

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15339

研究課題名(和文) 免疫介在性有痛性神経障害発症に關与する病的抗原を同定する

研究課題名(英文) Attempt at identifying pathogenic antigens of painful autoimmune neuropathy

研究代表者

栗原 崇 (KURIHARA, Takashi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：60282745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：免疫介在性が疑われる急性の有痛性神経障害を有する3名の患者血清をマウスへ受動的移入することにより、疼痛様行動の再現が可能か、そしてその標的抗原の同定を試みた。有痛期患者血清は、マウス髄腔内投与により熱性痛覚過敏を生じさせ、脊髄後角、小型後根神経節細胞、真皮小径神経線維を免疫染色したが、疼痛寛解期の血清では無効であった。本患者血清を用い、標的抗原の同定を試みるプロテオミクス解析が進行しているが、今後も同様な患者コホートの血清解析を継続していく計画である。

研究成果の概要(英文)：We present three patients with acute onset and monophasic course of painful neuropathy, who had antecedent infectious symptoms. IgG antibodies in their acute phase sera strongly bound to murine spinal dorsal horn, small neurons in the dorsal root ganglia, and small nerve fibres. Interestingly, the bindings disappeared during the convalescent phase. Furthermore, serum transfer to a mouse nociceptive model induced transient alteration in thermal pain responses. Our case series suggest that an acute transient immune response can be directed against the nociceptive pathway. Although we have still not been able to identify the target antigens, we try to recruit large cohorts of patients to support the identification of the pathogenic antigens in these patients.

研究分野：疼痛学

キーワード：有痛性神経障害 自己免疫疾患 受動移入 脊髄 一次知覚神経 後根神経節

1. 研究開始当初の背景

有痛性神経障害は、小径感覚末梢神経線維 (A δ 線維と C 線維) が何等かの原因で障害されることによりその多くが発症すると考えられている。小径神経障害の原因には、糖尿病などの代謝障害、抗がん剤などの薬物や毒物、感染 (らい菌、ヒト免疫不全ウイルスなど)、免疫介在性 (全身性エリテマトーデス、ギラン・バレー症候群など)、遺伝性 (肢端紅痛症、シャルコー・マリー・トゥース病など)、特発性 (特発性小径線維ニューロパチー、複合型局所疼痛症候群など) のもの、などがあり、患者数も多い。近年、糖尿病、抗がん剤治療、ヒト免疫不全ウイルス感染などに伴って発症する一部の有痛性神経障害に関しては動物モデルの開発も進み、疼痛発症メカニズム・有効な鎮痛薬の検定などの研究も進捗しつつあるが、未だ病因に基づく疼痛管理は不十分であり、対症療法に難渋することも少なくない。

免疫介在性有痛性神経障害の代表として、膠原病 (全身性エリテマトーデスやシェーグレン症候群など) に関連する有痛性神経障害がある。膠原病では自己免疫応答の結果、様々な抗体 (抗核抗体など) が産生されるが、これらの抗体と疼痛発症の因果関係や有効な疼痛管理法に関しても不明な点が多い。また、免疫介在性が疑われるが、エピソードが明らかでない有痛性神経障害も実際は多く存在する可能性が最近注目されている。

2. 研究の目的

自己免疫疾患の診断基準である Witebsky の基準では、1) 臨床的に自己免疫疾患または炎症症状の詳細な証拠を特定すること、2) 動物に患者血清を受動移入することで臨床症状を再現すること、3) 特定の抗原を立証すること、の3つの基準が重要であると考えられている (引用文献、)。本研究では、何らかの先行感染後、疼痛を急性に発症し、その後の臨床診断から免疫介在性が推測される有痛性神経障害患者の血清を用い、これをマウスに受動移入することで患者の中核的臨床症状である疼痛症状を再現できるか、およびその抗原を立証できるか否かを検討した。

3. 研究の方法

疼痛行動学的本実験の計画は、鹿児島大学動物実験委員会で承認を受けた (MD13074、MD14074)。免疫組織化学の実験は、鹿児島大学 (上記)、シンガポール国立大学医学部、およびエクス=マルセイユ大学・神経科学研究センター動物実験委員会の承認を受けた。

3.1. 疼痛行動学的実験

生後 6-8 週齢の雄性 ddY マウス (九動, 熊本) を用い、有痛性疼痛患者血清 (有痛期および寛解期) および正常ヒト血清の効果を検討した。血清は、単回髄腔内投与した。髄腔内 (intrathecal: i.t.) 投与は、血清 5 μ l を

Hylden と Wilcox の方法に従い、無麻酔で行った。

疼痛行動学的試験として、熱刺激に対する潜時を計測した。熱刺激に対する応答は、Paw Thermal Stimulator (UCSD, San Diego, USA) で評価し、カットオフ時間は 20.48 秒とした。なお、行動実験観察者は、投与する血清がどの種のものであるかは分からずに (ブラインド試験)、行動学的実験を行った (血清の調整は他者が行った)。

データは平均値 \pm 標準誤差で示した。多重比較には Dunnett 検定を用い、 $P < 0.05$ を有意とした。

3.2. 免疫組織化学の実験

雄性 C57BL/6J (Charles River) を灌流固定 (4% パラホルムアルデヒド) し、脊髄、後根神経節、皮膚を摘出した。各々凍結切片を作成し、患者血清 (1/200)、PGP9.5 抗体 (pan-axonal marker protein gene product 9.5, rabbit, Abcam, 1/1000)、電位依存性 Na⁺チャネル抗体 (mouse, Sigma-Aldrich, 1/500) を処理した (4°C で一晩)。二次抗体には、Alexa488 あるいは 594 標識 donkey anti-human IgG、Alexa594 標識 donkey anti-mouse IgG、Alexa488 標識 donkey anti-rabbit IgG (それぞれ 1/500, Molecular Probes) を使用し、室温で 1 時間処理した。

脊髄切片は患者血清で処理後、ビオチン化 anti-human IgG 抗体 (goat, Vector lab, 1/2000) を処置し、avidin-biotin peroxidase と diaminobenzidine で可視化した。

また、ラット (Wistar 系、3~4 週齢) より後根神経節を摘出し、分散培養を行った。培養 4 日目に、患者血清 (1/200) を室温で 1 時間処理し、その後 Alexa594 標識 donkey anti-human IgG 抗体 (1/500) で可視化した。また、neurofilament heavy chain 抗体 (chicken, 1/2000, Merck Millipore) で染色するため、上記蛍光免疫染色後、培養 DRG 神経を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、Triton X-100 (0.1%) で膜透過処理を施した。

3.3. 有痛性自己免疫神経障害患者の臨床症状

使用した血清は、シンガポール国立大学医学部の Einar P. Wilder-Smith 教授より供与頂いた。患者の臨床症状は、表 1 にまとめた。

本研究では 3 名の中国系患者血清を検討した。患者はいずれも先行する感染症症状があり、四肢の強い痛み (針で刺した様な痛覚過敏と触アロディニア) を訴えていた。振動感覚、固有知覚、筋力は正常であったが、腱反射は減弱、ないしは消失していた。また、動悸や便秘などの自律神経症状が疼痛発症後 1 週間は顕著であるが、数週間で回復した。両側の正中、尺骨、脛骨、腓腹神経機能は正常であったが、小指球の皮膚生検を行うと、3 名とも表皮内神経が消失していた。

患者 1 と 2 (Pt 1 と Pt 2) は、免疫グロブリン

ン大量静注療法 (IVIG) を受け、数日から 1 週間で疼痛症状は劇的に改善された。患者 3 は IVIG 療法を選択せず、経口プレドニゾン療法 (1 日 40 mg を 5 日間、その後 3 週間かけて漸減) を行った。疼痛症状は徐々に改善されたが、19 ヶ月後の外来診察においても依然軽度の疼痛が認められた。

3 名の患者はすべて、血沈、C 反応性タンパク値、空腹時血糖値、HbA1c 値、肝・腎機能、全血球数、ビタミン B₁₂ 値、甲状腺機能、抗核抗体価、B 型および C 型肝炎ウイルス、HIV ウイルスに対する検査、各種ガングリオンに対する IgG 抗体値は正常であった。

Own Cases	Age/ Sex	Antecedent illness	Pain			Other sensory symptoms	Autonomic symptoms	Deep tendon reflexes	CSF: cell count (μl)/protein (mg/dl)
			Onset to peak	Type	Onset site				
Pt 1	31/M	Diarrhea	1 week	Prickling	Feet	Pares, allo, ppk loss	Cons, palps	Decreased	3/89 (day 5)
Pt 2	26/M	Diarrhea	4 weeks	Burning	Fingers and toes	Pares, allo, ppk loss	Cons, palps	Absent	5/230 (week 6)
Pt 3	25/M	Fever	3 weeks	Burning	Thigh	No	Cons, palps, mict sx	Decreased	18/320 (week 6)
Dabby et al.									
Case 1	17/M	No	10 days	Burning	Hands	Allo, thermal loss	Not mentioned	Normal	Not mentioned
Case 2	21/F	No	12 days	Burning	Hands and feet	Allo, thermal loss	Not mentioned	Not mentioned	Not mentioned
Seneviratne et al.									
Case 3	27/F	UTI	4 weeks	Burning	Hands	Pares, thermal loss, ppk loss	No	Normal	2/55 (week 2)
Case 4	33/M	Diarrhea	2 days	Burning	Feet	Pares, thermal loss, ppk loss	No	Brisk	0/63 (week 1)
Case 5	67/M	No	15 days	Burning	Feet	Pares, thermal loss, ppk loss	No	Brisk	8/95 (week 4)
Case 6	44/F	Diarrhea	2 days	Burning	Hands	Pares, thermal loss, ppk loss	No	Normal	5/92 (day 10)

Pt = Patient; UTI = urinary tract infection; pares = paresthesia; allo = allodynia; ppk = pinprick; cons = constipation; palps = palpitations; mict sx = micturition symptoms

表 1. 疼痛性自己免疫神経障害患者の臨床症状

本研究で検討した 3 名の患者の主な臨床症状を表にまとめた。また、本患者の症状に類似した患者症状を検討していた先行論文 (引用文献、Dabby et al.; Seneviratne et al.) を文献検索で 2 件見出したので、比較のため表に掲載した。

4. 研究成果

4.1 疼痛行動学的検討

Pt 3 における経口ステロイド療法の効果は限定的であったが、Pt 1 と 2 における IVIG 療法の効果は劇的であったことから、少なくとも Pt 1 と 2 の患者の疼痛は、自己免疫性であること (自己抗体の関与) が推測された。そこで、患者血清をマウスへ受動移入することで疼痛症状を再現するかどうか検討するため、患者血清をマウスにも膜下腔へ投与 (i.t. 投与) し、熱刺激に対する疼痛閾値 (逃避潜時) を測定した (図 1)。

Pt 1 と 2 の有痛期の血清、あるいはそれぞれの寛解期の血清、または正常人の血清 1 種をマウスにも膜下腔に単回投与した。有痛期の血清は Pt 1、Pt 2 とともに、投与後 24 時間

をピークに、逃避潜時の有意な短縮 (熱性痛覚過敏) を引き起こし、4 日目にはほぼ回復していた。一方、寛解期の血清、あるいは正常人血清は無効であった。

Pt 2 血清の効果は Pt 1 血清より強く、投与後 30 分でほぼ最大の熱性痛覚過敏効果を引き起こしていた (図 2)。

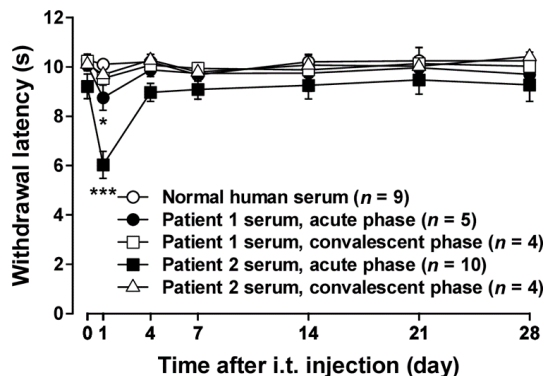


図 1. 有痛期および寛解期患者血清受動移入の効果

血清は単回投与した。詳細は本文参照。* P < 0.05, ***P < 0.001 (Dunnett's test), compared with data at time 0 (0 hr).

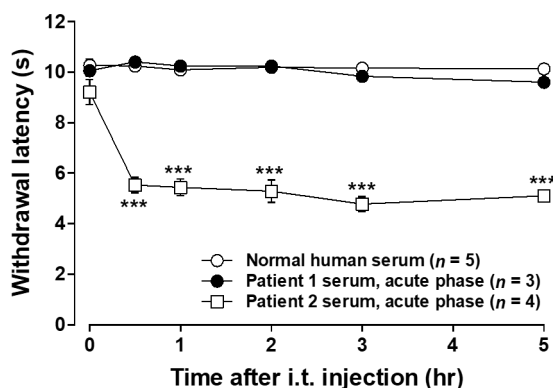


図 2. 有痛期患者血清の急性効果

Pt 1 の有痛期血清を単回 i.t. 投与しても急性の熱性痛覚過敏効果は認められなかったが (投与後 3、5 時間目に若干の潜時の短縮傾向が認められるが)、Pt 2 の血清は、投与後 30 分でほぼ最大の熱性痛覚過敏効果を示した。***P < 0.001 (Dunnett's test), compared with data at time 0 (0 hr).

4.2. 免疫組織学的検討

くも膜下腔投与した有痛期患者血清のターゲットが何処にあり、そしてそれが何であるかを検討するため、患者血清を用いてマウス脊髄、後根神経節、皮膚の免疫組織学的検討を行った (図 3、4、5)。

Pt 1、2、3 の有痛期患者血清は全て脊髄後角を良く染色したが、寛解期の血清は、脊髄後角との反応性を失っていた (図 3)。

後肢足底部真皮における検討では、有痛期血清は真皮内の小径神経 (神経線維マーカー

である PGP9.5 陽性) を強く染色した (図 4A、Patient 1)。一方、寛解期血清 (Patient 1') では有意な染色は観察されなかった。

後根神経節においては、主に小型の神経細胞に免疫反応陽性が認められ、陽性細胞は電位依存性 Na⁺チャネルを高発現している細胞であった (図 4B)。

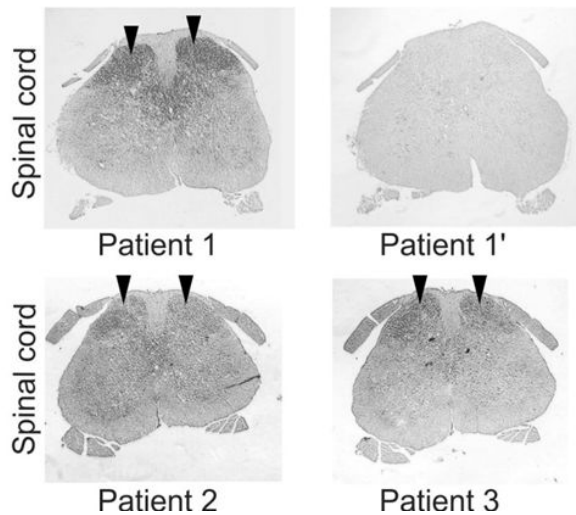


図 3. マウス腰部脊髄における免疫染色

有痛期患者血清は、主に脊髄後角と反応した。一方、寛解期血清 (Patient 1') にはほとんど免疫反応性は認められなかった。

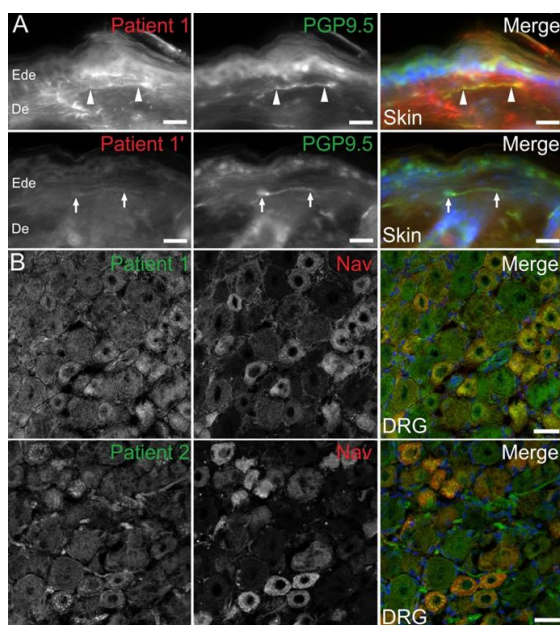


図 4. マウス後肢足底部表皮および後根神経節における免疫染色

A. 有痛期患者血清は、真皮内の小径神経 (神経線維マーカーである PGP9.5 陽性、矢頭) を強く染色した。一方、寛解期血清 (Patient 1') にはほとんど免疫活性はなかった (矢印)。スケールバー = 20 μ m。B. 有痛期患者血清 (Patient 1、Patient 2) は、電位依存性 Na⁺チャネル (Nav) 陽性の小型後根神経節細胞を主に染色した。スケールバー = 10 μ m。

生細胞である培養後根神経節細胞を用いた免疫染色も試みたところ、有痛期患者血清は細胞体や軸索の細胞膜成分と反応することが示唆された (図 5A、C)。しかし、寛解期血清 (Patient 1') では免疫反応性はほとんど認められなかった (図 5B)。

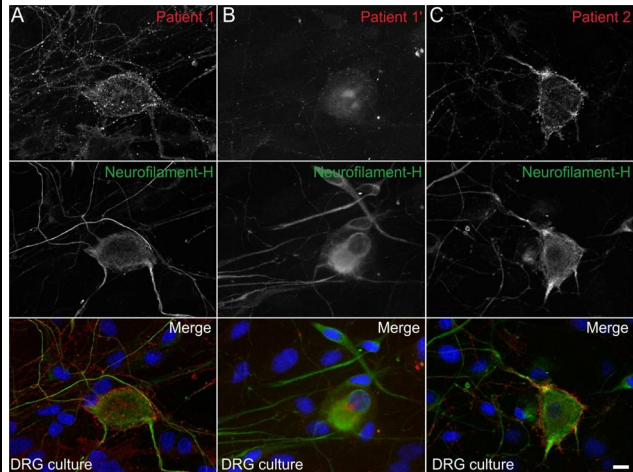


図 5. 培養後根神経節細胞における免疫染色

有痛期患者血清は、細胞体や軸索の細胞膜成分を染色した (A. Patient 1、B. Patient 2)。一方、寛解期血清 (Patient 1') にはほとんど免疫活性はなかった。緑: ニューロフィラメント H、青: DAPI。スケールバー = 10 μ m。

現在、患者血清が反応する抗原が何か、ラット後根神経節から単離を試みているが、これらの患者血清はラット後根神経節可溶性液を用いたウエスタンブロットには使用出来なかった。今後は、同様な患者をより多く集め、患者血清の検討を継続することが重要となってくると思われる。

<引用文献>

Witebsky E, Rose NR, Terplan K, Paine JR, Egan RW: Chronic thyroiditis and autoimmunization. *J Am Med Assoc* 1957, **164**:1439-1447.

Rose NR, Bona C: Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 1993, **14**: 426-430.

Dabby R, Gilad R, Sadeh M, Lampl Y, Watemberg N. Acute steroid responsive small-fiber sensory neuropathy: a new entity? *J Periph Nerv Sys* 2006, **11**: 47-52.

Seneviratne U, Gunasekera S. Acute small fibre sensory neuropathy: another variant of Guillain-Barre syndrome? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002, **72**: 540-542.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yuki N, Chan AC, Wong AHY, Inoue T, Yokai M, Kurihara T, Devaux JJ, Wilder-Smith E. Acute painful autoimmune neuropathy: A variant of Guillain-Barré syndrome. Muscle & Nerve. 2018 Feb;57(2):320-324.
DOI: 10.1002/mus.25738. Epub 2017 Jul 24.
査読有

栗原 崇. Trend & Topics 痛みの分子科学 - 電位依存性 Na⁺チャネル最前線. White - これからの女性医療を考える 通巻第 7 号 (Vol.4 No.2, 42-48, 2016)
http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J0076_0402
査読無

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

栗原 崇
ベッドサイドの薬理学 (笹栗俊之、宮田篤郎 編)、分担項目 (第 IV 編 1 章 1) 鎮痛薬; 1 章 2) 局所麻酔薬; 1 章 3) 全身麻酔薬; 1 章 4) 筋弛緩薬; 第 IV 編 2 章 1) 頭痛治療薬; 2 章 2) 抗めまい薬)、丸善出版、東京、2018 年 3 月 30 日発行. 総ページ数 432 ページ. ISBN: 978-4-621-30274-3

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: PAC1 受容体拮抗薬を用いた鎮痛薬
発明者: 栗原 崇、高崎一朗、豊岡尚樹、合田浩明
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2017-186447
出願年月日: 2017 年 9 月 27 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: 疼痛に関する化合物及び医薬組成物
発明者: 萩原正敏、豊本雅靖、細谷孝充、吉田 優、栗原 崇
権利者: 同上
種類: 特許
番号: US9745275B2
取得年月日: 2017 年 8 月 29 日
国内外の別: アメリカ合衆国

〔その他〕

ホームページ
鹿児島大学生体情報薬理学分野

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~pharmaco/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原 崇 (KURIHARA, Takashi)
鹿児島大学・歯学域医学系・准教授
研究者番号: 60282745

(2) 連携研究者

結城 伸泰 (YUKI, Nobuhiro)
シンガポール国立大学医学部・前教授
研究者番号: 60285913

Einar P. Wilder-Smith 教授
シンガポール国立大学医学部・教授

Jérôme J Devaux
エクス = マルセイユ大学・神経科学研究センター・主任研究員

(3) 研究協力者

福留 学 (FUKUDOME, Gaku)
用皆 正文 (YOUKAI, Masafumi)