

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461472

研究課題名(和文) 中枢神経系に対する抗U1RNP抗体の病原性に関する研究

研究課題名(英文) Pathogenicity of anti-U1RNP antibodies in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus

研究代表者

藤井 隆夫 (FUJII, Takao)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70255462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：全身性エリテマトーデス(SLE)患者は多彩な症状を呈するが、そのなかでもneuropsychiatric SLE(NPSLE)は診断や治療に苦慮する。特にその神経症状が真にSLEによるものであるのか、その確定診断に有用なマーカーが乏しい。われわれは比較的容易に検出できる髄液(CSF)中の自己抗体とサイトカインとの関連を調べ、さらに血液脳関門(BBB)の透過性の影響を明確にした。結果、抗NR2抗体はBBBの透過性亢進によりCSF-IL-6濃度が高くなることが明確となった。またCSF-抗U1RNP抗体が抗NR2抗体存在下でIL-6をさらに上昇させる現象を新たに見いだした。

研究成果の概要(英文)：In patients with systemic lupus erythematosus (SLE), neuropsychiatric manifestations (NPSLE) is a refractory disorder, because their disease-specific markers and treatment strategy are not well determined. The present study shows a certain subset of NPSLE, which has a link of cerebrospinal fluid (CSF)-autoantibodies, CSF-inflammatory mediators, and blood brain barrier (BBB) permeabilities. Especially, CSF-IL-6 concentration was elevated in association with anti-NR2 antibodies by BBB injury. Also, anti-U1RNP antibodies may activate IFN- γ production intrathecally and up-regulate CSF-IL-6 in the presence of CSF-anti-NR2 antibodies. We can conclude that both anti-NR2 and U1RNP antibody detections in NPSLE may be useful not only for diagnosis, but also treatment decision in primary NPSLE patients.

研究分野：膠原病学

キーワード：全身性エリテマトーデス 中枢神経障害 自己抗体 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus, SLE) は多彩な症状を呈するが、特に診断に関する特異的検査所見が乏しい neuropsychiatric SLE (NPSLE) は臨床の現場で問題となる。NPSLE には精神症状、神経症状、末梢神経症状が含まれるが、そのうち SLE の活動性に関連する場合を primary NPSLE と呼び、薬剤性など SLE と関連のない原因による神経症状は secondary NPSLE と呼ばれることが多い。しかし上記の理由からこの鑑別はしばしば困難で、primary NPSLE の適切なバイオマーカーが以前から求められてきた。

NPSLE のバイオマーカーとしては、脳脊髄液 (cerebrospinal fluid, CSF) 中のサイトカインや自己抗体が報告されてきた。われわれも primary NPSLE 患者血清中において抗 U1RNP 抗体陽性率が高いことに着目し、血清および CSF 中の抗 U1RNP 抗体の臨床的意義について調べてきた。その結果、CSF 中の抗 U1RNP 抗体が primary NPSLE の診断マーカーとして比較的優れていることを報告し (引用文献 1) かつ CSF 中の抗 U1RNP 抗体陽性と CSF 中の IFN- γ 高値とが関連することを示した (引用文献 2)。

一方で、primary NPSLE の典型的な精神症状 (びまん性障害) は抗 N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit 2 (NR2) 抗体と関連することが示され、実際には in vivo においても証明されている (引用文献 3)。

しかしわれわれ報告した抗 U1RNP 抗体と抗 NR2 抗体との相互作用や、抗 U1RNP 抗体がびまん性脳障害に与える影響は不明のままであった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、中枢神経症状を有する NPSLE 患者 CSF 中の抗 NR2 および抗 U1RNP 抗体、また IL-6 などの CSF 中液性因子を測定し、2 つの抗体に何らかの相加効果があるかどうかを検討した。また CSF 中抗 NR2 抗体は血液脳関門 (Blood-brain barrier, BBB) の透過性と相関することが報告されている (引用文献 3) ため、これらと BBB の透過性亢進との相関を検討した。

3. 研究の方法

(1) 対象

中枢神経障害を有した primary NPSLE 74 名 (男性 9 名: 女性 65 名)。これらの患者は、末梢神経障害のみの患者が省かれており、かつ感染症など明らかな他疾患による中枢神経障害が否定された primary central NPSLE で、平均発症年齢は 36.2 ± 14.4 歳であった。なおコントロールとして non-NPSLE 13 名 (全

員女性、平均発症年齢 41.5 ± 15.3 歳) を検討に加えた。この non-NPSLE とは、SLE の経過中神経障害があり髄液検査を行ったが、primary NPSLE および感染症などの炎症性中枢神経障害が否定された症例をさす。

(2) 文書同意をとったうえで NPSLE 患者の CSF を保存し、87 例において血清中および CSF 中の自己抗体と液性因子を測定した。

自己抗体として、血清/CSF-抗 U1RNP 抗体は RNA-免疫沈降法 (RNA-IPP) で、抗 NR2 抗体は ELISA で測定した。この ELISA の陰性コントロールは非 SLE 患者で、血清中抗 NR2 抗体陰性が確認された症例の検体を用いている。

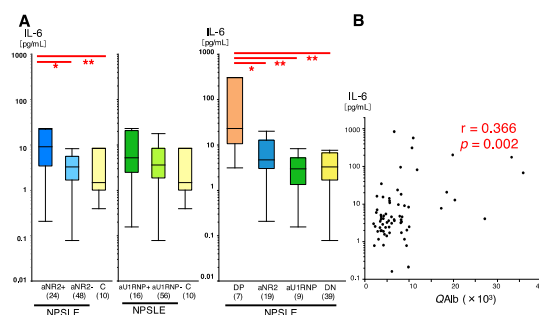
また CSF 中の液性因子の測定は Filgen 社に依頼し、IL-6, IL-8, および monokine induced by IFN- γ (MIG) を Procarta[®] Cytokine Assay kit を用いて Bio-Plex[™] により測定した。

4. 研究成果

対象症例において、局在性徴候を示した患者は全体の 66.2%、びまん性徴候を示した患者は 51.3%であった。これらの中には両者が重複していた症例も存在する。また本検討では CSF 中の自己抗体の有無により、以下の 4 群に分けて検討を行った。

- Double Positive 群 (DP):
抗 NR2 抗体および抗 U1RNP 抗体両方陽性
- 抗 NR2 抗体単独陽性群 (aNR2)
- 抗 U1RNP 抗体単独陽性群 (aU1RNP)
- Double Negative 群 (DN):
抗 NR2 抗体および抗 U1RNP 抗体両方陰性

(1) IL-6 と自己抗体 (A) および BBB 透過性 (B) との関係 (図 1)

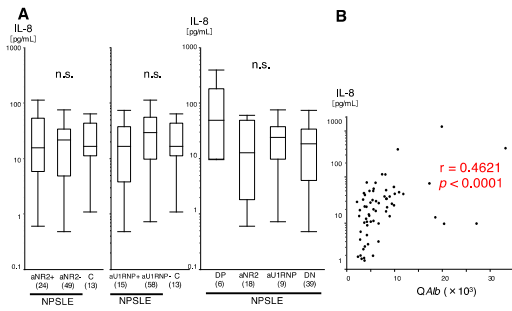


C: non-NPSLE, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s.: not significant, (): 患者数

単独抗体の有無の比較では抗 NR2 抗体陽性群が他の 2 群よりも IL-6 が高かったが、抗 U1RNP 抗体の有無では差を認めなかった。しかし 4 群の比較では DP 群が 4 群中最も高値

を示し、IL-6の上昇には抗NR2抗体が存在するときに抗U1RNP抗体が相加的な役割を果たしている可能性が示唆された。またCSF中IL-6はBBBの透過性(Albumin Quocient, Qalb)も影響すると考えられた。

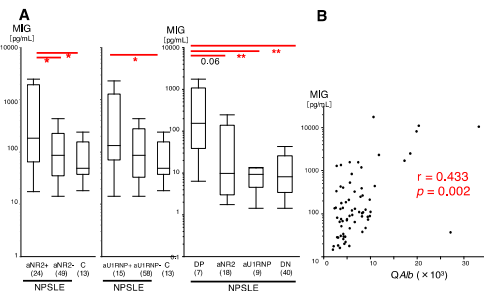
(2) IL-8と自己抗体(A)およびBBB透過性(B)との関係(図2)



C: non-NPSLE, n.s.: not significant, (): 患者数

単独抗体群間および4群間の比較でいずれも差を認めなかったため、CSF-IL-8の上昇に対する2つの抗体の影響は低い可能性が示された。一方、CSF中IL-8とQalbには相関を認めており、BBBの透過性亢進がIL-8濃度の上昇に影響していると考えられた。

(3) MIGと自己抗体(A)およびBBB透過性(B)との関係(図3)



C: non-NPSLE, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, (): 患者数

単独抗体群間の比較では抗体陽性群が高く、さらに4群間の比較ではDP群が4群中最も高値を示したため、MIGの上昇には2つの抗体が独立して影響している可能性が示唆された。一方で、CSF中MIGとQalbには相関を認めたため、上昇にはBBBの透過性亢進も影響していると考えられた。

(4) CSF中抗NR2抗体価と液性因子との関係 今回、スペースの関係からデータは示していないが、CSF-IL-6はCSF中抗NR2抗体価との

相関を認めた($r = 0.437$, $p = 0.033$)。一方CSF中MIGおよびIL-8は相関を認めなかった。

(5) CSF中の自己抗体とQalbとの関係

スペースの関係からデータを示していないが、従来の報告(引用文献3)通り、CSF中抗NR2抗体陽性群ではnon-NPSLE群よりもQalbが高値となっていた。すなわち、BBBの透過性亢進によりCSF-抗NR2抗体価が上昇し、4)に示すとおり、IL-6に影響する可能性が示唆された。なおCSF中抗U1-RNP抗体の有無では差を認めなかった。さらに、CSF-DP群とaNR2群との間には差を認めなかった。われわれは当初、抗U1RNP抗体がBBBの透過性を亢進させることで、CSF-抗NR2抗体価が上昇し、CSF中IL-6やMIGを上昇させている可能性を考えていたが、本結果からその可能性は否定的であった。

(6) まとめと考察

CSF-DP群では、CSF中IL-6およびMIGが他の群よりも有意に高かった。CSF-DP群とaNR2群との間でQalbに差は認めなかったことから、抗U1RNP抗体がBBBの透過性をさらに亢進させることなく、抗NR2抗体に対して、CSF中IL-6やMIGを上昇させるような相加的作用を与えていることが示唆された。CSF中IL-6は抗NR2抗体価と明らかに相関し、またBBBの透過性亢進にも影響を受けていると考えられた。なおCSF-IL-6がすべて抗NR2抗体により誘導されているかは不明である。過去に同様の結果を議論した報告はあったが、多数の検体で証明したのは本報告が初めてである。

次に、CSF中MIGはBBBの透過性に関係する一方、抗U1RNP抗体の影響も受ける可能性が示唆された。NPSLE患者CSF中のMIG濃度はnon-NPSLEよりも高いことがすでに報告されているが、これらの自己抗体との相関を示したのは本研究が初めてである。しかしその機序については今後の課題である。

最後に、CSF中IL-8はCSF中の自己抗体に依存せず、BBBの透過性のみ依存すると考えられた。

全体としての症例数がまだ少ないため液性因子や自己抗体と特異的症状との相関は認めなかった。

本研究により、CSF中の抗NR2抗体(抗神経細胞抗体)とともに抗U1RNP抗体を測定することは、CSFのより高度な炎症を示唆することが明らかとなった。なお本研究で抗U1RNP抗体はRNA-IPPで測定しているが、この検査法はごく少量の検体で抗U1RNP抗体を測定するためには最も適している。in vitroにおいて、抗U1RNP抗体が形成する免疫複合体は、I型インターフェロンであるIFN- α の

inducer として注目されている。CSF-抗 U1RNP 抗体陽性が CSF-IFN- γ 濃度の上昇と関連していることはすでに示した(参考文献 2)が、この IFN- γ が髄腔内でいかなる細胞に作用し NPSLE に悪影響を及ぼしているかどうかは不明である。今回の研究から、抗 NR2 抗体と抗 U1RNP 抗体が CSF 中で併存することでさらに IL-6 濃度が上昇した機序に関し、抗 U1RNP 抗体が直接関与しておらず IFN- γ が間接的に関与している可能性についても今後検討していきたい。

<引用文献>

Takeshi Sato, et al. Anti-U1 RNP antibodies in cerebrospinal fluid are associated with central neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 3730-3740, 2010.
Tomoko Yokoyama, et al. Association between anti-U1 ribonucleoprotein antibodies and inflammatory mediators in cerebrospinal fluid of patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2014;23:635-642.
DeGiorgio LA, et al. A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. *Nat Med* 2001;7:1189-1193.

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 27 件)

Tomoko Yokoyama, Takao Fujii, Seiko Kondo-Ishikawa, Noriyuki Yamakawa, Masayoshi Nakano, Naoichiro Yukawa, Hajime Yoshifuji, Koichiro Ohmura, and Tsuneyo Mimori. Association between anti-U1 ribonucleoprotein antibodies and inflammatory mediators in cerebrospinal fluid of patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2014;23:635-642. DOI: 10.1177/0961203314522337
Yoshimasa Fujita, Takao Fujii, Tsuneyo Mimori, Tomomi Sato, Takuji Nakamura, Haruka Iwao, Akio Nakajima, Miyuki Miki, Tomoyuki Sakai, Takafumi Kawanami, Masao Tanaka, Yasufumi

Masaki, Toshihiro Fukushima, Toshiro Okazaki, and Hisanori Umehara. Deficient leptin signaling ameliorates systemic lupus erythematosus lesions in MRL/Mp-Faslpr mice. *J Immunol* 2014;192: 979-984. doi: 10.4049/jimmunol.1301685.
Motomu Hashimoto, Takao Fujii, Masahide Hamaguchi, Moritoshi Furu, Hiromu Ito, Chikashi Terao, Keiichi Yamamoto, Wataru Yamamoto, Takashi Matsuo, Masato Mori, Koichiro Ohmura, Hiroshi Kawabata, and Tsuneyo Mimori. Increase of hemoglobin levels by anti-IL-6 receptor antibody (tocilizumab) in rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2014;9:e98202. doi: 10.1371/journal.pone.0098202.
Takao Fujii. Direct and Indirect pathogenic roles of autoantibodies in systemic autoimmune diseases. *Allergol Int* 2014;63:515-522. doi:10.2332/allergolint.14-RAI-0801

[学会発表](計 6 件)

藤井隆夫. 免疫と内科疾患-その病態と治療最前線. 関節リウマチの病態と治療の最前線. 第111回日本内科学会総会、東京、2014.
Takao Fujii. Direct and indirect pathogenic roles of autoantibodies in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. 第43回日本免疫学会総会、京都、2014.
近藤聖子、藤井隆夫、石郷岡望、山川範之、橋本求、井村嘉孝、湯川尚一郎、吉藤元、大村浩一郎、三森経世. Neuropsychiatric SLE 患者脳脊髄液中の抗 NR2 抗体と抗 U1RNP 抗体が IL-6 に与える影響. 第 42 回日本臨床免疫学会総会、東京、2014.

[図書](計 0 件)

[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
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤井 隆夫 (FUJII, Takao)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：70255462

(2)研究分担者

橋本 求 (HASHIMOTO, Motomu)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：60512845

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

近藤 聖子 (KONDO, Seiko)
石郷岡 望 (ISHIGOOKA, Nozomi)