



Circulating plasmablasts and follicular helper T-cell subsets are associated with antibody-positive autoimmune epilepsy

原, 敦

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2023-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8601号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482349>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Circulating plasmablasts and follicular helper T-cell subsets are
associated with antibody-positive autoimmune epilepsy

循環形質芽細胞と濾胞性 T 細胞亜分画は抗体陽性自己免疫性てんかんと関連する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

脳 神 経 内 科 学

(指導教員：松本 理器教授)

原 敦

<序論>

てんかんは脳の慢性疾患で、世界人口の0.5~1.0%が罹患する。てんかんの病因は多岐にわたり、今なお原因不明である場合もある。原因不明のてんかんの一部には抗てんかん薬に治療抵抗性で免疫療法により発作が抑制される病型がみられ、自己免疫性てんかんと呼ばれるようになった。自己免疫性てんかんは抗 N-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体抗体脳炎といった自己免疫性脳炎の亜型としての側面もあり、診断には Cell-based assay 法を用いた抗神経抗体の測定が有効である。しかし抗体の解析には時間と費用がかかり特に本邦では診断と治療が遅れる傾向にある。抗神経抗体の測定に依存しない包括的な自己免疫性脳炎の診断基準案を 2016 年に Graus らが提唱し、自己免疫性てんかんに対しても広く用いられているが、非炎症性の難治てんかんも診断基準に含まれてしまうことが問題である。これまで、自己免疫性てんかんにおける抗神経抗体の予測因子や、抗体陽性自己免疫性てんかんにおける免疫学的背景についてはあまり知られていなかった。

抗神経抗体を含む自己抗体は、濾胞性 T 細胞の Inducible T-cell co-stimulator(ICOS)などを介したサポートを受け B 細胞が分化した形質芽細胞(plasmablasts: PBs)や long-lived plasma cell によって産生される。リンパ組織の濾胞性 T 細胞と末梢血単核細胞(peripheral blood mononuclear cells: PBMCs)中の循環濾胞性 T 細胞(circulating follicular helper T cells: cTfh)の間にはかなりのクローン重複がある。cTfh の亜分画のうち、CXCR3-CCR6+で定義される cTfh17, CXCR3-CCR6-で定義される cTfh2 は B 細胞へ IgG 産生を促すことが知られている。近年、いくつかの自己抗体の関連する自己免疫性疾患で疾患活動期に PBMCs における PBs の上昇や cTfh の cTfh17 ないし cTfh2 への亜分画偏倚が報告されている。そこで我々は Graus らの診断基準案を満たした自己免疫性てんかんの疑いのある患者 23 人を対象に、包括的な抗体解析および血液と髄液における B 細胞と cTfh のリンパ球表現型解析を行った。抗体陽性群と陰性群間で臨床情報を比較し、疾患活動期における抗体陽性自己免疫性てんかんの診断バイオマーカーについて考察した。

<方法>

当院および神戸市立医療センター中央市民病院、兵庫県立尼崎総合医療センターを受診し、以下の条件を満たす患者検体を解析した。1)1 度でもけいれん発作を起こし、自己免疫性てんかんを鑑別するための臨床検査(髄液検査, 頭部 MRI 画像検査など)が行われている, 2)Graus らの possible autoimmune encephalitis の診断基準案を満たす, 3)髄液ないし血清で既知の抗神経抗体の測定を受けている, 4)ステロイド内服治療または免疫抑制療法を受けていない。以上を満たす、自己免疫性てんかんが疑われた 23 名を対象とした。NMDA 受容体, leucine-rich glioma-inactivated protein 1(LGI1), myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) を標的とする抗神経抗体を測定し、抗体陽性自己免疫性てんかん群(antibody-positive autoimmune epilepsy: AE/Ab(+))と抗体が陰性で自己免疫性てんかんが疑われた群(antibody-negative suspected autoimmune epilepsy: AE/Ab(-))に分類した。AE/Ab(-)はラット脳を用いた免疫組織化学染色で抗神経抗体が陰性であったものと定義した。MRI, 脳波, 髄液検査といった一般臨床検査に加え、フローサイトメトリーを

用いて末梢血及び髄液の B 細胞と cTfh のリンパ球表現型解析を行った。また、Immunoassay 法を用いて血清と髄液における炎症性サイトカインも測定し、各群間で比較した。末梢血のリンパ球表現型解析においては健常人(HC)11 例も加え各群で比較した。

データ解析は適宜 unpaired t-test, Mann-Whitney U test, Spearman 順位相関係数を用いて算出した。

<結果>

AE/Ab(+)は 13 例(57%), AE/Ab(-)は 10 例(43%)であった。AE/Ab(+)の内訳は NMDA 受容体抗体 5 例(38%), LGI 抗体 4 例(31%), MOG 抗体 4 例(31%)であった。MOG 抗体関連疾患の患者は全て皮質脳炎を来していた。AE/Ab(+)と AE/Ab(-)において年齢・性別・一般髄液検査・脳波・MRI・腫瘍の合併率に差はなかった。

そこで、抗体産生に関わる B 細胞の表現型についてフローサイトメトリーを用いて解析した。AE/Ab(+)の PBMCs では AE/Ab(-)と HC と比較し PBs が上昇していた($p=0.010$, $p=0.029$)。AE/Ab(+)の中でも NMDA 受容体抗体と LGI1 抗体陽性群を合わせた細胞表面抗原に対する抗体陽性群において特に PBs が上昇していた($p=0.023$, $p=0.0181$)。さらに、AE/Ab(+)では AE/Ab(-)と比べて髄液中の B 細胞と PBs が上昇していた($p=0.029$, $p=0.001$)。他の B 細胞亜分画である naïve B 細胞, unswitched memory B 細胞(USM), switched memory B 細胞 double negative B 細胞の割合は各群間で差がなかった。

次に、B 細胞分化の背景にある濾胞性 T 細胞の表現型について、PBMCs における cTfh 亜分画とその ICOS 発現率を解析した。cTfh は各群間で差がなかった。一方、cTfh の ICOS 発現率が AE/Ab(+)において AE/Ab(-)と HC と比較し高かった($p=0.022$, $p=0.001$)。cTfh の亜分画解析では、AE/Ab(+)において cTfh17 への移行率が AE/Ab(-)と HC と比較し高く($p=0.008$, $p=0.006$)、ICOS 発現 cTfh における cTfh17 への移行率は AE/Ab(+)において他 2 群と比較し高かった($p=0.0006$, $p=0.014$)。

さらに、AE/Ab(+)のリンパ球表現型解析と臨床情報を比較した。すると AE/Ab(+)の PBMCs 中の PBs と入院時の modified Rankin Scale の間に正の相関が見られた($r=0.67$)。また、AE/Ab(+)における NMDA 受容体抗体と LGI1 抗体陽性を合わせた群で、B 細胞のうち USM と cTfh のうち ICOS 発現 cTfh17 が正の相関が見られた($r=0.93$)。

最後に、AE/Ab(+)と AE/Ab(-)の血清・髄液における炎症性サイトカインの測定を行った。AE/Ab(+)は血清の IL-6・IL-23・IL-17A・IL-12p70・IFN γ が上昇し、髄液中では IL-6・IL-17A が上昇した。

<考察>

抗神経抗体の測定が常に可能とは限らないため、抗体解析に依存せず自己免疫性てんかんを診断する努力がなされている。治療可能な疾患の見逃しを避けるにはより包括的な解析が必要である。本研究において AE/Ab(+)は自己抗体を有する真の自己免疫病態を背景とするが、AE/Ab(-)の中には包括的な診断基準により抽出された非免疫性の難治てんかんが含まれることに注意が必要である。今回の研究では、既報と同じく AE/Ab(+)と AE/Ab(-)を一般臨床検査で鑑別することは困

難であり、臨床現場における自己免疫性てんかん患者の診断の困難さが浮き彫りとなった。しかしながら、より詳細な検討によって AE/Ab(+)では抗体産生に促すような免疫細胞とサイトカインの変化が見られ、自己免疫性てんかんの免疫背景を反映した診断バイオマーカー候補を明らかにした。

AE/Ab(+)は AE/Ab(-), HC と比較し PBMCs と髄液中の PBs が上昇しており、AE/Ab(+)における PBMCs の PBs は入院時の重症度と相関していた。PBs の上昇は同じ自己抗体をもつ自己免疫性疾患である IgG4 関連疾患や全身性エリテマトーデス、中枢神経の自己抗体が関連する中枢性自己免疫性疾患の視神経脊髄炎スペクトラム障害 (NMOSD) の疾患活動期にみられる。特に NMOSD においては PBMCs, 髄液中ともに PBs が上昇し、病原性抗体を産生する。自己免疫性脳炎では抗 NMDA 受容体抗体脳炎では少数例ながら PBMCs における PBs の上昇が報告されている。今回の結果から、AE/Ab(+)の PBMCs における PBs の上昇が自己抗体介在疾患であることを推定し、さらに疾患の病勢に関連する可能性が示唆された。

次に、AE/Ab(+)の cTfh が ICOS を強く発現し、cTfh17 に偏倚していることを示した。cTfh における ICOS の発現上昇や cTfh17 への偏倚は重症筋無力症などの自己抗体が関連する自己免疫性疾患で報告されており、ほかの自己抗体介在疾患と同様の免疫背景を共有している可能性が示唆された。

また、NMDA 受容体抗体と LGI1 抗体が陽性の症例群における B 細胞亜分画のうち USM と cTfh 中の ICOS 発現 cTfh17 とが相関していることを示した。USM は胚中心に存在する B 細胞亜分画で、Tfh を介した PBs へ早期に分化する機能を持つ可能性を持つ。末梢血における USM の上昇が、SARS-CoV2 に対する IgG1/IgM 反応と関連し、COVID-19 の回復が早まることが報告され、さらに免疫チェックポイント阻害剤による治療によく反応する癌患者では cTfh と USM が上昇することが報告されている。感染症やがんにおけるこのような免疫反応は、NMDA 受容体抗体と LGI1 抗体が陽性の症例群の自己免疫反応における USM と cTfh の関連性を示唆する可能性がある。

AE/Ab(+)では血清中 IL-12p70, IL-23, IL-6, IL-17A, IFN- γ と髄液中 IL-6, IL-17A 濃度が上昇していることを見出した。IL-17 は抗 NMDA 受容体抗体脳炎の髄液中で上昇することが知られており、Th17 のみでなく Tfh17 によっても産生される炎症性サイトカインである。tight junction 分子をダウンレギュレートし血液脳関門を白血球が通過するのを促進する。また、IL-6 は B 細胞の分化を誘導し、形質細胞の生存を促し抗体分泌を促進する。また、血清で上昇した IL-12 と IL-23 はそれぞれ STAT4 と STAT3 を活性化し Tfh 系への T 細胞分化を促進する機能を持ち、cTfh の亜分画変化を誘導した可能性がある。我々の AE/Ab(+)においてはサイトカインレベルが不均一であり、これは自己免疫性てんかんの疾患活動期における複雑な免疫反応を反映している可能性がある。

Dalmau らは自己免疫性脳炎の病態として、naïve B 細胞が中枢神経系以外の局所リンパ節で神経系抗原を経験し、Tfh などの経路で memory B 細胞に分化し、中枢神経系に移動して、最終的に抗体産生細胞に分化する、との仮説を提唱している。我々の結果はこの仮説を支持し、髄液での

PBs の上昇を捉えた．さらに AE/Ab(+)では末梢リンパ組織における cTfh17 偏倚と PBs 分化経路が促進している可能性を示し，末梢組織における病態に関連した B 細胞分化機構を明らかにした．

<結語>

本研究で，我々は自己抗体をもつ自己免疫性てんかんの末梢血における B 細胞および cTfh の亜分画が抗体産生を促す変化を来していることを示した．特に PBMCs における PBs の上昇と ICOS 発現 cTfh17 への偏倚は抗体陽性自己免疫性てんかんの新たな診断・治療指標となる可能性がある．

神戸大学大学院医学(系)研究科(博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3266 号	氏 名	原 敦
論 文 題 目 Title of Dissertation	Circulating plasmablasts and follicular helper T-cell subsets are associated with antibody-positive autoimmune epilepsy 循環形質芽細胞と濾胞性 T 細胞亜分画は抗体陽性 自己免疫性てんかんと関連する		
審 査 委 員 Examiner	主 査 篠 山 隆 司 Chief Examiner 副 査 南 康 博 Vice-examiner 副 査 永 瀬 裕 朗 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

<序論>

自己免疫性てんかんは抗てんかん薬に治療抵抗性で免疫療法により発作が抑制される中枢神経系の炎症性疾患である。診断には Cell-based assay 法を用いた抗神経抗体の測定が有効であるが、抗体の解析には時間と費用がかかり特に本邦では診断と治療が遅れる傾向にある。抗神経抗体の測定に依存しない包括的な診断基準案を 2016 年に Graus らが提唱し汎用されているが、非炎症性の難治てんかんも診断基準に含まれてしまい不十分である。これまで、抗体陽性自己免疫性てんかんにおける免疫学的背景についてはあまり知られていなかった。

抗神経抗体を含む自己抗体は、濾胞性 T 細胞の Inducible T-cell co-stimulator (ICOS)などを介して B 細胞が分化した形質芽細胞(plasmablasts: PBs)などによって産生される。リンパ組織の濾胞性 T 細胞は末梢血における循環濾胞性 T 細胞(circulating follicular helper T cells: cTfh)の間にはかなりのクローン重複がある。cTfh の亜分画のうち、CXCR3-CCR6+で定義される cTfh17 は B 細胞へ IgG 産生を促すことが知られている。

我々は Graus らの診断基準案を満たした自己免疫性てんかんの疑いのある患者 23 人を対象に、包括的な抗体解析および血液と髄液における B 細胞と cTfh のリンパ球表現型解析を行った。抗体陽性群と陰性群間で臨床情報を比較し、疾患活動期における抗体陽性自己免疫性てんかんの診断バイオマーカーについて考察した。

<方法>

当院および関連施設を受診し、以下の条件を満たす患者検体を解析した。1)1 度でもけいれんを起こし、自己免疫性てんかんを鑑別する十分な臨床検査(髄液検査、頭部 MRI 画像検査など)がなされている、2)Graus らの possible autoimmune encephalitis の診断基準案を満たす、3)髄液ないし血清で既知の抗神経抗体の測定を受けている、4)ステロイド内服治療または免疫抑制療法を受けていない。以上を満たす、自己免疫性てんかんが疑われた 23 名を対象とした。N-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体、leucine-rich glioma-inactivated protein 1(LGI1)、myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)を標的とする抗神経抗体を測定し、抗体陽性自己免疫性てんかん(antibody-positive autoimmune epilepsy: AE/Ab(+))群と抗体が陰性で自己免疫性てんかんが疑われた(antibody-negative suspected autoimmune epilepsy: AE/Ab(-))群に分類した。一般臨床検査に加え、末梢血及び髄液の B 細胞と cTfh のリンパ球表現型解析と、Immunoassay 法を用いて炎症性サイトカインを測定し、各群間で比較した。末梢血においては健常人(HC)11 例も加え各群で比較した。

<結果>

AE/Ab(+)は 13 例(57%)、AE/Ab(-)は 10 例(43%)であった。AE/Ab(+)の内訳は NMDA 受容体抗体 5 例(38%)、LGI1 抗体 4 例(31%)、MOG 抗体 4 例(31%)であった。MOG 抗体関連疾患の患者は全て皮質脳炎を来していた。AE/Ab(+)と AE/Ab(-)における脳波・MRI・一般髄液検査に差はなかった。

B細胞の亜分画解析では、末梢血と髄液におけるPBsの割合がAE/Ab(+)でAE/Ab(-)、HCと比較し上昇していた($p < 0.05$)。他のB細胞亜分画であるnaïve B細胞、unswitched memory B細胞(USM)、switched memory B細胞、double negative B細胞の割合は各群間で差がなかった。

cTfhの解析では、cTfhのICOS発現率、cTfh17への移行率、ICOS発現cTfh17への移行率がAE/Ab(+)において他2群と比較し高かった($p < 0.05$)

AE/Ab(+)のリンパ球表現型解析と重症度の比較では、AE/Ab(+)の末梢血中のPBsと入院時のmodified Rankin Scaleの間に正の相関を示した($r=0.67$)。また、NMDA受容体抗体とLGI1抗体陽性群を合わせた群でUSMとICOS発現cTfh17が正の相関を示した($r=0.93$)。

血清と髄液における炎症性サイトカインの比較では、AE/Ab(+)は血清のIL-6・IL-23・IL-17A・IL-12p70・IFN γ が上昇し、髄液中ではIL-6・IL-17Aが上昇した($p < 0.05$)。

<考察>

抗神経抗体の測定が常に可能とは限らないため、抗体解析に依存せず自己免疫性てんかんを診断する努力がなされている。今回の研究では、既報と同じくAE/Ab(+)とAE/Ab(-)を一般臨床検査で鑑別することは困難であり、臨床現場における自己免疫性てんかん患者の診断の困難さが浮き彫りとなった。しかしながら、より詳細な検討によってAE/Ab(+)では末梢血を中心にPBsの上昇やcTfh17への偏倚といった抗体産生を促すような免疫細胞、サイトカインの変化が見られ、自己免疫性てんかんの免疫背景を反映した診断バイオマーカー候補を明らかにした。さらにcTfhとB細胞亜分画間の関連性と、PBsと重症度の相関を示した。PBsの上昇やcTfh17への偏倚は自己抗体を持つ自己免疫性疾患である視神経脊髄炎スペクトラム障害や重症筋無力症などで報告されており、自己抗体介在疾患としての免疫背景を共有している可能性が示唆された。

Dalmauらは自己免疫性脳炎の病態として、naïve B細胞が中枢神経系以外の局所リンパ節で神経系抗原を経験し、Tfhなどの経路でmemory B細胞に分化し、中枢神経系に移動して、最終的に抗体産生細胞に分化する、との仮説を提唱している。我々の結果はこの仮説を支持し、髄液でのPBsの上昇を捉えた。さらにAE/Ab(+)では末梢リンパ組織におけるcTfh17偏倚とPBs分化経路が促進している可能性を示し、末梢組織における病態に関連したB細胞分化機構の一端を明らかにした。

<結語>

本研究で、我々は抗体陽性自己免疫性てんかんの末梢血におけるB細胞およびcTfhの亜分画が抗体産生を促す変化を来していることを示した。特に末梢血におけるPBsの上昇とICOS発現cTfh17への偏倚は抗体陽性自己免疫性てんかんの新たな診断・治療指標となる可能性があるという点で価値ある業績である。

よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。