

201442050A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患等克服研究事業

(委託業務演題)

**多発性硬化症生体試料バンクを活用した
アジア人特有の遺伝環境因子探索による病態解明**

平成26年度 委託業務成果報告書

業務責任者 吉良 潤一

平成27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の平成26年度厚生労働科学研究委託事業（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）））による委託業務として、国立大学法人九州大学 総長 久保 千春 代理人産学官連携本部長 若山 正人が実施した平成26年度「多発性硬化症生体試料バンクを活用したアジア人特有の遺伝環境因子探索による病態解明」の成果を取りまとめたものです。

委託業務成果報告書目次

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）		
全国多発性硬化症臨床情報・生体試料バンクの樹立と研究の方向性	-----	1
吉良 潤一		
II. 委託業務成果報告（業務項目）		
1. 遺伝・環境因子のリスク解析		
多発性硬化症・視神経脊髄炎の全ゲノム関連解析の成績と今後の研究の方向性	-----	8
松下 拓也		
2. 遺伝・環境因子のリスク解析		
多発性硬化症・視神経脊髄炎の体液中miRNAの発現解析研究 今後の研究の方向性	-----	11
横田 隆徳		
3. 遺伝・環境因子のリスク解析		
抗NMDA受容体脳炎における治療の現状と問題点	-----	13
西山 和利		
4. 遺伝・環境因子のリスク解析		
脊髄炎を呈する炎症性中枢神経疾患のT細胞サブセットの解析と遺伝的背景の解析： 現状と今後の展開	-----	16
吉良 潤一		
5. 遺伝・環境因子のリスク解析		
プロテオグリカン糖鎖合成酵素の遺伝子多型と多発性硬化症の関連	-----	18
楠 進		
6. 遺伝・環境因子のリスク解析		
二次性進行型多発性硬化症患者血清の抗BBB構成内皮細胞抗体が認識する標的抗原： プロテオーム解析を用いた検索	-----	20
神田 隆		
III. 学会等発表実績	-----	22
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	31

全国多発性硬化症臨床情報・生体試料バンクの樹立と研究の方向性

業務主任者: 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: 日本全国で前向きに多発性硬化症（MS）/視神経脊髄炎（NMO）の縦断的な臨床データを集積しMS/NMOの生体試料を基盤研に収集する。これらの試料・情報を用いて日本人MS/NMOの予後や病態修飾薬への治療反応性を規定する遺伝環境因子を同定する。また動物モデルへの影響を解析し、これらの遺伝子産物を標的とした新規治療薬や、環境因子の制御による予防法・進行防止法の開発をめざす。

分担研究者

新野正明: 独立行政法人国立病院機構北海道医療センター臨床研究部・神経免疫・臨床研究部長
深浦彦彰: 埼玉医科大学総合医療センター神経内科・准教授
田中正美: 独立行政法人国立病院機構宇多野病院神経内科学・診療部長
越智博文: 愛媛大学大学院医学系研究科老年・神経・総合診療内科学・講師
神田 隆: 山口大学大学院医学系研究科システム統御医学系専攻 脳・神経病態制御医学領域神経内科学分野・教授
横田隆徳: 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学・神経内科学・教授
松井 真: 金沢医科大学医学部・神経内科学・教授
楠 進: 近畿大学医学部神経内科・神経内科学・教授
寺山靖夫: 岩手医科大学医学部内科学講座神経内科・老年科分野・教授
西澤正豊: 新潟大学脳研究所神経内科・教授
大橋高志: 東京女子医科大学八千代医療センター神経内科・神経内科学・准教授
西山和利: 北里大学医学部神経内科学・教授
中辻裕司: 大阪大学神経内科学・准教授
越智一秀: 広島大学病院脳神経内科・神経免疫・診療講師
坂手龍一: 独立行政法人医薬基盤研究所難病・疾患資源研究部 難病研究資源バンク
錫村明生: 名古屋大学環境医学研究所・神

経免疫学・教授
山本 健: 久留米大学医学部医化学講座・教授
松下拓也: 九州大学大学院医学研究院神経治療学寄附講座・准教授
山崎 亮: 九州大学大学院医学研究院神経治療学寄附講座・助教
河野祐治: 国立病院機構大牟田病院・神経内科・部長
辻 省次: 東京大学医学部附属病院神経内科・教授
下濱 俊: 札幌医科大学医学部神経内科学講座・教授
研究協力者
永石彰子: 長崎川棚医療センター神経内科・医師
岡田和将: 産業医科大学神経内科・学内講師

A. 背景・研究目的

多発性硬化症（multiple sclerosis, MS）は、中枢神経髄鞘を標的とした自己免疫性疾患と考えられているが、証明はされていない。本症は、遺伝的要因と環境因子の相互作用により発症するとされるが、その詳細は解明されていない。欧米白人では1万例を越える多数のMS患者を対象とした大規模ゲノム疫学研究が進んでいるが、アジア人種ではこの方面の研究は大幅に遅れている。MSは人種差が著しい疾患であることから、アジア人種での遺伝・環境因子の研究が極めて重要である。また、アジア人種に多い視神経脊髄炎（neuromyelitis optica, NMO）においては、希少さ故に大規模ゲノム疫学研究は世界的にみても実施されていない。

私たちは2009年にJapan MS Genetics Consortium (JMSGC)を設立し784例のMS/NMOの臨床データとDNAを集積してきた。そこでこれを発展させ、本研究では日本神経免疫学会MS治験等

支援グループ委員会に属する全国のMS専門医療機関に手挙げ方式で、Japan MS Consortium (J-MSC) への参加を募り、全国規模のMS/NMO生体試料・臨床データバンクを立ち上げることとした。

本研究では、免疫性神経疾患調査研究班ならびに神経免疫学会と共同して前向きにMS/NMOの縦断的な臨床データを集積するとともに、基盤研と共同してMS/NMOの生体試料を収集する。この大規模臨床データと連結した生体試料を用いて、日本人MS/NMOの予後に寄与する遺伝環境因子、進行型を規定する遺伝環境因子、病態修飾薬への治療反応性を規定する遺伝環境因子等を同定する。同定された遺伝子の欠失マウスや同定された環境因子への暴露等のMS/NMO動物モデルへの影響を解析することで、病態カスケードを明らかにする。そして、これらの遺伝子産物を標的とした新規治療薬や、環境因子の制御による予防法・進行防止法の開発をめざす(図1)。

B. 研究方法・対象

J-MSCに参加の16医療機関の神経内科で、3年間で約1200例のMS/NMOの生体試料と臨床情報を前向きに収集する。J-MSC参加班員には、臨床情報と連結した生体試料を研究目的で供与するとともに、一般研究者には臨床情報と連携していない生体試料を研究の申請に応じて提供し、MS/NMOの臨床研究の推進に貢献する。

本年度は、基盤研と連携してJ-MSC参加医療機関で倫理委員会にて本研究の承認を受け、生体試料の収集を開始した(全班員)。

JMSGCで収集したDNAを用いてアジア人MS、NMOにおける遺伝的関連領域を明らかにするため全ゲノム関連解析(genome-wide association study, GWAS)を行った。さらにコピー数変化(copy number variation, CNV)が多くの疾患の発症や表現型に関わっていることが明らかとなってきたが、MS/NMOではCNVの病態への役割はほとんど分かっていないためSNPジェノタイプ情報を用い、全ゲノムCNV関連解析を実施した(吉良)。コンドロイチン硫酸の糖鎖合成酵素である β -1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase-1 (ChGn-1) 遺伝子上のアミノ酸置換を伴う多型はその酵素活性に影響を及ぼすが、コンドロイチン硫酸は中枢神経のマトリックスの主要な構成因子であり、また軸索進展の阻害因子であることも知られている。この点からMS患者においてChGn-1における多型の存在と疾患経過との関連を検討した(楠)。

環境要因の評価として北海道・九州においてMS患者を対象にオリゴクローナルIgGバンド

(OCB)の陽性率を比較、またOCB陽性に影響する遺伝的要因としてヒト白血球型抗原に着目して関連を解析した。またOCBと感染要因との関連を明らかにするため、EBV、VZV、*Helicobacter pylori*、*Chlamydia pneumoniae*に対する抗体を測定し、OCB陽性との関連を解析した。同様に北海道・九州でMS患者、健常者を対象に血清中1,25(OH)₂D、25(OH)D、ビタミンD結合タンパク(DBP)を測定し比較を行った(新野、吉良)。

バイオマーカーの検索として、がんや炎症性疾患領域において病態やその疾患の伝搬や進行に関与していることがこれまでに多く報告されているマイクロRNA(miRNA)に着目し、対照群、MS、NMO患者髄液中のmiRNAを網羅的に測定し、比較を行った(横田)。またMSでは脳血液関門(blodd-brain barrier, BBB)の破綻がその発症・症状進行に大きな影響を及ぼす。脳微小血管構成内皮細胞はBBBの主要構成要素であるが、MS、および対照群患者血清を用い、同細胞タンパクに対する自己抗体をウェスタンブロットにより検出する(神田)。

MSの病態解明に向けて、発症リスクとして検出されたNOTCH4遺伝子のノックアウトマウスを用い多発性硬化症の動物モデルであるexperimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)への影響を評価した(吉良)。

(倫理面への配慮)

必要とされる倫理的課題については班員所属施設の倫理委員会・遺伝子解析倫理委員会の承諾を得よう周知徹底する。特に研究対象者に対する不利益、危険性の排除やインフォームドコンセントに配慮する。血液検査や遺伝子解析データ等の臨床情報は、決して外部に流出しないよう厳重に保管し、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。さらに動物実験に関しては各施設の動物実験の指針を遵守し、動物愛護上の配慮を徹底する。

C. 研究結果

(1) MS/NMO生体試料バンク研究では班員施設の倫理委員会承認を受け、MS/NMO生体試料収集を開始した。平成26年12月時点で基盤研に117検体の生体試料を収集した。今後生体試料の収集は加速すると予想されるので、3年間で1200検体規模のバンクとなる見込みである。前向きに収集する臨床情報を確定し、年に1回更新することを班員会議で決定し、基盤研に提供した生体試料に連携可能な形式での臨床情報の収集も開始した。これにより生体試料と臨床情報が連携可能匿名化され

たMS/NMO生体試料バンクの全国体制を初年度に構築できた。このような公的なMS/NMO生体試料バンクはアジアでは初である。

- (2) 生体試料を活用した大規模研究(図2)では、コピー数多型の全ゲノム関連解析によりT細胞受容体 α 鎖の欠失型CNVがMSの、 γ 鎖の欠失型CNVがMSとNMOの発症リスクを40倍以上高めることを見出した。MS/NMOの全ゲノム関連解析により日本人MSおよびNMOでも欧米白人と遺伝的リスクを共有しているが、日本人MSではイオンチャネル分子群、NMOでは接着分子群が独自のリスク遺伝子であることを発見した(図3)。また男性MSでは*ChGn-1*多型を有すると、症状の進行が緩徐であることがわかった。
- (3) 北海道と九州のMSの解析により、OCBの陽性率は九州よりも北海道で高く、*HLA-DRB1*04:05*がOCB陰性に関連していることを明らかにした。また両者で共通してビタミンDが二次性進行型MSで低下し、障害進行の重要なリスクとなっていることを見出した。OCB陽性率と*C. pneumoniae*抗体陽性率との正の相関、*Helicobacter pylori*と負の相関を明らかにした。
- (4) miRNAの網羅的解析では正常対照群とMS群、およびNMO群との比較で有意差のあるmiRNAを見出し、バイオマーカーとしての有用性を明らかにした。脳微小血管構成内皮細胞に対する自己抗体は二次性進行型MSで見られ、質量分析によりgalectin-3に対する抗体であることが明らかとなった。同細胞株でgalectin-3をノックダウンするとNF κ BとICAM-1の発現量増加が認められた。
- (5) NOTCH4がlangerin陽性の樹状細胞で発現し、NOTCH4ノックアウトマウスではEAEが重症化することを発見した。

D. 考察

基盤研へのMS/NMO生体試料収集が順調に開始されたことから、今後は臨床情報を年1回前向きに基盤研へ収集する予定である。

日本人MS、NMOを対象としたGWASでは、ヨーロッパ系人種MSで確認されたリスク遺伝子を一部共有するものの、機能的には異なる傾向を持つリスク遺伝子が関連していることが明らかとなった。今後はMSバンクの検体を用いた候補遺伝領域の追試、診療情報を用いて臨床的特徴と関連する遺伝領域を明らかにしたい。また機能的関連から注目される*ChGn-1*多型と臨床情報との関連も症例を増やして追試を行う。

CNVに関しては、TCR遺伝子の特定の領域にMSとNMOに関連する欠失型CNVを同定した。同

CNVによって発現するTCRの種類が限定され、このことが病態に関わっていることが推察された。一方、統計学的基準に到達しないものの疾患関連CNVの候補はTCR遺伝子領域以外にも多数認められている。また、特徴的な疾患表現型とリンクするCNVの検討も要する。MSバンクを利用して解析症例数を増やすことによって、今後明らかにしていきたい。

バイオマーカーとしての役割が期待できるmiRNA、galectin-3に対する抗体も、収集検体を用いた追試を行い、その感度・特異度を明らかにする。

動物モデルを用いたMS病態解明についてはNOTCH4ノックアウトマウスにおけるEAEモデルの病理学的、免疫学的特徴を明らかにするとともに、GWASで関連が明らかとなった遺伝領域について、ノックアウト、ノックダウンによるEAEに対する影響を明らかにしたい。

E. 結論

全国施設でMS/NMO症例の臨床情報、生体試料の収集を開始した。遺伝子解析、環境解析により関連遺伝子、環境因子が検出され、バンク検体を用いた追試、動物・細胞モデルへの応用を今後行う。予備的研究で有用なバイオマーカー候補が複数発見され、収集検体による追試を今後行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ochi H. Mechanism of multiple sclerosis based on the clinical trial results of molecular targeted therapy - Ochi - 2014 - Clinical and Experimental Neuroimmunology - Wiley Online Library. Clin Exp Neuroimmunol 2014;
- 2) Takata K, Kato H, Shimosegawa E, Okuno T, Koda T, Sugimoto T, Mochizuki H, Hatazawa J, Nakatsuji Y. 11C-acetate PET imaging in patients with multiple sclerosis. PLoS ONE 2014; 9:e111598.
- 3) Yoshimura S, Isobe N, Matsushita T, Masaki K, Sato S, Kawano Y, Ochi H, Kira J-I. Genetic and Infectious Profiles Influence Cerebrospinal Fluid IgG Abnormality in Japanese Multiple Sclerosis Patients. PLoS ONE 2014; 9:e95367.
- 4) Isojima T, Doi K, Mitsui J, Oda Y, Tokuhira E, Yasoda A, Yorifuji T, Horikawa R, Yoshimura J, Ishiura H, Morishita S, Tsuji S, Kitanaka S. A recurrent de novo FAM111A mutation causes Kenny-Caffey syndrome type 2. J Bone Miner Res 2014; 29:992-8.

- 5) Araki M, Matsuoka T, Miyamoto K, Kusunoki S, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Aranami T, Yamamura T. Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica: a pilot study. *Neurology* 2014; 82:1302–6.
 - 6) Kusano S, Kukimoto-Niino M, Satta Y, Ohsawa N, Uchikubo-Kamo T, Wakiyama M, Ikeda M, Terada T, Yamamoto K, Nishimura Y, Shirouzu M, Sasazuki T, Yokoyama S. Structural basis for the specific recognition of the major antigenic peptide from the Japanese cedar pollen allergen Cry j 1 by HLA-DP5. *J Mol Biol* 2014; 426:3016–27.
 - 7) Wang L, Matsushita T, Madireddy L, Mousavi P, Baranzini SE. PINBPA: Cytoscape app for network analysis of GWAS data. *Bioinformatics* 2014; :btu644.
 - 8) Ochi H. Autoimmune regulator gene, Aire, and its relevance to central tolerance against myelin proteins. *Clin Exp Neuroimmunol* 2014; 5:279–80.
 - 9) Doi H, Song ZY, Yoshimura S, Tateishi T, Yonekawa T, Yamasaki R, Murai H, Matsushita T, Kira J-I. Distinct cytokine and T helper cell profiles between patients with multiple sclerosis who had or had not received interferon-beta. *Clin Exp Neuroimmunol* 2014; 5:321–7.
 - 10) Ochi H. Molecular targeted therapy in multiple sclerosis: Bench to bedside and bedside to bench. *Clin Exp Neuroimmunol* 2014; 5:2–3.
 - 11) Oryoji D, Hisamatsu T, Tsuchiya K, Umeno J, Ueda S, Yamamoto K, Matsumoto T, Watanabe M, Hibi T, Sasazuki T. Associations of HLA class I alleles in Japanese patients with Crohn's disease. *Genes Immun* 2015; 16:54–6.
 - 12) Matsumura A, Suzuki S, Iwahara N, Hisahara S, Kawamata J, Suzuki H, Yamauchi A, Takata K, Kitamura Y, Shimohama S. Temporal Changes of CD68 and $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Expression in Microglia in Alzheimer's Disease-Like Mouse Models. *J Alzheimers Dis* 2015; 44:409–23.
 - 13) Suzuki S, Kawamata J, Iwahara N, Matsumura A, Hisahara S, Matsushita T, Sasaki M, Honmou O, Shimohama S. Intravenous mesenchymal stem cell administration exhibits therapeutic effects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neurodegeneration and glial activation in rats. *Neurosci Lett* 2015; 584:276–81.
 - 14) Niino M, Sato S, Fukazawa T, Yoshimura S, Hisahara S, Matsushita T, Isobe N, Yoshida K, Houzen H, Miyazaki Y, Shimohama S, Kikuchi S, Kira J-I. Latitude and HLA-DRB1 alleles independently affect the emergence of cerebrospinal fluid IgG abnormality in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2015
 - 15) Yokote H, Nose Y, Ishibashi S, Tanaka K, Takahashi T, Fujihara K, Yokota T, Mizusawa H. Spinal cord ring enhancement in patients with neuromyelitis optica. *Acta Neurol Scand*. 2015 Jan 7.
 - 16) Oryoji D, Ueda S, Yamamoto K, Yoshimura Noh J, Okamura K, Noda M, Watanabe N, Yoshihara A, Ito K, Sasazuki T. Identification of a Hashimoto Thyroiditis Susceptibility Locus Via a Genome-wide Comparison With Graves' Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100:E319–24.
 - 17) Ogata H, Matsuse D, Yamasaki R, Kawamura N, Matsushita T, Yonekawa T, Hirotsu M, Murai H, Kira J-I. A nationwide survey of combined central and peripheral demyelination in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 2015; :jnnp-2014-309831.
 - 18) Matsushita T, Madireddy L, Sprenger T, Khankhanian P, Magon S, Naegelin Y, Caverzasi E, Lindberg RLP, Kappos L, Hauser SL, Oksenberg JR, Henry R, Pelletier D, Baranzini SE. Genetic associations with brain cortical thickness in multiple sclerosis. *Genes Brain Behav* 2015;
 - 19) Niino M, Sato S, Fukazawa T, Masaki K, Miyazaki Y, Matsuse D, Yamasaki R, Takahashi E, Kikuchi S, Kira J-I. Decreased serum vitamin D levels in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2015; 279:40–5.
2. 学会発表
- 1) 新野正明. 多発性硬化症における高次脳機能障害. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 2) 河内泉, 佐治越爾, 西澤正豊. 多発性硬化症における灰白質病変 – 認知機能障害の観点から –. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 3) 新野正明, 深澤俊行, 宮崎雄生, 南尚哉, 網野格, 藤木直人, 土井静樹, 菊地誠志. 多発性硬化症における末梢血単核球からのサイトカイン産生におけるビタミンDの影響. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 4) 西原秀昭, 清水文崇, 佐野泰照, 安部真彰, 前田敏彦, 大石真莉子, 佐野宏徳, 神田隆. fingolimodがヒト血液脳関門構成血管内皮細胞株に与える影響の検討. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 5) 田中正美, 田中恵子. 急性中枢神経脱髄性疾患における抗MOG抗体. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 6) 水野昌宣, 鈴木真紗子, 米澤久司, 寺山靖夫, 深浦彦彰. ナタリツマブからフィンゴリドへ薬剤変更した2症例. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 7) 前田敏彦, 佐野泰照, 安部真彰, 清水文崇, 大石真莉子, 佐野宏徳, 西原秀昭, 田崎彩子, 神田隆. 抗AQP4抗体が血液脳関門を越

- えるメカニズムの解析. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
- 8) 竹下幸男, Obermeier, Birgit, Cotleur, Anne, 清水文崇, 佐野泰照, Thomas, Kryzer, Lenon, Vanda, 神田隆, Ransohoff, Richard. The effect of Neuromyelitis optica (NMO)-IgG at the Blood-Brain Barrier. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 9) 大石真莉子, 佐野泰照, 清水文崇, 安部真彰, 前田敏彦, 西原秀昭, 古賀道明, 神田隆. アストロサイトのAQP4蛋白発現を制御する因子の解析. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 10) 藤井ちひろ, 岡田洋一郎, 木村公俊, 笠井高士, 徳田隆彦, 中川正法, 松本禎之, 高橋良輔, 越智博文, 近藤誉之, 水野敏樹. 視神経脊髄炎におけるCD56+T細胞の検討. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 11) 越智博文. Benign MSとは? 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 12) 能勢裕里江, 三條伸夫, 横田隆徳, 水澤英洋. 視神経脊髄炎患者における認知機能と脳萎縮の関連性. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 13) 伊藤陽子, 三條伸夫, 能勢裕里江, 横田隆徳, 水澤英洋. 多発性硬化症におけるIFN β 製剤の有効性と安全性の検討. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 14) 馬嶋貴正, 三條伸夫, 椎野顯彦, 松田博史, 横田隆徳, 水澤英洋. 多発性硬化症患者における認知機能障害とMRIでの大脳皮質, 白質萎縮部位との相関解析. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 15) 市野瀬慶子, 大久保卓哉, 町田明, 能勢裕里江, 水澤英洋, 横田隆徳. 中枢性脱髄性疾患の髄液におけるmiRNAプロファイリング解析(第2報). 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 16) 宮本勝一, 上野莉乃, 森口幸太, 義江修, 楠進. Chemokine receptor blockade for the treatment of EAE. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 17) 奥野龍禎, 甲田亨, 宮本勝一, 中辻裕司, 高田和城, 木下允, 楠進, 熊ノ郷淳, 望月秀樹. 血清Sema4A高値を示すNMO spectrum disordersの特徴. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 18) 荒木学, 松岡貴子, 宮本勝一, 楠進, 岡本智子, 村田美穂, 三宅幸子, 荒浪利昌, 山村隆. 視神経脊髄炎に対する抗IL-6受容体抗体トシリズマブ治療の有効性の検討. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 19) 穂苅万李子, 河内泉, 佐治越爾, 荒川武蔵, 横関明子, 豊島靖子, 柿田明美, 高橋均, 西澤正豊. Neuromyelitis optica脊髄炎局所におけるTH1細胞の役割. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 20) 清水優子, 中島一郎, 大橋高志, 横山和正, 高橋利幸, 藤原一男, 内山真一郎. NMO spectrum disordersの妊娠・出産に伴う再発因子の検討. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 21) 甲田亨, 中辻裕司, 奥野龍禎, Honorat, Joseph, 高田和城, 多田智, 木下允, 佐古田三郎, 熊ノ郷淳, 望月秀樹. Sema4Aの多発性硬化症治療効果予測マーカーとしての検証～EAEを用いた解析より～. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 22) 中辻裕司, 高田和城, 加藤弘樹, 下瀬川恵久, 奥野龍禎, 甲田亨, Honorat, Joseph, 木下允, 多田智, 畑澤順, 望月秀樹. 11C-acetate PETは多発性硬化症の画像バイオマーカーとして有用である. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 23) 高田和城, 中辻裕司, 木下允, 奥野龍禎, 甲田亨, 富田貴之, 武井雅也, 萩原幸一郎, 佐古田三郎, 望月秀樹. 食餌成分(酵母)の腸管免疫を介した多発性硬化症病態への影響. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 24) 渡邊充, 眞崎勝久, 山崎亮, 川ノ口潤, 竹内英之, 錫村明生, 吉良潤一. Th1細胞によるアストロサイトのコネクシン発現抑制作用. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 25) Li GR, Yamasaki R, Kira J. Functional analysis of Notch4 in EAE pathology. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 26) 佐藤眞也, 山本健, 松下拓也, 磯部紀子, 河野祐治, 吉村怜, 飯沼今日子, 渡邊充, 米川智, 眞崎勝久, 山崎亮, 吉良潤一. 多発性硬化症および視神経脊髄炎におけるT細胞受容体遺伝子領域のコピー数多型の同定. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 27) 松下拓也, 佐藤眞也, 山本健, Gourraud P, Baranzini S, Oksenberg J, 吉良潤一. 日本人多発性硬化症・視神経脊髄炎患者を対象としたゲノムワイド関連解析. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 28) 松下拓也. 多発性硬化症のリスク遺伝子. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 29) Yoshimura S, Isobe N, Matsushita T, Masaki T, Sato S, Kawano Y, Ochi H, Kira J. Genetic and infectious burdens affect CSF IgG abnormality in Multiple Sclerosis. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 30) 河野祐治, 松下拓也, 眞崎勝久, 米川智, 佐藤眞也, 吉良潤一, 土井晃一郎, 吉村淳, 森下真一. 多発性硬化症一卵性双生児不一致例でのゲノムの相違. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月21-24日
 - 31) Kira J. "Westernization" of Multiple Sclerosis in Japan: Genetic and Environmental Backgrounds Underlying The Rapid Changes in Epidemiological and Clinical Features of Multiple Sclerosis in Japanese. DFG-JSPS Symposium Shared Pathway in CNS Disorders. Munich,

- 30 Jun. – 2 Jul. 2014
- 32) 山崎亮. 中枢神経炎症性・変性疾患病態形成における単球とミクログリアそれぞれの役割
Differential roles of monocytes and microglia in CNS inflammations and degenerations. MSサマーカレッジ2014, 福岡, 2014年8月2-3日
- 33) Li GR, Yamasaki R, Kira J. Functional analysis of Notch4 in mouse EAE pathology. 第26回日本神経免疫学会, 金沢, 2014年9月4-6日
- 34) Song ZY, Kawano Y, Yoshimura S, Watanabe M, Imamura S, Yonekawa T, Masaki K, Matsushita T, Yamasaki R, Kira J. The peripheral blood T-cell subsets dynamics of oral fingolimod (FTY720) treated multiple sclerosis (MS) patients. 第26回日本神経免疫学会, 金沢, 2014年9月4-6日
- 35) 松下拓也, 佐藤真也, 山本健, Madireddy L, Baranzini S, Oksenberg J, 吉良潤一. 多発性硬化症の発症に関わるタンパクネットワーク. 第26回日本神経免疫学会, 金沢, 2014年9月4-6日
- 36) Shinoda K, Sun X, Oyamada A, Yamada H, Kira J, Yoshikai Y. CD30 ligand is a new therapeutic target for central nervous system autoimmunity. 第26回日本神経免疫学会, 金沢, 2014年9月4-6日
- 37) Kira J. Early disruption of the glial syncytium via connexins and energy transporters in demyelinating disorders. 第37回日本神経科学大会, 横浜, 2014年9月11-13日
- 38) Kawachi I, Yokoseki A, Saji E, Hokari M, Yanagawa K, Nishizawa M. Clinical and radiological profiles of anterior visual pathway involvement in neuromyelitis optica. 2014 Joint ACTRIMS-ECTRIMS meeting, Boston, 10 to 13 Sep. 2014.
- 39) Niino M, Fukazawa T, Miyazaki Y, Takahashi E, Minami N, Amino I, Fujiki N, Doi S, Kikuchi S. Suppression of IL-10 production by calcitriol in patients with multiple sclerosis. 2014 Joint ACTRIMS-ECTRIMS meeting, Boston, 10 to 13 Sep. 2014.
- 40) Sato S, Yamamoto K, Matsushita T, Isobe N, Kawano Y, Iinuma K, Yonekawa T, Masaki K, Yoshimura S, Yamasaki R, Kira J-I, The Japan Multiple Sclerosis Genetics Consortium. A genome-wide copy number variation study identified T-cell receptor as a susceptibility gene for multiple sclerosis and neuromyelitis optica. 2014 Joint ACTRIMS-ECTRIMS meeting, Boston, 10 to 13 Sep. 2014.
- 41) Matsushita T, Sato S, Yamamoto K, Madireddy L, Gourraud P, Baranzini S, Oksenberg J, Kira J-I, the Japan Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Susceptibility variants for multiple sclerosis in the Japanese population. 2014 Joint ACTRIMS-ECTRIMS meeting, Boston, 10 to 13 Sep. 2014.
- 42) Masaki K, Suzuki SO, Watanabe M, Sato S, Matsushita T, Suzuki M, Iwaki T, Kira J-I. Neuropathological study of glucose and monocarboxylate transporters in multiple sclerosis. 2014 Joint ACTRIMS-ECTRIMS meeting, Boston, 10 to 13 Sep. 2014.
- 43) Miyamoto K, Ueno R, Kadomatsu K, Kitagawa H, Kusunoki S. Chondroitin 6-O-sulfate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. 2014 Joint ACTRIMS-ECTRIMS meeting, Boston, 10 to 13 Sep. 2014.
- 44) Shimizu Y, Fujihara K, Nakashima I, Ohashi K, Yokoyama K, Ikeguchi R, Takahashi T, Uchiyama S, Kitagawa K. Risk of neuromyelitis optica spectrum disorder relapse associated with pregnancy on Japanese patients. 2014 Joint ACTRIMS-ECTRIMS meeting, Boston, 10 to 13 Sep. 2014.
- 45) Takata K, Tomita T, Koda T, Okuno T, Honorat JA, Kinoshita M, Takei M, Hagihara K, Mochizuki H, Sakoda S, Nakatsuji Y. Intestinal microflora modified by *Candida kefyr* reduces the susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. 2014 Joint ACTRIMS-ECTRIMS meeting, Boston, 10 to 13 Sep. 2014.
- 46) 増井徹, 平田誠, 樋野村亜希子, 倉田真由美, 前畑みどり, 冨田まや子, 青木昌子, 田中早苗, 坂手龍一, 渡辺智子, 高橋一朗, 小崎健次郎
「疾患特異的iPS細胞を活用した難病研究への橋渡しプロジェクト」の取り組み. 第37回日本小児遺伝学会学術集会 名古屋 2014年4月10日
- 47) 冨田まや子, 平田誠, 佐々木光穂, 樋野村亜希子, 前畑みどり, 高橋一朗, 増井徹, 山野嘉久, 吉良潤一, 坂手龍一, 勝本真平, 小原有弘, 米田悦啓, 松山晃文 「難病研究資源バンクにおける収集試料のHLAタイピング実施による難病研究の推進」 第23回日本組織適合性学会大会 長崎 2014年9月13-15
- 48) Masaki K, Suzuki SO, Yamasaki R, Watanabe M, Iwaki T, Kira J. Neuropathological Study of Glucose and Lactate Transporters in Demyelinating Disorders. 第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学学会大会合同年会, 2014年9月29-10月1日.
- 49) Sato S, Yamamoto K, Matsushita T, Isobe N, Kawano Y, Iinuma K, Watanabe M, Yonekawa T, Masaki K, Yoshimura S, Yamasaki R, Kira J. Deletion-type copy number variations at T cell receptor genes confer susceptibility to multiple sclerosis and neuromyelitis optica. American Neurological Association Annual Meeting 2014. Baltimore, 12-13 Oct.

- ct. 2014
- 50) Matsushita T, Sato S, Yamamoto K, Madireddy L, Gourraud P, Baranzini S, Oksenberg J, Kira J. Genome-wide Association Study for Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica in the Japanese Population. PACTRIMS 2014, Taipei, 6-8 Nov. 2014
- 51) Song ZY, Kawano Y, Sato S, Imamura S, Yonekawa T, Masaki K, Matsushita T, Yamasaki R, Kira J. Peripheral blood T cell alterations in myelitis with various causes. PACTRIMS 2014, Taipei, 6-8 Nov. 2014
- 52) Nakamura Y, Matsushita T, Sato S, Niino M, Fukazawa T, Yoshimura S, Hisahara S, Isobe N, Shimohama S, Yoshida K, Houzen H, Miyazaki Y, Kikuchi S, Kira J. Multiple Sclerosis Susceptibility/Resistance and Clinical Manifestations are Determined by HLA-DRB1 Alleles and Latitude in Japanese Patients. PACTRIMS 2014, Taipei, 6-8 Nov. 2014
- 53) Sato S, Yamamoto K, Matsushita T, Isobe N, Kawano Y, Iinuma K, Watanabe M, Yonekawa T, Masaki K, Yoshimura S, Yamasaki R, Kira J. Copy number variations in T cell receptor loci are associated with susceptibility to multiple sclerosis and neuromyelitis optica. 12th International Congress of Neuroimmunology. Germany. 9-13 Nov. 2014.
- 54) 宋子夜, 佐藤真也, 中村優理, 磯部紀子, 吉村怜, 眞崎勝久, 河野祐治, 松下拓也, 吉良潤一. 脊髄炎を呈する炎症性中枢神経疾患のT細胞サブセットの解析と遺伝的背景の解析:現状と今後の展開. 厚生労働省難治性疾患(神経免疫疾患)政策および実用化研究班 平成26年度合同班会議, 東京, 2014年1月21-22日
- 55) 松下拓也, 佐藤真也, 中村優理, 磯部紀子, 吉村怜, 眞崎勝久, 河野祐治, 吉良潤一. 多発性硬化症・視神経脊髄炎の全ゲノム関連解析の成績と今後の研究の方向性. 厚生労働省難治性疾患(神経免疫疾患)政策および実用化研究班 平成26年度合同班会議, 東京, 2014年1月21-22日
- 56) 吉良潤一, 佐藤真也, 中村優理, 磯部紀子, 吉村怜, 眞崎勝久, 河野祐治, 松下拓也, 山崎亮, 新野正明, 深浦彦彰, 田中正美, 越智博文, 神田隆, 横田隆徳, 松井真, 楠進, 寺山靖夫, 西澤正豊, 大橋高志, 西山和利, 中辻裕司, 越智一秀, 松山晃文, 樋野村垂希子, 錫村明生, 山本健, 辻省次, 下濱俊. MS生体試料バンクを活用したアジア人特有の遺伝環境因子探索による病態解明研究班 概要説明:全国多発性硬化症臨床情報・生体試料バンクの樹立と研究の方向性. 多発性硬化症・視神経脊髄炎の全ゲノム関連解析の成績と今後の研究の方向性. 厚生労働省難治性疾患(神経免疫疾患)政策および実用化研究班 平成26年度合同班会議, 東京, 2014年1月21-22日
- 57) 深浦彦彰, 水野昌宣, 大塚千久美, 久保田昭洋, 田中覚, 小島美紀, 伊崎祥子, 三井隆男, 横山和正, 山形宗久, 田中乾一, 西城健, 寺山靖夫, 野村恭一. 多発性硬化症/視神経脊髄炎患者の客観的・定量的QOL評価の試み. 厚生労働省難治性疾患(神経免疫疾患)政策および実用化研究班 平成26年度合同班会議, 東京, 2014年1月21-22日
- 58) 西郷和真, 吉村怜, 泉川友美, 松下拓也, 磯部紀子, 小池敏靖, 宮本勝一, 平野牧人, 田原康玄, 三木哲郎, 北川裕之, 吉良潤一, 楠進. プロテオグリカン糖鎖合成酵素の遺伝子多型と多発性硬化症の関連. 厚生労働省難治性疾患(神経免疫疾患)政策および実用化研究班 平成26年度合同班会議, 東京, 2014年1月21-22日
- 59) 八木洋輔, 宮田悠, 市野瀬慶子, 能勢裕里江, 町田明, 西田陽一郎, 大久保卓哉, 横田隆徳. 多発性硬化症・視神経脊髄炎の体液中miRNAの発現解析研究. 厚生労働省難治性疾患(神経免疫疾患)政策および実用化研究班 平成26年度合同班会議, 東京, 2014年1月21-22日
- 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
なし

多発性硬化症・視神経脊髄炎の全ゲノム関連解析の成績と今後の研究の方向性

班員： 松下拓也¹，河野祐治²，吉良潤一²

共同研究者： 佐藤真也²，中村優理²，磯部紀子²，吉村怜²，眞崎勝久²

1. 九州大学大学院医学研究院神経治療学

2. 九州大学大学院医学研究院神経内科学

研究要旨：多発性硬化症（MS）の発症には環境的・遺伝的要因の双方が関連していることが知られている。遺伝的要因についてはヨーロッパ人種を対象としたゲノムワイド関連解析（GWAS）により多数の SNP がリスク因子として報告されているが、日本人を含むアジア人種では GWAS は行われておらず、どの程度ヨーロッパ系人種における遺伝的リスクを共有しているのか、またアジア人特有の MS の遺伝的リスクが存在するかは明らかにされていない。また視神経脊髄炎（NMO）については、遺伝的リスクの詳細はほとんど分かっていない。私たちは Japan MS Genetic Consortium (JMSGC) によって収集した MS・NMO の DNA を用いて、日本人 MS、NMO の発症リスクとなる遺伝領域を GWAS により検索、幾つかの関連領域を明らかにした。これらのリスク遺伝子はヨーロッパ系人種 MS におけるリスクと共通するものの、日本人特有に関連を持つ領域も検出された。今後、追加試料による追試を行うとともに、関連遺伝子の免疫学的機能に与える影響について検討する。

【背景】多発性硬化症（multiple sclerosis; MS）の日本における有病率は、2003年に行われた全国調査により10万人あたり7.7人の有病率と推計されており¹⁾、比較的まれな神経疾患である。一方でヨーロッパ諸国、アメリカといったヨーロッパ系人種ではその有病率は10万人あたり100人を超える。このように人種、地域によって有病率は異なるものの、MSは世界各地で、特定の家系に限定されることなく観察される common disease である。MSの遺伝性（heritability）は双子研究を含む丹念な家系調査により明らかにされてきた。またヒト白血球抗原（human leukocyte antigen: HLA）がこの遺伝性の一部を担っていることは古くから知られている。MS発症の機序については不明な点が多く、遺伝的リスク領域の同定はその病態理解を助け、有効な治療法の開発につながると期待されており、Common Disease, Common Variant (CDCV) 仮説に基づき、一塩基多型（single nucleotide polymorphism: SNP）をマーカーとした全ゲノム関連解析（genome-wide asso-

ciation study: GWAS）が精力的に行われてきた²⁾³⁾。その結果、多くの関連遺伝領域が同定され、MSの病態に新たな知見を加えることとなったが、これらのGWASはヨーロッパ系人種でのみ行われている。MSの頻度の人種差は主に遺伝的背景の違いに起因すると考えられており、またその表現型にも差異が見られる。アジア人種でのMSを対象としたGWASが行われることで日本人特有の関連遺伝子や特定の表現型に関わる関連遺伝領域を同定できる可能性がある。また同様に中枢神経系に脱髄をきたす疾患である視神経脊髄炎（neuromyelitis optica）についてはその遺伝的関連については限定的に報告されているのみである⁴⁾。

【目的】日本人MS、NMO患者を対象としたGWASを行い、その遺伝的リスク要因を明らかにする。

【方法】

JMSGCにおいて収集された検体のうち、Discovery cohortとしてMS 261名、NMO 129名、

健常者 843 名, replication cohort として MS 292 名, NMO 75 名, 健常者 905 名についてゲノムワイド SNP ジェノタイピングを行った. 双方のコホートを併せ, MS 553 名と健常者 1,798 名, NMO 200 例と健常者 1,752 名を対象に SNP 関連解析を行った.

【結果】MS については, MHC 領域以外に 26 の遺伝領域 (うち 2 つはヨーロッパ人種での相関が確認されている領域), NMO では 33 の遺伝領域の関連が確認された (図 1). MS と NMO では関連領域に重複は見られなかった. ヨーロッパ人種で MS のリスクとして同定された 110 の SNP のうち, 97 の SNP について検証が可能であったが, そのうち 13 の SNP が日本人においてもリスク因子として再確認された. ヨーロッパ人種での MS リスク SNP を用い, MS の遺伝的リスク負荷 (MS genetic burden; MSGB) を計量し健常者と比較したが, 日本人においても健常者より MS で MSGB スコアが有意に高かった ($p = 3.09 \times 10^{-17}$). また MSGB スコアは NMO でも健常者と比較して有意に高かった ($p = 0.014$) (図 2).

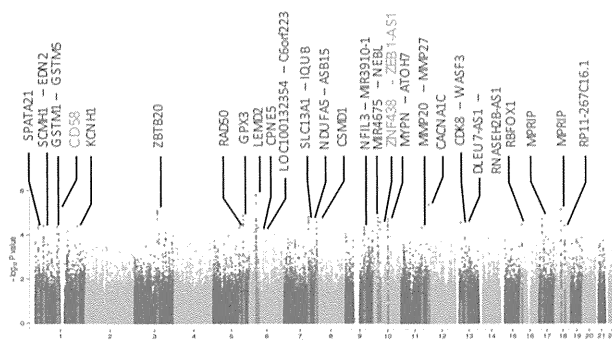
【結論】日本人 MS でもヨーロッパ人種における遺伝的リスクを共有しているが, 日本人 MS でのみ見られるリスク領域も存在する. また NMO の遺伝的リスクは MS とは異なるが, リスク傾向は一部 MS と共有している. 今後, 追加症例による関連領域の追試, 今回確認されたリスクと重症度・画像所見との関連を解析するとともに, リスクアレルと近傍遺伝子の発現量の相関と生物学的機能の変化について明らかにする.

文献

1. Osoegawa M, Kira J, Fukazawa T, et al: Temporal changes and geographical differences in multiple sclerosis phenotypes in Japanese: nationwide survey results over 30 years. *Mult Scler* 15:159– 173, 2009
2. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer S, et al: Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476:214– 219, 2011
3. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Beecham AH, Patsopoulos NA, et al: Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 45:1353– 1360, 2013
4. Kim HJ, Park H-Y, Kim E, Lee K-S, Kim K-K, Choi B-O, Kim SM, Bae JS, Lee SO, Chun JY, et al. Common CYP7A1 promoter polymorphism associated with risk of neuromyelitis optica. *Neurobiol Dis* 37:349– 55, 2010

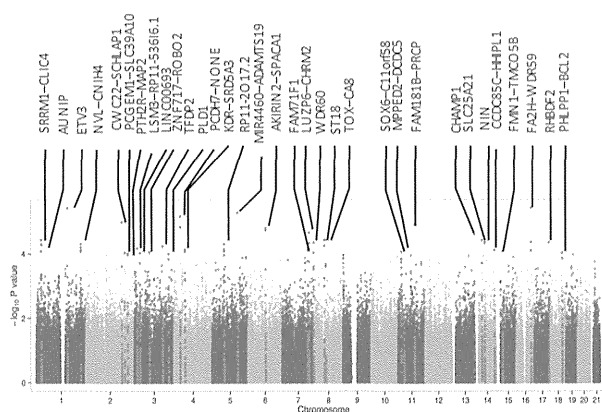
図 1. MS および NMO の GWAS 結果の manhattan plot (MHC 領域を除く)

MS (case 554, control 1,798)



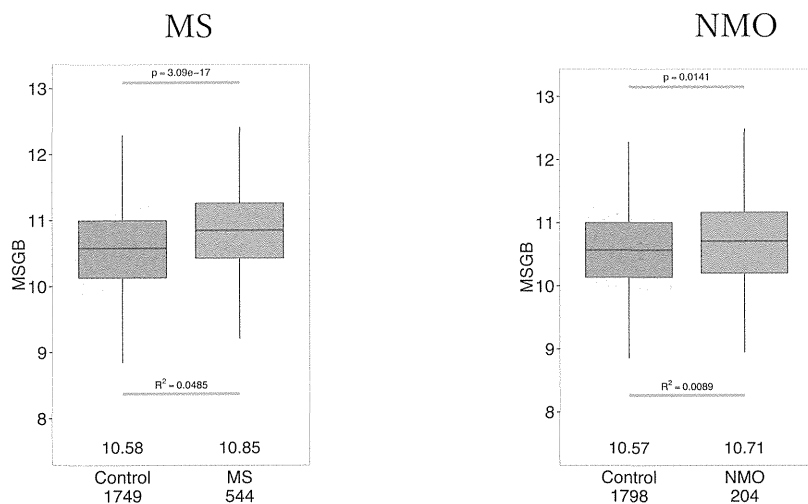
26 non-MHC risk loci (FDR-corrected $P < 0.05$)
2領域はヨーロッパ系人種と同じ領域

NMO (case 200, control 1,752)



33 suggestive non-MHC risk loci ($P < 1.0 \times 10^{-4}$)

図 2. MS genetic burden の比較



II. 委託業務成果報告（業務項目） 遺伝・環境因子のリスク解析

多発性硬化症・視神経脊髄炎の体液中 miRNA の発現解析研究 今後の研究の方向性

班員 横田隆徳¹⁾

共同研究者 八木洋輔¹⁾, 宮田悠¹⁾, 市野瀬慶子¹⁾, 能勢裕里江¹⁾, 町田明¹⁾,
西田陽一郎¹⁾, 大久保卓哉¹⁾

研究要旨

マイクロ RNA (miRNA) は 21-25 塩基長の small non-coding RNA であり、転写後発現調節に関与する。体液中に含まれる miRNA は多くの疾患において、病態や疾患の伝搬や進行に関与していることが報告されている。神経疾患においても病態に関与していることが示唆されており、その解析は疾患バイオマーカーの発見や、病態生理の解明に有用であると考えられる。今回、我々は多発性硬化症 (MS) および神経脊髄炎 (NMO) 患者の再発時における髄液の miRNA プロファイルを網羅的に解析し、両疾患において正常と比較して発現の変化している miRNA を同定した。現在、MS においては miRNA に関する知見が多く集積されつつあり、バイオマーカーや予後予測因子としての発展が期待される。また、NMO においては miRNA についての所見はほとんど報告されておらず、今後の探索が重要な領域であるといえる。

研究目的

体液中に含まれるマイクロ RNA (miRNA) は、がんや炎症性疾患領域において病態やその疾患の伝搬や進行に関与していることがこれまで数多く報告されており、疾患バイオマーカーとしての役割が示唆されている。各種の神経疾患においても miRNA は病態に関与していることが示唆されており、その解析は疾患バイオマーカーの発見や、病態生理の解明に有用であると考えられる。また、血液、髄液の液性成分に含まれる circulating miRNA は分解されにくく安定であることが知られている。

多発性硬化症 (MS) においても、miRNA に関する報告は増加する傾向にある。2009 年に MS 患者の血液や病変の miRNA プロファイルが報告された。これ以降、MS において miRNA の病態への関与、バイオマーカーとしての可能性を示唆する報告は増加傾向にある。2012 年には MS 患者の髄液中 miRNA が鑑別に有用であることが、2014 年には miR-26a-5p が INF- β への反応性のマーカーとなる可能性が報告された。一方、NMO についての所見は乏しい。

今回、我々は MS および NMO 症例において急性期の髄液 miRNA を網羅的に解析し、miRNA プロファイルを比較検討した。

1) 東京医科歯科大学大学院
脳神経病態学分野（神経内科）

研究方法

正常対照群 10 例，MS 患者 3 例，NMO 患者 3 例に対して，miRNA アレイ（3D-Gene®，東レ）を用いた miRNA の網羅的解析を行った．アレイシグナル値を独自の方法による標準化を行った後個々の miRNA の発現量を正常対照群と網羅的に比較検討した．

本研究は本学医学部倫理審査委員会の承認のもとに行われた．

研究結果

自験例の検討では，正常対照群と MS 群で有意差のある miRNA は 1 種類，正常対照群と NMO 群で有意差のある miRNA は 7 種類であった (Welch 検定, $p < 0.00001$)．これらの miRNA は正常対照群と疾患群の鑑別において 100%の曲線下面積 (AUC) を有していた．

考察

最近の報告や自験例の解析結果から MS において miRNA はバイオマーカーとして、あるいは治療反応性マーカーとしての発展が期待される．さらに，通常の保存血清や髄液中の miRNA の方が，抽出した RNA よりもはるかに安定であり，MS のバンキングにおいて，保存血清や髄液を用いた circulating miRNA の解析は有望であると考えられる．

また，MS 患者において，miRNA プロファイルに人種差が存在する可能性が示唆されており，本邦での所見の集積は極めて重要であると考えられる．

結論

miRNA は MS，NMO のバイオマーカーとして有用と考えられる．欧米での治験を本邦でも検証していくと同時に，新規の治療反応性マーカー等の探索が望まれる．

文献

- Kosik. Nat Rev Neurosci 2006
- Baraniskin et al. Blood 2011
- Ma et al. Int J Med Sci 2014
- Otaegui et al. PLoS ONE 2009
- Keller et al. PLoS ONE 2009
- Junker et al. Brain 2009
- Haghikia et al. Neurology 2012
- De Felice et al. BMC Med Genomics 2014
- Yang et al. J Mol Neurosci 2014

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

なし

抗 NMDA 受容体脳炎における治療の現状と問題点

班 員：西山和利

共同研究者：飯塚高浩，井島大輔，富永奈保美，金子淳太郎

所属：北里大学医学部神経内科学

研究要旨：抗 NMDA 受容体脳炎は，NR1 subunit 上の細胞外立体的エピトープを認識する IgG 抗体によって生じる疾患である。本疾患は卵巣奇形腫を有する若年女性に好発するが，性別や腫瘍の有無に関係なくあらゆる年齢層で発症し得る。統合失調症，痙攣，CJD，seronegative NMO，脱髄性疾患，HSV 脳炎でも本抗体が検出され，臨床スペクトラムの多様性が指摘されているが，慎重に判断する必要がある。本疾患は治療反応性とされているが，約半数は第一選択免疫療法や腫瘍切除は無効であり，死亡率は約 7%，発症 24 ヶ月後も約 20%に高度の後遺症を認める。難治例では第二選択免疫療法（cyclophosphamide と rituximab）の早期開始が推奨されているが，本邦では未承認のため，十分な免疫治療ができないのが現状である。

はじめに

イオン型グルタミン受容体の 1 つである

n-methyl-D-aspartate 受容体（NMDAR）は，2 つの NR1 subunit と 2 つの NR2 subunit のヘテロ 4 量体で構成されており，ニューロンのシナプス後膜に cluster を形成し，シナプスの可塑性や記憶および学習に関与している。NR subunit には ligand-binding domain（LBD）があり，NR1 subunit にはグリシンが，NR2 subunit にはグルタミン酸が結合する。LBD の N 末端側には amino-terminal domain

（ATD）が存在する。抗 NMDAR 脳炎は，NR1 subunit の ATD 上にある立体的エピトープを認識する IgG 抗体によって生じる疾患である^{1,3}。本疾患は 2007 年に報告されたが，その後，患者数は指数関数的に増加し，2013 年には世界 35 カ国から収集された約 500 例の長期予後調査結果も報告され⁴，本邦も含め若年者では稀ではない疾患と認識されるようになった。最近では，多発性硬化症や視神経脊髄炎との合併例も報告されている。本邦における診断・治療の現状と問題点を述べる。

本疾患の診断と治療

2011 年に Dalmau らのグループから本疾患に対する治療戦略が提唱された^{1,3}。本疾患を疑った場合には，まず本抗体を適切な方法で測定し，抗体陽性例では腫瘍を検索する²。画像上卵巣奇形腫が疑われた場合には積極的に腫

瘍を切除する。また，抗体陽性例では，腫瘍の有無に関係なく，ステロイドパルス療法，免疫グロブリン大量療法（IVIg），あるいは血漿交換療法（PE）の第一選択免疫療法を開始する²。しかし，無効例では cyclophosphamide の大量静注療法（IVCPA）と rituximab の単独あるいは両者併用の第二選択免疫療法を早期に投与する。これらの治療に反応した症例では，mycophenol mofetil あるいは azathiopurine を 1 年程度投与するが，無反応例では，methotrexate の経口あるいは静脈投与を行うなどの治療戦略が記載されている²。2013 年に報告された長期予後調査結果⁴では，81%は 24 ヶ月後の機能予後良好（mRS 0~2）と報告されたが，回復するまでにかかる時間が非常に長いことが示された。死亡率は 4~7%，第一選択免疫療法は約半数にしか奏効しないこと，第二選択免疫療法を受けた群が，受けなかった群より予後が良いことも示された。全体としての長期予後は良好であるが，いずれの治療にも反応しない症例が約 10~20%存在する。これらの難治例をどのように改善するかが求められている。

難治例に遭遇した際の診断・治療上の留意点

本疾患の診断で治療を開始したが，改善の兆しが全く見えない症例に遭遇することがある。そのような難治例に遭遇した際の留意点を表 1⁶に示す。

確定診断がついていない場合(即ち、臨床的に本疾患が強く疑われる、あるいは何らかの方法で抗 NMDAR 抗体が陽性と判定されている場合)には、表 1 に示した 6 項目を確認する。まず、本当に抗 NMDAR 脳炎なのかを再確認する。どの施設で、どの検体を用い、どの方法で抗体測定したかを確認する。確定診断がついていなければ、予後や治療方針について何も語るができない。本抗体の最重要エピトープは、NR1 subunit 上の ATD の一部であることが判明しており³、Cell Based Assay (CBA)とは異なる方法で測定された NR1 や NR2 subunit の線状エピトープを認識する抗体とは異なる抗体である。

次に、偽陽性の可能性はないかを考える。血清のみを用いて、CBA で抗体測定した場合の偽陽性率は 0~3%、偽陰性率は 13%である。低力価の血清抗体の臨床的意義は不明あるいは殆どないと考えられている。従って、髄液で抗体を検査しなければならない。また、CBA と immunohistochemistry (IHC)で抗体を測定し、両者が陽性の場合にのみ、抗体陽性と判定すべきであると Dalmau らは述べている。

てんかん重積を生じている場合に注意が必要である。痙攣重積発作は、抗 NMDAR 脳炎より、AMPA、GABA_AR あるいは GABA_BR 抗体を有する脳炎の方が生じやすいため、これらを鑑別する必要がある。即ち、これら抗 NMDAR 抗体以外の抗体の有無を確認する必要がある。また、これらの抗体が検出されない NORSE や AERRPS と呼ばれている原因不明の重症の痙攣重積型脳炎と混同してはならない。病態と予後が全く異なるからである。また、本疾患と古典的な傍腫瘍性辺縁系脳炎とを混同してはいけない。後者は細胞傷害性 T 細胞が主に関与しており、一般に治療に対する反応は不良である。

また、脱髄病変の有無を確認することも重要である。抗 NMDAR 抗体陽性者 691 例中 23 例 (3%) に脱髄病変を認め、その 23 例中 9 例 (39%) に抗 MOG 抗体を、他の 9 例 (39%) に抗 AQP4 抗体が検出された⁶。一方、典型的な脳炎を呈した群では、抗 NMDAR 抗体陽性者 50 例中 3 例 (6%) に抗 MOG 抗体を、1 例 (2%) に抗 AQP4 抗体が検出されることが報告された⁶。このことから、抗 NMDAR 脳炎で脱髄病変を生じた場合、その約 80%に抗 AQP4 抗体あるいは抗 MOG 抗体が検出されること、逆に、脱髄疾患でも不随意運動や精神症状を有する場合に

は抗 NMDAR 抗体も関与している可能性が示された。従って、同一症例に複数の抗体が複合的に関与している可能性があることを考慮する必要がある。

最後に、抗 NMDAR 抗体以外の抗細胞表面抗原抗体も測定したかを振り返って考える必要がある。抗 NMDAR 抗体が陰性でも、他の抗細胞表面抗原抗体が否定された訳ではない。

確定診断することが治療の出発点であり、「疑い」では保険適用のない第二選択免疫療法を開始することはできない。疑診例では、凍結保存した血清と髄液を、CBA と IHC の両法で検査している適切な機関に送り、抗 NMDAR 抗体のみならず、可能ならば、その他の抗細胞表面抗原抗体を同時に測定することが望ましい。

次に、確定診断がついている場合(即ち、CBA と IHC の両方で抗 NMDAR 抗体が確認されている場合)には、脳の器質的損傷の有無を確認する。本疾患は可逆性と言われているが、重度の痙攣重積状態が持続した症例、炎症細胞浸潤等により明らかに脳実質に器質的損傷を生じた症例、あるいは低酸素血症などの全身合併症によって脳が高度に障害された症例では予後不良である。しかし瀰漫性に脳が萎縮している症例でも治療により回復し得ることから、「脳の瀰漫性萎縮」のみをもって予後不良と判断してはならない^{7,8}。

次に卵巣奇形腫を再度確認する。奇形腫が確認された症例では腫瘍を切除する。しかし、画像検査にも限界があり、剖検時 7mm の卵巣嚢胞がみつき、組織学的に成熟奇形腫と診断された 24 歳女性も報告されている。難治例で両側正常卵巣が切除された症例もあるが、数年以上かけて緩徐に回復し得る疾患であり、明らかな奇形腫がない限り正常卵巣は温存したい。

抗体の髄内持続産生の有無を評価する。具体的には髄液中の抗体価と oligoclonal bands を評価する。血管周囲腔や間質には形質芽球と形質細胞が存在しており、本疾患では髄内で抗体が産生されていると考えられている。PE や IVIg が髄内持続産生を抑制するとは考え難い。難治例では早期からより強力な免疫療法が必要である。

急性期に十分な免疫療法が実施されているか、また、第二選択免疫療法は実施されているかを確認する。免疫療法未実施例では、第一選択免疫療法を開始すべきである。しかし、実際には約半数しか反応しない⁴。無効例で

は第二選択免疫療法が推奨されているが、IVCPA は本邦では保険適用外であり、重篤な副作用、発癌性、性腺機能不全などの危険性があることから敬遠されていることが多い。また、rituximab も適用外で、高額なこともあり、本邦では使用困難である。しかし、第二選択免疫療法未実施例では、IVCPA を月1回、計1～6回程度は使用した。第二選択免疫療法無効例では、mycophenolate mofetil, alemtuzumab, methotrexate あるいは bortezomib が用いられているが有効性が証明されている治療法はない。

免疫抑制剤の投与期間についても結論は出ていない。抗体価の推移は参考になるが、血清中の抗体が消失しても高度な神経後遺症が残存している症例も少なくない。髄液抗体価の方が血清抗体価より臨床症状を反映していると言われているが、完全回復にも関わらず、15年間髄液中に抗体が検出された症例も報告されている。髄液中の抗体が陰性化するまで免疫抑制剤を継続する必要性はないが、1年間は何らかの免疫抑制剤を継続し、再発の可能性を考慮し、臨床症状をみながら中止時期を判断する。

おわりに

現時点で必要と思われる診断・治療上の留意点を述べた。本邦でも上記薬剤が早期に承認されることを期待する。

COI：本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

文献

1. Dalmau J, et al. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol*. 2007;61:25-36.
2. Dalmau J, et al. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurol*. 2011;10:63-74.
3. Gleichman AJ, et al. Anti-NMDA receptor encephalitis antibody binding is dependent on amino acid identity of a small region within the GluN1 amino terminal domain. *J Neurosci*. 2012;32:11082-94.
4. Titulaer MJ, et al. Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-NMDA receptor encephalitis: an observational cohort study. *Lancet Neurol*. 2013;12:157-65.
5. Titulaer MJ, et al. Overlapping demyelinating syndromes and anti-NMDA receptor encephalitis. *Ann Neurology*. 2014;75:411-428.
6. 飯塚高浩他：抗 NMDA 受容体脳炎における臨床スペクトラムと治療戦略：現状と問題点。 *臨床神経*. 2014;54(12):1098-1102.
7. Iizuka T, et al. Anti-NMDA receptor encephalitis in Japan. Long-term outcome without tumor removal. *Neurology*. 2008;70:504-11.
8. Iizuka T, et al. Reversible brain atrophy in anti-NMDA receptor encephalitis: a long-term observational study. *J Neurol*. 257:1686-1691,2010.

表1：難治例に遭遇した際の診断・治療上の留意点

(文献6から引用著者改変)

1. 確定診断がついていない場合	2. 確定診断がついている場合
1) 本当に抗 NMDAR 脳炎か？	1) 脳実質に器質的損傷はないか？
2) 偽陽性の可能性はないか？	2) 本当に奇形腫はないか？
3) てんかん重積発作を生じていないか？	3) 髄内で抗体が持続産生されていないか？
4) 古典的な傍腫瘍性辺縁系脳炎の可能性はないか？	4) 急性期に十分な免疫療法がされているか？
5) 脱髄病変はないか？	5) 第二選択免疫療法は受けているか？
6) 抗 NMDAR 抗体以外の抗細胞表面抗原抗体は測定したか？	6) いつまで免疫抑制剤を継続するべきか？

脊髄炎を呈する炎症性中枢神経疾患の T 細胞サブセットの解析と遺伝的背景の解析：現状と今後の展開

班員： 吉良潤一¹，松下拓也²，河野祐治³

共同研究者： 宋子夜¹，佐藤真也¹，中村優理¹，磯部紀子¹，吉村怜¹，眞崎勝久²

1. 九州大学大学院医学研究院神経内科学
2. 九州大学大学院医学研究院神経治療学
3. 国立病院機構大牟田病院神経内科

研究要旨：多発性硬化症(MS)は病理所見や動物モデルでの解析により T リンパ球がその発症に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら他の中枢神経炎症性疾患と比較して、MS において特徴的な機能的 T リンパ球構成については明らかではない。健常者、MS およびアトピー性脊髄炎 (atopic myelitis; AM)，視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica; NMO)，HTML1 関連脊髄炎 (HTML1 associated myelitis; HAM) を対象として末梢血中の T リンパ球を表面抗原、産生サイトカインにより機能的に分類し、その割合を比較した。また、既報告の MS 発症リスクアレルである *IL2RA* の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) 間での T リンパ球構成の比較を行った。今後 T リンパ球サブセットと MS の表現型、予後、治療反応性との関連を解析する。

【背景】

多発性硬化症 (MS) は中枢神経系の慢性炎症性脱髄疾患である。急性期の病理所見では髄鞘を貪食した多数のマクロファージと血管周囲性に T リンパ球、B リンパ球の集簇が見られるが、こうした病理所見は中枢神経組織や髄鞘タンパクを免疫して脳炎を惹起する動物モデル (実験的自己免疫性性脳脊髄炎; experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) と類似している。EAE では脳脊髄炎の惹起に IL-17 を産生するヘルパー T 細胞 (Th17) が決定的な役割を果たす事が明らかとなり^{1,2)}、MS でも Th17 細胞の病態への影響が報告されている³⁻⁵⁾。また sphingosine 1-phosphate (S1P) 受容体に作用する fingolimod は MS、および EAE の炎症状態を抑制するが、主に central memory T 細胞 (Tcm) をリンパ節内部に留める効果があり⁶⁾、Tcm の MS 病態への関わりも注目されている。しかしその他の中枢神経炎症性疾患と比較して、MS における Tcm をはじめとする T 細胞サブセットの特徴については十分解明されておらず、また疾患リスク遺伝子との関連も明らかではない。

【目的】

MS、NMO、AM、および HAM において疾患特異的な T 細胞サブセットパターンを明らかにし、また MS ではリスク遺伝子における多型と T 細胞サブセットパターンとの関連を明らかにする。

【方法】

健常対照 (HC) 18 例、MS 37 例、NMO 12 例、AM 12 例、および HAM 8 例において、末梢血の Naïve T 細胞 (Naïve T, CCR7⁺CD45RA⁺)、central memory T 細胞 (Tcm, CD45RO⁺CCR7⁺)、effector memory T 細胞 (Tem, CD45RO⁺CCR7⁻)、CD45RA effector memory T 細胞 (TemRA, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁻)、抑制性 T 細胞 (Ts, CD8⁺CD28⁻)、制御性 T 細胞 (Treg, CD3⁺CD4⁺CD25^{high}CD127^{low})、サイトカイン (IL17, IFN γ , IL9, IL4) 産生細胞をフローサイトメトリー法で測定した。さらに、32 例の MS 患者において関連が確認されている IL2 receptor alpha (*IL2RA*) の一塩基多型 (rs7090512) との関連を検討した。

【結果】

健常者と比較して、MS は CD8⁺T 細胞の割合が低く、CD4⁺IFN γ ⁺、CD4⁺IL4⁺、CD8⁺IL4⁺T 細胞の割合が高かった。NMO は健常者より CD8⁺Naïve T 細胞の割合が低く、CD4⁺および CD8⁺Ts、CD4⁺および CD8⁺IFN γ ⁺、CD8⁺IL17⁺T 細胞の比率が高かった。HAM では健常者より CD8⁺Naïve と CD4⁺Tcm の割合が低く、CD8⁺Tem、CD8⁺TcmRA、CD4⁺Treg、CD4⁺Ts の比率が高かった。AM では HC と有意な差を認めなかった。

IL2RA -rs7090512 の genotype TT は、CC/TT genotype より CD8⁺Naïve T 細胞の割合が有意に低い一方で、CD8⁺TemRA が高い傾向だった。

【結論】

末梢血メモリーT細胞サブセットおよびサイトカイン産生T細胞サブセットは、脊髄炎ごとに特徴的な変化を示し、その一部はリスク遺伝子多型とも関連していることが示唆された。各脊髄炎でのT細胞サブセットの変化と遺伝的背景の関連を明らかにするためには、今後さらに患者数を増やして解析する必要がある。

文献

1. Harrington LE, et al. Interleukin 17-Producing CD4+ Effector T Cells Develop via a Lineage Distinct From the T Helper Type 1 and 2 Lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123–1132.
2. Park H, et al. A Distinct Lineage of CD4 T Cells Regulates Tissue Inflammation by Producing Interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6:1133–1141.
3. Brucklacher-Waldert V, et al. Phenotypical and Functional Characterization of T Helper 17 Cells in Multiple Sclerosis. *Brain* 2009;132:3329–3341.
4. Durelli L, et al. T-Helper 17 Cells Expand in Multiple Sclerosis and Are Inhibited by Interferon-Beta. *Ann Neurol* 2009;65:499–509.
5. Ramgolam VS, et al. IFN-Beta Inhibits Human Th17 Cell Differentiation. *J Immunol* 2009;183:5418–5427.
6. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer S, et al: Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476:214–219, 2011