

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09776

研究課題名(和文) 中枢神経系自己免疫疾患におけるマクロファージの動態と生物学的意義の解析

研究課題名(英文) Dynamics of innate immune cells per se in autoimmune CNS disorders

研究代表者

河内 泉 (KAWACHI, Izumi)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40432083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：視神経脊髄炎(NMO)は「アクアポリン4(AQP4)抗体による自己免疫」と、その結果起こる「グリア変性・神経変性」を特徴とする中枢神経系自己免疫疾患である。NMOの早期病変には、顆粒球、インターロイキン17産生T細胞、組織在住自然リンパ球、マクロファージが浸潤することで、血液脳関門を破壊し、その結果、AQP4抗体と補体が中枢神経を傷害する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視神経脊髄炎はアクアポリン4自己抗体と補体が関連する中枢神経系自己免疫疾患であり、本邦に多い指定難病の一つである。早期病変にTH17/TC17をはじめとした新たな炎症向性リンパ球・顆粒球と炎症向性マクロファージ・ミクログリアを新たに見出した。同細胞を抑制する分子標的治療の開発に向けた病態基盤の一部を確立したという点で意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neuromyelitis optica (NMO) is an autoimmune CNS disorder, which is characterized by aquaporin-4 water channel (AQP4) autoantibodies. Based on our pathological study using autopsied samples from NMO cases, CNS lesions at initial/early active stages in NMO included some granulocytes, interleukin-17-producing T cells and macrophages. These data suggest that these cells might provide initial signals, which induce entry of AQP4 autoantibodies from the outside of CNS via blood-brain barrier, and contribute active CNS lesions in NMO.

研究分野：神経内科学

キーワード：視神経脊髄炎 多発性硬化症 アストロサイト 自然免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系自己免疫疾患である視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica; NMO) では「AQP4 自己抗体」というエポックメイキングな発見¹以来、NMO の「自己免疫病態」と、その結果として起こる「脳変性 (グリア・神経変性)」に関する知見が集積している (下線は我々の研究成果である)。

(1) NMO の脊髄炎では、早期 (limited form) と晚期 (definite form) の別なく、活性化補体が血管周囲に沈着し、アストロサイト上の AQP4 水チャネル分子が消失する。このため NMO は AQP4 抗体が補体介在性 (complement-dependent cytotoxicity; CDC) にアストロサイトを障害する「アストロサイトパチー」²と考えられている。

(2) 一方で、NMO 発症の 10 年以上前から、AQP4 抗体をもちながらも無症状の症例の報告³から、CDC を介する免疫学的機序 (AQP4 抗体と補体) のみでは NMO の病態を完全に説明できない。これまでに NMO と自然免疫システムについて集積された研究結果は以下である。

① NMO の髄液ではインフラマソーム関連サイトカイン IL-1 β や IL-6 が上昇する²。

② NMO の病巣には、顆粒球、マクロファージ・ミクログリアが集積する^{2,4}。

③ NMO の血中には、IL-6 に依存的に増殖し、AQP4 抗体を産生する plasmablasts (PB) が多数存在し、IL-6 シグナルを遮断する抗 IL-6R モノクローナル抗体治療は NMO の再発を部分的に抑止する⁵。

④ 多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) や免疫介在性肥厚性硬膜炎 (immune-mediated hypertrophic pachymeningitis; HP)⁶ では髄膜に三次 (異所性) リンパ節類似濾胞が存在する。一方、NMO では存在しない⁷。以上から、中枢神経 (central nervous system; CNS) 内に自己免疫現象が隔絶される MS や HP とは異なり、NMO の自己免疫現象は CNS 外で環境から提供される自然免疫シグナルの影響をより強く受けると予想される。

以上から、NMO の免疫病理は (a) AQP4 抗体による CDC を介したアストロサイト障害、(b) AQP4 抗体と顆粒球による antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) を介したアストロサイト障害⁸が中核に位置し、さらに (c) IL-6 や IL-1 β とインフラマソームを介した「自然免疫システムなどの変調」が AQP4 抗体産生を促すなど自己免疫病態を加速させ、発症すると考えることができる。しかし NMO で IL-6、IL-1 β を産生する自然免疫細胞は同定されておらず、NMO で自己免疫病態に影響を与える自然免疫システムの全容は明らかになっていない。

(3) NMO の自己免疫現象の結果、起こる「脳変性」(グリア障害と神経細胞・軸索障害)には二つの形式が存在する。

① 視神経の病変中心部 (AQP4^{negative}/myelin basic protein [MBP]^{negative}) から病変周囲部 (AQP4^{negative}/MBP⁺) に至るまで軸索内に多くの変性ミトコンドリアが蓄積し、軸索腫大・変性を引き起こした結果、重篤な視機能障害に至る形式⁹。

② 大脳皮質に脱髄はないが、皮質 II 層に強い神経細胞脱落と皮質 I 層のアストロサイト上の AQP4 動態が異常となった結果、情報処理速度低下などの認知機能障害に至る形式⁷。

いずれの形式も AQP4 分子の消失に依存的かつ脱髄に非依存的な神経変性であるため、astrocyte-neuron interaction による神経変性機構が想定され、さらに前者①は CDC 依存的に破壊的で重篤な神経変性を起こし、後者②は CDC 非依存的に非破壊性の軽度の神経変性を起こすことから、astrocyte-neuron interaction には脳変性のモード (性質と重み) を変容させる「何らかの修飾因子」が存在すると予想される。MS のモデル動物・実験的自己免疫性脳脊髄炎では、マクロファージ・ミクログリアに由来する炎症シグナルが変性ミトコンドリアを軸索内に蓄積させ、局所的な神経軸索腫大を引き起こし、その変化は早期では可逆的、進行期に非可逆的、脱髄とは非依存的である¹⁰。従って NMO においても「脳変性」のモードを変容させる因子があり、その有力な候補は、「自然免疫システムの変調」であるが、未だに詳細な機序は不明なままである¹¹。

2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえ、我々は次の仮説を提案する。

(1) 「NMO では、AQP4 自己抗体を代表とする自己免疫病態の始動と加速、その結果として生じる神経障害には、マクロファージ、樹状細胞、ミクログリア、顆粒球をはじめとした自然免疫システムの変調が必要である。」

(2) 「AQP4 抗体がアストロサイトにアクセスしやすい環境 (血中の AQP4 抗体が血液脳関門 [BBB] を超えて CNS 実質へ侵入し、その結果、AQP4 抗体がアストロサイトを障害する) に導く未知の免疫細胞が存在する。」

本研究では上記の仮説のもと、(2) に該当する免疫細胞亜集団を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

自然免疫システムは発生学的に 1) common myeloid progenitor (CMP) 由来 myeloid cells (マクロファージ、樹状細胞、顆粒球など) と、2) common lymphoid progenitor (CLP) 由来 lymphoid cells (innate T cells (iT cells) [MAIT, NKT, $\gamma\delta$ T], NK, innate lymphoid cells

[ILCs] など)に大別される。本研究では、CNS病変に浸潤するTリンパ球系列とBリンパ球系列に代表される適応免疫システムの他に、自然免疫システムも含めて包括的に検討した。

- (1) NMOをはじめとした中枢神経系自己免疫疾患を持つ症例の標的臓器(脳、脊髄などの剖検標本)を対象に、自然免疫システムを構成する細胞群(組織在りリンパ球、マクロファージ・ミクログリア、顆粒球など)、適応免疫システムを構成する細胞群(Tリンパ球分画、Bリンパ球分画など)の浸潤動態を、免疫組織学的手法を用いて解析した。各免疫細胞群の同定には、サイトカイン分子とマスターレギュレーター分子の発現を免疫組織化学的手法と *in situ* hybridization 法を用いて解析した。
- (2) NMOのCNS病変を initial lesion (IL), early active lesion (EA), late active lesion (LA), inactive lesion (IA) にステージ分類し、病変ステージ依存的な免疫細胞浸潤パターンを解析した。

4. 研究成果

- (1) 本研究で検討したNMOのCNS(脳、脊髄)全病変では、NMOに特異的な病変である pattern-specific loss of AQP4 immunoreactivity を認めた。活性化補体 C9neo の免疫組織化学では IL/EA ステージ病変において血管周囲の活性化補体沈着を認め、hematoxylin and eosin (HE) 染色で血管壁の肥厚とヒアリン化を認めた。
- (2) NMOのIL/EAステージ病変には著しい炎症細胞浸潤を認めた。好中球を主体とする顆粒球はIL/EAステージ病変に浸潤し、活性化したIba-1⁺ミクログリアとマクロファージは全ステージ病変に認められた。マクロファージ・ミクログリアは各ステージで異なる形態を有していた。リンパ球の表面マーカーの免疫組織化学的解析では、T_H17/T_C17系列細胞と考えられる melanoma cell adhesion molecule (MCAM) 陽性T細胞を認めた。IL/EAステージ病変に浸潤する全CD3⁺T細胞におけるMCAM⁺CD3⁺T細胞が占める割合は、LAステージ病変とIAステージ病変よりも有意に高かった ($P < 0.001$)。MCAMを高度に発現する血管の割合は、IL/EAステージ病変において、LAステージ病変とIAステージ病変よりも有意に高かった ($P < 0.001$)。IL/EAステージ病変ではMCAM陽性T細胞がMCAM陽性血管の外へ遊走する像を認めた。MCAM陽性T細胞の浸潤形態は、T_H17/T_C17系列細胞のマスターレギュレーター分子の発現形態で再認した。組織在り自然リンパ球の一つである V α 7.2⁺IL-18R α ⁺CD3⁺ mucosal-associated invariant T (MAIT) 細胞と、形質細胞の前駆細胞である CD138⁺Ki67⁺ plasmablasts (PB) を全病変ステージで認めた。

NMOのCNS病変では、病変ステージ早期で血管壁のMCAM発現が高く、MCAM陽性T細胞が有意に多く浸潤することを見出した。NMOの病巣にあるT細胞はMCAMを介して実質に浸潤し、IL-17を産生することで好中球を誘導し、好中球がもたらす mediators がBBBを破壊し、CNS外からCNS内へAQP4抗体の流入を許す環境を形成する可能性が示唆された。ANCA関連血管炎では過剰な好中球の活性化シグナルが病変形成に大きな役割を果たすことが知られている¹²。NMOにおいても、AQP4抗体と活性化補体による液性免疫に加え、IL-17/好中球(顆粒球)に特化した免疫シグナルが、CNSの病変形成の始動に関与する可能性がある。

本研究により、NMOの早期脊髄病変には、顆粒球とMCAM陽性T細胞が浸潤し、NMO病巣はT_H17/T_C17に偏位した炎症極性を持つことを明らかにされた。一方、マクロファージ・ミクログリアとMAIT細胞は全病変ステージに認められ、炎症性極性と調整性・修復性極性の両面を有する可能性が推測された。T_H17/T_C17をはじめとした炎症向性リンパ球と炎症向性マクロファージ・ミクログリアを抑制する分子標的治療の開発、並びに、修復向性マクロファージ・ミクログリアや修復向性組織在りリンパ球を促進する分子標的治療の開発の両者により、抗炎症と神経保護・修復治療が完成する。本研究は将来の分子標的治療に向けた病態基盤の一部を確立したという点で意義があると考えられる。

<引用文献>

1. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 2004;364:2106-2112.
2. Yanagawa K, Kawachi I, Toyoshima Y, et al. Pathologic and immunologic profiles of a limited form of neuromyelitis optica with myelitis. *Neurology* 2009;73:1628-1637.
3. Nishiyama S, Ito T, Misu T, et al. A case of NMO seropositive for aquaporin-4 antibody more than 10 years before onset. *Neurology* 2009;72:1960-1961.
4. Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, et al. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 2002;125:1450-1461.
5. Araki M, Matsuoka T, Miyamoto K, et al. Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica: a pilot study. *Neurology* 2014;82:1302-1306.
6. Yokoseki A, Saji E, Arakawa M, et al. Hypertrophic pachymeningitis: significance of myeloperoxidase anti-neutrophil cytoplasmic antibody. *Brain* 2014;137:520-536.
7. Saji E, Arakawa M, Yanagawa K, et al. Cognitive impairment and cortical degeneration in neuromyelitis optica. *Ann Neurol* 2013;73:65-76.
8. Zhang H, Verkman AS. Eosinophil pathogenicity mechanisms and therapeutics in

- neuromyelitis optica. *The Journal of clinical investigation* 2013;123:2306-2316.
9. Hokari M, Yokoseki A, Arakawa M, et al. Clinicopathological features in anterior visual pathway in neuromyelitis optica. *Ann Neurol* 2016;79:605-624.
 10. Nikić I, Merkler D, Sorbara C, et al. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nature medicine* 2011;17:495-499.
 11. Kawachi I, Lassmann H. Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2017;88:137-145.
 12. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature medicine* 2009;15:623-625.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 河内泉	4. 巻 36
2. 論文標題 多発性硬化症に自己抗体の関与はあるか	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1286 ~ 1290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 河内 泉	4. 巻 70
2. 論文標題 増大特集 Antibody Update 2018 傍腫瘍性神経症候群と自己抗体	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BRAIN and NERVE	6. 最初と最後の頁 329 ~ 339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.11477/mf.1416201006	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawachi Izumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Neuropathological features of “non motor” symptoms in multiple sclerosis and neuromyelitis optica	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 161 ~ 168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/cen3.12533	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 4件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Izumi Kawachi
2. 発表標題 Cross-interaction of neuro-immune axis in multiple sclerosis
3. 学会等名 日本神経学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Izumi Kawachi, Etsuji Saji, Mariko Hokari, Akiko Yokoseki, Takahiro Wakasugi, Fumihiro Yanagimura, and Osamu Onodera
2. 発表標題 Double inversion recovery imaging MRI: A good tool to identify optic neuritis lesions in multiple sclerosis and neuromyelitis optica
3. 学会等名 The 70th. Annual meeting of the American Academy of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Izumi Kawachi
2. 発表標題 Up-to-date pathology in NMO
3. 学会等名 19th International Congress of Neuropathology (ICN2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumihiro Yanagimura, Etsuji Saji, Takahiro Wakasugi, Yasuko Toyoshima, Akiyoshi Kakita, Hitoshi Takahashi, Osamu Onodera, Izumi Kawachi
2. 発表標題 Radiological, immunological, and pathological analysis of ependymal cells in neuromyelitis spectrum disorders
3. 学会等名 19th International Congress of Neuropathology (ICN2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumihiro Yanagimura, Etsuji Saji, Takahiro Wakasugi, Mariko Hokari, Yasuko Toyoshima, Akiyoshi Kakita, Hitoshi Takahashi, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera, Izumi Kawachi
2. 発表標題 Dynamics of tissue regulatory T cells in Neuromyelitis optica spectrum disorders lesions
3. 学会等名 The 33rd Congress of The European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Etsuji Saji, Mariko Hokari, Akiko Yokoseki, Takahiro Wakasugi, Fumihiro Yanagimura, Kaori Yanagawa, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera, and Izumi Kawachi
2. 発表標題 Double inversion recovery MRI in the evaluation of the anterior visual pathway in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorders
3. 学会等名 The 33rd Congress of The European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Izumi Kawachi, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera
2. 発表標題 Current topics of myelin biology and beyond: Up-to-date knowledge on pathomechanism of MS and related disorders
3. 学会等名 第60回神経化学学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Izumi Kawachi, Takahiro Wakasugi, Etsuji Saji, Fumihiro Yanagimura, Kaori Yanagawa, and Osamu Onodera
2. 発表標題 Characteristic features of longitudinal cognitive function in a Japanese cohort of MS
3. 学会等名 8th Annual Meeting of the International MS Cognition Society (IMSCOGS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yanagimura F., Saji E., Wakasugi T., Hokari M., Toyoshima Y., Nakajima T., Takahashi H., Kakita A., Nishizawa M., Onodera O., Kawachi I.
2. 発表標題 Characterization of inflammatory axis of CNS lesions in neuromyelitis optica spectrum disorders
3. 学会等名 The 35th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Izumi Kawachi
2. 発表標題 神経学と免疫学のクロストークから読み解く神経疾患 - 多発性硬化症から認知症まで
3. 学会等名 NEUARO 2019, 第42回日本神経科学大会, 第62回日本神経化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumihito Yanagimura, Etsuji Saji, Takahiro Wakasugi, Mariko Hokari, Osamu Onodera, Izumi Kawachi.
2. 発表標題 Differential dynamics of mucosal-associated invariant T cells in the blood and the CNS lesions of patients with neuromyelitis optica
3. 学会等名 第47回日本免疫学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 河内泉, 他 (鈴木則宏 シリーズ監修 / 吉良潤一 編著)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 445
3. 書名 神経内科Clinical Questions & Pearls 中枢脱髄性疾患	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	豊島 靖子 (TOYISHIMA Yasuko) (20334675)	新潟大学・脳研究所・准教授 (13101)	