

# 松屋 合歓 論文内容の要旨

## 主 論 文

Increased T-cell immunity against aquaporin-4 and proteolipid protein  
in neuromyelitis optica

視神経脊髄炎における AQP-4 および PLP に対する T 細胞性免疫応答の亢進

松屋合歓、小森美華、野村恭一、中根俊成、福留隆泰、後藤公文、  
白石裕一、Klaus-Peter Wandinger、松尾秀徳、近藤誉之

(International Immunology・23 巻 9 号 565—573 2011 年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員：中根俊成教授)

### 【緒 言】

視神経脊髄炎 (Neuromyelitis optica, NMO) は、多発性硬化症 (Multiple sclerosis, MS) 類縁疾患と考えられて来た。しかし、2004 年の NMO-IgG の発見以降、両者の病態が異なる事が明らかになってきた。MS では、ミエリン抗原特異的細胞性免疫応答が病態の主体であるのに対し、NMO の病態においては、アクアポリン-4 (aquaporin-4, AQP4) に対する B 細胞免疫応答が主体であるとの仮説が受け入れられている。一方、NMO における T 細胞の役割については未だ詳細な検討がされていない。本研究では、第一に NMO の再発時に PBMC のうち CD69 陽性の活性化 T 細胞が増加していることを示し、第二に NMO 患者、MS 患者、健常人における AQP4 およびミエリン抗原に対する T 細胞性免疫応答を比較した。

### 【対象と方法】

(1) NMO 3 名において、経時採血し、末梢血単核球を分離し、抗 CD3-FITC、抗 CD69-PE、抗 CD4-PEcy5 で染色した。Flow cytometry を用いて CD4 T 細胞表面と CD4 陰性 T 細胞の CD69 発現頻度が寛解期と再発期でどのように変化するかを解析した。

(2) 寛解期 NMO 患者 12 名と、寛解期 MS 患者 12 名、健常人 10 名を対象とした。末梢血より分離した PBMC を AIM-V に浮遊させ 96 穴平底プレートに  $5 \times 10^5$ /well に播種し 2 日間未刺激で培養後、刺激ペプチドとして AQP4 由来のオーバーラッピングペプチド 32 種のうち可溶化できた 28 ペプチドとその混合物 (AQP4-M)、ミエリン抗原由来のペプチド 6 種: MOG (13-28)、MOG (145-160)、PLP (95-116)、PLP (139-154)、PLP (185-209)、MBP (83-99) のいずれかを加え 4 時間培養した。これを抗 CD3-FITC、抗 CD69-PE、抗 CD4-PEcy5 で染色し、Flow cytometry を用いて CD4 T 細胞表面の CD69 発現頻度を解析した。未刺激状態と刺激後の CD69 発現頻度を paired t-test および Stimulation Index (SI) が 3 倍以上となった検体数 (fSI3)、平均 SI (mSI) を用いて比較し、ペプチド刺激による CD69 発現頻度の上昇の有無を判定した。

また HLA-DRB1、HLA-DPB1 について HLA タイピングを行い、CD69 発現頻度との関連

を検討した。

### 【結 果】

(1) 再発時と寛解期に PBMC を採取できた 3 名の NMO 患者ではいずれも寛解期に比して再発時に CD4 T 細胞表面の CD69 発現頻度が上昇し、最大 42.6%に達していた。

(2) 先行実験において、分離した直後の PBMC に抗原ペプチドで刺激すると、CD69 陽性細胞が減少することが判明していた。T 細胞を非活性化するために、PBMC を 2 日間未刺激で培養した。2 日間の培養で CD69 はほとんど発現しなくなることが確認できた。

NMO 群では AQP4-M で刺激した場合の fSI3=10/12、mSI=5.50、AQP4(11-30)では fSI3=11/12、mSI=16.0、AQP4(91-110)で fSI3=11/12、mSI=13.0 であり、統計的にも有意な上昇を認めた。MS 群、健常人群でもこれらのペプチド刺激による CD69 発現頻度の有意な上昇がみられたが、NMO 群と比較すると MS 群では AQP4(11-30)で fSI3=3/11、mSI=2.50、AQP4(91-110)で fSI3=2/9、mSI=2.20、健常人群では AQP4(11-30)で fSI3=8/12、mSI=5.30、AQP4(91-110)で fSI3=5/9、mSI=6.30 と軽度の上昇であった。NMO 群では他に AQP4(21-40)、AQP4(61-80)、AQP4(101-120)、AQP4(171-190)、AQP4(211-230)を刺激した場合、CD4 T 細胞における CD69 発現頻度の有意な上昇がみられたが、fSI3 は AQP4(21-40)6/12、AQP4(61-80)1/12、AQP4(101-120)8/12、AQP4(171-190)7/12、AQP4(211-230)3/11 であった。MS 群と健常人においては、有意な反応を示さなかった。ミエリンペプチドの解析では、NMO 群で PLP(95-116)により有意な T 細胞性免疫応答が誘導された (fSI3=7/12、mSI=4.60)。

HLA-DR15 キャリアーと非キャリアーあるいは、HLA-DP5 キャリアーと非キャリアーを比較したが、AQP4 の T 細胞エピトープに有意な相関はみられなかった。

### 【考 察】

NMO の再発の早期に CD4 T 細胞の活性化が起こっていると推測され、AQP4 に対する液性免疫のみならず、T 細胞性免疫も NMO の病態に関与している可能性が示唆された。NMO において AQP4(11-30)、AQP4(91-110)によって強い T 細胞性免疫応答が誘導され、これらのペプチドが AQP4 の T 細胞主要エピトープと考えられた。他に AQP4(21-40)、AQP4(61-80)、AQP4(101-120)、AQP4(171-190)、AQP4(211-230)によっても有意な T 細胞性免疫応答が惹起されていた。mSI>3 を満たす 6 つのエピトープはいずれも細胞内領域にあり、最近報告された NMO における B 細胞エピトープと共通していた。AQP4 に対する T 細胞性免疫応答が、抗体産生のヘルパーとして、あるいは細胞性免疫応答を通じて、B 細胞性免疫応答と協調して疾患を惹起している可能性を示唆する。

NMO は従来 MS 類縁疾患とされており、ミエリンペプチドに対する免疫応答が病態に関与するかを検討した。PLP に対する T 細胞性免疫応答の亢進が NMO において示された。ミエリンに対する免疫応答が、何らかの形で NMO の病態に関与していると考えられる。AQP4 は腎臓など中枢神経外にも存在するが、中枢神経外に病変を形成することはない。ミエリン抗原に対する免疫応答が、中枢神経内に限られた病変形成に関与しているのかもしれない。