

令和元年6月18日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09901

研究課題名(和文) 中枢神経ループス患者髄液中のサイトカインを規定する因子に関する研究

研究課題名(英文) Associated factors with cerebrospinal fluid cytokine levels in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus

研究代表者

藤井 隆夫 (Takao, Fujii)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70255462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経障害を有する全身性エリテマトーデス(NPSLE)では脳脊髄液(CSF)中に自己抗体が併存することが多い。われわれは、抗NR2抗体と抗U1RNP抗体との相加効果を検討した。CSF-抗NR2抗体陽性はCSF-IL-6上昇と関連したが、CSF-抗U1RNP抗体陽性は直接的な関係はなかった。しかし両抗体が同時に存在する患者(DP)では抗NR2抗体単独陽性(aNR2)患者より、CSF-IL-6はさらに高濃度になっていた。したがって、CSF-抗U1RNP抗体は、直接的に脳障害を起こす可能性は低いが、抗NR2抗体の直接的な病原性を強めている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠原病の代表的疾患である全身性エリテマトーデスではしばしば脳の炎症を引き起こし、生命予後に影響を与える。この病態(NPSLE)は極めて重症と考えられ、そりよい治療法の開発が望まれるが、世界的にもガイドラインが整備されているとは言いがたい。本研究で、NPSLE患者の症状と深く関連するとされる脳脊髄液(CSF)中の液性因子がいかなる自己抗体と関連するかを明確にした。専門施設においてCSFは比較的容易に採取できるため、その自己抗体の検査を行うことでいかなる液性因子をターゲットとして治療すればよいかについて示唆に富む結果が得られたため、近日中に論文発表する予定である。

研究成果の概要(英文)：Autoantibodies (autoAbs) and inflammatory mediators (IMs) in cerebrospinal fluid (CSF) may be involved in the pathogenesis of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus (NPSLE). We examined combined effects of CSF anti-N-methyl D-aspartate receptor NR2 subunit (NR2) Ab and anti-U1RNP Ab on IMs in patients with NPSLE. CSF samples were collected from 69 patients with acute-phase NPSLE and 13 non-NPSLE controls. Levels of IL-6, IL-8, and monokine induced by IFN- γ (MIG) in CSF were measured by quantitative multiplex cytokine analysis. Elevated CSF IL-6 and IL-8 levels were mainly associated with anti-NR2 and U1RNP Ab positivity, respectively. CSF IL-6, IL-8 and MIG levels were higher in CSF anti-NR2 and anti-U1RNP Ab double positive group than in anti-NR2 Ab-positive alone group. Therefore, CSF anti-NR2 and anti-U1RNP Abs have combined effects on the elevation of CSF IL-6 and MIG levels in patients with NPSLE.

研究分野：リウマチ・膠原病分野

キーワード：全身性エリテマトーデス 抗核抗体 サイトカイン 中枢神経症状

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)の中枢神経症状(neuropsychiatric SLE:NPSLE)は、重篤かつ難治性である。理由として脳障害である点に加え、複数の異なる病態が混在することが多く、その活動性マーカーが患者により異なることがあげられる。NPSLEの病態に関連する因子として、i) 脳脊髄液(cerebrospinal fluids: CSF)中の自己抗体、ii) CSF中のサイトカインやケモカインなどのinflammatory mediators (IMs)、iii) 血液脳関門(Blood Brain Barrier: BBB)の透過性、などが考えられる。比較的NPSLEに特異的なCSF-自己抗体として抗N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunit 2 (NR2)抗体(Arinuma Y, *et al*, *Arthritis Rheum*, 2008; Yoshio T, *et al*, *Arthritis Rheum*, 2006 など)と抗リボゾームP抗体(Hirohata S, *et al*, *Arth Res Ther*, 2007)が以前から報告されているが、NPSLE患者の神経組織に免疫複合体(IC)やIgGの沈着は一般に認められないため、自己抗体が直接的に脳神経細胞を傷害している可能性は低く、エフェクターとしてはii) CSF-IMsがより有力である。われわれは、CSF-抗NR2抗体陰性のNPSLE患者に比し、陽性者ではCSF中のIL-6が有意に高いことを学会報告した。また本研究者らは過去に、CSF-抗U1RNP抗体陽性NPSLEでは神経症状の治療に副腎皮質ステロイド大量療法や免疫抑制薬の導入を要する“primary”NPSLEが高頻度であることを世界に先駆けて示し(Sato T, Fujii T, *et al*. *Arthritis Rheum*, 2010)、CSF-抗U1RNP抗体陽性がCSF中のIFN- α 、MCP-1(CCL2)の上昇と有意に相関することを報告した(Yokoyama T, Fujii T, *et al*, *Lupus*, 2014)。一方、IMsのCSF中濃度には自己抗体以外の因子、特に、iii) 血液脳関門(Blood Brain Barrier: BBB)の透過性亢進が関与している可能性がある。以上から、i) CSF-自己抗体、ii) CSF-IMs、iii) BBB透過性亢進におけるお互いの寄与について、部分的なデータは存在するが不明点はまだ多い。

2. 研究の目的

本研究では、i) NPSLE患者のCSFに検出される自己抗体、ii) サイトカインやケモカインなどのCSF-IMs、iii) 血液脳関門の透過性の3者の関係を明確にしてNPSLEをいくつかのサブセットに分類した上で、各サブセットにおいて最も重要な治療ターゲットとなるIMsがいかなる中枢神経症状と相関するかを調べる。またCSFにおけるIMsの上昇がいかなる因子で規定されているかを明確にすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 対象患者

本研究では、平成27年まで研究代表者が所属していた京都大学医学部附属病院 免疫・膠原病内科で研究代表者を中心に作成したNPSLEのコホートをを用いた。中枢神経症状が感染症や薬剤性で大量ステロイド療法などの免疫抑制療法が不要であった症例(SLEコントロール)、神経ベーチェット病などの他疾患をnon-NPSLEコントロールとした。

2) NPSLEの血清/CSF中抗核抗体およびその抗体価の測定

2)-1. RNA-IPP法

HeLa細胞から可溶性核・細胞質抗原を抽出し、血清中のIgGにプロテインAセファロースビーズを結合させた上で、核・細胞質抗原と混和する。免疫複合体を遠心により精製し、フェノール抽出により免疫複合体に含まれるssRNAを精製、電気泳動で同定する。

2)-2. ELISA

RNA-IPP法で検出できた場合のみ、抗U1RNP抗体と抗リボゾームP抗体はELISAでその力価

を測定した。抗 NR2 抗体は、NMDA ELISA HUMAN 96 テスト(Mybiosource 社)で測定した。

3) CSF-IMs の測定

CSF-IMs の測定についてはマルチプレックスサスペンションアレイ(蛍光マイクロビーズ)法を用いた。今回、NPSLE 患者 CSF 中で高値と報告されたもの(IL-6, IL-8, MIG)を測定した。

4) 血清・CSF-自己抗体と CSF-IMs との関連の検討

自己抗体陽性例で陰性例に比して高値になるかを確認した上で、有意差がある IMs については抗体価との関連を調べた。

5) 血清・CSF-自己抗体と BBB 透過性との関連の検討

血清中の自己抗体と BBB 破綻の指標である Albumin quotient (Qalb)との関連を調べた。

6) CSF-IMs と BBB 透過性との関連の検討

3)で測定した IMs と Qalb との関連を調べた。

7) NPSLE の臨床症状との関連の検討

NPSLE 症状と測定したサイトカインとの関連を調べた。

4. 研究成果

対象患者のプロファイル

対象患者は、平均年齢 34.9±13.6 歳、男性:女性=9:60、SLE の罹病期間は 5.0±6.1 年、平均 SLEDAI は 12.3±6.5 年であった。また発症時、副腎皮質ステロイドは 84.1%で使用されており免疫抑制薬は 11.6%で併用されていた。中枢神経症状はループス頭痛が 21.8%、認知障害 12.6%、気分障害 12.6%、けいれん発作 10.3%、急性せん妄状態 10.3%、ループス精神病 9.2%などが高頻度であった。また血清中抗 NR2 抗体は 46%、抗 U1RNP 抗体は 64%に、CSF 中では 35%と 25%に検出された。

CSF 中の自己抗体と液性因子

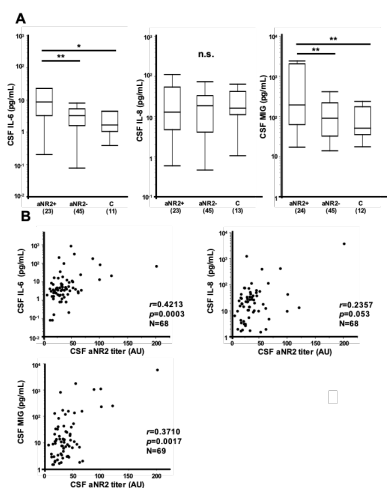
図 1 に示すように CSF-抗 NR2 抗体陽性は CSF-IL-6 上昇と関連したが、図 2 に示すように CSF-抗 U1RNP 抗体陽性は IL-6 と直接的な関係はなかった。しかし両抗体が同時に存在する患者(DP)では抗 NR2 抗体単独陽性(aNR2)患者より、CSF-IL-6 はさらに高濃度になっていた。この結果は、抗 U1RNP 抗体は抗 NR2 抗体の併存下においてのみ、IL-6 の上昇に関与する可能性を示唆している。

一方で、抗 NR2 抗体と異なり CSF-抗 U1RNP 抗体陽性は CSF-IL-8 濃度と関係し(図 2)、aNR2 よりも DP でより高濃度となっていた(図 3)。以上より CSF-IL-6 が CSF-抗 NR2 抗体と強く関連することから、IL-8 が BBB の透過性を亢進させ抗 NR2 抗体の血清から CSF への移行を誘導する可能性を考えた。実際、DP と aNR2 とを比較した場合、BBB の透過性や抗 NR2 抗体価に統計学的な有意差は検出できなかったものの、DP で亢進するあるいは高値となる傾向があり、BBB の透過性(Qalb)と CSF-IL-8 の間には明らかな相関関係があった(相関係数 0.51、 $P<0.0001$ 、本報告書に図表は示していない)。以上の結果から CSF-抗 U1RNP 抗体は、抗 NR2 抗体と異なり直接的に脳障害を起こす可能性は明らかでないが、髄腔内で IL-8 の産生を誘導し BBB の透過性を亢進させて抗 NR2 抗体の直接的な病原性(髄腔内での IL-6 上昇)を強めている可能性があると考えている。

自己抗体の併存と神経症状

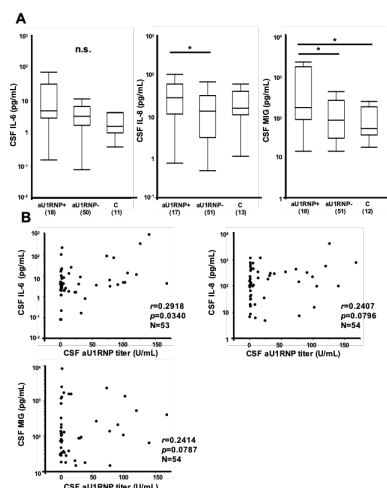
抗 NR2 抗体および抗 U1RNP 抗体がともに陽性の場合で、どちらかの抗体が単独陽性あるいは両方陰性の症例に比し、びまん性 NPSLE が多い傾向にあったが、有意差は検出できなかった。

図1. CSF中の抗NR2抗体とサイトカインとの関連



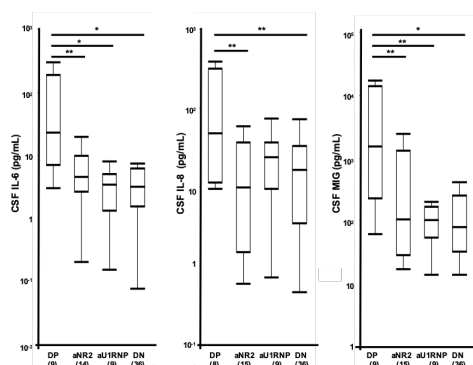
(A) 抗NR2抗体の有無とサイトカイン濃度。
* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$
(B) 抗NR2抗体価と各サイトカイン濃度の相関。
C: non-NPSLE; MIG: Monokine induced by interferon- γ ; n.s.: not significant;(): patient number.

図2. CSF中の抗U1RNP抗体とサイトカインとの関連



(A) 抗U1RNP抗体の有無とサイトカイン濃度。* $p < 0.05$
(B) 抗NR2抗体価と各サイトカイン濃度の相関。

図3. CSF中の自己抗体併存とサイトカインとの関連



* $p < 0.01$; ** $p < 0.05$
DP: (抗NR2 抗体+/抗U1RNP 抗体+); aNR2: 抗NR2抗体+/抗U1RNP抗体-;
aU1RNP: 抗NR2抗体-/抗U1RNP抗体+; DN: double negative: 抗NR2抗体-/抗U1RNP抗体-.

まとめ

CSF-抗 U1RNP 抗体は、抗 NR2 抗体と異なり直接的に脳障害を起こす可能性は明らかでないが、髄腔内で IL-8 の産生を誘導し BBB の透過性を亢進させて抗 NR2 抗体の直接的な病原性(髄腔内での IL-6 上昇)を強めている可能性があると考えた。今後さらに症例を増やして上記を確認することで、日常診療における NPSLE の治療法を進歩できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計 6 件)

【和文】

1. 藤井 隆夫. 全身性エリテマトーデスの中枢神経障害と自己抗体. 臨床リウマチ 2016;28: 243-250.
2. 藤井 隆夫. 膠原病における自己抗体の臨床的・病因的意義について. 和歌山医学 2016;67:

50-55.

3. 藤井 隆夫、近藤 聖子、石郷岡 望. 中枢神経ループスにおける自己抗体の直接的・間接的な病因的役割について. 臨床免疫・アレルギー科 2016;65:358-362.

【英文】

1. Ishikawa Y, Hashimoto M, Ito H, Tanaka M, Yukawa N, Fujii T, et al. Anti-nuclear antibody development is associated with poor treatment response to biological disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis. Semin Arthritis Rheum 2019. [Epub ahead of print]
2. Ishikawa Y, Fujii T, et al. Immunogenicity and lupus-like autoantibody production can be linked to each other along with type I interferon production in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab: A retrospective study of a single center cohort. PLoS One 2016;11:e0162896.
3. Fujita Y, Fujii T, et al. Isolation of vascular smooth muscle antigen-reactive CD4⁺ α β Th1 clones that induce pulmonary vasculitis in MRL/Mp-Fas^{+/+} mice. Cell Immunol 2016;303:50-54.

【学会発表】(計 5 件)

1. Fujii T, et al. Indirect pathogenic roles of cerebrospinal fluid anti-U1RNP antibodies in the presence of anti-NR2 antibodies in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. The Annual European Congress of Rheumatology (EULAR 2018), June 13-16, 2018, in Amsterdam, Netherlands.
2. 藤井 隆夫. 膠原病における自己抗体の臨床的意義と病原性. 平成 30 年度日本内科学会生涯教育講演会 2018 年 5 月 20 日 東京.
3. 石郷岡望、近藤聖子、藤井 隆夫、他. Neuropsychiatric SLE における血液脳関門の透過性と脳脊髄液中の炎症性メディエーターとの関係. 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会 2016 年4月21日～23日 横浜.
4. 近藤聖子、藤井隆夫、他. 精神神経ループスにおける脳脊髄液中の自己抗体とサイトカインとの相関. 第113回日本内科学会総会・講演会 2016年4月15日～17日 東京.
5. 藤井隆夫、他. 全身性エリテマトーデスの中枢神経症状と関連する自己抗体とその臨床的・病因的意義. 第61回日本リウマチ学会総会・学術集会 2017年4月20日～22日 福岡.

【図書】

該当なし

【産業財産権】

○出願状況

該当なし

【その他】

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名:石郷岡 望

ローマ字氏名:Nozomi Ishigooka