

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、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に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。プロムワレリル

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。

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、中枢神経内での発現は見られないが、その受容体(IL-9RとIL-2R)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 /)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。いずれの症例も单相性の経過で、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・アレルギー炎症に関与する。好酸球は MMP-9 などを通して 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、比較的よくみられる 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 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