

傍腫瘍性神経症候群の病態機序解明に向けて

新潟大学脳研究所神経内科 (主任: 辻 省次教授)

田 中 恵 子

A Study on Pathomechanisms of Paraneoplastic Neurological Syndrome

Keiko TANAKA

*Department of Neurology,
Brain Research Institute, Niigata University
(Director: Prof. Shoji TSUJI)*

Paraneoplastic neurological syndrome is thought to be caused by an autoimmune mechanism triggered by tumor antigens which attack the neurons presenting the common antigens. We tried to prove the antibody-mediated neuronal loss by passive transfer with IgG containing Yo antibody or Hu antibody and by active immunization with recombinant Yo protein or Hu protein, which was concluded the antibodies per se could not cause neuronal loss.

On the other hand, the patients with paraneoplastic neurological syndrome show pleocytosis in the cerebrospinal fluid and massive lymphorrhage, predominant CD8 + T cells, are seen in the tumor and in the affected lesions in the central nervous system. Another observation that each of the patients' group with anti-Yo antibody positive paraneoplastic cerebellar degeneration or anti-Hu positive sensory neuronopathy have the common HLA class I supertype, that suggested the neuronal loss might be caused by class I restricted CD8 -positive cytotoxic T lymphocytes (CTL).

We synthesized the peptides from Yo or Hu protein with binding capacity to each of the class I molecules. We found the CTL activities in the peripheral CD8 + T cells against the matched peptide-presenting autologous fibroblasts. We need to prove the CTL attacks neurons directly.

Key words: paraneoplastic neurological syndrome, Yo antibody, Hu antibody,
CD8 + T cells, CTL
傍腫瘍性神経症候群, Yo 抗体, Hu 抗体, CD8 陽性 T 細胞, 細胞傷害性 T 細胞

Reprint requests to: Keiko TANAKA,
Department of Neurology,
Brain Research Institute,
Niigata University, Niigata City,
951-8585 JAPAN

別刷請求先:
〒951-8585 新潟市旭町通り1番町
新潟大学脳研究所神経内科
田中恵子

傍腫瘍性神経症候群とは、担癌者に腫瘍転移・化学療法の副作用・栄養障害・感染症など明らかな因果関係のある原因が見あらず、系統変性的な神経症候を呈する一群である。これらの一部では、神経症候の責任病巣となる神経組織と腫瘍とを共通に認識する特徴的な自己抗体が産生され、抗体と神経症候、腫瘍との間に一定の関係がある。さらに、これらの抗体および神経症状は腫瘍の発見に先立って出現することが多いことから、抗体の診断が本症の診断および腫瘍の早期発見・その原発巣の推定に大きく寄与するものとなる¹⁾。

本症の神経傷害については、腫瘍に対して産生された自己抗体が共通抗原を有する神経組織を攻撃する機序が考えられてきた²⁾。

抗体が神経傷害を生じるとの仮説を証明したものとして、Lambert-Eaton 筋無力症候群 (Lambert-Eaton myasthenic syndrome: LEMS) とホジキン病に伴う亜急性小脳失調症がある。LEMS 患者の血清 IgG をマウスに繰り返し投与することにより、神経筋接合部でのブロックを生じ、LEMS で見られる電気生理学的所見を得ることができる³⁾。また最近、ホジキン病に伴う亜急性小脳失調症を伴った例の血清中に代謝調節型グルタミン酸受容体に対する抗体が見いだされ、この血清 IgG をマウスの脳槽内に投与することにより、マウスに一過性の小脳失調を発現させ得たことが報告された⁴⁾。LEMS では神経筋接合部、小脳失調を伴うホジキン病では小脳 Purkinje 細胞の細胞表面にある受容体が抗原となっており、両者とも抗体が到達しやすいと考えられる部位が病巣である特徴を有する。これらの群では早期の抗体除去が治療としても有効である可能性がある。

我々は細胞内・核内蛋白抗原に対する抗体である抗 Yo 抗体・抗 Hu 抗体が出現する群について、その発症機序を解明することを目的に、抗体による病態モデル再現の可否を検討してきた。抗 Yo 抗体は例外的な男性患者の報告があるものの、ほとんどは婦人科癌を背景にして中高年女性に出現する、進行の早い高度の小脳失調例にみられるものであり、小脳 Purkinje 細胞を認識し、ウェスタンブロットでは神経組織の58kD 付近のバンドに反応する抗体である。対応抗原は leucine-zipper 構造をそのモチーフに持つ DNA 結合蛋白であり、神経細胞の生存・維持に重要な役割を有すると考えられる⁵⁾。

抗 Hu 抗体は肺小細胞癌を背景に多彩な神経症状を

呈する例にみられ、神経細胞の核および細胞質を認識し、ウェスタンブロットで35-40kD 付近に複数のバンドがみられる。対応抗原は3つの RNA 認識モチーフを有する蛋白である⁶⁾。

これらの抗体は神経症候と対応する部位の神経細胞に結合し、病理学的にも同部の組織傷害がみられること、本症の腫瘍細胞と反応すること、抗体除去や産生を抑制する治療で神経症状が軽快する例があることなどから、抗体が腫瘍および神経組織を傷害する機序が考えられてきた。我々は抗 Yo 抗体、抗 Hu 抗体を用いて抗体による組織傷害を証明するべく様々な検討を行った⁷⁾⁻⁹⁾。

抗 Yo 抗体陽性 PCD の血清から IgG を精製し (Yo-IgG)、マウスの脳槽内に注入すると、ヒト IgG はマウス小脳 Purkinje 細胞に取り込まれ、抗ヒト IgG を用いた免疫染色で24時間をピークとして染色性が確認され、48時間後には検出できなくなった。この間マウスに失調症状は出現せず、Purkinje 細胞の脱落も認めなかった。抗体と補体を同時に投与しても同様の結果であった。

抗体をより長期間保持させるため、抗体の認識部位になっている leucine-zipper 構造を含む部分のリコンビナント Yo 蛋白を作成し、系統の異なるマウスへの能動免疫を行った。いずれの系統のマウスでも、2回の免疫で力価の高い抗 Yo 抗体産生が1ヶ月以上持続したが、神経症状の発現はなく組織学的変化も認めなかった。マウスで産生された抗 Yo 抗体はヒト組織を用いた免疫染色でも患者さんにみられるものと同様の反応パターンを呈した。

ヌードマウスに免疫した場合は抗体産生がなく、本抗体の産生には T 細胞のヘルプが必要であり抗 Yo 抗体は T 細胞依存性抗体であることがわかった。

抗体を脳血液関門 (blood-brain barrier: BBB) を越えて神経組織に有効に反応させる目的で、リコンビナント蛋白で免疫しながらマウスを妊娠させ、BBB の機能の未熟な胎児へ抗体を移行させたが、生まれた子マウスの小脳に形態学的変化は認めなかった¹⁰⁾。

以上より、少なくとも抗 Yo 抗体陽性群では抗体のみでの神経障害は生じないと思われた。Hu 抗体についても抗体のみでの疾患モデルは成立していない¹¹⁾。

抗 Yo/Hu 抗体陽性群では高力価の抗体が産生されると同時に、病初期には髄液中に細胞・蛋白の増加を認め、両群とも腫瘍組織内には CD8 陽性 T 細胞の浸潤が目立つ。Yo 陽性小脳変性症の剖検脳では小脳プルキンエ細胞が高度に脱落しているものの、リンパ球浸潤は

血管周囲性にわずかに認める程度で、Hu 陽性 sensory neuronopathy や辺縁系脳炎例の罹患組織に多数の CD8 陽性 T 細胞の浸潤を認めることと対比して、組織傷害機序が異なる可能性が考えられたこともあるが、病初期に事故死した Yo 陽性小脳変性症の剖検小脳には多数のリンパ球浸潤があることが明らかになり¹²⁾、両群とも同様の機序によることが考えられる。自験 Yo 陽性小脳変性症例剖検小脳でもブルキンエ細胞は消失しているが、免疫染色をしてみると、神経細胞が脱落した周囲に CD8 陽性 T 細胞が残存していた（未発表データ）。

浸潤細胞の T cell receptor を解析すると、浸潤リンパ球は抗原誘導性にオリゴクローナルに集積していると考えられ（未発表データ）、また Yo 陽性患者群、Hu 陽性患者群ともそれぞれ HLA 型が共通のサブタイプを有することなどより、病態形成に抗原特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞（cytotoxic T cell: CTL）が関与する可能性が考えられる。

CTL はウイルス感染細胞や癌細胞などの除去に重要な役割を有する。CTL の標的である細胞内抗原は、プロテアソーム系で 8-10 個のアミノ酸からなるペプチドに分解された後、主要組織適合抗原（major histocompatibility complex: MHC、ヒトでは human histocompatibility leukocyte antigen: HLA）class I 分子に結合した形で標的細胞表面に提示される。CTL は T 細胞受容体（T cell receptor: TCR）を介して、class I 分子とともにペプチド抗原を認識して活性化される。

class I 分子は $\alpha 1$ および $\alpha 2$ ドメインからなる二つの α ヘリックス構造と β シート構造によりペプチドがはまりこむ溝が形成されており、この溝に存在する 6 個のポケット（peptide-binding pockets）にペプチドのアミノ酸側鎖がはまりこんでいる。このうち 1, 2, 9 番目はアンカー部分として class I 分子とペプチドの結合に特に重要であり、この部位に結合能力のあるペプチドが細胞表面に提示され、抗原エピトープとなりうる。

Yo 抗体陽性群のほとんどは HLA A24 を有するが¹³⁾、A24 class I 分子に結合しているペプチドは、2 番目がチロシン、9 番目がイソロイシン/ロイシン/フェニルアラニンからなるモチーフ構造を有する。我々は Yo 抗原のアミノ酸配列の中から A24 class I 分子に結合しうるペプチドを検索して、抗原エピトープの候補として合成した。そして、Yo 陽性例の末梢血から分離した CD8 陽性 T 細胞を、このペプチドで刺激して

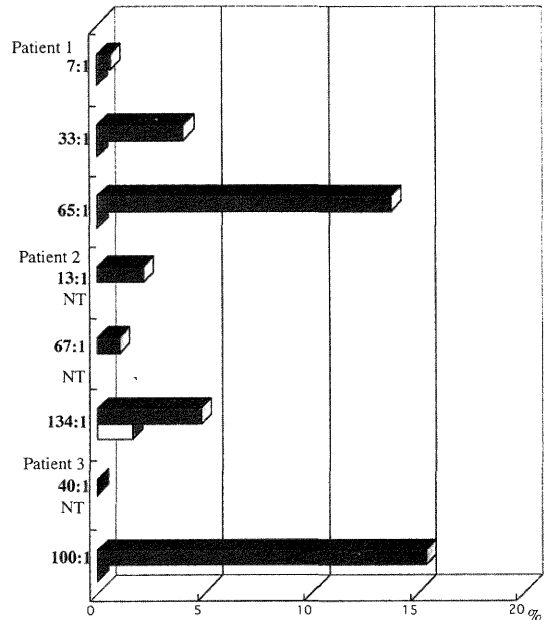


図1 抗 Yo 抗体陽性患者末梢血における Yo-ペプチドを組み込んだ自己線維芽細胞に対する細胞傷害活性（文献14より引用）。

effector とし、自己の線維芽細胞に同ペプチドを取り込ませたものを target として、⁵¹Cr 放出試験による CTL 活性を測定したところ、ペプチドに特異的に反応する CTL 活性が誘導された（図1）¹⁴⁾。

Hu 陽性群については、当初共通の HLA 型が見いだされずペプチドの同定が困難であったため、Hu のリコンビナント蛋白を作成して患者本人から得られた線維芽細胞に microinjection して、Hu 抗原蛋白で刺激した患者末梢血リンパ球による細胞傷害活性を検討した。線維芽細胞の消失率を算定したところ、コントロールとして注入した牛血清アルブミンに比し、Hu 抗原を入れたものでは高頻度に細胞の消失が見られ、これは抗 CD8 抗体でブロックされることから、effector は CD8 陽性 T 細胞と考えられた（表1）¹⁵⁾。

その後 Hu 陽性例の HLA 型を詳細に検討した結果、一見バラバラに見えた型が、class I 分子結合モチーフで見ると共通性のある同一の supertype に属することがわかり、Yo 群と同様に候補ペプチドを類推して合成した。

このうち 2 種のペプチドを用いて、Yo 抗体陽性群と同様の方法で患者末梢血 CD8 陽性 T 細胞に CTL 活

表1 抗Hu抗体陽性亜急性感覚障害患者末梢血T細胞によるリコンビナントHu抗原をmicroinjectionした自己線維芽細胞に対する細胞傷害活性(文献15より引用).

treatment	fibroblast disappearance rate (mean ± S.D. %)
none	0 ± 0
BSA + /MNC -	7.7 ± 10.0
BSA + /MNC +	21.7 ± 1.5
Vec + /MNC -	8.0 ± 2.5
Vec + /MNC +	17.8 ± 4.3
Hu - /MNC +	7.0 ± 5.6
Hu + /MNC -	11.0 ± 11.3
Hu + /MNC +	67.0 ± 6.4
Hu + /MNC + /anti-CD 8 +	33.0 ± 6.6
Hu + /MNC + /anti-CD 4 +	64.2 ± 3.5

BSA: bovine serum albumin, Vec: only plasmid vector, MNC: mononuclear cell, Hu: recombinant HuD protein

性が誘導できた¹⁶⁾.

これらの結果を踏まえて本症の病態を考察する. 本症の primary event と考えられる腫瘍に対する免疫応答の詳細は明らかではないものの, 腫瘍組織の中では professional antigen presenting cell といわれる抗原提示能の高い樹状細胞が浸潤していることが報告されている¹⁷⁾. 特に抗原を取り込む能力の高い幼弱な樹状細胞が腫瘍組織の内部に多く, 抗原表出能の高い成熟樹状細胞が腫瘍組織表面に豊富であることから, 腫瘍抗原を処理してペプチドエピトープを提示した樹状細胞が, 腫瘍周辺でヘルパー T 細胞を刺激し, B 細胞を活性化して抗体産生が生じる一方で, 活性化された樹状細胞は CTL を活性化し, 活性化された T 細胞が中枢神経に migrate して神経細胞の抗原エピトープを認識して神経障害を生じる可能性が考えられる.

しかしながら CTL が神経障害を生じるとの直接の証明はまだないため, 今後抗原特異的に反応する T 細胞クローンを樹立して, このクローンによる神経細胞傷害能を証明するべく検討中である.

謝辞

提示したデータの多くは国立療養所西新潟中央病院神経内科 田中正美先生との共同研究によるもの

であり, 深謝致します.

文 献

- 1) Tanaka, K., Igarashi, S., Yamazaki, M., Nakajima, T., Miyatake, T. and Sakai, K.: Paraneoplastic cerebellar degeneration: Successful early detection and treatment of cancer through characterization of the anti-Purkinje cell antibody *Int Med* **31**: 1339~1342, 1992.
- 2) Posner, J.B.: Paraneoplastic syndromes. In *Neurological Complications of Cancer* (edited by Davis, F.A.), Philadelphia, 1995, pp. 338~385.
- 3) Lang, B., Newsom-Davis, J. and Vincent, A., et al: Autoimmune aetiology for myasthenic (Eaton-Lambert) syndrome. *Lancet*, **ii**: 224~226 1981.
- 4) Smitt, P.S., Kinoshita, A. and Leeuw, B. et al.: Paraneoplastic cerebellar ataxia due to autoantibodies against a glutamate receptor. *New Engl J Med* **342**: 21 27, 2000.
- 5) Takanaga, H., Mukai, H. and Shibata, H. et al.: PKN interacts with a paraneoplastic cerebellar degeneration-associated antigen, which is a potential transcription factor. *Exp. Cell. Res.*, **241**: 363~372, 1998.
- 6) Kumagai, T., Sakai, K. and Kitagawa, Y. et al.: Antibody recognition and RNA binding of a neuronal nuclear autoantigen associated with paraneoplastic neurological syndromes and small cell lung carcinoma. *J Neuroimmunol.*, **93**: 37~44, 1999.
- 7) Tanaka, K., Tanaka, M. and Onodera, O. et al.: Passive transfer and active immunization with the recombinant leucine-zipper (Yo) protein as an attempt to establish an animal model of paraneoplastic cerebellar degeneration. *J. Neurol. Sci.* **127**: 153~158, 1994.
- 8) Tanaka, M., Tanaka, K. and Onodera, O. et al.: Trial to establish an animal model of paraneoplastic cerebellar degeneration with anti-Yo antibody. I. Mouse strains bearing different MHC molecules produce antibodies on immunization with recombinant Yo protein, but do not cause Purkinje cell loss. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **97**: 95~100, 1995.

- 9) **Tanaka, K., Tanaka, M., Igarashi, S., Onodera, O., Miyatake, T. and Tsuji, S.:** Trial to establish an animal model of paraneoplastic cerebellar degeneration (PCD) with anti-Yo antibody 2. Passive transfer of murine mononuclear cells activated with recombinant Yo protein to naive SJL or PCD lymphocytes to severe combined immunodeficiency (SCID) mice *Clin Neurol Neurosurg* **97**: 101~105, 1995.
 - 10) **Tanaka, M., Tanaka, K. and Tsuji, S.:** No ataxia and no Purkinje cell loss in newborn young of SJL mice anti-Yo antibody *Experimental Neurology* **149**: 299, 1998.
 - 11) **Sillevis-Smitt, P.A.E., Manley, G.T. and Posner, J.B.:** High titer antibodies but no disease in mice immunized with the paraneoplastic antigen HuD. *Neurology* **43**: 2049~2054, 1994.
 - 12) **Giometto, B., Marchiori, G.C. and Nicolao, P. et al.:** Subacute cerebellar degeneration with anti-Yo autoantibodies: immunohistochemical analysis of the immune reaction in the central nervous system. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **23**: 468~474, 1997.
 - 13) **Tanaka, M. and Tanaka, K.:** HLA A24 in paraneoplastic cerebellar degeneration with anti-Yo antibody *Neurology* **47**: 606~607, 1996.
 - 14) **Tanaka, M., Tanaka, K., Tokiguchi, S., Shinozawa, K. and Tsuji, S.:** Cytotoxic T cells against a peptide of Yo protein in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration with anti-Yo antibody. *J Neurol Sci* **168**: 28~31, 1999.
 - 15) **Tanaka, K., Tanaka, M., Inuzuka, T., Nakano, R. and Tsuji, S.:** Cytotoxic T lymphocyte-mediated cell death in paraneoplastic sensory neuronopathy with anti-Hu antibody. *J Neurol Sci* **163**: 159~162, 1999.
 - 16) **Tanaka, M., Tanaka, K., Miyamoto, N. and Kamakura, K.:** A peptide with the binding motif for the HLA B7 supertype reacts with CD8-positive cytotoxic T cells in anti-Hu syndrome. *Biomed Res* **21** (1): 25~29, 2000.
 - 17) **Bell, D., Chomarat, P. and Broyles, D. et al.:** In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* **190**: 1417~1425, 1999.
-