



2021年3月9日

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター(NCNP)

国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)

二次進行型多発性硬化症の診療に有用な免疫学的バイオマーカーを確立： ～エオメス陽性ヘルパーT細胞の研究に基づく成果～

国立精神・神経医療研究センター(NCNP)神経研究所免疫研究部のベン・レイバニー研究員、佐藤和貴郎室長、大木伸司室長、山村隆部長らの研究グループは、NCNP 病院・脳神経内科、同多発性硬化症センター、同放射線診療部および同臨床検査部との共同研究から、進行期にある多発性硬化症の早期発見に有用な血液診断マーカーを発見しました。多発性硬化症(MS)¹⁾患者の20-50%は、再発寛解型(RRMS)を経て二次進行型多発性硬化症(SPMS)へ移行しますが、SPMSでは中枢神経内で慢性炎症と神経変性がゆっくと不可逆的に進行し、車椅子や寝たきりの生活に至る例が多く見られます。治療薬の開発は進んでいますが、SPMSの診断は臨床的な評価に頼るしかないので容易ではなく、診断・治療の遅れなどの問題が生じています。今回の研究では、免疫応答に関わるT細胞の一種であるEomes陽性²⁾Th細胞(エオメス陽性ヘルパーT細胞)がSPMSの診断や病勢評価において有用なバイオマーカーとなることを明らかにしました。エオメス陽性ヘルパーT細胞の末梢血中の頻度(Eomes頻度)は、健常者、RRMS患者、一次進行型MS(PPMS)患者、SPMS患者の4群で比較検討したところ、SPMSで顕著な増加が見られ、SPMSの進行速度と有意に相関しました。研究チームは以前にマウスのSPMSモデルでエオメス陽性ヘルパーT細胞が脳内炎症を起こすことを報告しましたが(Raveny et al. Nature Comm 2015)、今回の研究ではSPMS患者の死後脳におけるエオメス陽性ヘルパーT細胞浸潤の証明にも成功しました。マウスの基礎研究の成果がヒト疾病で確認された意義は大きく、研究成果は今後、SPMS診断能力の向上、医療の均てん化、ひいてはMS患者の予後の向上に大きく貢献することが期待できます。

この研究成果は、米国アカデミー紀要「Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)」オンライン版に**報道解禁日を2021年3月9日午前5時(米国東部標準時間3月8日午後3時)**として掲載されます。

■研究の背景

MSは、免疫系が自身の中枢神経系を攻撃することで発症する自己免疫疾患の一つです。主に髄鞘が障害されるRRMSでは、再発(=炎症性脱髄の悪化)と寛解(=炎症と脱髄の改善)を繰り返すことが特徴ですが、病歴が長くなったRRMS患者の一部はSPMS(secondary progressive MS)に移行します。SPMSでは脱髄に加えて神経組織の変性が起こり、神経障害は不可逆性に進展します。進行したSPMS患者の脳萎縮は顕著であり、それに伴い歩行困難、認知機能障害など、重篤な中枢神経症状を呈します。RRMSで有効性が確認されている薬剤は

SPMS には効果がありません。SPMS の診断根拠としては、再発に関係ない神経障害の進行 (progression independent of relapse activity; PIRA) を確認することが求められます。脳神経内科の臨床では、年 1-2 回の神経症状評価尺度(EDSS)³⁾ の評価値の変動などを参考に SPMS と診断しますが、PIRA の確認は容易ではなく、主治医が SPMS の診断を確定するまでに要する期間は年単位になっており、治療機会の喪失に繋がっていました。SPMS 病態を的確に反映するバイオマーカーが利用できれば SPMS の診療は現在よりもはるかに容易になることから、バイオマーカー研究が世界各国で展開されてきました。

なお SPMS の症状の進行速度は、必ずしも一定ではなく、「安定期(stationary phase)」と「進行期 (progressive phase)」が確認できるケースが多いことが認識されるようになっていますが、このことも SPMS の診療を複雑にする要因になっています。

■研究の概要

本研究グループは、独自に開発した SPMS マウスモデルにおいてエオメス陽性ヘルパーT 細胞が病原性細胞であることを示しました(Raveney et al. **Nature Comm** 2015)。SPMS 患者の一部で血液中のエオメス陽性ヘルパーT 細胞の増加を確認しましたが、大規模な研究で、その意義を確認する必要があります。そこで今回、RRMS と SPMS だけでなく一次進行型 MS (PPMS) も含む、多数例での解析を進め、エオメス陽性ヘルパーT 細胞が SPMS のバイオマーカーとなりうるか、Eomes 頻度の多寡が SPMS 病態とどのように関連するのか、について調べました。その結果、SPMS 患者の Eomes 頻度は他群に比較して有意な高値を呈し(図1)、その分布は健康人や RRMS 患者と重なるピークと、頻度がより高く広域に分布するピークの2つのピークからなることがわかりました(図2)。

計算から得られたカットオフ値(=13%)を超える患者(Eomes-hi 群)はほぼ全例が SPMS 患者でしたが、ほぼ同数の SPMS 患者がカットオフ値以下(Eomes-lo 群)でした。SPMS の症状の進行速度は、必ずしも一定ではなく、「安定期(stationary phase)」と「進行期 (progressive phase)」が確認できるケースが多いことは、先に述べましたが、次にこの Eomes 頻度の高低が、

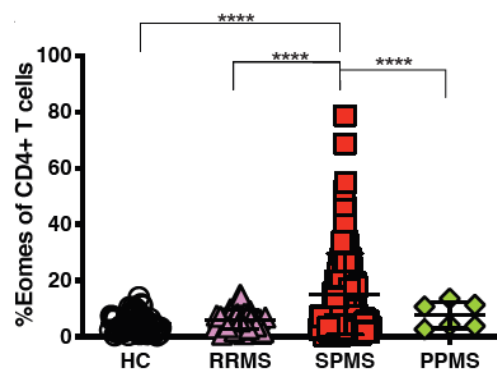


図1 MS患者および健康人のEomes頻度
健康者；HC、再発寛解型MS；RRMS、二次進行型MS；SPMS、一次進行型MS患者；PPMS

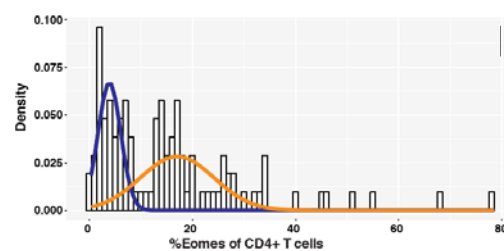


図2 SPMS患者のEomes頻度分布
混合ガウスモデルを用いた解析から、SPMS患者のEomes頻度分布(□)は、健康人やRRMS患者と重なるピーク(紺色)と、頻度がより高く広域に分布するピーク(オレンジ色)の2つの正規分布の線型結合からなることがわかった。

SPMS 患者のどのような病態を反映するかを調べるため、SPMS の診断に用いる EDSS の1年間の変動量を Δ EDSS と定義し、この値が 0 を超える患者を progressive 群(以下 P 群)、0 以下の患者を stationary 群(以下 S 群)として2群の SPMS 患者の比較を行いました。その結果、P 群の Eomes 頻度は S 群と比較して有意に高値を示し、先の Eomes-hi 群と P 群、Eomes-lo 群と S 群の大部分がオーバーラップすることがわかりました。ROC 曲

線 (AUC=0.8276) から計算されたカットオフ値 (=12.1%) は先の
 カットオフ値 (13%) とよく一致しており、この値を用いて SPMS
 患者を分類すると、Eomes-hi 群の 80%以上が P 群に分類さ
 れることがわかりました (図3)。したがって Eomes 頻度が
 SPMS 患者の障害進行度の良好な指標となる可能性が示さ
 れました。さらに複数回の診断で P 群から S 群 (P→S)、また
 は S 群から P 群 (S→P) と変化した SPMS 患者と、P 群のまま
 であった SPMS 患者の Eomes 頻度を調べたところ、P→S の
 患者では有意な Eomes 頻度の低下、S→P の患者では有意な
 Eomes 頻度の上昇が認められ、P 群→P 群では特
 定の傾向を示さないことがわかり、Eomes 頻度が患者
 の障害進行度と相関してダイナミックに変動する
 ことが明らかとなりました (図4)。さらに MRI 画像の
 解析から、Eomes-hi 群の SPMS 患者では Eomes-
 lo 群に比べて灰白質の容積が有意に低下しており、
 SPMS 患者に認められる灰白質の萎縮および重症
 度と Eomes 頻度の関連も明らかとなりました。

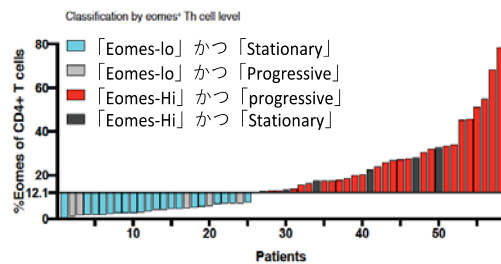


図3 SPMS患者のEomes頻度と障害進行度の相関
 (Waterfall plot解析)
 ΔEDSS を指標SPMS患者をStationary群とProgressive群に分類し、ROC解析から得られたカットオフ値 (=12.1%) を基準としたEomes-Hi/Loによる分類と比較した。

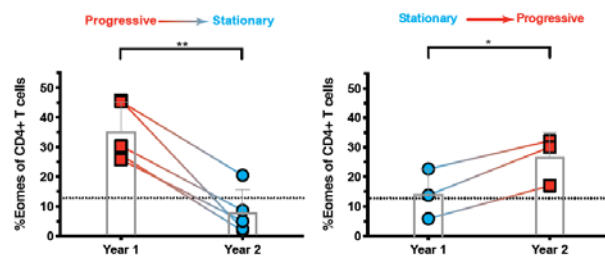


図4 Eomes頻度と臨床病態の変動
 複数回の診断で、P群からS群 (P→S; 左)、またはS群から
 P群 (S→P; 右) と変化したSPMS患者のEomes頻度を示す。

SPMS モデルマウスの脳脊髄組織や、SPMS 患者の脳脊髄液中の Eomes 頻度は明らかに増加しますが、エオメ
 ス陽性ヘルパーT 細胞が SPMS 患者の脳実質内にどのように分布するかは不明でした。そこで次に SPMS 患者
 死後脳を対象に、分離した単核球画分を定法に従って抗体染色し、フローサイトメーターを用いてエオメス陽性ヘル
 パーT 細胞の動態と中枢神経病理との関連を調べました⁴⁾。興味深いことに、脳実質内の Th 細胞は、大部分
 が Eomes 陽性かつ Granzyme B 陽性であり、とくに前頭葉あるいは後頭葉の normal-appearing white matter
 (NAWM)⁵⁾で Eomes 陽性細胞の割合が最も高く、皮質の病変部位にも多くの Eomes 陽性 Th 細胞が分布していま
 した (図5) が、対照として用いたパーキンソン病患者由来脳
 組織ではそもそも Th 細胞がほとんど検出されないことがわ
 かりました。さらに SPMS 患者の障害進行度と Eomes 頻度
 が極めてよく相関すること、およびエオメス陽性ヘルパーT
 細胞は SPMS 患者の中枢神経系に広範に分布し、その多く
 が Granzyme B 陽性の細胞障害性であることが明らかとなり
 ました。さらに SPMS 患者末梢血中のエオメス陽性ヘルパー
 T 細胞も、その大部分が Granzyme B 陽性であり、刺激に伴
 って Granzyme B 産生を引き起こすことも明らかとなりました。
 以上の結果は、SPMS 患者のエオメス陽性ヘルパーT 細胞
 および Granzyme B 陽性 Th 細胞が、神経細胞障害に直
 接関わる可能性を示すものです。

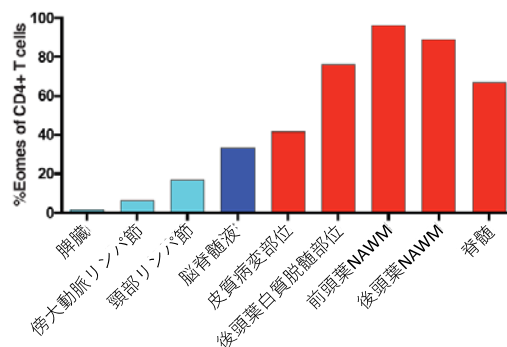


図5 ヒト中枢神経系のEomes陽性Th細胞の分布
 フローサイトメーターを用いて、SPMS患者の中
 枢神経病理と、それぞれのエオメス陽性ヘルパー
 T細胞分布とを比較した。

■今後の展望

今回の研究結果から、ヒト末梢血中の Eomes 頻度が、SPMS の病態進行度と極めて良く相関することが明らかとなり、同細胞は SPMS 病態のリアルタイムのモニタリングを可能にする画期的なバイオマーカーであることが示唆されます。今後は多施設共同研究による多数サンプルの大規模解析を実施することで、SPMS 患者の病態進行度のリアルタイム評価法を確立した上で臨床現場への普及を目指すことにより、よりの確な SPMS の精密医療の実現に近づくことが期待されます。

■用語説明

注 1) 多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS)

中枢神経系の炎症性脱髄疾患であり、その患者は国内では約 2 万 5000 人、全世界では 200 万～300 万人に達すると推定されている。大部分の患者が初発時に呈する RRMS (再発寛解型 MS; relapsing-remitting MS)、RRMS から移行する進行性病態である SPMS (二次進行型 MS; secondary progressive MS)、および再発寛解病態を経ずに進行性病態を呈する PPMS (一次進行型 MS; primary progressive MS) などの病型が知られている。SPMS では脱髄と並行して神経細胞障害による顕著な脳萎縮を認める。最近、有効性が示された初めての SPMS 治療薬であるシボニモドは、類似薬のフィンゴリモドと同様、リンパ球などの体内循環を阻害する活性を持つが、病態抑制につながる SPMS に対する作用機序は不明である。

注 2) Eomes (Eomesodermin)

細胞障害性 T 細胞や NK 細胞など、細胞障害性を示す細胞群で発現が亢進する転写因子の一つである。グランザイム、パーフォリン、インターフェロン γ などの発現に関わり、移植細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞などの認識と破壊に関わる。

注 3) 神経症状評価尺度 (EDSS)

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) 患者の身体障害度の評価に用いることが推奨されている総合障害度評価スケール。日常診療や多くの臨床試験において、MS の身体障害度の評価に最も用いられている。評価方法として長い歴史もあり、信頼性、妥当性の高い MS の障害評価尺度といえるが、測定検者ごとに点数がばらつくこと、検出感度が必ずしも高くないこと、点数変化が直線的でないことなどの問題点も指摘されている。

注 4) 剖検組織を用いたフローサイトメーター解析

剖検組織サンプルを、ホルマリン固定しないままできる限り早く酵素消化することで、単核球画分を分離することが可能である。得られた細胞画分を定法に従って各種蛍光標識抗体を用いて染色し、フローサイトメーターを用いて解析することにより、脳内にした各種免疫細胞の挙動を解析することができる。NCNP では、研究所免疫研究部と NCNP 病院・脳神経内科、同臨床検査部との共同研究の積み重ねにより、この様な迅速な臨床サンプルの解析が可能となっている。

注 5) normal-appearing white matter (NAWM)

MS患者における、通常のMRIの撮像では異常所見が確認されない潜在的な病変部位のこと。病理学的には、アストロサイトの増生、ミクログリアの活性化、血管周囲領域への細胞浸潤、軽度の軸索変性や脱髄などの病変を反映している。

■原著論文情報

・タイトル

Involvement of cytotoxic Eomes-expressing CD4+ T cells in secondary progressive multiple sclerosis

・著者名

Ben JE Raveney, Wakiro Sato, Daiki Takewaki, Chenyang Zhang, Tomomi Kanazawa, Youwei Lin, Tomoko Okamoto, Manabu Araki, Yukio Kimura, Noriko Sato, Terunori Sano, Yuko Saito, Shinji Oki, Takashi Yamamura

・雑誌

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)

■助成金

本研究成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって行われました。

- ・日本医療研究開発機構 (AMED) 難治性疾患実用化研究事業
- ・日本学術振興会・科学研究費補助金
- ・国立精神・神経医療研究センター・精神・神経疾患研究開発費
- ・日本多発性硬化症協会・医学研究助成
- ・加藤記念難病研究助成基金

■お問い合わせ先

【研究に関する問い合わせ】

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター

神経研究所 免疫研究部

部長 山村 隆

TEL: 042-341-2711

FAX: 042-346-1753

E-mail: yamamura(a)ncnp.go.jp

室長 大木 伸司

E-mail: soki(a)ncnp.go.jp

【報道に関するお問い合わせ】

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター

総務課広報係

〒187-8551 東京都小平市小川東町 4-1-1

TEL: 042-341-2711(代表) FAX: 042-344-6745

E-mail: ncnp-kouhou(a)ncnp.go.jp

AMED 事業に関するお問合せ

国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)

創薬事業部 創薬企画・評価課

難治性疾患実用化研究事業

〒100-0004 東京都千代田区大手町 1-7-1 読売新聞ビル

03-6870-2226

E-mail: nambyo-r(a)amed.go.jp

※E-mail は上記アドレス(a)の部分を@に代えた上でご使用ください。