

多系統萎縮症の病態形成における自然免疫の関与とバイオマーカーの探索

研究分担者 吉良潤一¹⁾

研究協力者 松瀬大¹⁾，山口浩雄¹⁾，グザリアイ ママティジャン¹⁾，山崎亮¹⁾，
樋渡昭雄²⁾，松下拓也¹⁾

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 臨床放射線科学

研究要旨

背景：脊髄小脳変性症(SCD)の30%は遺伝性、残りの70%は孤発性であり、そのうち65%は多系統萎縮症(MSA)と考えられている。MSAは中年期以降に発症する孤発性神経変性疾患で、そのうちMSA-Cは初期症状が遺伝性脊髄小脳変性症(hereditary SCD)と類似しているものの経過が早いため、両者の鑑別は治療計画の立案や予後予測の面で重要である。近年の報告では、MSAの病態生理におけるグリア炎症の関与が指摘されている。私たちはすでに、MSAおよびhSCD両疾患の鑑別および疾患進行度を反映するバイオマーカーを探索するため、MSAおよびhSCDにおける髄液サイトカインレベルと、罹病期間や脳萎縮等の疾患進行度とを比較検討した。その結果、MSA-C群では、単球の機能制御に関わる炎症性髄液サイトカイン(IL-1 β 、IL-1 α 、IFN- γ)が高値であること、MSA-C群では髄液中MCP-1(CCL-2)レベルが罹病期間と有意な負の相関を示すこと、MRI画像所見の比較では、MSA-C群では橋の萎縮と髄液中IL-6レベルが正の相関を示すことを見出した。これらの結果は、MSA-Cの病態における炎症性機序の存在を示している。しかし本疾患の末梢血におけるバイオマーカーについては未解明である。

目的：MSAおよびhSCD両疾患の鑑別および疾患進行度を反映する末梢血バイオマーカーを探索するため、MSAおよびhSCDにおける患者末梢血単球の分類および機能解析をフローサイトメーターで行った。

方法：当科の入院および外来患者で、MSA-CあるいはhSCDと診断された患者の末梢血より単球を分離し、それらを表面マーカー(CD14, CD16, CX3CR1, CCR2, CD62L, CD64など)で標識し、フローサイトメトリー法で評価する。患者の臨床データ(性別、発症年齢、採血時年齢、罹病期間)と、フローサイトメーターで得られた患者末梢血単球の解析結果との関連性を検討する。健常者20例、hSCD20例MSA-C20例を目標に計測を実施する。

結果と結論：現時点で、健常者(n=7)、hSCD(n=9)、MSA-C(n=8)での解析を行った。Intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺)単球の割合は、健常者、hSCD、MSA-Cでそれぞれ4.3 \pm 1.0%、4.4 \pm 0.8%、1.9 \pm 0.3%と、MSA-Cで低下傾向であった。また、CD62L⁺/Intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺)単球の割合は、健常者、hSCD、MSA-Cでそれぞれ27.7 \pm 8.6%、19.1 \pm 2.3%、8.5 \pm 1.4%でMSA-Cで低下傾向であった。さらにCCR2/Non-classical (CD14⁺CD16⁺⁺)単球の割合は、健常者、hSCD、MSA-Cでそれぞれ9.0 \pm 3.0%、6.8 \pm 2.1%、2.0 \pm 0.5%でMSA-Cで低下傾向であった。また、MSA-C患者において、これらの傾向と罹病期間との関連を調べたところ、Intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺)単球の割合が罹病期間と正の相関を認めた。

今後、症例数を増やし、特にMSA-Cの疾患進行度を反映する末梢血単球バイオマーカーを探索する。MSA-C疾患初期における末梢血単球を中心とした炎症性機序を抑制できれば、疾患の進行抑制治療につながる可能性がある。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症(SCD)の30%は遺伝性、残りの70%は孤発性であり、そのうち65%は多系統萎縮症(MSA)と考えられている[1]。MSAは中年期以降に発症する孤発性神経変性疾患で、そのうちMSA-Cは初期症状が遺伝性脊髄小脳変性症(hereditary SCD)と類似しているものの経過が早いため、両者の鑑別は治療計画の立案や予後予測の面で重要である。近年の報告では、MSAの病態生理におけるグリア炎症の関与が指摘され[2]、髄液中の炎症性サイトカインレベルが疾患進行と連動していることが予想される。

私たちは、MSAおよびhSCD両疾患の鑑別および疾患進行度を反映するバイオマーカーを探索するため、これまでにMSAおよびhSCDにおける髄液サイトカインレベルと、罹病期間や脳萎縮等の疾患進行度とを比較検討した。その結果、MSA-C群では、単球の機能制御に関わる炎症性髄液サイトカイン(IL-1 β 、IL-1 α 、IFN- γ)が高値であること、MSA-C群では髄液中MCP-1レベルが罹病期間と有意な負の相関を示すこと、MRI画像所見の比較では、MSA-C群では橋の萎縮と髄液中IL-6レベルが正の相関を示すことを見出した[3]。これらの結果は、MSA-Cの病態における炎症性機序の重要性を示している。

目的：MSAおよびhSCD両疾患の鑑別および疾患進行度を反映する末梢血バイオマーカーを探索するため、MSAおよびhSCDにおける患者末梢血単球の分類および機能解析をフローサイトメーターで行う。

B. 研究方法

フローサイトメーターによる末梢血単球の分類および機能解析

当科の入院および外来患者で、MSA-CあるいはhSCDと診断された患者の末梢血より単球を分離し、それらの表面マーカー(CD14, CD16, CX3CR1, CCR2, CD62L, CD64)を標識し、フローサイトメトリー法で評価する。MSA-C、hSCD患者末梢血において、Classical (CD14⁺⁺CD16⁻)、Intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺)、Non-classical (CD14⁺CD16⁺⁺)それぞれの単球の比率を比較する。また、Classical、Intermediate、Non-classicalそれぞれの単球で表面マーカー(CX3CR1, CCR2, CD62L, CD64)を発現している比率を比較する。さらに患者の臨床データ(性別、発症年齢、採血時年齢、罹病期間)と、フローサイトメーターで得られた患者末梢血単球の解析結果との関連性を検討する。健常者20例、MSA-C20例、hSCD20例を目標に計測を実施する。

(倫理面への配慮)

本研究は、九州大学医系地区部局臨床研究倫理委員会にて承認されている(許可番号 24-218、26-398)。

C. 研究結果

末梢血単球の分類および機能解析

現時点で、健常者(n=7)、hSCD(n=9)、MSA-C(n=8)での解析を行った。Intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺)単球の割合は、健常者、hSCD、MSA-Cでそれぞれ4.3 \pm 1.0%、4.4 \pm 0.8%、1.9 \pm 0.3%と、MSA-Cで低下傾向であった(vs cont: p=0.036, vs SCD: p=0.025)。また、CD62L⁺/Intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺)単球の割合は、健常者、hSCD、MSA-Cでそれぞれ27.7 \pm 8.6%、19.1 \pm 2.3%、8.5 \pm 1.4%でMSA-Cで低下傾向であった(vs cont: p=0.049, vs SCD: p=0.003)。さらにCCR2/Non-classical (CD14⁺CD16⁺⁺)単球の割合は、健常者、hSCD、MSA-Cでそれぞれ9.0 \pm 3.0%、6.8 \pm 2.1%、2.0 \pm 0.5%でMSA-Cで低下傾向であった。(vs cont: p=0.059, vs SCD: p=0.085)。また、MSA-C患者において、これらの傾向と罹病期間との関連を調べたところ、Intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺)単球の割合が罹病期間と正の相関を認めた(p=0.04、R²=0.53)。

D. 考察

私たちがすでに報告しているように、MSA-Cでは髄液中炎症性サイトカインレベルが上昇しており、同様に運動失調症を呈するhSCDでは上昇を示さなかった[3]。このことは、MSAの病態形成に炎症性機序が存在することを示唆する。さらに髄液中MCP-1(CCL-2)レベルについては、MSAで罹病期間と負の相関を認め、またIL-6は橋の萎縮と相関関係が見られた。MCP-1レベルは、疾患初期は正常値より高値で、慢性期には正常値を下回っていたことから、MCP-1による末梢のCCR2(MCP-1の受容体)発現細胞(単球、T細胞、NK細胞、B細胞など)の病変部への動員は疾患初期に行われ、慢性期にはこれらの末梢炎症細胞の関与は少ないことが考えられる。また、IL-6は主に単球系細胞から放出され、脳内ではグリア細胞が主要な産生細胞として知られている[3]。疾患初期に脳内へ浸潤した単球とともに、脳内で活性化したミクログリアもIL-6を産生し、これらの炎症性サイトカインがグリア炎症に寄与している⁽³⁾可能性が考えられている。他施設からの既報告でも、MSA患者血清中の炎症性サイトカイン上昇[1]や剖検脳における泡沫状マクロファージ浸潤[2]な

どの報告があり、MSA 病態における炎症性機序を支持している。

今回の私たちの研究結果では、CD62L+/Intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺)単球の比率は、健常者に比べ MSA-C 患者では低い傾向であった。また、CCR2/ Non-classical (CD14⁺CD16⁺⁺)単球の比率についても、MSA-C で低下傾向を認めた。CD62L は細胞接着分子で、発現細胞を炎症部位へ遊走させることが知られている。また、前述のように髄液中 MCP-1 レベルは、MSA-C では疾患初期に高値であり、罹病期間との逆相関が認められている[3]。MCP-1 は CCR2 発現細胞を炎症部位に誘導することが知られており[4]、これらの単球が、BBB を通過して炎症部位である脳内に移行し、末梢血の割合が減少した可能性が考えられる。さらに、MSA-C 患者における Intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺)単球の割合が罹病期間と正の相関を認めていたことも合わせると、MSA-C の炎症性変化が、病初期に目立ち、徐々に軽減していくことを示唆している可能性が考えられる。まだ解析症例数が少なく、今後症例数を増やしてもこれらの傾向が確認されるかの検証が必要であるが、MSA-C 患者の髄液と末梢血単球の結果から見出された CCR2-CCL2 axis の異常が本疾患の病因に関わるとすれば、これをターゲットとした抗炎症治療を確立できる可能性が考えられる。

E. 結論

今回の研究結果は、MSA-C 初期の病態における炎症性機序の重要性を示しており、炎症性サイトカインの代用マーカーとしての利用とともに、疾患初期における抗炎症性治療の可能性を強く示唆するものであった。今後、症例数を増やし、特に MSA-C の疾患進行度を反映する末梢血単球バイオマーカーを探索する。MSA-C 疾患初期における末梢血単球を中心とした炎症性機序を抑制できれば、疾患の進行抑制治療につながる可能性がある。

[参考文献]

1) Kaufman, E., et al., Proinflammatory cytokines are elevated in serum of

patients with multiple system atrophy. PLoS One, 2013. 8(4): p. e62354.

- 2) Yokoyama, T., et al., Multiple system atrophy (MSA) with massive macrophage infiltration in the pontocerebellar afferent system. Neuropathology, 2007. 27(4): p. 375-7.
- 3) Yamasaki, R., et al., Early strong intrathecal inflammation in cerebellar type multiple system atrophy by cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles: a case control study. J Neuroinflammation, 2017. 14(1): p. 89.
- 4) Henkel, J.S., et al., Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. Ann Neurol, 2004. 55(2): p. 221-35.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamasaki R, Yamaguchi H, Matsushita T, Fujii T, Hiwatashi A, Kira J. Early strong intrathecal inflammation in cerebellar type multiple system atrophy by cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles: a case control study. J Neuroinflammation. 2017 Apr 24;14(1):89. doi: 10.1186/s12974-017-0863-0.

2. 学会発表

吉良 潤一, 松瀬 大, 山口 浩雄, グザリアイ ママティジャン, 山崎 亮, 樋渡 昭雄, 松下 拓也. 多系統萎縮症の病態形成における自然免疫の関与とバイオマーカーの探索. 平成 28 年度運動失調班合同研究報告会. 東京. 2018 年 1 月 11-12 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし