

博士論文

論文題目 中枢神経系脱髄性疾患におけるリンパ球の病態解析

氏名 松岡 貴子

中枢神経系脱髄性疾患におけるリンパ球の病態解析

東京大学大学院医学系研究科生殖・発達・加齢医学専攻

指導教員 岡 明

松岡貴子

目次

I. 要旨	5
II. 序文	7
1. 多発性硬化症と視神経脊髄炎.....	7
2. アクアポリン4.....	10
3. 視神経脊髄炎とプラズマブラスト.....	11
4. IL-6 とトシリズマブ (アクテムラ®).....	12
5. リンパ球亜分画について.....	13
6. フローサイトメトリー.....	18
III. 目的.....	20
IV. 方法.....	21
1. 中枢神経系脱髄性疾患患者末梢血単核細胞の解析.....	21
1-1. 対象患者.....	21
1-2. 解析項目.....	21
2. NMO/NMOsd へのトシリズマブ投与前後のリンパ球解析.....	22
2-1. 臨床試験デザインおよび対象患者.....	22
2-2. 解析項目.....	24
3. サンプル解析の手順.....	26
3-1. 末梢血単核細胞の分離.....	26
3-2. 血清および髄液の保存.....	27
3-3. フローサイトメトリーによる解析.....	27
3-4. 培養実験.....	28
3-5. 抗 AQP4 抗体の測定.....	29
4. 統計解析.....	31

V. 結果	32
1. 中枢神経系脱髄性疾患患者末梢血単核細胞の解析	32
2. NMO/NMOsd 患者への TCZ 投与前後のリンパ球解析	37
2-1. リンパ球数の変化	37
2-2. B 細胞の変化	37
2-3. T 細胞の変化	41
2-4. 自然免疫系および自然リンパ球系細胞の変化	45
2-5. 抗 AQP4 抗体の変化	46
VI. 考察	49
1. 中枢神経系脱髄性疾患患者末梢血単核細胞の解析	49
2. NMO/NMOsd 患者への TCZ 投与前後のリンパ球解析	52
2-1. TCZ 投与後の B 細胞の変化について	52
2-2. TCZ 投与後の T 細胞の変化について	52
2-3. TCZ 投与後の自然免疫系および自然リンパ球系細胞の変化について	54
2-4. TCZ 投与後の NMO/NMOsd 患者抗 AQP4 抗体の変化について	57
2-5. IL-6 の NMO/NMOsd 病態への影響について	61
VII. 結論	64
VIII. 謝辞	67
IX. 文献	68

I. 要旨

多発性硬化症および視神経脊髄炎は中枢神経系の脱髄性疾患で、その病態に自己免疫応答が深く関与している。本研究では、まず、中枢神経系脱髄性疾患患者の臨床サンプルを用いて、B 細胞の解析を行った。この結果、視神経脊髄炎に加えて再発寛解型多発性硬化症の一部で、B 細胞の亜分画に数的異常を見出した。次に、視神経脊髄炎患者への抗インターロイキン 6 受容体抗体の投与前後の詳細なリンパ球解析を通して、その免疫的な疾患背景に、複数系統のリンパ球の数的異常および治療後の改善を見出した。これらの知見は、中枢神経系自己免疫性脱髄性疾患の病態に迫る上で貴重なデータであり、今後個々の患者の病態解明および治療選択に役立つと思われる。

略語一覽

AQP4	aquaporin 4
BAFF	B cell activating factor of the TNF family
BSA	bovine serum albumin
CHO	Chinese hamster ovary
CMS	conventional MS
CSF	cerebrospinal fluid
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
EDSS	expanded disability scaling score
Fc γ R	Fc γ receptor
HLA	human leukocyte antigen
IFN- β 1	interferon beta 1
IFN- γ	interferon gamma
Ig	immunoglobulin
IL-6	interleukin 6
IL-6R	interleukin 6 receptor
MAIT cells	mucosal-associated invariant T cells
MFI	median fluorescent intensity
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	multiple sclerosis
NMO	neuromyelitis optica
NMOsd	NMO spectrum disorder
NOD	nucleotide-binding and oligomerization domain
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PPMS	primary progressive MS
RRMS	relapsing-remitting MS
SD	standard deviation
SEM	standard error of mean
SPMS	secondary progressive MS
TCZ	tocilizumab
TGF- β	transforming growth factor- β

II. 序文

1. 多発性硬化症と視神経脊髄炎

多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) は中枢神経系の脱髄性疾患で、臨床症状および画像診断上空間的、時間的に多発する主に頭蓋内の脱髄巣の存在の証明で診断される¹。欧米に多く、生活習慣の西洋化に伴うものか近年では日本でも増加傾向にあり、2003年の本邦の推定罹患率は人口10万対7.7で、推定患者数は1972年と比較して4倍と算出されている²。症状は病巣の位置により多彩で、患者の日常生活は感覚神経障害による表在感覚の鈍麻やしびれ、運動神経障害による歩行障害や自律神経障害による排尿障害などで著しい不便を強いられる³。明らかな再発がないのに病状が進行する一次進行型 (primary progressing MS, PPMS) と、再発後にほぼ症状がないところまで回復する寛解に至り、再発と寛解を繰り返す再発寛解型 (relapsing-remitting MS, RRMS)、また再発寛解型が治療抵抗性となり障害が次第に蓄積する二次進行型 (secondary progressive MS, SPMS) に大きく分けられる⁴。このうち、RRMS が最も多い。RRMS の疾患特異的治療としては、第一選択薬のインターフェロンβ1 (interferon β1, IFN-β1) 製剤の皮下および筋肉内注射があるが、約半数の患者では効果がないか副作用で継続が困難となる^{5,6}。

MS の病因として単一のものとは同定されていない。ゲノムワイド遺伝子解析からは、HLA 抗原やヘルパーT細胞、制御性T細胞に関連する遺伝子が疾患感受性遺伝子

として報告され、何らかの細胞性免疫的機序が関与していると考えられている⁷。また、脳脊髄液(cerebrospinal fluid, CSF)中のオリゴクローナルバンドの存在も、髄腔内で免疫グロブリン(immunoglobulin, Ig)がクローン増殖性に産生されていることを示し⁸、何らかの自己抗原に対する反応を見ていると考えられるが、抗原決定基はこれまでのところ同定されていない。家族内発症が多いものの、一卵性双生児でMSの疾患浸透性が30%程度にとどまることなどから⁹、MSは、自己免疫に関連した遺伝的背景を持った人に食生活や感染症などの環境要因が関わって発症する多因子疾患と考えられる¹⁰。

視神経脊髄炎(neuromyelitis optica, NMO)は、2003年に新たに確立された比較的新しい病名であるが、その疾患概念自体は古くからあり、Devic病やアジア型多発性硬化症や、視神経脊髄型多発性硬化症などと呼ばれていたものが含まれる¹¹。日本を含むアジアに多く、欧米には少ない¹²。2003年の本邦の調査では、NMOを含むと考えられる視神経脊髄型多発性硬化症は、通常型MSの約4分の1の頻度とされていて²、これは人口10万対1.27に相当する。世界的には10万対0.053~0.40の罹患率とされている¹³。NMOは、視神経炎、急性脊髄炎の存在と、補助項目3つのうち2つを認めることで診断される¹⁴(図1)。MSより年上の世代の発症が多く¹⁵、病巣は主に視神経と脊髄で、発症後短期間で失明に至ることもある深刻な疾患である。大脳病変は発症当初は認められないことが多いが、あったとしてもMSとは形状が異なるとされ

ている¹⁶。これらの患者に RRMS の治療薬である IFN-β1 を投与すると、疾患が悪化することが知られている^{17, 18}。再発性視神経炎や再発性脊

図1 NMO 診断基準

- ◆ 視神経炎
- ◆ 急性脊髄炎
- ◆ 3つの補助基準のうち少なくとも2つ
 1. MRI 上、3椎体以上にわたる脊髄の連続病変
 2. MS の診断基準*に合わない脳 MRI 所見
 3. NMO-IgG 陽性

*ここで述べられている MS の診断基準の MRI 所見は Paty 基準である。

Paty 基準

- 4つ以上の白質病変があること もしくは
- 一つが側脳室周囲の時は3病変が存在すること。

髄炎、自己免疫疾患合併の視神経炎や脊髄炎などをさす、NMO 類縁疾患 (NMO spectrum disorder, NMOsd) と呼ばれる概念もあり¹⁹ (図2)、診断基準は近いうちにこれらをまとめたものとして改訂される可能性がある。

図2 NMO 類縁疾患

- ◆ NMO
- ◆ 限局型 NMO
 - ◆ 特発性単相性もしくは再発性の長い脊髄炎 (MRI で3椎体以上にわたるもの)
 - ◆ 視神経炎 (再発性もしくは両側同時発症のもの)
- ◆ アジア型視神経脊髄型多発性硬化症
- ◆ 全身性自己免疫疾患に合併した視神経炎もしくは長い脊髄炎
- ◆ NMO に典型的な脳病変 (視床下部、脳梁、側脳室周囲、もしくは脳幹部) を伴った視神経炎もしくは脊髄炎

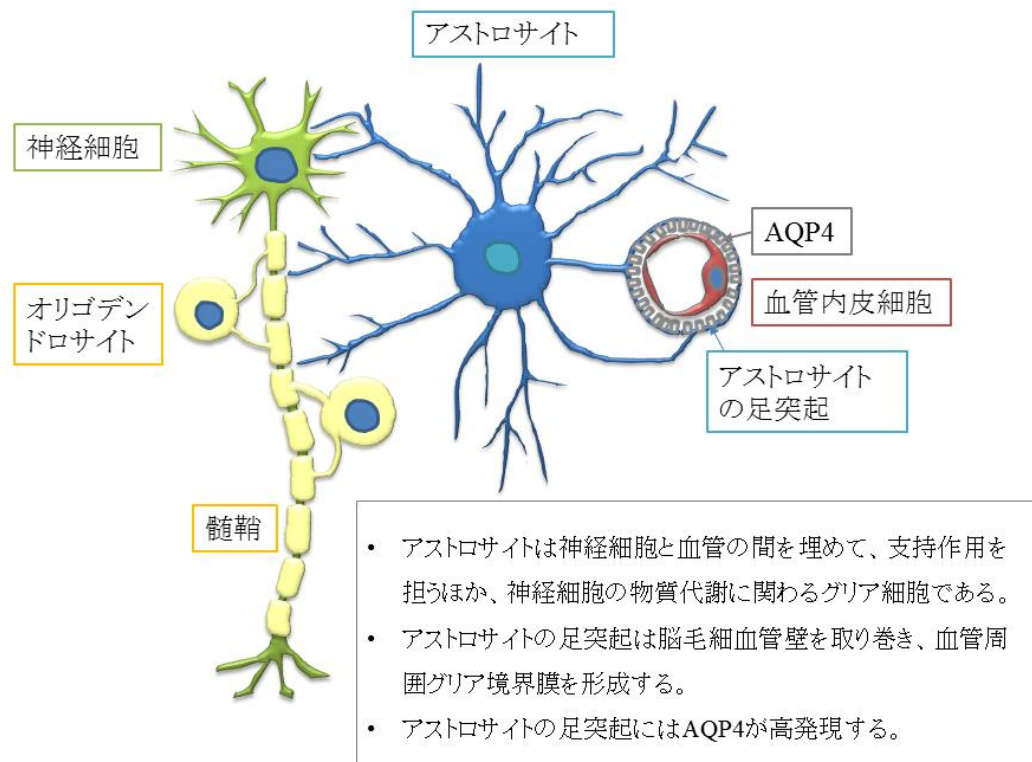
NMO には MS にあるような疾患特異的治療薬がまだなく、急性期に大量ステロイドパルス治療を行い、その後少量経口ステロイド治療に移行する免疫抑制療法が主に

行われている。しかし、耐糖能異常や大腿骨骨頭壊死などの副作用も避けられず、新たな薬剤が待ち望まれている。

2. アクアポリン4

NMO の疾患特異的マーカーとして、脳血液関門付近に結合する自己抗体が存在することが 2004 年に発表され²⁰、それが選択的水チャンネルであるアクアポリン4 (aquaporin 4, AQP4) に対する抗体であることが 2005 年に同定された²¹。AQP4 は、中枢神経系ではアストロサイトの足突起に高発現する²²(図 3)。AQP4 には翻訳開始部位の違いによって M1 と M23 の二つのアイソフォームがあり、中枢神経系では M23 が

図3 アストロサイトとAQP4



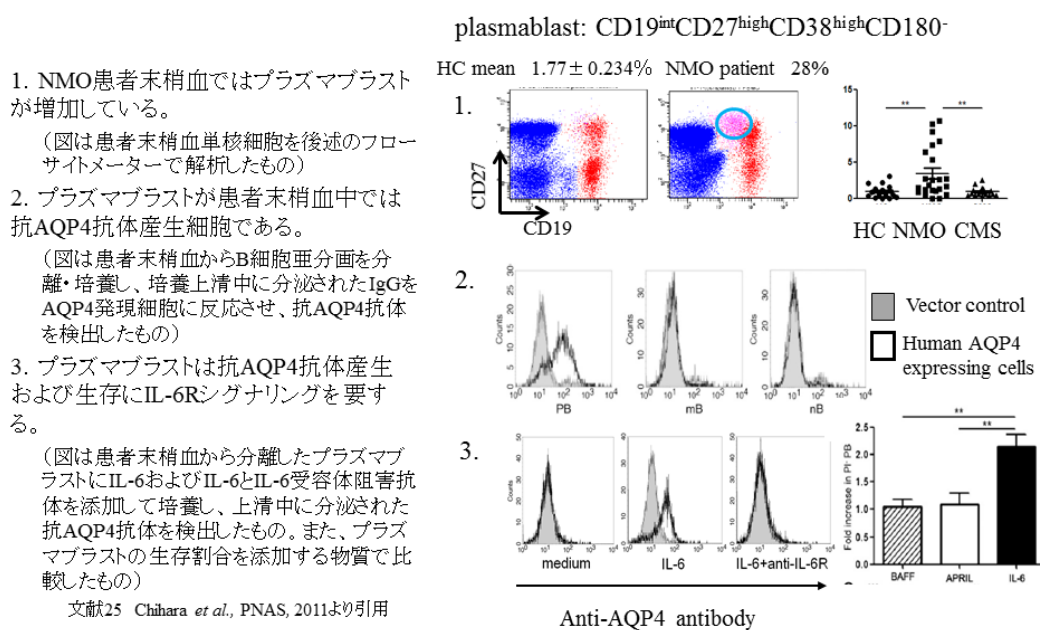
主要である。NMO では、自己抗体が AQP4 に結合し、補体依存性にアストロサイト傷害を起こすことが疾患の発症機序と考えられている²³。

IFN- β 1 治療への反応性を考慮すると、MS と NMO の鑑別は非常に重要である。抗 AQP4 抗体陰性 NMO 患者も少なからず存在し、また、抗 AQP4 抗体は治療によって経過中に陰転化することもある²⁴。したがって、抗 AQP4 抗体の意義に関しては、病原性があり²³、病勢を反映し²⁴、疾患特異的であり²¹、陽性であれば大いに有用であるが、陰性所見に関してはやや慎重な扱いが必要である。

3. 視神経脊髄炎とプラズマブラスト

NMO 患者末梢血単核細胞中では、プラズマブラスト(plasmablast)という B 細胞の

図4 視神経脊髄炎患者では末梢血中プラズマブラストが増加し、その生存はIL-6Rシグナリングを要する

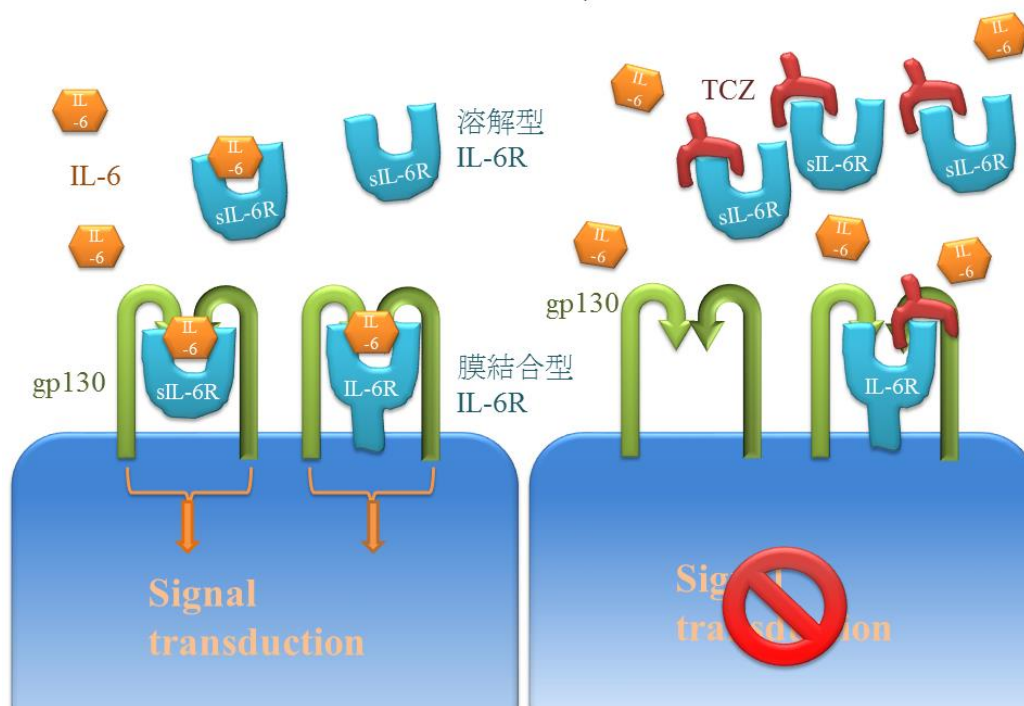


亜分画が通常型 MS 患者 (conventional MS, CMS) や健康コントロール (healthy control, HC) に比較して増加していることが報告されている。この細胞集団は、生存にインターロイキン 6 (interleukin 6, IL-6) を必要とする。また、患者末梢血に存在する中では、この細胞が NMO の自己抗体である抗 AQP4 抗体を産生する集団であり、なおかつその過程に IL-6 を要することが報告されている²⁵ (図 4)。

4. IL-6 とトシリズマブ (アクテムラ®)

細胞から分泌され、受容体に結合して細胞間の情報伝達を担う低分子タンパク質の総称をサイトカインという。IL-6 は当初、Interferon-β2、26K 因子、B 細胞刺激因子 2、ハイブリドーマ成長因子など、研究者によって機能が同定されるたびに別の名前が付

図5 トシリズマブ (Tocilizumab, TCZ) とIL-6受容体



けられていた、多機能なサイトカインである²⁶。特に、生体防御にかかわる免疫反応、造血作用や急性期反応などの中心的役割を担っている。IL-6 受容体 (IL-6 receptor, IL-6R) には膜結合型と溶解型の二つがあり、いずれも膜結合タンパクである gp130 と結合してシグナル伝達を起こす²⁷(図 5、左)。

IL-6 のシグナル伝達阻害剤としてすでにトシリズマブ (tocilizumab, TCZ, 商品名アクテムラ[®]) が関節リウマチ治療薬として販売されている²⁸。TCZ は膜結合型と溶解型の両方の受容体に結合し、IL-6 が受容体に結合することを阻害する(図 5、右)。この結果、IL-6R を介したシグナル伝達が阻害され、抗炎症効果を発揮する。この抗体は高度にヒト化してあるため、阻害抗体も体内で産生されにくいという特徴を持つ。

5. リンパ球亜分画に

ついて

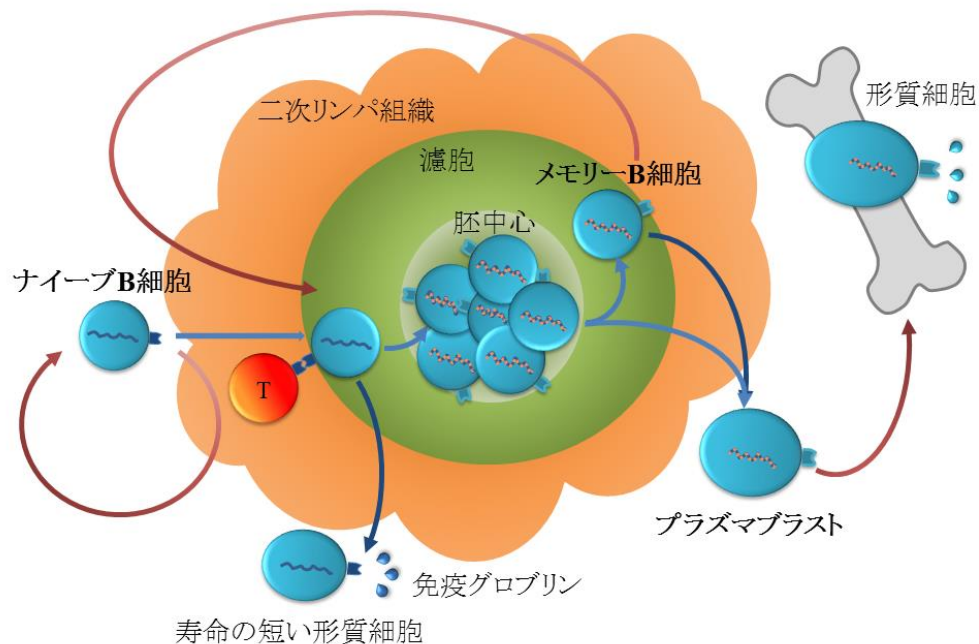
今回解析の対象としたリンパ球の各亜分画について概説する(図 6)。

図 6 白血球の分類

- ◆ リンパ球前駆細胞由来
 - ◆ B 細胞
 - ◆ ナイーブ B、メモリーB、プラズマブラスト
 - ◆ T 細胞
 - ◆ Main stream T cells: CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells
 - ◆ Innate T cells
 - ◆ $\gamma\delta$ T cells
 - ◆ NKT cells: iNKT cells, MAIT cells
- ◆ 骨髄由来
 - ◆ 好中球
 - ◆ 好塩基球
 - ◆ 好酸球
 - ◆ 単球
 - ◆ Natural Killer cells (NK cells)

B 細胞は、CD19 陽性細胞として同定されるが、末梢血中の B 細胞はさらに大きくナイーブ B 細胞、メモリーB 細胞、プラズマブラストの 3 つに分けられる²⁹(図 7)。骨髄で産生されたナイーブ B 細胞は脾臓やリンパ節などの二次リンパ組織で T 細胞と接触し、MHC クラス II 抗原を介して活性化されるとメモリーB 細胞に成熟する。この刺激を受けないナイーブ B 細胞は血流に戻って体内を循環し、次の二次リンパ組織に向かう。成熟したメモリーB 細胞はそのまま、あるいは一度リンパ組織を離れて別のリンパ組織内でさらに刺激を受けて成熟、増殖すると考えられる³⁰。これらの中からプラズマブラストや形質細胞が産生され、抗体産生を担うと考えられる³¹。

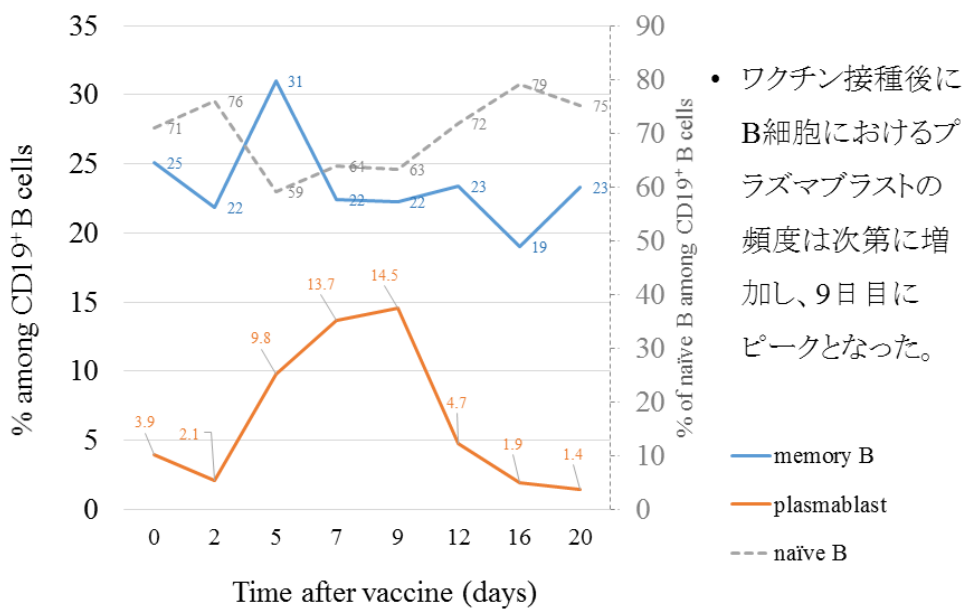
図7 B細胞分画



プラズマブラストは、全身性エリテマトーデスや若年性皮膚筋炎患者末梢血での増加が知られている^{32, 33}。また、健康な人でも、ワクチン接種後に一過性に増加し、液性

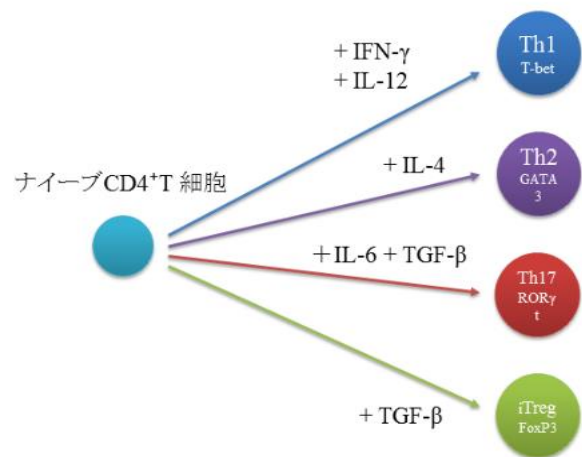
免疫応答に関連していることが予測されている(図 8)。自己抗体介在性の病態である NMO 患者では、T 細胞性自己免疫疾患と考えられている通常型 MS 患者に比較して、B 細胞に占めるプラズマブラストの割合の増加が指摘されている²⁵。

図8 ワクチン接種後のプラズマブラストの増加



T細胞はCD3陽性細胞として同定される。CD4陽性T細胞は二次リンパ組織で免疫応答の方向付けを行うヘルパー細胞として働くが、周囲のサイトカインの環境により分化の方向が決定づけられる³⁴(図 9)。インターフェロン γ (interferon γ ,

図9 ナイーブCD4陽性T細胞の分化



IFN- γ)や IL-2 存在下では細胞性免疫を惹起する方向に免疫反応を誘導する Th1 細胞に、IL-4 存在下では液性免疫を惹起する方向に誘導する Th2 細胞に分化する。これらの分化にはそれぞれ必要なサイトカインと転写因子とが同定されている。また IL-17 を産生し、寄生虫排除や自己免疫応答への関与が高いとされる Th17 細胞も同定されている。最近の知見では、Th17 細胞の分化には TGF- β (transforming growth factor- β)と IL-6 が必要であるが³⁵、TGF- β のみであると誘導性制御性 T 細胞の方向に分化が進むため、自己免疫と免疫反応の制御について IL-6R シグナリングの存在が注目されている。

自然リンパ球は自然免疫と獲得免疫の橋渡しをするリンパ球として注目されているリンパ球である³⁶。免疫系は、そもそもは、外来微生物などの非自己や、感染細胞やがん細胞などの自己の非自己化を認識して排除する生体反応である。Toll 様受容体や NOD (nucleotide-binding and oligomerization domain) 様受容体などの外来抗原に特異的な分子構造を認識するセンサーを用いて、自己にはないパターンを認識することによって素早く反応し外敵を排除する自然免疫は、昆虫でも見られる。この自然免疫は、生体がもともと持っている免疫という意味で、ヒトではマクロファージやナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞が担うと考えられる。これに対して、個々の抗原の特異性を認識し記憶するのが獲得免疫であり、これに動員されるのが T 細胞と B 細胞のリンパ球である。この免疫機構は脊椎動物以降で発達してきたシステムである。リンパ球

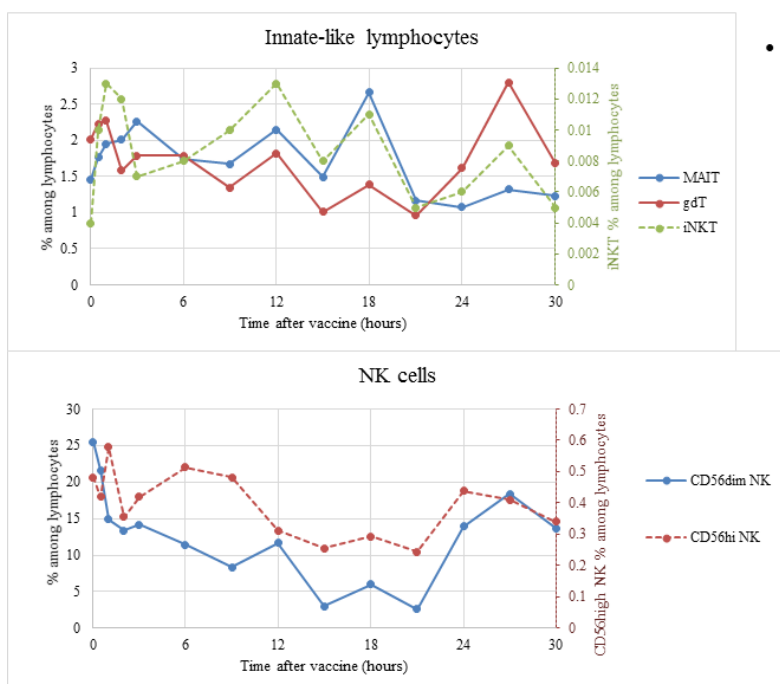
は、多様な抗原に対応するために抗原受容体の遺伝子の再組み換えをして多彩な受容体レパートリーを保つ。この際に、自己反応をしないような制御の仕組みも必要になったが、この制御を担うのが制御性 T 細胞 (regulatory T cells, Treg cells) である。この一群は転写因子 FoxP3 を発現しており、自己寛容と免疫の恒常性の維持に不可欠である³³。

リンパ球の中には、受容体が invariant すなわち不変で、サイトカイン分泌などの免疫調整を行う一分画が存在する。これらのリンパ球は受容体のレパートリーが少なく、同じ受容体で自己と外来の両方の抗原を認識し、そして獲得免疫よりも早く反応を起こす点で、自然免疫に近い働きを担いながらも、サイトカイン分泌などを通して獲得免疫の調節も行うため、自然免疫と獲得免疫の橋渡しを担うと考えられる³⁶。これらの中に、腸管粘膜に多く存在する粘膜関連インバリアント T (mucosal-associated invariant T, MAIT) 細胞や、インバリアントナチュラルキラー T (invariant natural killer T, iNKT) 細胞や、ガンマデルタ T 細胞受容体を持つ $\gamma\delta$ T 細胞が含まれる。

これとは逆に、自然免疫系の細胞の中にサイトカイン分泌を行って免疫調節を行う細胞も存在する。NK 細胞はその名の通り先行感作がなくても標的細胞を見分けて「自然に殺す」骨髄由来の小リンパ球であるが、その中でも CD56 強陽性 NK 細胞は細胞傷害性が低く、多くのサイトカインを産生して免疫調節機能を担うことが知られている³⁸。

これらの細胞集団は、早い免疫応答を担うとされ、B 細胞が 5-9 日程度で反応のピークを認めたのに対し、ワクチン接種後、時間単位で血中頻度の変動を認めた(図 10)。

図10 ワクチン接種後の自然リンパ球とナチュラルキラー細胞の変動



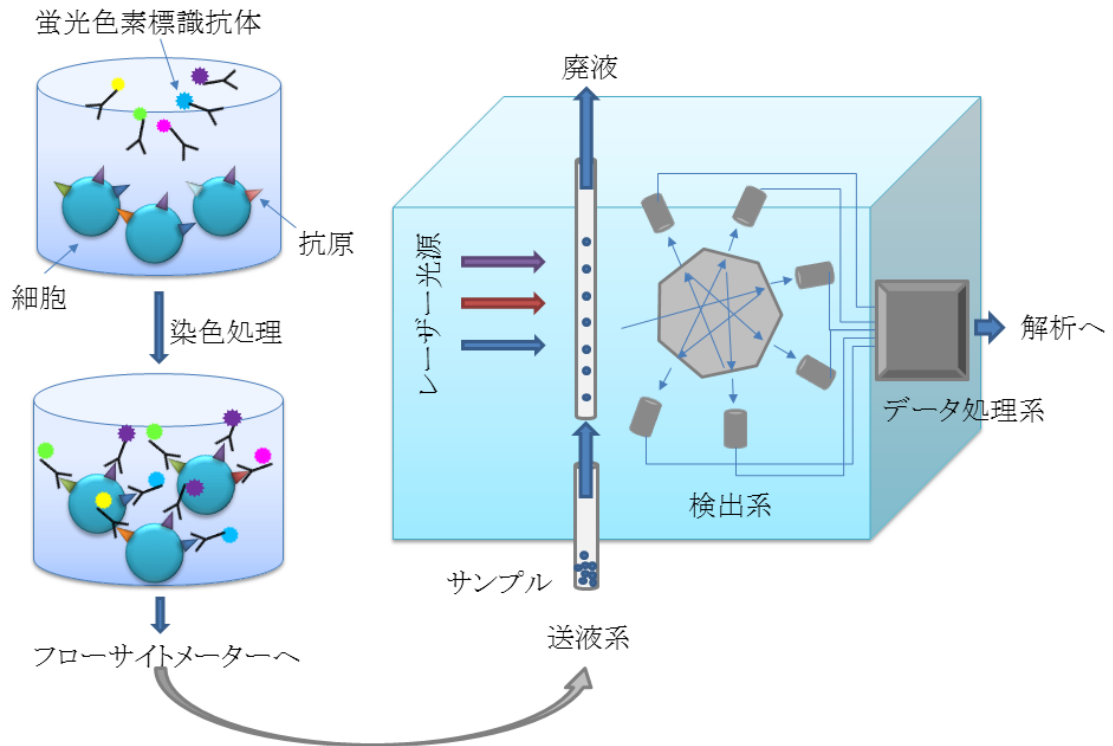
- 自然リンパ球(上グラフ)およびNK細胞(下グラフ)のワクチン接種後のリンパ球における割合の変動をグラフ化したもの。

接種後、0.5, 1, 2, 3, 6, 以降3時間おきにサンプリングしたところ、比較的早期に末梢血中の割合が変動していた。

6. フローサイトメトリー

本研究で用いたフローサイトメトリーの仕組みについて概説する。この技術は、細胞集団における個々の細胞のサイズ、膜表面および細胞内部(細胞質内と核内)の抗原を細胞ごとに高速で検出するもので³⁹、これを実行する装置をフローサイトメーターと呼ぶ(図 11)。

図11 フローサイトメーター



まず、細胞は一つ一つばらばらの状態にされ、各抗原に対応する蛍光色素標識抗体で染められる。この処置をした細胞を検出器にかけて、波長の異なるレーザー光を当て、それぞれの反射や屈折光を検出することで、各細胞の相対的サイズや色素の染まり具合を多重に測定する。測定データは、解析用ソフトを用いて、母細胞集団中にどのサイズでどの標識色素を持つ細胞がどれくらいの割合でいるかを計算する。

Ⅲ. 目的

本研究は、中枢神経系脱髄性疾患である多発性硬化症と視神経脊髄炎において、ヒト臨床サンプルを用いて免疫学的見地から病態を探ることを目的とした。

IV. 方法

1. 中枢神経系脱髄性疾患患者末梢血単核細胞の解析

1-1. 対象患者

本研究の対象は、2011年11月から2012年3月までの5か月間に、国立精神・神経医療研究センター病院神経内科を受診した外来患者、およびその間に入院した中枢神経系脱髄性疾患が疑われた患者連続52症例であった。主治医からの依頼を受けて、52人の患者(MS 28例、NMO 16例、抗AQP4抗体陰性NMO 2例、脊髄炎2例、その他の疾患としてSPMS、radiologically isolated syndrome、頸椎性脊髄症、腰椎症が各1例合計4例)から末梢血単核細胞中のB細胞におけるプラズマブラストの頻度を測定した。書面による同意取得ののち、10~20mlのヘパリン化血を得た。また、健康コントロールとして、年齢・性別を合わせたボランティア6人から同様にヘパリン化血を得た。なお、この研究は「多発性硬化症の病態解明を目的とした多発性硬化症患者の糞便検査と血液・髄液保存に関する研究」の一環で、国立精神・神経医療研究センターの倫理委員会の承認を得ており、承認番号は20-2-5であった。

1-2. 解析項目

本研究では、後述する方法で分離・染色処理した末梢血単核細胞におけるB細胞集団の亜分画の頻度測定を行った。B細胞亜分画は以下の抗原で分類した。

ナイーブ B 細胞 CD3⁻CD14⁻CD19⁺CD27⁻ lymphocytes

メモリーB 細胞 CD3⁻CD14⁻CD19⁺CD27⁺CD180⁺CD38⁻ lymphocytes

プラズマブラスト CD3⁻CD14⁻CD19^{dim}CD27^{high}CD180⁻CD38⁺ lymphocytes

2. NMO/NMOsd へのトシリズマブ投与前後のリンパ球解析

2-1. 臨床試験デザインおよび対象患者

NMO が自己抗体抗 AQP4 抗体によるアストロサイト傷害による脱髄疾患であること、患者末梢血ではプラズマブラストが抗 AQP4 抗体産生能を持つこと、プラズマブラストからの抗 AQP4 抗体産生とプラズマブラストの生存に IL-6 シグナリングが必要であることを受けて、NMO のプラズマブラストを標的にした治療として抗 IL-6R 抗体 TCZ に着目した。

標準治療に抵抗性の NMO 症例に対する TCZ 投与の臨床的安全性および有効性を判定するために、国立精神・神経医療研究センターは視神経脊髄炎におけるトシリズマブの適応外使用に関する研究 (UMIN000005889) (倫理委員会承認番号 A2011-019) を立ち上げた。3 人の抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者に半年間 8mg/kg の TCZ を月 1 回点滴静注し、臨床経過と抗 AQP4 抗体、末梢血中の免疫学的指標の関連性を検討した。安全性と有効性が確認されたのち⁴⁰、視神経脊髄炎におけるトシリ

ゾマブの安全性と有効性に関する多施設共同研究 (UMIN000007866) (倫理委員会承認番号 A2011-062)を開始した。これは 15 人の抗 AQP4 抗体陽性 NMO または NMOsd 患者に 2 年間、月 1 回 8mg/kg の TCZ を点滴静注するもので、先行研究の 3 人も先行研究終了後この研究に移行した。2 年が経過したのち⁴¹、研究期間は 6 年間に延長した。臨床研究の対象患者は 20 歳から 65 歳までの標準治療抵抗性の NMO/NMOsd 患者であった。総合障害度 (EDSS⁴²) 7 以上の重篤な身体機能障害がある例 (車いす生活やベッド上生活など) は除外された。スクリーニング検査で結核や真菌感染の除外や白血球数減少やリンパ球数減少などがなく TCZ 投与が可能なことを確認したのちエントリーした。

本研究では、この臨床研究の免疫学的背景を探ることを目的とした。本研究でリンパ球解析の対象となった NMO/NMOsd 患者は、TCZ 投与期間が 2014 年 7 月までに 1 年を経過した 7 人であった (表 1)。

表 1 患者背景

	年齢/ 性別	発症時 年齢	病型	EDSS	再発 回数	以前の 免疫治療	現在の 免疫治療
Pt 1	37/F	23	NMO	3.5	20	IFN-β1, IVIg	PSL/AZA
Pt 2	38/F	27	NMO	6.5	9	IFN-β1, PSL	AZA
Pt 3	26/F	21	NMO	3.5	6	PSL	PSL
Pt 4	31/M	12	NMO	6.0	16	IFN-β1, MIT	PSL/AZA
Pt 5	23/F	21	NMOsd (視神経炎)	3.0	7	AZA	PSL/Tacrolimus
Pt 6	35/F	29	NMOsd (脊髄炎)	3.5	3	PSL	PSL
Pt 7	40/F	23	NMO	6.5	26	PSL, IFN-β1	PSL

AZA: azathioprine (アザチオプリン)、IVIg: intravenous Ig (Ig 製剤静脈注射)、
MIT: mitoxantrone (ミトキサントロン)、PSL: prednisolone (プレドニゾロン)

毎月一回の TCZ 投与直前の病院採血に合わせて、ヘパリン化血 25ml と血清採血管に 6ml のサンプルを採取した。また、半年もしくは 1 年おきに髄液サンプルも採取した。

健康コントロールとして、年齢を合わせた基礎疾患がない非喫煙ボランティア 8 人から同意取得ののちヘパリン化血と血清を採取した。健康診断時にサンプル採取を行い、後日健康診断の結果の白血球分画から各リンパ球サブセットの数の算出を試み、一部を培養実験に用いた。

また、NMO 患者コントロールとして、外来 NMO 患者から同意取得ののち、「多発性硬化症の病態解明を目的とした多発性硬化症患者の糞便検査と血液・髄液保存に関する研究(国立精神・神経医療研究センター倫理委員会承認番号は 20-2-5)」の一環として末梢血サンプルを採取し、培養実験に用いた。

2-2. 解析項目

患者末梢血中単核細胞に含まれる、プラズマブラストを含む B 細胞と、制御性 T 細胞、濾胞ヘルパー T 細胞、Th1、Th2、Th17 のヘルパー T 細胞を含む T 細胞、および自然リンパ球の各リンパ球を蛍光色素標識抗体で染色し、フローサイトメーターで測定した。各細胞は以下の抗原で同定した。

B 細胞

トランジショナル B 細胞 (transitional B cells) $CD19^+IgD^+CD24^{high}CD38^{high}$

lymphocytes

成熟ナイーブ B 細胞 (mature naïve B cells) $CD19^+IgD^+CD24^+CD38^+$ lymphocytes

メモリーB 細胞 (memory B cells) $CD19^+IgD^-$ lymphocytes

プラズマブラスト (plasmablasts) $CD19^+IgD^-CD27^{high}CD38^{high}$ lymphocytes

T 細胞

制御性 T 細胞 (regulatory T cells, Treg cells) $CD3^+CD4^+FoxP3^+$ lymphocytes

活性化制御性 T 細胞 (activated Treg cells) $CD3^+CD4^+CD45RA^-FoxP3^{high}$

lymphocytes

濾胞ヘルパー T 細胞 (follicular helper T cells, Tfh cells)

$CD3^+CD4^+CD45RA^-CXCR5^+$ lymphocytes

1 型ヘルパー T 細胞 (type 1 helper T cells, Th1 cells)

$CD3^+CD4^+CD8^-CD45RA^-IFN-\gamma^+$ lymphocytes

2 型ヘルパー T 細胞 (type 2 helper T cells, Th2 cells)

$CD3^+CD4^+CD8^-CD45RA^-IL-4^+$ lymphocytes

IL-17 産生ヘルパー T 細胞 (Th17 cells) $CD3^+CD4^+CD8^-CD45RA^-IL-17^+$
lymphocytes

自然免疫系および自然リンパ球系細胞

CD56 強陽性 NK 細胞 (CD56^{high} NK cells) $CD3^-CD56^{\text{high}}$ lymphocytes

CD56 弱陽性 NK 細胞 (CD56^{dim} NK cells) $CD3^-CD56^{\text{dim}}$ lymphocytes

iNKT 細胞 (iNKT cells) $CD3^+\gamma\delta TCR-V\alpha 7.2^-CD1d^+$ T lymphocytes

MAIT 細胞 (MAIT cells) $CD3^+\gamma\delta TCR^-CD1d^-V\alpha 7.2^+CD161^+$ T lymphocytes

$\gamma\delta$ T 細胞 ($\gamma\delta$ T cells) $CD3^+\gamma\delta TCR^+$ T lymphocytes

3. サンプル解析の手順

3-1. 末梢血単核細胞の分離

ヘパリン化血はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で二倍に希釈し、15ml 蓋付きチューブに 4ml ずつ分注された Ficoll-Paque PLUS の上に静かに層を形成するように乗せたのち、加速・減速を弱くした遠心機で 1800 回転/分で 30 分遠心した。30 分後、リンパ球、単球、好塩基球、血小板の含まれる層を別チューブに回収し、PBS を加えて通常の加速・減速で 1800 回転/分で 5 分遠心し、上清を捨てて Ficoll-Paque を除いた。そ

のチューブに新たにPBSを加えて1400回転/分で5分遠心し、血小板を除いた。新たに適量のPBSを加えて細胞浮遊液を作成し、細胞数を数えた。こうして回収された末梢血単核細胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)を以後の解析に用いた。

3-2. 血清および髄液の保存

血清は、専用採血管に採取されたものを3000回転/分で10分遠心して、小分割して解析時まで保存した。

CSFサンプルは、1500回転/分で10分遠心して、上清を回収して保存した。

3-3. フローサイトメトリーによる解析

PBMCは測定対象を同定するために必要な蛍光色素標識抗体で多重染色した。細胞表面抗原の染色では、細胞浮遊液に蛍光色素標識抗体を加え、10~30分氷上静置して染色したのち、余分な蛍光色素を除去した。それに引き続く細胞内抗原の染色では、細胞膜に穴をあける工程が必要であるが、そのままでは細胞内の抗原が出てきてしまうため、まず細胞を2%パラホルムアルデヒドで固定した。そののち0.1%サポニン溶解液で膜に穴をあけ、サポニン存在下で蛍光色素標識抗体を加えて染色し、余分な色素をサポニン存在下で除去した。

細胞内サイトカインの染色では、 -80°C に保存しておいた PBMC を溶解し、ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 50ng/ml とイオノマイシン(Ionomycin) 500ng/ml 存在下で刺激しながら、細胞が産生したサイトカインが細胞外に分泌されるのを阻害するために培養液中にモネンシンを $2\mu\text{M}$ になるよう加え、 37°C 10% 二酸化炭素濃度のインキュベーターで 4 時間培養後に回収した。そして細胞表面抗原染色および細胞固定後に細胞内サイトカインの染色を行った。

このようにして処理した細胞浮遊液を CANTO II および ARIA II のフローサイトメーターで測定し、各細胞群の母集団における割合を Flowjo ソフトウェアで解析した。同日に病院採血検体がある場合は、白血球分画から各細胞集団の $1\mu\text{l}$ 中の数を算出した。

3-4. 培養実験

HC および外来 NMO 患者の末梢血単核細胞を、二群に分けて、片方は抗 IL-6R 阻害抗体で 20 分間前処置した。抗 CD3 抗体($2\mu\text{g}/\text{ml}$)と抗 CD28 抗体($4\mu\text{g}/\text{ml}$)で固相化した 96 穴平底プレートで、細胞の生存が伸びることを期待して 10%ウシ胎児血清と IL-2 200U/ml を添加した AIM-V 液体培地を用いて、1 穴あたり 6×10^5 の PBMC を 37°C 10% 二酸化炭素濃度のインキュベーターで培養した。3 日、5 日、7 日、10 日、14 日で細胞を回収し、CANTO II のフローサイトメーターで測定し、サイズゲートで

リンパ球を同定してそれに占める NK 細胞の割合を解析した。

また、HC 末梢血単核細胞から ARIA II のフローサイトメーターを用いて単離した CD56 強陽性 NK 細胞、CD56 弱陽性 NK 細胞、メモリーCD4 細胞、抗原提示細胞 (CD3 陰性 CD56 陰性リンパ球) の様々な組み合わせを同様に固相化した 96 穴平底プレートで前述の液体培地を用いて 3 日間 37°C 10% 二酸化炭素濃度の培養器で培養した。すべての培養条件をさらに二群に分けて、片方は細胞を抗 IL-6R 阻害抗体で前処置してから培養した。なお、培養細胞数は 1 穴あたり、CD56 強陽性 NK 細胞 2×10^4 、CD56 弱陽性 NK 細胞 4×10^5 、メモリーCD4T 細胞 4×10^5 、CD3 陰性 CD56 陰性抗原提示細胞 2×10^5 とした。3 日後に細胞を回収し、同様に測定・解析をした。

3-5. 抗 AQP4 抗体の測定

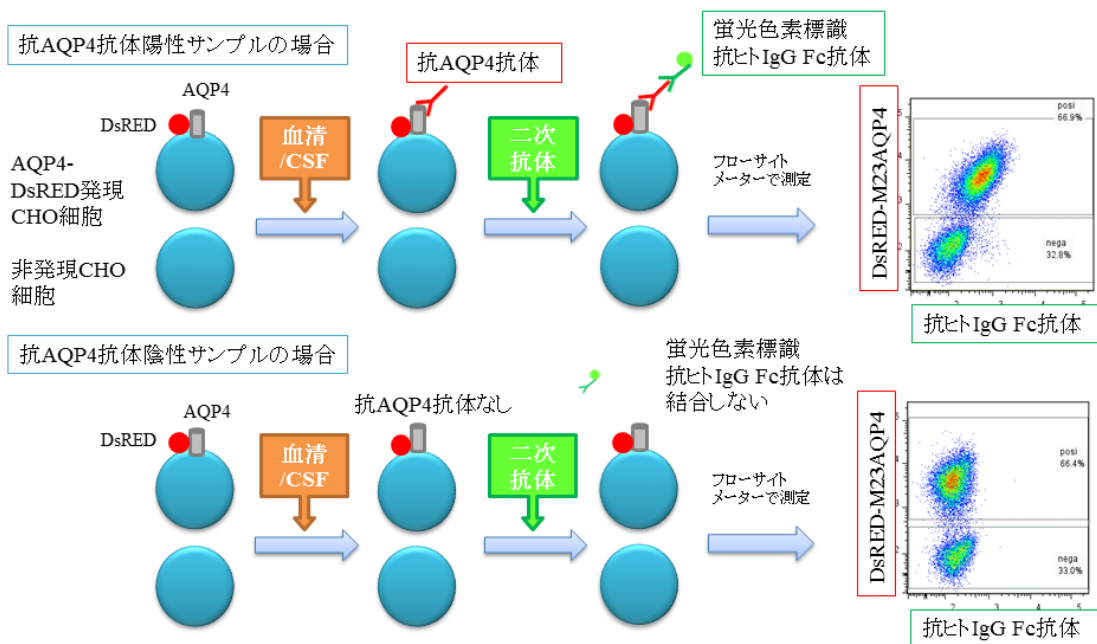
国立精神神経医療研究センター神経研究所免疫研究部では、DsRED 発現ベクターを用いてヒト M23 型 AQP4-DsRED 融合タンパクを強制発現させた AQP4M23 安定発現 CHO 細胞株を保有し、継代・維持している。この細胞を分与してもらい、患者血清および髄液中の抗体測定系の作成を試みた。この解析は、2014 年 5 月までに 1 年間もしくは 1 年半の TCZ 投与を終了した 6 人の患者で行った。

AQP4 発現細胞と非発現細胞が 7:3 で維持されている状態で、 5×10^6 /ml の濃度に浮遊させ、この溶液 14 μ l に対し 2 μ l の血清を加えた状態を 8 倍希釈での抗体価と定

義した。混合液を 20 分間氷上で静置し、1%ウシ血清アルブミン入りリン酸緩衝生理食塩水(1%BSA/PBS) 300 μ lで2回洗浄した。さらに、二次抗体として1%BSA/PBSで100倍に希釈した蛍光色素標識抗ヒトIgG-Fc抗体を加えて10分氷上静置した。その後、300 μ lの1%BSA/PBSで2回洗浄したのち、フローサイトメーターで測定した(図12)。ヒトIgGにはIgG1からIgG4まで4つのアイソタイプがあるが、本研究ではそれぞれのアイソタイプ特異的抗体を二次抗体として用いて測定を行った。

解析では、測定データから AQP4 発現細胞の抗ヒト IgG 抗体の蛍光色素の蛍光強度の中央値 (median fluorescent intensity, MFI) と、AQP4 非発現細胞の MFI を出し、その比 (MFI 比) を算出した。疑陽性判定を避けるため、健康コントロール 8 人分の MFI 比の平均値 + 3 \times 標準偏差 (standard deviation, SD) をカットオフ値として、それよ

図12 抗AQP4抗体の検出系



AQP4発現細胞と非発現細胞の抗ヒトIgG Fc抗体の蛍光強度の中央値 (median fluorescent intensity, MFI) の比を算出し、MFI比の経時変化の解析及び陰性・陽性の判定をする。

りも高い場合に陽性と判定した。

実験に先立って発現率を測定し、AQP4 の発現率が 70% でないときには、 3.5×10^6 /ml の AQP4 発現細胞が含まれるように溶液の細胞濃度を調整し、14 μ l を使用した。

髄液については、血清中よりも抗体量が少ないと予想されたため、まず AQP4 発現細胞数が 3.5×10^6 /ml の溶液を 14 μ l とり、上清を取り除いてペレットにして、そこに 16 μ l の髄液を添加して 20 分氷上静置した。そのあとは洗浄と二次抗体による染色を血清の場合と同様に行った。これが希釈なし(1 倍)での測定であるとした。コントロール群は、MS と正常圧水頭症の髄液サンプルを用いた。AQP4 発現細胞と非発現細胞の MFI 比を算出して、血清と同様に判定した。

正確を期するため、カットオフ値はサンプル測定と同日に測定したものを使用した。

4. 統計解析

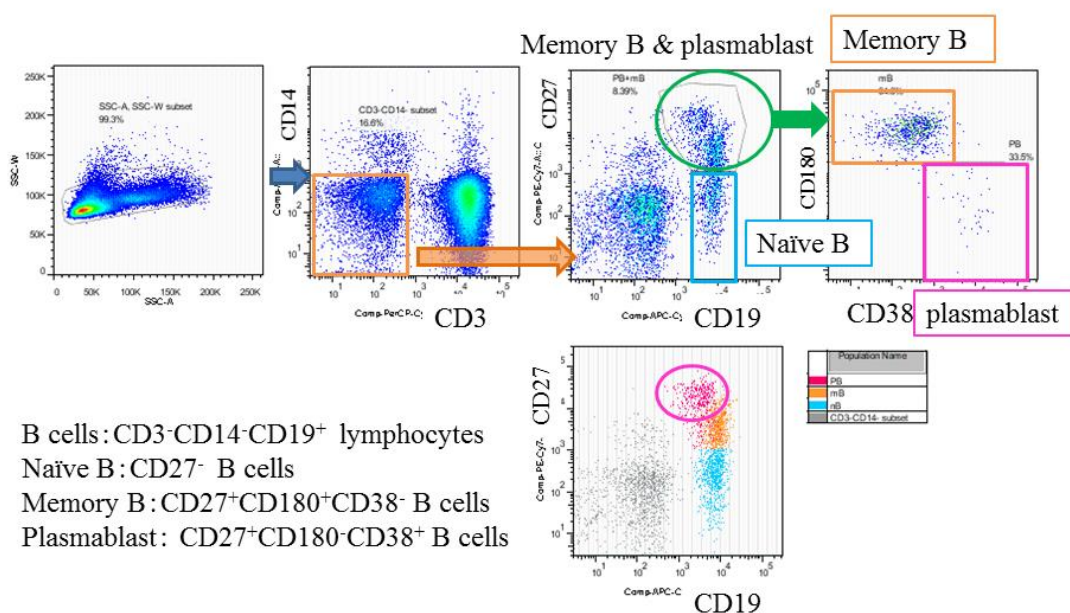
Prism ソフトウェアを用いて、ノンパラメトリック検定を行った。患者群と健康コントロール群の比較には、Mann-Whitney 検定を行った。3 群間の比較には、Kruskal-Wallis 検定と Dunnett 検定を行った。TCZ 投与患者の治療前と 1 年後の比較には、Wilcoxon signed rank 検定を行った。グラフを作成する際には平均値と標準誤差を示した。

V. 結果

1. 中枢神経系脱髄性疾患患者末梢血単核細胞の解析

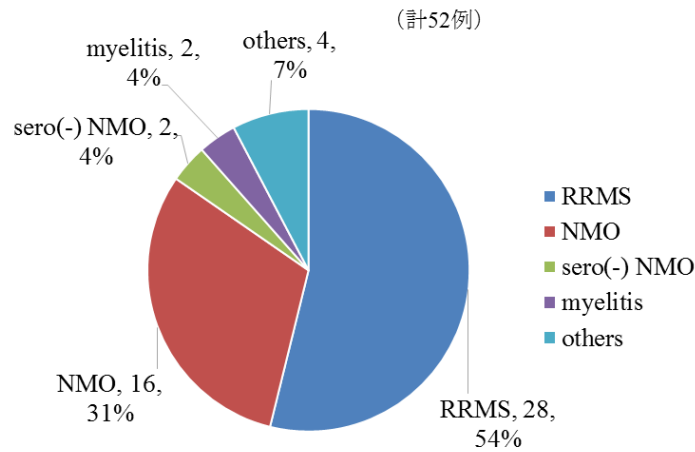
本研究では、B 細胞におけるプラズマブラスト頻度の解析を行った。プラズマブラストの解析は図 13 のごとく行った。

図13 プラズマブラストの解析方法



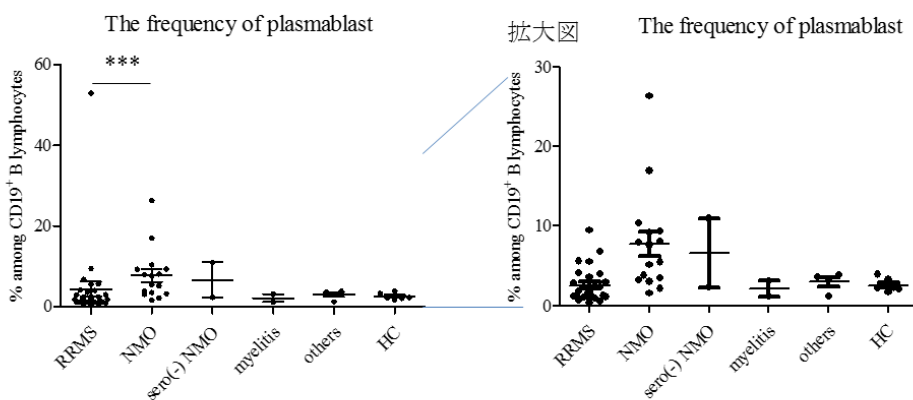
患者 52 症例のうち 54% (28 例) が RRMS であった。NMO 患者は 31% (16 例)、また、抗 AQP4 抗体陰性 NMO (sero-negative NMO, sero (-) NMO) 患者は 4% (2 例) であった。そのほかには脊髄炎が 4% (2 例) で、SPMS、radiologically isolated syndrome、頸椎性脊髄症、腰椎症が各 1 例で合わせて 7% (4 例) であった (図 14)。

図14 患者内訳



各群のプラズマブラストの分布を図 15 に示した。RRMS と NMO の患者では、プラズマブラストの頻度が非常に高い症例もあり、平均値では RRMS と NMO の患者では HC よりも頻度が高かったが、総じて、RRMS 患者では NMO 患者よりもプラズマブラスト頻度が低い傾向であった。症例数の少なかった、抗 AQP4 抗体陰性 NMO 患者、脊髄炎、その他の 3 群を除いた、RRMS、NMO、HC の 3 群で検定を行ったところ、

図15 B細胞におけるプラズマブラストの頻度



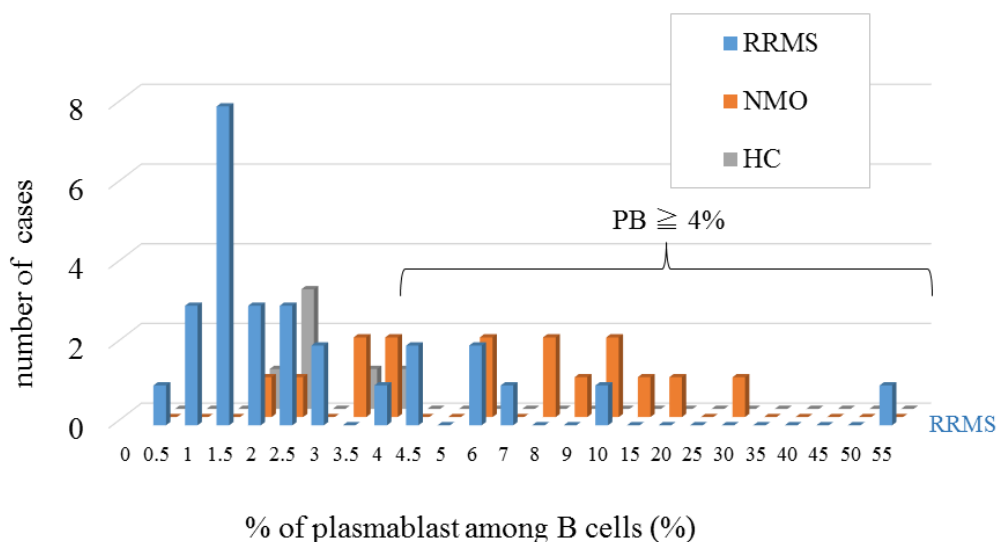
	RRMS	NMO	HC
Mean	4.391	7.761	2.597
Std. Deviation	9.745	6.314	0.8429
Std. Error	1.842	1.578	0.3441

* RRMS, NMO, HCの3群でKruskal-Wallis検定を施行後、Dunn's多重比較法を追加した。

RRMS と NMO では有意差をもってプラズマブラスト頻度に違いがあった。

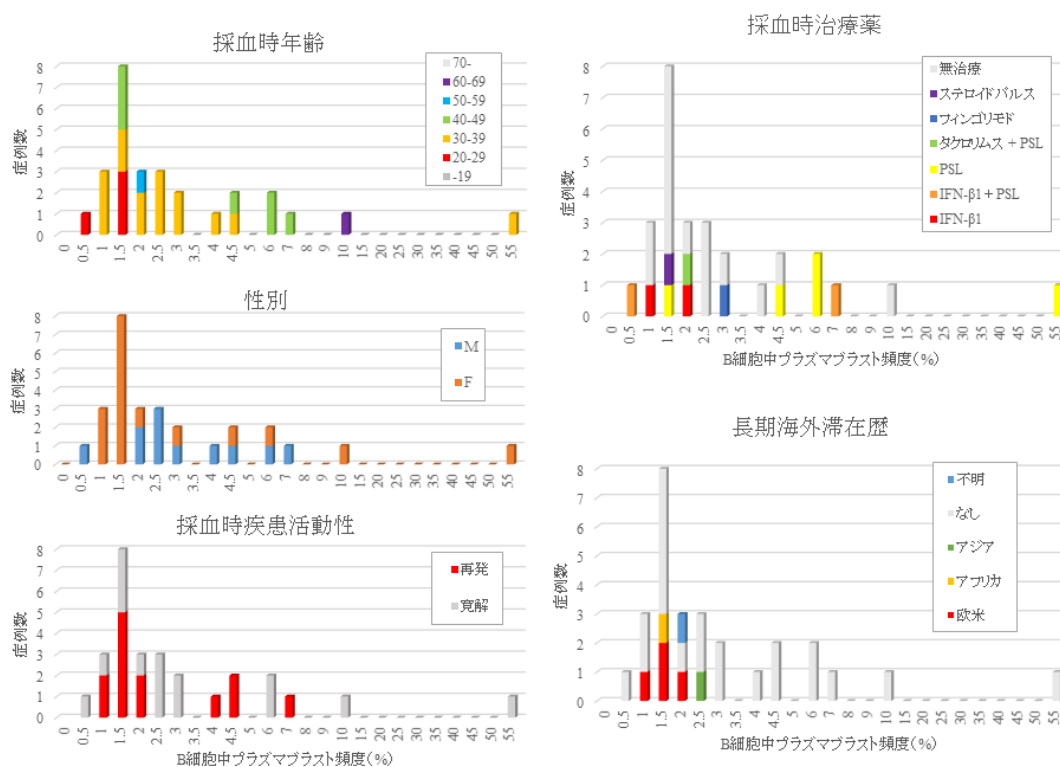
HC の平均値 + 2SD である、B 細胞におけるプラズマブラストの割合が 4% 以上の場合にプラズマブラスト頻度が高いと考えた。NMO 患者では 17 人中 10 人のプラズマブラスト頻度が 4% 以上の高値であった。RRMS 患者では 28 人中 7 人がプラズマブラスト頻度高値であった (図 16)。

図16 B細胞におけるプラズマブラストの割合の分布



RRMS というカテゴリー全体ではプラズマブラスト頻度は低いにもかかわらず、一部の RRMS 患者にプラズマブラスト高値を認めたため、その患者背景を検討した。RRMS 患者の性別や年齢、疾患活動性などの各パラメーターについては、図 17 の通りであった。患者の年齢は 20~40 代が大半を占めていた。プラズマブラスト頻度が高い患者に特に性別や疾患活動性の偏りは認めず、採血時無治療やステロイド単独治療が多かった。プラズマブラスト頻度が高い患者のうち 1 名が IFN-β1 製剤使用中であ

図17 RRMS患者におけるプラズマブラスト頻度と各項目の関係



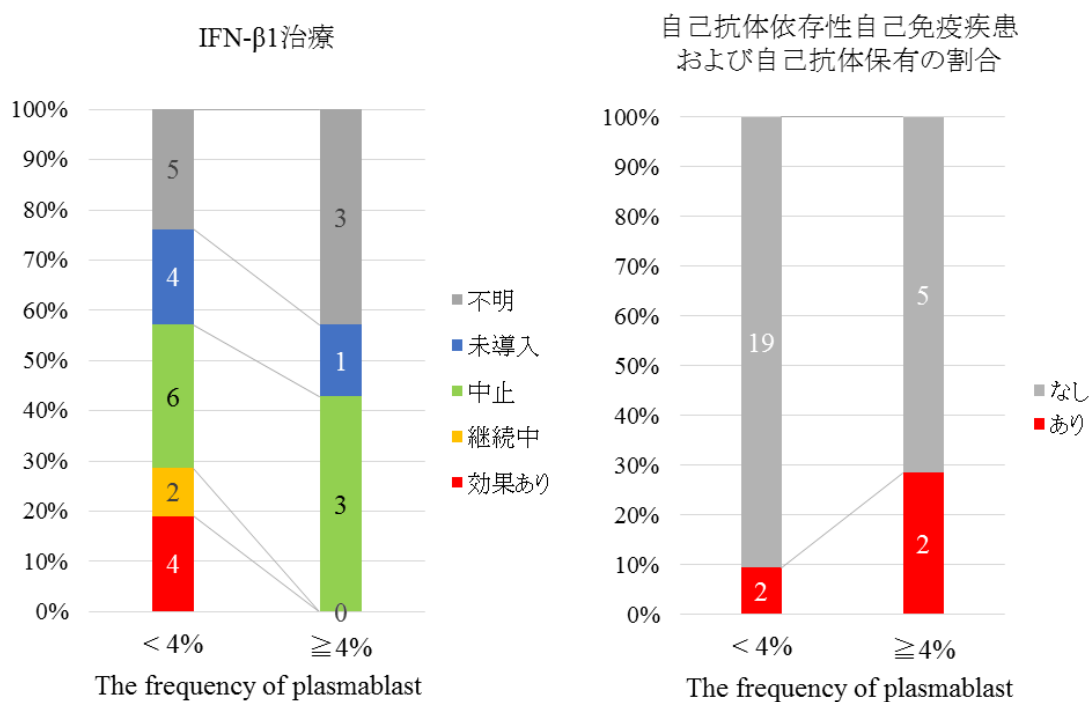
ったが、非反応性でありその後中止した。長期欧米滞在歴のある患者はプラズマブラスト頻度が2%未満に集中していた。

RRMS 患者をプラズマブラスト頻度が4%未満と4%以上の二群に分けて検討した。

IFN-β1 治療に着目すると、本検討の対象となった RRMS 患者 28 人のうち IFN-β1 治療が採血後の治療経過も含めて効果的であったのは 4 人と少なく、この 4 人全員がプラズマブラスト頻度の少ない群であった(図 18、左)。プラズマブラスト頻度が多い群の中に、IFN-β1 製剤が有効もしくは継続できた症例はなかった。

シェーグレン症候群や橋本病など抗体介在性の自己免疫疾患や抗核抗体や抗 TPO 抗体など自己抗体の保有については、プラズマブラスト頻度高値群ではその合併率が高かった(図 18、右)。

図18 プラズマブラスト頻度で分類したRRMS患者2群の比較



プラズマブラストが頻度、数ともに突出して増加していたRRMSの1例は、採血時には無症状であったが直後に再発をきたし、再発前段階であった可能性があった。また、経過はIFN-β1非反応性MSであった。

2. NMO/NMOsd 患者への TCZ 投与前後のリンパ球解析

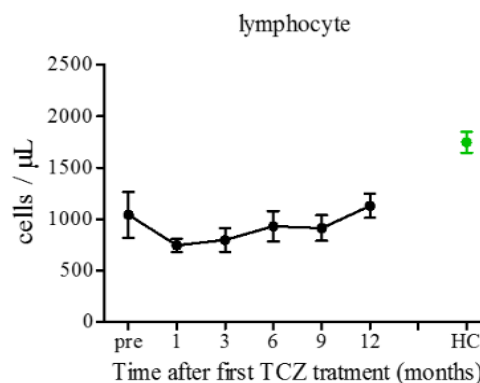
2-1. リンパ球数の変化

TCZ 治療後のリンパ球数は、投与1か月後に低値を示したが1年後にはゆっくりと投与前の基準に戻っていた(図19)。

血清中 TCZ 濃度は3人の患者で半年分測定が可能であったが、投与回数が増えるごと

に血中濃度が上昇している変化を示した。また、休薬期間があった症例では、投与後2か月すると血中濃度は感度以下に低下していた(データ示さず)。

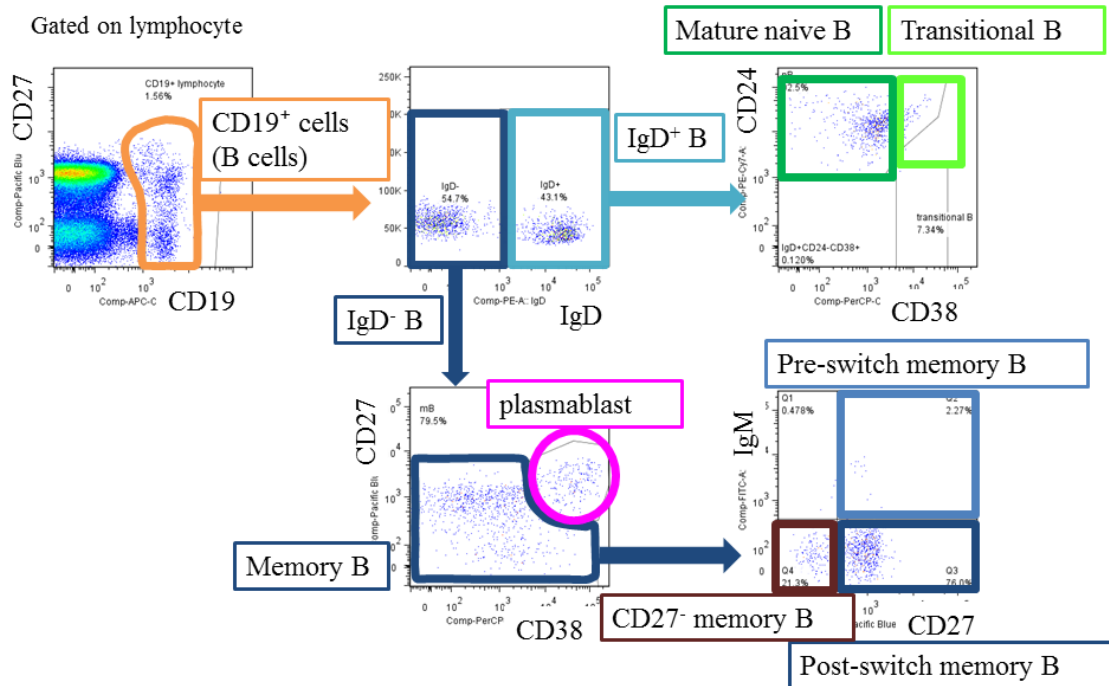
図19 TCZ投与後のリンパ球数の変化



2-2. B 細胞の変化

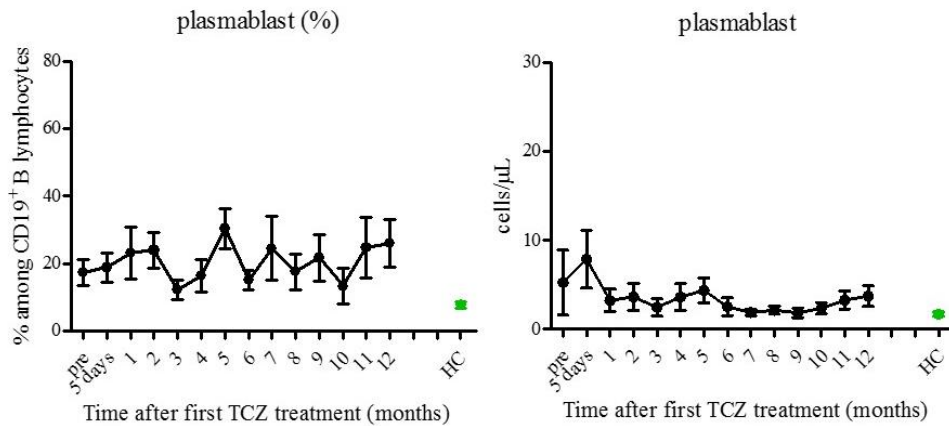
B 細胞における各分画は、図20に示す手順で解析した。

図20 B細胞分画の解析法



プラズマブラスト頻度は、増減を認めた。患者ではリンパ球数そのものの増減が大きかったことから、それにより割合が変わる可能性を考慮して、プラズマブラストの実数を算出した。治療開始前に高値であった症例では治療後下がったが、治療開始前に軽度高値程度の症例ではほぼ変化がなく、平均で見ると概ね HC より高めの横ばいの値

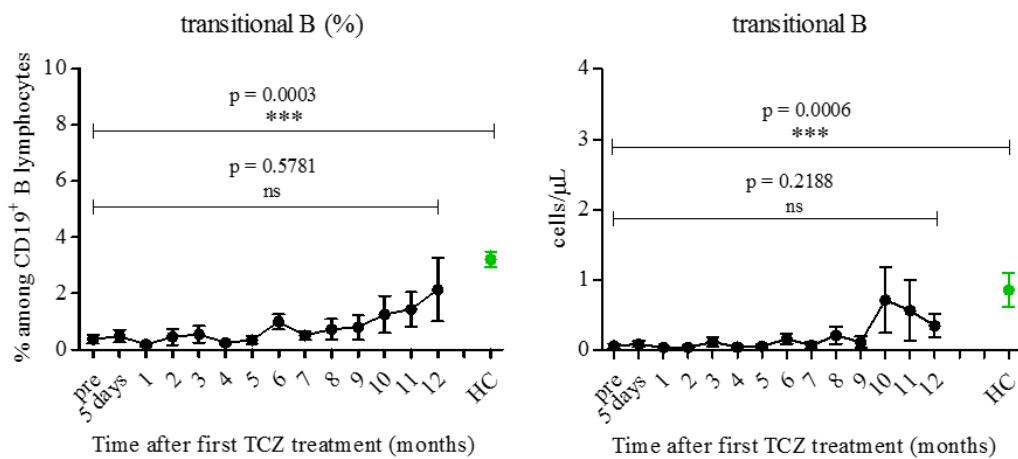
図21 TCZ投与後のプラズマブラストの頻度および数の変化



にとどまっていた(図 21)。再発時にはプラズマブラストは頻度・数ともに増加したが、明らかな再発兆候がないのに頻度・数に一時的な増加を認めた例もあった(データ示さず)。

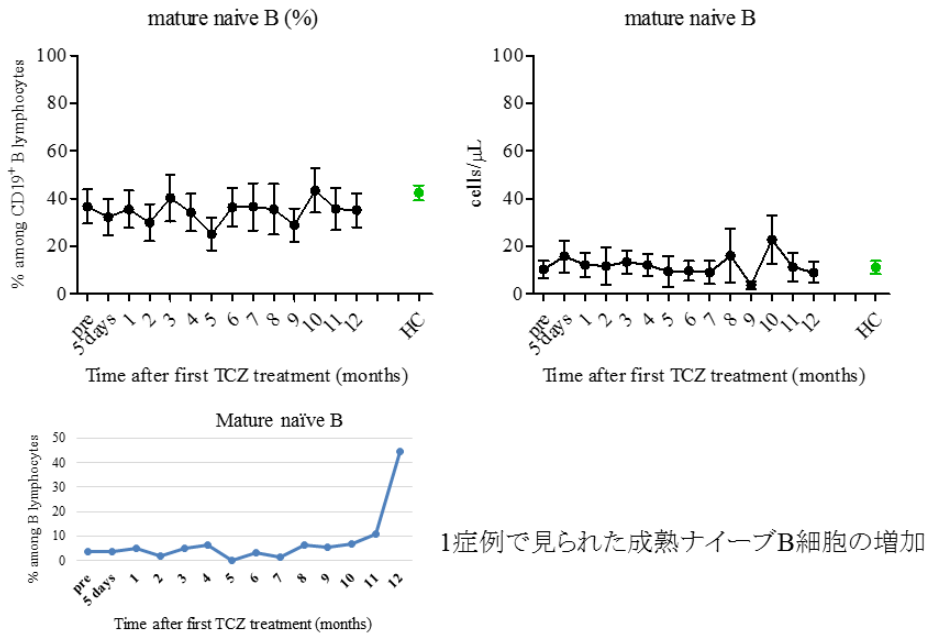
B 細胞の他の分画では、NMO/NMOsd 患者ではナイーブ B の中でも特に未熟なトランジショナル B 細胞が頻度および数ともに減っていた。治療経過とともにこの集団の出現を認めたが、有意差には至らなかった(図 22)。

図22 TCZ投与後のトランジショナルB細胞の頻度および数



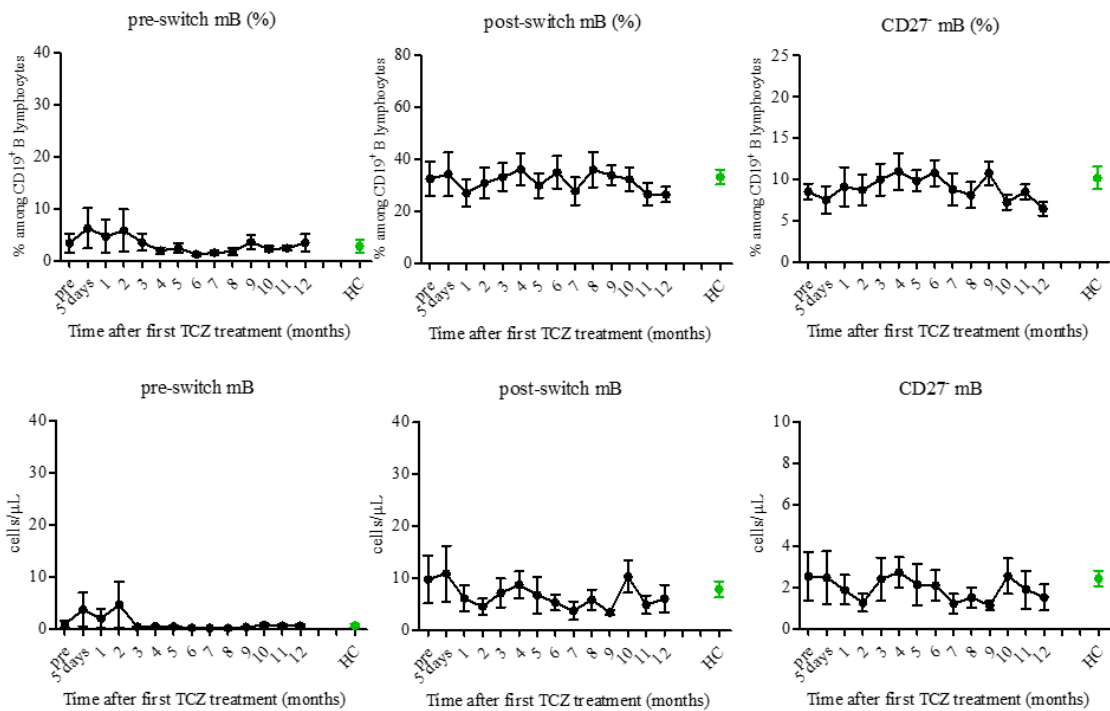
成熟ナイーブ B 細胞はもともと少なかった1人の患者で劇的に増加したが、患者平均値では頻度、数ともに傾向を示さなかった(図 23)。

図23 TCZ投与後の成熟ナイーブB細胞の頻度および数



メモリーB 細胞に関しては、クラススイッチ前後で分類したが、特に増加や減少の傾向を示さなかった。CD27 陰性 IgD 陰性のメモリーB 細胞は、加齢と主に増加し、抗原

図24 TCZ投与後のメモリーB細胞の頻度および数

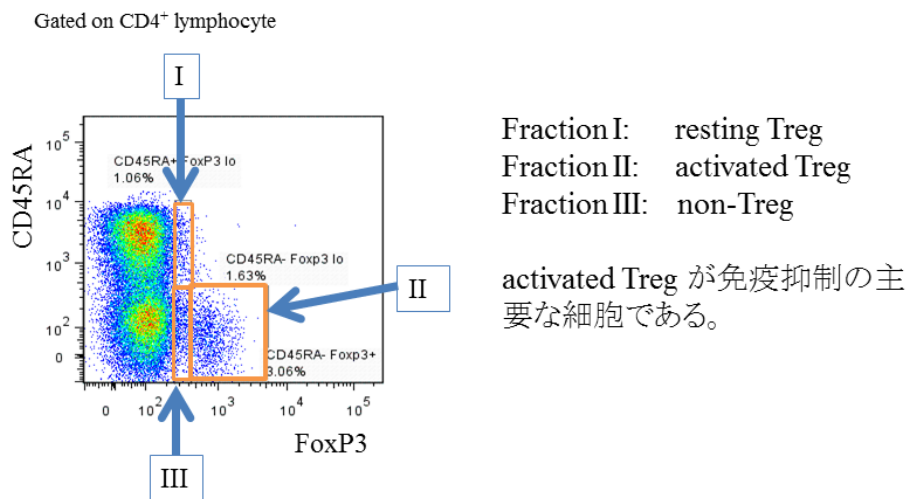


提示能や T 細胞との相互作用を行わない B 細胞といわれているが⁴³、この集団も頻度・数ともに健康コントロールと違いがなく、TCZ 投与後も一定の傾向を示さなかった (図 24)。

2-3. T 細胞の変化

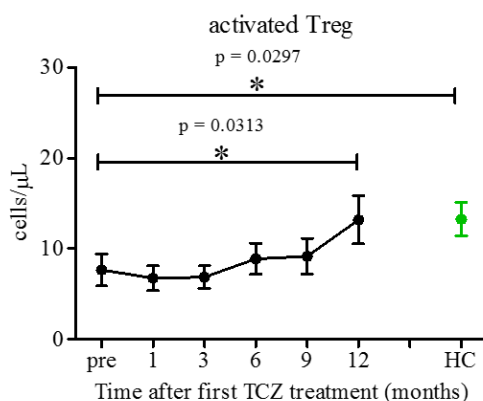
制御性 T 細胞に関しては、全身性エリテマトーデスや MS などの自己免疫疾患では数的・機能的低下があることが指摘されている⁴⁴。CD45RA 陰性 FoxP3 強陽性の集団が活性化制御性 T 細胞で、制御能が最も強いとされている⁴⁵ (図 25)。

図25 制御性T細胞の3分画



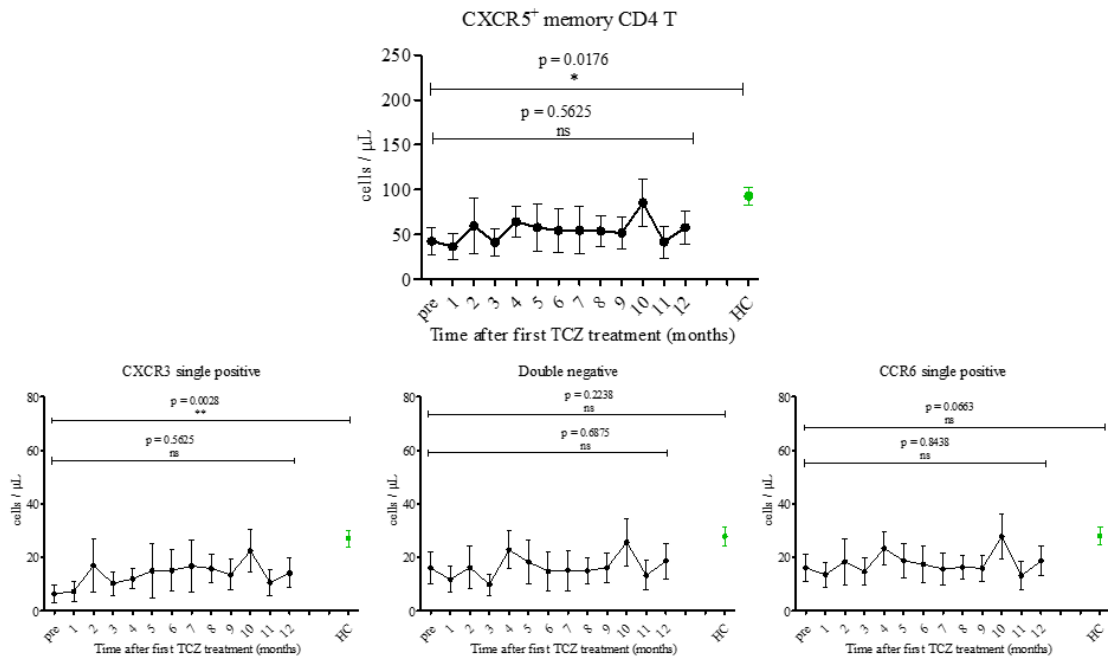
この集団に着目したところ、NMO/NMOsd 患者ではこの集団が減少しており、TCZ 投与後にゆっくりと増加していた(図 26)。

図26 活性化制御性T細胞の数の増加



IL-6R シグナリングは濾胞ヘルパーT 細胞からの IL-21 の産生を促して B 細胞の形質細胞への分化を促進する⁴⁶。濾胞ヘルパーT 細胞はリンパ節中に存在するが、ヒトの末梢血中のケモカイン受容体 CXCR5 陽性集団がその集団と対応しており、また若年性皮膚筋炎患者では病勢を反映するという報告がある³³。TCZ 投与前後で変化が現れる可能性を考え、この集団に着目して解析を行った。NMO/NMOsd 患者では HC に比較して CXCR5 陽性メモリーCD4T 細胞数が有意に減少していたが、1 年間の TCZ 治療では有意な数的変化を認めなかった(図 27、上)。TCZ 投与中の CXCR5 陽性メモリーCD4T 細胞群のケモカイン受容体発現に着目したところ、HC に比較して NMO/NMOsd 患者群では、Th1 反応を誘導する CXCR3 単独陽性群が少なかった(図 27、下左)。Th17 反応を誘導する CCR6 単独陽性群も少ない傾向にあったが有意差に至らなかった。1 年後には CXCR3 単独陽性群はコントロール値に近づく傾向に

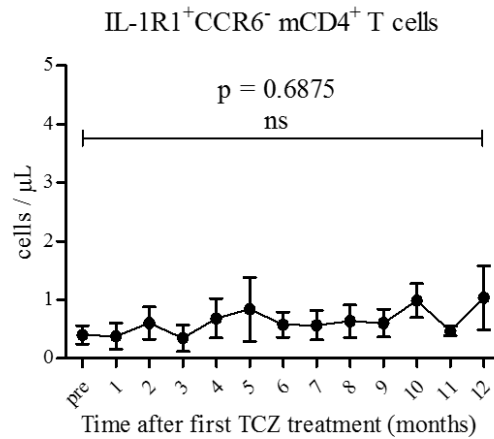
図27 CXCR5陽性メモリーCD4 T細胞の数の変化



見えたが、有意差には至らなかった。

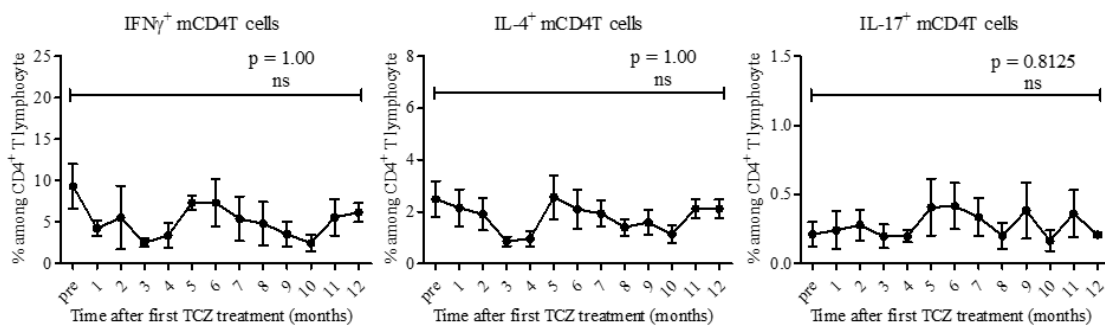
マウスの実験では、Th17 細胞が IL-17 産生能を失った exTh17 細胞は、CCR6 の発現は失うものの IL-1R1 の発現は保つことが示されている⁴⁷。このため、TCZ 投与後に既存の Th17 細胞が IL-6R シグナリングを受けなくなって exTh17 細胞に変換する可能性が考えられたため、この集団を同定する染色を行った。しかしながら、TCZ 投与前後でこの表面マーカーを持つ細胞の出現自体を認めにくく、また、この集団は治療前後で一定の増減傾向を示さなかった(図 28)。

図28 IL-1R1⁺CCR6⁻ mCD4⁺T細胞の数



Th1、Th2、Th17 細胞はそれぞれ IFN- γ 、IL-4、IL-17 産生メモリーCD4T 細胞として同定される³⁴。TCZ 投与前後のこれらの分画の変化について解析したが、いずれも有意な増減傾向を示さなかった(図 29)。なお、この解析ではサンプルに凍結・融解・刺激培養など多段階の処理をしており、途中で NK 細胞や単球など回収できない集団が多いため、正確な数値は得られないと判断して実数換算は行わなかった。

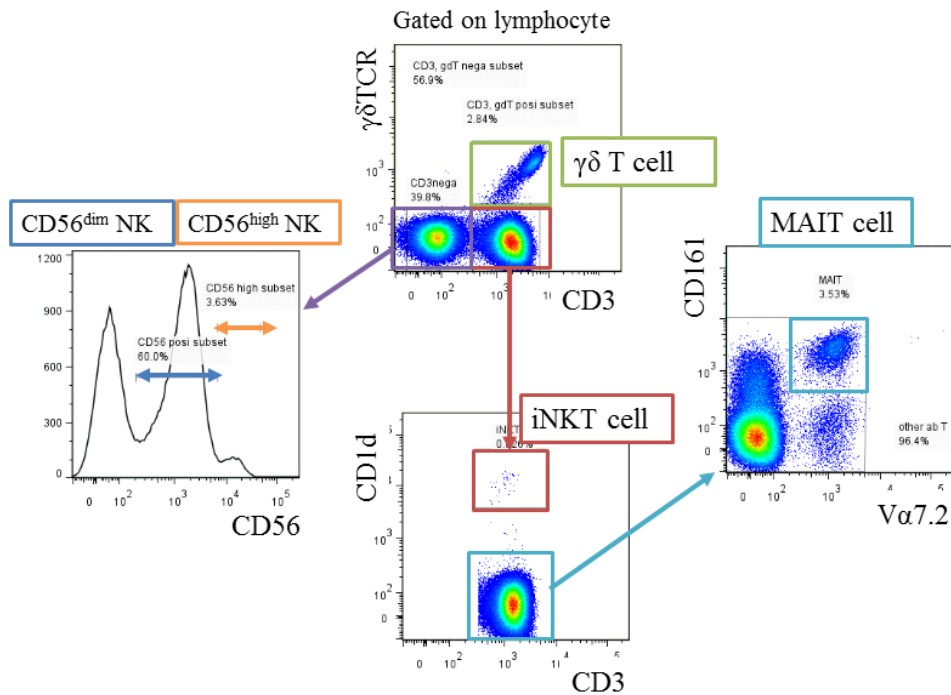
図29 IFN- γ 、IL-4、IL17産生メモリーCD4 T細胞のCD4 T細胞に占める割合の変化



2-4. 自然免疫系および自然リンパ球系細胞の変化

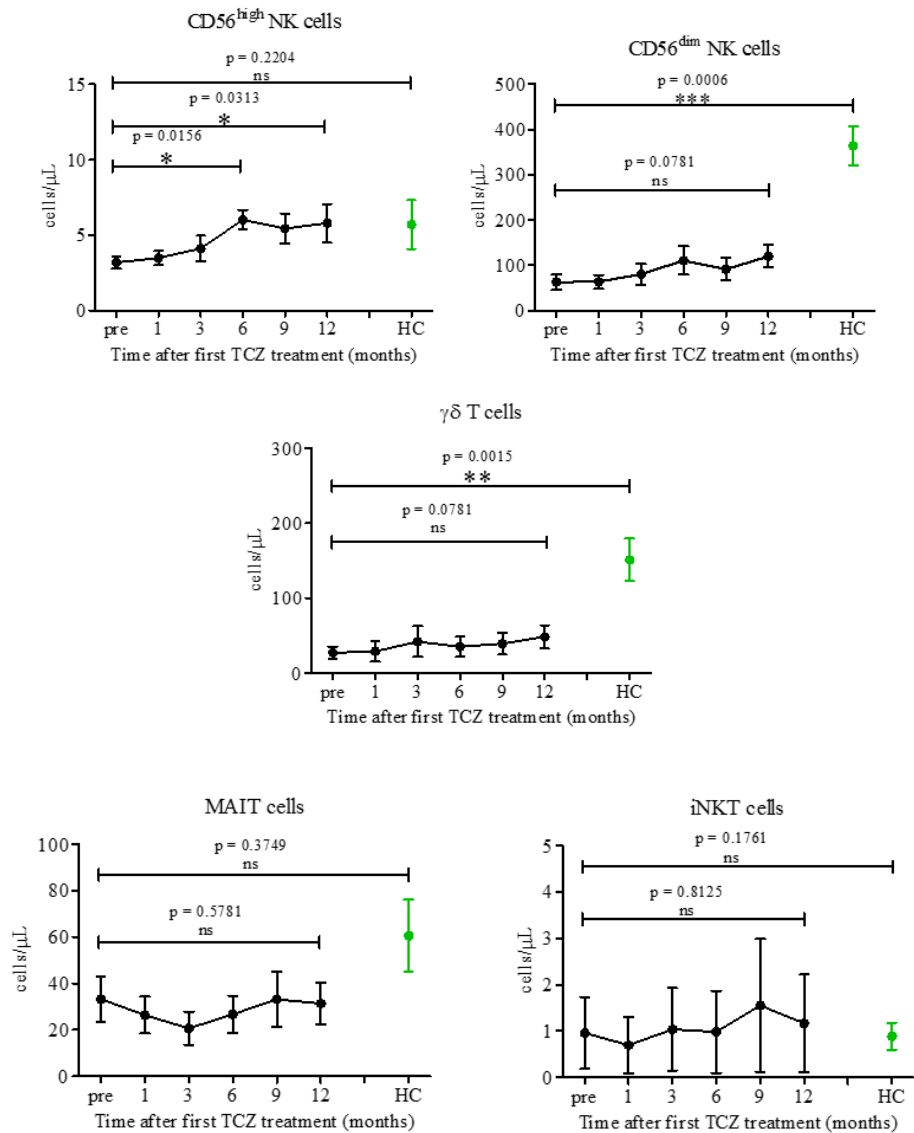
自然免疫系および自然リンパ球系の細胞は、図 30 に示す手順で分類した。

図30 自然免疫系および自然リンパ球系細胞の解析方法



CD56 強陽性 NK 細胞は、TCZ 投与後にその数が有意に増加した(図 31)。CD56 弱陽性 NK 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞は NMO/NMOsd 患者群では著明に低下していて、TCZ 投与後に増加傾向にあったが有意差には至らなかった。MAIT 細胞と iNKT 細胞は治療開始前後で有意な傾向を認めなかった。

図31 自然免疫系および自然リンパ球系細胞の変化

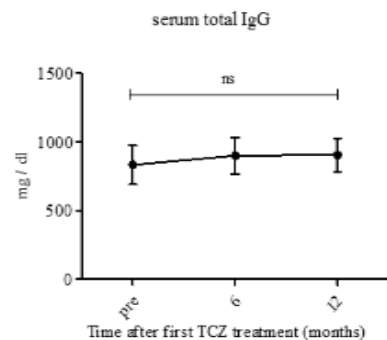


2-5. 抗 AQP4 抗体の変化

抗 AQP4 抗体の IgG1~IgG4 のアイソタイプの量的変化を測定するため、半年毎の MFI 比を算出した。

血清総 IgG 値は、本検討の対象となった 6 人中 5

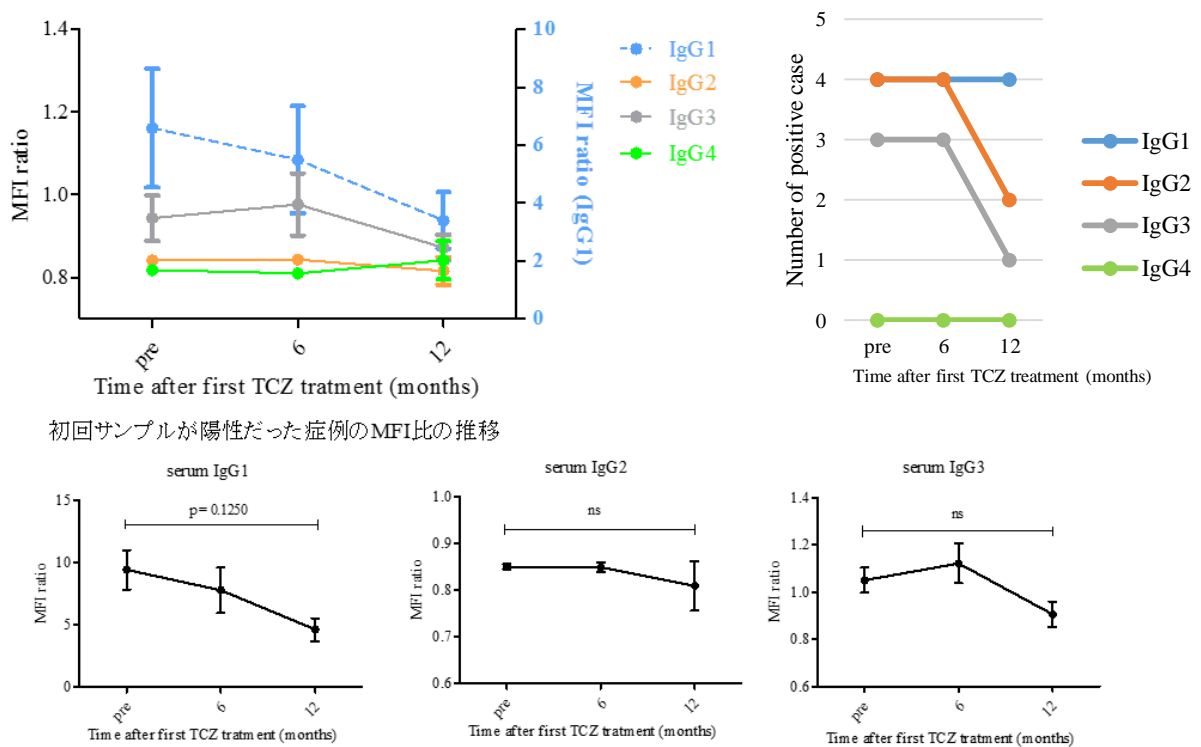
図32 血清総IgG値



人で 1 年の経過で増加しており、平均で見るとやや増加傾向であったが有意差には至らなかった(図 32)。

血清サンプルでは、8 倍希釈時の MFI 比を算出し、MFI 比の経時変化の追跡と陽性・陰性の判定を行った。抗 AQP4 IgG 抗体のうち IgG1 抗体がもっとも MFI 比が高く、抗体量として多いと考えられた。投与前は 6 人中 4 人で陽性であった。1 年の治療介入後に MFI 比は低下傾向を示したが、有意差には至らず、また 4 人中で陰性化した例もなかった。次に MFI 比が高かったのは IgG3 抗体で、6 人中 3 人で陽性であった。このうち 2 人が 1 年後に陰性化した。IgG2 抗体は 3 番目に MFI 比が高く、6 人中 4 人で陽性の判定であり、1 年後に 2 人が陰性化した。IgG4 抗体が陽性の判定であった

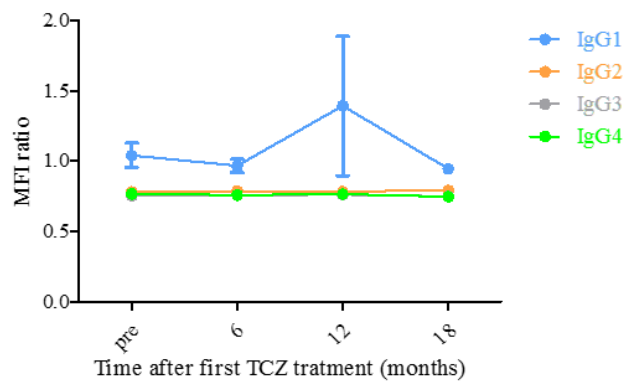
図33 血清抗AQP4抗体MFI比および陽性例の数の変化



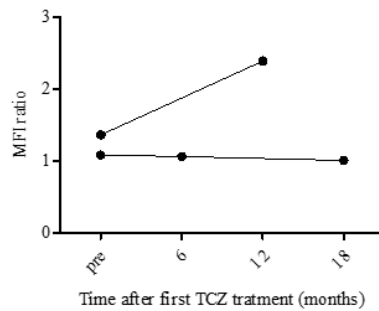
例はなかった(図 33)。エントリー時にすべての IgG アイソタイプが陰性であった 2 例は、NMOsd であった。

髄液中抗 AQP4 IgG 抗体は、髄液を希釈しない状態で MFI 比を算出した(図 34)。4 つのサブクラス中 IgG1 のみが 6 人中 2 人の患者で陽性で、12 か月後もしくは 18 か月後にも陰転化しなかった。この 2 人の患者は血清 IgG1 の MFI 比も高値であった。

図34 CSF抗AQP4抗体MFI比の変化



初回サンプルが陽性だった2例のMFI比の推移
CSF IgG1



VI. 考察

1. 中枢神経系脱髄性疾患患者末梢血単核細胞の解析

中枢神経系脱髄性疾患である MS の中には PPMS、RRMS、SPMS の大きく3つの病型があり、いずれも病態が異なるとされている⁴。IFN- β 1 製剤は RRMS の治療薬であるが、反応性と非反応性の患者がおり^{5,6}、RRMS は同じ病型の中でも病態が異なるヘテロな集団である可能性がある。

RRMS と NMO 患者の B 細胞中のプラズマブラスト頻度の比較では、NMO 患者は有意差をもって RRMS よりもプラズマブラスト頻度が高かった。しかし、RRMS のうち25%程度にプラズマブラスト頻度の高い症例があった。先に報告された論文²⁵ではこのような患者は見られなかったが、その理由は RRMS 患者として脊髄炎合併など非典型経過例を除外し、通常型 MS に絞ったためと推測された (Chihara、私信)。今回の検討では非典型例を含めたため、RRMS でも一部にプラズマブラスト高値を認めるという結果になったと考えられた。

NMO 患者でプラズマブラスト頻度が高かったことは、NMO の病態において、プラズマブラストが慢性的に高く維持される状態が背景にある可能性を示唆すると考えられた。必ずしもすべてのプラズマブラストが抗 AQP4 抗体を産生するわけではなくとも、プラズマブラストがサイトカイン産生などの機能を担って NMO の病態に深く関与している可能性が考えられた。

RRMS 患者のうち 4 名が検体採取時に IFN-β1 製剤使用中であった。このうち 1 名は非反応性でありその後の治療経過で中止した。残る 3 名と、その後の治療経過で IFN-β1 製剤を導入して継続ができた 3 例を合わせた 6 名は全員が採血時のプラズマブラストの頻度が低かった。他方、プラズマブラスト頻度の高い RRMS 群の中に IFN-β1 治療が有効であった症例はなかった。IFN-β1 は RRMS 患者の末梢血中の好中球と単球からの BAFF (B cell activating factor of the TNF family) の転写を増やし、また、血清中の BAFF 濃度を上げることが指摘されており、B 細胞の生存を刺激して炎症を長引かせる可能性や自己抗体を産生させる可能性が指摘されている⁴⁸。また、IFN-β1 製剤で効果の見られない RRMS 患者は 10~50%あるとも言われており、これらの患者の一部には、病態に B 細胞の関与が大きい一群がある可能性が指摘されている⁴⁸。本研究では、自己抗体介在性自己免疫疾患の合併や自己抗体陽性症例の割合は、プラズマブラスト頻度高値群で高かった。この結果からは、プラズマブラスト頻度が高い群は、T 細胞免疫主体の病態と考えられる通常型 MS⁷とは異なった免疫背景を持つ一群である可能性が示唆された。また、IFN-β1 非反応性 MS の一例では、再発準備段階ではプラズマブラスト頻度が非常に高くなっていた。このことから、プラズマブラストが、少なくとも一部の RRMS 患者では病態形成の一環を担っていることが示唆された。

サンプル数が少ないことや、治療対照群を設定できなかったことが本研究の課題で

あった。初発治療導入前のプラズマブラスト頻度に MS と NMO で違いがあるのか、IFN- β 1 治療の導入前後でプラズマブラスト頻度は変化するのかなど、症例を予め選択して比較できれば介入的な研究ができたと考えられた。今回は複数の神経内科医からの連続症例 52 例の検討であり、恣意的な患者選択は研究部側ではしていない。ただし、本研究の対象になったのは、非典型的 MS の経過の症例が多かったと考えられた。これは、国立精神・神経医療研究センター病院の受診層に長期罹患例や治療困難例が多いことと、典型的経過の症例に関してはプラズマブラスト頻度の解析を依頼されることがまれであったと推測されるためであった。それでも、比較的少ない症例数の解析で有意差をもって RRMS と NMO のプラズマブラスト頻度に違いを認めた。また RRMS の中でもプラズマブラスト頻度の高い症例は、通常型 MS とは免疫背景の異なる一群である可能性があった。これらのことから、プラズマブラスト頻度の測定が臨床現場に還元できる一つの指標となる可能性があった。しかし、プラズマブラストは感染やワクチンなど、自己免疫疾患以外の要因でも反応性に増加する細胞集団であるため、その臨床現場への応用には、患者の感染症状の確認や、プラズマブラストの数のみならず、例えば自己反応性の確認などが重要とも思われた。これらの点は、今後の課題であった。

2. NMO/NMOsd 患者への TCZ 投与前後のリンパ球解析

2-1. TCZ 投与後の B 細胞の変化について

NMO/NMOsd 患者の末梢血では未熟なナイーブ B 細胞であるトランジショナル B 細胞が HC に比較して有意に減少していた。TCZ 投与後にこの集団は増加傾向にあったが、1 年間の観察期間では有意差には至らなかった。この集団は、IL-10 産生性の制御性 B 細胞の前駆細胞であるという報告があり⁴⁹、この集団の変化は NMO/NMOsd の病態との関連が非常に興味深かった。成熟ナイーブ B 細胞、メモリー B 細胞の数は、TCZ 治療介入後は全体として大きな変化を認めなかった。TCZ 治療介入で最も変化すると予測されていたプラズマブラストに関しては、予測に反して、B 細胞における頻度は大きく増減し、明らかな減少傾向は見られなかった。実数換算したプラズマブラスト数では、頻度ほどの変動はなく、治療開始後は治療前に比較して低値ではあったものの、HC より高値を保った。このことは、NMO/NMOsd の病態においては、プラズマブラストが生成されて血中に出るまでの過程には IL-6 に依存しない経路が存在することを示唆した。(プラズマブラストに関しては、2-4の項で抗 AQP4 抗体と合わせた考察も行った。)

2-2. TCZ 投与後の T 細胞の変化について

活性化制御性 T 細胞は、NMO/NMOsd 患者末梢血中では有意に減少していたが、

TCZ 投与後は 1 年かけてゆっくりと増加した。誘導性制御性 T 細胞の分化は IL-6 の有無により Th17 細胞と拮抗する⁵⁰。NMO/NMOsd 患者で TCZ 治療前に Th17 細胞は必ずしも増加していなかったものの、IL-6 過多による Th17 細胞への分化が亢進していた状態が TCZ 投与によって是正された可能性も考えられた。関節リウマチ患者への 3 回の TCZ 投与後には、Th17 細胞の減少と制御性 T 細胞の増加があったという報告と⁵¹、Th1 細胞、Th17 細胞、制御性 T 細胞の減少と Th2 細胞の増加があったという報告とがあり⁵²、TCZ 投与後の Th17 細胞と制御性 T 細胞の関連はヒトサンプルでは明らかではない模様である。今回増加を認めたのは活性化制御性 T 細胞であり、制御能があることが期待されるが、この集団の制御機能の検討は今後の課題であった。

濾胞ヘルパー T 細胞を反映する CXCR5 陽性メモリー CD4T 細胞は、NMO/NMOsd 患者では有意差をもって HC よりも減少しており、中でも CXCR3 陽性群の数が減少していた。TCZ 投与 1 年後には CXCR3 陽性群が増えて正常コントロールに近づく傾向を示した。

メモリー CD4T 細胞のサイトカイン産生能は、大きな変化を認めなかった。このことは、寛解期では末梢血中の細胞群は活性化していないということを反映するものと考えられた。また、exTh17 細胞を同定する試みをしたが、少なくとも末梢血中では集団として同定しがたく、また明らかな数的変動も見られず、マウスとヒトとで細胞表面マーカーの発現が異なる可能性なども考えられた。

2-3. TCZ 投与後の自然免疫系および自然リンパ球系細胞の変化について

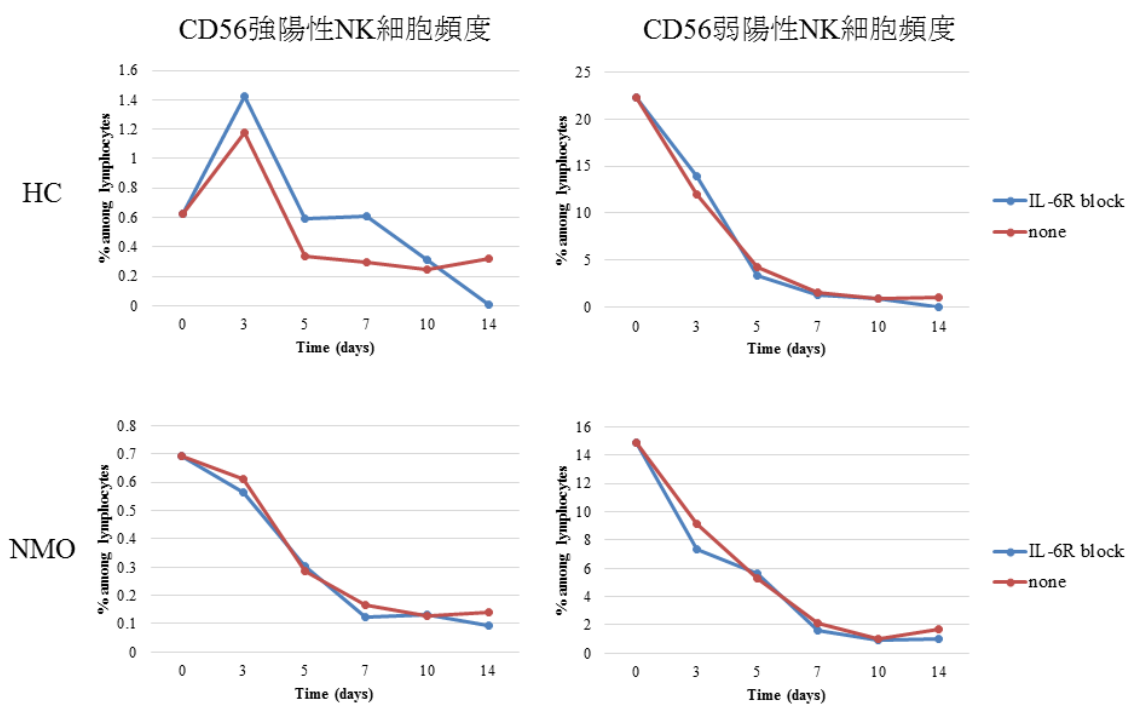
NMO/NMOsd 患者群では、CD56 強陽性 NK 細胞数が TCZ 開始 6 か月後には有意差をもって増加していた。この細胞群はこれまでに、MS 患者で IFN- β 1a 治療後や抗 IL-2R 抗体治療後に増加することが指摘され、治療効果を説明する細胞集団とされている^{53,54}。今回、NMO/NMOsd 患者への TCZ 治療後にこの集団の増加を認めたことは、疾患や治療薬の種類を超えて、自己免疫という病態の中で共通の経路が是正された可能性を示す点で興味深かった。MS 患者への IFN- β 1a 投与では、CD25 陽性 CD4T 細胞の FoxP3 mRNA 発現が 6 か月で、CD56 強陽性 NK 細胞頻度が 1 年で増加しているが⁵³、本研究では活性化制御性 T 細胞数が 1 年で、CD56 強陽性 NK 細胞数は 6 か月で有意な増加を認め、制御性細胞でも異なる集団は異なる機構で増加し、なおかつ治療と疾患によってその改善までの時間に違いがある可能性があった。

NMO/NMOsd 患者では CD56 弱陽性 NK 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞が著明に減少しており、TCZ 治療後に増加傾向であった。MS では、HC と比較して CD56 弱陽性細胞の頻度に差がないことや⁵⁵、 $\gamma\delta$ T 細胞が増加していることが指摘されており⁵⁶、NMO の疾患背景が MS と異なることを示唆する可能性があった。MAIT 細胞は、MS 患者の末梢血中では HC に比較して減少しており、再発期にはさらに減少し、病勢と関連して増減することが知られている⁵⁷。また、iNKT 細胞も MS 患者では同様に減少していることが指

摘されているが⁵⁸、今回のNMO/NMOsd患者ではそのいずれの細胞集団の数には明らかな傾向を認めなかった。検討症例数が少ない影響も考えられるが、このことからMSとNMOとでは背景となる免疫的病態に違いがある可能性が考えられた。

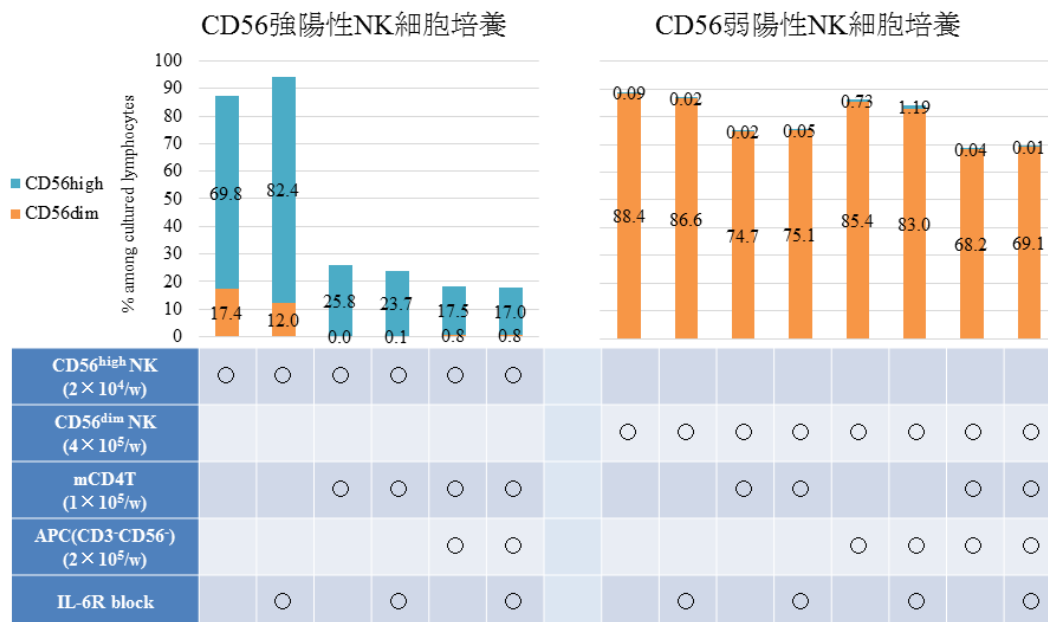
CD56 強陽性 NK 細胞の増加と IL-6R シグナリングの関連を調べる目的で、HC と NMO 患者の末梢血単核細胞を IL-6R 阻害抗体添加の有無で条件を振って 3~14 日間培養し、生存NK細胞の割合について時間を追って検討したが、IL-6R 阻害抗体による増加は認められなかった(図 35)。この結果からは、CD56 強陽性 NK 細胞は単にIL-6R 阻害で生存率が増えるのとは異なる機構で血中細胞数が増加したものと考えられた。

図35 末梢血単核細胞培養におけるCD56強陽性NK細胞の頻度



また、HC から単離した CD56 強陽性 NK 細胞もしくは CD56 弱陽性 NK 細胞を単独、もしくはメモリーCD4T 細胞や抗原提示細胞と 3 日間共培養し、IL-6R 阻害抗体添加の有無で比較したが、CD56 強陽性 NK 細胞の単独培養では CD56 の発現が一部低下することは確認できたものの、各共培養条件で IL-6R 阻害抗体による生存細胞の割合に差はなく、また CD56 弱陽性 NK 細胞から CD56 強陽性 NK 細胞が生成するなど CD56 強陽性 NK 細胞が増加するデータはまったく認められなかった(図 36)。また、今回の検討では 1 週間以上の培養では NK 細胞の生存そのものを確認しがたく、半年かけて増加するような機構の検討は困難であった。これらのことから、生体内では生存率や CD56 の発現量の変化以外で、例えば TCZ の再発抑制効果に伴う各 NK 細胞の体内の分布の変化や、産生の増加や、消費されずに残る細胞数が増えること

図36 単離CD56強陽性および弱陽性NK細胞の培養細胞中頻度



HCのCD56強陽性NK細胞 2×10⁴/w、CD56弱陽性NK細胞 4×10⁵/w、メモリーCD4T細胞 4×10⁵/w、CD3陰性CD56陰性の抗原提示細胞2×10⁵/wをIL-6R阻害抗体の有無で表に示す組み合わせで3日間培養し、サイズゲートでリンパ球における割合を算出した。

などによって血液中の細胞数が回復した可能性が考えられた。しかしながら、これらを実証する実験系はまだ組めていない。

2-4. TCZ 投与後の NMO/NMOsd 患者抗 AQP4 抗体の変化について

本研究では、抗 AQP4 IgG 抗体のアイソタイプごとの検出を試みた。血清中 IgG 抗体には、多い順に IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 の 4 つのアイソタイプがある。これらは、超可変領域の突然変異数の解析およびゲノム上の塩基配列の位置関係から、免疫反応の時間経過に伴い、IgG3、IgG1、IgG2、IgG4 の順に出現するとされている⁵⁹。また、これらの受容体である Fc γ 受容体 (Fc γ receptor, Fc γ R) にはいくつもの型があり、それぞれの下流のシグナリングの違いからリガンド結合後に引き起こされる免疫反応が異なる⁶⁰。IgG 各アイソタイプは各 Fc γ R への結合性がそれぞれ異なっており、最終的には、産生される IgG アイソタイプの量と受容体への親和性とが免疫反応を調整している。最初に産生される IgG3 抗体は、超可変領域の突然変異数が最も少ないことから抗原特異性が低いと考えられるが、補体活性能が高く、活発な免疫反応の先駆けを担う。その後、高親和性の IgG1 抗体に移行し、これも補体活性能が高いため、速やかな抗原除去の方向に反応が進む。さらに抗原が残存する状態では、高親和性を維持している IgG2 抗体に移行するが、この抗体は補体活性能が低く、Fc γ R との結合性も低く、免疫反応の抑制に働く。最後に現れる IgG4 抗体も補体活性能が低く、Fc γ R と

は全く反応しないため、免疫反応は終息する方向に向かうと考えられる。

このように、補体活性能と FcγR への結合性から考えると、IgG1 抗体が自己免疫の病態においては病原性が最も高いと考えられる。自己抗原のように、抗原が排除されない状態では、IgG2 抗体や IgG4 抗体の出現も考えられ、病態との関連が興味深い。

本研究の血清の検討では、抗 AQP4 IgG 抗体の各 IgG アイソタイプの出現頻度は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 が 4/6、4/6、3/6、0/6 であった。関節リウマチ患者の自己抗体は IgG1 と IgG4 が主流であるという報告があり⁶¹、また、NMO 患者血清中の抗 AQP4 抗体の測定で、M1AQP4 導入細胞を用いて希釈倍率 4 倍で IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 の陽性率がそれぞれ 97.8%、37.0%、6.5%、6.5%であったという報告もある⁶²。自己抗原は排除されないにもかかわらず高親和性の IgG4 抗体が今回検出できなかった背景としては、もともと出現頻度が少ないことと患者母数が 6 人と少なかったことが可能性として残った。治療後 1 年では、IgG1 は 4 人全員陽性のままであったが、IgG2 と IgG3 はそれぞれ 4/6→2/6、3/6→1/6 に陽性患者数は減少していた。TCZ 導入時に血清抗体が陰性判定であった 2 症例は、過去に陽性の診断はされており、導入前の治療により反応性に抗体値が下がっていた可能性を考えた。この 2 名は NMOsd であった。NMOsd では NMO より抗体価が下がりやすい機序があるのかもしれないが、症例数を増やしての検討が今後の課題と考えられた。

MFI 比は抗体量を反映すると考えられる。血清抗 AQP4 IgG 抗体では IgG1 抗体の

MFI 比が最も高く、治療経過とともに低下傾向を認めたが 1 年間では有意差に至らなかった。1 年間ずっと陰性を保った症例を除外して、MFI 値の変化を追ったが、全例で MFI は低下したものの症例数が 4 に減ったためか有意差に至らず、症例数を増やしての検討が必要と考えられた。

総じて、TCZ 投与によって血清中の抗 AQP4 IgG 抗体は 1 年後に低下傾向を示した。この間、患者血清総 IgG 値は有意差に至らなかったもののやや増加傾向であったことを考えると、抗 AQP4 抗体の減少は選択的で、TCZ 投与による変化の可能性があった。血清 IgG 分子の半減期は 21～28 日程度であり⁶³、TCZ 血中濃度が維持されている間は IL-6R シグナリングがほぼ抑制されることを考慮すると⁶⁴、IL-6R シグナリングによらない抗体産生経路があることが考えられた。すなわち、TCZ 投与によって阻害が期待されるプラズマブラストからの抗 AQP4 抗体産生以外に、恒常的に抗 AQP4 抗体を産生する機構の存在が考えられた。末梢血以外、例えば骨髄などに定着していると思われる形質細胞への TCZ の影響は、本研究では未確認である。

先行研究²⁵では、NMO 患者末梢血中のプラズマブラストを単離培養する過程で IL-6 がその生存と抗体産生過程に必要であることが示されている。この結果は、血中から先の過程を再現している可能性がある。すなわち、プラズマブラストが定着した先での生存や抗体産生過程に IL-6 を要するということを示すのではないだろうか。二次リンパ組織でプラズマブラストが産生されるまでの過程は IL-6 非依存性で TCZ 投与に

あまり影響を受けないため、血中に出てくるプラズマブラストは TCZ 投与前後で変化がなかった可能性がある。そして、血中から先の定着する段階ではプラズマブラストはおそらく生存や抗体産生細胞への分化に IL-6 を要するのではないだろうか。このように考えると、末梢血中のプラズマブラストが減らなかったにもかかわらず抗 AQP4 抗体が減少傾向であったことの説明がつく。ヒト末梢血単核細胞のインフルエンザウイルス感染モデルの実験では、形質細胞様樹状細胞の産生する I 型インターフェロン (IFN- α と IFN- β) が活性化 B 細胞をプラズマブラストに分化させ、この段階では抗体産生は見られず、さらに形質細胞様樹状細胞の産生する IL-6 がプラズマブラストを形質細胞に分化させて抗体を産生することが示されている⁶⁵。NMO/NMOsd の病態においては、プラズマブラストが産生される過程は IL-6 に非依存性で、その後の抗体産生細胞への分化の過程が IL-6 依存性であるという本研究からの予想を支持すると考える。そして、すでに形質細胞に分化してしまった後の抗体産生過程は、IL-6 非依存性なのではないだろうか。

本研究では CSF 中の抗 AQP4 IgG 抗体の検出も試みた。CSF 中では 6 人中 2 人で IgG1 のみが検出され、1 年もしくは 1 年半経過しても陽性を保った。MFI 比で比較すると、血清中より抗体量は少ないと予想された。なお、血清中と比較する目的で、同じ抗原量(同じ AQP4 発現 CHO 細胞数)で判定したが、もっと少ない数の細胞で開始すれば、陽性判定患者数が増えた可能性は否めない。これは今後の課題である。

CSF にプラズマブラストは寛解状態ではほとんど存在しなかった(データ示さず)。

CSF の抗 AQP4 抗体が維持されている機構は何なのだろうか。CSF の IgG 抗体の半減期は血清中と大きく異なるのだろうか。活性化した T 細胞が脳血液関門を通り中枢神経系に侵入するのに必要な $\alpha 4\beta 1$ インテグリンを阻害する、抗 $\alpha 4$ インテグリンモノクローナル抗体ナタリズマブを用いた MS 患者の治療後に CSF の IgG 値が下がることやオリゴクローナルバンドが消失することが報告されており^{66,67}、末梢から CSF 内に移入する細胞と CSF 中の IgG 値には関連があることが示唆されている。IL-6R シグナリングは病原性 T 細胞が血液脳関門を通過する際に大きな役割があることはマウスモデルで示されており⁶⁸、TCZ によってこの経路が阻害されても、CSF 中の抗 AQP4 抗体が維持される何らかの機構が存在するのかもしれない。

血清および CSF の抗 AQP4 抗体が著減する以前に再発回数が抑制されたことに関しては、自己抗体があっても IL-6R シグナリングが阻害されていれば再発に至らないことが考えられた。

2-5. IL-6 の NMO/NMOsd 病態への影響について

MS の動物実験モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) を用いた研究では、IL-6 が病態形成の様々な点で関与していることが報告されている。IL-6 欠損マウスは EAE が誘導されない⁶⁹。ま

た、EAE の免疫直後に抗 IL-6R 抗体を投与したマウスは EAE が軽症化する⁷⁰。この段階には、抗原刺激で活性化した樹状細胞が分泌する IL-6 が必須であることが示されている⁷¹。二次リンパ組織では、樹状細胞により分泌された IL-6 によって T 細胞の Th17 細胞への分化が進む。EAE 惹起の病原性を持った T 細胞は、脳血液関門を通過して中枢神経系に到達するが、その際には血管内皮細胞の分泌する IL-6 が重要である⁶⁸。また、EAE の病勢の極期には、B 細胞が分泌する IL-6 の影響が大きいことも示されている⁷²。このように、EAE の誘導、病原性細胞の中枢神経系への侵入、局所での病巣形成の各段階において、異なった細胞が分泌する IL-6 が一連の EAE の病態形成に関与している。NMO の病態は EAE と異なる点もあるし、ヒトとマウスとでは違いもあるが、IL-6R シグナリングの阻害が NMO の再発抑制効果に関与していることは本研究の臨床経過から明らかであった。

本研究では、その機序としてどの細胞が IL-6 を過剰に産生し、NMO/NMOsd の病態に関与しているのかという根本的な知識には到達できなかった。しかし、NMO/NMOsd で数的異常があり、TCZ 治療後に寛解状態となって HC に数値が近づき、病態形成に関与していると想定される細胞集団の知識を今回得ることができた。

免疫反応の場である二次リンパ組織や、長期抗体産生の場としての骨髄や、局所である中枢神経系の反復解析は、ヒトサンプルでは侵襲性が高すぎて倫理上難しい。血液は比較的 low 侵襲とはいえ、採血量には制約があるが、今回血液を用いて臨床免

疫的解析を行ったことは現実的で、長期間にわたり追跡が可能であった。

IL-6 は急性期サイトカインであるが、本研究では血液中で見られた変化は半年や 1 年といった時間経過で現れた。NMO 患者では、血清中の IL-6 は軽度上昇にとどまるが、CSF 中 IL-6 は著明に上昇していることが報告されており⁷³、NMO/NMOsd の免疫的疾患背景には、特に局所で、IL-6 が過剰に産生される慢性的な状態があるのだろう。再発回数や患者自覚症状は 1 年を待たずに改善しており⁴¹、本研究で見出された末梢血中のリンパ球の数的変化は、TCZ 投与による病態改善の結果による変化を見ている可能性もあった。

本研究では、主に数的変化に着目して解析を行った。今後は、数的変化が現れた制御性細胞の機能の検討などが課題であると考ええる。

VII. 結論

末梢血 B 細胞におけるプラズマブラストの頻度は、NMO 患者で RRMS 患者よりも有意差をもって多かった。しかしながら、RRMS 患者の 4 分の 1 にプラズマブラスト頻度高値を認め、この群では自己抗体介在性自己免疫疾患の合併や自己抗体保持の割合が高く、IFN- β 1 治療で効果のあった患者がいなかった。このため、プラズマブラスト頻度の測定は、RRMS 患者のうち疾患背景が異なる一群を区別するのに役立つ可能性があった。

NMO/NMOsd 患者への 1 年間の TCZ 投与の研究では、プラズマブラストの割合には明らかな低下傾向がなく、プラズマブラスト数を算出したところ、平均で見ると減少傾向ではあったが HC より高値に保たれていた。未熟なナイーブ B 細胞であるトランジショナル B 細胞は、NMO/NMOsd 患者末梢血中では著明に減少していたが、1 年間で増加する傾向にあった。また、活性化制御性 T 細胞と CD56 強陽性 NK 細胞の有意な増加を認めた。制御性機能を持つ独立したリンパ球集団が増加したことは特記すべき変化であった。CD56 弱陽性 NK 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞は対照群に比較して NMO/NMOsd 患者では有意に減少していたが、治療後増加する傾向にあった。また、治療後に Th17 細胞の明らかな低下は認められなかった。以上の結果を表 2 に示した。

表 2 NMO/NMOsd 患者末梢血中リンパ球各分画数の治療前後の変化

	治療前	治療後の変化
トランジショナル B 細胞	↓	(↑)
成熟ナイーブ B 細胞	差なし	
メモリーB 細胞	差なし	
プラズマブラスト	↑	
活性化制御性 T 細胞	↓	↑
CXCR5 陽性メモリーCD4T 細胞	↓	
CD56 強陽性 NK 細胞	差なし	↑
CD56 弱陽性 NK 細胞	↓	(↑)
γδ T 細胞	↓	(↑)
MAIT 細胞	差なし	
iNKT 細胞	差なし	

* () は傾向として認められたものの、有意差に至らなかった変化を示す。

血清抗 AQP4 抗体は 6 人中 4 人で陽性であったが、治療後に減少傾向であった。また、髄液中抗 AQP4 抗体は 6 人中 2 人で陽性であったが、1 年後は保たれていた。

以上、NMO/NMOsd 患者臨床検体の詳細なリンパ球解析を通して、NMO/NMOsd の免疫的な疾患背景にはトランジショナル B 細胞とプラズマブラスト、制御性 T 細胞、自然免疫系および自然リンパ球系の細胞の複数のリンパ球の数的異常があることが示された。TCZ 投与後に、これらの集団の一部は 1 年の経過で正常コントロールに近づく変化を示した。一つのサイトカインのシグナル伝達の阻害によってこのような多様な変化を認めたことは、IL-6 シグナリングのヒト生体内での多様な機能を反映していると考えられ、また、IL-6 シグナリングの亢進が NMO/NMOsd の病態形成に関与していることが示唆された。

かつて、中枢神経の脱髄性疾患という大きな概念の中で MS にもいくつかの病型が認識され、その中から PPMS、RRMS、SPMS の分類がなされた。また、21 世紀に入ってから NMO という新たな疾患概念が独立し、抗 AQP4 抗体というマーカーの発見でその存在が裏付けられた。また、NMOsd という概念も提唱されている。そして、近年では RRMS や NMO もそれぞれが必ずしも同質な疾患背景を持つ集団ではなく、個別にみるとさまざまな免疫背景を持つ症例が混在していることが認識されるようになった。今後、病名や臨床経過だけではなく、個々の患者の病態を踏まえた治療選択は重要となるだろう。本研究の知見は、中枢神経系自己免疫性脱髄性疾患の病態に迫り、また将来的には患者個別の免疫的背景を考慮した治療選択をする上で、貴重なデータを提供するものであると考える。

VIII. 謝辞

本研究は国立精神・神経医療研究センター病院の臨床サンプルを用いて、同センター神経研究所免疫研究部で行われた。研究に際して、神経内科医でないにもかかわらず研究生として受け入れご指導くださり、国内及び海外の学会で発表の機会をくださった免疫研究部の山村隆部長、NMO/NMOsd 患者さんのマネージメントをなさっていた同センター病院多発性硬化症センターの荒木学医師、そしてボランティアとしてサンプルをくださった患者のみなさま、患者さんを支え研究に協力してくださった患者さんのご家族のみなさま、サンプル採取や患者さんとの応対に協力してくださった医師、看護師、検査技師、事務職員など病院スタッフのみなさま、健康コントロールとしてサンプルをくださった免疫研究部のみなさまに感謝申し上げます。

また、大学院で綿密にご指導いただいた東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻国際生物医科学講座発達医科学教室の水口雅教授、同研究科生殖・発達・加齢医学専攻小児医学講座小児科学教室の岡明教授、小児科以外の研究テーマを選んだ際に快く送り出してくださった同前教授で現国立成育医療研究センターの五十嵐隆総長、そして大学院への進学を進めてくださった同前医局長の小野博医師に深謝申し上げます。

IX. 文献

1. Polman C.H., Reingold S.C., Wolinsky J.S., *et al.* Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald Criteria. *Ann Neurol.* 69(2): 292-302 (2011)
2. Osoegawa M., Yamamura T., Research Committee of Neuroimmunological Diseases., *et al.* Temporal changes and geographical differences in multiple sclerosis phenotypes in Japanese: nationwide survey results over 30 years. *Mult Scler.* 15(2): 159-173 (2009)
3. Muto M., Mori M., Kuwabara S., *et al.* Current symptomatology in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Eur J Neurol.* 22(2): 299-304 (2015)
4. Kamm C.P., Uitdehaag B.M., and Polman C.H. Multiple sclerosis: current knowledge and future outlook. *Eur Neurol.* 72(3-4): 132-141 (2014)
5. Durelli L., Verdun E., Independent Comparison of Interferon (INCOMIN) Trial Study Group *et al.* Every-other-day interferon beta-1b versus once-weekly interferon beta-1a for multiple sclerosis: results of a 2-year prospective randomized multicentric study (INCOMIN). *Lancet* 359(9316): 1453-1460 (2002)
6. Panitch H., Goodin D. S., Weinshenker B., *et al.* Randomized, comparative study of interferon beta-1a treatment regimens in MS: the EVIDENCE Trial. *Neurology*

- 59(10): 1496-1506 (2002)
7. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium & the Wellcome Trust Case Control Consortium 2. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476(10251): 214-219 (2011)
 8. Owens G.P., Bennett J.L., Burgoon M.P., *et al.* The B cell response in multiple sclerosis. *Neurol Res.* 28(3): 236-244 (2006)
 9. O’Gorman C., Lin R., Broadley S.A., *et al.* Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. *Neuroepidemiology* 40(1): 1-12 (2013)
 10. Nylander A. and Hafler D.A. Multiple Sclerosis. *J Clin Invest.* 122(4): 1180-1188 (2012)
 11. de Seze J. Neuromyelitis optica. *Arch Neurol.* 60(9): 1336-1338 (2003)
 12. Verkman A.S. Aquaporins in clinical medicine. *Annu Rev Med.* 63: 303-316 (2012)
 13. Marrie R.A. and Gryba C. The incidence and prevalence of neuromyelitis optica. *Int J MS Care.* 15(3): 113-118 (2013)
 14. Wingerchuk D.M., Lennon V.A., Weinshenker B.G., *et al.* Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 66: 1485-1489 (2006)
 15. Mealy M.A., Wingerchuk D.M., Levy M., *et al.* Epidemiology of neuromyelitis optica in the United States. *Arch Neurol.* 69(9): 1176-1180 (2012)
 16. Cabrera-Gomez J.A., Quevedo-Sotolongo L., Cabrera-Nunez A.Y., *et al.* *Brain*

- magnetic resonance imaging findings in relapsing neuromyelitis optica. *Mult Scler.* 13(2): 186-192 (2007)
17. Tanaka M., Tanaka K., and Komori M. Interferon-beta (1b) treatment in neuromyelitis optica. *Eur Neurol.* 62(3): 167-170 (2009)
18. Palace J., Leite M.I., Vincent A., *et al.* Interferon beta treatment in neuromyelitis optica: increase in relapses and aquaporin 4 antibody titers. *Arch Neurol.* 67(8): 1016-1017 (2010)
19. Wingerchuk D.M., Lennon V.A., Weinshenker B.G., *et al.* The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol.* 6: 805-815 (2007)
20. Lennon V.A., Wingerchuk D.M., Weinshenker B.G., *et al.* A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 364(9451): 2106-2112 (2004)
21. Lennon V.A., Kryzer T.J., Hinson S.R., *et al.* IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med.* 202(4): 473-477 (2005)
22. Agre P. and Kozono D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett.* 555(1): 72-78 (2003)
23. Saadoun S., Waters P., Papadopoulos M.C., *et al.* Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces

- neuromyelitis optica lesions in mice. *Brain* 133(2): 349-361 (2010)
24. Jarius S., Aboul-Enein F., Kristoferitsch W., *et al.* Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica. *Brain* 131(11): 3072-3080 (2008)
25. Chihara N., Aranami T., Yamamura T., *et al.* Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108(9): 3701-3706 (2011)
26. Simpson R.J., Hammacher A., Ward L.D., *et al.* Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci.* 6(5): 929-955 (1997)
27. Scheller J., Garbers C., and Rose-John S. Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Semin Immunol.* 26: 2-12 (2014)
28. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T., *et al.* A new era for the treatment of inflammatory autoimmune disease by interleukin-6 blockade strategy. *Semin Immunol.* 26: 88-96 (2014)
29. Dalakas M.C. B cells as therapeutic targets in autoimmune neurological disorders. *Nat Clin Prac Neurol.* 4(10): 557-567 (2008)
30. Zuccarino-Catania G., Sadanand S., Shlomchik M.J., *et al.* CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype. *Nat Immunol.* 15(7): 631-637 (2014)
31. Medina F., Segundo C., Brieva J.A., *et al.* The heterogeneity shown by human

- plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* 99(6): 2154-2161 (2002)
32. Odendahl M., Jacobi A., Dorner T., *et al.* Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 165(10): 5970-5979 (2000)
33. Morita R., Schmitt N., Ueno H., *et al.* Human blood CXCR5⁺CD4⁺ T cells are counterpart of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 34(1): 108-121 (2011)
34. Calabrese L.H. and Rose-John S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol.* 10(12): 720-727 (2014)
35. Veldhoen M., Hocking R.J., Stockinger B., *et al.* TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24(2): 179-189 (2006)
36. Miyake S. MAIT cells in autoimmunity (in Japanese). *Jpn J Clin Immunol.* 37(1): 19-24 (2014)
37. Ohkura N. and Sakaguchi S. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol.* 32(2): 95-106 (2010)
38. Shi F-D., Ljunggren H-G., Kaer L.V., *et al.* Organ-specific features of natural killer

- cells. *Nat Rev Immunol.* 11(10): 658-671 (2011)
39. Jaroszeski M.J. and Radcliff G. Fundamentals of flow cytometry. *Mol Biotechnol.* 11(1): 37-53 (1999)
40. Araki M., Aranami T., Yamamura T., *et al.* Clinical improvement in a patient with neuromyelitis optica following therapy with the anti-IL-6 receptor monoclonal antibody tocilizumab. *Mod Rheumatol.* 23: 827-831 (2013)
41. Araki M., Aranami T., Yamamura T., *et al.* Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica. *Neurology* 82: 1302-1306 (2014)
42. Kurtzke J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an extended disability status scale. *Neurology* 33(11): 1444-1452 (1983)
43. Colonna-Romano G., Bulati M., Caruso C., *et al.* A double-negative (IgD⁻CD27⁻) B cell population is increased in the peripheral blood of elderly people. *Mech Aging Dev.* 130: 681-690 (2009)
44. Viglietta V., Weiner H.L., Hafler D.A., *et al.* Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 199(7): 971-979 (2004)
45. Miyara M., Yoshioka Y., Sakaguchi S., *et al.* Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30: 809-911 (2009)

46. Diehl S.A., Schmidlin H., Spits H., *et al.* IL-6 Triggers IL-21 production by human CD4⁺ T cells to drive STAT3-dependent plasma cell differentiation in B cells. *Immunol Cell Biol.* 90: 802-811 (2012)
47. Hirota K., Duarte J.H., Stockinger B., *et al.* Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol.* 12(3): 255-263 (2011)
48. Krumbholz M., Faber H., Meinl E., *et al.* Interferon- β increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity. *Brain* 131(6):1455-1463 (2008)
49. Matsumoto M., Kurosaki T., Baba Y., *et al.* Interleukin 10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* 41(6): 1040-1051 (2014)
50. Mucida D., Park Y., Cheroutre H., *et al.* Reciprocal Th17 and regulatory T Cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 317: 256-260 (2007)
51. Samson M., Audia s., Bonnotte B., *et al.* Inhibition of interleukin-6 functions corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 64(8):2499-2503 (2012)
52. Guggino G., Giardina A.R., Ciccia F., *et al.* Targeting IL-6 signaling in early rheumatoid arthritis is followed by Th1 and Th17 suppression and Th2 expression. *Clin Exp Rheumatol.* 32(1): 77-81 (2014)

53. Vandembark A.A., Huan J., Burdette D., *et al.* Interferon-beta-1a treatment increase CD56^{bright} natural killer cells and CD4+CD25+Foxp3 expression in subjects with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 215: 125-128 (2009)
54. Blelekova B., Catalfamo M., Martin R., *et al.* Regulatory CD56^{bright} natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2R α -targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(15): 5941-5946 (2006)
55. Lunemann A., Tackenberg B., Munz C., *et al.* Impaired IFN- γ production and proliferation of NK cells in multiple sclerosis. *Int Immunol.* 23(2): 139-148 (2011)
56. Stinissen P., Vandevyver C., Zhang J., *et al.* Increased frequency of $\gamma\delta$ T cells in cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with multiple sclerosis. *J immunol.* 154(9): 4883-94 (1995)
57. Miyazaki Y., Miyake S., Yamamura T., *et al.* Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int Immunol.* 23(9): 529-535 (2011)
58. Araki M., Kondo T., Yamamura T., *et al.* Th2 bias of CD4⁺ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol.* 15(2): 279-288 (2003)
59. Collins A.M. and Jackson K.J.L. A temporal model of human IgE and IgG antibody production. *Frontier Immunol.* 4(00235): 1-6 (2013)
60. Bruhns P., Iannascoli B., Daeron M., *et al.* Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113(16):

3716-3725 (2009)

61. Engelmann R., Bradt J., Mueller-Hilke B., *et al.* IgG1 and IgG4 are the predominant subclasses among auto-antibodies against two citrullinated antigens in RA. *Rheumatology* 47: 1589-1492 (2008)
62. Isobe N., Yonekawa T., Kira J., *et al.* Quantitative assays for anti-aquaporin-4 antibody with subclass analysis in neuromyelitis optica. *Mult Scler.* 18(11): 1541-1551 (2012)
63. Abbas A.K., Lichtman A.H., and Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*, Seventh Edition, Elsevier/Saunders, Philadelphia, p. 100 (2011)
64. Mihara M., Katsutani K., Ohsugi Y. *et al.* Tocilizumab inhibits signal transduction mediated by both mIL-6R and sIL-6R, but not by the receptors of other members of IL-6 cytokine family. *Int Immunopharmacol.* 5(12): 1731-1740 (2005)
65. Jego G., Palucka A. K., Banchereau J., *et al.* Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 19(2): 225-234 (2003)
66. Harrer A., Tumani H., Kraus J., *et al.* Cerebrospinal fluid parameters of B cell-related activity in patients with active disease during natalizumab therapy. *Mult Scler.* 19(9): 1209-1212 (2013)
67. Von Glehn F., Farias A.S., Brandao C.O., *et al.* Disappearance of cerebrospinal fluid

- oligoclonal bands after natalizumab treatment of multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 18(7): 1038-1041 (2012)
68. Arima Y., Harada M., Murakami M., *et al.* Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell* 148(3): 447-457 (2012)
69. Samoilova E.B., Horton J.L., Chen Y., *et al.* IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol.* 161(12): 6480-6486 (1998)
70. Serada S., Kishimoto T., Naka T., *et al.* IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(26): 9041-9046 (2008)
71. Leech M.D., Barr T.A., Anderton S.M., *et al.* Cutting edge: IL-6-dependent autoimmune disease: dendritic cells as a sufficient, but transient, source. *J Immunol.* 190(3): 881-885 (2013)
72. Barr T.A., Shen P., Gray D., *et al.* B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med.* 209(5): 1001-1010 (2012)
73. Uzawa A., Mori M., Kuwabara S., *et al.* Cytokine and chemokine profiles in neuromyelitis optica: significance of interleukin-6. *Mult Scler.* 16(12): 1443-1452

(2010)