

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（ME/CFSなど）、原因不明の脳炎・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、剖検例の中枢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新しいイメージング解析手法を用い、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実施する。

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

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

齊藤祐子 国立精神・神経医療研究センター

（異動のため令和元年で終了）

田中章景 横浜市立大学大学院医学研究科

（令和二年度より開始）

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。2年目となる今年度は、それぞれの研究分野について進展がみられ、いくつかの成果発表につながった。詳細は各分担報告に譲ることとし、本総括報告書では班として横断的に進めている研究プロジェクトについて紹介する。

1) 基礎研究から出発し臨床研究に発展した研究として、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 細胞を同定し（B. Raveney et al. Nat Comm. 2015）、その発生に関する検討を動物モデルを用いて進めた。その結果、ミクログリア活性化に引き続いて産生される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てい

る (C. Zhang et al. PNAS, 2019)。

今年度、Eomes 陽性 T 細胞が二次進行型 MS の疾患活動性を反映するバイオマーカーとして有用であるとの成果発表を行うことができた (B. Raveney, et al. PNAS, 2021)。これは、脳病理組織における Eomes 陽性細胞の証明や MRI 画像解析による脳萎縮との関連解析データを含む論文であり、本研究班の貢献は大きい。なお MS 以外の難治性神経疾患 (視神経脊髄炎二例) の剖検脳組織における Eomes 陽性細胞の同定も (NCNP 岡本, 佐藤和, 山村) 特筆すべきである。さらに CIDP を始めとする難治性ニューロパチー患者の末梢血における Eomes 陽性細胞の寄与についても検討を進めた (NCNP 佐藤和)。Eomes 陽性細胞に続く、難治性神経疾患の新たなバイオマーカー探索研究として、NCNP の北條らは血液中のセルフリー核酸の検討を進めている。動物モデルを用いた検討により、セルフリー核酸が、腸内細菌依存性に脳内炎症に影響を与える機序が明らかとなりつつある。

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、「説明困難な神経症状」を呈し「びまん性脳障害」が示唆される多数の自験例についてまとめ、ME/CFS を合併する一群を見出している。NCNP 放射線科の佐藤は、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、論文として発表した。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リンパ球解析を進め、多発性硬化症との異同について新たな知見を得ている。NINJA も含め、原因不明の免疫介在性神経疾患では、抗神経

抗体の存在が推定されるが抗原が明らかでないものも多いと考えられる。これに関し NCNP の荒木は基礎的手法を用いた抗原同定法の開発を進めている。

その他、重症筋無力症における濾胞性 T 細胞に関する研究成果発表 (関西医大 近藤) や ALS モデルマウスにおける単球系炎症細胞の関与に関する研究 (横浜市大 田中)、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)、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進められている。

4. 研究成果刊行一覧

1. B Raveney, W Sato, D Takewaki, et al. Involvement of cytotoxic Eomes-expressing CD4+ T cells in secondary progressive multiple sclerosis. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 118(11) e2021818118 (2021)
2. Fujii H, Sato W, Kimura Y, et al. Altered Structural Brain Networks Related to Adrenergic/Muscarinic Receptor Autoantibodies in Chronic Fatigue Syndrome. J Neuroimaging. 2020 Nov;30(6):822-827
3. Sato, W., Ono, H., Matsutani, T. et al. Skewing of the B cell receptor repertoire in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. Brain, Behavior, and Immunity. (2021). in press
4. Takewaki D, Suda W, Sato W, Takayasu L, Kumar N, Kimura K, Kaga N, Mizuno T, Miyake S, Hattori M, Yamamura T. Alterations of the gut ecological and functional microenvironment in different stages of multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci USA. 2020 Sep. 117(36):22402-22412. doi:10.1073/pnas.2011703117.
5. Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Zhou H, et al. Mesenchymally expressed Bmp3b

- maintains skeletal muscle integrity and reduction of its expression contributes to sarcopenia. *Journal of Clinical Investigation*. 131(1) e139617, 2021.
6. Ashida S, Hirofumi Ochi, et al. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2021; 12;8(2):e945.
 7. Nakata K, Namiki M, Nishida H et al. Up-regulated spinal microRNAs induce aggregation of superoxide dismutase 1 protein in canine degenerative myelopathy. *Res Vet Sci*, 2021 Mar;135:479-485
 8. Komiya H, et al. CCR2 is localized in microglia and neurons, as well as infiltrating monocytes, in the lumbar spinal cord of ALS mice. *Mol Brain*. 13(1):64, 2020
 9. Chihara N. Role of effector T cells in multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 11:140-147,2020
 10. 大木伸司、山村 隆 中枢神経系の慢性炎症と病原性ヘルパーT 細胞の機能的スイッチング、臨床免疫・アレルギー科(科学評論社) 第74巻 第4号 412-418, (2020)
 11. 漆谷 真. 筋萎縮性側索硬化症. 特集 難病研究の進歩. 生体の科学. 71 (5) : 2-4, 2020
 12. 引網亮太, 南山素三雄, 漆谷 真. 筋萎縮性側索硬化症 - プロテノパチーの観点から. 医学のあゆみ. 273(1): 44-49, 2020
 13. 漆谷 真. 筋萎縮性側索硬化症. 特集「難病研究の進歩」 生体の科学, 71, 2-4, 2020
 14. 漆谷 真. 神経難病治療のニューホライズン 「神経難病の治療開発update」*BIO Clinica*, 35, 4-5, 2020
 15. 松浦英治 高嶋博, 医学書院, 新臨床内科学 第10版, HTLV-1 関連脊髄症 p.1338, 2020

1-5 Development of novel therapy and diagnostics for 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 aiming to improve the prognosis of the patients. The subjects assigned to 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), intractable neuropathy among others. For this purpose, we take a strategy to combine basic and clinical researches, and our team includes neurologists, radiologists, immunologists, and neuroscientists to promote inter-disciplinary 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 network analysis and cell-free miRNA analysis.

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
特任研究部長 山村 隆

緒言

難治性神経疾患では中枢神経組織へ免疫細胞が浸潤し、炎症や脱髄、軸索障害に関与しうる。免疫細胞間相互作用やミクログリア・アストロサイト連関により、免疫反応が形作られる。自己免疫性炎症性脱髄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、徐々に進む神経障害と脳脊髄の萎縮—神経細胞死の進行を反映する—を特徴とする進行型 (SPMS) がある。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、さらに同細胞が細胞障害性因子 GranzymeB を発現していることを見出した (Raveneyら Nat. Comm 2015, PNAS 2021)。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5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、抗体陰性NMOSDの52歳男性、パーキンソン病の88歳男性、脳炎疑いの5例である。また、SPMS症例についてT細胞受容体レパトア解析を実施し、多様性やクローナリティーについて評価した。

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。また抗体陽性 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。抗体陰性 NMOSD は陽性例と異なり、脳および視神経の浸潤細胞のメインは CD4+T 細胞であった。T 細胞受容体レパトア解析の結果、末梢組織 (脾臓・リンパ節) と比較し、SPMS 脳組織 (NAWM・病変部) では顕著な多様性の低下を認めた。また、各脳部位を構成する T 細胞受容体ファミリーは異なっていた。

考察

MS や NMOSD において、Eomes 陽性 Th 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た。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

ヒト剖検例での免疫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である。

参考文献

Raveney, B. J., et al. (2021). Involvement of cytotoxic Eomes-expressing CD4+ T cells in secondary progressive multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(11).

炎症性中枢神経疾患に対する画像解析を用いた診断法の開発

分担研究者：佐藤典子¹

研究協力者：木村有喜男¹

佐藤和貴郎²、山村 隆²

国立精神・神経医療研究センター

¹病院放射線診療部

²神経研究所免疫研究部

緒言

自由水イメージング(free water imaging; FWI)は、生体脳における自由水の影響を取り除くことで生体脳組織をより正確に計測することを可能とする次世代型拡散 MRI 解析法である¹⁾。FWI は神経炎症の指標として利用できると考えられており、今回我々は、筋痛性脳脊髄炎/慢性疲労症候群 (ME/CFS) における脳内構造評価のため FWI を用いた解析を行った。

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 3 か月以内に施行されている 25 名 (女性 20 名、男性 5 名; 年齢 38.1 ± 12.6 歳) を対象とした。撮影は、通常の MRI 撮影に追加し拡散 MRI を撮影した。Philips 社製 3 テスラ MRI を使用し、b 値 (0, 1000 sec/mm²)、MPG32 軸にて撮影した。FWI は MATLAB を用いた tensor-model fitting アルゴリズムを用いて、自由水の体積分率 (free water: FW)、自由水の影響を除外した異方性比率 (FW corrected Fractional Anisotropy:

FAt) を算出した。これらの指標と抗自律神経受容体抗体 [抗 $\beta 1$ アドレナリン受容体抗体 (a1-adr-R-Ab)、抗 $\beta 1$ アドレナリン受容体抗体 (b1-adr-R-Ab)、抗 $\beta 2$ アドレナリン受容体抗体 (b2-adr-R-Ab)、抗ムスカリン 3 型アセチルコリン受容体抗体 (M3R-Ab)、抗ムスカリン 4 型アセチルコリン受容体抗体 (M4R-Ab)、ニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 1$ (N1R-Ab)、ニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 2$ (N2R-Ab)] の抗体価との相関を、SPM12 を用いて解析した。

結果

FAt では、M4R-Ab にて左海馬に正の相関、N1R-Ab にて右海馬、視床、小脳、左頭頂葉に負の相関、N2R-Ab にて右海馬後部、両側小脳に負の相関を認めた。その他の抗体では有意な相関はなかった。また、FW では、a1-adr-R-Ab にて右前頭葉に負の相関を、M3R-Ab にて左小脳に正の相関を、M4R-Ab にて右側頭葉に正の相関を、N1R-Ab にて右前頭葉に負の相関を、N2R-Ab にて右側頭葉に負の相関を認めた。その他の抗体では有意な相関は認めなかった。

考察

FW において a1-adr-R-Ab や N1R-Ab にて異常が検出された右前頭葉は、我々が報告した MRI 構造ネットワーク解析において異常を検出した右背外側前頭前野白質 (BA9) と一致しており²⁾、BA9 は意思決定やワーキングメモリなどの認知機能、痛みの制御に関連するとされている。BA9 の白質は右上縦束の一部であり、我々が以前に DKI および NODDI による拡散 MRI 解析にて右上縦束

の異常を報告したが³⁾、同部位の異常がFWIでも再現されたと言える。上縦束は前頭葉頭頂後頭側頭連合野を結ぶ連合野で認知機能や言語機能のほか、ワーキングメモリと関連が知られており、その障害がME/CFSの症状と関連している可能性がある。FWは神経炎症の指標として利用できると考えられており、ME/CFS病態の解明に有用なツールとなる可能性がある。

結論

FWIを用いた解析は、ME/CFS病態の解明に有用なツールであり、右上縦束の異常はME/CFSにおけるbiomarkerとなる可能性がある。

参考文献

1. Pasternak O, Sochen N, Gur Y, et al. Free water elimination and mapping from diffusion MRI. *Magn Reson Med*. 2009 Sep;62(3):717-30.
2. Fujii H, Sato W, Kimura Y, et al. Altered Structural Brain Networks Related to Adrenergic/Muscarinic Receptor Autoantibodies in Chronic Fatigue Syndrome. *J Neuroimaging*. 2020 Nov;30(6):822-827
3. Kimura Y, Sato N, Ota M, et al. 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.

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髄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 細胞による髄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、モデルとしての妥当性の評価に繋がりたいと考え

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、今年度、標的蛋白の発現量に依存しない網羅的スクリーニングを実施した。

2) 培養下での末梢神経髄鞘化モデルは、これまでラットでのみ実施されてきた。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髄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髄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髄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、髄鞘化を誘導した。

結果

1) 前年度までに入手した血清検体を用い、外部委託によるタンパクアレイを用いた網羅的同定を実施した。また、その結果に基づき、脳炎に関しては、同一患者の異なる検体を用いた抗体価の変動に関する検討を行うことにより、抗原の候補を同定した。

2) ヒト末梢神経系培養モデルでは、誘導条件の最適化を進め、髄鞘化を観察できる条件を見出した。

考察

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ことができたが、血清中の抗体成分と抗原候補の親和性は全般に低く、有力な候補であるとみなすためには、更に多検体を用いた解析が必要であるものと考えられた。

ヒト細胞による末梢神経髄鞘化モデルは、引き続き実験手技の最適化を進めるとともに、観察された Myelin basic Protein 陽性構造が、実際にどのような髄鞘構造を形成しているかに関して、電顕レベルでの詳細な観察を行う必要があるものと考えている。

参考文献

Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Zhou H, Kurosawa T, Yoshimoto Y, Nakatani M, Hitachi K, Yamaguchi H, Wakatsuki S, Araki T, Morita M, Yamada H, Toyoda M, Kanazawa N, Nakazawa N, Hino J, Fukada S, Tsuchida K. Mesenchymally expressed Bmp3b maintains skeletal muscle integrity and reduction of its expression contributes to sarcopenia. *Journal of Clinical Investigation*. 131(1) e139617, 2021.

免疫性ニューロパチーの統合的解析

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

慢性炎症性脱髄性多発神経根炎 (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy : CIDP) をはじめとする免疫性ニューロパチーでは、自己免疫学的機序の関与が考えられている。多くの症例で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 (MS) 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 を同定した (PLoS One 2013, Nat Commun 2015, PNAS 2021)。Eomes 陽性 CD4 陽性 T 細胞は進行型 MS 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免疫性ニューロパチー患者を対象に、末梢血 memory CD4+T 細胞における Eomes 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 (CCPD1 例を含む) および MADSAM, MGUS, Sjogren 症候群、sarcoidosis 各 1 例。健常者や再発寛解型 MS、進行型 MS を対照とし、頻度を比較した。

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 陽性細胞の頻度を測定した。Eomes 頻度と症例の臨床的特徴の関連について検討した。

結果

CIDP 症例 10 例中 4 例および、Sjogren 症候群、sarcoidosis の症例において、健常者と比較し Eomes 陽性 Th 細胞が増加していた。非増加症例はいずれも、ステロイドパルス治療後あるいは免疫治療の継続により経過が安定している症例であった。一方、増加例は、CIDP の初発例 (2 例)、難治例 4 例であった。発症年齢や罹病期間、INCAT 等の重症度スコアと Eomes 頻度の間に有意な相関は見られなかった。

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ニューロパチー患者において Eomes 陽性細胞の頻度の高い症例が存在する。細胞は、多発性硬化症においてのみならず各種の難治性ニューロパチー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. Raveney, B. J., Sato, W., Takewaki, D., Zhang, C., Kanazawa, T., Lin, Y., ... & Yamamura, T. (2021). Involvement of cytotoxic Eomes-expressing CD4+ T cells in secondary progressive multiple sclerosis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 118(11).

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

分担研究者 大木 伸司

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

緒言

中枢神経系 (CNS) の難治性神経疾患のほとんどは、その病態形成過程に慢性炎症反応を伴うが、病態との関連についての知見は少ない。とくに I 型 Interferon (IFN-I) の過剰産生は、sterile inflammation、慢性疲労や遺伝性の interferonopathy など複数の病態に関わるが、その産生誘導機序や病態形成との関連は不明である。また孤立した compartment である CNS 内の IFN-I の過剰産生を、末梢組織などで検出、評価する簡便な方法も存在しない。その一方で、IFN- β は多発性硬化症の再発予防薬であることから、その作用は context-dependent と考えられ、時空間的な機能解析が必要である。そこで本研究では、中枢神経系の難治性疾患における IFN-I の病態促進機序を、microglia との関連を含めて解析し、慢性炎症環境下における IFN-I の時空間的な挙動が中枢神経病態に及ぼす作用を、分子レベルで解明することを目指す。

方法

・ EAE マウス microglia の single cell 解析 ; EAE マウスの CNS 由来 microglia について single cell 解析を行い、IFN signature 遺伝子を含む網羅的な遺伝子発現解析を行なった。

・ EAE マウスの IFN-I 産生の経時変化 ; EAE 発症に伴う Eomes 陽性 Th 細胞と IFN-I 産生の経時変化の相互連関を比較解析した。

・ microglia の IFN-I 産生と Clec7a 発現 ; 遺伝子発現パターンに heterogeneity を認める EAE マウス由来 microglia のうち、

Clec7a 分子の発現を指標とした細胞亜画分に着目し、IFN-I 産生能の比較、および Clec7a を介した細胞活性化による IFN-I 産生を解析した。

結果

EAE マウス由来 microglia の網羅的遺伝子発現解析から、microglia の IFN-I 産生とともに CXCL13 発現が顕著に増加することが明らかとなった。CXCL13 は、慢性炎症下で誘導される CCR2 や CXCR5 などのケモカイン受容体を通じて、CNS 内に分布した活性化リンパ球の近傍への誘導能を有しており、効率的なミクログリア/T 細胞/B 細胞などの細胞間相互作用に寄与するものと考えられた。EAE マウス由来 microglia の single cell 解析から、IFN signature に加えて Clec7a 遺伝子の発現が、EAE 後期の microglia で亢進することが明らかとなり、さらにその発現には heterogeneity が認められた。Clec7a 発現の経時変化は IFN-I 発現と良く相関し、後期 EAE 病態への移行とともに顕著に増加した。EAE マウス由来 microglia を、Clec7a 発現の有無に基づいて 2 群に分け、それぞれ zymosan を用いて in vitro 刺激をしたところ、Clec7a⁺ microglia において、顕著な IFN-I 産生、および IFN signature の発現亢進が確認された。病態下で産生される何らかの内在性 ligand により、Clec7a 刺激を介して活性化した microglia が、IFN-I 高産生による CNS 内の慢性炎症環境の形成と、神経細胞障害性 T 細胞の分化促進に関わる可能性が示された。

考察

Clec7a は、別名 Dectin-1 とも呼ばれる C タイプレクチンファミリー分子の一つであり、 β -1, 3- β -1, 6-構造を含む glucan 類を認識する。本研究の結果から、EAE マウスの Clec7a⁺ microglia は IFN-I 高産生群を含むことが明らかとなり、またその過程に Clec7a 刺激を介した IFN-I 産生誘導が存在することが確認された。今回 EAE 病態下で

Clec7a を活性化する内在性リガンドの同定は行なっていないが、既報によると活性化 astrocyte が産生する galectin-9 は内在性 ligand として Clec7a の活性化に関わることが示されている。興味深いことに、galectin-9 は、多発性硬化症 (MS) の病変部位や、二次進行型 MS 患者の脳脊髄液中で増加することが知られていることから、galectin-9 刺激により選択的に活性化した Clec7a+ microglia が産生する IFN-I が、MS を含む CNS 内の慢性炎症環境の形成に関与する可能性が示された。

結論

EAE マウス由来 microglia の遺伝子発現解析から、microglia の heterogeneity が確認され、その一部のサブセットが IFN-I の過剰産生を通じて、CNS 内の慢性炎症環境の形成に関与する可能性が示された。

参考文献

Ben J. E. Raveney, Wakiro Sato, Daiki Takewaki, et al. Involvement of cytotoxic Eomes-expressing CD4+ T cells in secondary progressive multiple sclerosis. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 118(11) e2021818118 (2021)

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
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
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とその役割を調べた。

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 communication¹. In our research, we search for cell-free nucleic acids related to neurological diseases with immune inflammation as candidate biomarkers²; 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 MS³. 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. We generated gut microbiome dysbiosis model mice by oral administration of non-absorbing antibiotics cocktail (ABX) containing kanamycin, vancomycin and colistin. The model mice were subjected to EAE by a conventional method. Lymphocytes were isolated 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 analysis was performed by a DNA chip of mouse miRNAs (3D-gene chip; TORAY INDUSTRIES, INC)² and Real time PCR. Inhibition of miRNAs in model mice was performed by intravenous administration of antisense oligonucleotides of miRNAs. In vitro LPS stimulation to epithelial cells was done and miRNA expression was examined.

結果と考察(Results & Discussion)

The results exhibited that changes in gut microbiome by ABX administration ameliorated EAE. MiRNA profiles and real-time PCR analysis indicated that miR-21a-5p and miR-146a-5p were present in the blood of EAE mice, but markedly decreased in ABX-treated models. In addition, administration of their inhibitors (antisense oligonucleotides) to EAE models resulted in the reduction of the EAE severity and also T cell frequency in CNS. When epithelial cells were treated with LPS, the cells secreted more exosomes and cell-free miRNAs, i.e., LPS stimulation causes the induction of secretion of exosomes and

miRNAs. Taken together, the results suggest the possibility that exosomal miRNAs may be related to the connection between gut microbiome and auto immune responses in EAE models.

結論(Conclusion & future plans)

Our current study may provide us with new insights into the relationship between gut microbiome and EAE with the addition of blood-circulating exosomal miRNAs as possible messengers. To further clarify the relationship, the target genes for miRNAs need to be determined.

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.

視神経脊髄炎関連疾患 剖検 2 例における 臨床・病理学的検討

分担研究者：岡本 智子¹，

研究協力者：石原 資¹，佐藤 和貴郎²，

水谷 真志³，佐野 輝典³，高尾 昌樹³，

高橋 祐二¹，山村 隆²

国立精神・神経医療研究センター

¹病院 脳神経内科

²神経研究所免疫研究部

³病院 臨床検査部

緒言

抗アクアポリン4 (AQP4) 抗体陽性視神経脊髄炎関連疾患 (Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: NMOSD) の病態はかなり解明されている一方で、抗 AQP4 抗体陰性 NMOSD の病態機序は不明な点が多い。抗 AQP4 抗体陽性及び陰性 NMOSD の剖検例を経験したので報告する。

方法

急死後剖検を実施した NMOSD 2 例の臨床・病理学的検討を後方視的に行った。

結果

症例 1：54 歳女性；45 歳 右視力障害，46 歳 感覚障害，四肢麻痺，膀胱直腸障害が進行し MRI で頸髄長大病変 (C1-6) を指摘，他院で抗 AQP4 抗体陽性 NMO と診断。呼吸困難のため人工呼吸器管理を実施。ステロイドパルス (SP)，血液浄化療法 (PP) を繰り返す。経口ステロイド (OS)，免疫抑制剤 (IS) 併用，約 10 か月後に人工呼吸器離脱。46 歳 当院受診後約 8 年間再発なく経過。54 歳

呼吸状態悪化，自宅で心肺停止状態，当院で死亡を確認。

症例 2：52 歳男性；43 歳 左顔面麻痺で発症。両側難聴・めまいを繰り返す。48 歳 視力障害，複視，歩行障害増悪し，頭部 MRI で視交叉～両側視神経，左基底核～側頭部内側，脳梁膨大部に一部造影効果がある異常信号を認めた。抗 AQP4 抗体陰性。HLA-B51 陽性，髄液：リンパ球優位の細胞数増多，蛋白高値，IL-6 著明高値。PET・ランダム皮膚生検行うも原因不明。その後も視神経炎，脳幹，頸髄，胸髄病変を繰り返す。MRI で延髄頸髄移行部から上位胸髄に至るまでの長大脊髄病巣を呈した。種々の免疫治療 (SP, PP, OS, IS) を施行するも，視力障害，難聴，歩行障害は増悪。52 歳肺炎罹患，総胆管結石，膵炎合併し敗血症性ショックで死亡。神経病理所見としては，症例 1 は片側性視神経線維脱落，症例 2 は両側性視神経線維脱落と高度な視神経萎縮を認めた。

両者ともに高度な脊髄萎縮，壊死病変，軸索の破壊消失を認めたが，症例 1 は脊髄中心優位，症例 2 は脊髄辺縁部位優位であった。NMO に特徴的な病理像である抗 AQP4 抗体反応の消失，抗 GFAP 抗体反応の消失は両者ともに認めなかったが，症例 1 のみ末梢性の髄鞘が脊髄内に侵入する病理像がみられた。

考察

NMO に特徴的な病理像¹⁾である脊髄萎縮，病変壊死，白質脊髄路二次変性，軸索の破壊消失，視神経病変は両者にみられた。一方で、NMOSD 慢性期のためか両者とも AQP4

抗体あるいは抗 GFAP 抗体反応の消失は認めなかった。末梢性の髄鞘が脊髄内に侵入する病理像は典型的 NMOSD のみにみられた。

結論

典型的及び、非典型的 NMOSD の剖検例を経験したので報告する。抗 AQP4 抗体陰性 NMOSD の病態把握には、病理を含めた症例の蓄積とさらなる検討が必要である。

参考文献

高尾 昌樹 : Clinical Neuroscience 2018; 36(11):
1313-1315

NINJA の病態解明と治療手段に関する研究

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

明らかな神経学的所見を認め臨床的には多発性硬化症 (MS) と考えられるものの通常の MRI 画像でほとんど病変を指摘できない疾患群を Normal brain imaging accompanies neuroimmunologically justified, autoimmune encephalomyelitis (NINJA) という MS とは異なる疾患群として報告した (Takewaki D. et.al 2018)。NINJA は抗体産生を担う血中のプラズマブラストの数値が高く、ステロイド治療や血液浄化療法などの免疫学的治療が有効で、通常の MRI 撮影方法でなく拡散テンソル画像解析を行えば白質の異常があることを指摘しうることまでは判明した。今回はこの免疫異常をさらに解析する。

方法

NINJA 9 名、健常者 (HS) 20 名から採取した末梢血細胞より Ficoll 法でリンパ球分画を分離し、CD45RA 陰性の memory CD4 陽性 T 細胞をケモカイン受容体の発現パターンに基づいて CXCR3 陽性 CXCR5 陰性群を Th1 細胞、CXCR3 陰性 CXCR5 陰性 CCR6 陰性群を Th2 細胞、CXCR3 陰性 CCR6 陽性群を Th17 細胞、CD25^{high} 群を regulatory T 細胞 (Treg) とし、頻度を比較した。

結果

Th2 細胞、Th17 細胞、Treg については健常群と NINJA 群で有意差は認めなかったが、Th1 細胞については NINJA 群で優位に低かった。

考察

昨年提示した先行研究では、MS の IAPP 有効例では無効例に比べて IFN γ 産生 Th1 細胞が多く、plasmablast が少ない傾向にあるという結果が得られている。Th1 細胞の解析方法が異なるため単純比較はできないが、MS と NINJA では plasmablast と Th1 細胞の関与が逆である可能性があり、病態的に異なる疾患群であることを示唆するものと考ええる。

結論

T 細胞サブセットの解析では NINJA 群で Th1 細胞が優位に低かった。

参考文献

1. Takewaki D, Lin Y, Sato W, et al. Normal brain imaging accompanies neuroimmunology justified, autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2018 Apr 2;5(3):e456.
2. 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.

一本鎖抗体を用いた神経変性疾患の治療法 開発研究

滋賀医科大学内科学講座脳神経内科
南山素三雄、漆谷 真

緒言

遺伝性疾患の基本病態は、原因遺伝子変異による転写産物の「機能喪失」か「機能獲得」である。家族性 ALS の原因として最大の superoxide dismutase 1 (SOD1) の突然変異は、構造異常、つまりミスフォールドした SOD1 の毒性が分子基盤と考えられており、転写産物の産生阻止が根治治療戦略となる。アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) は、すでに脊髄性筋萎縮症などで実用化されているが、抗体は遺伝子変異部位に依らない異常構造を包括的に補足できる点で有望な治療ツールである。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(クローン X)とイムノグロブリン重鎖・軽鎖の cDNA クローニングと一本鎖抗体(scFv-X)の作製に成功している。昨年度の報告会では全長抗体とオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)、さらに scFv 遺伝子をボルナ病ウイルスベクター (BoDV) によって遺伝子導入した OPC 各々の髄腔内投与の有効性の有無についてパイロットデータを提示した。本年度は投与数を増やすとともに、OPC の組織生着性と治療効果の関連を検討するため OPC の脊髄実質内投与実験も加えた

方法

H46R 変異 SOD1 遺伝子を発現するトランスジェニック (Tg) ラットに対して、①浸透圧ポンプを用いたクローン X の持続髄腔内投与と②生後初日ラット脳由来の初代 OPC に GFP、あるいは scFv-X を発現する BoDV を感染させ、大漕への髄腔内投与、腰髄膨大部への実質内投与の 2 種類の投与経路からの移植を行った。筋力、体重変化、運動機能の評価に加え、免疫組織化学的検討を行い、OPC の組織生着と移植治療の有効性を検討した。

結果

髄腔内に scFv-X を分泌する OPC を投与する群が scFv-X 分泌しない OPC を投与する群と OPC の培地のみを投与する群に比べ 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の減少、さらに神経筋接合の減少抑制効果認めた。さらに脊髄組織における SOD1 タンパク質量を陽性画分、不溶性画分とも減少させた。しかしながら脊髄実質において著明な外来性 OPC は認めなかった。一方 OPC の脊髄内投与群の少数例の検討では、移植 1 週間後に著明な OPC の生着を認めたにもかかわらず、OPC 単独群、scFv 発現群とも対照群に比し、著明な生存効果の延長を認めなかった。

考察

抗ミスフォールド SOD1 抗体の scFv を分泌する OPC の髄腔内移植は寿命のみならず、運動ニューロン数、神経筋接合部の残存効果、グリオシス抑制効果のみならず、変異 SOD1 の減少効果も認めた。しかし、意外にも同細胞の脊髄実質投与の有効性は認めなかった。OPC 移植後の生着は 1 ヶ月後には殆ど認めなくなっており、非細胞自律性の細胞外環境が OPC 細胞死を誘導していることが考えられ、抗 SOD1 抗体の分泌のみでその減少を抑制できなかったことは、ALS における非細胞自律性の機序を考える上で極めて有用な示唆となる。

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るが、脊髄への OPC 再生戦略の有効性についてさらなる検証が必要である。

参考文献

1. 真田 充, 松井 真, 漆谷 真. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と慢性炎症. *Bio Clinica* 9 (2), 2020
2. 小川暢弘, 北村彰浩, 山川 勇, 金 一暁, 真田 充, 漆谷 真. 急性期脳梗塞の治療の進歩. *画像診断* 40 (14), 1405-1416, 2020
3. 漆谷 真. 筋萎縮性側索硬化症. 特集 難病研究の進歩. *生体の科学*. 71 (5): 2-4, 2020
4. 引網亮太, 南山素三雄, 漆谷 真. 筋萎縮性側索硬化症 - プロテノパチーの観点から. *医学のあゆみ*. 273(1): 44-49, 2020
5. 漆谷 真. 筋萎縮性側索硬化症. 特集「難病研究の進歩」 *生体の科学*, 71, 2-4, 2020
6. 漆谷 真. 神経難病治療のニューホライズン「神経難病の治療開発 update」 *BIO Clinica*, 35, 4-5, 2020
7. Asada-Utsugi M, Uemura K, Kubota M, Noda Y, Tashiro Y, Uemura M, Yamakado H, Urushitani M, Takahashi R, Hattori S, Miyakawa T, Ageta-Ishihara N, Kobayashi K, Kinoshita M, Kinoshita A. Mice with a cleavage-resistant N-cadherin exhibit synapse anomaly in the hippocampus and outperformance in spatial learning tasks. *Mol Brain*. 2021 Jan 25;14(1):232
8. Nakata K, Namiki M, Nishida H, Sakai H, Yamato O, Urushitani M, Maeda S, Kamishina H. Up-regulated spinal microRNAs induce aggregation of superoxide dismutase 1 protein in canine degenerative myelopathy. *Res Vet Sci*, 2021 Mar;135:479-485
9. Nakamura R, Kitamura A, Tsukamoto T, Ogawa N, Yamakawa I, Kim H, Sanada M, Urushitani M. A case of spinal muscular atrophy type 3 showing a specific pattern of selective vulnerability on muscle ultrasound: a case report. *Int Med* 2021, DOI: 10.2169/internalmedicine.6396-20
10. Nakamura R, Kitamura A, Tsukamoto T, Tamura R, Ogawa N, Yamakawa I, Kim H, Kawai H, Sanada M, Urushitani M. The effect of intravenous methylprednisolone to recurrent exacerbations in hematologic malignancies-associated progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). *Int Med* 2021, DOI: 10.2169/internalmedicine.6396-20.
11. Kawamoto Y, Ayaki T, Urushitani M, Ito H, Takahashi R. Accumulation of HAX-1 and PARL in brainstem and cortical-type Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *J Neurol Sci* 2020, 15:415-116928. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.116928>
12. 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, 46(6):579-587
13. 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
14. 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

CXCR5 陽性 T 細胞は重症筋無力症のバイオマーカーや治療標的となりうるか

関西医科大学合医療センター¹

京都府立医科大学²

近藤誉之¹、芦田真士²

緒言

重症筋無力症 (Myasthenia gravis: MG) の多くは、神経筋接合部アセチルコリン受容体 (AchR)、筋特異的チロシンキナーゼ (MUSK) に特異的自己抗体を病因抗体とする自己免疫性疾患であるが、両抗体の存在が証明できない MG (double seronegative MG: dSNMG) も存在する。

我々は、抗 AchR 抗体陽性 MG 患者において、末梢血 CD4 T 細胞中の濾胞性 T 細胞 (circulating follicular helper T cells: cTfh) の頻度上昇、中でも inducible T cell costimulator (ICOS) を高発現する cTfh (ICOS^{high}cTfh) の頻度が上昇していることを確認し、これらが重症度と関連することを報告した¹。同時に、MG 患者の cTfh では、B 細胞の抗体産生を促進する Interleukin (IL) -21² の産生が亢進していることを確認した。この傾向は ICOS^{high}cTfh においてより顕著であった¹。

本研究では、① dSNMG における cTfh の偏倚があるか、② IL-21 の B 細胞サイトカイン産生への影響について解析した。

方法

主としてフローサイトメトリーを用いて、① dSNMG 患者末梢血における cTfh 頻度と

ICOS 発現を解析し、② B 細胞を分離培養し、IL-21 存在下の B 細胞のサイトカイン産生を検討した。

結果

dSNMG 患者の ICOS^{high}cTfh の頻度は健常群と比較して上昇しており、診断を支持する免疫学的指標になる可能性が示唆された。

② IL-21 は *in vitro* で B 細胞による抗体産生に重要である IL-6、IL-10、IL-2、BAFF (B-cell activating factor)³ の産生を促進した。

考察

dSNMG 患者では、電気生理学的に神経筋接合部の障害を証明できない場合の診断は困難であり、またその免疫病態の詳細は不明である。dSNMG における ICOS^{high}cTfh の上昇は、抗体陰性 MG にて Tfh が免疫学的診断指標になる可能性がある。Tfh の産生する IL-21 が B 細胞は抗体産生に重要であるサイトカイン産生を促進することが示唆された。

結論

dSNMG 患者においても、ICOS^{high}cTfh の頻度の上昇を認めた。IL-21 は MG の B 細胞の抗体産生を促進し、病態に関与する。

参考文献

1. Ashida S, Hirofumi Ochi, et al. *Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2021; 12;8(2):e945.
2. Morita R, Schmitt N, Bentebibel S-E, et al. *Immunity.* 2011;34:108–121.
3. Christoph Jandl, Cecile King. *Antibodies.* 2016;5:5.

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(Autoimmune Epilepsy (AE))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 AE の免疫動態の探索を行った。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った¹⁾。解析には BD 社の FACS AriaIII ないし Fortessa 及び Verse を用いた。2) 疾患活動期に得た末梢血血清及び髄液中の炎症性サイトカインないし抗炎症性サイトカインについてマルチプレックスアッセイを用いて解析した。それぞれのコントロールとしててんかんないしてんかんが疑われた非炎症性疾患で同様の解析を行い比較した。3) リンパ球フェノタイプとサイトカイン

プロフィールから抗神経抗体陽性脳炎の背景にある炎症病態について臨床的な特徴と比較検討した。

結果と考察

本疾患は希少疾患であるため、神戸大学を中心に京都大学、関西医科大学などと連携した多施設共同研究を展開した。AE 症例(抗 NMDA 抗体, 抗 LGI1 抗体, 抗 GAD 抗体に加えて抗 MOG 抗体陽性例)では髄液細胞数増多(>5cell/mm³)が認められない例が過半数であった。しかし、詳細な解析を行うと非炎症性症例と比して血清での IL-12, IL-23, IL-17 が増加していた。また AE 群の末梢血 B 細胞の中で抗体産生性 Plasmablasts が増加していた。さらに症例を追加し検討する。

結論

自己免疫性脳炎の診断基準として Graus らの診断基準²⁾が用いられているが、難治性てんかんを呈する症例では髄液細胞数増多が認められない例があり、非炎症性の焦点てんかんと鑑別が難しい。B 細胞フェノタイプや血液の炎症性サイトカインプロフィールが両者を鑑別する特徴となりうる。昨今注目される抗 MOG 抗体関連疾患の一部は難治性てんかんを呈し本疾患群に含む議論が必要である。

参考文献

1. [Chihara N.](#) Role of effector T cells in multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 11:140-147,2020
2. Graus F, et al. A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *Lancet Neurol.* 15(4):391-404, 2016

自己抗体介在性神経疾患の診断と治療に関する研究（ワクチン後脳炎・脳症など）

鹿児島大学 脳神経内科・老年病学

高嶋 博

緒言

HPV ワクチン接種に伴う副反応のうち神経系症状の特徴として①神経学的に説明困難な症状が多い、②運動系・感覚系・自律神経系の陽性症状および陰性症状を同時に認める事が多い点などがある。我々はこの病変・病態の非特異性を踏まえた多系統にわたる脳症状を「びまん性脳障害」と表現してきた。今回我々はこの「びまん性脳障害」を呈する患者で、HPV 関連と橋本脳症関連以外の患者について臨床的特徴を解析した。

方法

2012 年から 2020 年上半期に当科に入院した「説明困難な神経症状」を呈した患者について、同意を得て、患者の年齢、性別、基礎疾患、症状、誘引疾患、合併症、我々の最終診断を調査した。

結果

調査期間に当科に入院した患者のうち 244 人が神経学的に説明困難な症状を呈していた。そのうち 78 名は HPV ワクチン接種関連の患者で、次に多いのは橋本脳症 54 名であった。残りの 112 名（男女数は 39 人：73 人）について調査したところ最も多い合併疾患は気管支喘息 12 名（10%）であった。SPECT を行った患者ではほぼすべての患者で異常所見を確認した（46 名）。発症の先行因子は術後・外傷後が 39 人（35%）で、感

染・炎症後が 14 人（13%）であった。合併疾患治療中が 29 例（26%）存在した。先行因子や大きな合併症がない 30 人（27%）の原因としては 15 人がミトコンドリア機能異常と考えられた。臨床症状を 6 系統に分類したところ、すべての異常を呈した「びまん性障害」は 1 例（1%未満）のみで、5 系統 13%、4 系統 26%、3 系統 32%、2 系統 24%、1 系統 12%であった。

考察

不随意運動や自発的疼痛などの陽性症状と、運動麻痺や感覚脱失などの陰性症状は共存しにくい傾向があった。一方、倦怠感と痛みは共存する割合が高く ME/CFS の特徴に相当する一群の存在が推察された。ジストニアやてんかん発作だけの患者は誘因がはっきりしないことが多くこれらは PNES に相当する一群と考えられた。

結論

非特異的的症状は、手術や事故、基礎疾患をベースに続発することが多いことが判明した。神経学的に説明がつかないと指摘されてきた患者の中にはいくつかの疾患群に分類できる可能性が示唆された。「びまん性脳障害」の定義については更に検討が必要と考えられた。

参考文献

1. Kinoshita T, Abe R, Hineno A, Tsunekawa K, Nakane S, Ikeda S. Peripheral sympathetic nerve dysfunction in Japanese adolescent girls after immunization of human papillomavirus vaccines. *Intern Med* 53:2185-2200, 2014
2. 公益社団法人日本医師会/日本医学学会 作成 :HPV ワクチン接種後に生じた症状に対する診療の手引き. 1-19, 2015

炎症性中枢神経疾患におけるリンパ球異常の解析

順天堂大学免疫学講座

三宅 幸子

緒言

視神経脊髄炎 (NMOSD) は中枢神経系自己免疫性疾患であり、疼痛や倦怠感が問題となる疾患の1つである。NMOSD ではアストロサイト足突起に発現する水チャネルである AQP4 に対する自己抗体が産生され、病態の形成に深く関与していることが知られているが、自己抗体が産生されるメカニズムは未だ解明されていない。そこで我々は自己抗体産生のメカニズムに焦点をあて、NMOSD 患者末梢血リンパ球の異常を解析することを目的とした。

方法

健常人 (HC) 24 例、多発性硬化症 (MS) 24 例、AQP4 抗体陽性 NMOSD 22 例、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) 抗体関連疾患 (MOG-AD) 12 例の患者から得られた末梢血単核細胞 (PBMC) または脳脊髄液 (CSF) の T 細胞および B 細胞サブセットの頻度を分析した。また、B 細胞と T 細胞サブセットの共培養における抗体分泌細胞 (ASC) への分化と免疫グロブリンの産生を分析した。さらに、B 細胞の質的異常を解析するため NMOSD 患者および HC から得られた B 細胞サブセットの RNA-seq 分析を行った。

結果

NMOSD 患者末梢血において、既報のとおり、

plasmablast の増加を認めると共に、Switched memory B (SMB) 細胞の頻度が MS, HC に比べて有意に増加していた。さらに、自己免疫疾患患者 3 次リンパ組織における抗体産生への関与が報告された T peripheral helper (TPH) 細胞が、NMOSD 患者末梢血では、HC、MS、MOG-AD と比較して有意に増加していた。また NMOSD 患者 SCF において、TPH 細胞が MS 患者と比較して増加していることが明らかとなった。これらの細胞の自己抗体産生への寄与を評価するため、試験管内で SMB 細胞と TPH 細胞を共培養し、ASC への分化と IgG 産生を評価したところ、ASC への分化の割合が HC と比較して NMOSD において有意に増加し、培養上清中の IgG 濃度も高い傾向にあった。NMOSD 患者 B 細胞の質的異常を解析するために行った RNA-Seq 解析により、NMOSD 患者では、B 細胞サブセット特異的転写因子のプロファイルが HC と比較して ASC 側に偏位していること、さらにこの異常が、SMB 細胞だけではなく naïve B 細胞においても認められることが明らかとなり、NMOSD では B 細胞分化の早期から B 細胞系列に質的異常が存在することが示唆された。さらに Gene set enrichment 解析の結果から、NMOSD 患者 naïve B 細胞では IL-2 誘導遺伝子の発現亢進が明らかとなった。

考察

以上の結果から SMB 細胞と TPH 細胞が NMOSD における自己抗体産生に関与することが示唆された。さらに、RNA-seq 分析から、NMOSD 患者では、SMB 細胞だけでなく、

naïve B 細胞の段階から、転写因子の発現プロファイルが、ASC へと偏倚しており、IL-2 誘導遺伝子の発現亢進が認められることが明らかとなった。B 細胞分化における IL-2 の役割については不明な点が多いが、ヒト B 細胞を試験管内で B 細胞受容体刺激と共に IL-2 で刺激することで ASC への分化が亢進するとの報告があり¹、我々の結果と一致する。これらの結果は、NMOSD および自己抗体関連自己免疫疾患の病態を明らかにし、新しい治療標的薬の発見に寄与する可能性がある。

結論

NMOSD 患者では SMB 細胞、TPH 細胞が増加し、自己抗体産生に関与している可能性が示唆された。NMOSD 患者では B 細胞分化の早期から転写因子発現に異常があることが明らかとなった。

参考文献

Hipp N, Symington H, Pastoret C, Caron G, Monvoisin C, Tarte K, Fest T, Delaloy C. IL-2 imprints human naïve B cell fate towards plasma cell through ERK/ELK1-mediated BACH2 repression. *Nat Commun.* 2017 Nov 13;8(1):1443.

神経変性病態における単球系細胞の役割解明

横浜市立大学大学院医学研究科

神経内科学・脳卒中医学

田中 章景

緒言

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態において、CCR2 陽性骨髄単球系炎症細胞 (CCR2 陽性単球) の中枢神経浸潤による神経炎症機序が想定されているが、CCR2 の中枢での細胞局在を含めその詳細は未解明である。ALS モデルマウスの病変部位である腰髄での CCR2 陽性細胞の経時的局在解析を行うことで、ALS の病態形成における CCR2 陽性細胞の役割を検討した。

方法

ALS モデルである SOD1 Tg マウスを、CCR2 および CX3CR1 の各レポーターマウスである $Ccr2^{rfp/rfp}$ マウスおよび $Cx3cr1^{gfp/gfp}$ マウスと交配することで SOD1 Tg- $Ccr2^{rfp/+}$ - $Cx3cr1^{gfp/+}$ を作成し、免疫組織学的解析を用いて、病初期 (12 週齢)、病中期 (16 週齢)、病後期 (20 週齢)、病末期 (24 週齢) での腰髄における CCR2 の細胞局在についての経時的検討を行った。

結果

SOD1Tg- $Ccr2^{rfp/+}$ - $Cx3cr1^{gfp/+}$ マウスは SOD1 Tg マウスと同様の病勢推移を呈し、病期進行に伴った腰髄への CCR2 陽性単球細胞浸潤の経時的増加を認めた。病勢進行に伴って、CCR2 の局在は、Iba1 陽性細胞 (浸潤単球およびミクログリア) に加えて、CX3CR1 陽性細胞 (ミクログリア) や NeuN 陽性細胞 (神経細胞) にも認められるようになっ

たが、既報告とは異なり GFAP 陽性細胞 (アストロサイト) には認められなかった。

考察

ALS 患者の髄液における末梢血単球の遊走因子である MCP-1 (CCL2) の上昇や末梢血における CD14 高発現の炎症性単球系細胞の上昇など神経変性疾患における単球系細胞の役割が示唆されている。しかし、神経変性疾患モデルマウスを用いた単球系細胞の解析はほとんど行われていない。本研究では、CCR2 陽性単球細胞の疾患進行に伴う中枢神経系への浸潤に伴い、CX3CR1 陽性細胞 (ミクログリア) や NeuN 陽性細胞 (神経細胞) にも CCR2 の発現が誘導されることが明らかとなった。この理由として、活性化ミクログリアから CCL2 が放出されることで CCR2 陽性単球の浸潤を引き起こし、これにより CX3CR1 陽性の常在ミクログリアが CCR2 を発現するミクログリアに毒性変換され、さらに神経細胞にも CCR2 発現を誘導したと考えられた。

結論

ALS の病態機序において、病勢進行に伴った CCR2 陽性単球の中枢神経浸潤の増加と、ミクログリアや神経細胞における CCR2 の発現誘導が、神経炎症の悪循環を惹起することで、ALS の病態形成の一機序を担っている可能性が示唆される。

参考文献

Komiya H, et al. CCR2 is localized in microglia and neurons, as well as infiltrating monocytes, in the lumbar spinal cord of ALS mice. *Mol Brain*. 13(1):64, 2020