

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2007～2009

課題番号：19209032

研究課題名（和文）視神経脊髄型多発性硬化症の病態解明と新たな疾患概念と治療法の確立

研究課題名（英文） Optic-spinal multiple sclerosis: clarification of pathogenesis, establishment of new disease entity and treatment

研究代表者

系山 泰人 (ITOYAMA YASUTO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30136428

研究成果の概要（和文）：視神経脊髄型多発性硬化症 (OSMS) は、重症の視神経炎と横断性脊髄炎を繰り返す神経難病であり、視神経脊髄炎 (NMO) と同一疾患と考えられる。本研究は、本疾患に特異なアкваポリン 4 (AQP4) 抗体の発見に伴い、3 椎体以上の長い脊髄病変などの臨床的特徴を明らかにし、AQP4 抗体の病原性とアストロサイトパチーとしての本疾患の新たな疾患概念を確立し、また血漿交換や免疫抑制剤による治療法の有効性を証明した。

研究成果の概要（英文）：Optic-spinal multiple sclerosis (OSMS) is an intractable neurologic disease characterized by recurrent severe optic neuritis and transverse myelitis, and is essentially identical to neuromyelitis optica (NMO). Based on the discovery of aquaporin 4 (AQP4) antibody, an OSMS/NMO-specific autoantibody, the present study clarified its clinical features including longitudinally extended myelitis (> 3 vertebral segments), established pathogenicity of AQP4 antibody and the new clinical entity as astrocytopathy, and proved therapeutic efficacy of plasma exchange and immunosuppression in the disease.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 12,200,000 | 3,660,000 | 15,860,000 |
| 2008 年度 | 10,400,000 | 3,120,000 | 13,520,000 |
| 2009 年度 | 8,900,000 | 2,670,000 | 11,570,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 31,500,000 | 9,450,000 | 40,950,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経病態免疫学

キーワード：多発性硬化症、脱髄疾患、視神経脊髄炎、脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄型多発性硬化症 (optic-spinal multiple sclerosis, OSMS) は、視神経炎と横断性脊髄炎のみを繰り返す重篤な免疫性神経難病である。OSMS は欧米の視神経脊髄炎

(Neuromyelitis Optica, NMO) と共通点が多いがその疾患概念の異同は長らく議論の的となってきた。OSMS/NMO は欧米諸国に比べて日本を含めたアジア諸国で多くみられ重要な疾患である。従来 OSMS は中枢神経内に病

変が播種する古典的 MS(classical MS, CMS)と臨床的相違点が指摘されながら、類似の治療をされてきた。2004年に我々は米国メイヨークリニックとともに日本の OSMS, 北米の NMO 症例の 60~80%に特異的に検出され、CMSには全くみられない自己抗体(NMO-IgG)を発見した(Lancet, 2004)。その後我々は鋭敏な AQP4 抗体の測定系を確立し、また剖検例における病理学的解析により本疾患の病変部位における AQP4 の消失を報告した。

2. 研究の目的

本研究は、私共の研究による OSMS/NMO の疾患特異的抗体 NMO-IgG とその後の標的抗原アクアポリン 4(AQP4)の発見に伴い、本疾患の新たな疾患概念を確立し、また適切な治療法を確立するのが研究目的である。

(1) OSMS/NMO の病態解明

①抗 AQP4 抗体の検出系を用いた解析 -病態、診断、治療における意義-

②NMO 病変における AQP4 消失に関する免疫組織病理学的解析 -脱髄疾患である CMS との病態比較-

③抗 AQP4 抗体の細胞障害性と培養アストロサイトに及ぼす影響の検討~細胞障害メカニズムの解明~

(2) 新たな疾患概念の確立

①OSMS のサブグループの解析~OSMS はさらに典型的 NMO と CMS 的症例に分類されるか? ~

②NMO, CMS の脊髄 MRI 病変の比較解析~従来行われていない軸断面における病変分布の検討~

③Quality of Life (QOL) の経時的検討~QOL からみた CMS と異なる OSMS の特徴を明らかにする~

(3) OSMS の治療法の確立

①OSMS の早期診断、治療指針の構築

3. 研究の方法

(1) 抗 AQP4 抗体の検出系を用いた解析

抗 AQP4 抗体アッセイ系: 成人ヒト小脳 cDNA library から AQP4 cDNA を増幅しクローニングする。次に Human embryonic kidney cells (HEK-293) に対して pTarget™ を用いて AQP4 のトランスフェクションを行う。得られた安定な細胞株を geneticin を用いて選択する。AQP4 トランスフェクション後は 30~40% の細胞が間接蛍光抗体法で陽性に染色される。ベクターのみの細胞は染色されない。血清を AQP4 あるいはベクターのみをトランスフェクトした HEK-293 細胞に添加し、反応後に蛍光色素 (FITC) で標識したウサギ抗ヒト IgG 抗体を添加して細胞を固定し蛍光顕微鏡下で染色性を観察する。二重染色では、さらにヤギ抗ヒト AQP4 抗体を添加し、ローダミン標識ヤギ抗ウサギ IgG を加え、共焦点顕微

鏡下で染色性を比較し陽性、陰性の判定を行う。陽性検体では 4 倍から連続的に 2 倍希釈して、陽性となる最大の希釈倍率を抗体価とする。

①病型と抗体検出頻度の関連性の分析

凍結血清を用いて検討する。

すなわち診断基準に適合する NMO

(Fulfilling all items of 2006 NMO criteria except for NMO-IgG seropositive status)、NMO の High Risk Syndrome(1. Recurrent optic neuritis without brain lesions. 2. Myelitis with ≥ 3 vertebral segments spinal cord lesions with or without brain lesions. 3. Optic neuritis and/or myelitis without ≥ 3 VS spinal cord lesions with NMO-specific brain (symmetric diffuse white matter lesions, diencephalic lesions, periaqueductal lesions のいずれか)、MS (Clinically definite MS by Poser's criteria except NMO and high-risk syndrome)、Clinically Isolated Syndrome (CIS) (Cases with single clinical episode without ≥ 3 VS spinal cord lesions) 及び他疾患群における抗 AQP4 抗体の検出頻度や抗体価を求める。

②抗 AQP4 抗体と NMO-IgG の感度の比較検討
既に NMO-IgG の結果が得られている検体について抗 AQP4 抗体の有無を検査し、NMO-IgG が陽性となる抗 AQP4 抗体価の閾値の有無を解析する。また抗体価と臨床的特徴の関連についても検討する。

③血清と髄液中の抗体価の比較解析
抗 AQP4 抗体の血清抗体価と髄液抗体価を比較する。血清、髄液中の抗 AQP4 抗体とアルブミンとの比を算出する。

④OSMS/NMO の脳病変と抗体価との関連解析
抗 AQP4 抗体の抗体価と脳病変を呈する OSMS/NMO 症例との関連を検討する。

(2) NMO 病変における AQP4 消失に関する免疫組織病理学的解析

剖検例を用いて以下の検討を行う。

①H-E、ミエリン、軸索染色による脱髄、壊死性病変、灰白質病変、顆粒球浸潤などの比較、

②病変の血管周囲への免疫グロブリン (IgG, IgM)、活性化補体 (C9neo) 沈着

③AQP4, GFAP, MBP などの発現と上記所見との関連

(3) AQP4 抗体の細胞障害性と培養アストロサイトに及ぼす影響の検討

ヒト AQP4 発現 HEK293 細胞あるいは AQP4 発現アストロサイトを 96 well 培養プレートで培養し、AQP4 抗体を含む精製 IgG を単独あるいはウサギ補体と共に添加し、細胞の変化を顕微鏡下に観察した。また細胞障害性を LDH アッセイで測定した。

(4) OSMS のサブグループの解析

OSMS の中に NMO に特徴的な 3 椎体以上の長い脊髄病変を有するか否かで分類し、NMO 的な症例と CMS に類似の特徴を持つ症例がどのような割合であるか解析する。

(5) NMO, CMS の脊髄 MRI 病変の比較解
両病型(各々n=20)の axial section での脊髄病変をコンピューター上で重層し病変分布の差異を解析する。

(6) Quality of Life (QOL) の経時的検討
OSMS/NMO, CMS 症例例において 6 ヶ月ごとに QOL 調査 (SF-36, FAMS, EQ-5D) を実施し、日本人の対照群と比較する。また 2 年間の経時的変化を追跡する。

(7) OSMS の治療
国内外の OSMS/NMO の治療成績を総合的に検討し、早期診断、適切な治療法の開発を行い、OSMS の診療体制を構築する

4. 研究成果

(1) AQP4 をトランスフェクした HEK-293 細胞を用いて AQP4 抗体の有無を測定した。

① NMO 及びその High Risk Syndrome では約 90% の症例で AQP4 抗体陽性だったが、MS その他の疾患は全例陰性だった。

AQP4 抗体値は寛解時に比べ再発時で高く、ステロイドパルス療法、血漿交換療法、ステロイドやイムランの長期投与により低下した。また一部の症例ではこれらの免疫抑制療法により陰性化した。ただし、抗体価自体は症例により低価から高価のものまで様々だった。

② AQP4 抗体陽性検体の中に NMO-IgG 陰性のも
のがある (64x, 2048x)、AQP4 抗体検査のほう
が感度が高いことが明らかになった。

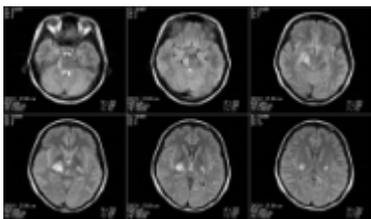
③ AQP4 抗体の血清抗体価が 500 倍以上の場合
に限って髄液抗体価はその 1/500 程度の値で
検出された。したがって AQP4 抗体は患者の
髄空内では産生されていないと推測された。

④ AQP4 抗体価が高い症例で広範な脳病変が
みられる傾向があった。

視神経炎及び脊髄炎の既往のない脳病変
を呈する症例で陽性例が見つかった。すなわ
ち AQP4 抗体陽性症例は病変分布のみでは定
義されないことがわかった。

なお OSMS/NMO に特徴的な脳病変としては、
両側性の症候性視床下部病変、長軸方向に長
く進展する病変(下の図 1)、延髄の中心管周
囲病変、脳室周囲病変や浮腫性の著明な脳
梁病変等がみられた。

図 1. 長軸方向に長く進展する病変



(2) OSMS の神経病理学的所見の解析

① 脊髄中心灰白質を中心に AQP4 と GFAP の高
度の欠失があり、それに比べて MBP の染色性
は比較的保持されていたことから、OSMS/NMO
はアストロサイトの高度の傷害が特徴であり、
脱髄は二次性の病変であることが推察され
た。したがって NMO は脱髄が一次性病変で
ある MS と根本的に異なる疾患概念であると
考えられた。一部の病変では顆粒球の侵潤が
著明だった。なお、OSMS/NMO の急性増悪期
には髄液中でアストロサイトのマーカーであ
る GFAP 濃度が著明に上昇していた。しかし
このような上昇は CMS では見られなかった。
これも OSMS/NMO におけるアストロサイトパ
チーを示唆する所見と考えられた。

② OSMS/NMO の典型的病変を以下に示す。

図 2. OSMS/NMO 病変の病理組織学的所見

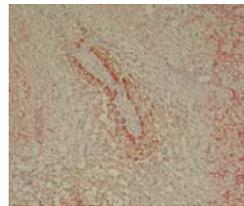


図 2 では液性因子沈着血管周囲での AQP4 消
失であり、図中央の血管壁は IgG, C9neo が
沈着(茶色)しているが、AQP4 はこの血管周
囲では染色されず、さらにその周辺領域でピン
クにメッシュ状に染色されている。

③ OSMS/NMO 病変では、上記の液性因子沈着血
管周囲で AQP4 のみならず GFAP も広範に消
失していたが、MBP の染色性は比較的保持さ
れていた。AQP4 の欠失は GFAP の欠失よりも
広範だった。

(3) AQP4 を発現させた培養アストロサイトに
AQP4 抗体と補体を添加すると細胞が膨化し
その後破裂した。これに伴い LDH の上昇がみ
られた。

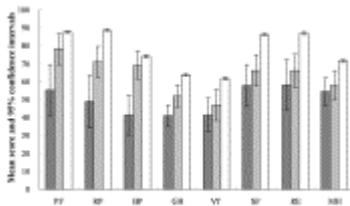
一方、AQP4 抗体のみでは細胞膜上で AQP4 が
クラスターを形成し、その後細胞内に飲み込
まれていった。またそれと共にアストロサイ
トの胞体が著明に収縮し、培養液中に浮遊し
た。したがってこのようなアストロサイトは
細胞死には至っていないが、接着性を失っ
ておりもはや正常の機能を果たしていないこ
とが推測された。

(4) OSMS の中では、長い脊髄病変を持つ NMO
の症例と短い脊髄病変を有する MS の症例が
あり、近年後者が増加傾向であった。

(5) NMO と MS の MRI 脊髄病変のコンピュー
ター解析により NMO 病変は中心灰白質に主
に分布していたが、MS 病変は白質にみられ
た。

(6) QOL 調査として SF-36 を実施し、NMO
では MS よりさらに QOL の低下が著しいこ
とが明らかになった。また NMO では特に痛
みに関する

QOLの低下が著しいことがわかった(図3)。



上の図3はSF-36の結果である。OSMS/NMO(black bar)とCMS(gray bar)は対照群(white bar)に比べて、身体機能、体の痛みをはじめ全8項目で点数の有意な低下がみられる。またOSMS/NMOはCMSよりさらにQOLが低下している傾向がみられる。

(7)治療については、急性期には、まずステロイドパルス療法を施行するがそれが無効の場合、血漿交換療法はできるだけ早期に実施したほうが臨床的改善に関する有効性が高いことがわかった。またステロイドの長期投与により年間再発率が1.0から0.15程度に著明低下することがわかった。その他、イムランやシクロスポリンなど種々の免疫抑制剤やリツキシマブ(CD20モノクローナル抗体)が再発予防に有効であることがわかった。

臨床及びMRIその他の検査所見とAQP4抗体検査から早期診断を行い、これらの治療を速やかに施行することによりOSMS/NMOの予後の改善が期待される。

なお、我々はOSMS/NMOの発症前に献血を行っていた症例の発症前の血清のAQP4抗体を検査し、発症10年前からAQP4抗体が陽性であることを報告した。最近の実験的研究によりAQP4抗体の病原性が証明されているが、これと本症例の知見を総合すると、OSMS/NMOの発症には十分な量のAQP4抗体が血液脳関門を通過して中枢神経組織内に漏出し、アストロサイトの足突起表面にあるAQP4と結合し補体を活性化することが必要と思われる。この血液脳関門の破たんを誘発するイベントが何であるかは不明だが、治療学的観点からみるとOSMS/NMOの発症あるいは再発予防には、AQP4抗体を枯渇させるか、あるいは血液脳関門の破たんを予防することが必要と考えられる。

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58件)

①Misu T, Fujihara K, Kakita A, Konno H, Nakamura M, Watanabe S, Takahashi T,

Nakashima I, Takahashi H, Itoyama Y. Loss of aquaporin-4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain*, 130:1224-1234, 2007. 査読有

②Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I, Misu T, Miyazawa I, Nakamura M, Watanabe S, Shiga Y, Kanaoka C, Fujimori J, Sato S, Itoyama Y. Anti-aquaporin-4 antibody is involved in the pathogenesis of NMO: a study on antibody titer. *Brain*, 130:1235-1243, 2007. 査読有

③Nakashima I, Fukazawa T, Ota K, Nohara C, Warabi Y, Ohashi T, Miyazawa I, Fujihara K, Itoyama Y. Two subtypes of optic-spinal form of multiple sclerosis in Japan: clinical and laboratory features. *J Neurol*, 254:488-492, 2007. 査読有

④Nakashima I, Fujinoki M, Fujihara K, Kawamura T, Nishimura T, Nakamura M, Itoyama Y. Alteration of Cystatin C in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 62:197-200, 2007. 査読有

⑤Watanabe S, Misu T, Miyazawa I, Nakashima I, Shiga Y, Fujihara K, Itoyama Y. Low-dose corticosteroids reduce relapses in neuromyelitis optica: a retrospective analysis. *Mult Scler*, 13:968-974, 2007. 査読有

⑥Watanabe S, Nakashima I, Misu T, Miyazawa I, Shiga Y, Fujihara K, Itoyama Y. Therapeutic efficacy of plasma exchange in NMO-IgG-positive patients with neuromyelitis optica. *Mult Scler*, 13:128-132, 2007. 査読有

⑦Nakamura M, Miyazawa I, Fujihara K, Nakashima I, Misu T, Watanabe S, Takahashi T, Itoyama Y. Preferential spinal central gray matter involvement in neuromyelitis optica: an MRI study. *J Neurol*, 255:163-170, 2008. 査読有

⑧Misu T, Takano R, Fujihara K, Takahashi T, Sato S, Itoyama Y. Marked Increase of CSF GFAP in neuromyelitis optica—an astrocytic damage marker. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 80:575-577, 2009. 査読有

⑨Nakamura M, Misu T, Fujihara K, Miyazawa I, Nakashima I, Takahashi T, Watanabe S, Itoyama Y. Occurrence of acute large and edematous callosal lesions in neuromyelitis optica. *Mult Scler*, 15:695-700, 2009. 査読有

⑩Nishiyama S, Ito T, Misu T, Takahashi T, Kikuchi A, Suzuki N, Jin K, Aoki M, Fujihara K, Itoyama Y. A case of NMO seropositive for aquaporin-4-antibody

over 10 years before the onset. Neurology, 72:1960-1961, 2009. 査読有

①Bradl M, Misu T, Takahashi T, Watanabe M, Mader S, Reindl M, Adzemovic M, Bauer J, Berger T, Fujihara K, Itoyama Y, Lassmann H. Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. Ann Neurol, 66:630:643, 2009. 査読有

[学会発表] (計 27 件)

①糸山泰人, 会長講演: 多発性硬化症の研究を通して学んだこと. 第 50 回日本神経学会総会、仙台、平成 21 年 5 月 20 日.

②糸山泰人, 教育講演: 多発性硬化症と視神経脊髄炎: 病態解明と治療法の確立、第 50 回日本神経治療学会総会、仙台、平成 21 年 6 月 11 日.

③Fujihara K. Neuromyelitis optica (NMO): Astrocytic damage in its pathogenesis. European Charcot Foundation Symposium 2009、リスボン(ポルトガル)、平成 21 年 11 月 14 日.

[図書] (計 6 件)

①藤原一男. IV 疾患別各論 脳疾患 多発性硬化症と視神経脊髄炎. 神経疾患最新の治療 2009-2011 小林祥泰、水澤英洋編. pp143-147、南江堂、2009.

②藤原一男. 多発性硬化症 (MS) と視神経脊髄炎 (NMO) の治療の進歩. Annual Review 神経 2009. 柳澤信夫、篠原幸人、岩田 誠、清水輝夫、寺本 明編. pp203-210、中外医学社、2009.

③三須建郎、藤原一男、糸山泰人. NMO に対する最新の治療法は. EBM 神経疾患の治療 2009-2010 (第 1 版). 岡本幸市、棚橋紀夫、水澤英洋編. Pp416-421、中外医学社、2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ms.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

糸山 泰人 (ITOYAMA YASUTO)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 30136428

(2) 研究分担者

藤原 一男 (FUJIHARA KAZUO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 70280873

中島 一郎 (NAKASHIMA ICHIRO)

東北大学・病院・助教

研究者番号: 50333810

三須 建郎 (MISU TATSURO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 00396491