

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461289

研究課題名(和文) 顆粒球系細胞をターゲットとした中枢神経系脱髄疾患の疾患制御と生物学的意義の解明

研究課題名(英文) Analysis of granulocytes in inflammatory autoimmune disorders of the central nervous system

研究代表者

河内 泉 (KAWACHI, Izumi)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：40432083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：視神経器脊髄炎(NMOSD)はアクアポリン4(AQP4)水チャネル分子を発現するアストロサイトを標的とする中枢神経系自己免疫疾患である。NMOSDの早期活動病巣ではAQP4発現低下、血管周囲の免疫グロブリン/活性化補体沈着、顆粒球、マクロファージ、組織常在リンパ球の浸潤を認めたことから、AQP4自己抗体は顆粒球をはじめとした免疫細胞と共同で活動病変を形成することが示唆された。またその結果、引き起こされたアストロサイト傷害は、変性ミトコンドリア集積を介し、神経軸索変性を来し、重篤な身体機能・視機能障害を引き起こすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD) is an autoimmune disease of the central nervous system (CNS). Accumulation of granulocytes, macrophages and tissue-resident lymphocytes was evident in early active lesions with a pattern-specific loss of aquaporin-4 (AQP4) immunoreactivities in NMOSD cases. These lesions had widespread neuroaxonal damage with axonal degenerative mitochondria, via abnormal AQP4 dynamics on astrocytes. These data suggest that unique dynamics of AQP4 autoantibodies and immune cells including granulocytes might cooperate to form massive damages of the CNS and cause severe physical and visual disabilities in NMOSD.

研究分野：医歯薬学、神経病態免疫学

キーワード：視神経脊髄炎 多発性硬化症 アクアポリン4水チャネル 顆粒球系細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica spectrum disorders; NMOSD) は多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) との異同が長く論じられてきた中枢神経系 (central nervous system; CNS) の炎症性自己免疫疾患である。2004 年、2005 年に NMOSD 患者血清に AQP4 を標的とする自己抗体 (AQP4 抗体) が発見されて以来 (Lancet 2004;364:2106, JEM 2005;202:473), NMOSD は MS とは異なる独特なスペクトラムを有す疾患と考えられ始めている。これまでに NMOSD に関して我々と国内外の研究者らが明らかにした研究成果は以下の通りである。NMOSD の診断バイオマーカー AQP4 抗体を cell-based assay で測定 (Neurology 2009;73:1628, Multiple Sclerosis 2007;13:850) することにより、NMOSD では a) MS 疾患修飾薬である I 型 IFN (IFN-β) 療法の NMOSD の病態を増悪させる (Arch Neurol 2010;67:1016), b) NMOSD では髄腔内抗体産生を示唆する髄液オリゴクローナルバンドの陽性率が少ない (JNNP 2007;77:1073), c) AQP4 抗体陽性 NMOSD の薬半数は抗核抗体が陽性である (Arch Neurol 2008;65:78) ことが明らかとなった。以上から、NMOSD の基盤にある異常な免疫病態は、MS というよりも、IFN signature を持つ systemic lupus erythematosus (SLE) に類似する可能性が指摘されている。NMOSD (definite form) 脊髄炎病理では免疫グロブリンと活性化補体の沈着、AQP4 の広範な発現消失を認める (Brain 2007;130:1224, Brain 2007;130:1194, Neurology 2009;73:1628) とともに、脊髄炎のみの早期型 NMOSD (limited form) にも同様の病理所見を認める (Neurology 2009;73:1628)。以上から「NMOSD はアストロサイトフットプロセスに存在する AQP4 分子を標的とするアストロサイトパチーである」、「AQP4 抗体と補体を代表とする液性免疫機構は、NMOSD の早期・晩期の別なく、全経過を通じて病態機序の鍵を握る重要な分子である」ことが示唆される。

最近、MS に大脳皮質の脱髄と髄膜のリンパ節類似構造が明らかにされ (NEJM 2011;365:2188, Ann Neurol 2010;68:477), 認知機能障害との関連が注目されている。我々は、NMOSD においても認知機能障害を認めるが、その病理像は MS とは異なり、大脳皮質に脱髄はなく、皮質 II 層に強い神経細胞脱落と AQP4 の動態異常が存在することを明らかにした (Ann Neurol 2013;73:65)。皮質病態の観点からも NMOSD は MS とは異なるスペクトラムにある可能性がある。一方で、発症 10 年前から AQP4 抗体をもつ NMOSD の症例報告 (Neurology 2009;72:1960) や、AQP4 抗体と補体の全身投与のみでは動物モデル作成が困難であるとする報告 (Ann Neurol 2009;66:630) から、AQP4 抗体と補体という液性因子のみでは NMOSD の病態を完全に説明できないと考えられている。NMOSD

の髄液で interleukin (IL)-6, IL-1β (Neurology 2009;73:1628), IL-8, IL-17 (Brain 2005;128:988) が上昇し、NMOSD の病巣にはマクロファージの浸潤が盛んである (Brain 2002;125:1450, Neurology 2009;73:1628) ことから、AQP4 抗体による補体介在性アストロサイト障害 (complement-dependent cytotoxicity; CDC) の他にも、別個の免疫病態が潜在する可能性がある。AQP4 抗体と補体を脳内に局所注入する動物モデルの検討から、CDC の他に、antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) が NMOSD の病変形成に重要な役割を果たす可能性があり、そのエフェクターアームとしての顆粒球系細胞に注目が集まっている (J Clin Invest 2013;123:2306, Ann Neurol 2012;71:323)。

(2) 2004 年、Brinkmann らは好中球が好中球細胞外捕捉 (neutrophil extracellular traps; NETs) と呼ばれる線維網を細胞外に放出し、好中球自ら NETosis と呼ばれる細胞死を起こし、細菌を捕捉して死滅させる現象を報告した (Science 2004;303:1532)。好酸球にも類似の細胞死が存在する (ETosis)。近年、次に示す点から自己免疫疾患の発症に顆粒球系細胞由来の NETs が重要な役割を果たしていることが示されている。抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎では myeloperoxidase (MPO)-ANCA, proteinase 3 (PR3)-ANCA が好中球を直接活性化させ、細胞外に NETs を形成し、腎糸球体毛細管壊死を引き起こす (Nat Med 2009;15:623)。

SLE では DNase 阻害因子の存在により NETs の分解が遮断され、残存した死細胞成分を含む NETs が形質細胞様樹状細胞 (PDC) の Fcγ 受容体や toll 様受容体 (TLR) シグナルを介して I 型 IFN (IFNα) の産生を促す。PDC が分泌した大量の I 型 IFN は、a) 単球を成熟樹状細胞へ分化させる、b) 自己反応性 T 細胞の活性閾値を下げることで免疫寛容を破綻させる、c) NK 細胞を活性化する、d) 形質細胞芽球の誘導と分化を促し、自己抗体産生を加速させることで、SLE の発症に関連している (Immunity 2003;19:225, Nature 2010;465:937, J Immunol 2012;188:3150)。

以上 (1), (2) の研究背景を踏まえ、本研究では次の仮説を提案する。「NMOSD では顆粒球系細胞 (好中球・好酸球) の活性化と I 型 IFN シグナル亢進が、免疫寛容の破綻と AQP4 抗原に対する自己免疫応答の活性化を持続させ、NMOSD の病巣形成 (AQP4 抗体・補体によるアストロサイト障害) をもたらす。」

2. 研究の目的

本研究では「顆粒球系細胞の活性化による好中球細胞死 (NETosis) や好中球細胞外捕捉 (NETs) 形成が、I 型 IFN シグナルと協調することで、免疫寛容の破綻と AQP4 抗原に対する自己免疫応答の活性化を促し、NMOSD

の病巣形成の始動と炎症量の増幅をもたらす」という仮説を立て、以下を証明することを目的とする。(1) NMOSD では顆粒球系細胞が病変形成に何らかの役割を持つ。(2) NMOSD では顆粒球系細胞の活性化を導く「未知の自然免疫細胞群」が、感染トリガーに反応し、NMOSD の発症・再発を始動する。IL-8, IL-17, IL-6, IL-1 β などの好中球走化・炎症惹起因子を産生するマクロファージ・自然リンパ球がその候補細胞群と考えられる。(3) AQP4 抗体と顆粒球系細胞をはじめとした免疫細胞がアストロサイト傷害をもたらす、その結果、重篤な神経軸索変性を引き起こす。

3. 研究の方法

中枢神経系炎症性自己免疫疾患である NMOSD の免疫基盤における顆粒球系細胞の役割と、その活性化を導く「未知の自然免疫細胞群」を明らかにするために、免疫細胞に特異的な抗体を用いた免疫組織学的検討を行う。さらに AQP4 抗体や顆粒球系細胞をはじめとした免疫細胞によるアストロサイト傷害の結果、生じる神経軸索変性の詳細な病態機序を明らかにするために、免疫組織学的手法を用いた変性ミトコンドリア解析を行う。これらは NMOSD の剖検中枢神経病理を対象に行い、疾患対照として MS やその他の神経変性疾患を検討する。

さらに NMOSD と MS における神経軸索障害の結果、生じることが想定される神経機能障害の詳細を明らかにするために、視機能に注目し、臨床的検討を行った。具体的には、NMOSD と MS 症例の臨床経過、視機能(視力、視野)、光干渉断層法(optical coherence tomography; OCT)、MRI 画像所見を後方視的に検討した。

4. 研究成果

(1) NMOSD の早期活動病巣には AQP4 水分子の染色性低下に加え、活性化補体の血管周囲性沈着と多数の好中球、好酸球、マクロファージの浸潤を認めた。一方、非活動病巣には活性化補体の血管周囲性浸潤はなく、好中球をはじめとした顆粒球浸潤を認めなかった。以上から、好中球をはじめとした顆粒球は、活性化補体と AQP4 抗体が CDC を介してアストロサイト傷害を引き起こす早期活動病巣に特異的に浸潤し、その病変形成に何らかの役割を果たす可能性が示唆された。

(2) NMOSD の炎症性脱髄病巣には、好中球、好酸球、CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、CD20⁺ B 細胞、Iba1⁺ 活性化ミクログリア・マクロファージに加え、V α 7.2⁺ mucosal-associated invariant T 細胞をはじめとしたいわゆる組織常在リンパ球が存在した。

(3) NMOSD の視神経の脱髄プラークと periplaque white matter には phosphorylated neurofilaments (SMI31)⁺ 軸

索腫大と amyloid precursor protein (APP)⁺ スフェロイド軸索が存在し、顕著な軸索障害が存在した。また同部位に一致して、voltage-dependent anion channel (VDAC1)⁺ ミトコンドリアの著明な集積、軸索特異的ミトコンドリアドッキング分子 syntaphilin の著明な集積、陽イオンチャネル transient receptor potential melastatin 4 の異常な集積を神経軸索内に認めた。NMOSD は MS に比較して軸索障害の程度が重度であった。以上から、NMOSD には「astrocyte-neuron interaction を介した AQP4 依存性・脱髄非依存性の神経変性機構」が存在することが明らかとなった。

(4) NMOSD の網膜では、ミュラー細胞の AQP4 水分子の染色性低下、retinal nerve fiber layer (RNFL) の菲薄化、ganglion cells の減少を認めた。ミュラー細胞の AQP4 水分子の染色性低下は補体活性化と関連しないことから、CDC とは異なる機序で AQP4 抗体がミュラー細胞の機能障害を引き起こす可能性が示唆された。また RNFL 菲薄化と ganglion cells の減少は、視神経炎に伴う二次的な逆行性軸索変性と考えられた。

(5) 最後に、NMOSD と MS を対象とした視機能に着目した臨床的検討から、以下を明らかにした。NMOSD では MS と比較して視神経炎発症時の視力が有意に低下していた。NMOSD では視野検査で mean deviation 値が低下し、The Optic Neuritis Treatment Trial による視野障害分類では total loss of vision 型を呈する割合が上昇していた。MRI 画像所見では視神経炎発症時の造影病変長が、NMOSD では長く、一部の症例では視神経周囲病変が認められた。MRI による病変分布では、NMOSD は MS に比較して、intracranial segment と optic chiasm に視神経病変を持つ症例が多かった。OCT 検査では NMOSD の視神経炎罹患眼で RNFL 及び ganglion cell complex (GCC) 厚が菲薄化し、視神経炎による二次的な逆行性軸索変性が重度であることが推測された。さらに NMOSD 症例では視神経炎の発症から視力の回復に長期間を要し、回復に至らない症例も存在していた。尚、発作から 2 ヶ月を超えて視機能低下が進行する慢性進行例が 25%認められた。以上から、NMOSD では MS と比較して、重篤かつ予後不良な神経障害を生じることが明らかとなった。

以上 (1) ~ (5) の結果から、AQP4 抗体と活性化補体に加え、顆粒球系細胞と組織常在リンパ球をはじめとした免疫細胞が NMOSD の病変形成の惹起と維持に関与すること、さらにその結果として生じたアストロサイト傷害が、変性ミトコンドリア集積を介し、神経変性を誘導し、結果、重篤な身体機能障害・視機能障害を引き起こす可能性が示唆された。

2004 年、2005 年の NMO-IgG/AQP4 特異抗体の発見以来、標的自己抗原 AQP4 分子の特徴

から臨床病態が解析され、NMOSD は重度の脊髄炎と視神経炎を特徴とする疾患であることが明らかとなっている。本研究により、顆粒球系細胞をはじめとした免疫細胞が免疫寛容破綻と自己免疫応答の増幅を引き起こす可能性があること、さらに免疫・炎症病態と共に、重度の神経変性病態を引き起こすことが明らかとなり、特定の免疫分子を標的にする抗炎症治療と神経保護治療の両者がNMOSDの治療に必要であると考えられる。本研究は、将来の分子標的治療に向けた病態基盤の一部を確立したという点で意義があると考えられる。

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3件)

Kawachi I, Lassmann H. Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2017;88:137-145.

doi:10.1136/jnnp-2016-313300. 査読有
Kawachi I. Clinical characteristics of autoimmune optic neuritis. Clinical and Experimental Neuroimmunology. 2017;8(Suppl.1):8-16. DOI:

10.1111/cen3.12354. 査読有

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3件)

Kawachi I, Hokari M, Yokoseki A, Arakawa M, Saji E, Yanagawa K, Yanagimura F, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M. 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.

Kawachi I, Yokoseki A, Saji E, Hokari M, Yanagawa K, Nishizawa M. Clinical and radiological profiles of anterior visual pathway involvement in

neuromyelitis optica. 2014 Joint ACTRIMS-ECTRIMS Meeting. Boston, USA. 2014年9月.

Kawachi I, Hokari M, Saji E, Toyoshima Y, Yokoseki A, Yanagawa K, Kakita A, Takahashi H, Nishizawa M. Role of meningeal lymphoid follicle-like structures in the CNS inflammatory disorders. The 12th International Congress of Neuroimmunology. Mainz, German. 2014年11月.

[図書](計2件)

河内泉. III. 各種疾患. 7. 脱髄・免疫性疾患. 2. 多発性硬化症の「炎症・変性」と進行型多発性硬化症に対する治療の最新動向. Annual Review 神経 2017. 2017年1月発行. 206-214. 中外医学社.

河内泉, 西澤正豊. III. 免疫を治す-治療薬・治療法. 免疫抑制薬. アクチュアル脳・神経疾患の臨床. 免疫性神経疾患-病態と治療のすべて. 2016年3月発行. 164-172. 中山書店. 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

(<http://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

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

河内 泉 (KAWACHI, Izumi)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号: 40432083

(2)研究分担者

豊島 靖子 (TOYOSHIMA, Yasuko)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号: 20334675

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし