

## 免疫性神経疾患における末梢血リンパ球サブセットの意義に関する研究

分担研究者：野村 恭一

所属施設名：埼玉医科大学総合医療センター神経内科

### 研究要旨

免疫性神経疾患のうち、(1)視神経脊髄炎関連疾患(neuromyelitis optica spectrum disorders: NMOSD)、(2)再発寛解型多発性硬化症(relapsing-remitting multiple sclerosis: MS)、(3)重症筋無力症(myasthenia gravis: MG)における末梢血 T・B リンパ球サブセット、およびその変動について検討し、各疾患の病態との関連性を明らかとした。結果、以下のことが示された：(1) NMOSD のうち、AQP4Ab (anti-aquaporin4 antibody)-NMOSD と MOGAb (anti-myelinoligodendrocyte antibody)-NMOSD では、それぞれの病態に関連する末梢血 B 細胞の分段階は異なる。(2) RRMS 症例では、末梢血 T<sub>H</sub> の割合と再発回数は有意に相関する。(3) MG 症例のうち、Late-onset MG では、末梢血 memory B 細胞の割合の低値が特徴である。胸腺腫合併 MG の術後早期における末梢血 plasmablast 割合の一過性増加は、術後での筋無力症状の増悪と関連する可能性がある。また MuSK (Muscle-specific tyrosine-kinase) 抗体陽性 MG における抗体価と臨床経過との関連性についての検討では、抗体価が鋭敏に臨床経過と相関する。

### A. 研究目的

免疫性神経疾患のうち、(1)視神経脊髄炎関連疾患(neuromyelitis optica spectrum disorders: NMOSD)、(2)再発寛解型多発性硬化症(relapsing-remitting multiple sclerosis: MS)、(3)重症筋無力症(myasthenia gravis: MG)における末梢血 T・B リンパ球サブセット、およびその変動について検討し、各疾患の病態との関連性を明らかとすることも目的として各々の疾患について検討した。

### B. 研究方法

各疾患における末梢血リンパ球サブセットの測定は、各疾患の患者から採取した末梢血 2 mL を使用して、T・B リンパ球の各種細胞表面マーカーを染色し、flow cytometry (FACS Canto2 Becton, Dickinson and Company)を用いて測定した。測定項目は T リンパ球；

cytotoxic-T 細胞、活性化 CD8、活性化 CD4、regulatory T 細胞、NK 細胞を含み、B リンパ球では transitional B 細胞、naive B 細胞、memory B 細胞、plasmablast の全リンパ球に占める各項目の割合を測定した。各末梢血リンパ球サブセットと各疾患における臨床的特徴との関連性について後ろ向きに検討した。

本研究のいずれにおいても、倫理面への配慮として当院の倫理委員会の承認を得た。

### C. 研究結果

#### 1. NMOSD

( 1 ) AQP4Ab-NMOSD 24 例 と MOGAb-NMOSD10 例を対象とし末梢血 T・B リンパ球サブセットについて正常対照群(HC)との多重比較検討を行った。末梢血 T リンパ球サブセット・NK 細胞の全リンパ球に占める割合の平均値に群間差はなかった。一方で B リ

リンパ球サブセットについての検討では、transitional B 細胞:MOGAb-NMOSD 2.7 vs AQP4Ab-NMOSD 1.2 vs HC 0.8; naive B 細胞 : MOGAb-NMOSD 15.1 vs AQP4Ab-NMOSD 9.2 vs HC 7.8; Memory B 細胞 ; MOGAb-NMOSD 4.4 vs AQP4Ab-NMOSD 3.5 vs HC 2.9 ; Plasmablast : MOGAb-NMOSD 1.9 vs AQP4Ab-NMOSD 5.2 vs HC 1.7 であり、MOG-SD 群における transitional B 細胞, および naive 細胞の全リンパ球に占める割合の平均は、AQP4Ab-NMOSD 群, および HC 群と比較して有意に高値であり、MOG-SD 群における memory B 細胞の比率の平均値は、HC 群と比較して有意に高値であった。AQP4Ab-NMOSD における plasmablast の B 細胞に占める比率の平均値は MOG-SD 群, および HC 群と比較して有意に高値であった。

( 2 ) AQP4Ab-NMOSD 34 例 , MOGAb-NMOSD 13 例 を 対 象 と し , AQP4Ab-NMOSD と MOGAb-NMOSD の 各 々 の 増 悪 期 と 寛 解 期 に お け る リ ン パ 球 サ ブ セ ャ ッ ト を そ れ ぞ れ HC 群 と の 多 重 比 較 検 討 を 行 っ た . 増 悪 期 に お け る 比 較 検 討 で は , Naïve B 細胞 : MOG-RD 12.4 vs AQP4-RD 8.2 vs HC 6.6; Memory B 細胞 : MOG-RD 3.9 vs AQP4-RD 3.4 vs HC 2.3; Transitional B 細胞 : MOG-RD 2.7 vs AQP4-RD 1.2 vs HC 0.8; Plasmablast : MOG-RD 2.7 vs AQP4-RD 6.9 vs HC 1.5 であり、AQP-RD では Transitional B 細胞, Naïve B 細胞, Memory B 細胞, plasmablast の B 細胞 に 占 め る 比 率 の 平 均 値 が HC と 比 較 し 有 意 に 高 値 で あ っ た . 一 方 で MOG-NMOSD で は Naive B 細胞, Memory B 細胞 の B 細胞 に 占 め る 比 率 の 平 均 値 が HC と 比 較 し 有 意 に 高 値 で あ っ た .

寛解期における比較検討では、Transitional B 細胞 : MOG-RD 2.6 vs AQP4-RD 0.3 vs HC 1.0 ; Plasmablast : MOG-RD 0.8 vs AQP4-RD 2.3 vs HC 1.5 であり、AQP4-RD では Plasmablast の B 細胞 に 占 め る 比 率 の 平 均 値 が HC , お よ び MOGAb-NMOSD の も の と 比 較 し て 有 意 に 高 値 で あ っ た . 一 方 で MOG-RD で の Transitional B 細胞 の B 細胞 に 占 め る 比 率 の 平 均 値 が HC と 比 較 し 有 意 に 高 値 で あ っ た .

## 2. RRMS

RRMS 34 症例を対象とし、Tfh の全リンパ球に占める割合と患者背景の罹病年数、EDSS で示される重症度、脳 MRI での T1 病巣数、再発回数の各項目と末梢血 Tfh の相関関係を後ろ向きに検討した。結果、RRMS 症例における末梢血 Tfh の全リンパ球に占める割合の平均 (%) は、 $6.27 \pm 3.28$  であった。Tfh (%) 結果と MS 再発回数には有意な相関関係が見られた ( $r = -0.61$ ;  $P = 0.0001$ ;  $n=34$ )。Tfh (%) と 罹 病 期 間 , EDSS で 示 さ れ る 重 症 度 , MRI で の T1 病 巣 数 に は 相 関 関 係 は な か っ た ( $r = -0.09$ ,  $r = -0.30$ ,  $r = -0.41$ )。

## 3. MG

(1) 重症筋無力症のうち、Early-onset 症例 (EOMG) , Late-onset 症例 (LOMG) , Thymoma-associated 症例 (TAMG) を対象とし、これら 3 群における末梢血 T リンパ球, ならびに B リンパ球サブセットの比較検討を行った。結果、3 群間において、末梢血 T リンパ球サブセットに有意な群間差はなかった。一方で末梢血 B リンパ球サブセットの多群比較検討では、末梢血 memory B 細胞の全リンパ球に占める割合の平均 (%) は、EOMG 群 3.8 vs LOMG 群 1.7 vs TAMG 群 2.4 であり、LOMG 群における memory B 細胞の割合の平均は

EOMG 群, および TAMG 群と比較してそれぞれ有意に低値であった(各  $P < 0.05$ ). ほかの末梢血 Bリンパ球サブセットでは3群間に有意な差はなかった.

(2) 胸腺腫合併重症筋無力症 10 例における胸腺摘除術前後での末梢血 T・Bリンパ球サブセットの変動について検討した. 結果, T 細胞系では NK 細胞の全リンパ球に占める割合が術後早期において減少し, のちに増加する傾向が見られた(NK 細胞:術前 8.4 vs 術後早期6.9%). B細胞系では plasmablast の割合が術後早期に一過性に増加する傾向が見られた(plasmablast:術前 0.5 vs 術後早期2.0%).

(3) 重症筋無力症におけるリンパ球サブセットについての検討に加えて, seronegative MG のうち MuSK (Muscle-specific tyrosine-kinase) 抗体陽性例における MuSK 抗体の意義について MuSK 抗体陽性 MG 6 例における抗体価と臨床経過の関連性について検討した. 結果, 6 例中 5 例において血清 MuSK 抗体価は臨床経過との相関がみられた.

## D. 考察

### 1. NMOSD

これまでの検討で, AQP4-NMOSD では plasmablast 上昇が病態と深く関与することが示唆されている. 今回の我々の検討においても, AQP4-NMOSD の全リンパ球に占める plasmablast の割合が高値を示しており, plasmablast 上昇と AQP4AB-NMOSD 病態との関連性が示唆された. 一方で, MOGAb-NMOSD では plasmablast 割合の上昇は示されなかった. AQPAb 陽性例と MOGAb 陽性における臨床表現型は同様であるが, それぞれの病態における B 細胞の関与

は異なる可能性が示唆された.

### 2. RRMS

これまでの検討で, 末梢血 Tfh は, MS 病態への関連は少ないと考えられている. しかし, 今回の我々の検討では, 末梢血 Tfh の全リンパ球に占める割合の平均と再発回数は中等度の相関関係を示した. RRMS において末梢血 Tfh がその病態に関連する可能性があると考えられた.

### 3. MG

MG の EOMG 群, LOMG 群, および TAMG 群における多重比較検定では, 末梢血 memory B 細胞の割合が LOMG 群において有意に他群と比較して低値であった. MG における末梢血 memory B 細胞の全リンパ球に占める割合は, 発症年齢との逆相関し, 発症が高齢になるほど低値に収束することが推察され, LOMG の発症メカニズムに関連していることが示唆された.

胸腺腫合併重症筋無力症での胸腺摘除術前後での末梢血 T・B リンパ球サブセットの変動について検討では, 術前と比較して術後早期において NK 細胞の全リンパ球に占める割合が一過性に減少し, のちに増加に転じる傾向にあることが明らかとなった. この結果は, これまでに示された NK 細胞と治療反応性との関連性についての報告と同様の傾向であった. また, 本研究で認められた術後早期における plasmablast 割合の一過性増加は, 術後での筋無力症状の増悪と関連する可能性がある.

本研究で MuSK 抗体値が鋭敏に臨床経過と相関することが示された. 経時的な抗体値測定は病勢, 重症度の把握に有用である可能性が示唆された.

## E. 結論

### 1. NMOSD

AQP4Ab-NMOSDとMOGAb-NMOSDでは、それぞれの病態に関連する末梢血 B 細胞の分化段階は異なる。

### 2. RRMS

再発寛解型 MS 症例では、末梢血 Tfh の割合と再発回数は有意に相関する。

### 3. MG

Late-onset MG では、末梢血 memory B 細胞の割合が低値であることが特徴である。

抗 MuSK 陽性 MG において、経時的な抗体値測定は病勢、重症度の把握に有用である可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### (1)国内

口頭発表 ( 47 ) 件  
原著論文による発表 ( 0 ) 件  
それ以外(レビューなど)の発表( 17 ) 件

#### そのうち主なもの

##### 論文発表

該当なし

##### 学会発表

1. 田中 覚, 久保田 昭洋, 小島 美紀, 王子 聡, 金子 仁彦, サトウ・ダグラス, 中島 一郎, 傳法 倫久, 深浦 彦彰, 野村 恭一: 抗 MOG 抗体関連疾患・抗 AQP4 抗体 NMOSD における寛解期の末梢血 T・B リンパ球サブセットの比較. 第 28 回 日本神経免疫学会学術集会, 長崎, 2016
2. 久保田 昭洋, 杉本 恒平, 古谷 真由美, 田中 覚, 伊崎 祥子, 王子 聡, 三井 隆男, 傳法 倫久, 深浦 彦彰, 野村 恭一: 重症筋無力症患者の免疫療法における濾胞性ヘルパーT細胞の変動. 第 28 回 日本

神経免疫学会学術集会, 長崎, 2016

3. 王子 聡, 田中 覚, 久保田 昭洋, 伊崎 祥子, 齋藤 あかね, 成川 真也, 小島 美紀, 三井 隆男, 深浦 彦彰, 野村 恭一: Neuromyelitis optica 安定期における末梢血白血球分画と再発抑制効果の関連性についての検討. 第 28 回 日本神経免疫学会学術集会, 長崎, 2016

### (2)海外

口頭発表 ( 7 ) 件  
原著論文による発表 ( 2 ) 件  
それ以外(レビューなど)の発表( 0 ) 件

#### そのうち主なもの

##### 論文発表

1. Kubota A, Izaki S, Fukaura H, Nomura K. Circulating memory B cells are reduced in patients with late-onset myasthenia gravis. Clinical and Experimental Neuroimmunology 6 (3): 322-329, 2015
2. Oji S, Tanaka S, Kojima M, Fukaura H, Mori M, Takahashi T, Fujihara K, Nomura K. Quotient of cerebrospinal fluid/serum immunoglobulin G as a predictive factor for non - responders to intravenous methylprednisolone therapy in patients with relapsing neuromyelitis optica spectrum disorder: Implication for early initiation of plasmapheresis. Clinical and Experimental Neuroimmunology 7 (3): 272-280, 2016

##### 学会発表

1. Tanaka S, Kubota A, Fukaura H, Nomura K, Sato D.K., Fujihara K: Immunological Analysis of MOG Autoantibody Positive NMOSD and Aquaporin-4 Autoantibody

Positive NMOSD. 67th American Academy of Neurology (AAN) Annual Meeting. Washington, DC; United States of America, 2015

2. Kojima M, Tanaka S, Kubota A, Izaki S, Oji S, Fukaura H, Nomura K, Mori M, Takahashi T, Fujihara K: Efficacy of recurrence prevention by tacrolimus in patients with Aquaporin-4 antibody positive neuromyelitis optica. 31th European committee for treatment and research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS). Barcelona; Spain, 2015
3. Kubota A, Fukaura H, Sugimoto K, Tanaka S, Ishizuka K, Suzuki M, Saito A, Narukawa S, Hara W, Tajima T, Izaki S, Yoshida N, Oji S, Mitsui T, Dembo T, Nomura K: The Higher the Total Number of Relapses, the Lower the Number of Circulating Follicular Helper T Cells from the Patients with Multiple Sclerosis. 9th Pan-Asian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (PACTRIMS). Bangkok; Thailand, 2016

#### G. 知的所有権の出願・取得状況

該当するものなし