

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870477

研究課題名(和文)Fingolimodは重症筋無力症の治療となりうるか？

研究課題名(英文)Can fingolimod be treatment strategy for myasthenia gravis？

研究代表者

松井 尚子 (MATSUI, Naoko)

徳島大学・大学病院・診療支援医師

研究者番号：10547954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：Fingolimodが胸腺からのT細胞のアウトプット(=recent thymic emigrant, RTE)に及ぼす影響について検討した。

多発性硬化症患者ではFingolimod服用の1カ月後よりRTEが減少し、1年後もRTEは減少していた。RTEにおけるS1P1のmRNA発現量は、Fingolimod内服前後で大きな変化を認めなかった。Fingolimodはスフィンゴシン1リン酸受容体S1P1作動薬で2次リンパ節のみならず胸腺でもリンパ球の移動に関係する。Fingolimodが、T細胞のアウトプットを調整することで、重症筋無力症患者において胸腺摘出術に変わる治療となりえる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：We aimed to examine the effect of fingolimod on recent thymic emigrant (RTE). Peripheral blood mononuclear cells were obtained from 4 healthy subjects and 10 patients with multiple sclerosis (MS). Blood sampling for the patients with MS was performed before and after the administration of fingolimod (in 1, 6, and 12 months). CD3+CD4+ T, naive T (CD45RA+, CD45RO-), and memory T cells (CD45RA-, CD45RO+) were identified by FACS. We also analyzed naive T's expression of CD31, a surrogate marker of RTE. The frequency of memory T cells was relatively increased, but that of RTE was decreased in MS. Effect of fingolimod on RTE continued over one year. Fingolimod act as a potent antagonist at sphingosine 1-phosphate receptor type 1 (S1P1) on lymphocytic emigration from secondary lymphoid organs as well as thymus. In myasthenia gravis (MG), removal of thymus results in RTEs. We speculate that fingolimod have a possibility of the pharmacological effect similar to thymectomy.

研究分野：神経免疫

キーワード：重症筋無力症 Fingolimod 胸腺

1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症 (Myasthenia Gravis, MG) の大部分は、神経筋接合部のアセチルコリン受容体に対する抗体によっておこる自己免疫疾患で、胸腺腫や過形成などの胸腺異常を合併することが多い。胸腺摘出術は MG の重要な治療オプションのひとつであるが、胸腺摘出術のみで治療が完結することはごく稀である。

2. 研究の目的

MG 患者では、胸腺から末梢循環に移動する T 細胞 (recent thymic emigrant) すなわち T 細胞のアウトプットが亢進することが多い。多発性硬化症患者の再発予防薬である fingolimod (FTY720) は、S1P1 受容体のアゴニストで、S1P1 受容体は胸腺髄質にある T 細胞系にも発現する。T 細胞のアウトプットを抑制することで、MG においても fingolimod が有効な治療オプションとなりえるか検証する。

3. 研究の方法

健常者、多発性硬化症患者より末梢血を採取し、単核球細胞を分離の上、多重蛍光染色ならびに分子生物学的実験を行う。多発性硬化症患者は再発予防のため、fingolimod を必要とする例を対象とし、fingolimod 服用前、服用後 1 ヶ月、6 ヶ月、年後の計 4 回採血を行う。

(1) 末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell:PBMC) の分離:

採血後 Ficoll を用いて、比重遠心法によりリンパ球を含む単核球を分離し、細胞保存液にて保管を行う。

(2) フローサイトメータを用いた T 細胞の解析ならびに細胞分離: PE-Cy5-Propidium iodide、PE/Cy7-CD3, FITC-CD4 もしくは FITC-CD8, PerCP-Cy5.5-CD45RA, PE-CD45RO, APC-CD31 に対する抗ヒト抗体を用い、末梢血単核球の染色を行う。フローサイトメータを用い、リンパ球分画の中でも CD3(+)/CD4(+)/T 細胞もしくは CD3(+)/CD8(+)/T 細胞を分離する。さらに図に示したように、ナイーブ T 細胞、さらにナイーブ T 細胞の中でも recent thymic emigrant を反映する CD31(+)/ナイーブ T 細胞 (TREC に値する) メモリー T 細胞の割合を確認後、これらの細胞分離を行う。

(3) S1P1 の RT-PCR 解析:

細胞分離により得られた、ナイーブ T 細胞、CD31(+)/ナイーブ T 細胞、メモリー T 細胞から mRNA を抽出、逆転写反応後、RT-PCR を行い S1P1 の発現量を確認する。

4. 研究成果

図1 Gated on CD3+CD4+Tcells 図2 Gated on Naive Tcells

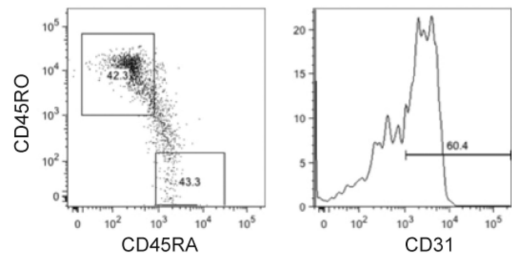


図 1 : CD3(+)/CD4(+)/T 細胞を、CD45RA(+)/CD45RO(-)ナイーブ T 細胞 (43.3%) と CD45RA(-)/CD45RO(+)/メモリー T 細胞 (42.3%) に分画した。

図 2 : 図 1 のナイーブ T 細胞のうち CD31 陽性細胞を recent thymic emigrant=RTE とした (60.4%)。

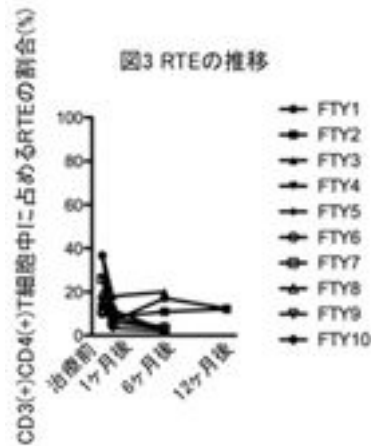


図 3 : fingolimod 内服の多発性硬化症患者における RTE の推移

RTE は fingolimod 内服 1 ヶ月より低下し、12 ヶ月後も低下したままであった。

なお、fingolimod 内服前後で、ナイーブ T 細胞、メモリー T 細胞、RTE 中の S1P1 の mRNA 発現量には差異を認めなかった。

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 15 件)

Furukawa T, Matsui N, Fujita K, et al. CSF cytokine profile distinguishes multifocal motor neuropathy from progressive muscular atrophy. Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation, in press(査読あり)

Furukawa T, Matsui N, Fujita K, et al. Increased proinflammatory cytokines in sera of patients with multifocal motor neuropathy. J Neurol Sci 2014;346(1-2);75-79 (査読あり)

Miyashiro A, Matsui N, Shimatani Y, et al. Are multifocal motor neuropathy patients underdiagnosed? An epidemiological survey in Japan. Muscle Nerve 2014;49(3);357-361 (査読あり)

Mungunkhuyag M, Harada M, Abe T, Fujita K, Matsui N, Kaji R. Longitudinal Monitoring with Multiple MR techniques in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy associated with multiple myeloma. Magn Reson Med Sci 2014;13(1);55-59 (査読あり)

Matsui N, Ohigashi I, Tanaka K, et al. Increased number of Hassall's corpuscles in myasthenia gravis patients with thymic hyperplasia. J Neuroimmunol 2014;269(1-2);56-61 (査読あり)

松井尚子  
多巣性運動ニューロパチー  
今日の治療指針 2014 年度版 885-886  
医学書院 (査読なし)

松井尚子、古川貴大、梶龍兒  
多巣性運動ニューロパチー (MMN) 病態と検査所見 GBS と CIDP-診療 New Standards Clinical Neuroscience 2014 年 Vol.32(3) 324-326 中外医学社 (査読なし)

古川貴大、松井尚子、梶龍兒  
V 脱髄性疾患、遺伝性ニューロパチー  
多巣性運動ニューロパチー (MMN)  
-診療 New Standards  
別冊 日本臨床 領域別症候群 27 神経症候群 (第 2 版) 2014 年 3 月 20 日発行 848-850  
ISSN 0047-1852 日本臨床社 (査読なし)

松井尚子、宮城愛、梶龍兒  
特集：免疫性神経疾患  
多巣性運動ニューロパチー (MMN) の疫学・病態と治療  
日本臨床 2013;71(5);861-864 (査読なし)

松井尚子、梶龍兒  
特集：末梢神経診療 update  
MMN：疫学と治療の実態  
BRAIN MEDICAL 2013;25(3);45-48 (査読なし)

Furukawa T, Nodera H, Shimatani Y, Watanabe O, Miyashiro A, Mori A, Matsui N, Nishida Y, Izumi Y, Kaji R.  
Hyperexcitability as a potential cause for diffuse lower motor neuron loss in Isaacs' s syndrome.  
Neurology and Clinical Neuroscience 2013;1(4);179-181 (査読あり)

Nakane S, Fujita K, Shibuta Y, Matsui N, Harada M, Urushihara R, Nishida Y, Izumi Y, Kaji R. Successful treatment of stiff person syndrome with sequential use of tacrolimus. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2013;84(10);1177-1180 (査読あり)

Fujita K, Matsui N, Takahashi Y, et al. Increased interleukin-17 in the cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a case-control study of rapidly progressive dementia. J Neuroinflammation 2013;13(1);135 (査読あり)

Mitsui T, Kuroda Y, Ueno S, Matsui N, Kaji R. FK506 attenuates thymic output in patients with myasthenia gravis. Arch Med Sci 2013;30:9(6):1090-1096 (査読あり)

Matsui N, Miyashiro A, Shimatani Y, et al. Diagnostic spectrum of multifocal motor neuropathy. Clinical and Experimental Neuroimmunology 2013;4(2);210-215 (査読あり)

[学会発表](計 6 件)  
松井尚子、古川貴大、梶龍兒 重症筋無力症患者の過形成胸腺ではハッサル小体が増加している 2014 年 5 月 22 日 第 55 回日本神経学会学術大会 福岡国際会議場(福岡県、福岡市)

Matsui N, Kaji R.  
Increased number of Hassall's corpuscles in myasthenia gravis patients with thymic hyperplasia. April 29, 2014 The 66<sup>th</sup> American Academy of Neurology Annual Meeting Pennsylvania Convention Center, (Philadelphia, PA, USA)

松井尚子、酒井和香、和泉唯信他 老年発症重症筋無力症の治療戦略 2014 年 2 月 23 日 第 25 回日本老年医学会四国地方会日亜メデイカルホール(徳島県、徳島市)

松井尚子、古川貴大、藤田浩司他 Fingolimod の recent thymic emigrant への影響 2013 年 11 月 27 日 第 25 回日本神経免疫学会学術集会 海峡メッセ下関(山口県、下関市)

松井尚子  
stiff-person, Isaacs 症候群のアフェレシス(シンポジウム:難治性神経筋疾患におけるアフェレシス療法) 2013 年 11 月 3 日 第 34 回日本アフェレシス学会学術大会 軽井沢プリンスホテル(長野県、軽井沢町)

Matsui N, Ohigashi I, Takahama Y, et al.  
Increased Hassall ' s corpuscles in  
myasthenia gravis patients carrying  
thymic hyperplasia July 1-2,  
2013 Myasthenia 2013  
Pasteur Institute (Paris, France)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松井 尚子 (MATSUI, Naoko)  
徳島大学・病院・診療支援医師  
研究者番号 : 10547954

(2)研究分担者

( )

研究者番号 :

(3)連携研究者

( )

研究者番号 :