

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2010～2014

課題番号：22229008

研究課題名(和文) 視神経脊髄炎の新たなアストロサイトパチーの疾患概念の確立と病態、治療に関する研究

研究課題名(英文) Establishment of a new disease entity as astrocytopathy, and studies on the pathogenesis and treatment for neuromyelitis optica

研究代表者

糸山 泰人 (Itoyama, Yasuto)

国際医療福祉大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：30136428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 150,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、視神経脊髄炎(Neuromyelitis Optica, NMO)に特異なアクアポリン(AQP)4抗体陽性の多数の解析により、NMOは多発性硬化症(MS)と異なる臨床、検査所見を報告し、より広い疾患概念であるNMO関連疾患(NMOSD)の新たな国際的な診断基準の作成に寄与した。またAQP4抗体陽性NMOSDが、MSのような脱髄疾患ではなく自己免疫性アストロサイト病であることを明らかにし、免疫抑制療法の有効性を示した。さらにAQP4抗体陰性NMOSDの一部にミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク(MOG)抗体陽性例があることを発見し、その臨床的特徴と脱髄が主体の病態を見出した。

研究成果の概要(英文)：We clarified the clinical and laboratory features of aquaporin (AQP) 4-antibody-positive neuromyelitis optica (NMO), and contributed to the new international consensus diagnostic criteria of NMO Spectrum Disorders (NMOSD), a wider clinical entity of NMO. We also revealed that AQP4-antibody-positive NMOSD is not a demyelinating disease like multiple sclerosis but an autoimmune astrocytopathic disease. Moreover, we discovered that a fraction of AQP4-antibody-negative NMOSD are positive for myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-antibody and those cases have some unique clinical features. Importantly, unlike AQP4-antibody-positive NMOSD, MOG-antibody-positive NMOSD appears to be a demyelinating disease.

研究分野：神経内科学

キーワード：視神経脊髄炎 アクアポリン4抗体 アストロサイトパチー 多発性硬化症 脱髄疾患

1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎(Neuromyelitis Optica, NMO)は視神経炎と脊髄炎の再発と寛解を繰り返す特徴を有し、日本では脱髄疾患である多発性硬化症(Multiple Sclerosis, MS)の一亜型として考えられ、視神経脊髄型MS(Optic-Spinal, OSMS)と呼称され、疾患概念の混乱があった。しかし、2004年にMSには検出されず NMO にのみ認められる NMO-IgG 抗体が発見され、翌年に NMO-IgG がアストロサイトに主に発現している水チャンネルであるアクアポリン 4(AQP4)に対する抗体であることが明らかになってから、国内外で NMO の臨床的特徴の解析、病態の解明、治療法の開発と疾患概念の確立にむけて研究が始められていった。

2. 研究の目的

(1)新たな NMO の疾患概念の確立

NMO の臨床的疾患概念を構築するため多数例での臨床像や MRI 所見を明らかにする。

(2)NMO の病態解明～AQP4 を標的とするアストロサイトパッチの機序の解明～

NMO 病変におけるアストロサイトパッチを神経病理学的研究、髄液細胞傷害マーカーの病態を解析及び実験的研究により詳細に検討する。

(3)NMO の発症予防の研究と治療法の確立

AQP4 抗体産生の機序を検討し、NMO の発症予防法を検討する。

診断基準の作成と治療体制の構築により診療プロトコルの作成を行う。

3. 研究の方法

(1)新たな NMO の疾患概念の確立

NMO の臨床的疾患概念の構築

我々は全国から 1946 例の AQP4 抗体陽性症例のデータを集積しており、その臨床及び検査所見を解析し NMO の臨床的特徴の全体像を明らかにした。

NMO の MRI 脳病変の分類と解析

AQP4 抗体陽性 NMO の脳病変をパターン分類し、NMO の臨床症候やその頻度及び脊髄病変との関連を調べるとともに、MS 病変との比較検討を行った。

(2)NMO の病態解明～AQP4 を標的とするアストロサイトパッチの機序の解明～

NMO 病変におけるアストロサイトパッチに関する神経病理学的検討：

NMO 剖検例の脳脊髄を用いて、NMO 病巣の特徴であるアストロサイト傷害と病変形成を免疫組織化学的解析にて明らかにした。

髄液中の髄液グリア線維性酸性タンパク(GFAP)、ミエリン塩基性タンパク(MBP)、ニューロフィラメント濃度の測定とその臨床意義の解析：

NMO において GFAP, S-100 等のアストロ

サイト関連タンパク濃度を MBP、ニューロフィラメントと比較し、アストロサイト障害をミエリンやニューロンの傷害と比較し、特異性と経過を分析した。

AQP4 抗体の培養アストロサイトに及ぼす影響及び B 細胞と液性免疫の in vitro 解析：

AQP4 抗体と補体等とアストロサイトと共に培養し細胞障害のメカニズムを探った。また B 細胞マーカーの解析や補体、in vitro で AQP4 抗体産生実験等を行った。

AQP4 抗体の病原性に関する実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を用いた in vivo 実験的研究：

MBP 反応性 T 細胞を移入して発症させるトランスファー-EAE モデルに AQP4 抗体を各種の条件を変えて投与し NMO 様病変形成における役割を解析した。

(3)NMO の発症予防の研究と治療法の確立

AQP4 抗体産生の機序と NMO 発症のトリガーの解析

ウイルス感染や AQP4 の共通抗原検索により考察し、NMO の発症予防法を検討した。

診断基準の作成と治療体制の構築～診療プロトコルの作成～

AQP4 抗体測定を含めた NMO の早期診断を進めるため、国際委員会のメンバーとして新たな診断基準の作成を行った。また適切な免疫抑制療法と診療体制を構築した。

4. 研究成果

“アストロサイトパッチという新たな疾患概念の提唱”

(1)NMO の臨床的疾患概念の構築：臨床像の全体を明らかにする

全国から集積した 1946 例の AQP4 抗体陽性症例の臨床情報の総合的解析：発症年齢の平均は 44 歳(1 歳～93 歳)だった。若年及び老年発症例では男女差はなかったが、代表的年齢の発症例では 14:1 と圧倒的に女性優位だった。若年発症例では視神経炎、高齢発症例では脊髄炎で発症することが多かった。10% の症例では脳症候で発症した。脳幹症候もまれではなく、約 30% の症例で嘔吐、吃逆をはじめ種々の脳幹症候がみられた。臨床経過としては、発症から 75 カ月後には、18% の症例は両眼の重篤な視覚障害を、34% は 100m の歩行が困難になるなど全体的に予後は不良だった。

NMO における脳病変の特徴：NMO 症例の 62 例の脳 MRI 病変を詳細に解析し、MS とは異なる以下の 5 種の MRI 病変を見出した；錐体路を含む病変、血管性浮腫による広範な大脳半球病変、中脳水道、第 3, 4 脳室周囲の病変、側脳室周囲の病変、しばしば頸髄病変と連続する延髄病変がみられた。これらは MS との鑑別上有用な MRI 所見である。

AQP4 抗体陽性女性患者の妊娠出産と再発

の関連：出産後6カ月間は妊娠前や妊娠中に比べて約4倍に再発率が上昇していた。NMOは女性患者が多く、従来は胎児への影響を考慮して再発予防薬を内服せずに妊娠出産に臨むことがほとんどであった。しかしこの結果を受けて再発予防の重要性が認識され、現在は患者と相談して適量のステロイドやアザチオプリン等の治療を慎重に継続しながら妊娠出産するようにしている。また、AQP4抗体は実験的にAQP4を発現する胎盤細胞を傷害し、動物実験では胎児の死亡を引き起こすことが他のグループにより示されている。我々の検討では、AQP4抗体陽性の女性では実際に流産のリスクが高まることが示唆された。これも妊娠中の免疫抑制療法の継続の意義を支持する知見である。

NMOのQuality of Life (QOL)と疼痛に関するMSとの比較解析：NMOはMSに比べ有意にQOLが低下しており、疼痛がMSより高頻度で重症だった。疼痛の分布も異なり、NMOでは疼痛が歩行障害や生活を楽しめないことに深く関与していた。NMOにおける疼痛の対症療法は患者のQOLの向上のために重要である。

東日本大震災のNMO及びMSの再発に及ぼす影響：宮城県内のNMO(63例)とMS(140例)で調査を行った。その結果、両疾患とも再発率や重症度は震災前後1年間には有意な変化はみられなかった。Visual Analogue Scaleでは震災時に両群とも有意にストレスが高かったが、衣食住のサポートに加えて、再発予防治療は97%の症例で継続され、これらのことが病勢が増悪しなかったことに寄与したと考えられた。今後の大規模自然災害におけるNMOの増悪防止に重要な示唆を与える知見と思われた。

高クレアチニンキナーゼ(CK)血症：発症前に倦怠感や筋肉痛があり血清CK値が著明に高値を呈する3症例があり、横紋筋に発現しているAQP4も本疾患の自己免疫の標的になっている可能性が示唆された。その後、約600例で再発時のCK値が測定され、10%の症例でCK値の上昇が確認された。

従来のNMO Spectrum Disorders (NMOSD)の概念を超える症例の存在：M23-AQP4をトランスフェクトした最も高感度の細胞を用いたアッセイ(Cell-Based Assay)を用いて298例の炎症性中枢神経疾患(視神経炎、脊髄炎、脳幹脳炎等)においてAQP4抗体の有無を検索した。18%の症例は現在のNMO、NMOSDの基準を満たさず、AQP4抗体陽性によって定義されるNMOSDは従来の概念より広いことが明らかになった。これはNMOSDの早期診断に重要な知見であり後述する新たな国際的なNMOSDの診断基準に取り入れられた。

(2)NMOにおけるアストロサイトパチーの病理学及び実験的検討

NMO病変のアストロサイトパチーと他の病理所見：

NMO病変の壊死部分ではアストロサイトは全く染色されないが、その周囲においてはアストロサイトの突起のビーズ状変化(Clasmatodendrosis)や破砕物が多数みられた。これらはアストロサイトが破壊されている所見の一つと考えられる。また病変部位におけるIgGや活性化補体の沈着の存在は液性免疫の関与を示唆する特徴的な所見である。その他、ワラ変性、AQP4の選択的欠失、脱髄や軸索変性、オリゴデンドロサイトのアポトーシスなど様々なタイプの病変も生じていた。

髄液グリア線維性酸性タンパク(GFAP)、ミエリン塩基性タンパク(MBP)濃度とその意義の解析：NMOの再発時には、アストロサイトタンパクであるGFAPの髄液濃度が著明に上昇しており、脊髄病変の長さや重症度と関連していた。MSでは上昇はみられなかった。またGFAP：MBP比はNMOではMSより有意に高く、NMOでは主にアストロサイトが破壊されていることが確認された。

なおNMOSD再発時の髄液中のAQP4抗体値やインターロイキン(IL)6濃度はGFAP濃度と関連し、病原性AQP4抗体や炎症の程度がアストロサイト傷害の程度と関連することを支持する知見と考えられた。

AQP4抗体の培養アストロサイトに及ぼす影響の検討：AQP4抗体をAQP4発現アストロサイトに補体と共に添加すると細胞が破壊された。またAQP4抗体のみでは細胞膜のAQP4が内在化し分解し、アストロサイトは球状になった(この変化は培養液中のAQP4抗体を除去すると可逆性を示した)。

NMO患者末梢血B細胞のAQP4抗体産生能の検討：患者の末梢血B細胞を分離し、IL6、IL10、IL15、B細胞刺激因子(BAFF)の4種のサイトカインと共に培養したところ、約半数の症例で培養液中にAQP4抗体を検出できた。この知見はAQP4抗体を抑制する治療の開発に重要な情報になると思われた。

AQP4抗体及びAQP4反応性T細胞の病原性の検討：従来MBP反応性T細胞を投与して作成したトランスフェクターEAEにAQP4抗体を投与するとNMO様病変が誘発されることが知られていた。今回はAQP4反応性T細胞を樹立し、これをAQP4抗体と共にLewisラットの血中に注入するとNMO様病変が惹起された。AQP4反応性T細胞のみの注入ではより軽度の病変がみられた。以上の結果は、AQP4に対する細胞性及び液性免疫のみで、NMO様病変を惹起させることが出来ることが明らかになった。

髄液補体の解析：NMOの再発時に補体の活性化によって産生されるアナフィラトキシン(C3a、C4a、C5a)を髄液で測定したところ、C5aの濃度が対照群に比べて有意に上昇していた。最近NMOの再発予防にC5aモノクローナル抗体製剤(Eculizumab)の有効性が注目されており、この所見はC5aの病態への関与を強く示唆する所見である。

(3) 診断、治療体制の構築～診療プロトコルの作成～

AQP4 抗体産生機序と発症予防に関する検討

NMOSD の初発例の血液、髄液を用いて各種のウイルスなどの微生物の抗体測定や PCR 検査を行ったが、発症と関連すると考えられる特定の感染因子は検出できなかった。しかし AQP4 抗体が血液脳関門を越えてアストロサイト上に発現した AQP4 と結合し、補体を活性化して細胞傷害を惹起するためのトリガーが何であるかを突き止めることは、NMOSD の発症機序の解明や治療法の開発のために極めて大切である。

新たな国際的な NMOSD の診断基準

国際委員会が作成した新たな NMOSD の診断基準では、AQP4 抗体陽性 NMOSD の診断には、視神経炎、急性脊髄炎あるいは特異な脳症候群等の主要臨床症候のうち 1 つがあり、他疾患が除外されれば診断される。これについては、我々の研究により NMOSD の特徴とされてきた脊髄炎が長軸方向に 3 椎体以上に及ぶことや、視神経炎が再発性あるいは両眼同時に発症することは実際には満たさない AQP4 抗体陽性症例があり、また脳幹症候で発症する AQP4 抗体陽性例もあることがわかったことなどを基に、今回の AQP4 抗体陽性 NMOSD の診断基準は定められた(3 椎体以上の脊髄病変などの所見はいずれも注意事項に含められた。)。これは従来の診断基準が、視神経炎と急性脊髄炎の両者か一方が必須とされていたのに対して、より早期の診断が可能になると期待される。一方、AQP4 抗体陰性 NMOSD や抗体検査結果が不明の場合は、2 つ以上の主要臨床症候が必要であり、さらに特定の MRI 所見がみられ、空間的多発を満たすなどが必要とした。しかしこの診断群は今後さらに研究が進めば、特異な一群が分離される可能性がある。

ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク(MOG)抗体陽性 NMOSD の発見

AQP4 抗体陰性 NMOSD の一部に MOG 抗体陽性例があることを発見した。従来の MOG 抗体に関する研究は ELISA やウエスタンブロットを用いたものだが、おそらくは抗体と抗原の非特異的な結合のために、MOG 陽性症例の特徴は見いだされていなかった。しかし本研究では細胞にヒトの MOG を発現させた特異度の高い MOG 抗体検出法(MOG のコンフォメーションを認識する病原性 MOG 抗体を検出)を用いたところ、それらの症例は、AQP4 抗体陽性例と異なり、女性優位性がみられず、両側視神経炎や腰仙髄を呈する頻度が高く、AQP4 抗体陽性脊髄炎にしばしば見られる痛性緊張性けいれんはまれであり、脳幹症候での初発も少なく、比較的再発が少なく、軽症で経過することが多いこと等を明らかにした。なお、AQP4 抗体と MOG 抗体の両者が陽性の症例は見られなかった。これ

ら 2 つの自己抗体が共に陰性の NMOSD は、両者の中間的な特徴を示した。また髄液細胞傷害マーカーの解析から、MOG 抗体陽性 NMOSD は脱髄が主体の病態であり、AQP4 抗体陽性例と異なることを明らかにした。この MOG 抗体陽性 NMOSD に関する研究は米国神経学会誌の掲載された際に、“NMO の 2 つの顔”として論説に取り上げられた。MOG 抗体陽性視神経炎については光干渉断層計による検査で、AQP4 抗体陽性視神経炎に比べて網膜神経層の厚さが保持される、すなわちより軽症であることを明らかにした。

MOG 抗体陽性疾患のスペクトラムは、AQP4 抗体陰性 NMOSD のみならず、視神経炎や小児の急性散在性脳脊髄炎などを含んでいることがわかってきた。

NMOSD の治療法のまとめ

国際的な研究チームの協力により NMOSD の治療法に関して、これまでの自験例や文献例の解析からステロイドや種々の免疫抑制剤や抗体製剤 (Rituximab, Tocilizumab, Eculizumab など) が有効であること、MS の治療薬である、インターフェロンベータや、ナタリズマブ、フィンゴリモドなどはむしろ NMOSD を増悪させるため投与すべきでないことなどを複数の英文総説論文に発表した。しかし一方、NMOSD においてはこれまでにプラセボ対照二重盲験試験などエビデンスレベルの高い治験は行われておらず、NMOSD の治療薬の真の有効性が章ん性されたとは言い難い。そこで本疾患における、プラセボ対照試験、add-on 試験、他の免疫抑制剤との比較試験など治験デザイン毎の利点と問題点を国際的なグループで詳細に検討し、プラセボ対照試験も状況により容認されうることを示した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 129 件)

Sato DK, Callegaro D; Jorge FMdH, Nakashima I, Nishiyama S, Takahashi T, Simm RF, Apostolos-Pereira SL, Misu T, Steinman L, Aoki M, Fujihara K. Cerebrospinal fluid aquaporin-4 antibody levels in neuromyelitis optica attacks. *Ann Neurol* 76:305-309, 2014. DOI: 10.1002/ana.24208. 査読有

Sato DK, Callegaro D, Lana-Peixoto, Waters PJ, Jorge FMdH, Takahashi T, Nakashima I, Apostolos-Pereira SL, Talim N, Simm RF, Lino AMM, Misu T, Leite MI, MD, Aoki M, Fujihara K. Distinction between MOG antibody-positive and AQP4 antibody-positive NMO spectrum disorders. *Neurology*, 82:474-481, 2014. DOI: 10.1212/WNL.000000000000101. 査読有
Sato DK, Nakashima I, Takahashi T, Misu T, Waters PJ, Kuroda H, Nishiyama S, Suzuki C, Takai Y, Fujihara K, Itoyama Y, Aoki M.

Aquaporin-4 antibody positive cases beyond current diagnostic criteria for NMO spectrum disorders. *Neurology* 80:2210-2216, 2013. DOI: 10.1212/WNL.0b013e318296ea08. 査読有
Takano R, Misu T, Takahashi T, Sato S, Fujihara K, Itoyama Y. Astrocytic damage is far more severe than demyelination in NMO: a clinical CSF biomarker study. *Neurology* 75:208-216, 2010. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181e2414b. 査読有

〔学会発表〕(計 87 件)

Fujihara K. Parallel Session 2: MS subpopulations and disease variants, (PS2.2) Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: Evolution and Current Concept, Joint 2014 ACTRIMS-ECTRIMS Meeting (MSBoston2014), Boston (USA), September 11, 2014.

Fujihara K. Workshop 10: Updates on Demyelinating Diseases, Demyelination after discovery of aquaporin 4 (multiple sclerosis, neuromyelitis optica), The 18th International Congress of Neuropathology (ICN2014), Rio de Janeiro (Brazil), September 17, 2014.

Fujihara K. Controversies in NMO/OSMS: the Japanese experience. AM Half-Day Course: Neuromyelitis Optica: Scientific and Clinical Update (8AC.002), The 64th Annual Meeting of American Academy of Neurology, New Orleans (USA), April 28, 2012.

〔図書〕(計 20 件)

Weinshenker BG, Keegan M, Winters JL, Nakashima I, Fujihara K. Cambridge University Press, Multiple Sclerosis Therapeutics (4th edition), 2011, 454-464.

多発性硬化症治療ガイドライン作成委員会(評価委員 糸山泰人、委員 藤原一男). 医学書院、多発性硬化症治療ガイドライン、2010、145.

〔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)
国際医療福祉大学・教授

研究者番号 : 30136428

(2)研究分担者

藤原 一男 (FUJIHARA, Kazuo)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号 : 70280873

中島 一郎 (NAKASHIMA, Ichiro)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号 : 50333810

三須 建郎 (MISU, Tatsuro)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号 : 00396491