

<Education Program 3>

多発性硬化症の臨床研究の最近の進歩： アストロサイトパチーからみた脱髄

吉良 潤一

要旨：視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica, NMO) は、NMO-IgG の発見により多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) とは病態機序が異なる独立した疾患とする説が有力となっている。NMO-IgG が認識する aquaporin-4 (AQP4) がアストロサイトの足突起に存在する水チャネル分子であることから、NMO-IgG (抗 AQP4 抗体) が、アストロサイトの足突起上の AQP4 に結合し補体を活性化することでアストロサイト死を誘導するとされる。他方、Baló 病は脱髄層と非脱髄層が交互に同心円状に分布する特徴的な病理像を示す。このような同心円状病巣は、MS や NMO でもみられることがある。私たちは、Baló 病巣では脱髄巣も非脱髄巣もふくめて広汎に AQP4 が脱落していることをみだした。Baló 病では、血管周囲性に抗体や補体の沈着はみられず、血清抗 AQP4 抗体も陰性であることから、抗 AQP4 抗体非依存性アストロサイトパチーが、オリゴデンドロサイトパチーを誘導して、脱髄をひき起こすとの新しい説を提唱している。同様な血管周囲性の抗体や補体の沈着をとまなわない AQP4 の脱落は、MS や NMO の病巣でもみられることがあり、自己抗体非依存性アストロサイトパチーは広く脱髄性疾患に共通するメカニズムである可能性が高い。

(臨床神経 2010;50:788-793)

Key words：多発性硬化症, 視神経脊髄炎, Baló病, アストロサイトパチー, アクアポリン4

はじめに

多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) には、ヒトの名前を冠するいくつかの亜型が知られている。Devic 病 (視神経脊髄炎, neuromyelitis optica, NMO) は Devic により記載され、視神経と脊髄を選択的に侵すものとして有名である。他方、Baló 病 (同心円硬化症) は、脱髄層と非脱髄層が交互に同心円状に分布する特徴的な病理像を示すことでよく知られている。本症は病理診断によっていたが、MRI で同心円状病巣が描出できるようになり、生前診断されるようになった。いずれも MS の亜型と考えられていたが、Devic 病は、NMO-IgG の発見により MS とは独立した疾患との意見が優勢である。本稿では、この二つの病型からみた MS の病態をめぐる最近の研究の進歩について述べる。

1. 視神経脊髄炎の病態をめぐる

NMO は Devic の報告以来、MS との異同が論争になってきた。我が国では、1958 年に Okinaka¹⁾ によりアジア人でははじめて多数例の脱髄性疾患の報告がなされ、その 65% は NMO とされた。この報告で MS と NMO の間に多くの移行例がみいだされたことから、以降、本邦では単相性のもののみが NMO とされ、再発性のものは MS の範疇にふくめられることとなった。

しかし、aquaporin-4 (AQP4) を認識する NMO-IgG の発見により、NMO は AQP4 を発現するアストロサイトが標的で脱髄は二次的に起きるに過ぎず、脱髄が一次性である MS とは異なる疾患とする説が有力視されるにいたった。これにより我が国で病像の解析が進められてきた視神経脊髄型多発性硬化症 (opticospinal MS, OSMS) は NMO とみなされるようになった。その主な根拠は、①抗 AQP4 抗体が NMO に特異的に検出されること、② NMO の脊髄・延髄病巣では AQP4 の選択的な喪失がみられること、③抗 AQP4 抗体陽性患者血清由来 IgG の実験動物への移入によりアストロサイトの障害が再現できることなどである。

私たちは、多数の自験例の検討から、(1) AQP4 の喪失という病理所見は MS でもみとめられる一方、典型的な NMO であっても AQP4 喪失がみられない例が約半数あること、(2) 種々の方法で抗 AQP4 抗体を測定しても NMO の約 5 割は陰性であること、(3) NMO-IgG/抗 AQP4 抗体価と NMO の発症・再発は相関しないこと、および、動物モデルの報告によれば、(4) 抗 AQP4 抗体の末梢からの移入だけでは血液脳関門が脆弱な状況であっても何もおこらず、アストロサイトの障害を誘導するには抗 AQP4 抗体に加えて髄鞘蛋白特異的な T 細胞の移入を必要とすることなどから、抗 AQP4 抗体は修飾因子に過ぎず T 細胞などが病巣の形成には不可欠である可能性を指摘している。

私たちは、NMO 髄液での IL-17 や IFN γ の高値、NMO 末梢血 T 細胞が髄鞘蛋白に対して epitope spreading を示すこと

を明らかにしている²⁾³⁾。これらは、NMOの発症・再発のトリガーとしてのT細胞の重要性を支持する。約半数のNMOでAQP4に対する自己免疫が免疫学的にも病理学的にも存在しないことは、AQP4以外の要因が発症に重要であることを強く示唆する。我が国のMSとNMOにはHLAなどの免疫遺伝学的背景においても共通点がみられることから、発症機序において共通するメカニズムが存在する可能性が考えられる。

2. 抗AQP4抗体の役割をめぐって

これまでに、抗AQP4抗体価と脊髄病巣の長さが有意な正の相関を示すという報告⁴⁾が一編なされているが、これを再確認できた報告はない。他方、私たちは、抗AQP4抗体はSS-A/B陽性例で陰性例より有意に抗体価が高いこと、末梢血のTh1/Th2バランスでみるとTh2細胞が優勢な例で抗AQP4抗体価が高いことを報告している⁵⁾。一般的におこなわれているAQP4を発現している細胞をもちいた蛍光免疫染色法(immunofluorescence assay, IFA)による抗体の検出では、細胞が固定されることによるAQP4の変性、あるいは固定しない場合はスライドガラス上(固相上)に細胞が貼り付けられることによる抗原の変性がおこる。IFAで血清を段階希釈して抗AQP4抗体価を測定して臨床像と比較した多くの報告では、抗体価と臨床パラメーターとの間に有意な相関がみられていない。一方、私たちが最近開発したフローサイトメトリー法では、生細胞の表面に発現している変性していないAQP4に結合する抗体のみを検出でき、IgGのサブクラスごとの抗体の検出が可能である。また、共同研究者のSRS社が開発したbridging ELISA法では、固相のAQP4と液相で比較的立体構造を保ったAQP4の両者と結合する抗AQP4抗体を検出する。この2つの新しい方法による抗体価の測定から、私たちは、抗AQP4抗体価は罹病期間が長いほど、かつ再発回数(とくに視神経を侵す再発回数)が多いほど高くなること、フローサイトメトリー法で生細胞表面にのみ結合する抗体をしらべるとIgG抗AQP4抗体価はProgression Indexと逆相関すること、IgG2サブクラスの抗AQP4抗体価は脊髄病巣の長さとは逆相関することなどを明らかにした。罹病期間の長さや再発回数の多さと抗AQP4抗体価が相関することは欧米からも同様な報告がある⁶⁾。

これらの結果は、抗AQP4抗体は、液性免疫の亢進状態を背景にして産生され、罹病期間が長くなり再発をくりかえすにつれ抗原への親和性が増し(affinity maturationにより)高力価となることを示唆する。さらにIgGサブクラスやエпитープによりin vivoでの作用は異なり、補体結合活性の弱いIgG2クラスなどはむしろneuroprotectiveである可能性がある。事実、AQP4ノックアウトマウスでは実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)が著明に軽減することが報告されており⁷⁾、AQP4の発現を減らすことが治療となりえるとの説も提唱されている。これはAQP4欠損マウスでは、血管原性浮腫は重症化・遷延化する

Table 1 NMO IgG Positivity Rate Among Races.

Race	Disease	NMO-IgG (%)
Caucasians	NMO	43-78 *
Northern Japanese	OSMS	63 *
Southern Japanese	OSMS	38 *
Turkish	NMO	45
Caribbean	NMO	33
Indian	NMO spectrum	5 *
African American	OSMS	5

* : measured by Mayo Clinic; cited from Ref.

一方、細胞性浮腫は軽減することによる、急性散在性脳脊髄炎は、拡散強調MRI所見から急性期は細胞性浮腫が主(ADC mapで拡散が低下)であることが示されているので、EAEなど炎症にともなう細胞性浮腫はAQP4の発現が低い方がむしろ障害が軽くなることが考えられる。したがって、抗AQP4抗体が陽性であると再発しやすい、とくに視神経炎を再発しやすいことが明らかになっているが、それは抗AQP4抗体の作用ではなくて、もともとT細胞性自己免疫の強さなどの背景があって再発しやすく、抗AQP4抗体は再発の結果高くなるに過ぎない可能性がある。また、一部のサブクラスの抗AQP4抗体がneuroprotectiveに作用するために、抗AQP4抗体総体としてみると臨床パラメーターと有意な相関を示さないとも考えられる。

3. Seronegative NMO をめぐって

NMO-IgG陽性率は、人種や臨床的な病型の括りによって大きく異なる(Table 1)⁸⁾。抗AQP4抗体陽性率に関する最近のイタリア(47%の陽性率)⁹⁾やフランス(54%の陽性率)¹⁰⁾の大規模な報告によれば、陽性率は約50%である。これは私たちの報告ともよく一致する。また、病理学的にも、AQP4の脱落がまったくみられないNMOも報告されている。私たちの多数のNMO剖検例の病理学的検討においても約半数(11例中5例, 45%)ではAQP4の脱落はみられなかった¹¹⁾。したがって、NMO-IgG陰性例のすべてを抗AQP4抗体の感度の差に帰することはできないのは明白である。臨床的には、NMO-IgG/抗AQP4抗体陽性者は、陰性者に比べて再発率が高い、視力障害が強い、脳病巣の頻度が高い、SS-A/Bなどの自己抗体やシェーグレン症候群などの自己免疫疾患の合併率が高いといった特徴がある⁵⁾。これらの事実は、NMO-IgG/抗AQP4抗体がプライマリーな役割を担っておらず、修飾因子に過ぎないことを示唆する。Seronegative NMOを独立した一疾患であるかのように取り扱う研究者もいるが、再発性であってNMO-IgGが陰性のばあいに、それがMSと異なるという明確な科学的根拠は現時点では存在しない。また、単相性のNMOの多くはseronegativeであり、自己免疫疾患の背景は乏しい。これらのことから、NMOが単一疾患でないのは明らかである。単相性のNMO、自己免疫疾患にともなうNMO-IgGが陽性のNMO、parenchymal NMO、再発性で

NMO-IgGが陰性のNMOとheterogeneousな症候群と考えるのが妥当であり、その一部ないしかなりの部分はMSそのものか、MSとオーバーラップするものといえる。視神経脊髄型多発性硬化症(opticospinal MS, OSMS)という用語は、脱髄性疾患であるMSの一亜型であることを意味するが(ユニークな病態の修飾は働いているものの)、NMOという用語は、それがMSとはまったく異なる機序の疾患であることを意味している。したがって、MSとNMOの病巣形成のトリガーの解明なくしては、両疾患が真に独立した疾患であると証明されたとはいえないであろう。

4. Baló 病の病態をめぐって

Baló 病は、フィリッピン、中国南部、台湾などで比較的多くみられる。急性発症し、階段状に増悪し akinetic mutism に陥る重篤な疾患とされてきた。しかし、MRIで臨床診断され、早期から積極的にステロイドパルス療法など免疫療法がなされるようになり、寛解・再発しMSと変わらない臨床像に移行する例も知られるようになった。また、典型的なMSで発症し、後にMRI上で同心円状病巣を呈する例も報告されている。他方、NMO-IgGが陽性のNMOで脳幹にBaló病巣が出現したり¹²⁾、NMOで発症して治療中に脳に典型的なBaló病巣を呈したりする例¹³⁾も最近報告されている。このようにBaló病巣は、MSでもNMOでもみられ、これらの3者間には移行がある。

Baló 病の病態仮説としては、様々なものが唱えられてきた。最近のものとしては、tissue preconditioning と successive ring formation がある¹⁴⁾¹⁵⁾。これは病巣の辺縁では heat shock protein 70 や heat-inducible factor 1 α などのストレス蛋白の発現がみられることから、病巣の辺縁は次の炎症の波及に対して抵抗性となる。一方、MRIではBaló病巣の辺縁に造影リングがみられ、これがさらに次の時には前回みられた造影リングの内側面で脱髄層(T₁でlow)がみとめられ、前回みられた造影リングのさらに外側に新たな造影リングが出現する例のあることから、段階的に炎症が波及し、炎症による組織破壊層の外側が抵抗性になり、その層では次の炎症の波及に対して組織が保たれることで同心円状病巣が形成されるというものである。

しかし、Baló 病巣は初回発作時の最初のMRIですでに同心円状の病巣がみられることが多く、造影リングが幾重にも初期からみられる例も少なくない¹⁶⁾、tissue preconditioning と successive ring formation 仮説がすべての例にあてはまるわけではなく、その一部しか説明できないことは明瞭である。私たちは、NMO例でもBaló病巣が出現するという最近の報告に基づいて、Baló病でのAQP4やその他のアストロサイトマーカーの発現を免疫組織化学的に検討した。その結果、Baló病では脱髄層も非脱髄層もふくめて広汎にAQP4の発現が低下していることを突き止めた¹⁷⁾。Baló病巣ではアストロサイトにおけるGFAPの発現は保たれ、血管周囲性の免疫グロブリンや活性化補体の沈着もみとめない点は、NMO

病巣とは大きく異なっている。私たちはBaló病患者6例で血清抗AQP4抗体をしらべ全例陰性であったことから、NMOが抗AQP4抗体依存性のアストロサイトパチーとすると、Baló病はNMOとは異なり抗AQP4抗体非依存性のアストロサイトパチーであることを提唱している(Fig.1)。

5. 同心円状脱髄層の形成機序をめぐって

Tissue preconditioning と successive ring formationによる段階的なリングの形成に加えて、広汎なAQP4の脱落が脱髄層と非脱髄層が交互に配列する特徴的な病巣の形成に寄与していると私たちは考えている。先に述べたようにAQP4脱落部位では、血管原性浮腫は重症化し、細胞性浮腫は軽減する。Baló病巣の最近の拡散強調画像MRIの報告によれば、Baló病巣では最初期には拡散が低下する細胞性浮腫を呈する、さらに病巣の外層で拡散が低下する細胞性浮腫の部位が出現するという¹⁸⁾¹⁹⁾。Baló病の造影リングは層状あるいは帯状に出現することが多く、これらの造影部位では血管原性浮腫を生じていると考えられる。つまり、Baló病では細胞性浮腫の部位と血管原性浮腫の部位が複雑に入り組んで配置していると推定される。一方、AQP4の脱落は広汎におこっているの、先に述べたEAEでの成績⁷⁾に基づくと、AQP4が脱落し血管原性浮腫の部位は組織破壊が高度になり、一方、AQP4が脱落し細胞性浮腫の部位では組織破壊が軽減すると考えられる。私たちは、これが脱髄層と非脱髄層が交互に配列する病巣が一回の発作で形成される機序であるという説を提唱している。

6. 自己抗体非依存性アストロサイトパチーをめぐって

先に述べたようにアストロサイトのマーカーであるGFAPは病巣では保たれていることから、Baló病巣ではアストロサイト自体は存在し破壊されてはいない。そこで、Baló病の同心円状病巣はAQP4以外に他のアストロサイトマーカーの発現はどのように変化しているかを、私たちは検討した。アストロサイト側に発現し、アストロサイト間、アストロサイトーオリゴデンドロサイト間の結合と相互作用にかかわる connexin 43 は、AQP4 同様に広汎に脱落していた。オリゴデンドロサイトに発現し、アストロサイトーオリゴデンドロサイト間の結合と相互作用にかかわる connexin32 が発現も明らかに低下していた。一方、髄鞘蛋白である oligodendrocyte-specific protein は保たれていた。すなわち、Baló病巣のアストロサイトパチーはAQP4に限らず、connexin43 などより拡がりをもって細胞間接着に関与する分子の脱落がおこっていることがわかる。これらのことから、Baló病巣では、アストロサイトパチーがまず生じ、その下流にオリゴデンドロサイトパチーがおこり、それが脱髄にいたるというカスケードを考えた。Baló病は、細胞間接着にかかわる分子のアストロサイトパチーと私たちは考える。

さらに、日本人MS患者脊髄の同心円状脱髄層やNMO例

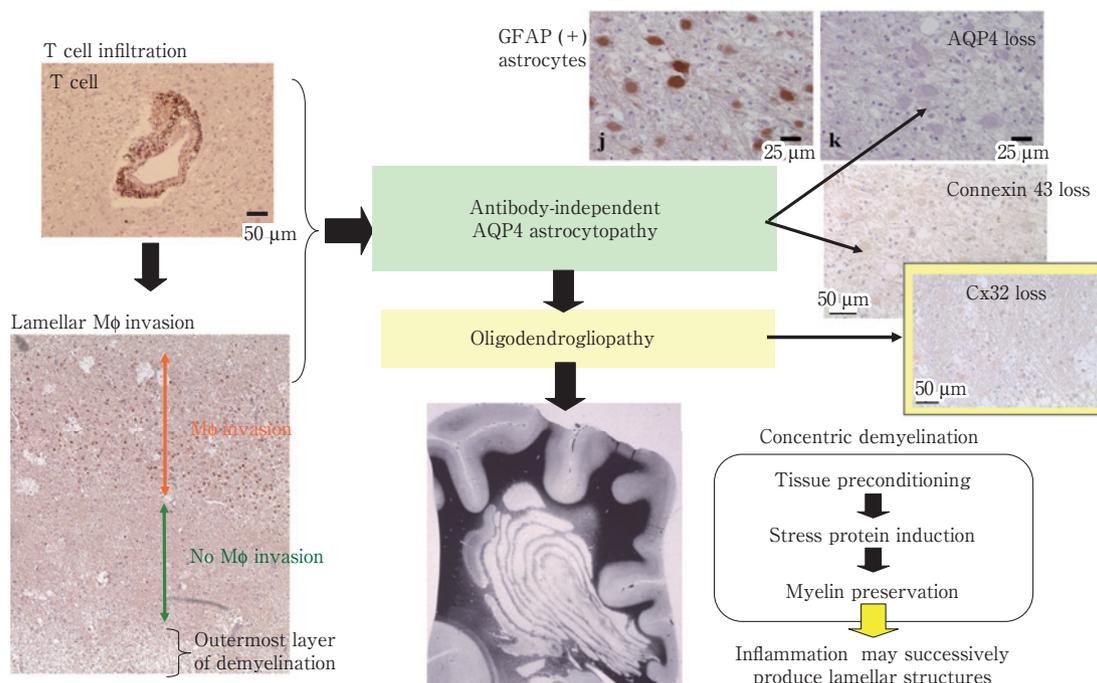


Fig. 1 Hypothetical mechanism of Baló's disease.

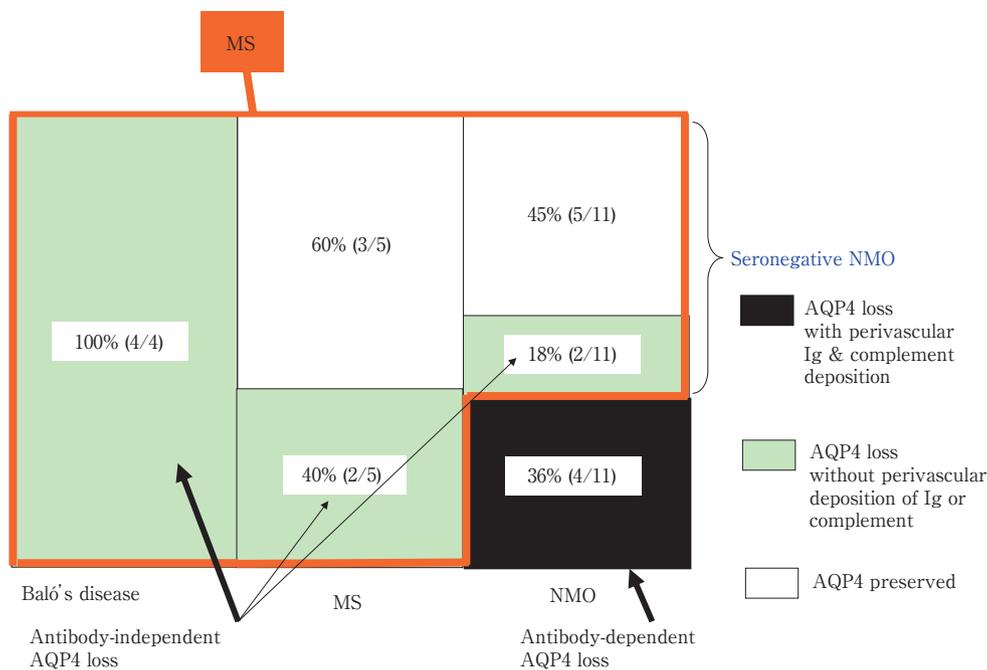


Fig. 2 AQP4 loss in Baló's disease, MS and NMO.

の脱髄巣の一部でも、やはり抗体や補体の沈着なくアストロサイトの AQP4 が広汎に脱落していることを発見した (Fig. 2)¹⁶⁾。すなわち、自己抗体非依存性アストロサイトパッチーは中枢神経脱髄性疾患で広くみとめられ、脱髄機転に大きく寄与している可能性がある。

おわりに

抗 AQP4 抗体の発見により、脱髄性疾患におけるアストロサイト障害の重要性が認識されるようになった。抗 AQP4 抗体によるアストロサイト死が脚光を集めているが、自己抗

体によらないアストロサイトパチーは広く脱髄性疾患でみられ、それがもっとも端的に表れているのが、Baló病と考えられる。同様な機序は、MSやNMOでも存在すると思われる。その意味で、Baló病、MS、NMOは、一連の脱髄疾患スペクトラムを構成すると考える。抗AQP4抗体依存性のアストロサイトパチーは、抗AQP4抗体陽性NMOでしか作用しえないが、自己抗体非依存性アストロサイトパチーはより拡がりをもって作用している可能性が高い。その上流に位置していると想定されるT細胞性免疫やマクロファージのinnate immunityの研究や、その下流に位置すると考えられるconnexinやAQP4などによる細胞間相互作用の障害の研究が、今後の研究の焦点となろう (Fig. 1)。

文 献

- 1) Okinaka S, Tsubaki T, Kuroiwa Y, et al. Multiple sclerosis and allied diseases in Japan: clinical characteristics. *Neurology* 1958;8:756-763.
- 2) Minohara M, Ochi H, Matsushita S, et al. Differences between T-cell reactivities to major myelin protein-derived peptides in opticospinal and conventional forms of multiple sclerosis and healthy controls. *Tissue Antigens* 2001; 57:447-456.
- 3) Tanaka M, Matsushita T, Tateishi T, et al. Distinct CSF cytokine/chemokine profiles in atopic myelitis and other causes of myelitis. *Neurology* 2008;71:974-981.
- 4) Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I, et al. Anti-aquaporin-4 antibody is involved in the pathogenesis of NMO: a study on antibody titre. *Brain* 2007;130:1235-1243.
- 5) Matsushita T, Isobe N, Matsuoka T, et al. Aquaporin-4 autoimmune syndrome and anti-aquaporin-4 antibody-negative opticospinal multiple sclerosis in Japanese. *Mult Scler* 2009;15:834-847.
- 6) Mader S, Lutterotti A, Di Pauli F, et al. Patterns of antibody binding to aquaporin-4 isoforms in neuromyelitis optica. *PLoS One* 2010;5:e10455.
- 7) Li L, Zhang H, Verkman AS. Greatly attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in aquaporin-4 knockout mice. *BMC Neurosci* 2009;10:94.
- 8) Kira J. Neuromyelitis optica and opticospinal multiple sclerosis: mechanisms and pathogenesis. *Pathophysiology* 2011;18:69-79.
- 9) Fazio R, Malosio ML, Lampasona V, et al. Anti-aquaporin 4 antibodies detection by different techniques in neuromyelitis optica patients. *Mult Scler* 2009;15:1153-1163.
- 10) Collongues N, Marignier R, Zephir H, et al. Neuromyelitis optica in France: a multicenter study of 125 patients. *Neurology* 2010;74:736-742.
- 11) Matsuoka T, Suzuki So, Suenaga T, et al. Reappraisal of aquaporin-4 astrocytopathy in Asian neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Brain Pathol* (in press).
- 12) Graber JJ, Kister I, Geyer H, et al. Neuromyelitis optica and concentric rings of Balo in the brainstem. *Arch Neurol* 2009;66:274-275.
- 13) Kreft KL, Mellema SJ, Hintzen RQ. Spinal cord involvement in Balo's concentric sclerosis. *J Neurol Sci* 2009;279: 114-117.
- 14) Stadelmann C, Ludwin S, Tabira T, et al. Tissue preconditioning may explain concentric lesions in Balo's type of multiple sclerosis. *Brain* 2005;128:979-987.
- 15) Chen CJ, Chu NS, Lu CS, et al. Serial magnetic resonance imaging in patients with Balo's concentric sclerosis: natural history of lesion development. *Ann Neurol* 1999;46: 651-656.
- 16) Chaodong W, Zhang KN, Wu XM, et al. Balo's disease showing benign clinical course and co-existence with multiple sclerosis-like lesions in Chinese. *Mult Scler* 2008; 14:418-424.
- 17) Matsuoka T, Suzuki SO, Iwaki T, et al. Aquaporin-4 astrocytopathy in Balo's disease. *Acta Neuropathol* 2010;120: 651-660.
- 18) Kavanagh EC, Heran MK, Fenton DM, et al. Diffusion-weighted imaging findings in Balo concentric sclerosis. *Br J Radiol* 2006;79:e28-31.
- 19) Wiendl H, Weissert R, Herrlinger U, et al. Diffusion abnormality in Balo's concentric sclerosis: clues for the pathogenesis. *Eur Neurol* 2005;53:42-44.

Abstract

Recent progress in multiple sclerosis research: astrocytopathy in demyelinating diseases

Jun-ichi Kira, M.D., Ph.D.

Department of Neurology, Neurological Institute, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating disease of the central nervous system (CNS) while neuromyelitis optica (NMO) is an inflammatory disease of the CNS that selectively affects the optic nerves and spinal cord. Recently, a specific IgG against NMO, designated NMO-IgG, was discovered, and the relevant antigen was found to be aquaporin 4 (AQP4), one of the major water channel proteins in the CNS. The sensitivity of NMO-IgG/anti-AQP4 antibodies for NMO varies from 30% to 80%, while specificity is 90-100%. Pathological studies on NMO patients have revealed perivascular immune complex (IgM, IgG and C9neo) deposition and extensive loss of AQP4 in active lesions, while myelin basic protein (MBP) staining was relatively preserved. IgG from NMO-IgG-seropositive NMO patients induces astrocyte death in culture in the presence of complement, and reproduces astrocyte loss *in vivo* when MBP-specific T cells are co-transferred to cause experimental autoimmune encephalomyelitis. Therefore, it is postulated that the complement-activating anti-AQP4 antibodies have a pivotal role in the development of NMO lesions through astrocyte necrosis, and that demyelination is a secondary event.

Baló's disease is characterized by alternating rings of demyelination and preserved myelin. As additional MS-like lesions often coexist in Baló's cases, Baló's disease is regarded as a variant of MS. However, Baló's concentric rings are also observed in NMO cases and in Asian opticospinal MS patients in the cerebral white matter, spinal cord and optic chiasm. In demyelinated areas, many hypertrophic astrocytes are present, in close contact with oligodendrocytes that often show apoptotic features. In the outermost layer of preserved myelin, stress proteins involved in tissue preconditioning are abundant in oligodendrocytes. The peri-plaque white matter is thus assumed resistant to subsequent attack, thereby leaving a layer of preserved myelin. In some patients, Baló's concentric rings develop systematically in a centrifugal direction, while other patients show simultaneous enhancement of multiple rings. Therefore, tissue preconditioning and successive ring formation does not fully explain the mechanism of the disease. We recently reported that AQP4 was extensively lost in glial fibrillary acidic protein-positive hypertrophic astrocytes, both in demyelinated and myelinated layers of all actively demyelinating lesions in four Filipino Baló's patients. None of six other patients with magnetic resonance imaging-confirmed Baló's disease was seropositive for anti-AQP4 antibodies. I therefore propose that AQP4 astrocytopathy, in the absence of anti-AQP4 antibodies, is characteristic of Baló's disease. Since a similar loss of AQP4 without perivascular deposition of immunoglobulin and complement is also observed in autopsied CNS tissues from NMO and MS cases, I consider that autoantibody-independent astrocytopathy may widely occur in human CNS demyelinating diseases, including Baló's disease, MS and NMO.

(Clin Neurol 2010;50:788-793)

Key words: multiple sclerosis, neuromyelitis optica, Baló's disease, astrocytopathy, aquaporin 4
