

# 1－5 難治性神経疾患における免疫病態の解明と診断・治療法開発

主任研究者 国立精神・神経医療研究センター神経研究所

山村 隆

総括研究報告

## 1. 研究目的

本研究班は、NCNPの研究組織を活用して、脳神経内科学、免疫学、放射線医学、病理学、分子生物学などの専門家が連携し、痛みや疲労症状などを主徴とする難治性疾患、原因不明の脳炎・脳症（橋本脳症、NINJAなど）、自己免疫性てんかん、難治性免疫性ニューロパチー（CIDP）などの難病において画期的な診断・治療法の開発につながる知見を得ることを目的とする。具体的には、患者血液や髄液および、剖検例の中核神経組織を材料としたリンパ球解析を実施するとともにMRI拡散テンソル画像解析など通常のMRIで検出できない中枢神経病巣との対応関係について検討し、上記難治性神経疾患の病態解明研究を進める。なおNCNPだけで対応できない研究開発について、外部機関の協力を得て研究を推進する。

## 2. 研究組織

主任研究者

山村 隆 国立精神・神経医療研究センター

分担研究者

北條浩彦 国立精神・神経医療研究センター

荒木敏之 国立精神・神経医療研究センター

大木伸司 国立精神・神経医療研究センター

佐藤和貴郎 国立精神・神経医療研究センター

岡本智子 国立精神・神経医療研究センター病院

林 幼偉 国立精神・神経医療研究センター病院

佐藤典子 国立精神・神経医療研究センター病院

齊藤祐子 国立精神・神経医療研究センター病院

漆谷 真 滋賀医科大学

高嶋 博 鹿児島大学大学院

近藤誉之 関西医科大学医学部

三宅幸子 順天堂大学医学部

千原典夫 神戸大学医学部

## 3. 研究成果

病態未解明の自己免疫性神経疾患に対する学際的アプローチとして、基礎研究、病理組織を活用した研究、リンパ球解析研究、画像研究等を研究班横断的に進めている。今年度は初年度であり、体制構築を進めたことに加え、いくつか興味深い知見が得られており、以下に紹介する。

- 1) 基礎研究から出発した代表的な研究が、神経系の慢性炎症形成の分子機序解明（NCNP 免疫研究部 大木）である。この研究は、MS 患者末梢血の病原性リンパ球として NR4A2 陽性ヘルパーT 細胞を同定したことから始まり、その後、進行型 MS の促進に関連する病原性リンパ球として Eomes 陽性 T 細胞を同定 (B. Raveney et al. Nat Comm. 2015)、さらにその発生に関する検討を動物モデルを用いて進めた結果、ミクログリア活性化に引き続いだ産生される type I インターフェロンが抗原提示細胞の Prolactin 産生を促し、Prolactin を介して Eomes 陽性 T 細胞が誘導される機序を明らかにした (C. Zhang et al. PNAS, 2019)。横への展開として、MS および視神経脊髄炎の剖検脳脊髄病理組織における同細胞の同定 (B. Raveney, 山村ら) および、末梢神経の自己免疫疾患である慢性炎症性脱髓性脊髄神経根炎 (CIDP) 患者末梢血における NR4A2 陽

性細胞/Eomes 陽性細胞の関与についての検討  
(NCNP 免疫研究部 佐藤和) を進めている。

2) 自己免疫性脳炎・脳症は、原因不明の子宮頸がんワクチン接種後脳症や筋痛性脳脊髄炎/慢性疲労症候群 (ME/CFS) さらに NINJA とも臨床的・免疫学的に共通点が多いと考えられる。なお NINJA は NCNP が同定した MRI 画像正常であるが MS の臨床診断基準を満たす疾患群である (Takewaki et al. Neurology NN, 2018)。鹿児島大の高島らは、多数の症例について、自己抗体測定・リンパ球解析と治療経過・予後についてまとめた。順天堂大の三宅らは自己免疫疾患マウスマodelで症状と関連する自然免疫系の変化を明らかにした。NCNP の荒木は基礎的手法を用いた抗原同定法の検討に着手した。NCNP 放射線科の佐藤らは、新たな MRI 画像解析である構造ネットワーク解析の手法を用い、ME/CFS の特定の部位の異常と血清中の抗自律神経受容体抗体との有意な相関を明らかにした。NINJA は血液浄化療法の有効例が多いが、NCNP 病院脳神経内科の林はその治療成績と関連する免疫学的異常について知見を得ている。

その他、リンパ球解析に基づいた自己免疫性てんかんの免疫病態解析 (神戸大 千原) や抗体療法と細胞移植療法を組み合わせた ALS の新規治療開発 (滋賀医大 漆谷) など独自性の高い研究が順調に進められている。

#### 4. 研究成果刊行一覧

1. Chenyang Zhang, Ben J.E.Raveney, Hirohiko Hohjoh, Chiharu Tomi, Shinji Oki, Takashi Yamamura: Extrapituitary prolactin promotes generation of Eomes-positive helper T cells mediating neuroinflammation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Oct.2019, 21131-21139,
2. Chihara N, Matsumoto R, Yamamura T. Plasmablasts and neuroimmunological disorders. Immunol Med., 42(3): 103-107, 2019
3. Tsubota M, Fukuda R, Hayashi Y, Miyazaki T, Ueda S, Yamashita R, Koike N, Sekiguchi F, Wake H, Wakatsuki S, Ujiie Y, Araki T, Nishibori M, Kawabata A. Role of non-macrophage cell-derived HMGB1 in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and its prevention by the thrombin/thrombomodulin system in rodents: negative impact of anticoagulants. Journal of Neuroinflammation 16: 199 2019 10.1186/s12974-019-1581-6
4. Kimura Y, Sato N, Ota M, Shigemoto Y, Morimoto E, Enokizono M, Matsuda H, Shin I, Amano K, Ono H, Sato W, Yamamura T. Brain abnormalities in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: Evaluation by diffusional kurtosis imaging and neurite orientation dispersion and density imaging. J Magn Reson Imaging. 2019 Mar;49(3):818-824.
5. Chen T, Noto D, Hoshino Y, Mizuno M, Miyake S. Butyrate suppresses demyelination and enhances remyelination. J Neuroinflammation. 2019 Aug 9;16(1):165.
6. Miyake S, Yamamura T. Gut environmental factors and multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2019 Apr 15;329: 20-23.
7. Ben JE Raveney, Wakiro Sato, Daiki Takewaki, Chenyang Zhang, Tomomi Kanazawa, Youwei Lin, Tomoko Okamoto, Manabu Araki, Yukio Kimura, Noriko Sato, Terunori Sano, Yuko Saito, Shinji Oki, and Takashi Yamamura: Eomes expression defines a pathogenic CD4+ T cell population associated with secondary progressive multiple sclerosis. BRAIN (submitted)
8. Suzuki, F., Sato, N., Ota, M., Sugiyama, A., Shigemoto, Y., Morimoto, E., ... & Kawamura, M. (2020). Discriminating chorea-acanthocytosis from Huntington's disease with single-case voxel-based morphometry analysis. Journal of the Neurological Sciences, 408, 116545.
9. Ueda, R., Matsuda, H., Sato, N., Iwasaki, M., Sone, D., Takeshita, E., ... & Nakagawa, E. (2019). Alteration of the anatomical covariance network after corpus callosotomy in pediatric intractable epilepsy. PloS one, 14(12).
10. Minamiyama S, Ueda S, Nakashima R, Yamakado H, Sakato Y, Yamashita H, Sawamoto N, Fujimoto Ry, Nishino I,

- Urushitani M, Mimori T, Takahashi R. Thigh muscle MRI findings in myopathy associated with anti-mitochondrial antibody. *Muscle Nerve* 2020, 61:81-87
11. Kobashi S, Terashima T, Katagi M, Nakae Y, Okano J, Suzuki Y, Urushitani M, Kojima H. Transplantation of M2-deviated microglia promotes recovery of motor function after spinal cord injury in mice. *Mol Ther* 2020, 28:254-265
12. Zong C, Hasegawa R, Urushitani M, Zhang L, Nagashima D, Sakurai T, Ichihara S, Ohsako S, Ichihara G. Role of microglial activation and neuroinflammation in neurotoxicity of acrylamide in vivo and in vitro. *Arch Toxicol.* 2019, 93(7):2007-2019.
13. Yamaguchi Y, Li F, Tsujimura A, Kamada M, Ito H, Maki T, Sawamoto N, Urushitani M, Takahashi R. Phosphorylated NF- $\kappa$ B subunit p65 aggregates in granulovacuolar degeneration and neurites in neurodegenerative diseases with tauopathy. *Neurosci Lett* 2019, 704: 229-235.
14. Hishizawa M, Yamashita H, Akizuki M, Urushitani M, Takahashi R. TDP-43 levels are higher in platelets from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis than in healthy controls. *Neurochem Int.* 2019, 124, 41-45.
15. Ayaki, T., Murata, K., Kanazawa, N., ...M. Urushitani, F. Furukawa H. Ito, R. Takahashi Myositis with sarcoplasmic inclusions in Nakajo-Nishimura syndrome: a genetic inflammatory myopathy. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2020 DOI: 10.1111/nan.12614
16. 高嶋 博 自己免疫性脳症の臨床症候—ヒステリーとの鑑別 神經治療 36 : 341-344
17. 竹脇大貴, 山村 隆: 神經変性疾患と腸内細菌. 特集. 腸内細菌が関与する諸疾患. *Current Therapy* 37:58-63, 2019
18. 山村 隆, 木村公俊: 多発性硬化症と制御性T細胞. 特集 制御性T細胞-研究の現在. 医学のあゆみ 268: 1229-1233, 2019
19. 山村 隆:総論. 免疫性神經疾患の治療学. (特集編輯 山村 隆) *BIO Clinica* 460: 4-5, 2019
20. 佐藤和貴郎 特集「免疫性神經疾患の治療学」「新規治療薬の開発」 *BIO Clinica* 34巻5号 Page470-474 (2019. 05)
21. 千原典夫, 松本理器, 山村 隆 : Plasmablasts と免疫性神經疾患. *Clin Neurosci* 37: 744-746, 2019

## ヒト中枢神経病理組織のフローサイトメーターを用いた免疫細胞の検討

国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所

山村 隆

### 緒言

多くの神経疾患は中枢神経組織への炎症性の機序の関与があり、免疫細胞、中でも T 細胞と B 細胞は中枢神経組織へ浸潤し、炎症や脱髓や軸索障害に寄与していることが知られている。局所での免疫細胞同士の相互作用やミクログリア・アストロサイトとの関係により、免疫反応が形作られている。代表的な自己免疫性の炎症性脱髓疾患である多発性硬化症は、獲得免疫系が主な役割を果たす再発寛解型の他に、徐々に悪化する神経障害と脳脊髄の萎縮—神経細胞死の進行一を特徴とする二次進行型 (SPMS) があり、難治性である。SPMSにおいて、我々のグループは転写因子 Eomes 発現を特徴とするヘルパーT 細胞が MS の動物モデルの進行性病態を形成し、かつ SPMS 患者の末梢血中で増加していること、さらに同細胞が GranzymeB という細胞障害性因子を発現していることを見出した (Raveney ら 2015 Nat. Comm, Brain submitting)。本研究では、剖検組織を用いた組織浸潤免疫細胞解析による同細胞の同定や機能解析を進める。

### 方法

NCNP 病院にて剖検が実施された 3 症例

について、フローサイトメーター解析を行い、中枢神経組織における浸潤細胞の評価を行った。経過 20 年の急性呼吸不全で死亡した SPMS の 51 歳女性、急性呼吸不全で死亡した抗 AQP4 抗体陽性視神経脊髄炎 (NMOSD) の 54 歳女性、敗血症で死亡した経過 18 年の臨床診断 PDD、88 歳男性の 3 例である。

### 結果

SPMS および NMOSD においては、脳脊髄組織での広範なリンパ球浸潤を認め、病変部位のみならず Normal appearing white matter (NAWM)において Eomes 陽性 Th 細胞が広範に浸潤していた。また NMOSD の視神経病巣には CD4+T 細胞と B 細胞の両者の浸潤が認められた。一方、パーキンソン病剖検脳では、このような広範なリンパ球浸潤は乏しいものの、大脳白質への B 細胞の浸潤が確認された。

### 考察

MS や NMOSD 両者において、Eomes 陽性 Th 細胞が中枢神経組織に広範に浸潤していることは、少なくとも慢性経過の症例において、同細胞が両疾患の病態形成に寄与していることが示唆される。遺伝子発現解析など詳細な解析を行うことにより、同細胞の細胞障害性などの機能が明確になることが期待される。

### 結論

ヒト剖検例でのフローサイトメーター解析

による病原性リンパ球の同定と解析は病態  
解明に有用と考えられる。

#### 参考文献

1. Riveney, J.E.B., S. Oki, H. Hohjoh, M. Nakamura, Sato W, M. Murata, and T. Yamamura: Eomesodermin-expressing T helper cells are essential for chronic neuroinflammation. *Nature Comm* 6:8437, 2015
2. Riveney J.E.B., W Sato, D Takewaki, C Zhang, T Kanazawa, Y Lin, T Okamoto, M Araki, Y Kimura, N Sato, T Sano, Y Saito, S Oki, and T Yamamura: Eomes expression defines a pathogenic CD4+ T cell population associated with secondary progressive multiple sclerosis. *BRAIN* (under review)

## 難治性神経疾患における免疫関連バイオマーカーの探索

分担研究者：北條浩彦

所属：国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所

研究協力者：Mallahalli Manu

所属：国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所

### 緒言

神経疾患と関連してその症状を反映する生体内分子は、疾患の早期診断・治療・治療予後の経過観察において、疾患の状態を客観的に捉える有用な指標、すなわちバイオマーカーに成りえる。本研究は、その様な有用な生体内分子を見つけ出すために、近年研究が進んでいるセルフリー核酸に着目し、免疫炎症を伴う神経変性のバイオマーカー候補として血液中のセルフリー核酸を解析する。本年度は、多発性硬化症モデルを用いた疾患関連セルフリー核酸の探索を行った。

Biomolecules that are associated with neurological diseases may become useful biomarkers for early diagnosis, early medical treatment and catamnestic observation of the diseases. To find such biomarkers, cell-free nucleic acids are considered as promising candidates. Cell-free nucleic acids are extracellular and may play an important role in cell-to-cell communication<sup>1</sup>. In our research, we search for cell-free nucleic acids related to neurological diseases with immune inflammation as candidate biomarkers<sup>2</sup>; and this year, we examined Multiple sclerosis (MS) models as follows:

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS), and many factors are involved in lesion formation. Recent studies suggest that gut microbiota affects the pathogenesis of MS<sup>3</sup>. On the other hand, circulating exosomal miRNAs in the

blood are also involved in MS. However, it is not yet fully understood how the microbiota is related to the immune responses and also if there is any association between microbiota and circulating miRNAs in MS.

### 方法 (Methods)

Here we hypothesized that gut microbiota might control the host immune system through blood-circulating miRNAs. Based on the hypothesis, we generated gut microbiome dysbiosis model mice by oral administration of 200µL of non-absorbing antibiotics cocktail (ABX) containing kanamycin (1mg/ml), vancomycin (0.1mg/ml) and colistin (2000U/ml). The model mice were subjected to treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by a conventional method<sup>3</sup>. Lymphocytes were collected from the CNS, spleen and blood to see the percentage of T cells. For cell-free miRNA analysis, total RNA was isolated from the plasma by a Plasma/Serum circulating and exosomal RNA Purification kit, and miRNA expression profiles were examined by a DNA chip of mouse miRNAs (3D-gene chip; TORAY INDUSTRIES, INC)<sup>2</sup>.

### 結果と考察 (Results & Discussion)

Results indicated that: i) ABX treatment altered gut microbiome, ii) the frequency of total T cells in the CNS was reduced in EAE mice treated with ABX compared to untreated EAE mice, and iii) ABX treatment ameliorated the EAE clinical score. Expression profile analysis of circulating cell-free miRNAs in the blood showed a marked difference in the expression of miR-21a-5p, miR-122-5p and miR-223-3p among normal, EAE and ABX treated EAE mice. The results suggest the possibility that cell-free miRNAs might be implicated in the association between gut microbiome and auto immune response in EAE mice.

### 結論 (Conclusion & future plans)

The study we did here contains preliminary

experiments, but the data suggest an intriguing association between gut microbiome and immune response in EAE and also possible association between blood-circulating cell-free miRNAs and microbiota. To further clear the associations, more extensive studies need to be carried out in the future.

#### 参考文献 (References)

1. Zhang J, et al., Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 13: 17-24, 2015.
2. Kimura K, et al., Circulating exosomes suppress the induction of regulatory T cells via let-7i in multiple sclerosis. *Nat Commun*. 9: 17, 2018.
3. Yokote H, et al., NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora. *Am J Pathol*. 173: 1714-1723, 2008.

## 自己免疫性脳炎・神経炎における抗原同定による発症機序の解析

国立精神・神経医療研究センター

神経研究所 疾病研究第五部

荒木 敏之

### 緒言

近年、国内外でいくつかの抗原同定報告例があるが、その一方で、自己免疫性脳炎が強く疑われる脳炎・脳症のなかで、CLIPPERS（Chronic lymphocytic inflammation with pontine perivascular enhancement responsive to steroids）症候群として区分される疾患群が存在することが報告されているなど新たな疾患群の存在も明らかになっているが、抗原となっている分子の同定を含め、その病態メカニズムはほとんど明らかとなっていない。本研究では、1) 臨床的に自己免疫機序が疑われる脳症・神経炎患者の血清と臨床情報を収集し、2) 自己抗体の標的抗原を同定することによる病因・病態の解明と、疾患マーカーとしての自己抗体の意義の検討を実施することにより、自己免疫性脳症・脳炎の疾患概念と診断法の確立に貢献することを目指す。

末梢神経疾患評価手法の一つとして、ヒト細胞のみを用いた末梢神経培養系を作出することは、ヒト疾患の評価および創薬開発には不可欠であると考えられる。これまで、ヒトES細胞もしくはiPS細胞から末梢神経細胞を誘導した報告や、そのようにして得られたヒト神経細胞とラットSchwann細胞の共培養による培養下での髓鞘化観察の報告はなされているが、ヒト神経細胞とヒトSchwann細胞による髓鞘化モデル作出に関する論文報告はこれまでになされていない。本研究ではヒトiPS細胞から神経系細胞を分化させることにより、ヒト細胞による神経系細胞培養モデルを作出し、モ

ルとしての妥当性の評価に繋げたいと考えている。

### 方法

1) 自己免疫性機序が疑われる脳炎患者、および、CIDP患者からそれぞれ血清検体を取得する。患者血清中に存在すると考えられる、自己抗体に対する抗原の同定を行う。同定法としてはラットもしくはマウスの脳・神経組織あるいは市販のヒト脳組織抽出蛋白を用いて、SDSPAGE-Immunoblot法、もしくは、患者血清を用いた免疫沈降法により検出した蛋白を、質量分析法により同定することを計画した。

2) 培養下での末梢神経髓鞘化モデルは、これまでラットでのみ実施してきた。これは、Schwann細胞の純化がラット以外では困難であるためである。我々は、これまでに後根神経節(DRG)のExplant培養を行うことにより、Schwann細胞の純化プロセスなしに髓鞘化を観察できる実験法を開発し、この方法によりマウス細胞でも高効率な末梢神経髓鞘化を観察できることを示した。

本研究では、このExplant培養と類似した方法により、神経細胞・Schwann細胞をそれぞれ純化することなく末梢神経髓鞘化を観察することを目指す。

ヒト細胞を用いた末梢神経系培養モデル作出は、標準iPS細胞から分化させた神経堤細胞を、細胞塊として培養し、末梢神経細胞の培養条件で維持したうえで、髓鞘化を誘導した。

### 結果

1)これまでに脳炎患者血清5検体、CIDP患者血清4検体を入手した。

自己抗体と反応する蛋白の同定に関しては、まず、上記のように一般的な生化学的手法を試みたが、齧歯類の脳蛋白Lysateを用いた場合、ヒト脳組織抽出蛋白を用いた

場合のいずれの場合も、患者血清検体中の抗体に特異的に結合していると考えられる蛋白を同定することができなかった。(ヒト血清中の抗体と反応していると考えられる蛋白は存在したが、患者血清中の抗体に特異的に反応しているとは言えなかった。)

2) ヒト末梢神経系培養モデルでは、今年度実施した範囲では、末梢神経様に分化した細胞が長く突起を伸ばし、突起の周囲に Schwann 細胞マーカーを発現する細胞の集積がみられる、という段階に到達した。

### 考察

自己抗体に結合する蛋白を脳組織中から同定する実験に関しては、論文として成功例に関する報告も見られるが、血清中の抗体価が蛋白同定に使用できるほど高い例は少ないものと考えられた。今後、タンパクアレイを用いたスクリーニングを実施することにより抗原候補を得る。

ヒト細胞による末梢神経髓鞘化モデルは、引き続き実験手技の最適化を進める。

### 参考文献

Saitoh F, Hagiwara H, Wakatsuki S, Araki T Carboxymethylation of CRMP2 is associated with decreased Schwann cell myelination efficiency. Neurosci Res 139(2) 58 – 62, 2019.

## 神経疾患の病態形成に関わる慢性炎症の分子機序の解明

国立精神・神経医療研究センター神経研究所  
疾病研究第六部  
大木 伸司

### 緒言

中枢神経疾患における慢性炎症の分子機序は極めて複雑であり、その全容は未解明である。I型インターフェロン(IFN-I)は、感染非依存性の sterile inflammation や慢性疲労などに伴う慢性炎症に関わる一方で、IFN- $\beta$ は多発性硬化症の治療薬でもあることから、その作用は context-dependent と考えられる。本研究では、中枢神経系の IFN-I 産生細胞としての microglia の機能に着目し、IFN-I シグナルに関する様々な遺伝子の改変マウスを用いて、中枢神経系の慢性炎症に対する IFN-I の作用を網羅的に解析する。様々な神経難病の病態形成過程における IFN-I の機能の解明が進むことにより、複数の疾患に渡る慢性炎症の分子機序の理解が進み、病態解明と治療薬開発をつなぐ画期的な成果が期待できる。

### 方法

IFN- $\alpha/\beta$ 受容体欠損(IFN- $\alpha/\beta$ RKO)マウスに EAE を誘導し、中枢神経系に浸潤した Th 細胞の Eomes 発現と microglia の IFN signature の相関を調べる。TREX1 欠損(Trex1 KO)マウスを用いて、上記と同様の解析を進める。microglia 特異的 USP18 欠損マウスを用いて、microglia 由来の IFN-I の機

能を解析する。

### 結果

IFN-I は抗原提示細胞のプロラクチン産生と Eomes 陽性 Th 細胞の生成を誘導し、後期 EAE 病態に関わる。EAE マウスの microglia では IFN signature は有意に亢進していた。近年、microglia の機能的 heterogeneity が注目されており、EAE 誘導マウスの microglia を用いて single cell 解析でも、IFN signature の有無を指標として、microglia の機能的 heterogeneity が確認できた。

### 考察

Microglia 由来の IFN-I は、後期 EAE 病態に伴う慢性炎症の形成に深く関わることが示され、その分子機序の一端が明らかとなった。当初の計画通り、引き続き研究を進めていく。

### 結論

EAE の病態形成過程における microglia 由来の IFN-I の機能が示された。microglia の機能的 heterogeneity も示されたことから、今後他の遺伝子欠損マウスの解析と、組織透明化技術を用いた脳組織解析による microglia の spatio-temporal な挙動の解明を目指す。

### 参考文献

- Chenyang Zhang, Ben J. E. Raveney, Hirohiko Hohjoh, Chiharu Tomi, Shinji Oki, Takashi Yamamura. Extrapituitary prolactin promotes generation of Eomes-positive helper T cells mediating neuroinflammation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 116 (42) 21131–21139 (2019)

## 慢性炎症性脱髓性多発神経根ニューロパチー(CIDP)における病原性リンパ球の検討

国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 免疫研究部

佐藤和貴郎

### 緒言

慢性炎症性脱髓性多発神経根炎 (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy : CIDP) は、末梢神経を標的とする炎症性脱髓疾患であり、自己免疫学的機序の関与が考えられている。CIDPにおける標的抗原は同定されていないが、液性免疫と細胞性免疫の両者の関与が示唆されている。我々は、多発性硬化症とそのモデル動物である実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) の解析から、病原性 CD4 陽性 T 細胞に関連する分子として Eomes および NR4A2 を同定した ((PNAS 2008, PLoS One 2013, Nat Commun 2015)。前者は進行型 MS との関連が、後者は MS の再発との関連を示唆する結果が得られている。今回、血液浄化療法や定期的 IVIG 療法などの免疫治療を必要としている難治性の CIDP 患者を対象に、末梢血 memory CD4+T 細胞における Eomes および NR4A2 の発現を定量し、病態との関連について検討した。

### 方法

対象は、当院通院中の FENS/PNS 診断基準を満たす CIDP 患者 10 名 (平均年齢土

SD=52±17.9 歳、男/女=3/7) と、健常者 12 名 (平均年齢±SD=40±7.3 歳、男/女=5/7) である。1) 対象の末梢血から末梢血単核球細胞を分離し、フローサイトメーターを用いて、CD4 陽性 T 細胞中の Eomes 陽性細胞の頻度および memory CD4 陽性 T 細胞 (CD3+CD4+CD45RA-) における NR4A2 陽性細胞の頻度を測定した。2) Eomes や NR4A2 の頻度が異常高値の症例の臨床的特徴を検討した。

### 結果

健常者と比較し NR4A2 陽性 memory CD4+T 細胞高値の患者は 10 例中 6 例、Eomes 陽性 Th 細胞高値例は 2 例、両者とも高値例は 1 例であった。両者とも正常であった 3 例は、IVIG 治療直後の 2 例と PSL10 mg/日で寛解維持している症例であった。

### 考察と結論

血液浄化療法や定期的 IVIG を必要とする難治性 CIDP 患者において、末梢血中の NR4A2 陽性細胞や Eomes 陽性細胞の頻度の高い症例は決してまれではない。両細胞は、多発性硬化症においてのみならず、CIDP においても病態形成に関連していると考えられ、また病態マーカーとして有用な可能性がある。

### 参考文献

1. Raveney, J.E.B., S. Oki, H. Hohjoh, M. Nakamura, Sato W, M. Murata, and T. Yamamura: Eomesodermin-expressing T-

- helper cells are essential for chronic neuroinflammation. *Nature Comm* 6:8437, 2015
2. Doi, Y., Oki, S., Ozawa, T., Hohjoh, H., Miyake, S., & Yamamura, T. (2008). Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(24), 8381-8386.

## 神経核内封入体病の臨床的多様性

分担研究者:岡本 智子<sup>1)</sup>

研究協力者:石原 資<sup>1)</sup>, 齊藤 祐子<sup>2)</sup>, 佐藤 典子<sup>3)</sup>, 佐藤 和貴郎<sup>4)</sup>, 山村 隆<sup>4)</sup>, 高橋 祐二<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 国立精神・神経医療研究センター病院 脳神経内科, <sup>2)</sup> 同 臨床検査部, <sup>3)</sup> 同 放射線診療部, <sup>4)</sup> 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 免疫研究部

### 緒言

神経核内封入体病(neuronal intranuclear inclusion disease; NIID)は、認知機能障害を呈し、特異な脳MRI所見からNIIDが疑われ、皮膚生検で診断が確定される症例が多い。しかし、NIIDの中には、慢性に経過する筋力低下や感覚障害を有し、末梢神経障害が前景にたつ症例や、急性神経症状を呈する症例が存在し、NIIDの臨床像を検討することは重要である。本研究では、NIID患者の臨床的特徴を検討することを目的とする。

### 方法

当院でNIIDと診断された12例について臨床経過、電気生理学的所見、脳MRI所見の特徴を後方視的に検討した。

### 結果および考察

NIID 12例(男5例、女7例)、発症年齢は31～68歳、発症から診断確定までは1～17年、家族歴は2例に認めた。初期症状は認知機能低下、振戦、四肢筋力低下、排尿障害などであった。10例は脳MRIで特徴的な病変を認めたことからNIIDが疑われ、皮膚生検で診断が確定された。頭部MRI所見は、全例に大脳萎縮、小脳萎縮を認め、DWI皮髓境界高信

号10例、FLAIR画像で広範な白質高信号9例、小脳虫部高信号8例、小脳脚高信号7例に認められた。2例は認知機能低下なく、上記NIIDに特徴的なMRI画像所見<sup>1)</sup>を認めず、末梢神経障害が前景にたち、初期に慢性炎症性脱髓性ニューロパチーと診断されていた。うち1例は経過中急激な頭痛、めまい、視野異常が出現、頭部MRIで広範な病変を認めた。急性期画像所見はMitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes (MELAS)に類似していたが、ミトコンドリア全周シーケンスで変異を認めなかった。末梢神経障害、脳卒中様エピソード、縮瞳を認めたことからNIIDを疑い、皮膚・神経生検を施行し診断が確定した。近年、NIIDの原因遺伝子としてNOTCH2NLGのGGC expansionが同定され<sup>2)</sup>、本例においても同様の遺伝子異常を認めている。

### 結論

NIIDの中にはDWIにおける皮髓境界高信号などの特徴的な頭部MRI所見を呈しない症例が存在し、末梢神経障害、急性発症の中枢神経症状を呈する症例の鑑別診断としてNIIDを考慮することは重要である。近年の遺伝子異常の同定は、今後臨床的多様性を示すNIIDの診断に重要な役割を果たすと考える。

### 参考文献

- 1) Sugiyama A. et al. AJNR Am J Neuroradiol. 2017;38(11):2100-2104.
- 2) Sone J. et al. Nat Genet. 2019;51(8):1215-1221.

## ステロイドパルス療法で寛解不充分な MS・NMO における血液浄化療法の有効性とその免疫学的な予測指標に関する研究

国立精神・神経医療研究センター

1)病院 脳神経内科診療部、

2)神経研究所 免疫研究部、

林 幼偉

### 緒言

疾患修飾薬の普及や免疫抑制剤の調整により多くの MS や NMO で疾患活動性の制御が可能になった。しかし再発・増悪症状に対してはほとんどの施設でステロイドパルスの施行にとどまり、複数クール施行しても充分に寛解しない症例も少なくない。ステロイドパルス後も症状が残存する症例に対する血液浄化療法の有効性と免疫学的指標を解析する。

### 方法

当院では 2005 年から血液浄化療法を導入しており、今回 2005 年度から 2011 年度の初期 5 年間に行った MS 77 人(再発型(=RRMS) 45 人；進行型(=SPMS) 32 人)；NMO 20 人と 2016 年度から 2017 年度の後期 2 年間に行った MS 73 人(RRMS 41 人；SPMS 32 人)；NMO 44 人を解析した。原則血漿免疫吸着療法(IAPP)から開始し、反応次第で二重濾過型血漿交換療法(DFPP)や単純血漿交換療法(PE)に変更した。

EDSS が軽減した症例を改善群、FS のみが軽減した症例を軽快群、自覚的症状のみが軽減した症例を有効群、それ以外を不变・悪

化群と判定し、複数回の施行で判定が異なる場合は別症例とした。

免疫学的指標として施行前の末梢血 B 細胞中の plasmablast と IFN $\gamma$ <sup>+</sup>Th1 細胞あるいは IL-17<sup>+</sup>Th17 細胞の割合を測定した。

### 結果

前期では IAPP を施行した場合は RRMS 37.0%；SPMS 27.3%；NMO 47.8% の症例で、DFPP や PE を施行した場合は RRMS 25.0%；SPMS 35.3%；NMO 45.5% の症例で改善・軽快した。後期では IAPP を施行した場合は RRMS 65.9%；SPMS 39.4%；NMO 26.3% の症例で、DFPP や PE を施行した場合は RRMS 50.0%；SPMS 50.0%；NMO 57.7% の症例で改善・軽快した。

改善・軽快群では IAPP を施行した場合 plasmablast が低く、Th1 が高く、DFPP/PE を施行した場合 plasmablast が高かった。

### 考察

IAPP は IgG1, IgG3 サブクラスを選択的に除去することから、plasmablast の活性化レベルにより自己抗体の IgG サブクラスの発現に選択性の違いが生じる可能性がある。Th1 細胞をメインとする病態には IgG1 や IgG3 型の自己抗体が関与していることを示唆する。前期と後期の反応性の違いとしては MS では過去の施行において効果を示している患者が多く含まれていたが NMO では新規の患者が多くなったこと、MS では疾患修飾薬の選択肢が増えたことが理由として考えられる。

## 結論

ステロイドパルス治療抵抗性の MS・NMOにおいて血液浄化療法が効果的な症例が存在する。RRMS では IAPP で軽快する症例が多いが、SPMS や NMO では DFPP・PE で効果が期待できる。IAPP と DFPP・PE の有効性は plasmablast の多寡で異なり、特に IAPP では Th1 の割合で予測が可能である。

## 参考文献

1. Weiner HL, Dau PC, Khatri BO, et al. Double-blind study of true vs. sham plasma exchange in patients treated with immunosuppression for acute attacks of multiple sclerosis. *Neurology* 1989; 39: 1143-1149.
2. Weinshenker BG, O'Brien PC, Petterson TM, et al. A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. *Ann Neurol* 1999; 46: 878-886.
3. Keegan M, Pineda AA, McClelland RL, et al. Plasma exchange for severe attacks of CNS demyelination: predictors of response. *Neurology* 2002; 58: 143-146.
4. Watanabe S, Nakashima I, Misu T, et al. Therapeutic efficacy of plasma exchange in NMO-IgG-positive patients with neuromyelitis optica. *Mult Scler* 2007; 13:128-132.
5. Khatri BO, McQuillen MP, Hoffmann RG, et al. Plasma exchange in chronic progressive multiple sclerosis: a long-term study. *Neurology* 1991; 41: 409-414.
6. Hauser SL, Dawson DM, Lehrich JR, et al. Immunosuppression and plasmapheresis in chronic progressive multiple sclerosis. Design of a clinical trial. *Arch Neurol* 1983; 40: 687-690.
7. Canadian Cooperative MS Study Group. The Canadian cooperative trial of cyclophosphamide and plasma exchange in progressive multiple sclerosis. *Lancet* 1991; 337: 441-446.
8. Schmitt E, von Appen K, Behm E et al. Immunoabsorption with phenylalanine-immobilized polyvinyl alcohol versus plasma exchange - A controlled pilot study in multiple sclerosis. *Ther Plasmapheresis* 1993; 12: 239-242.
9. Schimrigk S, Faiss J, Köhler W, et al. Escalation therapy of steroid refractory multiple sclerosis relapse with tryptophan immunoabsorption - Observational multicenter study with 147 patients. *Eur Neurol*. 2016; 75: 300-306.
10. Chihara N, Aranami T, Oki S, et al. Plasmablasts as migratory IgG-producing cells in the pathogenesis of neuromyelitis optica. *PLoS One*. 2013; 8(12): e83036.

## 慢性疲労症候群における脳内構造ネットワーク異常と抗自律神経受容抗体価との相関解析

分担研究者 NCNP 病院放射線診療部

佐藤典子

研究協力者 NCNP 病院 放射線診療部

藤井裕之、木村有喜男

NCNP 神経研究所免疫研究部

佐藤和貴郎、山村隆

NCNP 病態統合イメージングセンター

松田博史

### 緒言

脳内ネットワーク解析は脳の構造的・機能的結合状態を評価し、通常の MRI 画像では異常が指摘できない脳内ネットワークの異常を評価することが可能である。筋痛性脳脊髄炎/慢性疲労症候群 (ME/CFS) 患者における脳内ネットワーク異常と抗自律神経受容体抗体価の相関解析を行った。

### 方法

ME/CFS 患者において、頭部 MRI 検査と血中の抗自律神経受容体抗体価の測定が 30 日以内に施行されている 89 例(男性 13 名、女性 76 例、; 平均年齢  $37.3 \pm 12.7$  歳、右利き手)を対象とした。撮像は全例 Philips 社製 3 テスラ Achieva で行った。SPM 12 を用いて 3D-T1 強調画像から灰白質画像を抽出し、 $2 \times 2 \times 2\text{mm}$  大の等大ボクセル化したのちに、灰白質の類似性を用いた個人構造ネットワーク解析 ([https://github.com/bettytijms/Single\\_Subject\\_Grey\\_Matter\\_Networks](https://github.com/bettytijms/Single_Subject_Grey_Matter_Networks); Tijms et al.,

2012; version 20150902) を用いて、局所のネットワーク指標である Degree、Clustering coefficient、Shortest path length、Betweenness centrality、全体脳のネットワーク指標である small-world network  $\delta$  を算出した。これらの指標と抗自律神経抗体(抗  $\beta 1$  アドレナリン受容体抗体( $\beta 1\text{-adr-R-Ab}$ )、抗  $\beta 2$  アドレナリン受容体抗体( $\beta 2\text{-adr-R-Ab}$ )、抗ムスカリーン 3 型アセチルコリン受容体抗体(M3R-Ab)、抗ムスカリーン 4 型アセチルコリン受容体抗体(M4R-Ab)) の抗体価との相関を解析した。

### 結果

全体脳のネットワーク指標の  $\delta$  はいずれの抗体価とも有意な相関は認めなかった。局所ネットワーク指標では、 $\beta 1\text{-adr-R-Ab}$  と右背外側前頭前野白質(BA9) の Betweenness centrality に正の相関、 $\beta 2\text{-adr-R-Ab}$  と右一次運動野皮質(BA4) の Shortest path length に負の相関を認めた。M3R、M4R と局所ネットワーク指標に有意な相関は認められなかった。BA9 の白質は右上縦束の一部であり、我々が以前拡散イメージングを用いて右上縦束の異常を報告したが(Kimura et al. JMRI. 2019)、同部位にネットワーク異常が再現されたと言える。BA9 は意思決定やワーキングメモリーなどの認知機能、痛みの制御に関連している。Betweenness centrality の増加の原因として、同部の白質線維の障害/減少により、残存した白質線維を介したネットワークが発達していることが考えられる。BA4 は一次運動野であるが、慢性痛の患者では一次運動野の活性化

や、補足運動野との結合増強を認めることが知られている。一次運動野が活性するのは、これが痛みのネットワークに抑制的に働くためと考えられている。Shortest path lengthとの負の相関は、痛みに対する一次運動野の活性化によって局所ネットワークが効率化したこと、補足運動野とのランダムネットワークの増加したことが要因として考えられる。

#### 考察

我々は以前 ME/CFS にて、MR 拡散先鋭度画像による解析を行い、患者群にて両側頭頂葉、右上縦束に有意な低下を認めた。また血中の Plasmablast/B 細胞、B 細胞/リンパ球、Treg/CD4+T 細胞の比をもって、異常高値群と正常低値群に分けて比較したところ、Treg/CD4+T 細胞では右上縦束に低下域を認めた。今回の自律神経受容体においても脳内ネットワーク解析で異常を示し、やはり ME/CFS の一部の患者は自己免疫性疾患患者が含まれるとの我々の予想は妥当性があるものと強く思われる。

#### 結論

MRI の灰白質画像を用いた構造ネットワーク解析は拡散イメージング同様に、ME/CFS の病態解明に有用と考えられる。抗自律神経受容体抗体である  $\beta$  1-adr-R-Ab、 $\beta$  2-adr-R-Ab は ME/CFS の診断マーカーとなる可能性がある。

#### 参考文献

1. Fukuda K, Straus SE, Hickie I, Sharpe MC, Dobbins JG, Komaroff A. The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study. International Chronic Fatigue Syndrome Study Group. Annals of internal medicine. 1994;121(12):953-9.
2. Klimas NG, Salvato FR, Morgan R, Fletcher MA. Immunologic abnormalities in chronic fatigue syndrome. Journal of clinical microbiology. 1990;28(6):1403-10.
3. Sone D, Sato N, Ota M, Kimura Y, Matsuda H. Widely Impaired White Matter Integrity and Altered Structural Brain Networks in Psychogenic Non-Epileptic Seizures. Neuropsychiatric disease and treatment. 2019;15:3549-55.

## NMO 剖検例の病理解析

研究分担者

国立精神・神経医療研究センター

病院臨床検査部病理部門

齊藤祐子

研究協力者

1 国立精神・神経医療研究センター

病院 臨床検査部病理部門、

2 同 脳神経内科

水谷真志<sup>1</sup>、佐野輝典<sup>1</sup>、高橋祐二<sup>2</sup>

緒言

NMO は本邦に多い疾患であるが、剖検例は非常に稀である。今年度は、NMO の症例がブレインバンクに登録された。ブレインバンクプロトコールに則り、視神経を含む半脳をホルマリン固定、半脳を凍結、(脊髄も一部を凍結) した。さらに凍結前にリンパ球の解析を行うためのサンプリングを行うことが出来たので、これまでに判明している病理解析の結果を報告する。

方法

対象は 54 歳女性。45 歳時、右優位の視神經炎、第一頸髄から第六頸髄までの上部頸髄炎にて A 病院にて加療。抗 AQP 抗体陽性であり NMO と診断された。一時人工呼吸器管理となつたが、離脱し、翌年から当院外来フォローとなつた。ADL は車いす移動、上肢は肩までの挙上可能レベルで会話も可能であった。その後ステロイド+免疫抑制剤内服にて NMO の再発は無く、経過良好。54 歳、右慢

性心不全、肺うつ血により死亡。御遺族の承諾を得て、死後 23 時間 40 分後に病理解剖を施行。

結果および考察

神経病理学的：脳重は 1377g と減少は認めないが、前頭葉皮質に軽度萎縮あり。視神経は右優位に高度の萎縮を認めた。頸髄では第 1 ~ 第 4 頸髄が高度に萎縮し、褐色調を呈していた。光頭では、視神経に強い脱髓を認め、AQP4 抗体陰性。血管周囲に T 細胞の cuffing を認めた。頸髄では脊髄前成中裂に強い脱髓を認めたが、T 細胞の cuffing は全般的に認められた。大脳では、明らかな脱髓は認められないものの、前頭葉優位に T cell の cuffing を軽度認めたが、他の皮質では明らかではなかった。

結論

光頭については解析途中であるが、臨床症状に合致して、視神経と脊髄の脱髓の時相はほぼ同時期と考えられる陳旧性の病変のみであった。

なお、大脳の前頭葉優位に脱髓所見は明らかではないもののリンパ球の cuffing を認めた点は興味深い。

今後、フローサイトメトリーとの結果とも照らし合わせ、リンパ球の染め分け、剖検時に採取したリンパ節の解析も進めてゆく予定である。

また昨年度に経験した SPMS や、疾患コントロール、健常コントロールとの比較も行う予定である。

## 一本鎖抗体を用いた神経変性疾患の治療法開発研究

滋賀医科大学脳神経内科

漆谷 真

### 緒言

パーキンソン病、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症(ALS)を始め多くの神経変性疾患は生理機能を有する蛋白質が構造学的な毒性転化を来して生じる「蛋白質ミスフォールディング病」であり、これに端を発した多彩なパスウェイを介しているが、個別のパスウェイ介入を目指した治療戦略は残念ながら大きな成果を生んでいない。我々は、これまで ALS の原因蛋白質であるミスフォールド TDP-43 と変異型 SOD1 を認識するモノクローナル抗体の產生に成功した。本研究はこうしたミスフォールド構造特異認識抗体由来の一本鎖抗体を用いた分子標的治療の開発を目指す。特に細胞自律性と非細胞自律性に着目し、作用点の近いに応じた改変抗体を作製し、培養細胞、子宮内電気穿孔法、モデルマウなど様々な評価系を用いて、新たな遺伝子治療法の開発を進める。

### 方法

#### #1 ミスフォールド型 TDP-43 に対する細胞内 scFv 治療法の開発

ミスフォールド TDP-43 を認識する 3B12A モノクローナル抗体由来の scFv にオートファジー分解シグナル CMA を付加した自己分解型一本鎖抗体をすでに構築した。こ

れを発現するウイルスベクター(AAV, BDV)に組み込み、神経特異的に TDP-43 凝集体を形成する独自の遺伝子改変マウスの静脈内投与により効果を検討する。さらに CMA シグナル以外の分解シグナルの効率も検討し、より治療効果の高い細胞内抗体の開発を目指す。

#### #2 変異 SOD1 を有する家族性 ALS に対する scFv 分泌 OPC の移植研究

我々はすでにオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の変異 SOD1 ラットへの髄腔内移植が生存期間の延長に有効であるデータを得ている。変異 SOD1 を特異的に認識するモノクローナル抗体 D3·1 より分泌型 scFv を構築しボルナウイルスベクターに組み込み、OPC に感染させ、変異 SOD1 ラットの髄腔内に投与し有効性を検討する。

### 結果と考察

我々はこれまでに変異 SOD1 蛋白質のみと結合し、天然構造の SOD1 を認識しないマウスモノクローナル抗体(antibody X)の作製に成功している。その antibody X の変異 SOD1 蛋白質に対する特異性を SOD1 変異を持つ ALS 患者の脊髄組織を用いて確認している。また浸透圧ポンプを用いて髄腔内に antibody X を 4 週間連続投与することにより SOD1H46RTg ラットの生存期間の延長、運動機能の改善を確認している。しかし変異蛋白質は細胞内に豊富に存在しており、全長抗体の治療限界の障壁となっている。そこで、我々は antibody X を用いて抗原と結合する可変領域(Fv) 配列をク

ローニングし、低分子の一本鎖抗体 (single chain of Fv ; scFv) の作製に成功した。さらに scFv に分泌シグナルを付加させた細胞外分泌抗体 (scFv-X と命名) を作製し培養細胞において変異 SOD1 に特異的に結合することを確認している。scFv-X を発現する非増殖型ボルナウイルス病ウイルスベクター (BDV) を作成し、ラットの初代培養により作成した OPC に感染させ、抗体の発現、分泌を確認している。EGFP を発現している Tg ラットの初代培養により EGFP-OPC を作成し、SOD1H46RTg ラットの髄腔内に投与し、移植された EGFP-OPC が脊髄内に生着していることを確認した。まだ少数ではあるが scFv-X を発現する BoDV に感染した OPC を投与する群が scFv-X を発現しない BoDV に感染した OPC を投与する群と何も投与しない群に比べ SOD1H46RTg ラットの生存期間、体重変化、運動機能が有意に改善することを確認している。また生存期間の延長が平均で抗体のみでは 2 週間であったが細胞移植と組み合わせた方法では 4 週間の延長を認めた。また病理学的にも神経細胞の脱落、反応性アストロサイト、ミクログリアの増殖が減っていることを確認している。

## 結論

抗体治療と細胞移植治療を組み合わせた新たな治療法は ALS に対して有望な治療法である可能性があり、今後その治療機序の解明に関してさらなる研究が必要である

## 参考文献

1. Ayaki T, Murata K, Kanazawa N, Uruha A, Ohmura K, Sugie K, Kasagi S, Li F, Megumi Mori M, Nakajima R, Sasai T, Nishino I, Ueno S, Urushitani M, Furukawa F, Ito H, Takahashi R. Myositis with sarcoplasmic inclusions in Nakajo-Nishimura syndrome: a genetic inflammatory myopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2020; in press.
2. Shimizu J, Tabata T, Tsujita Y, Yamane T, Yamamoto Y, Tsukamoto T, Ogawa N, Kim H, Urushitani M, Eguchi Y. Propofol infusion syndrome complicated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: a case report. *Acute Med Surg*. 2020;7:e473.
3. Minamiyama S, Ueda S, Nakashima R, Yamakado H, Sakato Y, Yamashita H, Sawamoto N, Fujimoto Ry, Nishino I, Urushitani M, Mimori T, Takahashi R. Thigh muscle MRI findings in myopathy associated with anti-mitochondrial antibody. *Muscle Nerve* 2020;61:81-87.
4. Kobashi S, Terashima T, Katagi M, Nakae Y, Okano J, Suzuki Y, Urushitani M, Kojima H. Transplantation of M2-deviated microglia promotes recovery of motor function after spinal cord injury in mice. *Mol Ther* 2020; 28:254-265.
5. Zong C, Hasegawa R, Urushitani M, Zhang L, Nagashima D, Sakurai T, Ichihara S, Ohsako S, Ichihara G. Role of microglial activation and neuroinflammation in neurotoxicity of acrylamide in vivo and in vitro. *Arch Toxicol*. 2019; 93(7):2007-2019.
6. Yamaguchi Y, Li F, Tsujimura A, Kamada M, Ito H, Maki T, Sawamoto N, Urushitani M, Takahashi R. Phosphorylated NF- $\kappa$ B subunit p65 aggregates in granulovacuolar degeneration and neurites in neurodegenerative diseases with tauopathy. *Neurosci Lett* 2019; 704: 229-235.
7. Hishizawa M, Yamashita H, Akizuki M, Urushitani M, Takahashi R. TDP-43 levels are higher in platelets from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis than in healthy controls. *Neurochem Int*. 2019; 124, 41-45.
8. 漆谷 真. 筋萎縮性側索硬化症に対する創薬開発の現状と展望「神經難病をクスリで治す」*BRAIN and NERVE*. 71 (1) 13-23, 2019
9. 漆谷 真, 玉木 良高, 引綱 亮太, 南山 素三雄. ALS における免疫療法開発の現状と展望. 特集「ALS2019」*BRAIN and NERVE*. 71 (11): 1289-1301, 2019.
10. 玉木良高、漆谷 真. 運動ニューロン疾患の抗体を用いた治療開発の展望. 神經内科, 2019, 90, 146.

## HPV ワクチン後自己免疫脳症の病態、疫学、 リンパ球動態等についての検討

鹿児島大学大学院脳神経内科

高嶋 博

### 緒言

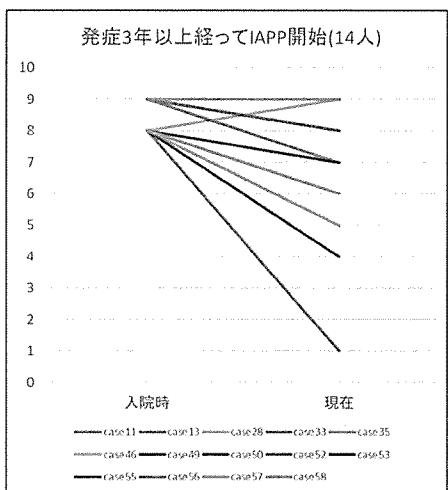
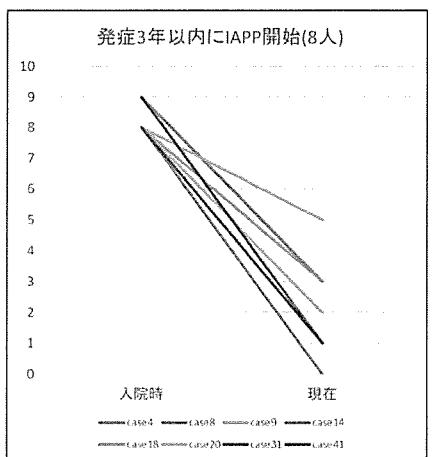
免疫学的発症機序に関する理解が十分でない自己免疫性脳炎脳症を対象とし、その臨床症状や病態や治療反応性を解析し、それに基づいた新規治療法の実現に向けた研究を実施する。対象疾患としては子宮頸癌ワクチン(HPV ワクチン)関連自己免疫脳症、橋本脳症、抗ガングリオニック ACh-R 抗体(抗 gACh-R 抗体)関連脳症について検討する。初年度研究として HPV ワクチン関連自己免疫脳症について患者の臨床像と機能画像検査、自律神経機能検査、各種抗体の検出、皮内神経線維密度、疫学について検討し、その臨床情報には一定の傾向がみられ免疫学的機序の関与が強く疑われることを証明していく。

### 方法

我々の施設では HPV ワクチン後に神経症状を発症した患者を受け入れて、現在のところ約 58 名の患者を 6 年以上に渡って実際に入院させ診療し、脳内炎症疾患として免疫吸着療法(IAPP)を中心とする治療を行ってきた。ほとんどの患者が発症から 5~8 年経過したため、治療効果、長期的な予後、予後を左右する因子について検討する。

### 結果

HPV ワクチン関連脳症について十分な臨床情報が得られた 58 名の患者の臨床情報を解析した。県内在住が 24 人で、県外からの患者が 34 名であった。発症年齢は 12 歳から 19 歳であり、ワクチンの種類はサーバリックスが 48 人、ガーダシルが 10 人であった。その臨床像は、53 人に頭痛や四肢疼痛などの痛み症状が認められ、48 例に慢性的な倦怠感を認め、46 人が日常生活に影響を与える運動障害を発症していた。た。43 人に睡眠障害、39 人に自律神経症状と思われる症状が見られた。その他、37 例に学習障害・記憶障害が認められた。血液検査では、37 症例中 10 症例の血液中に抗 gAChR 抗体が検出された。23 人中 18 人に髄液中の抗 GluR 抗体が検出された。2016 年の慢性疲労症候群患者の日常生活困難度調査事業実施報告書による各種症状出現率と比較すると症候的には類似点が多いと考えられた。治療介入の効果について検討したところ、HPV ワクチン接種後神経障害では、重症例は発症 3 年以内に IAPP を導入した例は performance status の改善が強く認められたのに対して、3 年以内に IAPP を導入しなかった例は PS の改善割合が小さかった。



血液中の抗体が検出されることから免疫学的反応が起こっていると想定し、細胞性免疫因子、液性免疫因子について検討した。その結果、年齢およびワクチン接種のある対象群を置いていないものの、血液中のIL-2やIL-4、IL-6、IL-12、IL-13、MIP-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ などの上昇が認められた。一方、CD3陽性CD4陽性Fox-p3陽性細胞の割合は健常者と比べてかわりなく、CD19+CD27+CD180-CD38highの分画にも差が認められなかった。

## 考察

本疾患の患者の多くに血液中サイトカイン

の上昇を確認した一方、Plasmablastや制御性T細胞の頻度に健常者と差は認められなかつた。過去の報告では多くが血液学的異常がないとされてきたが、今回の検討により患者の生体内で起こっている特異な免疫学的な反応が他覚的に確認された可能性がある。これは慢性化していない患者に免疫治療が奏功する機序を説明している可能性がある。次年度研究では、サンプル数を増やすとともに、適切なコントロールサンプルの検討により、症状特異的な免疫反応であるか検討する予定である。

## 参考文献

- Ikeda SI, Hineno A, Ozawa K, Kinoshita T. Suspected adverse effects after human papillomavirus vaccination: a temporal relationship. *Immunol Res.* 2018 Dec;66(6):723-725. doi: 10.1007/s12026-018-9063-y. Review.
- Hirai T, Kuroiwa Y, Hayashi T, Uchiyama M, Nakamura I, Yokota S, et al. Adverse effects of human papillomavirus virus vaccination on central nervous system: neuro-endocrinological disorders of hypothalamo-pituitary axis. *Auton Nerv Syst.* 2016;53:49-64.
- Kuroiwa Y, Yokota S, Nakamura I, Nakajima T, Nishioka K. Human papilloma virus vaccination (HPVV)-associated neuro-immunopathic syndrome (HANS): a comparative study of the symptomatic complex occurring in Japanese and Danish young females after HPVV. *Auton Nerv Syst.* 2018;55:21-30.
- Carnovale C, Damavandi PT, Gentili M, Pozzi M, Antoniazzi S, Radice S, et al. On the association between human papillomavirus vaccine and sleep disorder: evaluation based on vaccine adverse reporting systems. *J Neurol Sci.* 2017;373:179-81.
- Kinoshita T, Abe R, Hineno A, Tsunekawa K, Nakane S, Ikeda S. Peripheral sympathetic nerve dysfunction in adolescent Japanese girls following immunization with the human papillomavirus vaccine. *Intern Med.* 2014;53:2185-200.
- Palmieri B, Poddighe D, Vadalà M, Laurino C, Carnovale C, Clementi E. Severe somatoform and dysautonomic syndromes after HPV vaccination: case series and review of literature. *Immunol Res.* 2017;65:106-16.

## 重症筋無力症における濾胞性T細胞とIL-21 産生の解析

分担研究者 関西医科大学大学総合医療センター神経内科 近藤 誉之

研究協力者 京都府立医科大学大学院神経内科学 芦田 真士

### 緒言

我々は、抗アセチルコリン受容体抗体陽性の重症筋無力症（myasthenia gravis: MG）患者において末梢血中濾胞性T細胞（circulating follicular helper T cells : cTfh）の頻度、中でも inducible T cell costimulator (ICOS)を高発現した ICOS<sup>high</sup>cTfh の頻度が上昇しており、重症度と相関することを報告した。C-X-Chemokine Receptor 5 (CXCR5)はTfhとB細胞上に発現し、2次リンパ組織への移動を促進する。TfhのICOSとB細胞上のICOS ligand (ICOSL)の相互作用はB細胞の分化に重要である。また、TfhはInterleukin (IL)-21を产生し、IL-21はB細胞の抗体产生を促進する。MG患者におけるICOSの発現とIL-21産生能と両者の関係、IL-21の表面分子を中心としたB細胞への影響について解析した。

### 方法

MG患者末梢血からcTfhを分離、*in vitro*で48時間刺激し、上清中のIL-21を定量、健常群と比較した。同様に ICOS<sup>high</sup>cTfh と ICOS<sup>low</sup>cTfhにおいて、IL-21産生を比較した。またB細胞を分離培養し、IL-21を培地に添

加して、IgG産生とB細胞の表面マーカーへの影響を検討した。またIL-21のB細胞表面分子への影響とSTAT3のリン酸化の関係についても検討した。IL-21、IgGの定量、B細胞表面マーカー、STAT3リン酸化の解析にはフローサイトメトリーを用いた。

### 結果および考察

MG患者において、健常群と比較してcTfhによるIL-21の産生は亢進していた。また、MG患者のICOS<sup>high</sup>cTfhにおいてIL-21の産生亢進は顕著であったが、健常人ではこの現象を認めなかった。また既報告にあるように、*in vitro*の培養でIL-21によってB細胞によるIgG産生は促進された。新しい知見として、IL-21により、B細胞上のCXCR5とICOSL発現は亢進した。IL-21存在下で、B細胞のSTAT3はリン酸化され、STAT3リン酸化の阻害により、IL-21のCXCR5、ICOSL発現促進は阻害された。IL-21のB細胞表面分子発現への影響はSTAT3リン酸化を介していることが推察された。

### 結論

MG患者では、TfhがICOSを高発現し、IL-21を产生することによってB細胞上のCXCR5発現維持とICOSL発現を亢進する。結果として、2次リンパ節におけるT-B細胞間作用を促進する可能性がある。

### 参考文献

特になし

## 疲労や疼痛を主徴とする炎症性中枢神経疾患の病態研究

順天堂大学 免疫学講座

三宅 幸子

### 緒言

筋痛性脳脊髄炎/慢性疲労症候群 (ME/CFS) における主要な症状は疲労や疼痛であるが、同様の症状は自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)にもみられる。これらの症状は中枢神経における炎症性の病態と関連すると考えられるものの、一般的には臨床的な炎症マーカーではとらえることができない。精神疾患や神経変性疾患も臨床的には明らかな炎症のとらえられない病態であるが、近年ミクログリアなどの自然免疫系を中心とした神経炎症がこれらの病態へ関与していることが注目されている。ME/CFS や SLE においてもこのような神経炎症が病態に関与している可能性が考えられるため、今回我々は SLE マウスモデルを用いて中枢神経における自然免疫系を中心とした慢性炎症の病態を解析し、ME/CFS 病態の解明へつなげることを目指した。

### 方法

SLE モデルである FcγRIIB<sup>-/-</sup> Yaa マウスについては強制水泳試験、tail-flick 試験により精神神経症状の評価を行い、脳における免疫細胞のフローサイトメトリー解析、免疫組織染色、RNA-seq によるミクログリアの網羅的遺伝子発現解析によって、精神神経症状と中枢神経炎症病態との関連について検討した。

また、古典的な SLE モデルである NZB×NZW F1(NZB/NZW)、MRL/Fas<sup>lpr</sup> (MRL/lpr)についても免疫細胞の構成変化や活性化についてフローサイトメトリーと免疫組織染色を用いて解析し、FcγRIIB<sup>-/-</sup> Yaa マウスのミクログリアで発現上昇がみられた特徴的な遺伝子については定量的 PCR により NZB/NZW での発現を確認した。

### 結果

FcγRIIB<sup>-/-</sup> Yaa マウスの行動解析では、強制水泳試験における不動時間の亢進と、tail-flick 試験による温痛覚過敏がみられた。FcγRIIB<sup>-/-</sup> Yaa マウスにおけるミクログリアの RNA-seq 解析ではインターフェロン誘導遺伝子の発現上昇と、*Axl*, *Clec7a*, *Itgax* などの神経変性病態での上昇が報告されている炎症に関連する遺伝子群の発現上昇がみられ、これは NZB/NZW マウスにも共通していた。SLE モデルマウスの脳ではミクログリアや Ly6C<sup>lo</sup> 単球などのミエロイド系細胞の増加がみられ、これらの細胞では I 型インターフェロンへの反応を示唆する MHC クラス I や PDCA1 の発現上昇が共通してみられた。免疫組織染色では、ミクログリアの増加に加えて突起の肥大と延長、細胞体の増大がみられたことに加え、アストロサイトや血管内皮細胞の反応もみられた。また FcγRIIB<sup>-/-</sup> Yaa マウスと NZB/NZW マウスのミクログリアでは *Ccl5* や *Cxcl10* の発現が上昇し、脳の T 細胞の増加や Ly6C<sup>lo</sup> 単球の増加と合致する所見であった。

## 考察

*FcγRIIB<sup>-/-</sup> Yaa* マウスではうつ様症状や温痛覚過敏がみられ NPSLE や ME/CFS に通じる症状であった。SLE モデルマウスの中枢神経ではいずれも、ミクログリアやミエロイド系の細胞に変化がみられ、*FcγRIIB<sup>-/-</sup> Yaa* マウスのミクログリアの形態変化や遺伝子発現の状態は、急性炎症とは異なる自然免疫系の慢性炎症病態を示唆するものであった。

*FcγRIIB<sup>-/-</sup> Yaa* マウスと NZB/NZW マウスには共通したミクログリアの遺伝子変化がみられ、自然免疫系の慢性炎症病態は SLE 病態全般にみられるものであり、精神神経症状にもつながるものと考えられた(1)。ME/CFS では一般的な臨床検査では炎症病態がとらえられないが、PET 検査において脳のミクログリアの活性化が示されている(2)。このように SLE の中枢神経病態と ME/CFS には共通する病態があることが示唆された。

## 結論

SLE モデルマウスの中枢神経には自然免疫系の関与した慢性炎症病態があり、このメカニズムの解明により ME/CFS 病態の理解へつながると考えられた。

## 参考文献

1. Arthritis Res Ther. 2019;21(1):303.
2. J Nucl Med. 2014;55(6):945.

## 自己免疫性てんかんの免疫動態の探索

神戸大学医学部附属病院 脳神経内科

千原 典夫

### 緒言

自己免疫性てんかんは自己免疫性脳炎の症候群の一つで、早期の診断・治療介入が必要であるが、診断の根拠となる抗神経抗体の測定が本邦では時間がかかること、また抗体陰性症例では診断に至らないことなどが問題で、不十分な治療による難治性てんかんの原因となっている現状がある。炎症を示唆する髄液所見が特徴の一つであることから、本研究では末梢血及び髄液のリンパ球フェノタイプやその機能解析を行うことで、抗神経抗体陽性症例の免疫動態の特徴を解明する。

### 方法

本研究では次のように自己免疫性てんかんの免疫動態の探索を行う。1) けいれんが持続し、その背景に免疫性神経疾患が疑われる患者から検査のために得られた末梢血及び髄液検体を用いてそのリンパ球のフェノタイプ解析を行う。解析には BD 社の FACS AriaIII ないし Fortessa 及び Verse を用いる。2) フェノタイプ解析結果から統計学的な手法を用いて病態に特徴的な細胞亜分画を抽出し、その機能解析としてセルソーティングを行い細胞を分離後、免疫制御機能に関する遺伝子発現を定量的 RT-PCR 等を用いて解析する。3) 経過中に抗神経抗体陽性が判明した群と陰性であった群でリンパ球のフェノタイプが類似して

いる群の臨床的特徴の相違について解析する。

### 結果と考察

本疾患は希少疾患であるため、本年度は神戸大学と京都大学で連携した共同研究を行うための倫理委員会承認を得た。また FACS 染色のパネルについて主にヘルパーT 細胞に注目したもの、さらに T 細胞上の共抑制性受容体ないし B 細胞亜分画に注目した合計 3 種類の染色パネルを作成した。

けいれんが持続し、抗神経抗体陽性症例 (NMDA, LGI1, GAD) や扁桃体腫大などの画像上の異常所見が認められる症例について T 細胞および B 細胞の末梢血および髄液におけるフェノタイプ解析を開始した。一部の症例で自己抗体産生細胞である Plasmablasts が増加している例があり、さらに症例の蓄積を行なってゆく。

### 結論

自己免疫性てんかんについて、臨床経過、生理検査および画像検査所見、抗神経抗体、リンパ球フェノタイプを組み合わせた新たな診断基準作成を目指した解析を開始した。次年度以降症例数を増やし検討を追加する。

### 参考文献

1. Chihara N, Matsumoto R, Yamamura T. Plasmablasts and neuroimmunological disorders. Immunol Med., 42(3): 103-107, 2019

## 1-5 Development of novel therapy and diagnostics through understanding of the intractable neurological diseases

Principal Investigator:

National Institute of Neuroscience, NCNP

Takashi Yamamura

The purpose of this study is to elucidate the mechanisms of presumably inflammation-mediated intractable neurological diseases and to develop novel diagnostic methods and therapeutic strategies in order to improve the prognosis of the patients. The subjects of this research group include autoimmune encephalomyelitis, NINJA (normal brain neuroimaging accompanies neuroimmunologically justified autoimmune encephalomyelitis) and autoimmune encephalopathy/encephalitis and ME/CFS (myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome) among others. For this purpose, we take a strategy to combine basic and clinical researches, and our team includes neurologists, radiologists, pathologists to promote inter-institutional collaborations.

In the previous year, we have succeeded in detecting cytotoxic lymphocytes in normal appearing autopsy samples from various intractable neurological disease patients. Of note, we have applied state-of-the-art methodology including searching anti-neuronal autoantibodies, brain MRI analyses and B cell repertoire analyses by next-generation sequencing.