

視神経脊髄炎における melanoma cell adhesion molecule の病理学的解析

柳村文寛

新潟大学医歯学総合研究科分子細胞医学専攻 (神経内科学)

(主任：小野寺理教授)

**Pathologic analysis of Melanoma Cell Adhesion Molecule
in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders**

Fumihiro Yanagimura

Department of Neurology, Graduate School of Medicine Niigata University

(Director: Prof. Osamu ONODERA)

要旨

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) と視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica spectrum disorders: NMOSD) は、代表的な中枢神経系自己免疫疾患である。MS はミエリン・オリゴデンドロサイトに発現する何らかの分子が自己抗原と推測されている。NMOSD はアストロサイト足突起にある水チャネル分子アクアポリン 4 (aquaporin-4: AQP4) が自己抗原である。MS の原因は未だ不明のままだが、NMOSD は液性免疫による補体介在性のアストロサイト傷害が中核の病態である。しかし AQP4 抗体が、血液脳関門を超えてアストロサイトの AQP4 分子を認識する機序は不明である。MS では、細胞浸潤機構の重要分子として melanoma cell adhesion molecule (MCAM) の関与が唱えられている。MCAM は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子で、T 細胞と血管内皮細胞の接着、T 細胞の血管外遊走に関与し、MCAM 陽性 T 細胞はインターロイキン (interleukin: IL) - 17 を産生し、IL-17 が脳血管関門の破綻を引き起こすと考えられている。実際 MS の再発時の脳脊髄液中や活動性病変では MCAM 陽性 T 細胞が増加し、MS 動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎では MCAM 陽性 IL-17 産生 T 細胞の中枢神経系への浸潤が示されている。私は、NMOSD においても、MCAM 陽性 IL-17 産生 T 細胞が、IL-17 を介し血液脳関門を傷害し、AQP4 抗体の侵入を惹起し、その結果としてアストロサイトが傷害されるとの仮説をたて、NMOSD 脊髄病変における T 細胞と MCAM 発現を免疫組織化学的に検討した。対象は、NMOSD 剖検例 7 例と、非中枢神経疾患剖検例 5 例の脊髄組織とした。NMOSD の 38 病変にて MCAM 陽性単核球の有無、MCAM 陽性 T 細胞の密度 (単位面積当たりの個数)、T 細胞中の MCAM 陽性細胞の割合、MCAM 陽性血管の有無を解析した。病変部位は、既報に基づき、initial lesions (IL), early active lesions (EA), late active lesions (LA), inactive lesions (IA) に分類した。

MCAM 陽性単核球は、IL/EA の 86%、LA の 75%、IA の 22%に認めた。MCAM 陽性 T 細胞の密度および T 細胞中の MCAM 陽性細胞の割合は、LA と IA に比して IL/EA で有意に高かった。MCAM を発現する血管の割合も、LA と IA に比して IL/EA で有意に高かった。さらに IL/EA において MCAM 陽性 T 細胞が MCAM 陽性血管と近接する像を認めた。これらから、NMOSD の早期脊髄病変では T 細胞と血管にて増加する MCAM が病態の背景にあると考えた。

キーワード：視神経脊髄炎，アクアポリン 4，melanoma cell adhesion molecule，T 細胞，interleukin-17

別刷り請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757

新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野 柳村文寛

緒言

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) と視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica spectrum disorders: NMOSD) は代表的な中枢神経系自己免疫疾患である¹⁾。MS は中枢神経のミエリンとオリゴデンドロサイトが傷害される一次的な脱髄疾患である。病理学的にはマクrofage と T 細胞が浸潤するパターン、免疫グロブリンと補体が沈着するパターンがあり、複数の異なる免疫病態が中枢神経病変を形成すると推測されている²⁾。未だに標的自己抗原分子は明らかにされていない。一方、NMOSD は視神経と脊髄に長大な炎症病変を形成する疾患である。病理学的に 1) 水チャネル分子であるアクアポリン 4 (aquaporin-4: AQP4) の染色性の広汎な消失、2) 血管周囲の活性化補体沈着・ヒアリン化した血管がすべての炎症病変に認められること^{3, 4)}、免疫学的に 1) NMOSD 患者血清に AQP4 を認識する自己抗体の出現⁵⁾、2) 疾患活動性と AQP4 抗体価の相関、3) NMOSD 患者由来の AQP4 抗体を移入した動物モデルで NMOSD 類似の炎症病変が再現できる⁶⁾ことから、NMOSD はアストロサイトに発現した AQP4 を標的自己抗原とする自己免疫疾患であると考えられている。AQP4 抗体と補体によって AQP4 分子を発現したアストロサイトが傷害された結果、神経系はアストロサイトの持つ役割を失い、二次的なミエリン脱落 (脱髄) と神経傷害を引き起こす^{3, 4)}。このため NMOSD はアストロサイトパチーと称され、一次的に脱髄を引き起こすオリゴデンドロサイトパチーである MS とは異なる疾患として認識されている。

しかし、AQP4 抗体が血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) というバリアーを越える機序は不明である。実際 NMOSD では、10 年以上、AQP4 抗体が血液中に存在するにも関わらず発症しない症例⁷⁾、感染やワクチン接種が発症の誘引となる症例⁸⁾が報告されている。この事実は、骨髄など中枢神経の外で産生された AQP4 抗体が、中枢神経の内にあるアストロサイトに発現した AQP4 分子にアクセスするために、BBB を超えるステップが必要であることを示唆する。このステップには、AQP4 抗体と補体以外の「未知の免疫因子」が関連して

いると想定されている。

MS では、T 細胞をはじめとしたリンパ球が BBB を越えて脳実質に浸潤するステップに、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子である melanoma cell adhesion molecule (MCAM) とインターロイキン (interleukin; IL)-17 が重要な役割を果たすと考えられはじめています。MCAM は、リンパ球の微絨毛を誘導し、血管内皮細胞表面へのローリングを促進し⁹⁾、さらに、血管内皮細胞の MCAM と¹⁰⁾、もしくは内皮基底膜のラミニンと結合し、リンパ球の組織内浸潤を惹起すると想定されている¹¹⁾。実際、MS では、再発時の脳脊髄液や活動病変の血管周囲では、MCAM を高発現した CD4 もしくは CD8 陽性 T 細胞の増加を認め、活動病変の血管内皮細胞でも MCAM の発現が増加している^{12, 13)}。さらに、CD4 陽性 T 細胞 (T_H17 細胞) のヒト脳血管内皮細胞株 hCMEC/D3 細胞への接着を、抗 MCAM 抗体で抑制できる¹⁴⁾。これらの事から、MS での BBB を超えたリンパ球浸潤に MCAM は関わっていると考えられる。

一方、BBB を傷害する因子として IL-17 が注目されている。IL-17 は、オクルディンをはじめとした BBB のタイトジャンクション分子を破壊し¹⁵⁾、血管内皮細胞からのケモカイン CCL2 を放出させ、CD4 陽性リンパ球を血管外へ遊走させる炎症性サイトカインである¹⁶⁾。IL-17 を産生するリンパ球には、T_H17 細胞、CD8 陽性 T 細胞 (T_C17 細胞)、3 型自然リンパ球などがある。これら IL-17 産生リンパ球は MCAM を高く発現することが知られている^{12, 13, 17)}。MS では、MCAM 高発現の T 細胞の関与が想定されていることから、MCAM を発現する IL-17 産生リンパ球が、脳血管内皮細胞の MCAM と結合し実質内に移行し、その場で産生する IL-17 を介して病変を形成すると推定される。このような MCAM と IL-17 の自己免疫性疾患への関与は、MS だけではなく、関節リウマチ¹⁸⁾、ベーチェット病¹⁹⁾、サルコイドーシス¹⁹⁾、炎症性腸疾患^{19, 20)}、乾癬²¹⁾をはじめとした全身性自己免疫疾患においても、報告されている。

これらの事実から、私は、「NMOSD でも、MCAM を高発現した IL-17 産生リンパ球が、リンパ球の血管内皮細胞表面へのローリングを促進し、血管内皮細胞の MCAM と結合することで、BBB を乗り越え中枢神経内へ到達し、その場で IL-17 を産生することで BBB を破壊する。BBB の破壊により、AQP4 抗体が中枢神経の外から内へ流入し、補体とともにアストロサイト傷害を発揮し、病変を形成する」という病態仮説を立てた。本研究では、これを明らかにする目的で、NMOSD 病変にて、まず T 細胞および血管内皮細胞の MCAM 発現について免疫組織化学的な検討を行った。

対象と方法

表 1 対象

新潟大学脳研究所病理学分野において NMOSD と臨床病理学的に診断された剖検例 7 例 (表 1) の脊髄を検討した。このうちの 3 例で MCAM の詳細を解析した。病理学的には pattern-specific loss of AQP4 immunoreactivity と血管周囲の活性化補体沈着を全例に

認め、臨床的には視神経炎および脊髄炎を呈した症例群である。正常対照として、非中枢神経疾患の剖検例 5 例（76 歳男性：Lambert-Eaton 症候群，80 歳男性：消化管出血，66 歳男性：慢性炎症性脱髄性多発神経根炎，49 歳女性：ミオパチー，47 歳女性：筋強直性ジストロフィー）を検討した。

組織学的解析

剖検で得られた脊髄を含むホルマリン固定，パラフィン包埋ブロックから，4 μ m 厚の切片を作製した。hematoxylin and eosin (HE) 染色を行い，顆粒球，マクロファージ，単核球，ヒアリン化した血管の存在を確認した。

免疫組織化学および免疫蛍光二重染色

脊髄の切片について，表 2 に記載した一次抗体を用いた。免疫組織化学は Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, USA) による ABC 法または Histofine Simple Stain MAX-PO kit (Nichirei, Japan) によるポリマー法で行い，diaminobenzidine で発色した。免疫蛍光二重染色では，既報のごとく TSA Plus Fluorescein System (Perkin Elmer Life Sciences, USA) によって MCAM を Fluorescein で標識した²²⁾。その後，抗 CD3 抗体と Alexa Fluor 555 goat anti-rat IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific, USA; 1:200) を使用し，CD3 を Alexa Fluor 555 で標識した。核を 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で標識した。共焦点画像撮影にはレーザ走査型顕微鏡 (LSM710; Carl Zeiss Co., Ltd.) を用いた。

定量解析

NMOSD の脊髄病変を AQP4, 活性化補体 C9neo, glial fibrillary acidic protein (GFAP), 2', 3' - Cyclic-nucleotide 3' - phosphodiesterase (CNPase), myelin basic protein (MBP) の免疫組織化学と HE 染色によって initial lesions (IL), early active lesions (EA), late active lesions (LA), inactive lesions (IA) に分類した^{23, 24)}。抗 CD3 抗体，抗 CD4 抗体，抗 CD8 抗体，抗 CD20 抗体による免疫組織化学切片において，CD3 陽性 T 細胞，CD4 陽性 T 細胞，CD8 陽性 T 細胞，CD20 陽性 B 細胞を同定した。さらに，NMOSD の 3 例(表 1 の症例 1, 2, 3)における脊髄組織 10 ブロックから IL または EA, LA, IA をそれぞれ 7 個，8 個，23 個抽出し，正常対照では 5 例から脊髄組織 15 ブロックを抽出し，抗 MCAM 抗体による免疫組織化学を行い，MCAM 陽性単核球を同定した。抗 MCAM 抗体と抗 CD3 抗体による免疫蛍光二重染色切片において，MCAM 陽性 T 細胞を同定した。対物 20 倍レンズを用いて，IL/EA, LA, IA でそれぞれ 15 視野の画像をランダムに撮影した。MCAM 陽性 T 細胞の密度 (単位面積当たりの個数 (/mm²)), T 細胞における MCAM 陽性 T 細胞の割合を棒グラフで示した。MCAM 陽性血管に関しては，MCAM で染色した切片において，形態によって血管を同定した。対物 10 倍レンズを用いて，切片に垂直あるいは平行な 1 つの血管腔を 1 本の血管と定義した。IL/EA, LA, IA でそれぞれランダムに 15 視野の画像を撮影し，正常対照の灰白質と白質で

それぞれ 15 視野の画像をランダムに撮影した。MCAM の発現を半定量的に 2 段階で評価し (0, 発現なし; 1, 発現あり), MCAM を発現する血管の割合を棒グラフで示した。画像におけるカウントは Image J (imagej.net) を用いて行った。

統計学的解析

2 群 (正常対照の灰白質群, 白質群) 間の組織像の比較には, Mann - Whitney U 検定を用いた。3 群 (NMO/D の IL/EA 群, LA 群, IA 群) 間の組織像の比較には, Kruskal - Wallis 検定と Dunn の方法による多重比較検定を用いた。解析は GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) で行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結果

図 1 等倍

NMO/D の脊髄病変におけるステージ毎の炎症細胞浸潤

HE 染色で脊髄病変を全例で, 22 ブロック (22/27, 81%) で認めた。全例で AQP4 の染色性は広汎に消失し (図 1 B), アストロサイトのマーカーである GFAP (図 1 C) やオリゴデンドロサイト・ミエリンのマーカーである CNPase (図 1 D) や MBP (図 1 E) が脱落する範囲を超えており, 既報にある pattern-specific loss of AQP4 immunoreactivity³⁾ を認めた。既報に基づき, ステージ分類を行った。IL/EA 100% (7/7 病変), LA の 67% (6/9 病変), IA の 9% (3/35 病変) に著しい炎症細胞浸潤を認めた (図 1 A)。

図 2, 3, 4 等倍

NMO/D の脊髄病変における MCAM 陽性 T 細胞

浸潤する顆粒球としては好中球が主体であったが (図 2 A), 好酸球もみられた (図 2 B)。マクロファージも多数浸潤していた (図 2 B)。リンパ球では, CD20 陽性細胞 (図 2 D), CD3 陽性細胞 (図 2 E), CD4 陽性細胞 (図 2 F), CD8 陽性細胞 (図 2 G) の浸潤を認めた。CD4 陽性細胞よりも CD8 陽性細胞が優位であった。

次に, 抗 MCAM 抗体と抗 CD3 抗体を用いた免疫蛍光二重染色によって, MCAM 陽性 T 細胞を同定した。IL/EA では, 血管周囲を中心に MCAM 陽性 T 細胞を認めた (図 3 A-D)。血管でも T 細胞に比して, 強い MCAM の染色性を示した (図 3 A)。MCAM 陽性 T 細胞の密度は, LA と IA に比して IL/EA で有意に高かった (平均値 ± 標準偏差: IL/EA $8.9 \pm 4.6 /\text{mm}^2$, LA $5.5 \pm 2.9 /\text{mm}^2$, IA $0.4 \pm 1.4 /\text{mm}^2$, IL/EA 対 LA, $P < 0.0028$; IL/EA 対 IA, $P < 0.0001$) (図 3 E)。T 細胞における MCAM 陽性 T 細胞の割合は, LA と IA に比して IL/EA で有意に高かった (IL/EA $7.7 \pm 4.4\%$, LA $1.6 \pm 1.9\%$, IA $0.2 \pm 0.9\%$, IL/EA 対 LA, $P < 0.0006$; IL/EA 対 IA, $P < 0.0001$) (図 3 F)。IL/EA において, MCAM 陽性 T 細胞が MCAM 陽性血管と近接する像を認めた (図 4)。

図 5 等倍

NMO/D の脊髄病変における MCAM 陽性血管

免疫組織化学によって脊髄血管における MCAM の発現を検討した。正常対照では MCAM は血管壁に沿って染色され、その発現は灰白質で高く、白質で低かった (図 5 A-C)。MCAM を発現する血管の割合は、白質に比して灰白質で有意に高かった (平均値±標準偏差 : 灰白質 $27.6 \pm 8.9 \%$, 白質 $5.9 \pm 5.7 \%$, $P < 0.0001$) (図 5 D)。NMOSD では、IL/EA において血管壁の MCAM の発現は高く (図 5 E), LA と IA では低かった (図 5 F, G)。MCAM を発現する血管の割合は、LA と IA に比して IL/EA で有意に高かった (IL/EA $80.1 \pm 19.1 \%$, LA $10.2 \pm 7.84 \%$, IA $3.01 \pm 4.75 \%$, IL/EA 対 LA, $P < 0.0006$; IL/EA 対 IA, $P < 0.0001$) (図 5 H)。

考察

本研究では NMOSD の脊髄病変にて、第一に、MCAM 陽性 T 細胞が早期病変に有意に多く浸潤すること、第二に、MCAM 陽性血管が早期病変に有意に多いこと、第三に、MCAM 陽性 T 細胞が MCAM 陽性血管と接することを明らかにした。以上の研究結果は、病態作業仮説「NMOSD では、MCAM を高発現した IL-17 産生リンパ球が、リンパ球の血管内皮細胞表面へのローリングを促進し、血管内皮細胞の MCAM と結合することで、BBB を乗り越え中枢神経内へ到達し、その場で IL-17 を産生することで BBB を破壊する。BBB の破壊により、AQP4 抗体が中枢神経の外から内へ流入し、補体とともにアストロサイト傷害を発揮し、病変を形成する」の一端を支持するものである。

最初に、T 細胞に発現する MCAM について考察する。1) NMOSD の脊髄病変には CD8 陽性 T 細胞が優位であること (図 2), 2) CD8 陽性 T 細胞では IL-1 β と IL-6 によって MCAM の発現が誘導されること¹³⁾, 3) NMOSD の再発時の脳脊髄液では IL-1 β と IL-6 が上昇すること⁴⁾ から、NMOSD において IL-1 β と IL-6 が T 細胞の MCAM の発現誘導に影響を与えていると考えられる。MS の早期病変では、IL-1 β 陽性ミクログリア²⁵⁾ と IL-6 陽性アストロサイト²⁶⁾ が存在し、IL-1 β と IL-6 が T 細胞での MCAM の発現を誘導する^{12, 13)} ことが知られている。今後、NMOSD においても IL-1 β と IL-6 を産生する細胞を同定すると共に、それらに反応する MCAM 陽性 T 細胞系列 (T_H17, T_C17 など) の詳細を明らかにする必要がある。

次に、脳血管内皮細胞に発現する MCAM について考察する。1) NMOSD の病変には活性化マクロファージをはじめとした自然免疫細胞の浸潤が多い⁴⁾, 2) MS やクローン病の病変ではマクロファージから産生された tumor necrotic factor (TNF) が血管内皮での MCAM 発現を誘導する可能性がある^{12, 20, 27, 28)} ことから、NMOSD ではマクロファージから産生された TNF が脳血管内皮細胞の MCAM 発現を誘導している可能性がある。今後、マクロファージをはじめとした自然免疫細胞における TNF 産生能を確認する必要がある。

最後に、NMOSD における T 細胞の意義について考察する。1) NMOSD の患者に存在する AQP4 抗体の主なサブクラスは T 細胞依存的サブクラス IgG1 であることから²⁹⁾, AQP4 特異的 T 細胞が AQP4 抗体産生に関与する可能性が高い³⁰⁾, 2) NMOSD 患者の血液中には AQP4 蛋白や

AQP4 ペプチド (p61-80) に特異的な T 細胞が存在する³⁰⁾, 3) NMOSD 患者の血液中には AQP4 ペプチド p61-80 特異的 HLA-DR 拘束性 CD4 陽性 T 細胞が存在し, IL-17 を産生する³⁰⁾, 4) NMOSD のモデル動物では AQP4 特異的 T 細胞と AQP4 抗体の移入により, ヒト NMOSD に類似した病巣を再現できる³¹⁾ ことが明らかにされている. これまで NMOSD には AQP4 抗体と補体という液性免疫機構のみが注目されてきたが, T 細胞も重要な役割を持つ可能性がある. IL-17 を産生する CD4 陽性 T 細胞 (T_H17 細胞) の 50%以上, IL-17 を産生する CD8 陽性 T 細胞 (T_C17 細胞) の 5-15%が MCAM を発現する^{13, 14)} ことから, 本研究で見出された「NMOSD 病変部位には MCAM 陽性 T 細胞が集積する」という事実は, MCAM と密接な関係にある IL-17 を軸とした炎症が NMOSD の病変局所に存在する可能性を示唆する. MCAM 陽性 T 細胞が産生する IL-17 により, 炎症局所への好中球の遊走³²⁾ と BBB の破綻が^{15, 16)} 誘導され, NMOSD の初期病変を形成する可能性が高い.

NMOSD は稀少な自己免疫疾患で, 剖検時に活動病変がある症例が少ないため, 本研究で解析した活動病変は少ないこと, 抗 CD4 抗体または抗 CD8 抗体と抗 MCAM 抗体の免疫蛍光二重染色を行っていないため, NMOSD の脊髄病変における MCAM 陽性 T 細胞の系列 (T_H17, T_C17 など) が明らかでないこと, さらに MCAM とラミニンの免疫蛍光二重染色を行っていないため, 内皮基底膜のラミニンを介して侵入する可能性を否定できないことは, 今後, 解決すべき課題である.

本研究は, T 細胞が血管との MCAM を介した結合により病変局所に浸潤することが, NMOSD の早期病変に重要である可能性を示している. この事実は, MCAM が治療標的となる可能性を示唆する. 実際, MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎において, 抗 MCAM キメラ抗体の投与や, MCAM を除去したリンパ球を用いることで, 神経症候が軽症化し, 中枢神経系に浸潤する T_H17 細胞が減少する¹²⁾. 今後, NMOSD に対しても, 同様のアプローチで, NMOSD の再燃や, また病変の進展を抑止できる可能性があり, 今後, 動物モデルを用いた検証が期待される.

結語

本研究では NMOSD の剖検病理組織を用いて, 脊髄病変早期には MCAM 陽性 T 細胞が有意に多く浸潤し, 血管における MCAM の発現が高いことを示した. T 細胞と血管の MCAM が相互に作用することで, 活性化した T 細胞が血液脳関門を通過し脊髄実質に浸潤する可能性が示唆された. NMOSD において MCAM 陽性 T 細胞は IL-17 を産生し, 血管内皮細胞の傷害と好中球の誘導に関与する可能性が考えられた. NMOSD の病態機序として, AQP4 抗体と活性化補体による液性免疫に加えて T 細胞による細胞性免疫の関与が示唆され, MCAM が新たな治療標的となる可能性が考えられた.

謝辞

本研究に際しご指導を賜りました新潟大学脳研究所神経内科学分野の河内泉先生，小野寺理先生，西澤正豊先生，同病理学分野の高橋均先生，柿田明美先生，豊島靖子先生に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Kawachi I and Lassmann H: Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88:137-145, 2017.
- 2) Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M and Lassmann H: Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707-717, 2000.
- 3) Roemer SF, Parisi JE, Lennon VA, Benarroch EE, Lassmann H, Bruck W, Mandler RN, Weinshenker BG, Pittock SJ, Wingerchuk DM and Lucchinetti CF: Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Brain* 130:1194-1205, 2007.
- 4) Yanagawa K, Kawachi I, Toyoshima Y, Yokoseki A, Arakawa M, Hasegawa A, Ito T, Kojima N, Koike R, Tanaka K, Kosaka T, Tan CF, Kakita A, Okamoto K, Tsujita M, Sakimura K, Takahashi H and Nishizawa M: Pathologic and immunologic profiles of a limited form of neuromyelitis optica with myelitis. *Neurology* 73:1628-1637, 2009.
- 5) Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS and Hinson SR: IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* 202:473-477, 2005.
- 6) Saadoun S, Waters P, Bell BA, Vincent A, Verkman AS and Papadopoulos MC: Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice. *Brain* 133:349-361, 2010.
- 7) Nishiyama S, Ito T, Misu T, Takahashi T, Kikuchi A, Suzuki N, Jin K, Aoki M, Fujihara K and Itoyama Y: A case of NMO seropositive for aquaporin-4 antibody more than 10 years before onset. *Neurology* 72:1960-1961, 2009.
- 8) Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC and Weinshenker BG: The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* 53:1107-1114, 1999.
- 9) Guezguez B, Vigneron P, Lamerant N, Kieda C, Jaffredo T and Dunon D: Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor. *J Immunol* 179:6673-6685, 2007.
- 10) Bardin N, Frances V, Lesaule G, Horschowski N, George F and Sampol J: Identification of the S-Endo 1 endothelial-associated antigen. *Biochem Biophys Res Commun* 218:210-216, 1996.

- 11) Flanagan K, Fitzgerald K, Baker J, Regnstrom K, Gardai S, Bard F, Mocci S, Seto P, You M, Larochelle C, Prat A, Chow S, Li L, Vandever C, Zago W, Lorenzana C, Nishioka C, Hoffman J, Botelho R, Willits C, Tanaka K, Johnston J and Yednock T: Laminin-411 is a vascular ligand for MCAM and facilitates TH17 cell entry into the CNS. *PLoS One* 7:e40443, 2012.
- 12) Larochelle C, Cayrol R, Kebir H, Alvarez JI, Lecuyer MA, Ifergan I, Viel E, Bourbonniere L, Beauseigle D, Terouz S, Hachehouche L, Gendron S, Poirier J, Jobin C, Duquette P, Flanagan K, Yednock T, Arbour N and Prat A: Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system. *Brain* 135:2906-2924, 2012.
- 13) Larochelle C, Lecuyer MA, Alvarez JI, Charabati M, Saint-Laurent O, Ghannam S, Kebir H, Flanagan K, Yednock T, Duquette P, Arbour N and Prat A: Melanoma cell adhesion molecule-positive CD8 T lymphocytes mediate central nervous system inflammation. *Ann Neurol* 78:39-53, 2015.
- 14) Brucklacher-Waldert V, Stuermer K, Kolster M, Wolthausen J and Tolosa E: Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* 132:3329-3341, 2009.
- 15) Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, Bechmann I, Becher B, Luhmann HJ, Waisman A and Kuhlmann CR: Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J* 24:1023-1034, 2010.
- 16) Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, Giuliani F, Arbour N, Becher B and Prat A: Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 13:1173-1175, 2007.
- 17) Montaldo E, Teixeira-Alves LG, Glatzer T, Durek P, Stervbo U, Hamann W, Babic M, Paclik D, Stolzel K, Grone J, Lozza L, Juelke K, Matzmohr N, Loiacono F, Petronelli F, Huntington ND, Moretta L, Mingari MC and Romagnani C: Human RORgammat(+)CD34(+) cells are lineage-specified progenitors of group 3 RORgammat(+) innate lymphoid cells. *Immunity* 41:988-1000, 2014.
- 18) Dagur PK, Tatlici G, Gourley M, Samsel L, Raghavachari N, Liu P, Liu D and McCoy JP, Jr.: CD146+ T lymphocytes are increased in both the peripheral circulation and in the synovial effusions of patients with various musculoskeletal diseases and display pro-inflammatory gene profiles. *Cytometry B Clin Cytom* 78:88-95, 2010.
- 19) Dagur PK, Biancotto A, Wei L, Sen HN, Yao M, Strober W, Nussenblatt RB and McCoy JP, Jr.: MCAM-expressing CD4(+) T cells in peripheral blood secrete IL-17A and are significantly elevated in inflammatory autoimmune diseases. *J Autoimmun*

- 37:319-327, 2011.
- 20) Bardin N, Reumaux D, Geboes K, Colombel JF, Blot-Chabaud M, Sampol J, Duthilleul P and Dignat-George F: Increased expression of CD146, a new marker of the endothelial junction in active inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 12:16-21, 2006.
 - 21) Mehta NN, Dagur PK, Rose SM, Naik HB, Stansky E, Doveikis J, Biancotto A, Playford MP and Philip McCoy J, Jr.: IL-17A production in human psoriatic blood and lesions by CD146+ T cells. *J Invest Dermatol* 135:311-314, 2015.
 - 22) Saji E, Arakawa M, Yanagawa K, Toyoshima Y, Yokoseki A, Okamoto K, Otsuki M, Akazawa K, Kakita A, Takahashi H, Nishizawa M and Kawachi I: Cognitive impairment and cortical degeneration in neuromyelitis optica. *Ann Neurol* 73:65-76, 2013.
 - 23) Lassmann H: Review: the architecture of inflammatory demyelinating lesions: implications for studies on pathogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37:698-710, 2011.
 - 24) Bruck W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmar HA and Lassmann H: Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 38:788-796, 1995.
 - 25) Cannella B and Raine CS: The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 37:424-435, 1995.
 - 26) Maimone D, Guazzi GC and Annunziata P: IL-6 detection in multiple sclerosis brain. *J Neurol Sci* 146:59-65, 1997.
 - 27) Hofman FM, Hinton DR, Johnson K and Merrill JE: Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 170:607-612, 1989.
 - 28) Neurath MF: Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 14:329-342, 2014.
 - 29) Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, Nakashima I and Weinshenker BG: A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 364:2106-2112, 2004.
 - 30) Varrin-Doyer M, Spencer CM, Schulze-Topphoff U, Nelson PA, Stroud RM, Cree BA and Zamvil SS: Aquaporin 4-specific T cells in neuromyelitis optica exhibit a Th17 bias and recognize Clostridium ABC transporter. *Ann Neurol* 72:53-64, 2012.
 - 31) Pohl M, Fischer MT, Mader S, Schanda K, Kitic M, Sharma R, Wimmer I, Misu T, Fujihara K, Reindl M, Lassmann H and Bradl M: Pathogenic T cell responses against aquaporin 4. *Acta Neuropathol* 122:21-34, 2011.
 - 32) Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR and Harrington LE: IL-17 family cytokines and

the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25:821-852, 2007.

表1 NMOSD 剖検例の臨床的特徴

症例	性別	発症年齢 (歳)	罹病期間 (年)	剖検時年齢 (歳)	脊髄炎の エピソード(回)
1	男性	77	0.2	77	1
2	女性	64	3.3	67	2
3	男性	21	26.2	47	21
4	男性	39	40.1	79	3
5	女性	56	8.7	64	3
6	男性	40	12.0	52	4
7	男性	80	0.7	80	1

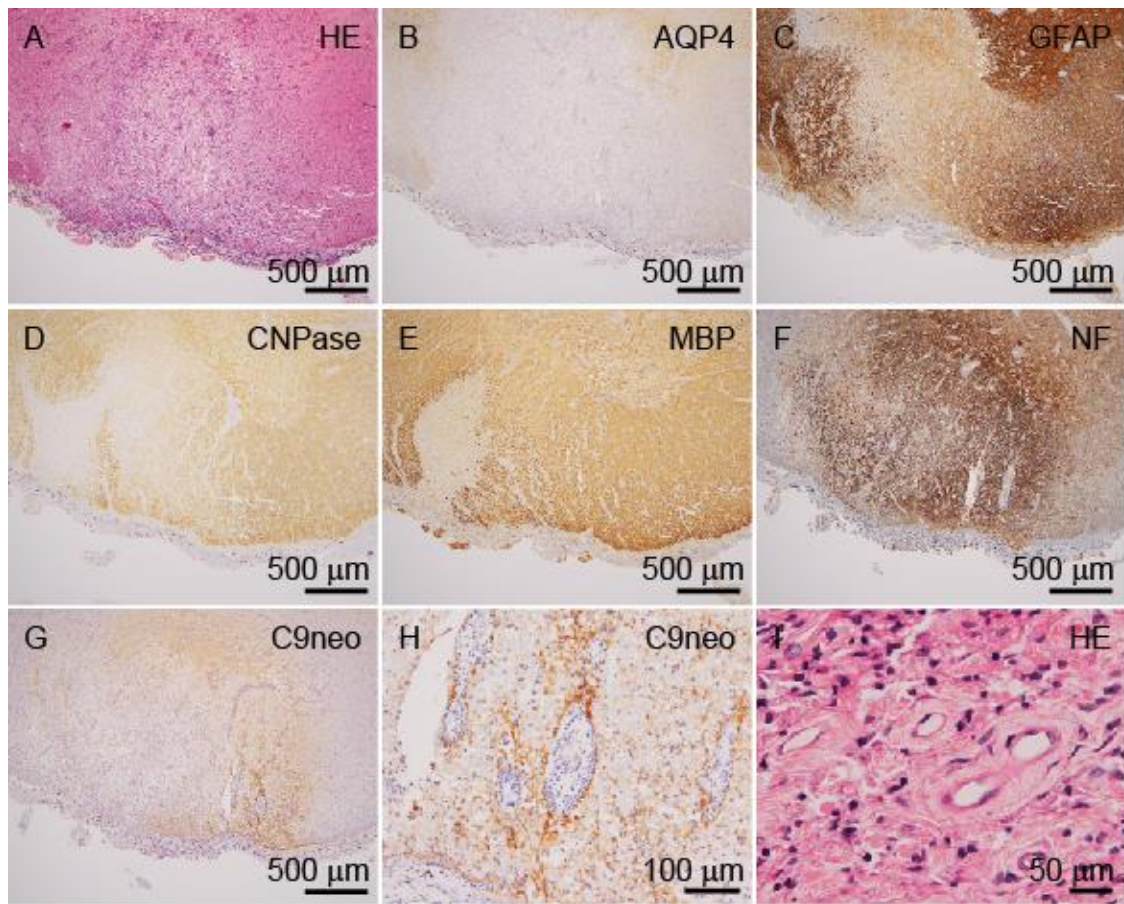
N. A. : not assessed.

表2 免疫組織化学で使用した一次抗体

一次抗体	クローン	希釈倍率	ソース
AQP4	ラビット, ポリクローナル	1:1000	Chemicon, USA
GFAP	ラビット, ポリクローナル	1:1500	Dako, Denmark
CNPase	マウス, モノクローナル (11-5B)	1:1000	Sigma, USA
MBP	ラビット, ポリクローナル	1:200	Dako, Denmark
NF	マウス, モノクローナル (SMI31)	1:1000	Sternberger Monoclonals, USA
C9neo	マウス, モノクローナル (B7)	1:200	Dr. Paul Morgan, Cardiff, UK
Iba-1	ラビット, ポリクローナル	1:2000	Wako, Japan
CD3	ラット, モノクローナル (CD3-12)	1:500	AbD Serotec, UK
CD4	マウス, モノクローナル (4B12)	1:100	Dako, Denmark
CD8	マウス, モノクローナル (C8/144B)	1:50	Dako, Denmark
CD20	マウス, モノクローナル (L26)	希釈済抗体	Dako, Denmark
MCAM	ラビット, モノクローナル (EPR3208)	1:250	Abcam, UK

AQP4: aquaporin-4, GFAP: glial fibrillary acidic protein, CNPase: 2',3' - Cyclic-nucleotide 3' - phosphodiesterase, MBP: myelin basic protein, NF: neurofilament, MCAM: melanoma cell adhesion molecule.

天

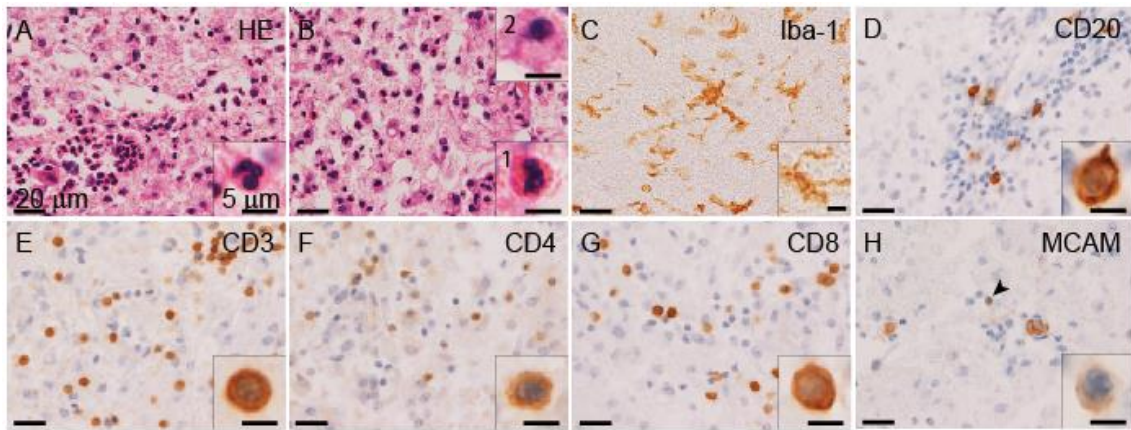


地

図1 NMOSD 脊髄病変の病理像

HE 染色で著しい炎症細胞浸潤を認める (A). AQP4 の染色性は広汎に消失し (B), アストロサイトのマーカーである GFAP (C) やオリゴデンドロサイト・ミエリンのマーカーである CNPase (D) と MBP (E) の脱落する範囲を超える. 一部の範囲で, 神経軸索のマーカーである NF は脱落している (F). C9neo の免疫組織化学では, 血管周囲の活性化補体沈着を認める (G, H). HE 染色では血管壁の肥厚とヒアリン化を認める (I).

天

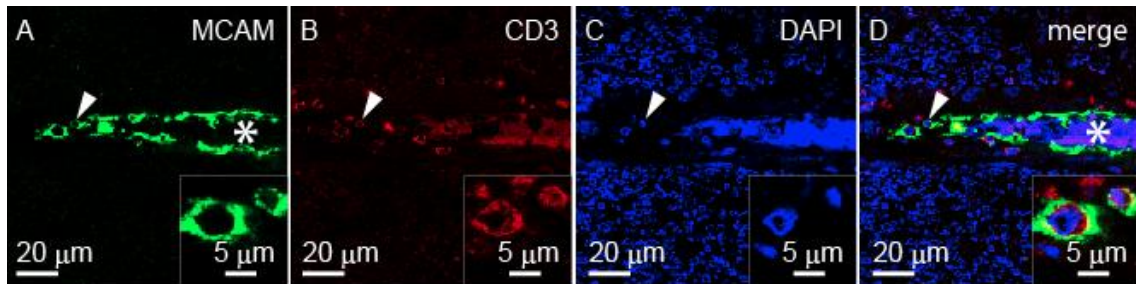


地

図2 NMOSD 脊髄病変における炎症細胞浸潤

IL/EA に浸潤する免疫細胞の病理像を示す. HE 染色では著しい顆粒球の浸潤があり, 好中球 (A) と好酸球を認める (B-1). マクロファージも多数浸潤している (B-2). Iba-1 の免疫組織化学では, 活性化したミクログリアを認める (C). リンパ球マーカーと MCAM の免疫組織化学では, CD20 陽性 B 細胞 (D), CD3 陽性 T 細胞 (E), CD4 陽性細胞 (F), CD8 陽性細胞 (G), MCAM 陽性単核球を認める (H, 矢頭). IL/EA: initial lesions/early active lesions.

天



地

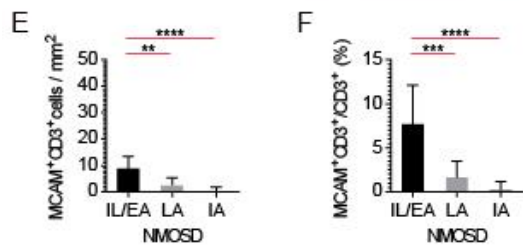


図3 NMOSD 脊髄病変の MCAM 陽性 T 細胞

抗 MCAM 抗体 (緑) と抗 CD3 抗体 (赤) を用いた免疫蛍光二重染色像. NMOSD の IL/EA (A-D) に MCAM 陽性 T 細胞を認める (矢頭). 血管は T 細胞に比べて, 強い MCAM の染色性を示す (アスタリスク). 脊髄病変における MCAM 陽性 T 細胞の密度は, LA と IA に比して IL/EA で有意に高く (**** $p < 0.0001$, ** $p < 0.0028$, 多重比較検定) (E), T 細胞中の MCAM 陽性細胞の割合も IL/EA で有意に高い (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.0006$, 多重比較検定) (F). IL/EA: initial lesions/early active lesions, LA: late active lesions, IA: inactive lesions.

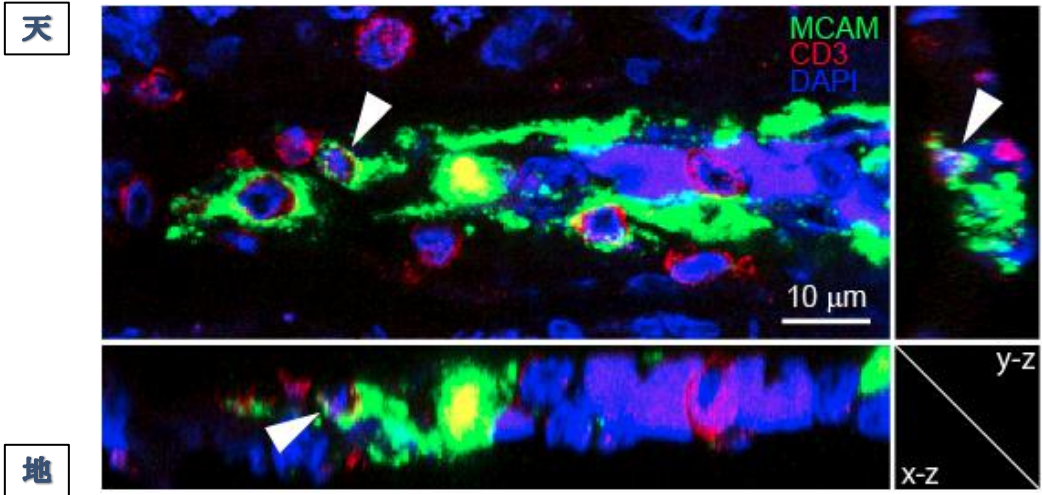


図4 MCAM 陽性 T 細胞の 3 次元構造解析
 抗 MCAM 抗体 (緑) と抗 CD3 抗体 (赤) を用いた免疫蛍光二重染色の Z スタック画像. NMOSD の IL/EA において, MCAM 陽性 T 細胞が MCAM 陽性血管と近接する像を認める (矢頭). IL/EA: initial lesions/early active lesions.

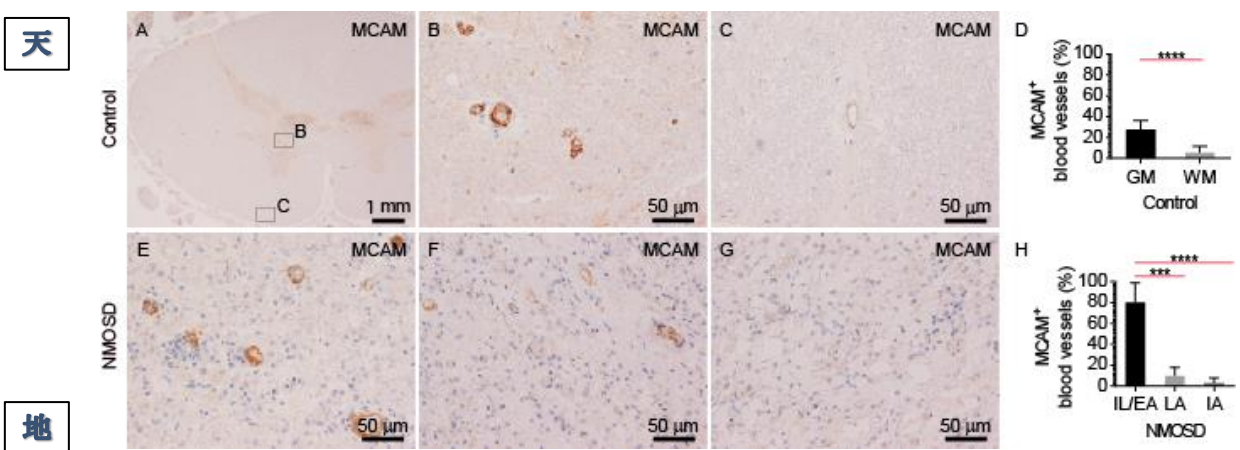


図5 脊髄の MCAM 陽性血管
 正常対照の脊髄では, MCAM は血管壁に沿って染色され (A), その発現は灰白質で高く (B), 白質で低い (C). MCAM を発現する血管の割合は, 白質に比して灰白質で有意に高い (**** $p < 0.0001$, Mann - Whitney U 検定) (D). NMOSD の脊髄病変では, 血管壁の MCAM の発現は IL/EA で高く (E), LA (F) と IA (G) では低い. MCAM を発現する血管の割合は, LA と IA に比して IL/EA で有意に高い (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.0006$, 多重比較検定) (H). GM: grey matter, WM: white matter, IL/EA: initial lesions/early active lesions, LA: late active lesions, IA: inactive lesions.