

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07997

研究課題名(和文)日本人多発性硬化症での疾患修飾薬による進行性多巣性白質脳症多発機序の解明と防止

研究課題名(英文)Elucidation and Prevention of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy Induced by Disease-Modifying Drugs in Japanese Patients with Multiple Sclerosis

研究代表者

河野 祐治 (Kawano, Yuji)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：20333479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症(MS)では、疾患修飾薬に伴う免疫抑制状態により進行性多巣性白質脳症(PML)を生じる例があり、大きな問題になっている。本研究では、日本人MSで疾患修飾薬によるPML発症が多い理由の解明、PML発症リスク因子の同定を目指した。その結果、HLAの一つを持った患者では抗JCV抗体の陽性率および抗体価が低く、また別のHLAでは抗体価が高いことや、フィンゴリモド使用者では抗JCV抗体の抗体価が高く、治療歴が長いほど抗体価も高いこと、多変量ロジスティック解析では年齢、HLAが抗体陽性率に関与していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療が進歩し、多くの病気の治療法が開発され、大きな成果をあげている。その一方で、治療に伴う新たな疾患の発症が問題になっている。多発性硬化症ではフィンゴリモド(多発性硬化症再発抑制薬)による進行性多巣性白質脳症(PML、しばしば致死性になる)発症が問題になっている。本研究では、JCVの原因ウイルスに対する抗体価(ウイルスが体内に存在することの指標)には年齢とHLAの関与が大きいことを明らかにした。したがって、予めリスクの大きい患者に対しては、別の治療法の選択や、嚴重なPML発症管理により治療継続できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) is a major problem in multiple sclerosis (MS) due to the immunosuppressive state caused by disease-modifying drugs. In this study, we aimed to elucidate the reasons why PML is frequently caused by disease-modifying drugs in Japanese MS and to identify risk factors for PML. We found that patients with one HLA had lower anti-JCV antibody positivity and antibody titer, while those with another HLA had higher antibody titer, and that antibody titer was higher in fingolimod users with a longer treatment history, and that age and HLA were related to antibody positivity by multivariate logistic analysis.

研究分野：神経免疫学

キーワード：多発性硬化症 進行性多巣性白質脳症 疾患修飾薬

1. 研究開始当初の背景

(1) John Cunningham virus (JCV)は健常人の約70%で抗体が陽性で、ほとんどの人が幼少期に経口ないし経気道的に感染し、最初のウイルス複製は扁桃で起こると考えられている。その後Bリンパ球を介して腎臓、脾臓、骨髄などに拡がり、そこで潜伏感染をしている。健常者でも尿中からJCVが検出されることがあるが、その複製の制御には細胞性免疫が大きく関わっている。癌化学療法、後天性免疫不全症(AIDS)、自己免疫疾患などの免疫不全状態において、細胞性免疫によるウイルス複製抑制が障害されることで再活性化され、進行性多巣性白質脳症(progressive multifocal leukoencephalopathy, PML)を発症する。

(2) 多発性硬化症(multiple sclerosis, MS)では、疾患修飾薬による再発抑制療法が普及する一方で、治療に伴う免疫抑制状態によりPMLを生じることが大きな問題になっている。特に日本人ではフィンゴリモド使用患者で欧米人の約10倍高いPMLの発症がみられ(世界的には1人/18,000人に対して日本人MSは1人/1800人, $p < 0.05$), 重大な関心事となっている。しかし、その理由は全く不明である。最近、日本人MSでは、フィンゴリモド使用が長くなるとJCV抗体価が高くなると指摘されたが(Aoyama S, et al, J Neurol, 2018)、欧米人ではむしろ低くなるとの報告もあり、一定した見解に至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、日本人MSで疾患修飾薬によるPML発症が多い理由の解明、PML発症リスク因子の同定と発症予測バイオマーカーの確立を目的とする。具体的には以下の問題についての検討を行う。

- (1) JCV感染に感受性や抵抗性を付与する遺伝因子は何か
- (2) HLA多型を含めてどのような機序でJCVに対する細胞性免疫の効率が決まっているのか
- (3) フィンゴリモド等の疾患修飾薬はJCVに対する免疫機構のどこに作用するのか
- (4) MS患者でPML発症に寄与するリスクと発症を予測するバイオマーカーは何か
- (5) 免疫に抵抗するウイルス側の要因は何か

3. 研究の方法

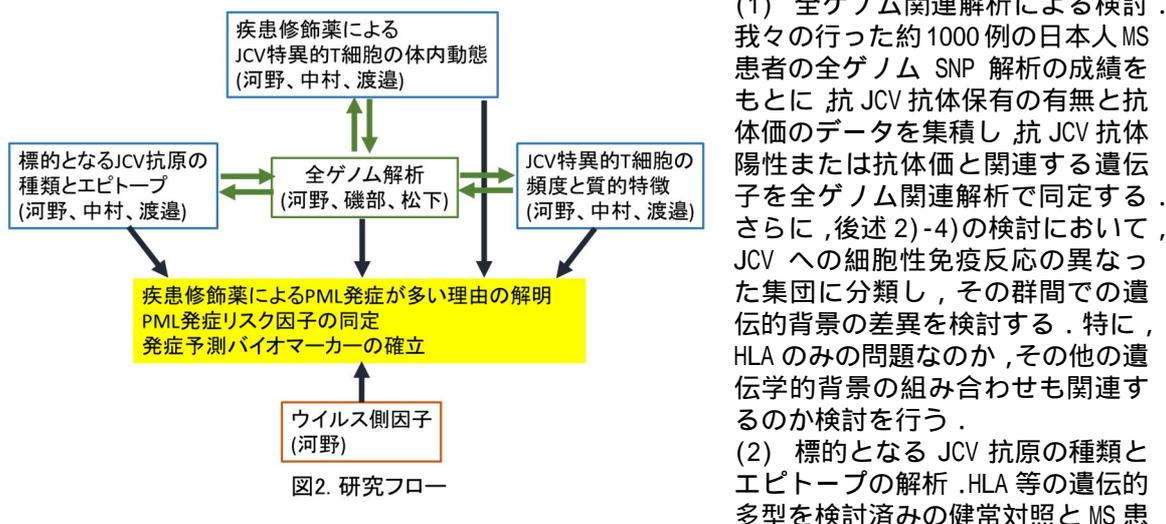


図2. 研究フロー

者において、ペプチドライブラリをB細胞にパルスし、T細胞が反応するペプチドを選択する。さらに抗体に関しても同様にエピトープを検討する。

(3) JCV特異的T細胞の頻度及びJCV特異的T細胞の質的特徴の検討。HLA等の遺伝的多型を検討済みの健常対照とMS患者において、CD4、CD8それぞれにおいて、MHC multimerを使ったフローサイトメーター、T細胞レセプター再構成部位を標的とした定量PCR、及びELISPOTにて解析する。エピトープペプチドをパルスしたB細胞を標的とし、それによって活性化されたT細胞から放出されるサイトカインをフロービーズアレイにて解析する。併せて、そのT細胞の表面活性化マーカーをフローサイトメトリー法にて解析する。

(4) 疾患修飾薬によるJCV特異的T細胞の体内動態への影響の検討。上記3)をMS患者の疾患修飾薬開始前と開始後定期的に、さらに再発時および再発からの回復期に検討する。

(5) ウイルス側因子の検討。上記3)4)の患者及び健常対照の尿中及び血液中のウイルスをCOS-7細胞で培養増殖させ、そのウイルスDNAをベクターにクローニングする。検体が集まった段階で配列の解析や配列の変異の解析、培養細胞中での増殖能、エピトープ内に変異のあった場合は、その変異エピトープに対するT細胞の反応性の検討を行う。

4. 研究成果

(1) JCV に対する免疫機構,特に細胞性免疫能が低い集団で多い遺伝因子が感受性を付与する遺伝因子であり,それを保有するものでは JCV に対する細胞性免疫の効率が低くなる. という仮説に関して,全ゲノム関連解析の前段階として,細胞性免疫応答に強く関連した HLA 多型と,液性免疫反応の結果である抗 JCV 抗体の陽性率および抗体価,それに,疾患修飾薬としてフィンゴリモド使用との関連を解析した.その結果 MS でよく見られる HLA の一つ(DRB1*04)を持った患者では抗 JCV 抗体の陽性率および抗体価が低く(図 1),また別の HLA を保つ場合は反対に陽性率が高いこと,さらに別の HLA (DRB1*15)では抗体価が高いこと(図 2)や,フィンゴリモド使用者では抗 JCV 抗体の抗体価が高く,治療歴が長いほど抗体価も高い(図 3)ことなどを明らかにした.さらに,多変量

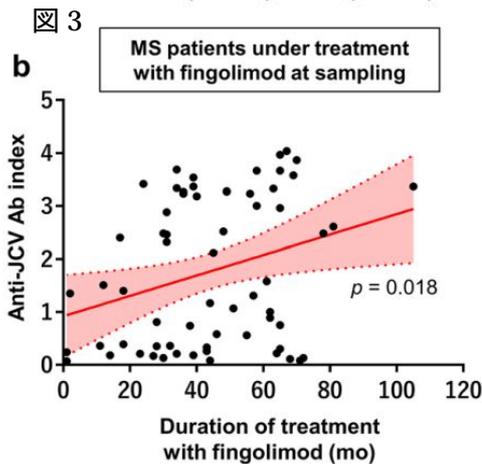
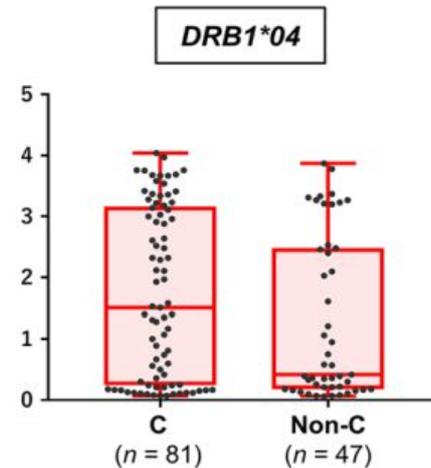
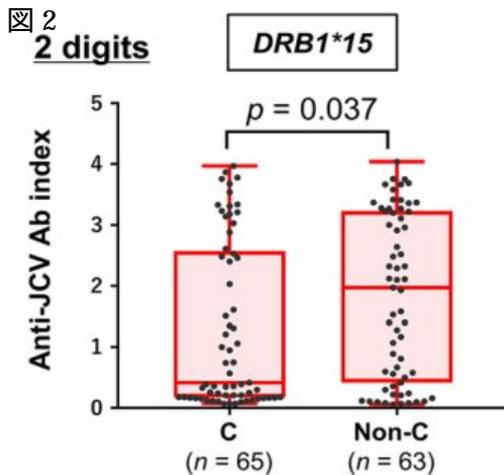
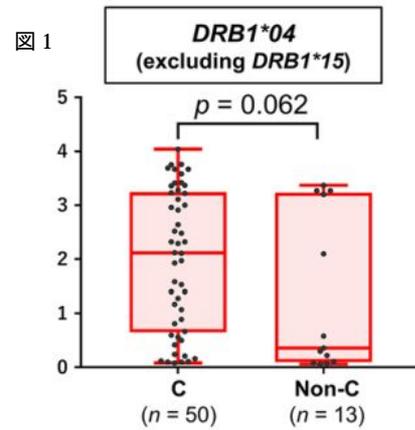


Table 4 Multivariate logistic regression analysis of factors contributing to anti-JCV antibody positivity in patients with MS

All participants (n = 128)	OR (95% CI)	p value
Age	1.06 (1.02–1.10)	0.006
HLA-DRB1*15	0.37 (0.16–0.90)	0.028
Sex (male)	1.59 (0.63–4.00)	0.321
Fingolimod usage at sampling	1.76 (0.52–5.89)	0.361
Lymphocyte count (× 1000/μL)	1.14 (0.47–2.79)	0.771
HLA-DRB1*04	0.92 (0.39–2.19)	0.850

CI confidence interval, HLA human leukocyte antigen, JCV JC virus, MS multiple sclerosis, OR odds ratio

Table 5 Multivariate logistic regression analysis of factors contributing to anti-JCV antibody positivity in patients with MS excluding carriers of HLA-DRB1*15

Patients without HLA-DRB1*15 (n = 63)	OR (95% CI)	p value
HLA-DRB1*04	5.50 (1.26–23.94)	0.023
Age	1.04 (0.98–1.11)	0.149
Fingolimod usage at sampling	2.40 (0.33–17.32)	0.384
Sex (male)	1.78 (0.38–8.46)	0.467
Lymphocyte count (× 1000/μL)	0.85 (0.20–3.66)	0.832

CI confidence interval, HLA human leukocyte antigen, JCV JC virus, MS multiple sclerosis, OR odds ratio

ロジスティック解析を行い,年齢,HLA が抗体陽性率に関連していることがわかった.(Table 4,5)

(2) 引き続き,標的となる JCV 抗原の種類とエピトープの解析.JCV 特異的 T 細胞の頻度及び JCV 特異的 T 細胞の質的特徴の検討.疾患修飾薬による JCV 特異的 T 細胞の体内動態への影響の検討,を行った.

具体的には,fingolimod 使用中,未使用それぞれの MS 患者の末梢血免疫細胞のフローサイトメトリーを行い,免疫細胞のサブポピュレーションと抗 JCV 抗体の関連をみてきた.さらに,標的となる JCV 抗原の種類とエピトープの解析,JCV 特異的 T 細胞の頻度及び JCV 特異的 T 細胞の質的特徴の検討についても検体収集し,データを蓄積してきた.しかし,fingolimod 使用中の患者の末梢血のリンパ球数が非常に少ないことが災いし,免疫細胞のサブポピュレーションの十分な解析が困難な例が多く,また JCV 特異的 T 細胞の解析のための末梢血からの T 細胞分離でも十分な T 細胞の確保が難しかった,さらに JCV 特異的 T 細胞頻度がもともと低いために,MHC

テトラマーによるフローサイトメトリー法では 特異的 T 細胞が検出できず, ELISPOT でも検出が非常に困難であった. そのため, 結果的には年齢, HLA が抗体陽性率に関連していることがわかったが, T 細胞の関与は十分には検討できなかった

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Mitsuru, Nakamura Yuri, Isobe Noriko, Tanaka Masami, Sakoda Ayako, Hayashi Fumie, Kawano Yuji, Yamasaki Ryo, Matsushita Takuya, Kira Jun-ichi	4. 巻 17
2. 論文標題 Two susceptible HLA-DRB1 alleles for multiple sclerosis differentially regulate anti-JC virus antibody serostatus along with fingolimod	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12974-020-01865-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe M. Nakamura Y. Sato S. Niino M. Fukaura H. Tanaka M. Ochi H. et al	4. 巻 11
2. 論文標題 HLA genotype-clinical phenotype correlations in multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorders based on Japan MS/NMOSD Biobank data	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79833-7	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0件

〔図書〕 計0件

〔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	松下 拓也 (Matsusita Takuya) (00533001)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	渡邊 充 (Watanabe Mitsuru) (30748009)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	中村 優理 (Nakamura Yuri) (40822375)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	磯部 紀子 (Isobe Noriko) (60452752)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関