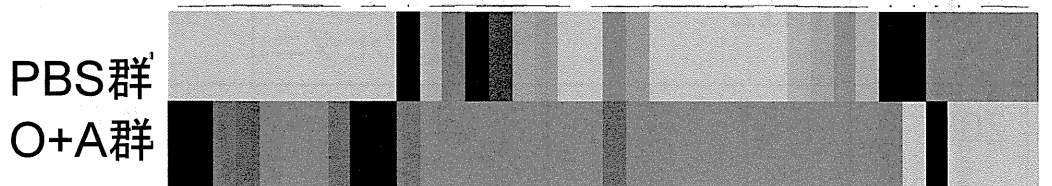
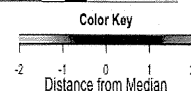


図3: マウス脊髄ミクログリアの炎症性サイトカイン遺伝子発現パターン。O+A(喘息)群で炎症性サイトカインの発現が亢進。



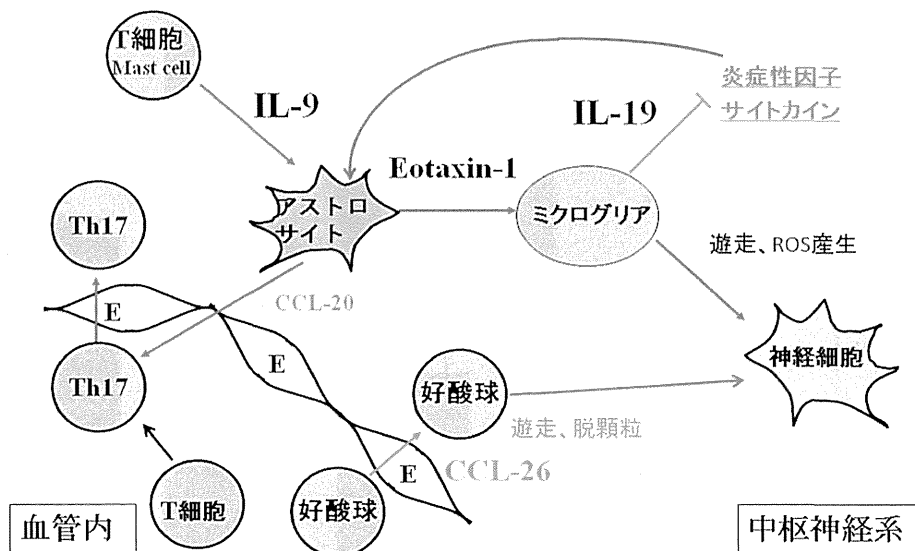


図4: グリア炎症とサイトカイン(錫村班)

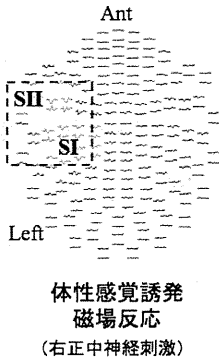
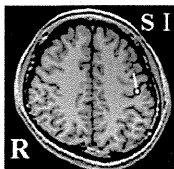
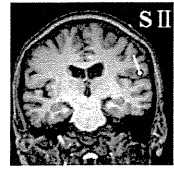
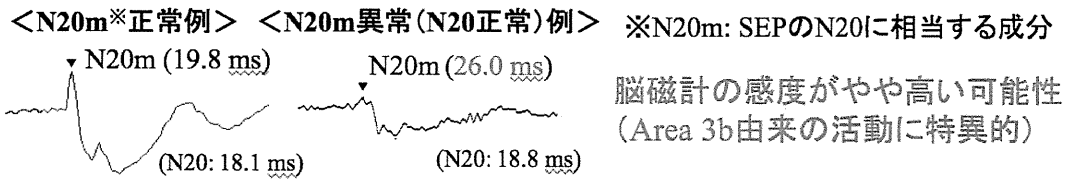
表1: アトピー性皮膚炎と脊髄炎関連疾患の合併例(楠班)

症例		脊髄炎部位	特異IgE高値	診断
1	39F	C4,Th8	コナヒョウヒダニ ヤケヒョウヒダニ	MS
2	28M	C7-Th1,Th7	なし	MS
3	23M	C4-5	コナヒョウヒダニ ヤケヒョウヒダニ	アトピー性脊髄炎(確定)
4	21M	Th12	コナヒョウヒダニ ヤケヒョウヒダニ	アトピー性脊髄炎(疑い)
5	20F	不明	不明	脊髄炎(詳細不明)

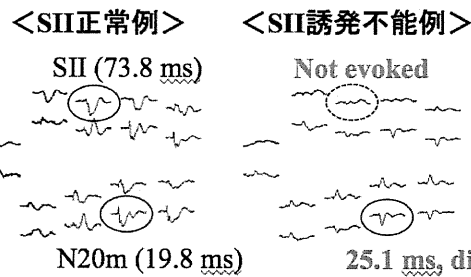
結果および考察:

(注) 健常者23名(46肢)による参考値(Hagiwara, 2010)

- ① SI (N20m^{*}): 22.9 ± 2.6 ms ($>21.4 \pm 1.0$ ms^(注)) (4肢で延長、2肢で誘発不能)
 誘発不能・延長例の2/4肢ではMRIおよびSEPで頸髄～末梢の異常。
 延長例の2/4肢では、MRI上で頸髄病変指摘されるもSEP正常(下図)。



- ② SII: 99.3 ± 13.8 ms (91.2 ± 15.8 ms^(注)) (3肢で誘発不能)



SII誘発不能例ではSI(N20m)の異常を伴っていたため、基本的にはSI以下末梢に起因か。
 MSでは反応が保たれていることが多く、代償機転の差?

図5: アトピー性脊髄炎患者のMEG異常(萩原班)

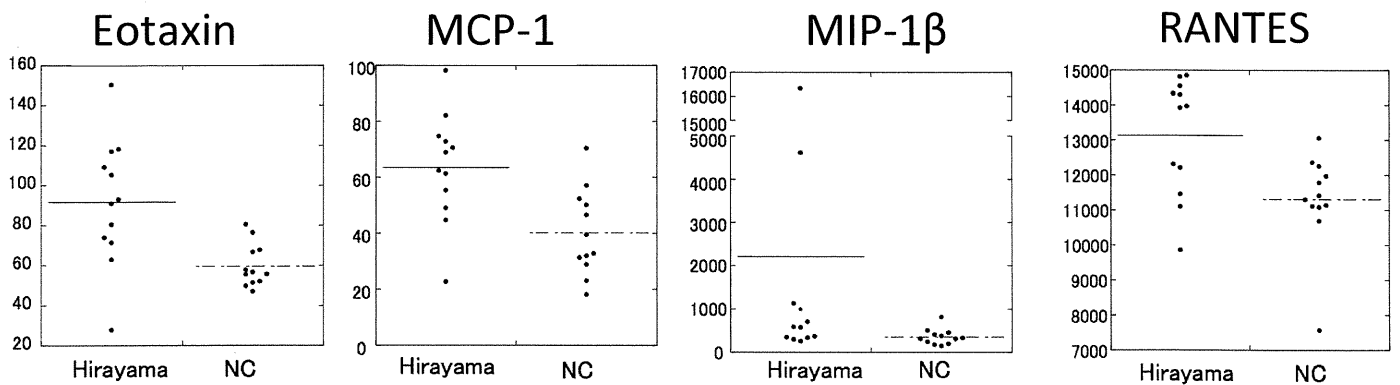


図6: 平山病患者髄液中サイトカイン上昇(桑原班)

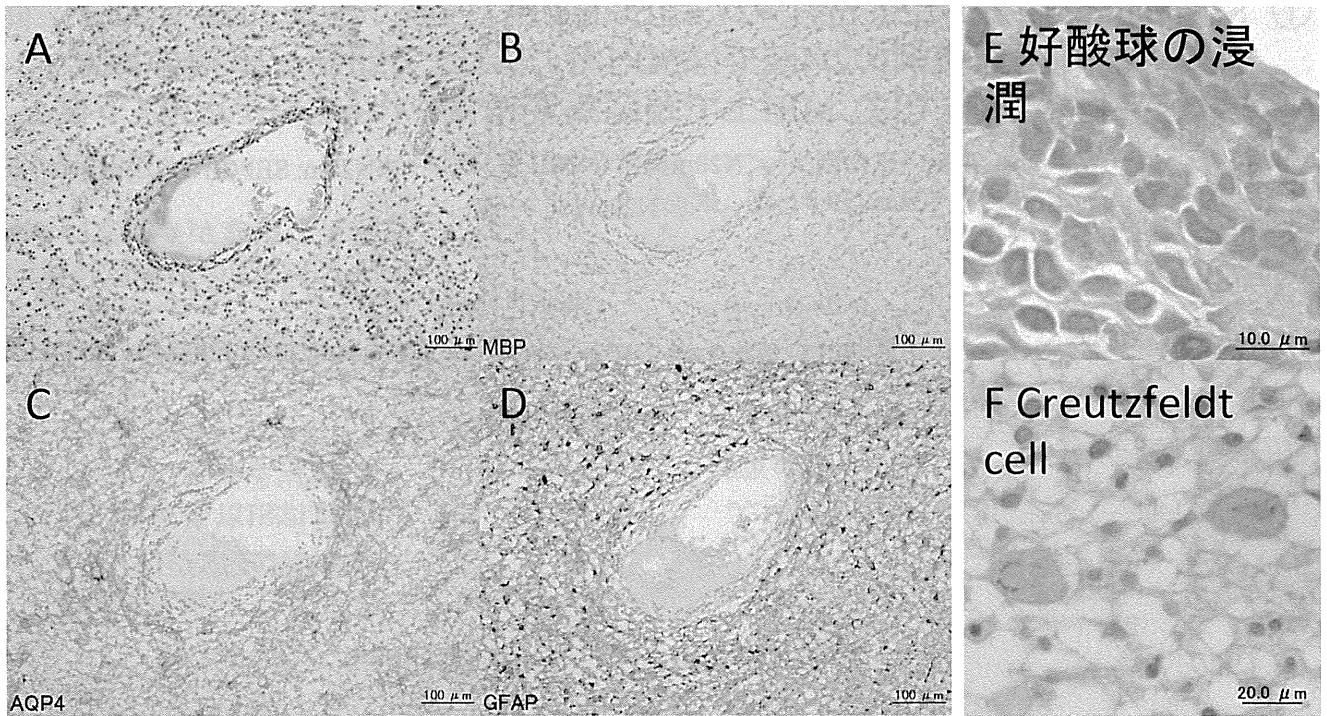


図7:脱髄性疾患患者脳生検組織におけるグリア細胞異常と好酸球浸潤(吉田班)

A: 血管周囲脱髄(KB染色), B: MBP(脱落), C: AQP4(保持), D: GFAP(保持)
 E: 好酸球の浸潤(HE), F: クロイツフェルト細胞(異常グリア細胞)の出現

研究成果の刊行に関する一覧表

(2014年4月1日～2015年3月31日迄)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山崎 亮 吉良 潤一	アトピー性脊髄炎	水澤 英洋	新領域別 症候群シ リーズ	株式会社日 本臨床社	大阪	2014	822-826

研究成果の刊行に関する一覧表

(2014年4月1日～2015年3月31日迄)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Jin S, Sonobe Y, Kawanokuchi J, Horiuchi H, Cheng Y, Wang Y, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A.	Interleukin-34 restores blood-brain barrier integrity by upregulating tight junction proteins in endothelial cells.	PLOS ONE	23;9(1 2)	e115981	2014
Wang Y, Jin S, Sonobe Y, Cheng Y, Horiuchi H, Parajuli B, Kawanokuchi J, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A.	Interleukin-1 β induces blood-brain barrier disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes.	PLOS ONE	14;9(1 0)	e110024	2014

V 脱髄性疾患, 遺伝性ニューロパチー

中枢性脱髄疾患

アトピー性脊髄炎

Atopic myelitis

山崎 亮¹
吉良 潤一²

Key words : アトピー素因, 好酸球性脊髄炎, ミクログリア, 血漿交換

1. 概念・定義

アトピー性脊髄炎とは, アトピー性皮膚炎, 気管支喘息, アレルギー性鼻炎・結膜炎などのアトピー素因を有する患者でみられる脊髄炎である。1997年に吉良らが, 4例の高IgE血症とアトピー性皮膚炎を伴った, 四肢の異常感覚(じんじん感)を呈し頸髄後索を主病変とする脊髄炎を報告し, アトピー性脊髄炎と命名した¹⁾。

2003年に小副川らが全国調査を行った際の暫定的な疾患定義は, 'ダニ特異的IgEを含む高IgE血症を認め, アトピー性疾患を併発している原因不明の脊髄炎'であった²⁾。その後, 症例の蓄積で新たに診断基準が策定された(表1)³⁾。現在の診断基準は, ①原因不明の脊髄炎, ②抗原特異的IgE陽性, ③Barkhofの多発性硬化症における脳MRI診断基準に合致する病変を認めない, の3項目を絶対基準とするもので, これに病理基準や相対基準を合わせて確定診断および推定診断が可能である。

2. 疫 学

アトピー性脊髄炎の全国調査は, 小副川ら(2000-01年)²⁾と磯部ら(2006-07年)⁴⁾によって行われた。現在の我が国における推定患者数は約1,000人で男性に多い傾向があり, 平均発症年齢は35歳であった。脊髄炎発症に先行したアトピー性疾患は約7割に認め, そのうちアトピー性皮膚炎が45%と最も多く, アレルギー

性鼻炎(43%), 気管支喘息(30%), 食物アレルギー(16%)の順であった。そのほかの臨床症状および検査所見は後述するが, 現在までに明らかかな有病率の地域差は認められない。また, 本疾患は海外からも報告がある^{5,6)}が, 症例数が少ないので有病率や臨床症状の人種差に関しても今後の検討課題となっている。

3. 病 因

アトピー性脊髄炎の発症メカニズムは不明である。疾患の定義であるアトピー素因の存在や高IgE血症から考えると, ヘルパーT細胞のThバランスは末梢において主にTh2に偏っていると思われる。すなわち, Th2細胞のシグナルは形質細胞からのIgE産生を促進, これにより肥満細胞からヒスタミンなどが遊離し, 血管透過性の亢進をきたす。また, Th2は末梢血好酸球も活性化・増殖させる。末梢組織で増殖したTh2細胞は脳脊髄液腔へ侵入し, 準備状態となる。実際の患者髄液中ではIL-9とCCL11(eotaxin-1)の増加がみられる⁷⁾。CCL11は好酸球上のCCR3およびCCR5と結合し細胞遊走因子として働き, IL-9はTh2からTh9への分化を誘導すると考えられている。Th9細胞はCCL11やIL-9の放出によって好酸球の遊走や増殖などに関与している可能性がある。

一方, 中枢神経ではアトピー性疾患に伴ってミクログリアという脳実質内常在グリア細胞が活性化している。当研究室では, 卵アルブミン

¹Ryo Yamasaki, ²Jun-ichi Kira: ¹Department of Neurological Therapeutics, Neurological Institute, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University 九州大学大学院医学研究院 神経治療学 ²Department of Neurology, Neurological Institute 同 神経内科学

表1 アトピー性脊髄炎 新診断基準(文献³⁾より引用)

絶対基準	以下の3項目をすべて満たす 1) 原因不明の脊髄炎 2) 抗原特異的IgE陽性 3) Barkhofの脳MRIによる多発性硬化症診断基準 (①1造影病変もしくは9傍皮質病変, ②1テント下病変, ③3脳室周囲病変)をすべて満たさない
病理基準	脊髄生検組織で, 血管周囲リンパ球浸潤や好酸球の浸潤を認め, 肉芽腫を伴うこともある
相対基準	1) 現在または過去のアトピー性疾患歴 2) 高IgE血症(>240 U/mL) 3) 髄液中IL-9(>14.0pg/mL)もしくはCCL11(>2.2pg/mL) 4) オリゴクローナルバンド(OCB)なし
確定診断	1) 絶対基準+病理基準 2) 絶対基準+相対基準2項目以上+(4)(OCBなし)
推定診断	1) 絶対基準+相対基準1項目以上+(4)(OCBなし) 2) 絶対基準+相対基準2項目以上

V

脱髄性疾患、遺伝性ニューロパチー

(OVA)感作マウスの中樞神経系において、OVAの腹腔内注射後3週の脊髄ミクログリアの活性化を認めている。この活性化は後角に強いので、何らかの感覚性入力末端梢感覚神経の過剰興奮を誘発し、反応性にミクログリアが活性化している可能性が高い。実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)モデルマウスでは、脊髄後根神経節からのシグナルが交感神経節の刺激を介して血管内皮のCCL20高発現を誘導し、後索への病原性Th17細胞の脊髄浸潤を促すとの報告もあることから⁹⁾、アトピー性脊髄炎における頸髄後索病変の形成にもこのような感覚神経の異常活性化に伴うグリア炎症が関与している可能性が高い。また、CCL20の受容体であるCCR6は主にT細胞、B細胞および樹状細胞に発現しているが、好酸球にも発現している⁹⁾ことから、このような刺激が好酸球の脊髄浸潤に直接寄与している可能性もある。

これらの中樞および末梢双方における炎症準備状態から、何らかのきっかけにより中樞神経内への炎症細胞浸潤が惹起され、好酸球性炎症による組織破壊に至ると考えられる。

4. 病 態

アトピー性脊髄炎は、基礎となるアトピー性疾患の増悪後に発症する傾向がある。発症様式は急性、亜急性、慢性それぞれ3割で、単相性経過は3割、あとの7割は動揺性に慢性の経過をたどる。初発症状は7割で四肢遠位部の異常感覚(じんじん感)や感覚鈍麻で、運動障害も6割にみられるが軽症であることが多い。深部反射は8割で亢進し、排尿障害を伴うこともある。

MRIでは、6割以上の症例で頸髄後索にGd造影効果を伴う病変を認める(図1)。一方大脳病変を認める症例は1割に満たない。電気生理学的検査では、潜在性の末梢神経障害を1/4の症例で認め、運動神経誘発電位(MEP)や感覚神経誘発電位(SEP)では中枢性の障害を認める。血液検査では高IgE血症を9割に認め、高好酸球血症も6割に認める。髄液検査では1/4の症例で軽度の細胞数増多を認めるが好酸球はみられない。また、髄液中のIL-9とCCL11(eotaxin-1)の増加がみられるが、多発性硬化症などでしばしば高値であるIL-17やIFN γ は本疾患では増加していないのも特徴である³⁾。

その非特異的なMRI所見から、脊髄腫瘍な

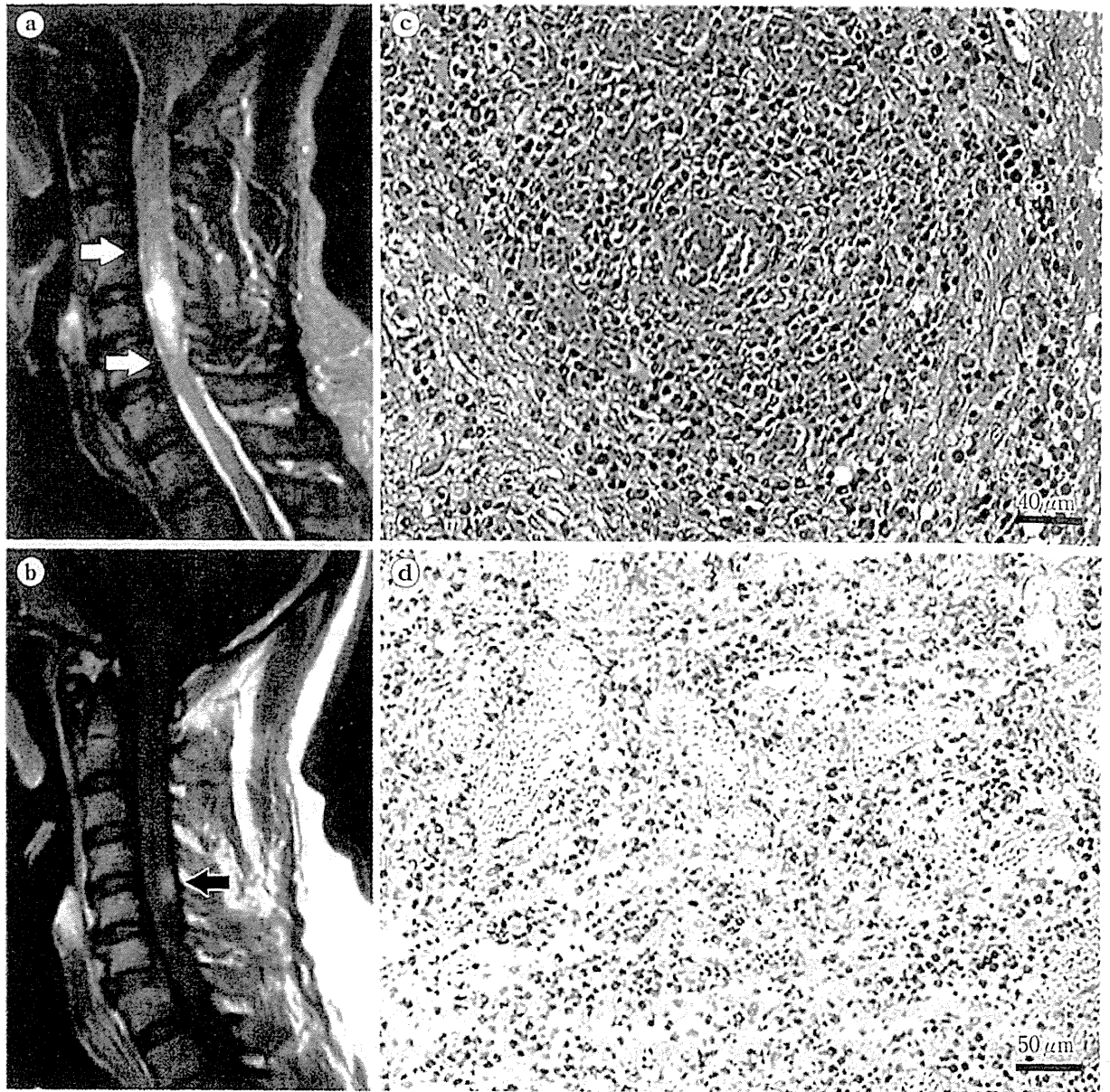


図1 アトピー性脊髄炎のMRIと病理組織所見(文献¹⁰⁾より引用)

a. 53歳男性患者のMRI T2強調画像：C4-6にT2延長病変を認める(白矢印). b. aと同部位のガドリニウム造影T1強調画像：C5/6に造影病変を認める(黒矢印). c. 同患者の生検組織画像：小静脈周囲に多数の好酸球浸潤を認める. ヘマトキシリン-エオジン染色. d. 同患者の生検組織画像：著明なECPの沈着を認める(褐色). 抗ECP抗体染色.

どとの鑑別のため生検を施行される場合があるが、本疾患では病理学的に血管周囲の好酸球を主とした炎症細胞浸潤、髄鞘や軸索の破壊がみられる。また eosinophil cationic protein (ECP) の沈着がみられ、好酸球由来のタンパクによる組織破壊が示唆される(図1)。また、疾患急性期にはCD4陽性T細胞がみられるが、慢性期にはCD8陽性T細胞が多く認められ、これらの細

胞傷害性T細胞も組織破壊の原因の一つと考えられる¹⁰⁾。

5. 診断と鑑別診断

臨床的に、アトピー素因があり、四肢の異常感覚を訴える若年患者を診た際には、アトピー性脊髄炎も鑑別対象となる。

前述のように、疾患の診断は近年策定された

新診断基準と照合することで比較的容易に行うことができる³⁾。鑑別すべき疾患としては、頸椎症などに伴う頸髄の圧迫性病変、多発性硬化症、視神経脊髄炎、腫瘍性病変、各種感染症(寄生虫、真菌、ウイルス、細菌)に関連した脊髄炎(HTLV-1関連脊髄症や神経梅毒など)、膠原病、サルコイドーシス、脊髄血管奇形、放射性脊髄炎などが挙げられる。寄生虫性脊髄炎は、アトピー性脊髄炎同様に高IgE血症や好酸球増多を認めるため、鑑別診断として重要である。また、同じくアレルギー性機序で末梢神経障害を呈するChurg-Strauss症候群(CSS)(別名:アレルギー性肉芽腫性血管炎、allergic granulomatous angiitis)も重要な鑑別対象である。CSSは気管支喘息やアレルギー性鼻炎に引き続いて末梢血好酸球増多を伴う血管炎を生じ、末梢神経炎や消化管潰瘍、脳梗塞・脳出血、腎機能障害などの多臓器障害をきたす。30-60歳代に発症するため発症年齢も類似している。CSSでは抗好中球細胞質抗体(MPO-ANCA)が約半数で陽性となるが、アトピー性脊髄炎では陰性である。また、CSSでは脳神経系以外の病変を認めることもアトピー性脊髄炎との鑑別点となる⁴⁾。しかしながら、好酸球性炎症に伴う臓器障害という点は酷似しており、少なくとも一部はオーバーラップしている症例も存在していると考えられており、今後の症例蓄積が待たれる。

6. 治療と予後

村井ら¹⁾によるアトピー性脊髄炎患者26例の治療効果の検討では、副腎皮質ステロイド(CS)治療のみ、もしくは免疫グロブリン静注

療法(IVIg)のみではそれぞれ72%、60%の患者で臨床症状の改善がみられた。一方血漿交換(PE)は単独でも9割の患者で臨床症状の改善がみられ、ほかの治療と比較し有意に効果的であった。第2回全国調査では6割でCS治療が行われており、PEは25%で施行されたにすぎなかったが、そのうち8割で有効であった。PEは本疾患の治療としてまだ一般的ではないが、CS治療に反応しない症例にはPEを積極的に施行すべきである。本疾患の予後は、発症から6.6年後の総合障害度評価尺度(EDSS)スコア(10段階評価で10点が最重症)で平均2.3点程度の障害が残るのみで、一般的に大きな障害を残しにくい⁴⁾。

また、本疾患は多発性硬化症との鑑別がしばしば問題となるが、多発性硬化症の治療に用いられるインターフェロンβ(IFN-β)や、現在開発中のグラチラマー酢酸塩(glatiramer acetate)は、Th2タイプのT細胞を活性化させ、好酸球性炎症を悪化させる可能性が高いため勧められない³⁾。治療法選択という観点からも多発性硬化症との鑑別は非常に重要である。また、本疾患の再発予防のため、基礎となるアトピー素因の治療は非常に重要である。

おわりに

近年の食生活の欧米化や生活環境の変化に伴い、アレルギー性疾患は増加しつつある。診断および最適な治療選択のためにも、軽度の脊髄炎や末梢神経障害患者ではアトピー素因の有無の間診が重要と考えられる。

文献

- 1) Kira J, et al: Acute myelitis associated with hyperIgEemia and atopic dermatitis. *J Neurol Sci* 148(2): 199-203, 1997.
- 2) Osoegawa M, et al: Myelitis with atopic diathesis: a nationwide survey of 79 cases in Japan. *J Neurol Sci* 209(1-2): 5-11, 2003.
- 3) Isobe N, et al: First diagnostic criteria for atopic myelitis with special reference to discrimination from myelitis-onset multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 316(1-2): 30-35, 2012.
- 4) Isobe N, et al: Neural damage associated with atopic diathesis: a nationwide survey in Japan. *Neurology* 73(10): 790-797, 2009.
- 5) Yoon JH, et al: Clinical and laboratory characteristics of atopic myelitis: Korean experience. *J Neurol Sci* 285(1-2): 154-158, 2009.

V

- 6) Gregoire SM, et al: Atopic myelitis: a clinical, biological, radiological and histopathological diagnosis. *J Neurol Sci* 247(2): 231-235, 2006.
- 7) Tanaka M, et al: Distinct CSF cytokine/chemokine profiles in atopic myelitis and other causes of myelitis. *Neurology* 71(13): 974-981, 2008.
- 8) Arima Y, et al: Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell* 148(3): 447-457, 2012.
- 9) Sullivan SK, et al: MIP-3alpha induces human eosinophil migration and activation of the mitogen-activated protein kinases (p42/p44 MAPK). *J Leukoc Biol* 66(4): 674-682, 1999.
- 10) Osoegawa M, et al: Eosinophilic myelitis associated with atopic diathesis: a combined neuroimaging and histopathological study. *Acta Neuropathol* 105(3): 289-295, 2003.
- 11) Murai H, et al: Effect of immunotherapy in myelitis with atopic diathesis. *J Neurol Sci* 227(1): 39-47, 2004.

RESEARCH ARTICLE

Interleukin-34 Restores Blood–Brain Barrier Integrity by Upregulating Tight Junction Proteins in Endothelial Cells

Shijie Jin, Yoshifumi Sonobe, Jun Kawanokuchi, Hiroshi Horiuchi, Yi Cheng, Yue Wang, Tetsuya Mizuno, Hideyuki Takeuchi*, Akio Suzumura

Department of Neuroimmunology, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8601, Japan

*htake@riem.nagoya-u.ac.jp



CrossMark
click for updates

 OPEN ACCESS

Citation: Jin S, Sonobe Y, Kawanokuchi J, Horiuchi H, Cheng Y, et al. (2014) Interleukin-34 Restores Blood–Brain Barrier Integrity by Upregulating Tight Junction Proteins in Endothelial Cells. *PLoS ONE* 9(12): e115981. doi:10.1371/journal.pone.0115981

Editor: Jun-ichi Kira, Kyushu University, Japan

Received: July 11, 2014

Accepted: December 1, 2014

Published: December 23, 2014

Copyright: © 2014 Jin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan; a grant from the Advanced Research for Medical Products Mining Program of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO) of Japan; and grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Akio Suzumura is a PLOS ONE Editorial Board member. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE Editorial policies and criteria.

Abstract

Interleukin-34 (IL-34) is a newly discovered cytokine as an additional ligand for colony stimulating factor-1 receptor (CSF1R), and its functions are expected to overlap with colony stimulating factor-1/macrophage-colony stimulating factor. We have previously shown that the IL-34 is primarily produced by neurons in the central nervous system (CNS) and induces proliferation and neuroprotective properties of microglia which express CSF1R. However, the functions of IL-34 in the CNS are still elucidative. Here we show that CNS capillary endothelial cells also express CSF1R. IL-34 protected blood–brain barrier integrity by restored expression levels of tight junction proteins, which were downregulated by pro-inflammatory cytokines. The novel function of IL-34 on the blood–brain barrier may give us a clue for new therapeutic strategies in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases such as multiple sclerosis and Alzheimer's disease.

Introduction

Interleukin-34 (IL-34) has been identified as an additional ligand for colony stimulating factor-1 receptor (CSF1R), and it is broadly expressed in various organs including heart, brain, lung, liver, kidney, spleen, and colon [1]. IL-34 and colony stimulating factor-1/macrophage-colony stimulating factor (CSF-1/M-CSF) bind to the different regions of CSF1R and share no overt sequence homology [2]. Recent studies showed that IL-34 produced by epithelial lineage cells (e.g. keratinocytes, splenic vascular endothelial cells, and neurons) is necessary for the development of tissue macrophage-like cells (e.g. Langerhans cells, osteoclasts, and microglia) [3–5]. We also have shown that IL-34 is