

### 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	九州大学大学院医学研究院	神経内科学
研究協力者	松瀬 大	九州大学大学院医学研究院	神経内科学
	山口 浩雄	九州大学大学院医学研究院	神経内科学
	グザリアイ ママティジャン	九州大学大学院医学研究院	神経内科学
	山崎 亮	九州大学大学院医学研究院	神経内科学

#### 研究要旨

背景：多系統萎縮症(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こと、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 群では炎症性サイトカイン CCL2/MCP1 や IL-6 が髄液中において、病初期に上昇する傾向にあることを見出した。これらの結果は、MSA-C の病態における炎症性機序の存在、特にマクロファージ、単球系の細胞の関与の可能性を示している。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、MRI)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した。健常者(HC)17 例、hSCD 11 例、MSA-C 23 例に対し、計測を実施した。

結果と結論：Intermediate (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>)単球の割合は、HC (n=17)、hSCD (n=11)、MSA-C (n=23) でそれぞれ  $5.7 \pm 1.0\%$ ,  $6.9 \pm 1.7\%$ ,  $3.0 \pm 0.3\%$  と、MSA-C で有意に低下していた(vs HC:  $p < 0.05$ , vs SCD:  $p < 0.01$ )。CD62L<sup>+</sup> 単球の割合は、HC、hSCD、MSA-C において、Classical 単球の中ではそれぞれ  $50.4 \pm 7.9\%$ ,  $30.1 \pm 6.4\%$ ,  $20.4 \pm 5.1\%$ 、Intermediate 単球の中ではそれぞれ  $34.9 \pm 5.2\%$ ,  $17.8 \pm 2.2\%$ ,  $13.4 \pm 4.2\%$  で、いずれも HC と比較して MSA-C で有意に低下していた(vs HC:  $p < 0.01$ )。さらに MSA-C 患者において、これらの傾向と罹病期間、MRI 所見との関連を調べたところ、Intermediate (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>)単球の割合が罹病期間と正の相関を認め( $p < 0.05$ )、さらに延髄横断径、小脳虫部垂直径といずれとの間にも逆相関の傾向が認められた( $p < 0.05$ ,  $p = 0.066$ )。

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(GM-CSF、IL-6、12、13)が高値であること、MSA-C群では髄液中CCL2/MCP1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。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、フローサイトメーター法で評価する。MSA-C、hSCD患者末梢血において、Classical (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>)、Intermediate (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>)、Non-classical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>)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した。前年度から症例をさらに追加し、合計健康者(HC)17例、hSCD11例、MSA-C23例に対し、計測を実施した。

### **(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26-398、2019-113)。

## C. 研究結果

### 末梢血単球の分類および機能解析

Intermediate (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>)単球の割合の割合は、HC (n=17)、hSCD (n=11)、MSA-C (n=23)でそれぞれ5.7±1.0%、6.9±1.7%、3.0±0.3%と、MSA-Cで有意に低下していた(vs HC: p<0.05, vs SCD: p<0.01)。CD62L<sup>+</sup>/Classical単球の割合は、HC、hSCD、MSA-Cにおいて、それぞれ50.4±7.9%、30.1±6.4%、20.4±5.1%であり、HCと比較してMSA-Cで有意に低下していた(vs HC: p<0.01)。CD62L<sup>+</sup>/Intermediate単球の割合は、HC、hSCD、MSA-Cにおいて、それぞれ34.9±5.2%、17.8±2.2%、13.4±4.2%であり、HCと比較してMSA-C(vs HC: p<0.01)、hSCD(vs HC: p<0.01)いずれにおいても有意に低下していた。加えてMSA-C患者において、これらの傾向と罹病

期間、MRI 所見との関連を調べたところ、Intermediate (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>)単球の割合が罹病期間と正の相関を認め(p< 0.05)、さらに延髄横断径と有意な逆相関(p< 0.05)、小脳虫部垂直径とも逆相関の傾向が認められた(p=0.066)。

#### D. 考察

私たちがすでに報告しているように、MSA-C では他の神経疾患と比較して髄液中炎症性サイトカインレベルが上昇している[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 CCL2/MCP1 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[3]。CCL2/MCP1 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、CCL2/MCP1 による末梢の CCR2(MCP1 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, 4]。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<sup>+</sup>/Intermediate (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>)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、Intermediate (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>)単球の割合が罹病期間と正の相関を認めた。CD62L は細胞接着分子で、発現細胞を炎症部位へ遊走させる。また、IL-1 $\beta$ 、IL-6、8 などの産生に関わり、炎症に関与することが知られている[5]。このこと

より CD62L<sup>+</sup> Intermediate 単球が、MSA 初期に CNS に侵入し、グリア炎症に関与する可能性が考えられる。 $\alpha$ Syn は、中枢神経内のグリア細胞からの CCL2/MCP1 や IL-6 の産生を促すことが知られており[4]、これらのサイトカインが Intermediate 単球を中枢神経へ誘導し、グリア炎症を引き起こしている可能性が考えられた。

#### 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。MSA-C 疾患初期における末梢血単球が関与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 ponto-cerebellar 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) Roodveldt, C., et al., Glial innate immunity generated by non-aggregated alpha-synuclein in mouse: differences between wild-type and Parkinson's disease-linked mutants. PLoS One, 2010. 5(10): p. e13481.
- 5) Cui., Y.W., et al., Decreased CCR2 and CD62L

expressions on peripheral blood classical monocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, 2014. 5: p. 92-96.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Matsuse D, Yamasaki R, Maimaitijiang G, Yamaguchi H, Masaki K, Isobe N, Matsushita T, Kira J. Early decrease of intermediate monocytes in peripheral blood is characteristic of multiple system atrophy-cerebellar type. (投稿中)

##### 2. 学会発表

1) 松瀬 大, 山口 浩雄, Maimaitijiang Guzailiayi, 山崎 亮, 吉良 潤. 多系統萎縮症の病態形成における自然免疫関与とバイオマーカーの検索. 第60回日本神経学会学術大会. 大阪. 2018年5月22-25日.

2) 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. 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. 令和元年度運動失調班合同研究報告会. 東京. 2020年1月10-11日.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし