

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した。患者血液や髄液、剖検例の中樞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た。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した。

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きた。3年間でそれぞれの研究分野について進展がみられ、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を中心に紹介する。

1) 免疫性神経疾患における病原性リンパ球研究

臨床研究に発展した基礎研究として、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）がある。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、NR4A2ノックアウトマウスの研究から進行型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）、さらに発生機序に関する検討を進めてきた。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が明らかとなった

(C. Zhang et al. PNAS, 2019)。

2021年度には、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った (B. Raveney, et al. PNAS, 2021)。本論文は脳病理組織における Eomes 陽性細胞の集積や MRI による脳萎縮との関連を示す解析データを含み、本研究班員 (斎藤、佐藤典、佐藤和、岡本、林) が協力し結実した成果である。さらに難治性免疫性神経疾患 (視神経脊髄炎二例) の剖検脳組織における Eomes 陽性細胞集積も示すことができた (岡本、佐藤和、齊藤)。また CIDP 等難治性ニューロパチー患者末梢血における Eomes 陽性細胞の寄与についても明らかにできた (佐藤和)。

2) 腸内細菌叢と免疫性神経疾患

NCNP では無菌マウスの行動実験を可能とする国内唯一の施設が稼働を開始し、腸内細菌研究が山村、北條・荒木らによって進められている。その施設を活用した研究で、北條らは血液中のセルフリー核酸である miR-21a-5p が腸内細菌依存性に MS の動物モデル EAE の増悪因子として働くこと、その機序として IL-17 等の炎症性サイトカインを誘導することを明らかにした。MS 患者における miR-21a-5p の増加も確認された。山村らは AMED-CREST 研究で、MS 患者の腸内細菌研究を推進しており、この成果を活用する研究に進む予定である。

3) 免疫介在性脳炎/脳症の統合的理解

自己免疫性脳炎・脳症は、HPV ワクチン後関連神経症状や筋痛性脳脊髄炎/慢性疲労症候群 (ME/CFS) さらに NINJA との臨床的・免疫学的に共通点が多いと考えられるものの、その機序が解明されておらず、重要な研究課題である。なお NINJA は 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り、NCNP 発の新しい免疫介在性中枢神経疾患である (Takewaki et al. Neurology NN, 2018)。

鹿児島大の高島らは、HPV ワクチン後関連神経症状多数例について検討し、血液浄化療法の有効性、血清/髄液中炎症性サイトカインの増加、ME/CFS を合併する一群の同定などの成果を上げた。

ME/CFS 研究は山村/佐藤和が外来診療および免疫解析研究を継続し多数例の解析を行っている。放射線科の佐藤典は、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 (Fujii et al. J Neuroimaging, 2020)。同論文はその雑誌で最も引用回数の多い論文と認定された。

NINJA について、脳神経内科の林は血液浄化療法による治療を進めてきた。林は患者末梢血のリンパ球解析を進め、その病態理解が進んだ。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。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手法の検討を行った。荒木はヒト iPS 細胞を用いた末梢神経髄鞘化モデルの作成に成功し、今後の難治性ニューロパチー疾患解析に有用な成果が得られた。

4) その他の関連研究

脳神経内科の岡本は、神経核内封入体病 12 例についてまとめ報告した (Ishihara et al. Neurol Genet . 2020)。同疾患が難治性ニューロパチーの重要な鑑別疾患であることを指摘する貴重な成果である。

NCNP では対応できない分野について、外部の分担研究者もそれぞれ成果を上げている。関西医大の近藤らは重症筋無力症における濾胞性 T 細胞の重要性を示したが (Ashida et al. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2021)、抗アセチルコリン受容体や抗 MuSK 抗体陰性例においても同様の変化を認めることから、診断に難渋する症例での活用も考えられ重要な成果である。

順天堂大の三宅は、抗 AQP4 抗体陽性を特徴

とする視神経脊髄炎について解析を進め、B細胞がその分化の初期の段階で偏倚していること新たに見出し、病態解明に向けて前進する成果を上げた (Hoshino et al. J Neuroinflammation. 2022)。

代表的な神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における神経炎症の寄与が近年指摘されている。横浜市大の田中は、モデルマウスにおける単球系炎症細胞およびインターロイキン 19 の寄与を示す成果を発表した (Komiya et al. Mol Brain. 2020; Nakata et al, Res Vet Sci, 2021)。

滋賀医大の漆谷は、ALS の全く新しい免疫治療として、ALS の病原蛋白特異的な一本鎖抗体を用いた除去療法の開発を進めており、臨床試験へ向けて着実に成果が挙がっている。細胞移植治療と組み合わせることによって高い治療効果を得たことは新しいパラダイムと言える。

近年新たなてんかんの分類として、自己免疫性てんかんの存在が認められた。神戸大の千原は、関西圏で多施設共同研究を立ち上げ希少疾患の免疫病態解析を進めた。その結果、抗体産生性 B 細胞である Plasmablasts と活性化した循環型濾胞性 T 細胞 (circulating follicular T cells (cTfh)) の増加などの変化を見出した。今後の発展が期待されるとともに、将来的に診断基準に活用される成果である。

4. 考察と結論

近年、我が国でもようやく「神経免疫」についての正しい理解と関心が広がり、商業雑誌 (実験医学)。や医師向け新聞 (週刊医学会新聞) で特集号や座談会が組まれるようになった。神経内科学および精神医学における免疫学の重要性は、もはや無視できないものとなっている。また 2025 年には、国際神経免疫学会 (ISNI) の日本開催が決まったこともあり、臨床に根付いた神経免疫の意義について多くの研究者が関心を寄せている。

本研究班で取り上げた、中枢神経および末梢神

経疾患は、従来の研究班では十分な取り組みがなされて来なかった。しかし本研究班では、MRI 拡散テンソル画像、フローサイトメーター解析、B 細胞レパトア解析等の新しい手法を導入して、ME/CFS における脳器質異常や免疫学的異常を証明し、自己免疫性てんかんや CIDP における免疫機序についても理解を深めることができた。これらは当該疾病におけるパラダイム・シフトを迫る大きな成果であり、専門家集団のネットワークがうまく機能した例と言えよう。今後の研究では、研究成果の臨床への還元、同様の免疫学的アプローチによる他の神経疾患の解明、新規治療や診断法開発を目指すべきであり、十分な予算措置が望まれる。

本研究班の活動は今後も継続されるべきものであり、柔軟かつ戦略的な配慮による、研究班の再出発を強く願うものである。統合失調症における自己免疫機序も報告されている昨今、免疫病態の解析に基づく神経疾患や精神疾患の治療法開発は、これからますます重要なものになるであろう。

神経変性疾患の剖検脳を用いた脳内炎症病態解明と新たな治療標的の同定

分担研究者：山村 隆

所属：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

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、軸索障害に関与する。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。また代表的な神経変性疾患である筋委縮性側索硬化症およびアルツハイマー病患者の末梢血における同細胞の評価を行う。

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。

末梢血の検討では、対象は ALS 患者 27 名・AD 患者 19 名と健常者 23 名とし、末梢血 Eomes 陽性 Th 細胞の頻度や表面抗原等をフローサイトメーターで測定して臨床情報との関連について検討した。また、同細胞の細胞障害性について ELISPOT 法を用いて確認した。

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。

末梢血中の Eomes 陽性細胞については、ALS 患者の末梢血 Th 細胞中 Eomes 陽性細胞の頻度は $14.2 \pm 8.5\%$ （健常者 $7.0 \pm 3.4\%$ ）、AD 患者は $13.5 \pm 6.9\%$ （健常者 $7.3 \pm 3.7\%$ ）であり、健常者と比較して有意に高かった

($P < 0.01$). Eomes 陽性 Th 細胞の頻度と Granzyme B 陽性 Th 細胞の頻度には正の相関を認め、Th 細胞の Granzyme B 発現率は AD・ALS 群でそれぞれ健常群よりも高かった (ALS: $P < 0.0001$, AD: $P < 0.05$). ELISPOT 法では、患者群 Th 細胞の Granzyme B スポット形成数は健常者より有意に多かった (ALS: $P < 0.01$, AD: $P < 0.01$). また、AD 患者において、認知機能障害の程度と Eomes 陽性 Th 細胞の頻度との間に正の相関を認めた。

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。また、SPMS と同様に、Eomes 陽性 Th 細胞が神経変性疾患の病態へも関与している可能性が示唆された。

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り、Eomes 陽性 Th 細胞の神経変性病態への関与についてさらなる研究が必要である。

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).

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・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、そのような有用な生体内分子を見つけ出すために細胞外マイクロ RNA (セルフリーmiRNA) に着目し、免疫炎症を伴う神経変性の血液中のセルフリーmiRNAを解析した。多発性硬化症モデルマウスを用いて、疾患関連セルフリーmiRNAの探索と共に、近年注目されている腸内細菌叢との関連も調べた。

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 communication. In our research, we search for cell-free nucleic acids related to neurological diseases with immune inflammation as candidate biomarkers and we examined Multiple sclerosis (MS) as a target disease.

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. On the other hand, exosomal miRNAs, a type of cell-free

RNA circulating 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 if there is any association between microbiota and circulating miRNAs in MS.

方法 (Methods)

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 experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by a conventional method. Lymphocytes were isolated from the CNS, spleen and blood to see the percentage of CD40⁺ 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) and real-time (quantitative) 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. Microbial abundances were analysed by 16S V3-V4 amplicon sequencing.

結果と考察 (Results & Discussion)

The results indicated that changes in gut microbiome by ABX administration ameliorated EAE. Fecal microbiome analysis by 16S V3-V4 amplicon sequencing indicated that gram-negative strains were much more in EAE mice than in ABX-treated (dysbiosis) EAE mice. MiRNA profiles and real-time PCR analysis confirmed that miR-21a-5p and miR-146a-5p were present as a cell-free miRNA in the blood of EAE mice, and markedly decreased in ABX-treated EAE mice. In addition, administration of an inhibitor (antisense oligonucleotides) for miR-21a-5p to EAE models

resulted in the reduction of the EAE severity and T cell frequency in the CNS. When gut epithelial cells were treated with LPS derived from gram-negative strains, the cells secreted more exosomes and cell-free miR-21a-5p, i.e., LPS stimulation induced secretion of exosomes and miRNAs. Transfection of naïve T cells with miR-21a-5p mimics increased the proinflammatory cytokines IL17 and GM-CSF. When taken together, the findings presented here suggest the possibility that exosomal or cell-free miRNAs may be involved in the association between gut microbiome and auto immune responses in the EAE models.

結論 (Conclusion & future plans)

Our study provides us with a new insight into the relationship between gut microbiome and EAE with the addition of blood-circulating miRNAs as potential messengers. To further clarify the relationship, the target genes for miRNAs need to be determined in the future.

参考文献 (References)

1. Manu M.S., Hohjoh H., Yamamura T. Extracellular Vesicles as Pro- and Anti-inflammatory Mediators, Biomarkers and Potential Therapeutic Agents in Multiple Sclerosis. *Aging Dis*, 12:1451-1461, 2021.
2. Zhang J, et al., Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 13: 17-24, 2015.
3. Kimura K, et al., Circulating exosomes suppress the induction of regulatory T cells via let-7i in multiple sclerosis. *Nat Commun*. 9: 17, 2018.
4. 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・神経炎の発症機序の解析と末梢神経疾患モデル化に関する研究

分担研究者：荒木 敏之

所属：国立研究開発法人 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

緒言：

脳炎の少なくとも一部には、自己免疫機序を原因とするものが存在している。また末梢神経系では慢性炎症性脱髄性多発神経炎（CIDP）は自己免疫的機序を背景としてい

ると考えられる。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。また、末梢神経疾患評価手法の一つとして、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を評価したいと考えた。

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した。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目的で、齧歯類の脳・末梢神経、ヒトの脳・末梢神経組織由来の蛋白を用いた Immunoblot 法により、患者血清中に存在する抗体成分が脳・神経組織中の蛋白と反応

するかどうかを検討した。さらにこれに加えて、脳・神経組織中の発現量に依存しない unbiased な抗原蛋白スクリーニングとして、蛋白アレイを用いた網羅的スクリーニングを実施した。

2) 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神経細胞の培養条件で培養することにより、末梢感覚神経細胞・Schwann 細胞を誘導することを基本とし、高効率かつ再現性の高い分化条件を検討した。

結果：

1) 自己免疫機序が疑われる脳炎患者、末梢神経炎患者から採血し、血清を分離して研究に使用した。解析方法としてマウス脳、末梢神経中の蛋白、さらに、ヒト大脳皮質を構成する蛋白を抗原として結合する抗体成分が存在するかどうかを、患者血清を抗体として用いる Immunoblot 法により検討した。また、マウス末梢神経髄鞘切痕領域に存在する蛋白、マウス大脳皮質の細胞膜蛋白の濃縮を行い、Immunoblot 法により解析したが、これらの検討においては、患者血清と結合する蛋白を同定することができなかった。

次に、脳・神経における発現量に依存しない網羅的解析法として、蛋白アレイを用いたスクリーニング解析を行った。蛋白アレイスクリーニングでは、各被検者血清から、いくつかの蛋白との比較的弱い反応を検出したが、異なる患者血清から同じ抗原蛋白に対する強い反応を検出することはできなかった。

2) ヒト細胞を用いた末梢神経髄鞘化モデル作出のため、標準ヒト iPS 細胞を神経堤

細胞に分化させ、その細胞塊を神経細胞の培養条件で維持することによって末梢神経を自己組織化させて誘導する方法を試みた。神経細胞・シュワン細胞を別々に分化誘導した後に共培養によって髄鞘化を誘導するという一般的な方法では、シュワン細胞の分化誘導・純化が困難であったが、今回の方法では個々の構成細胞を別々に誘導する必要がなく、髄鞘化シュワン細胞を含めた末梢神経構成細胞を誘導可能であることが確かめられた。

考察：

1) については、脳炎検体を追加し、抗原蛋白アレイの網羅的探索による検討を更に実施し、追加的な抗原候補を得たが、検出された抗原性はいずれも弱く、同定には至っていない。既報では、Immunoblot法を用いた解析を中心とする方法で抗原の同定を報告している例があるが、血清中の抗体成分と抗原との反応性が非常に強くなければ、この方法で抗原を確定することは困難であると考えられた。また、蛋白アレイを用いた網羅的スクリーニングにおいて得られる抗原候補蛋白と血清中の抗体成分との反応性は一般に低く、この方法で得られた抗原候補に関して個別の詳細な検討を行う上では、多数例の患者検体において共通する抗原であるなどの追加情報が得られることが望ましいと考えられた。

2) に関しては、神経堤細胞から末梢感覚神経細胞・Schwann細胞を個別には分離しない、いわばオルガノイド培養のような形で髄鞘化末梢神経を誘導する方法の最適化を進め、髄鞘化セグメントの観察に至った。ヒト幹細胞から末梢神経組織の誘導について

はこれまでの報告例は少ないが、特にSchwann細胞の分化誘導方法が確立していない。またそもそもヒトSchwann細胞の維持培養手技自体も十分理解されていない。我々の方法は、こうした状況下で、末梢神経組織を構成する個別の細胞種を分離培養することなしに、末梢神経組織全体を誘導することを可能にするもので、簡便な末梢神経組織誘導法となる。また、今後、この培養中のシュワン細胞のフェノタイプと分化過程の検討から、ヒトシュワン細胞の分化誘導方法、培養方法を確立し、更に効率的なヒト末梢神経疾患モデル作出に資することを目指す。

結論：

自己免疫性脳炎・神経炎患者血清中の抗体成分が認識する抗原の同定に関しては、これまでに得られた結果をもとに、さらに検体数を増やして検討を継続する。

また、ヒト幹細胞からの末梢神経組織誘導では、髄鞘化の高効率化とともに、ヒトシュワン細胞の分化誘導方法、培養方法を確立するとともに、末梢神経疾患患者由来細胞を用いた疾患のモデル化を進める。

参考文献：

1. 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

2. 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. *J Clin Invest* 131(1) e139617, 2021.
3. Funakoshi M, Araki T. Mechanism of initiation and regulation of axonal degeneration with special reference to NMNATs and Sarm1. *Neuroscience Research* in press.

中枢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

所属：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：

神経疾患における免疫依存性の慢性炎症の分子機序は極めて複雑であり、その分子機序は不明である。とくに慢性炎症と密接に関わる I 型インターフェロン(IFN-I)は、種々の神経難病との関連が指摘されているが、その作用は context-dependent であり、疾患修飾作用の全容は依然不明なままである。本研究は、IFN-I 依存性の中枢神経系(CNS)の慢性炎症の分子機序の解明を目的とし、中枢神経疾患の素地となる慢性炎症環境の全容の理解を目指す。神経難病の多様な病態機序と IFN-I との関連が明らかになることで、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。とくに二次進行型 MS(SPMS)の病原性因子である Eomes 陽性 Th 細胞は、その生成に IFN-I が深く関わるということが明らかになりつつあり、我々が確立した SPMS モデルマウスにおける IFN-I の性状解析、IFN-I を高産生する遺伝子改変マウスにおける Eomes 陽性 Th 細胞の挙動解析と、IFN-I の高産生に至る分子機序の究明を進める。

方法：

・ SPMS モデルマウスから、CX3CR1 発現を指標としてミクログリアを分離し、RNA を抽出後、QPCR 法を用いて遺伝子発現定量解析を行った。

・ Zymosan 存在下にミクログリアを培養し、Clec7a 発現について定量解析を行った。

・ IFN- α/β 受容体欠損マウスに EAE を誘導し、CNS 内の Eomes 陽性 Th 細胞頻度と抗原提示細胞の異所性 PRL 産生を、QPCR 法を用いてそれぞれ定量した。

・ Trex1 欠損マウスの二次リンパ組織及び CNS の Th 細胞の Eomes 発現を定量した。

・ MRL-lpr マウスの二次リンパ組織及び CNS の Th 細胞の Eomes 発現を定量した。

結果：

SPMS モデルマウス由来ミクログリアの網羅的遺伝子発現解析から、IFN-I と CXCL13 発現の顕著な増加を見出した。CXCL13 は、CNS 内に分布した活性化リンパ球などの CCR2 または CXCR5 発現細胞に作用して、ミクログリアと免疫細胞の相互作用を促進するものと考えられた。

IFN-I の作用により、B 細胞を含む抗原提示細胞の異所性プロラクチン(PRL)産生が亢進し、この PRL 刺激を受けた Th 細胞の Eomes 発現が増強することがわかり、ミクログリア/T 細胞/B 細胞(抗原提示細胞)間の相互作用の重要性が示された。

シングルセル解析から SPMS マウス由来ミクログリアの Clec7a 遺伝子の発現増強を見出し、zymosan 刺激により、Clec7a 陽性ミクログリア IFN-I 産生亢進を確認した。病態下のアストロサイトが産生するガレクチンなどにより、Clec7a 依存性に生じたミクログリアの IFN-I 産生増強が、CNS 内の慢性炎症環境を形成し、神経細胞障害性の Eomes 陽性 Th 細胞の生成による神経変性病態の促進に中心的な役割を果たす可能性が示された。

IFN- α/β RKO マウスでは、SPMS 相当病態下の CNS に浸潤した Eomes 陽性 Th 細胞と抗原提示細胞の異所性 PRL 産生がともに低下し、SPMS 相当病態において IFN-I 産生が中心的な病態修飾作用を示すことが明らかとなった。

Crispr/Cas9 法を用いて樹立した *Trex1* 欠損(KO)マウスは、IFN-I 発現が全身性に亢進し、いわゆる Interferonopathy の症状を呈する。*Trex1* 欠損 KO マウスの二次リンパ組織では軽度の、CNS では顕著な Eomes 陽性 Th 細胞が検出された。同様に IFN-I 産生亢進を伴って全身性ループス(SLE)を発症する MRL-lpr マウスでも、二次リンパ組織と CNS で Eomes 陽性 Th 細胞の増加を認め、普遍的な IFN-I の作用が確認された。

考察： SPMS モデルマウスの病態形成と Eomes 陽性 Th 細胞の生成に、IFN-I が中心的な役割を果たすことが示された。とくに *Trex1* 欠損 KO マウスの二次リンパ組織と CNS で Eomes 陽性 Th 細胞の増加を認めたことから、IFN-I の単独刺激のみで Th 細胞の Eomes 発現が誘導可能であることが示された。*Trex1*KO マウスの二次リンパ組織と CNS で、Eomes 陽性 Th 細胞誘導の程度が異なることから、CNS が IFN-I 依存性の Eomes 陽性 Th 細胞生成により適した環境を提供する可能性が考えられた。今後、IFN-I 依存性の Eomes 陽性 Th 細胞生成に関わる CNS 環境の性状解析を行うことで、その詳細を明らかにする。また *Trex1*KO マウスの Interferonopathy は、CNS にも強い慢性炎症を引き起こし、ヒト SLE では Neuro-psychiatric SLE として知られる、特徴的な中枢神経病態を発症する。そこで、そ

れらの中枢神経症状の発症に対する Eomes 陽性 Th 細胞の関与を明らかにする。

結論：

中枢神経疾患の病態形成に関わる慢性炎症因子としての IFN-I の役割が明らかとなった。とくに IFN-I の単独刺激のみで、Th 細胞の Eomes 発現が誘導可能であることが明らかとなり、そのようにして誘導された Eomes 陽性 Th 細胞と中枢神経症状との関連を解明するための手がかりを得た。

参考文献：

1. Takahashi, F., Zhang, C., Hohjoh, H., Raveney, B., Yamamura, T., Hayashi, N., & Oki, S. (2022). Immune-mediated neurodegenerative trait provoked by multimodal derepression of long-interspersed nuclear element-1. *iScience*, 104278.
2. 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)
3. 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)

免疫性ニューロパチーの統合的解析

分担研究者：佐藤 和貴郎

所属：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：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。

また海外では難治例に対する Rituximab の有効性が報告されるなど B 細胞を介した病態機序が想定されるが、特定の自己抗体や確立した標的抗原は同定されておらず、CIDP 患者における B 細胞の機能に関する知見は乏しい。

また、Sjogren 症候群や Sarcoidosis などの CIDP 以外の難治性ニューロパチーは頻度も低く研究も乏しいため病態未解明な点が多い。

本研究では、当研究部で発見された多発性硬化症における病原性リンパ球の難治性免疫性ニューロパチーにおける意義について

を検討し、病態解明に資する結果を得ることを目的としている。

方法：対象は国立精神・神経医療研究センター病院に通院中の CIDP 患者とし、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、T 細胞・B 細胞亜分画解析を行った。具体的には、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。B 細胞については Memory B、Double Negative B、Naïve B、Transitional B、Plasmablast、Plasma cell、Age Associated B 細胞について評価した。健常対照者との比較および患者の臨床症状・臨床所見との関連について検討した。

結果：CIDP 患者末梢血における Eomes 陽性 Th 細胞の頻度は、健常者のデータにより高値例（14%以上）と正常値例の二群に分かれた。高値例は CIDP の初発例（2 例）および治療抵抗例（4 例）であり、正常値例はいずれも免疫治療により安定している症例であった。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。

NR4A2 陽性 Th 細胞の頻度については、60%の症例で高値であった。高値例と正常値例の間に臨床的に有意な相関は認めなかったが、IVIg 治療直後の症例および少量経口ステロイド治療で長期寛解が得られている症例では正常値であった。NR4A2 陽性細胞頻度と Eomes 陽性細胞頻度の間に相関関係は認めなかった。

B 細胞亜分画の中では、Plasmablast が患

者群で増加しており($p < 0.01$)、CD138 陽性の mature な plasmablast、CXCR3 陽性の Plasmablast が増加していた($p < 0.01$)。その他、Memory B cell の増加($p < 0.01$)を認める一方で Naive B cell は相対的に減少していた($p < 0.05$)。近年全身性エリテマトーデス(SLE)や一部の多発性硬化症(MS)患者で増加していることが報告されている。Age-associated B cell は一部の患者で増加しているものの有意差は認めなかった($p = 0.08$)。

考察：

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。MS の疾患活動性と関連する NR4A2 陽性細胞は Th17 細胞の一つであり、CIDP においても疾患活動性を反映している可能性がある。

Plasmablast の増加は SLE や視神経脊髄炎といった B 細胞を介した自己免疫性疾患に共通して認める現象であることから、自己抗体の産生や B 細胞の分化異常を示唆する結果であると考えられる。

本研究の Limitation として、対象患者のほとんどが免疫療法を受けており、治療の影響が否定できない点、また疾患活動性や重症度など臨床的に多様な症例を含んでおり、CIDP 一般の病態を明らかにするには不十分であることが挙げられる。さらに症例を集積し検討を継続することが重要と考えられる。

結論： CIDP やその他の免疫介在性ニューロパチーにおいても、多発性硬化症やその動物モデルにおける病原性リンパ球の関与が示唆され、共通する免疫病態が存在する可能性がある。疾患活動性のバイオマーカーとして、あるいは治療標的として有用である可能性があり、今後さらに検討を進めることが必要である。

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).
3. 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.

免疫介在性ニューロパチー・脳炎の診断と治療

分担研究者：岡本智子

所属：国立精神・神経医療研究センター病院
脳神経内科

緒言

神経疾患の病態が解明することで、確定診断の手法が確立し、新規治療が可能になることが期待される。難治性神経疾患における患者の臨床的特徴を詳細に検討し、病態の解明、診断の確立、新規治療に寄与する研究を行う。令和元年度は、神経細胞核内の好酸性封入体形成を特徴とし、認知機能障害、小脳性運動失調、末梢神経障害を合併する神経核内封入体病 (NIID) について、近年の遺伝子解析の進歩による確定診断に基づき、免疫介在性ニューロパチーとの鑑別の重要性について検討した。また令和2年度は、抗アクアポリン4 (AQP4) 抗体が病態の機序に大きく関与する視神経脊髄炎関連疾患 (NMOSD) で、抗 AQP4 抗体陽性 NMOSD 例と陰性 NMOSD 例の剖検例からその臨床的病理学的相違について検討した。令和3年度は、中枢神経の炎症性脱髄性疾患である多発性硬化症に対する新規治療薬の医師主導治験に関して報告した。

方法

[令和元年度]当院で NIID と診断された12例についての臨床的経過、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。

[令和2年度]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。

[令和3年度]再発性多発性硬化症 (RMS) 患者30人を対象とした、週1回経口反復投与 (24週間)、多施設共同2群ランダム化二重盲検第II相臨床試験で、被験薬：OCH-NCNP1 顆粒 0.3 g (OCH-NCNP1; 3.0 mg 含有) を15人、または対照薬 (プラセボ) を15人に投与し有効性及び安全性を検討した。主要評価項目はMRI画像 T2 強調画像による、新規病巣又は既存の病巣の拡大が認められた被験者の割合であり、副次評価項目は、有効性に関しては第I相試験で変動が認められた T 細胞・NK 細胞系統の探索的バイオマーカーと、临床上重要な有効性評価項目である再発、機能障害、MRI 画像上の変化である。安全性評価は有害事象発現とその程度を検討した。

結果および考察

[令和元年度]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 皮髄境界高信号 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¹⁾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髄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クエ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、縮腫を認めたことから 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 *NOTCH2NLC* の GGC expansion が同定され²⁾、本例においても同様の遺伝子異常を認めた。

[令和2年度]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、他院で抗アクアポリン4（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）を繰り返し、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、自宅にて心肺停止状態で発見され当院へ救急搬送。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 著名高値。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、胸髄病変を繰り返し、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した。

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、末梢性の髄鞘が脊髄内に侵入する像は症例1にみられた。

[令和3年度]治験実施状況は、2019年12月～2021年11月までに延べ35人が同意し、スクリーニング検査を実施。登録された30人（男性10人/女性20人、再発寛解型18人/二次進行型12人、平均年齢45歳、平均発症年齢33歳、平均罹病期間13.5年、平均 EDSS4.2）の患者のうち25人が完遂、5人中止し、その理由は、MS再発に対する治療継続のため（3人）、検査値基準範囲外のため（2人）であった。本治験では治験参加患者を募ることが重要な課題のひとつで、様々な広報活動を行い、他施設から6人の患者をご紹介いただき、3人組み入れることができた。

結論

[令和元年度]NIID の中には DWI における皮髄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。

[令和 2 年度]典型的及び、非典型的 NMOSD の剖検例を経験した。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。

[令和 3 年度]OCH-NCNP1 は免疫制御性に作用するユニークな機序の経口薬剤であり、MS の新規治療薬として有望である。30 例の登録が達成でき、今後解析をすすめる。

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.

NINJA の病態解明と治療手段に関する研究

分担研究者：林 幼偉

所属：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

緒言：

多発性硬化症 (MS) は自己免疫機序によって中枢神経症状の再発・寛解を繰り返す脱髄疾患であり、臨床経過により再発寛解型(RR-MS)、二次進行型(SP-MS)、一次進行型(PP-MS)に分けられ、多くが再発寛解期を経て二次進行期に移行する。各病期の病態は解明されているが、移行期の機序は明らかになっていない。RR-MS に関しては疾患修飾薬の導入により多くの症例で疾患活動性の制御が可能になったが、疾患修飾薬が無効でむしろステロイド製剤や免疫抑制剤が有効な疾患群は少なくない。そのような非典型的な疾患群の中で抗 AQP4 抗体の同定により視神経脊髄炎類縁疾患(NMOsd)として分類された。しかしいずれの疾患においても再発・増悪症状に対してステロイドパルスを複数クール施行しても十分に寛解しない難治症例も少なくなく、またいずれについて非典型的な疾患群が想定されている。その中で明らかな神経学的所見を認め他覚的に神経学的な責任病変の存在が想定でき臨床的には 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 plasmablast 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。本研究は NINJA の病態を明らかにして治療手段の適正化を図ることを目標とし、A)患者検体有感作マウスに移入して病原性を確認し、B)末梢血リンパ球サブセットのパターンを解析し、C)患者検体から病因物質を同定し、D)診断基準を確立することを計画した。

自己抗体同定に関する解析手段が入手困難となったことや研究における時間的制約ができたことから、今回の研究では NINJA の病態解析に絞った。まず①MS や NMOSD の難治症例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ついて解析し、②末梢血リンパ球サブセットのパターンと、③MS の各病型を反映し全経過に共通な治療反応性を反映できる T 細胞サブセットのパターンについて、それぞれ MS や NMOSD と比較した。

方法：

① ステロイドパルス後も症状が残存する症例に対し、当院では 2005 年から血液浄化療法を導入しており、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。他覚的な指

標として 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、自覚的症狀のみが軽減した症例を有効群、それ以外を不変・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 $IFN\gamma^+$ Th1 細胞あるいは $IL-17^+$ Th17 細胞の割合を測定した。

- ② 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。
- ③ MS 患者 (RR-MS 32 名、SP-MS 28 名、PP-MS 5 名)、NINJA 患者 10 名の末梢血における $CD4^+CD25^+$ T 細胞について $CD25^{high}$ 分画と $CD25^{low}$ 分画に分けて頻度と推移を比較した。また各分画における Foxp3 の発現頻度と IL-10 または IL-17 産生能を測定した。

結果：

- ① 血液浄化療法の有効性とその免疫学的な予測指標について、他覚的所見が改善した症例の割合が、前期では IAPP を施行した場合は RRMS 37.0% ; SPMS 27.3% / ; NMO 47.8%、DFPP や PE を施行した場合は RRMS 25.0% ; SPMS 35.3% ; NMO 45.5% であり、後期では IAPP を施行した場合は RRMS 65.9% ; SPMS 39.4% ; NMO 26.3%、DFPP や PE

を施行した場合は RRMS 50.0% ; SPMS 50.0% ; NMO 57.7% であった。RR-MS では IAPP でも改善する症例が多いが、SP-MS や NMOSD では DFPP や PE の追加で効果が期待できること、IAPP 有効例では plasmablast が低く、DFPP/PE 有効例では plasmablast が高いことが判明した。

- ② 末梢血リンパ球サブセットのパターンの解析について、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、健常群に比べ NINJA 群では plasmablast が多く、CXCR3 陽性 CXCR5 陰性群の Th1 細胞が優位に低いことがわかり、先行研究での MS の IAPP 有効例では無効例に比べて $IFN\gamma$ 産生 Th1 細胞が多く、plasmablast が少ないことと逆であることが判明した。
- ③ T 細胞サブセットを用いた病型分類と治療反応性の指標として、末梢血の $CD4^+CD25^+$ T 細胞における $CD25^{high}$ 分画 $CD25^{low}$ 分画の多寡と推移により MS の各病型 (RR-MS、SP-MS、PP-MS)、NMOSD、NINJA の活動性 (寛解期か再発期・増悪期) を評価することができ、再発・増悪期に RR-MS では $CD25^{high}$ が減少し、SP-MS では $CD25^{low}$ が増加し、NMOSD と NMO では両者が関与すること、 $CD4^+CD25^{high}/CD4^+CD25^{low}$ 比で治療反応性を評価することができること、 $CD25^{high}$ 分画が十分に回復しない RR-MS では多くが SP-MS へ移行していたこと、 $CD25^{high}$ 分画はほとんどが Foxp3 を発現する Treg であり一部は IL-10 あるいは IL-17、または IL-10 と

IL-17 を産生する effector Treg であり、CD25^{low} 分画は Foxp3 発現頻度が低く IL-17 を産生する Th17 を含んでいることを明らかにした。

考察：

- ① 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かったこと、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。
- ② 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られる。
- ③ RR-MS と SP-MS では再発・増悪時における CD25^{high} 分画の推移が異なるが、これは RR-MS から SP-MS への移行期では Treg の抑制能低下による炎症の遷延で effector Treg が Th17 に変化することを示唆する。NINJA の CD25^{high} 分画は RR-MS と SP-MS の中間にあり、MS 治療薬への抵抗性を反映すると考えられた。

結論：

- ① 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。
- ② 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。
- ③ CD4⁺CD25⁺T 細胞における CD25^{high} 分画と CD25^{low} 分画のバランスは MS の各病型と NINJA の病態を反映する。CD4⁺CD25^{high}/CD4⁺CD25^{low} 比は治療反応性を反映し、特にこの値の回復が不十分な RR-MS は SP-MS に移行しやすい。

参考文献：

1. Takewaki D, Lin Y, Sato W, et al. Normal brain imaging accompanies neuroimmunology justified, autoimmune encephalomyelitis. *Neurol 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.
3. Kimura K, Lin Y, Yamamura T, et al. Th1-CD11c⁺B Cell Axis Associated with Response to Plasmapheresis in Multiple Sclerosis. *Ann Neurol.* 2021 Oct;90(4):595-611.
4. 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.
5. 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.
 6. Keegan M, Pineda AA, McClelland RL, et al. Plasma exchange for severe attacks of CNS demyelination: predictors of response. *Neurology* 2002; 58: 143-146.
 7. 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.
 8. Khatri BO, McQuillen MP, Hoffmann RG, et al. Plasma exchange in chronic progressive multiple sclerosis: a long-term study. *Neurology* 1991; 41: 409-414.
 9. 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.
 10. Canadian Cooperative MS Study Group. The Canadian cooperative trial of cyclophosphamide and plasma exchange in progressive multiple sclerosis. *Lancet* 1991; 337: 441-446.
 11. 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.
 12. 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.

MRIによるネットワーク手法および Free water imaging を用いた筋痛性脳脊髄炎/慢性疲労症候群 (ME/CFS) の脳画像解析

分担研究者：佐藤典子

所属：国立精神・神経医療研究センター病院
放射線診療部

緒言

筋痛性脳脊髄炎/慢性疲労症候群

(ME/CFS) は原因不明の強度の疲労が長期間継続する病気である。我々は脳MRIデータからグラフ理論ネットワーク解析や、自由水イメージング (Free water imaging : FWI) と呼ばれる最新の拡散MRI解析を用いて脳内の微細構造変化を検出し、客観的診断確立に貢献することを目的とした。患者群と正常群での二群間比較に加え、免疫研究部で解析した血中の免疫細胞データを基に相関解析を行った。

方法

脳内ネットワーク MRI 解析については、ME/CFS 患者 89 人(男性 13 名、女性 76 例、; 平均年齢 37.3±12.7 歳、すべて右利き手)を対象とした。SPM 12 を用いて 3D-T1WI から灰白質画像を抽出し、2×2×2mm 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; Tijms et al., 2012; version 20150902)を用いて、局所脳のネットワーク指標である次数、クラスタリン

グ係数、媒介中心性、特徴的経路長およびスモールワールド性を算出した。こられを自律神経受容体に対する自己抗体 (抗 $\beta 1$ アドレナリン受容体抗体 $\beta 1\text{AdR}$ 、抗 $\beta 2$ アドレナリン受容体抗体 $\beta 2\text{AdR}$ 、抗 M3 アセチルコリン受容体抗体 $M3\text{AchR}$ 、抗 M4 アセチルコリン受容体抗体 $M4\text{AchR}$) 価と相関解析を実施した。

FWI 解析については、ME/CFS 患者 58 名(女性 44 名、男性 14 名; 年齢 35.6 ± 12.5 歳)を対象に行った。拡散 MRI は b 値 (0, 1000, 2000 sec/mm^2)、MPG32 軸にて撮影し、解析は MATLAB による tensor-model fitting アルゴリズムを用い、自由水の体積分率 FW、自由水の影響を除外した異方性比率 (Fat) と平均拡散 (MDt) の 3 つの指標を算出した。これらを健常者との群間比較、自己抗体 ($\beta 1\text{AdR}$ 、 $\beta 2\text{AdR}$ 、 $M3\text{AchR}$ 、 $M4\text{AchR}$) との相関解析を行った。

結果

脳内ネットワーク解析については、 $\beta 1\text{AdR}$ と右背外側前頭前野 (BA9) の媒介中心性との間に正の相関、 $\beta 2\text{AdR}$ と右中心前回 (BA4) の特徴的経路長との間に負の相関を認めた。FWI 解析については、群間解析では右弁蓋部に FW 低下域を、近接する右弁蓋部に Fat 低下域を、その上部の上縦束に Fat 上昇域を認めた。相関解析では $\beta 1\text{AdR}$ および $\beta 2\text{AdR}$ は同様の挙動を示し、右弁蓋部において FW、MDt にて負の相関を認めた。 $M3\text{AchR}$ および $M4\text{AchR}$ とは有意な相関はなかった。

考察

ネットワーク解析で異常が検出された BA9 は意思決定やワーキングメモリなどの認知機能、痛みの制御に関連しており、さらに BA9 の白質は右上縦束の一部であり、我々が以前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。また、FWI 解析でも右上縦束の異常が検出され、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。さらに右弁蓋部の異常については、うつ関連指標(ストレス、抑うつ、意欲低下、不安)と強い関連性を示した報告や慢性的な職業性ストレスによる疲労症候群において右弁蓋部皮質厚の低下(菲薄化)を認めた報告などがあり、同領域も症状との関連性が示された。

結論

ネットワーク手法や FWI を用いた脳 MRI 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. Tijms B.M., Seriès P., Willshaw D.J. Similarity-based extraction of individual networks from gray matter MRI scans. *Cereb Cortex.* 2012;22(7):1530–1541.
2. 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.
3. 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;30(6):822-827.

一本鎖抗体を用いた神経変性疾患の治療法 開発研究

分担研究者：漆谷 真

所属：滋賀医科大学内科学講座脳神経内科

緒言：

家族性 ALS (FALS) の我が国最大の変異遺伝子 SOD1 が産生する変異タンパク質、孤発性 ALS (SALS) の病的封入体構成タンパク質 TDP-43 はともにその構造異常を背景とした毒性獲得 (GOF) が主要病態である。我々は両タンパク質の異常構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を独自に作成し筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対する新規抗体療法の開発を進めている。さらにモノクローナル抗体ハイブリドーマ由来の scFv は小型であるのみならず、分泌シグナル、分解シグナルなどの分子修飾が自在で有り、用いるベクターによっては直接投与やドラッグデリバリーとしての細胞に感染させることで、病原タンパク質の局在の場に応じた分子標的治療のツールに資する高い潜在性を有する。我々は本研究班の前進班「神経疾患における免疫病態の解明と治療法開発に関する研究」において、ミスフォールド TDP-43 に対するモノクローナル抗体 3B12A 由来の scFv にシャペロン介在性オートファジー (CMA) シグナルを付与した自己分解型 scFv の *in vitro* での治療効果を報告した。本研究では scFv の前臨床評価に資する TDP-43 プロテノパチーマウスの作製と、変異 SOD1 scFv を細胞移植と融合させるといった免疫再生治療の有効性を検討した。

方法：

1. 抗 TDP-43 細胞内抗体の前臨床研究に資するモデル動物の作出

臨床型と病理所見の両者において TDP-43 プロテノパチーを忠実に再現するモデル動物は存在しない。そこで TDP-43 cDNA 上下流に発現効率を増強させたプロモーター、polyA を配置させたコンストラクトを作出した。TDP-43 として核移行シグナル (NLS) の変異体 (LQ)、LQ 変異に RNA 認識モチーフのアミノ酸置換により凝集体形成効率を上げた LQ-DCS (Shodai, 2012 JBC) を導入した。LQ、LQ-DCS の両者で脊髄と脳にて外来性 TDP-43 を発現するラインを得たため、運動機能と認知機能と病理所見について表現型解析を行った。

2. 家族性 ALS の原因タンパク質変異 SOD1 に対する抗体治療開発研究

我々は SOD1 変異を有する家族性 ALS で共通して認めるミスフォールド型 SOD1 を認識するマウスモノクローナル抗体 (D3-1) の作出に成功した。まず全長 H46R SOD1 トランスジェニックラットの髄腔への D3-1 の全長抗体を 1 ヶ月持続投与によって進行抑制、運動機能改善効果を観察した。さらに D3-1 抗体のハイブリドーマより VH、VL の可変領域遺伝子を単離し、一本鎖抗体 scFvD3-1 を作出した。遺伝子導入による外来遺伝子の恒久的影響に対する懸念と、細胞移植治療の組み合わせによる相乗効果を得るため、scFvD3-1 の cDNA をボルナウイルス病 (BoDV) ベクターに組み込み、オリジナリティ前駆細胞 (OPC) に感染させ、scFvD3-1 を分泌する OPC (D3-1-OPC) を作出した。

結果：

1. 抗 TDP-43 細胞内抗体の前臨床研究に資するモデル動物の作出

生後 6 ヶ月で脳脊髄での TDP-43 の異所性局在が見られ、アストロサイトの異常増殖を認めた。LQ-DCS マウスでは脊髄で界面活性剤不溶性の TDP-43 が増加したが、ともに明らかな表現型は見られなかった。生後 400 日齢で行ったオープンフィールド検査にて LQ、LQ-DCS で異常な探索行動を認めたが両者の相違はわずかであった。

2. 家族性 ALS の原因タンパク質変異 SOD1 に対する抗体治療開発研究

D3-1 全長抗体を H46R SOD1 トランスジェニックラットの髄腔内に 1 ヶ月間持続投与したところ、生存期間、体重減少、握力、両下肢伸展反射のいずれも改善効果を示した。次に、OPC (D3-1-OPC) の感染効率がほぼ 100%であることを確認し、培養培地中の分泌、Brefeldin による分泌抑制を確認した。D3-1-OPC を発症直前の H46R ラットの脳室内に投与したところ、全長抗体単独に比し、寿命延長、進行抑制、種々の運動機能の進行抑制についてより顕著な効果を示し、この効果には運動ニューロン数や神経筋接合部の保持、さらにミスフォールド SOD1 の減少、グリオシスの抑制を伴っていた。OPC-D3-1, OPC のみ、生食対照群脊髄のトランスクリプトーム解析によって炎症関連分子の発現が OPC-D3-1 で著明に抑制されていることを確認した。

考察：

1. TDP-43 トランスジェニックマウスの表現型解析の結果から、細胞質異所性局在の TDP-43 に与える病態が明らかとなってきた。

特に細胞質の凝集体形成は一義的な病態でないことが *in vivo* で証明された。そして、FTD-ALS スペクトラムと考えられている TDP-43 であるが、市販の高発現型の TDP-43 マウスとの比較によって認知機能と運動機能の障害における TDP-43 の分子病理の解明が期待される。

2. SOD1 抗体治療研究については、すでに抗体の特許出願を終えた。本研究から移植治療と抗体治療のカップリングというあらたなパラダイムが提案できた。First in human に向けてのハードルは高いが、iPS 細胞研究を取り入れた方向性が必要と考える。さらに SOD1 の核酸治療 (Tofersen) の臨床使用が視野に入り、D3-1 は未知の変異や孤発性 ALS における SOD1 の構造評価にも利用可能と考え、知財活用予定である。

結論：

我々はこの 3 年間で、我が国の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の 2 大原因タンパク質とも言うべき TDP-43 と変異 SOD1 の物性解析を *in vitro*、*in vivo* の両者で進め、タンパク質構造学知見に基づいて作出した一本鎖抗体による分子標的治療の開発を進めた。そして変異 SOD1 に対する D3-1 全長抗体の髄腔内投与と、ボルナウイルス病ベクターを用いて D3-1-scFv の分泌能を付与したオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の大槽内移植による ALS モデルラットの治療に成功した。TDP-43 は適切な前臨床モデルが現存しない中、新たなモデルを作出し、凝集体形成の ALS 病態に及ぼす栄養を検討したところ、意外にもその病的意義について考え方を改める必要があるような知見が

得られた。SOD1 に対する一本鎖抗体は OPC という腫瘍原性と炎症原性の少ない細胞に分泌させるという新たなパラダイムの実現に成功した。臨床応用を視野に置いた場合、iPS由来の OPC ということになり、あらたな技術革新に向けて研究を推進する必要がある。

参考文献：

1. Nakamura R, Kurihara M, Ogawa N, Kitamura A, Yamakawa I, Bamba S, Sanada M, Sasaki M, Urushitani M. Investigation of the prognostic predictive value of serum lipid profiles in amyotrophic lateral sclerosis: roles of sex and hypermetabolism. *Sci Rep* 12: 1826, 2022, DOI: 10.1016/j.pneurobio.2022.102229
2. Nakamura R, Kurihara M, Ogawa N, Kitamura A, Yamakawa I, Bamba S, Sanada M, Sasaki M, Urushitani M. Prognostic prediction by hypermetabolism varies depending on the nutritional status in early amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep* 2021 Sep 9;11(1):17943. doi: 10.1038/s41598-021-97196-5.
3. Kurihara M, Bamba S, Yasuhara S, Itoh A, Nagao T, Nakanishi N, Nakamura R, Ogawa N, Kitamura A, Yamakawa I, Kim H, Sanada M, Urushitani M, Sasaki M. Factors affecting energy metabolism and prognosis in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Nutr Metab*, 2021, doi: <https://doi.org/10.1159/000518908>
4. Aizawa H, Kato H, Oba K, Kawahara T, Yoshihiko Okubo Y, Saito T, Naito M, Urushitani M, Tamaoka A, Nakamagoe K, Ishii K, Kanda T, Katsuno M, Atsuta, Maeda Y, Nagai M, Nishiyama K, Ishiura H, Toda T, Kawata A, Abe K, Yabe I, Takahashi-Iwata I, Sasaki H, Warita H, Aoki M, Sobue G, Mizusawa H, Matsuyama Y, Haga T, Kwak S. Randomized phase 2 study of perampanel for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 2021 Jun 30. doi: 10.1007/s00415-021-10670-y.
5. Tanaka N, Kimura S, Kamatari Y, Nakata K, Kobatake Y, Inden M, Yamato O, Urushitani M, Maeda S, Kamishina H. In vitro evidence of propagation of superoxide dismutase-1 protein aggregation in canine degenerative myelopathy. *Vet J* 2021, Jun 21;274:105710. doi: 10.1016/j.tvjl.2021.105710.
6. 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
7. 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
8. 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
 9. 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>
 10. 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
 11. 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
 12. 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
 13. 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.
 14. Yamaguchi Y, Li F, Tsujimura A, Kamada M, Ito H, Maki T, Sawamoto N, Urushitani M, Takahashi R. Phosphorylated NF-kB subunit p65 aggregates in granulovacuolar degeneration and neurites in neurodegenerative diseases with tauopathy. *Neurosci Lett* 2019, 704: 229-235.
 15. 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.

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）

分担研究者：高嶋 博

所属：鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
神経病学講座 脳神経内科・老年病学

緒言：

HPV ワクチン後関連神経症状の多くは精神的反応と理解され機能性神経障害（FNSD）/転換性障害（CD）と診断されているのが現状であり、血液検査などによる他覚的異常は検出されないと考えられている。我々は HPV ワクチン後関連神経症状の病態を解明するために HPV ワクチン後関連神経症状と FNSD/CD を比較し、HPV ワクチン関連神経症状の特徴を明らかにする。免疫学的に血液および髄液を解析し、病態解明を行う。

方法：

1 年目は全国から紹介され当科に入院精査した 58 人の HPV ワクチン後関連神経症状患者（HPV 後患者）の臨床症状や治療反応性を ME/CFS と比較した。また、患者の血液・髄液中の自己抗体について探索した。

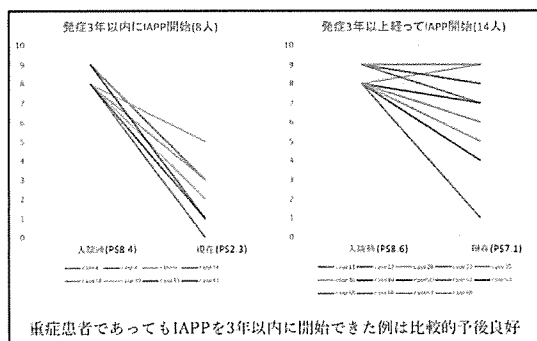
2 年度目は HPV 後患者の神経症状と類似するとされる機能性神経障害（FNSD）患者/転換性障害（CD）患者の神経症状の解析を行い、HPV 後患者のそれと比較した。当科に入院し神経学的に説明困難な症状を呈した 233 人について検討したところ、78 名は HPV ワクチン接種関連の患者で次に多いのは橋本脳症関連の患者 54 名であった。HPV 後患者と橋本脳症の関与が疑われる患者を除いた残り 112 名（男 39 人：女性 73 人）は一

般に狭義の FNSD/CD と考えられ、症状の種類と誘引・合併症について調査した。

3 年度目は HPV 後患者の血液及び髄液中サイトカインについて網羅的に検討した。血液中・および 髄液中サイトカインは HPV 患者群 8 人と HPV ワクチン接種歴のある健常者群 5 人とワクチン未摂取群 10 人の 3 郡で比較検討した。

結果：

県内在住 24 人、県外 34 名の併せて 58 例の HPV 後患者（12～19 歳）について検討した。使用された HPV ワクチンはサーバリックス 48 人、ガーダシル 10 人であった。頻度の高い症状は順に頭痛 91%、慢性疲労 81%、運動障害 78%、睡眠障害 73%、起立性低血圧/POTS 66%、学習障害・記憶障害 63%、音過敏/光過敏 40%などであった。ME/CFS における主症状は順に慢性的疲労感 89%、睡眠障害 88%、頭痛/四肢疼痛 79%と報告されており、症状の類似性がうかがわれた。また、ME/CFS 患者はステロイドに対する反応性が低いことが知られているが、当院での HPV 後患者に対するステロイド治療で改善した患者は少数で、概してステロイド反応性は低いと考えられた。一方、免疫吸着療法に対



する反応性は比較的高く、特に発症3年以

内に同治療を行った場合、臨床症状のより大きな改善が見られた (PS8.4→PS2.3)。

3年経過後に同治療を開始した患者において臨床的改善は乏しかったことから (PS8.6→PS7.1) 早期の治療介入が有用である可能性が高い。

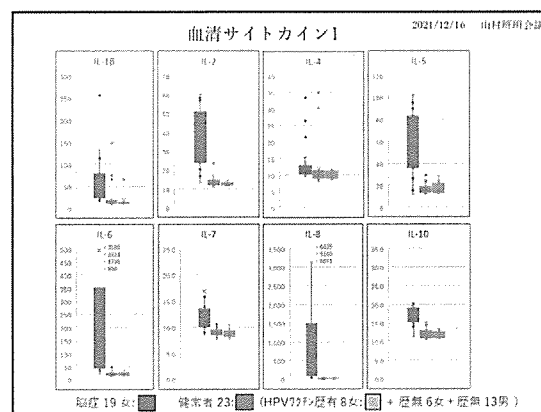
次に行った血液・髄液中の自己抗体の検討では、通常検出されない各種の自己抗体が HPV 後患者に多数認められることが判明した。抗ガングリオシド抗体は測定した患者の 38% に認められた。自己免疫性自律神経障害の原因とされる抗ガングリオニック AchR 抗体 (抗 g AchR 抗体) は、測定した患者 37 人中 10 人 (27%) が陽性であった。なお、抗 g AchR 抗体は既存研究で健常者 73 人では 1 名も検出されなかったと報告されている。髄液中 GluR 抗体も 23 人中 18 人 (78%) で陽性であった。

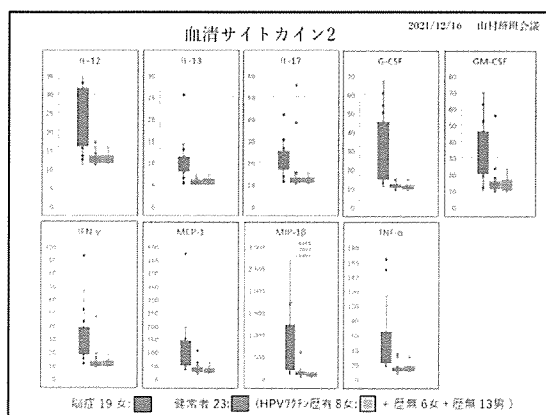
2年目の検討として、HPV 後患者ではない FNSD/CD 患者についてその臨床症状の広がりや、運動障害系・感覚障害系・いたみ系・脳神経系・自律神経系・倦怠感の 6 系統に分け、検討した。6 系統すべてに異常を呈したのは 1 例 (1% 未満) で、5 系統 13%、4 系統 26%、3 系統 32%、2 系統 24%、1 系統 12% であった。多系統に渡る障害の場合、不随意運動と感覚低下は合併しにくく、麻痺と感覚低下は合併しやすいなど組み合わせに一定の傾向が見られた。

次に一般に狭義の FNSD/CD と考えられている 112 人において、誘引は術後や外傷後が 39 人 (35%) で次に合併基礎の増悪が 29 人 (26%)、感染後・炎症後が 14 人 (13%) であった。疾患発症誘引がはっきりしないものは 30 人 (37%) いた。合併疾患については最も多い合併症は気管支喘息で 112 人中 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)。明らかな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が、残りの 15 人は原因不明であった。免疫・アレルギー素因や炎症誘発性のイベントも多く、脳血流 SPECT の異常所見を含めて、器質的な脳障害がある可能性が高い。

3年目の検討として測定した HPV 後患者の血液中サイトカインは IL-1 β 、IL-2・5・6・7・8・10・12・13・17、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、MCP-1、MIP1 β 、TNF- α で顕著に上昇しており、一方でワクチン摂取済み健常者群と健常者群に差はなかった。HPV 後患者の髄液検査でもほぼ同じ傾向で、多くのサイトカインの上昇がみられた。血液と髄液をほぼ同時期に採取できた 7 人の患者について血液中と髄液中のサイトカイン値を比較したところ髄液中サイトカインが血液中サイトカインと比べて著しく上昇していたのは MCP-1 であった (serum 165.7pg/ml vs CSF 913.8pg/ml)。





考察：

HPV 後患者の症状は ME/CFS と重なっている部分が多いことが判明した。症状の解析では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る一方、倦怠感と痛みは共存する割合が高く ME/CFS 類似の症候を呈する一群が示唆された。治療反応性についてはステロイドに対する反応性の乏しさは、ME/CFS と同様であるが、免疫吸着療法には比較的良好に反応した。一方、発症後 3 年以上経過すると治療反応性が低下することが明らかとなった。血液、髄液検査では HPV 後患者では軒並みサイトカインの上昇が認められ、何らかの免疫賦活による一種のサイトカインストーム状態にある可能性が示唆された。本研究の血清および髄液の採取時期は、ほとんどが発症後 1 年以上を経過しているので、長期的な免疫状況を示していると推定される。このことは、HPV 後患者において多くの自己抗体が高率に陽性であることを裏付ける所見と考えられ、抗体産生性のアジュバントを注射していることと、関連する可能性がある。特に HPV 後ワクチンの接種歴のある健常者は、非接種群と変わらないことからサイトカイン上昇は症状と関連があると考えられた。HPV ワクチン接種者内でサイトカイン上昇

をきたす場合と来さない場合の差が生じる原因は不明であるが、その個人の免疫学的バックグラウンドに違いがあるのであろう。

結論：

HPV ワクチン接種後神経症状を呈している患者は、通常検出されない自己抗体を高頻度に有し、加えて血液・髄液中の多数のサイトカインが著しく上昇していることから、単純な心因反応ではなく、何らかの免疫学的反応が生じていることが確認された。

参考文献：

- 1) American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5), American Psychiatric Association, 2013.
- 2) Vernino S, Low PA, Fealey RD, Stewart JD, Farrugia G, Lennon VA. Autoantibodies to ganglionic acetylcholine receptors in autoimmune autonomic neuropathies. N Engl J Med. 2000 Sep 21;343(12):847-55.
- 3) 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. Internal Medicine 53: 2185-2200, 2014

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になりうるか

分担研究者：近藤誉之

所属：関西医科大学総合医療センター

研究協力者：芦田真士

所属：京都府立医科大学

緒言：重症筋無力症 (Myasthenia gravis: MG) は、その 80% にアセチルコリン受容体への自己抗体 (acetylcholine receptor: AchR 抗体) を認めるが、AchR 抗体値と臨床症状は必ずしも相関しない。また、既存の治療の有効性が不十分な患者が一定数存在し、新たな免疫機序を標的とした治療法が望まれている。

本研究では、MG において、CXCR5 陽性 T 細胞 (末梢血中濾胞 T 細胞: Tfh) を解析し、抗体陰性例も含めて、Tfh の免疫学的偏倚が臨床的指標になるか、Tfh および関連分子が治療標的になるかを検討した。

方法：免疫療法導入前の AchR 抗体陽性患者、陰性患者、健常人より末梢血単核球を分離し、Flow cytometry によって Tfh の CD4 T 細胞中頻度、発現分子を解析した。Tfh/CD4T 頻度や ICOS^{high}Tfh/CD4T 頻度と重症度 (QMg スコア) と相関するかを検討した。さらに、Tfh を *in vitro* で刺激をして、サイトカイン産生能を検討した。また、RT-PCR によって測定された末梢血単核球 microRNA146a や MiR155 の発現量と Tfh の発現型や機能と相関しているかを検討した。

結果：AchR 抗体陽性の MG 患者において末梢血中 Tfh (cTfh) の頻度、中でも

inducible T cell costimulator (ICOS) を高発現した cTfh の頻度が上昇しており、重症度と相関することをまず明らかにした。AchR 抗体、抗筋特異的チロシンキナーゼ抗体陰性の MG (double seronegative MG: dSNMG) 患者においても同様に、ICOS^{high}cTfh の頻度は健常群と比較して上昇しており、抗体陰性者においても、診断における免疫学的指標になる可能性が示唆された。

MG 患者において、健常群と比較して cTfh による IL-21、IL-17、IL-4 の産生は亢進しており、特に MG 患者の ICOS^{high}cTfh における産生亢進は顕著であった。*in vitro* では、IL-21 存在下で B 細胞上の CXCR5 と ICOS ligand (ICOSL) 発現は亢進した。また、IL-21 は *in vitro* で B 細胞による IL-6、IL-10、IL-2、BAFF (B-cell activating factor) の産生を促進した。

末梢血単核球中 miR-146a, miR-155 の発現頻度は、MG において有意に上昇していた ($p=0.0015$, $p=0.0003$)。cTfh と mRNA の解析では、miR-155 と ICOS^{high}cTfh の頻度が正の相関を示した ($R^2=0.2$, $p=0.03$)。

考察：MG において Tfh はその頻度が増加し、ICOS を強発現し、炎症性あるいは B 細胞の分化を促進するサイトカインを強く産生した。また、Tfh の頻度は疾患活動性に相関し、疾患活動性のバイオマーカーになりうるかの検討が必要である。Tfh の偏倚はより抗体産生事象より上流の異常と考えられるが、この偏倚には microRNA の変化が影響を与えている

結論：Tfh は MG の免疫病態に強く関与し、疾患活動性にも相関をする。

炎症性中枢神経疾患におけるリンパ球異常の解析

分担研究者：三宅 幸子

所属：順天堂大学免疫学講座

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、特に抗体産生に関与するB細胞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NMOSD22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AQP4抗体陽性NMOSD患者4名および健常人(HC)4名から末梢血を採取、cell sorterを用い末梢血中B細胞をnaïve B細胞、switched memory B(SMB)細胞、double negative B細胞を分取しRNA-seq解析を行い遺伝子発現について比較検討を行った。さらに、HC10名、

NMOSD10名から末梢血を採取し、B細胞分画についてフローサイトメトリーを用い解析した。

結果：NMOSD患者末梢血において、既報のとおり¹、plasmablastの増加を認めると共に、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(T_{PH})細胞²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CSFにおいて、T_{PH}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T_{PH}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。さらに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。またGene set enrichment analysisの結果から、NMOSD患者naïve B細胞では、IL-2により誘導される遺伝子群の発現が亢進していることが明らかとなった。またIL-2受容体 α 鎖であるIL2RA(CD25)がHCと比較し有意に上昇していた。フロ

ーサイトメトリーを用いた解析から NMOSD 患者では CD25 陽性 naïve B 細胞が HC と比較し有意に増加していること、さらに IL-2 のシグナル分子であるリン酸化 STAT5 と CD25 の発現が正の相関を示すことが明らかとなった。また NMOSD 患者から CD25 陽性 naïve B 細胞と CD25 陰性 naïve B 細胞を分取し、試験管内で刺激培養を行うと CD25 陽性 naïve B 細胞で有意に抗体産生細胞が増加することが分かった。

考察：以上の結果から SMB 細胞と T_{PH} 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³、我々の結果と一致する。また、CD25 陽性 naïve B 細胞は自己抗体産生細胞への分化傾向をもつ naïve B 細胞サブセットである可能性が示唆された。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。今後、CD25 陽性 naïve B 細胞の自己抗体産生への関与を検証するため、CD25 陽性 naïve B 細胞産生抗体の自己抗原反応性を確認する。さらに、NMOSD 患者末梢血 B 細胞サブセットの B 細胞受容体レパトア解析を行うことで、自己抗体産生 CD25 陽性 naïve B 細胞の

SMB 細胞や plasmablast への分化について解析を行う。また、CD25 陽性 naïve B 細胞のトランスクリプトーム解析を行い、その分化、機能異常に関与する分子を同定する。さらに明らかになった分子について動物モデルを用いてその役割について検証するとともに、自己免疫疾患の新たな治療標的の開発を目指す。

結論：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。NMOSD 患者では抗体産生細胞への分化傾向をもつ CD25 陽性 naïve B 細胞が HC と比較し有意に増加していた。

参考文献：

1. Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, Yamamura T. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(9):3701-6.
2. Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, Slowikowski K, Fonseka CY, Liu Y, Donlin LT, Henderson LA, Wei K, Mizoguchi F, Teslovich NC, Weinblatt ME, Massarotti EM, Coblyn JS, Helfgott SM, Lee YC, Todd DJ, Bykerk VP, Goodman SM, Pernis AB, Ivashkiv LB, Karlson EW, Nigrovic PA, Filer A, Buckley CD, Lederer JA, Raychaudhuri S, Brenner MB. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature*. 2017;542(7639):110-114.
3. Hipp N, Symington H, Pastoret C, Caron G, Monvoisin C, Tarte K, Fest T, Delalay C. IL-2 imprints human naïve B cell fate towards plasma cell through ERK/ELK1-mediated BACH2 repression. *Nat Commun*. 2017;8(1):1443.

自己免疫性てんかんの免疫動態の探索

分担研究者：千原 典夫

所属：神戸大学医学部附属病院 脳神経内科

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ことを目的とする。本研究は、未だ十分な解析が行われていない抗神経抗体陽性症例の免疫動態を明らかにするとともに、抗体陰性例においても同様の免疫動態であれば一連の疾患群と考える一つの根拠になる可能性があり、ひいては AE に関連する新規抗神経抗体の同定に繋がると考える。

方法：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。本研究では新たにけいれんを疑う症状を呈した症例のうち、Graus らの自己免疫性脳炎診断基準¹⁾で possible と診断された症例 20 例に対して抗神経抗体の網羅的なスクリーニングを行なった。さらに、疾患活動期の末梢血及び髄液検体を用いてフローサイトメトリーによるリンパ球のフェノタイプ解析を行った。また血清及び髄液中の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。末梢血については、健常対照者 (healthy control(HC))11 例についても解析を行なった。

結果および考察：AEが疑われた症例の内、12名が抗神経抗体陽性でAEと診断、8例が抗神経抗体陰性でSeizure群とした。AE群では複数の抗神経抗体を認める例もありB細胞トレランスの異常を疑うものであった²⁾。両群で扁桃体腫大を主な所見とする画像変化がほぼ全例で認められた一方で髄液細胞数増多(>5cell/mm³)が認められた例は両群ともに1例ずつであった。しかし、詳細な解析を行うとAE群では有意に末梢血の抗体産生性B細胞であるPlasmablastsと活性化した循環型濾胞性T細胞(circulating follicular T cells (cTfh))が他の群と比して増加していた。また、血清中の炎症性サイトカインがAE群でSeizure群と比して有意に増加していた。今後、今回得られたAEにおける急性期の免疫動態は抗神経抗体陰性例においても同様の免疫動態であれば一連の疾患群と考える一つの根拠になる可能性があり、既存の診断基準に付加的な所見として用いることができるか、国内外の連携をさらに強化して検討する。また、現時点では抗神経抗体陰性例とされる同様の免疫動態を呈する患者由来の血清から、自己免疫性てんかんに関連する新規抗神経抗体の同定を目指す。

結論：難治性てんかんを呈する症例では髄液細胞数増多や画像所見が非炎症性の焦点てんかんと鑑別に有用でない例がある。B細胞やcTfh細胞のフェノタイプや血液の

炎症性サイトカインプロファイルが両者を鑑別する特徴となりうる。

参考文献：

1. Graus F, et al. A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *Lancet Neurol.* 15(4):391-404, 2016
2. Nakano T, Chihara N, et al. A Case of Immunotherapy-responsive Non-paraneoplastic Encephalitis with Antibodies Against GAD, LGI1, and GABAA Receptor. *Internal Medicine* 61(3):419-423, 2022

NMO 剖検例の病理解析

研究分担者：齊藤祐子

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

研究協力者：水谷真志¹、佐野輝典¹、高橋祐二²

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

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、右優位の視神経炎、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ったが、離脱し、翌年から当院外来フォローとなった。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、肺うっ血により死亡。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、視神経に強い脱髄を認め、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髄を認めたが、T 細胞の cuffing は全般的に認められた。大脳では、明らかな脱髄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、視神経と脊髄の脱髄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髄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。

分担研究課題名：神経変性病態における単球系細胞の役割解明

分担研究者：田中 章景

所属：横浜市立大学大学院医学研究科神経内科学・脳卒中医学

緒言：

神経変性疾患に共通の病態機序として、神経系へ浸潤した単球系細胞が異常に活性化され炎症性因子を分泌することで、慢性神経炎症を誘導し、神経系恒常性を破綻させ神経細胞機能不全から神経細胞死へ至る「非自律性」機序が提唱されている。そこで、我々は筋萎縮性側索硬化症（ALS）を研究対象とし、ALS モデルマウスの病変部位である腰髄において、CCR2 陽性骨髄単球系炎症細胞（CCR2 陽性単球）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。さらに、ALS モデルマウスにおいて、我々がミクログリア活性化に伴い発現が増加するサイトカインとして同定した interleukin-19 を欠損させることで表現型、病理所見がどのように変化するかを検討した。これらの研究により、各臓器恒常性センサーとして全身に分布する単球系細胞の神経変性疾患の病態形成における役割を解明することをめざした。

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 $Cx3cr1^{sfp/sfp}$ マウスと交配することで SOD1 Tg- $Ccr2^{rfp/+}$ - $Cx3cr1^{sfp/+}$ 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。

また、SOD1^{G93A} Tg マウスと、IL-19 欠損マウスとの交配により IL-19^{-/-}/SOD1^{G93A} Tg マウスを作出し、生存期間、Rotarod での運動機能の解析に加え、各病期での病理学的解析を行った。さらに、同マウスの初代培養細胞と病変部位である腰髄を用いて、神経障害因子、神経保護因子の発現、産生を検討した。

結果：SOD1 Tg- $Ccr2^{rfp/+}$ - $Cx3cr1^{sfp/+}$ 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。

SOD1^{G93A} マウスの腰髄では、病勢進行に伴った IL-19 mRNA 発現増加を認めた。IL-19^{-/-}/SOD1^{G93A} Tg マウスは、SOD1^{G93A} Tg マウスに比べ、生存期間に有意差は認めなかったが（173 日 vs. 178 日、n = 30）、有意な運動機能の改善を認めた。腰髄での mRNA 発現解析では TNF- α 、IL-1 β 、GDNF、TGF- β 1 の発現増加を認め、病理学的には CD68 陽性ミクログリアの減少と arginase1 陽性ミクログリアの増加を認めた。IL-19^{-/-}/SOD1^{G93A} Tg マウス由来の初代培養ミクログリア、アストロサイトでは、SOD1^{G93A} Tg マウスに比べ、TNF- α 産生増

加と、それに伴うアストロサイト由来の GDNF 放出増加を認めた。

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。

IL-19 欠損は、ミクログリアのフェノタイプを抗炎症性に変化させ、かつ、アストロサイト由来の GDNF 放出を増加させることで、神経保護効果をもたらし、運動機能改善に寄与している可能性が考えられた。

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。IL-19 シグナル伝達阻害による ALS 治療法開発の可能性が示唆された。

参考文献：

1. Komiya H, Takeuchi H, Ogawa Y, Hatooka Y, Takahashi K, Katsumoto A, Kubota S, Nakamura H, Kunii M, Tada M, Doi H, Tanaka F. 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
2. Komiya H, Takeuchi H, Ogawa Y, Suzuki K, Ogasawara A, Takahashi K, Azuma YT, Doi H, Tanaka F. Ablation of interleukin-19 improves motor function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Brain*. 14(1):74, 2021

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 immune/inflammatory mechanisms, underlying intractable neurological diseases, which have not consistently been categorized as a neuroimmunological disorder. Given the recent progress of neuroimmunology as an interdisciplinary science, new theories, novel diagnostic methods and therapeutic strategies, relying on the immunology background, have lately emerged, aiming to improve the prognosis of the patients. The target disorders 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, including neurologists, radiologists, immunologists, and neuroscientists to promote inter-disciplinary collaborations. By applying state-of-the-art methodologies, including flow cytometric analysis, searching anti-neuronal autoantibodies, brain MRI network analysis, cell-free miRNA analysis and B cell repertoire analysis, we have obtained provocative findings

which suggest the efficacy of immune-targeted drugs in some disorders. This project, in line with the current academic trend, should be encouraged and promoted without interruptions.