

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19505

研究課題名(和文) 視神経脊髄炎におけるインフラマソームを介した自然免疫機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of inflammasomes in innate immunity of neuromyelitis optica

研究代表者

佐治 越爾 (SAJI, Etsuji)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：00706418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：視神経脊髄炎(neuromyelitis optica; NMO)は、中枢神経系炎症性疾患であり、アキアポリン4(aquaporin 4; AQP4)水チャネルを標的とするNMO-IgGの検出により、多発性硬化症と区別できる。剖検凍結組織でのmRNA発現解析において、活動性病変を含むNMO症例でインフラマソーム関連分子発現が亢進していることを見出した。NMO末梢血中のリンパ球亜分画においてIFN γ に加え、インフラマソーム関連分子の発現が亢進していた。NMOの病態に自然免疫機構が関与していることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD) is an autoimmune inflammatory disorder of the central nervous system (CNS). The detection of NMO IgG autoantibody, which targets the aquaporin-4 water channel, distinguishes NMO from multiple sclerosis. The mRNA levels of inflammasome related genes were increased in active frozen spinal cord tissues of NMOSD. Moreover, sorted lymphocytes from peripheral blood in patients with NMOSD also had the increased mRNA expression of inflammasome related genes and interferon-gamma. These data suggest that innate immunity including inflammasome play an important role in the pathomechanism of NMOSD.

研究分野：神経免疫

キーワード：視神経脊髄炎 自然免疫 インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 【NMO は MS と異なる病態機序を持つ自己免疫性アストロサイトパチー疾患である】

視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica; NMO) は視神経と脊髄を首座とする炎症性脱髄疾患である。長らく NMO は多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) の一亜型と考えられてきた。NMO 患者血清中にアクアポリン 4 (aquaporin 4; AQP4) 水チャネルを標的とする自己抗体 (NMO-IgG/AQP4 抗体) が発見され (Lancet. 2004;364:2106), NMO は MS とは分離独立する疾患として認識されるようになった。NMO の炎症性脱髄病変では、アストロサイトの血管足突起に発現する AQP4 の消失と血管中心性の補体沈着を認めることから、NMO の病態機序として AQP4 抗体による補体介在性アストロサイト障害が病変形成に重要な役割を果たしていると考えられている (Brain. 2007;130: 1224, Brain. 2007;130:1194, Neurology. 2009;73:1628)。さらに中枢神経病変を呈する AQP4 抗体陽性患者の解析により、延髄背側病変や視床下部病変、広範な大脳白質病変など脳病変を初発症状とする症例の報告が蓄積されており、NMO は従来考えられてきたよりも多彩な中枢神経症状を呈することが明らかにされている (Arch Neurol. 2006;63:390)。最新の NMO 診断基準案では AQP4 抗体陽性炎症性中枢神経疾患を含む NMO 関連疾患 (NMO spectrum disorders; NMOSD) として捉えることが提唱されている (Neurology. 2015;85:177)。

これまでに NMO の病態について我々と共同研究者は以下のことを明らかにしている。AQP4 蛋白を強制発現させた HEK293 細胞を使用し、AQP4 抗体の間接蛍光抗体測定系を確立した (Multiple sclerosis. 2007;13:850, Neurology. 2009;73:1628)。脊髄炎のみの早期型・限局型 NMO (limited form) は視神経炎と脊髄炎を持つ晩期型・完全型 NMO と同様の病理所見を認めること、髄液インターロイキン (IL)-6, IL-1 β をはじめとした炎症性サイトカインは限局型 NMO から上昇し、完全型 NMO ではさらに増加することを明らかにしている (Neurology. 2009;73:1628)。NMO 患者の認知機能を評価し、MS 患者同様に認知機能障害が存在することを明らかにし、剖検脳を用いた解析にて MS と異なり大脳皮質内脱髄はないが、大脳皮質の神経細胞脱落および皮質 II 層にアストロサイトの AQP4 発現の低下が存在することを明らかにしている (Ann Neurol. 2013;73:65)。

NMO の病理学的解析から AQP4 抗体と補体を中心とする液性因子がその病態機序において重要な役割を担っていることが示唆される (Brain 2007;130:1224, Brain 2007;130:1194)。一方で、10 年以上にわたり AQP4 抗体が陽性でも NMO を発症しない症

例の存在や、動物モデルでは AQP4 抗体と補体を末梢に投与しても中枢神経症状を呈さないことが報告されている (Neurology. 2009;72:1960, Ann Neurol. 2009;66:630)。このことは、AQP4 抗体による補体介在性アストロサイト障害のみでは NMO 病態を説明するには不十分であり、自己抗体が中枢神経系内へ流入するためには、血液脳関門 (Blood brain barrier; BBB) を破綻させるもう一つのステップを必要とすることを意味している。実際に NMO 病変には上述した液性因子以外に、T 細胞に加え、マクロファージ、好酸球、好中球などの自然免疫細胞が浸潤しており、さらにミクログリアが活性化していることも明らかにされている (Brain. 2002;125:1450, Acta Neuropathol. 2013; 125:815, Acta Nueropathol Commun. 2013;1:85)。これらの活性化した T 細胞や自然免疫細胞群により産生されるサイトカインが BBB を破綻させる一因を担っている可能性がある。

(2) 【酸化ストレス亢進はインフラマソームを活性化し、炎症の形成に関与する】

髄鞘が標的となり炎症性脱髄病変を形成する MS において、酸化ストレスの亢進がその病態に関わっていることが報告されている (Lancet Neurol. 2015;14:183)。1) MS の活動性炎症性脱髄病変において酸化 DNA・脂質の発現亢進を認め、オリゴデンドロサイトのアポトーシスおよび神経軸索障害に関連している (Brain 2011;134:1914)。2) ミクログリアが産生する活性酸素種による酸化ストレスの亢進が炎症性脱髄の形成に関与している (Brain 2012;135:886)。さらに中枢神経内における酸化ストレスの亢進は脱髄だけではなく、直接神経細胞を障害する可能性も示唆されている (Cell. 2010;140:918)。一方で、ミトコンドリアが産生する活性酸素種や酸化ミトコンドリア DNA がインフラマソームの活性化に関与していることが明らかにされた (Immunity. 2012;36:401)。インフラマソームは自然免疫受容体にアダプター分子が会合して形成される分子複合体の総称であり、ダメージ関連分子パターン (DAMPs) および病原体関連分子パターン (PAMPs) により活性化され、IL-1 β , IL-18 の産生を促進する。NLRP3 インフラマソームは、病原体の感染防御だけでなく、自己炎症症候群、多発性硬化症、アルツハイマー病および 2 型糖尿病を含む生活習慣病など様々な病気にも関与していることが報告されている (Nat Med. 2015;21:677)。また、インフラマソーム関連蛋白である Pyrin をコードする MEFV 遺伝子変異により周期性発熱を特徴とする自己炎症症候群である家族性地中海熱を発症するが、MS 患者の一部も MEFV 遺伝子変異を有しており、MS の疾患感受性遺伝子の可能性がある (Mult Scler. 2012;18:1229)。同じ自己炎症症候群に属する

TNF 受容体関連受容体症候群では MS 合併例が報告されており, TNF シグナルの亢進が病態に関与していることが示唆されている (Neurology. 2008;71:1812). 一方で, 髄液中 IL-1β および IL-6 の上昇を認める NMO ではインフラマソームシグナルの亢進を介した自然免疫機構の活性化が病態に関与している可能性がある.

2. 研究の目的

本研究では, 「自然免疫系細胞群に焦点を当て, NMO の病態にインフラマソームを介した自然免疫機構が関与している」という仮説を立て, 以下を証明することを目的とする. (1) NMO 病変局所におけるインフラマソーム活性化を示唆するサイトカインの存在およびその産生細胞を同定する. (2) NMO 末梢血におけるインフラマソーム活性化を証明する. (3) 体液サンプルを用いて, 疾患活動性マーカーを同定する.

3. 研究の方法

NMOSD の病態にインフラマソームを含む自然免疫機構の役割を明らかにするために, NMO の剖検組織を用いて, インフラマソームシグナルに関連するサイトカインの産生細胞とその局在を明らかにする. また自然免疫細胞である単球, マクロファージ, ミクログリアの局在について検討する. さらに, 患者由来の検体を用いて, 病勢を反映しうるサイトカインの同定およびそれらのサイトカインを誘導する因子を分子生物学的, 免疫学的手法を用いて検討した.

4. 研究成果

- (1) NMO および対照として非炎症性疾患例の剖検組織を用いて免疫組織化学染色にて病理学的解析を行った. NMO 剖検脊髄急性期病変には, T 細胞の浸潤に加え, マクロファージの浸潤および活性化したミクログリア, 好中球, 好酸球を含む顆粒球の浸潤の存在を認めた.
- (2) NMO (n = 3) および非炎症性疾患である神経変性疾患 (n = 3) の凍結組織より Total-RNA を抽出し, リアルタイム PCR 法を用いて mRNA 発現を解析した. 活動性病変を含む NMO 症例においてインフラマソーム関連分子発現が亢進していることを確認した. この結果は, NMO 急性期病変においてインフラマソームを含む自然免疫機構が病態に関与していることが示唆される.
- (3) NMO (n = 14) および健常者 (n = 12) の末梢血液中のリンパ球を分離し, Total RNA を抽出してインフラマソーム関連

分子を含む mRNA 発現を解析した. NMO のリンパ球亜分画において IFN γ や CXCL8 に加え, インフラマソーム関連分子である IL-1 β の発現が亢進していた.

以上より, NMO 剖検組織における病変局所だけではなく NMO 患者由来の末梢血液中のリンパ球亜分画においてもインフラマソームの活性化が存在しており, NMO の病態に自然免疫機構が関与していることが示唆される. インフラマソーム活性化の制御が NMO の新たな分子標的療法につながる可能性がある.

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 1 件)

Hokari M, Yokoseki A, Arakawa M, Saji E, Yanagawa K, Yanagimura F, Toyoshima Y, Okamoto K, Ueki S, Hatase T, Ohashi R, Fukuchi T, Akazawa K, Yamada M, Kakita A, Takahashi H, Nishizawa M, Kawachi I. Clinicopathological features in anterior visual pathway in neuromyelitis optica. *Annals of Neurology*. 2016;79(4):605-624. DOI:10.1002/ana.24608. 査読有.

[学会発表](計 5 件)

E. Saji, M. Hokari, A. Yokoseki, T. Wakasugi, F. Yanagimura, K. Yanagawa, M. Nishizawa, O. Onodera, I. Kawachi. Double inversion recovery MRI in the evaluation of the anterior visual pathway in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorders. 7th Joint ECTRIMS-ACTRIMS meeting. Paris, France. 2017 年 10 月.

E. Saji, T. Wakasugi, M. Hokari, F. Yanagimura, K. Yanagawa, M. Nishizawa, O. Onodera, I. Kawachi. A follow-up study of cognitive assessments in a Japanese cohort of multiple sclerosis. XXIII World Congress of Neurology. Kyoto. 2017 年 9 月.

佐治越爾, 横関明子, 若杉尚宏, 柳村文寛, 穂苅万李子, 柳川香織, 西澤正豊, 小野寺理, 河内泉. 診断基準・重症度分類作成に向けた肥厚性硬膜炎の臨床的・免疫学的解析. 第 29 回日本神経免疫学会学術集会. 札幌. 2017 年 10 月.

I Kawachi, M Hokari, A Yokoseki, M Arakawa, E Saji, K Yanagawa, F

Yanagimura, Y Toyoshima, A Kakita, H Takahashi, O Onodera, M Nishizawa. Severe neurodegeneration and unique dynamics of aquaporin-4 on astrocytes in the anterior visual pathway of neuromyelitis optica. The 32nd Congress of the european committee for treatment and research in multiple sclerosis (ECTRIMS). London, UK. 2016年9月
Neuromyelitis optica 脳病変における神経放射線学的・神経病理学的特徴. 穂苅万李子, 佐治越爾, 柳村文寛, 柳川香織, 豊島靖子, 柿田明美, 高橋均, 小野寺理, 西澤正豊, 河内泉. 第28回日本神経免疫学会学術集会. 長崎市. 2016年9月.

〔図書〕(計1件)

佐治越爾, 河内泉. IV 検査, 8. 脱髄性疾患の眼科的検査について教えてください. 神経内科 clinical questions and pearls : 中枢脱髄性疾患. 2018年2月発行. 178-182. 中外医学社. 東京.

〔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

新潟大学

(<https://www.niigata-u.ac.jp/>).

新潟大学脳研究所

(<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/>).

新潟大学脳研究所神経内科学分野

(<https://www.neurology-bri.jp/>).

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐治 越爾 (SAJI, Etsuji)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：00706418

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし