

—— 研究助成報告 ——

Rasmussen症候群の早期診断・効果的免疫調節治療選択に向けた研究

Studies for early diagnosis & rationale selection of effective immunomodulatory therapy in Rasmussen syndrome

高橋 幸利, 西村 成子, 高尾 恵美子,
笠井 理沙, 榎田 かおる, 井上 有史

要旨：Rasmussen症候群の発病要因である*CTLA4*及び*PDCDI*のアミノ酸置換を伴うエクソンSNP, rs231775, rs2227982について、ライトサイクラー[®]を用いた迅速測定法を開発した。臨床要因（発病年齢, 病変側, rs231775, rs2227982, 髄液granzyme B, MRI進行性萎縮, IVIg治療, メチルプレドニゾロンパルス治療, タクロリムス治療, 等）と最終観察時予後について重回帰分析を行った。PIQは、発病年齢が高いほど高く ($p=0.0319$), 発作予後は, rs231775 ($p=0.0230$), rs2227982 ($p=0.0074$) がある方が良く, 髄液granzyme Bが高いほど不良であった ($p=0.0041$)。PIQは, メチルプレドニゾロンパルス治療例で良好 ($p=0.0232$) で, 発作予後はタクロリムス治療例で良好 ($p=0.0005$) であった。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2016 ; 27 : 47-56

Key Words : Rasmussen syndrome, *CTLA-4*, *PDCDI*, 重回帰分析, 免疫修飾治療

【はじめに】

1958年に、Rasmussenらが術前には予期し得なかった限局性脳炎の組織所見を有する難治部分てんかん手術症例を3例報告したのがRasmussen症候群研究の始まりである¹⁾。Rasmussen症候群は、神経症状のない健常者に何らかの先行感染症（上気道炎・急性扁桃炎など）があった後に限局性に慢性炎症が起こり、初期には意識障害などの急性脳炎症状は通常示さないが、てんかん発作が難治に経過、次第に片麻痺・知的障害などが出現し、適切な治療がないと“寝たきり”となる慢性進行性の疾患である²⁻⁵⁾。

当初は何らかのウイルスの直接感染による疾患と考えられ、Rasmussen“脳炎”と呼ばれて

いたが、1994年にRogersらがAMPA型グルタミン酸受容体（GluR）のうちのGluA3に対する自己抗体を報告⁶⁾、2002年にBienらが1次的には細胞傷害性T細胞（cytotoxic T cell, CTL）の関与する自己免疫疾患であることを報告した⁷⁾。CTLが放出するgranzyme Bは本症の髄液中で有意に高く、なおかつ発病初期に高値であるので、初期診断に役立つ⁸⁾。Rasmussen症候群のCTLは、NMDA型GluRのアミノ酸配列保存領域由来ペプチドを認識してgranzyme Bを分泌するが、一部のCTLはFluAペプチドにも反応してgranzyme Bを分泌することが分かっている⁹⁾。

Rasmussen症候群では、先行感染症などを契機に活性化されたCTLが持続的に活性化して、中枢神経系でNMDA型GluR等を認識してgranzyme Bを分泌し続けることが病態の本質

国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター

〔〒420-8688 静岡市葵区漆山886〕

Yukitoshi Takahashi, Shigeko Nishimura, Emiko Takao, Risa Kasai, Kaoru Enokida, Yushi Inoue

National Epilepsy Center, Shizuoka Institute of Epilepsy and Neurological Disorders, NHO

〔886 Urushiyama, Aoi ward, Shizuoka, 420-8688, Japan〕

であるが、感染から自己免疫が持続活性化するメカニズムは複雑である。免疫調節遺伝子の *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4* (*CTLA4*) は CD152 (Cluster of differentiation 152) と呼ばれ、T細胞免疫を抑制的に制御する細胞表面蛋白として知られている。*CTLA4* 遺伝子 SNP (rs231775) が、転写・翻訳に影響し、CTLA4蛋白の細胞表面発現量を低下させ、T細胞免疫の抑制的制御が低下している可能性がある。exon 1 +49のSNP がA/AのT細胞とG/GのT細胞を比較すると、G/GではT細胞活性化刺激に対するCTLA4の増加反応が弱いという¹⁰⁾。このSNP (rs231775) があるとCTLA4活性が上昇しにくく、感染後のT細胞活性化状態が終息しないことにつながり得る。もうひとつ免疫調節遺伝子である *programmed cell-death 1* (*PDCDI*) は CD279 (Cluster of differentiation 279) と呼ばれ、T細胞免疫を抑制的に制御する細胞表面蛋白として知られている。*PDCDI* 遺伝子の exon5 の PD-1.9 SNP (rs2227982) が、細胞内情報伝達に影響し、同様にT細胞免疫の抑制的制御が低下する可能性があり、感染後のT細胞活性化状態が終息しないことにつながり得る。*PDCDI* の発現低下は実験自己免疫脳炎になりやすくなると報告されている¹¹⁾。*CTLA4* と *PDCDI* のアミノ酸置換を伴うSNP (rs231775, $p=0.0363$; rs2227982, $p=0.0145$) が、感染後の免疫反応を遷延させ、Rasmussen症候群発病に一部寄与している可能性を我々は報告した¹²⁾。

てんかん発病後に発作が難治に続く場合、これらのSNPマーカーの有無を知ることで、Rasmussen症候群への進展の可能性を予測し、可能性がある場合には髄液のgranzyme Bの測定、MRI検査の反復施行などで、早期に診断、免疫修飾治療を開始することが可能となる。我々はこれまでの症例の解析で、定期的IVIg治療の発作抑制効果 (50% responder rate=RR) は23%、認知機能温存効果 (IQが80以上に保てた割合=R80) は43%で、定期的メチルプレドニゾロンパルス治療のRRは81%、R80は50%、タクロリムスのRRは42%、R80は29%であることを明らかにした¹³⁾。てんかん発

病初期 (半球機能障害が明らかとなる前) に Rasmussen症候群を早期診断し、個々の患者に合った免疫調節治療を選択できるようにすることで、予後を改善したい。

【対象および方法】

1. *CTLA4* 遺伝子、*PDCDI* 遺伝子のSNP迅速測定法開発：

遺伝子配列直接解析でSNPの有無が判明している患者末梢血からMagNA Pure Compactを用いてゲノムDNAを抽出し、陽性及び陰性対照として、検出条件を検討した。

CTLA4 のSNP (rs231775) および *PDCDI* のSNP (rs2227982) 検出は、LightCycler[®] (ロシュダイアグノスティックス) による融解曲線分析にて行った¹⁴⁾。SNPの遺伝子情報から、LightCycler[®] を使用したSNP解析用のプライマー、3' 端をフルオレセインラベルしたセンサープローブおよび5' 端をLightCycler[®] Red (LC Red) ラベルして3' 端をリン酸化したアンカープローブを合成した。

2. 臨床要因と最終観察時予後の統計学的検討

Rasmussen症候群として当センターで加療されている症例、詳細な臨床情報とともに髄液などの検体を当センターに送付いただいた他院で加療中のRasmussen症候群症例、合計55例の中から、10歳未満の発病の小児例で、臨床情報が十分解析できる症例を30例選択した (Fig. 1)。

臨床要因 (発病年齢、EPC出現年齢、病変側、脳組織所見、rs231775、rs2227982、血清及び髄液granzyme B、MRI進行性萎縮、MRI高信号病変、持続鎮静治療の有無、IVIg治療の有無と短期効果、メチルプレドニゾロンパルス治療の有無と短期効果、タクロリムス治療の有無と短期効果、発病後経過年数) を独立変数として、最終観察時FSIQ、VIQ、PIQ、運動機能、発作頻度を目的変数として、重回帰分析をステップワイズ変数選択により行った。IVIg治療の有無は定期的に3回以上行った症例をありとし、メチルプレドニゾロンパルス治療の有無は、定期的に3か月以上行った症例をありとし、タクロ

Tentative or referral diagnosis of Rasmussen syndrome in 55 patients

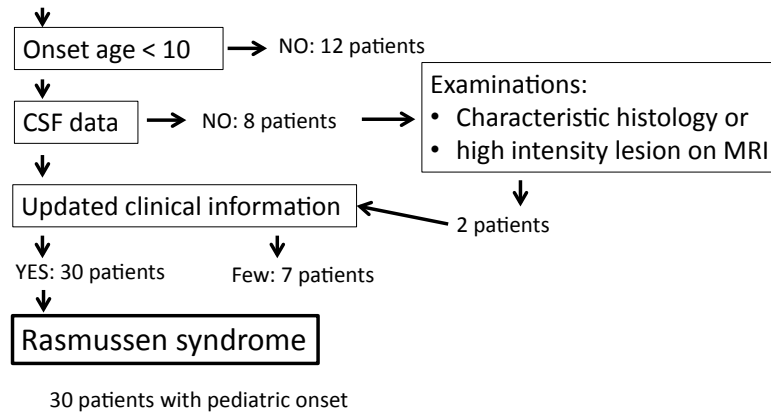


Fig. 1 Including criteria for outcome study

Tab. 1 てんかん発作・運動障害の評価スコア

後遺症	各スコアと状態									
てんかん発作	0	日単位：毎日発作がある	1	週単位：週に数回発作がある	2	月単位：月に数回発作がある	3	年単位：年に数回発作がある（数年にも一回も含める）	4	発作はない
運動障害	0	四肢麻痺	1	障害があるが自力移動可能（はいはい・伝い歩きなど）	2	支えなく歩行できるが走れない	3	運動障害はない		

リムス治療の有無は3か月以上継続して内服した症例をありとした。最終観察時の運動機能、発作頻度はTab. 1に示すスコアで評価した。

【結果】

1. CTLA4遺伝子のSNP迅速測定法開発：

遺伝子配列解析でCTLA4のSNP（rs231775）が判明している患者ゲノムDNAを用いて、LightCycler[®]の反応条件を検討し、正確に診断される条件を見出した。プライマー及びプローブはTab. 2に示すものを用い、試薬の量はTab. 3に示した。PCRおよび熱融解条件はTab. 4に示した条件で行った。融解曲線はrs231775がGGのSZ18症例は低温にピークが、rs231775がAAのSZ304は高温にピークが、AGのAZ402症例は二つのピークが検出された（Fig. 2）。

2. PDCD1遺伝子のSNP迅速測定法開発：

遺伝子配列解析でPDCD1のSNP（rs2227982）

が判明している患者ゲノムDNAを用いて、LightCycler[®]の反応条件を検討し、正確に診断される条件を見出した。プライマー及びプローブはTab. 2に示すものを用い、試薬の量はTab. 3に示した。PCRおよび熱融解条件はTab. 5に示した条件で行った。融解曲線はrs2227982がTTのSZ18症例は低温にピークが、rs231775がCCのSZ3は高温にピークが、CTのAZ402症例は二つのピークが検出された（Fig. 3）。

3. 臨床要因と最終観察時予後の統計学的検討：

臨床要因として、発病年齢、EPC出現年齢、病変側、脳組織所見、rs231775、rs2227982、血清及び髄液granzyme B、MRI進行性萎縮、MRI高信号病変、持続鎮静治療、IVI g 治療の有無と効果、メチルプレドニゾロンパルス治療の有無と効果、タクロリムス治療の有無と効果、発病後経過年数の18項目を独立変数とし

Tab. 2 *CTLA4*と*PDCDI*のSNP診断のためのプライマー、プローブ

SNP ID	配列 (5'→3')		アンプリコンサイズ
rs231775	Forward primer	GAACACCGCTCCCATAAAG	156 bp
	Reverse primer	CTTCATGCTCCAAAAGTCTCAC	
	Sensor Probe	TGGCTA CC AGGACCT-Fluorescein	
	Anchor Probe	LCRed640-GCCCTGCACTCTCCTGTTTTTTCTTCTCTTCATC-Phosphate	
rs2227982	Forward primer	GGGACAGCTCAGGGTAAG	290 bp
	Reverse primer	GGATGAGGTGCCCATTC	
	Sensor Probe	LC640-GCACG G CTGAGGG-Phosphate	
	Anchor Probe	GGAAATCCAGCTCCCCATAGTCCACAGAGAACAC-Fluorescein	

赤字: 遺伝子変異を示す。

Tab. 3 *CTLA4*と*PDCDI*のSNP診断のための反応試薬

rs231775	ストック濃度	添加量[μl]	終濃度
H2O		12.2	
MgCl2	25mM	0.8	2mM
Forward Primer	1 μM	1.0	0.05 μM
Reverse Primer	10 μM	1.0	0.5 μM
Sensor Probe	8 μM	1.0	0.4 μM
Anchor Probe	8 μM	1.0	0.4 μM
MMx	10×	2.0	1×
Template DNA		1.0	
rs2227982	ストック濃度	添加量[μl]	終濃度
H2O		10.4	
MgCl2	25mM	1.6	3mM
Forward Primer	10 μM	1.0	0.5 μM
Reverse Primer	1 μM	2.0	0.1 μM
Sensor Probe	4 μM	1.0	0.2 μM
Anchor Probe	4 μM	1.0	0.2 μM
MMx	10×	2.0	1×
Template DNA		1.0	

MMX, master mix,

て、最終観察時FSIQ, VIQ, PIQ, 運動機能、発作頻度を目的変数として、重回帰分析をステップワイズ変数選択により行ったが、有意な関連は見られなかった。そこで独立変数を発病年齢、病変側、rs231775, rs2227982, 髄液granzyme B, MRI進行性萎縮, IVIg治療、メ

チルブレドニゾロンパルス治療、タクロリムス治療の有無の9項目に絞り、最終観察時FSIQ, VIQ, PIQ, 運動機能、発作頻度を目的変数として、重回帰分析をステップワイズ変数選択により行ったところ、PIQは、発病年齢が高いほど高く (p=0.0319)、発作予後は、rs231775

Tab. 4 Rs231775 (CTLA4) のPCRおよび熱融解条件

解析モード	サイクル数	セグメント	温度	保持時間	蛍光取得
熱変性					
None	1	酵素活性化	95℃	10 分	None
増幅					
Quantification	45	熱変性	95℃	10 秒	None
		アニーリング & 伸長反応	50℃	30 秒	Single
融解曲線分析					
Melting Curves	1	熱変性	95℃	10 秒	None
		アニーリング	38℃	4 分	None
		メルティング	85℃	0 秒 Ramp rate= 0.1℃/秒	Continuous
冷却					
None	1	冷却	40℃	30 秒	None

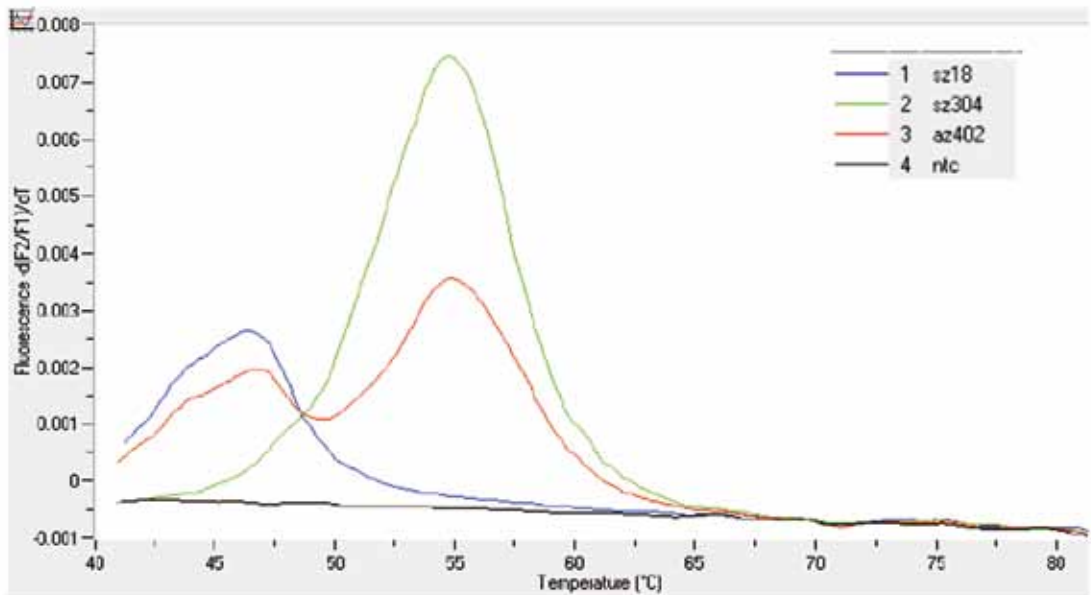


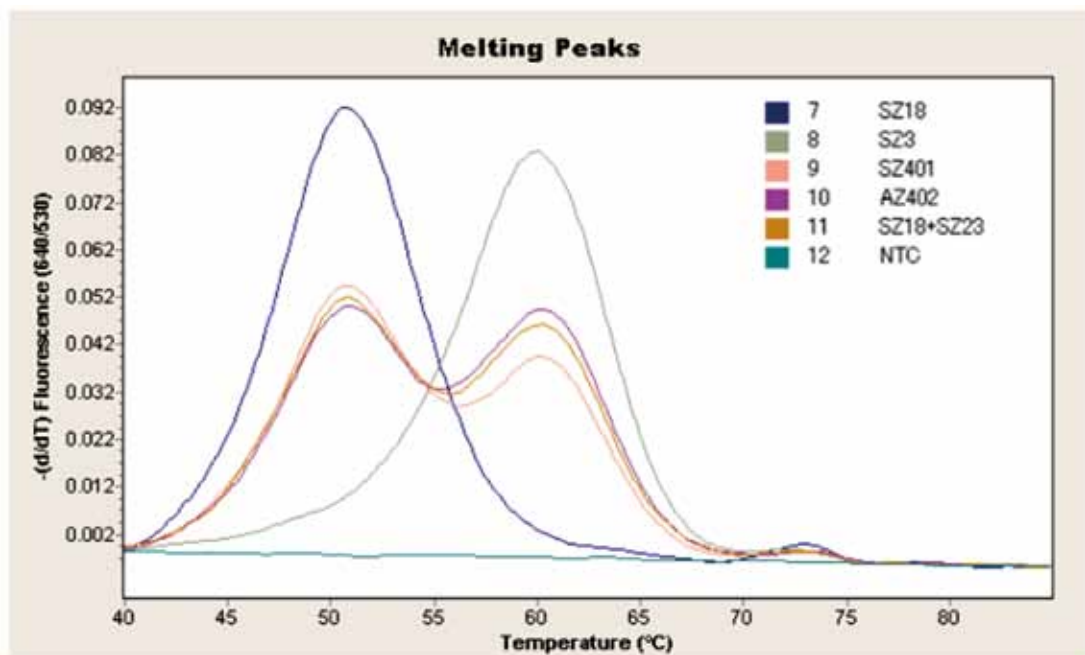
Fig. 2 Rs231775 (CTLA4) の熱融解曲線

($p=0.0230$), rs2227982 ($p=0.0074$) がある方が良く、髄液granzyme B濃度が高いほど不良であった ($p=0.0041$) (Tab. 6)。PIQは、メチルプレドニゾロンパルス治療例で良好 ($p=0.0232$) で、発作予後はタクロリムス治療

例で良好 ($p=0.0005$) であった。

【考察】

Rasmussen症候群ではCTLA4遺伝子SNP (rs231775) とPDCDI遺伝子SNP (rs2227982)

Fig. 3 Rs2227982 (*PDCD1*) の熱融解曲線Tab. 5 Rs2227982 (*PDCD1*) のPCRおよび熱融解条件

解析モード	サイクル数	セグメント	温度	保持時間	蛍光取得
熱変性					
None	1	酵素活性化	95℃	10 分	None
増幅					
Quantification	50	熱変性	95℃	10 秒	None
		アニーリング	62℃	15 秒	Single
		伸長反応	72℃	12 秒	None
融解曲線分析					
Melting Curves	1	熱変性	95℃	10 秒	None
		アニーリング	40℃	4 分	None
		メルティング	85℃	0 秒 Ramp rate= 0.05℃/秒	Continuous
冷却					
None	1	冷却	40℃	30 秒	None

が、疾患感受性の一部を規定している¹⁰⁾。我々の開発したLightCycler[®]を用いた*CTLA4*および*PDCD1*のこれらの遺伝子多型の迅速検出法は、採血から90分以内にSNPが検出可能で、外

来でも利用できる診断法となった。Rasmussen症候群のみならず、感染などを契機に発病した症例においても、てんかん発病早期にこれらの遺伝子多型の存在で免疫介在の可能性を診断

Tab. 6 臨床要因と最終観察時予後

	発病年齢	Rs 231775 (GG/AG)	Rs2227 982 (TT/CC)	Rs2227 982 (CT/CC)	Gr B in CSF	Pulse (+/-)	FK506 (+/-)
PIQ	t=2.43 P=0.0319				t=-1.68 P=0.1182	t=2.60 P=0.0232	
発作 予後		t=2.50 P=0.0230	t=3.04 P=0.0074	t=4.38 P=0.0004	t=-3.31 P=0.0041		t=4.32 P=0.0005

Gr B, granzyme B; Pulse, メチルプレドニゾロンパルス治療; FK506, タクロリムス治療

し、髄液や画像の検査を積極的に行い、関与が強く疑われる場合には早期に免疫修飾治療を試行することが可能となり、疾患予後の改善につながるとされる¹⁵⁾。Rasmussen症候群のCTLを主体とした免疫病態が解明される以前は、多くの症例が機能的半球切除術に至っていたが、最近では早期に免疫修飾治療を行うことが可能となり、機能的半球切除術に至る症例は少なくなり、認知運動機能的にも何とか認容できるレベルを維持できる症例が増えている。CTLA4およびPDCDIのこれらの遺伝子多型の迅速検出法の保険収載を目指し、データの蓄積を図っていきたい。

今回の臨床要因と予後との重回帰分析による検討では、CTLA4遺伝子SNP (rs231775) とPDCDI遺伝子SNP (rs2227982) が最終観察時の発作予後をむしろ改善することが明らかになった。今回の症例群ではこれらのSNPをもとに早期に免疫修飾治療を試行した症例はほとんどないと思われるので、これらのSNPが発病因子であっても予後悪化因子ではないことを示唆している。

定期的なメチルプレドニゾロンパルス治療は、最終観察時PIQを改善していることが重回帰分析で明らかになった。我々の短期の治療効果の解析でも、R80が50%、ARが10%と認知運動機能に良い効果をもたらしていた¹³⁾。今回、長期的に見た多変量による解析でも有効性が明らかになり、早期から行ってみるべき免疫修飾治療であると思われる。

タクロリムス治療は、最終観察時発作予後を改善していることが重回帰分析で明らかになっ

た。Bienらの報告¹⁶⁾では発作には無効で、我々の短期の治療効果の解析ではRRが42%とさほど良い成績ではなかったが¹³⁾、今回、長期的に見た多変量による解析で有効性が明らかになり、有益な免疫修飾治療であると思われる。

IVIg治療については今回の臨床要因と長期予後との重回帰分析による検討では明らかな効果は見いだせなかった。我々の短期の治療効果の解析でも、R80が43%、ARが62%と認知運動機能における効果は他の免疫修飾治療に比べてやや劣るものであった¹³⁾。今後症例数を増やし、治療のタイミングなどの問題も含めた多変量解析が必要である。

今回の臨床要因と長期予後との重回帰分析による検討では、髄液中のgranzyme B濃度が強く発作予後に影響していた。髄液granzyme B濃度が高い症例では、より積極的な長期にわたる免疫修飾治療を検討する必要があるのかもしれない。また、髄液granzyme B濃度は治療効果評価指標として使える可能性がある。今後症例数を増やした検討が必要である。

今回の臨床要因と長期予後との関連に関する重回帰分析では、発病年齢が若いとPIQが悪くなることが明らかになり、幼弱発病例では先述の髄液granzyme B濃度などを指標にした慎重かつ積極的な免疫修飾治療を検討する必要があるのかもしれない。

【文献】

- 1) Rasmussen T, Olszewski J, Lloyd-Smith D. Focal seizures due to chronic localized encephalitis. *Neurology* 1958 ; 8 : 435-445.

- 2) Bien CG, Granata T, Antozzi C, et al., Pathogenesis, diagnosis and treatment of Rasmussen encephalitis: A European consensus statement. *Brain* 2005 ; **128** : 454-471.
- 3) 高橋幸利, 久保田裕子, 山崎悦子, 松田一己, ラスムッセン脳炎と非ヘルペス性急性辺縁系脳炎, *臨床神経学*, 2008 ; **48** : 163-172.
- 4) 高橋幸利, 植田佑樹, 保立麻美子, 山口解冬, 那須裕郷, 高山留美子, Rasmussen症候群, *小児内科*, 2013 ; **45**(2) : 416-421.
- 5) 高橋幸利, 木水友一, 小池敬義, 堀野朝子, 中川直子, 増刊号: 免疫性神経疾患-基礎・臨床研究の最新知見-Rasmussen症候群(脳炎), *日本臨床*, 2015 ; **73** (増刊号7) 619-625.
- 6) Rogers SW, et al: Autoantibodies to Glutamate receptor GluR3 in Rasmussen's encephalitis. *Science* 1994 ; **265** : 648-651.
- 7) Bien, C.G., Bauer, J., Deckwerth, T.L., Wiendl, H., Deckert, M., Wiestler, O.D., Schramm, J., Elger, C.E., Lassmann, H., Destruction of neurons by cytotoxic T cells: a new pathogenic mechanism in Rasmussen's syndrome. *Ann. Neurol.* 2002 ; **51** : 311-318.
- 8) Takahashi Y, Mine J, Kubota Y, Yamazaki E, Fujiwara T. A substantial number of Rasmussen syndrome patients have increased IgG, CD4+Tcells, TNF α , and granzyme B in CSF. *Epilepsia* 2009 ; **50** : 1419-31.
- 9) 高橋幸利, Meilia M. Suriadi, 西村成子, 角替央野, 高尾恵美子, 最上友紀子, 高山留美子, 美根潤, 池上真理子, 向田壮一, 大谷早苗, 久保田裕子, 大谷英之, 池田浩子, 今井克美, 松田一己, 山崎悦子, 小出泰道, 藤原建樹, 井上有史, 渡辺宏雄, 今村淳. 「てんかんの新たな免疫学的治療法の開発に関する研究」: Rasmussen症候群のペプチド療法開発のための研究, 平成19-21年度厚生省精神・神経疾患研究委託費19指-6 てんかんに対する新たな治療法開発と標準化に関する研究, 総合研究報告書, p 57-79, 2010年4月発行.
- 10) Mäurer M, Loserth S, Kolb-Mäurer A, Ponath A, Wiese S, Kruse N, Rieckmann P., A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (*CTLA4*) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. *Immunogenetics* 2002 ; **54** : 1-8.
- 11) Wang C, Li Y, Proctor TM, Vandenbark AA, Offner H., Down-Modulation of Programmed Death 1 Alters Regulatory T Cells and Promotes Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, *J Neurosci Res.* 2010 ; **88** (1) : 7-15.
- 12) Yukitoshi Takahashi, Yukiko Mogami, June Mine, Katsumi Imai, Yasumichi Koide, Kazumi Matsuda, Noriyuki Akasaka, Takashi Konishi, Atsushi Imamura, Yushi Inoue, Genetic variations of immunoregulatory genes associated with Rasmussen syndrome. *Epilepsy Research*, 2013 ; **107** : 238-243.
- 13) Yukitoshi Takahashi, Etsuko Yamasaki, Jun Mine, Yuko Kubota, Katsumi Imai, Yuki Mogami, Koichi Baba, Kazumi Matsuda, Hirokazu Oguni, Kenji Sugai, Yoko Ohtsuka, Tateki Fujiwara, Yushi Inoue, Immunomodulatory therapy versus surgery for Rasmussen syndrome in early childhood, *Brain & Development*, 2013 ; **35** : 778-785.
- 14) Lohmann S., Lehmann L., Tabiti K. Fast and Flexible Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection with the LightCycler System, *BIOCHEMICA* 2000 ; No. 4 : 23-28.
- 15) 高橋幸利, 特別企画シリーズ: てんかんを分かり易く理解するための神経科学, 6: 免疫, てんかん研究, 2016 ; **33** : 683-687.
- 16) Bien CG, Gleissner U, Sassen R, Widman G, Urbach H, Elger CE., An open study of tacrolimus therapy in Rasmussen encephalitis, *Neurol* 2004 ; **62** : 2106-2109.

Summary

Studies for early diagnosis & rationale selection of effective immunomodulatory therapy in Rasmussen syndrome

Yukitoshi Takahashi, Shigeko Nishimura, Emiko Takao, Risa Kasai, Kaoru Enokida, Yushi Inoue

We developed rapid diagnosis system using Lightcycler® for *CTLA4*-SNP (rs231775) and *PDCD-1*-SNP (rs2227982) with amino acid replacement in exons, which were reported as predispositional factors for the onset of Rasmussen syndrome.

We evaluated relationship between clinical factors (age at onset, side of involvement, rs231775, rs2227982, granzyme B levels in CSF, progressive atrophy in MRI findings, intravenous immunoglobulin therapy, methyl prednisolone pulse therapy, tacrolimus therapy) and the outcome at the last observation by multiple linear regression analysis. Performance intelligent quotient (PIQ) correlated positively with age at onset ($p=0.0319$). Seizure outcome was better in patients with rs231775 ($p=0.0230$) and rs2227982 ($p=0.0074$), and correlated negatively with granzyme B levels in CSF ($p=0.0041$). PIQ was better in patients with methyl prednisolone pulse therapy ($p=0.0232$), and seizure outcome was better in patients with tacrolimus therapy ($p=0.0005$).

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2016 ; 27 : 47-56

