

—— 研究助成報告 ——

Dravet症候群における免疫学的反応の解析

倉 橋 宏 和

要旨：Dravet症候群は約8割の症例でSCN1A遺伝子変異が同定される，イオンチャネル異常が原因の疾患である。しかしながら，発熱時のてんかん重積が頻発し急性脳症の発症もみられることから，その病態に免疫・炎症が関与している可能性もあると考え，血中サイトカイン測定を行った。SCN1A変異群30例の平熱時検体では対照6例と比べて，TNF， $\text{IFN}\gamma$ ，IL-4が有意に高かった。IL-1 β ，IL-6，IL-17，IL-22，RANTES，MCP-1，IL-1RA，IL-10については有意差を認めなかった。通常， $\text{IFN}\gamma$ とIL-4はその産生細胞であるTh1とTh2が相互に抑制するため，ともに上昇することは考えにくい。両者の上昇には，Th1/Th2ではなく自然免疫リンパ球類似細胞やNKT細胞が関与しているのかもしれない。今回の結果は，Dravet症候群の免疫学的な特徴を示している可能性があると考えられた。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2018；29：89-96

Key Words：難治性てんかん，熱性けいれん，自然免疫，炎症性サイトカイン，ILC

【序論】

近年，てんかんと炎症との関連が注目されつつある¹⁻³⁾。動物実験では，てんかん発作後に脳内でIL-1 β ，IL-6，TNF α ，HMGB1等の液性因子が上昇することが観察されている。また，発作間欠期にも慢性的に，これらの分子に加え，COX2やプロスタグランジンなど，炎症性メディエーターの上昇が報告されている。ヒトにおいては，限局性皮質異形成によるてんかんや側頭葉てんかん，結節性硬化症（TSC）で，IL-1 β やHMGB1が脳内に存在することが報告されている³⁾。また，てんかん重積後に血液脳関門のアルブミン透過性が亢進するとの動物を用いた研究もある⁴⁾。

しかし，ヒトにおける報告は切除標本を用いたものがほとんどであり，患者の脳内の炎症性分子を測定することは困難である。そのため，末梢血のバイオマーカーとしての炎症性分子に着目した研究も進められつつある。例えば，TSCに対する前向き研究（EPISTOP）では，これらのバイオマーカーについても解析が進め

られている³⁾。また当然のことながら，てんかんだけでなく熱性けいれんおよび急性脳症についても研究が行なわれている。急性脳症では，熱性けいれんが遷延したのち24時間以内に意識状態が回復した症例と比べ，髄液IL-6が高値であったと報告されている⁵⁾。

Dravet症候群は発熱感受性が高く，しばしば発熱に伴って重積発作を起こすことが特徴である。さらに，Dravet症候群では発熱に伴って急性脳症を起こすことが稀でなく，死亡や重度後障害の原因になっている。Dravet症候群の約8割はSCN1A遺伝子変異を持っていることが知られている。SCN1Aは電位依存性Na⁺チャネルのサブユニットをコードする遺伝子で，前頭前野をはじめとする中枢神経系に発現し，リンパ球など炎症に関連する細胞での発現は乏しい。そのため，炎症との直接の関連は不明であるが，近年の研究ではDravet症候群のない急性脳症の患児でも，SCN1A遺伝子変異を持つ症例が報告されている⁶⁾。これらの知見は，SCN1A遺伝子変異は急性脳症のリスク因子である可能性を強く示唆する。

急性脳症は発熱後1~2日以内に発症する。このことは、自然免疫を主体とする急性期の免疫反応や炎症が急性脳症発症に深くかかわっていることを示唆し、Dravet症候群も例外ではないと考えられる。しかし、現在までDravet症候群の免疫学的研究はほとんど行われていない。

また、薬剤抵抗性のてんかんでは、平熱時においても血液中および中枢神経組織にてHMGB1が高値であることが示されている⁷⁾。HMGB1は通常は細胞の核内に存在するが、細胞障害などにより細胞外に漏出し、自然免疫による炎症を惹起する。これらのことから、難治性てんかんでは平熱時においても免疫・炎症状態に特徴がある可能性が考えられる。

本研究の仮説は、①SCN1A変異をもつDravet症候群は、発熱に伴う免疫応答に特徴があるのではないか、②てんかんが難治に経過することから、平熱時においても、免疫状態に特徴があるのではないか、の2点である。そのため、平熱時および発熱時の検体を対象に研究を施行した。Dravet症候群における免疫学的特徴についての知見を得ることは、てんかんの難治化や急性脳症の病態解明につながり、診断法や治療法の開発に有用と考えられる。

【方法】

1. 対象および比較対照

愛知医科大学病院および共同研究施設で診療されているDravet症候群の患者のうち、SCN1A変異が同定されているものを対象とした（SCN1A変異群）。また、共同研究施設である福岡大学医学部小児科研究室で遺伝子解析を行われたDravet症候群、または低年齢のため症状が揃わないものの臨床経過からDravet症候群が強く疑われた症例のうちSCN1A変異が同定された既存検体も対象とした。平熱時の対照は、てんかん以外の患者でかつ炎症性腸疾患や膠原病など炎症の関与する疾患に罹患していない症例を、発熱時の対照は、熱性けいれんで受診した症例とした。患者を対象とした解析については愛知医科大学小児科を主研究施設とし、福岡大学の既存検体解析については福岡大

学医学部小児科を主研究施設として、それぞれについて、愛知医科大学および福岡大学の倫理委員会の承認を得て研究を実施した。対象・対照ともに、文書によるインフォームドコンセントを得た。

2. 平熱時および発熱時の炎症・免疫学的反応の解析

対象および比較対照の血清または血漿を用いて以下の解析を行った。検体採取のタイミングは、①平熱時、②発熱時（発熱当日が望ましい）とし、③急性脳症を発症した場合にも解析を予定した。以下の液性因子をAimplex[®] Multiplex Immunoassayを用いて測定した。

- ①Pro-inflammatory cytokineおよびchemokine : IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17, IL-22, IFN γ , TNF, MCP-1, RANTES
- ②Anti-inflammatory cytokine : IL-1RA, IL-10
- ③その他 : IL-2

IL-2はT細胞への分化・増殖を制御するサイトカインで、pro-inflammatory, anti-inflammatoryへの分類が難しいため、その他とした。

サイトカインおよびケモカイン値を対象・正常対照の二群間で比較する際の統計学的解析については、Mann-Whitney U検定を用いた。

【結果】

SCN1A変異群の平熱時検体数は30例で、採血時年齢は4か月~19歳（中央値1歳3か月）、男12例、女18例であった。SCN1A変異の内訳はナンセンス変異7、ミスセンス変異12、フレームシフト変異8、フレームシフトのない微笑欠失1、スプライシング異常2であった。正常対照は6例で、採血時年齢は7か月~12歳（中央値5歳）、男4例、女2例であった。有意差はないものの、SCN1A変異群の方が正常対照に比べ低年齢である傾向があった。使用されている抗てんかん薬は、VPAが27例、CLBが18例、LEVが6例、ZNSが4例、KBrおよびTPMがそれぞれ3例、CBZが2例、AZM, LTG, PB, STPがそれぞれ1例であった。投与中の抗てんかん薬数は1剤が6例、2剤が14例、3剤が8例、4剤と5剤がそれぞれ1例であった。

Tab. 1 サイトカイン・ケモカイン測定結果

平熱時解析					発熱時解析	
	SCN1A変異群 (n=30)	対照 (n=6)	P値		SCN1A変異群 (n=1)	対照 (n=3)
Proinflammatory cytokines/chemo- kines	IL-1 β	2.5 - 8.8 (6.4)	5.3 - 6.6 (5.9)	0.13	4.4	5.9 - 21.9 (6.7)
	IL-4	0.2 - 13.5 (4.1)	0.3 - 5.9 (0.6)	0.026	0.1	0.4 - 0.9 (0.6)
	IL-6	1.5 - 27.4 (1.5)	3.6 - 11.1 (8.2)	0.27	104.3	31.1 - 229.9 (37.9)
	IL-17A	0.8 - 11.9 (2.9)	1.2 - 14.0 (1.8)	0.33	1.1	1.3 - 2.4 (2.3)
	IL-22	1.1 - 3.5 (2.1)	2.0 - 5.6 (2.6)	0.27	2.0	2.1 - 2.5 (2.1)
	IFN γ	0 - 5.3 (1.6)	0.3 - 0.6 (0.5)	0.0042	0.5	0.3 - 4.2 (1.2)
	TNF	0.3 - 5.4 (1.4)	0.3 - 1.0 (0.6)	0.0085	0.3	0.6 - 1.0 (1.0)
	MCP1	5.4 - 33.6 (12.5)	12.1 - 52.7 (15.4)	0.20	519.9	26.0 - 33.6 (30.8)
	RANTES	404 - 2567 (1381)	770 - 1496 (1238)	0.16	1127	615 - 1058 (1058)
Anti- inflammatory cytokines	IL-1RA	0.1 - 45.7 (5.7)	0.8 - 16.6 (3.1)	0.56	35.2	11.2 - 18.5 (13.7)
	IL-10	0 - 6.9 (1.7)	0.3 - 8.6 (0.7)	0.11	9.4	2.8 - 16.6 (10.0)
	IL-2	1.1 - 50.0 (7.5)	2.8 - 43.0 (5.7)	0.38	13.5	3.0 - 61.4 (6.5)

(値は範囲(中央値). 単位はpg/ml)

SCN1A変異群の発熱時の検体は、今回は1例のみ収集できた。症例は13歳の女児で、すでに急性脳症の既往があり、後障害として座位不能、簡単な言語理解はあるが発語のない状態の児である。おそらくウイルス感染に伴う発熱当日の採血で、発熱中にてんかん発作を認めなかった。発熱時検体の対照は3例で、年齢は1歳3か月～3歳（中央値1歳5か月）、全例女児であった。

平熱時解析

Proinflammatory cytokine/chemokineのうち、IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-22, RANTES, MCP-1については、二群間で有意差を認めなかったが、TNF, IFN γ , IL-4はSCN1A変異群で有意に高かった (Tab. 1)。これらについては発熱時解析の対照である熱性けいれん検体と比較しても高い傾向を示した (Fig. 1)。

Anti-inflammatory cytokineのIL-1RA, IL-10では、両者ともにSCN1A変異群の方が高い傾向があったものの、二群間で有意差を認めなかった。IL-2についても二群間で有意差を認め

なかった。

SCN1A変異群におけるIFN γ とIL-4の相関について検討すると、IFN γ が高値な症例はIL-4も高値であった (Fig. 2)。抑制性サイトカインとの相関については、IFN γ , IL-4が高値な症例はIL-10も高値であった。IL-1RAについては特に相関を認めなかった。

IFN γ およびIL-4が特に高値であった5例の内服薬は、VPA 5例、CLB 3例、ZNSとKBrがそれぞれ1例で、投与中の抗てんかん薬数は、1剤が1例、2剤が3例、3剤が1例と、残りの症例と明らかな違いはなかった。

SCN1A変異群で高値であったTNF, IFN γ , IL-4について、年齢による値の違いを検討した (Fig. 3)。正常対照では低年齢であってもこれらの値は低かった。また一方で、SCN1A変異群においても、高年齢ではこれらの値は低かった。これらのサイトカインが高いのはSCN1A変異群かつ5歳以下の症例であった。

発熱時解析

今回、発熱時検体が得られた症例は、急性脳

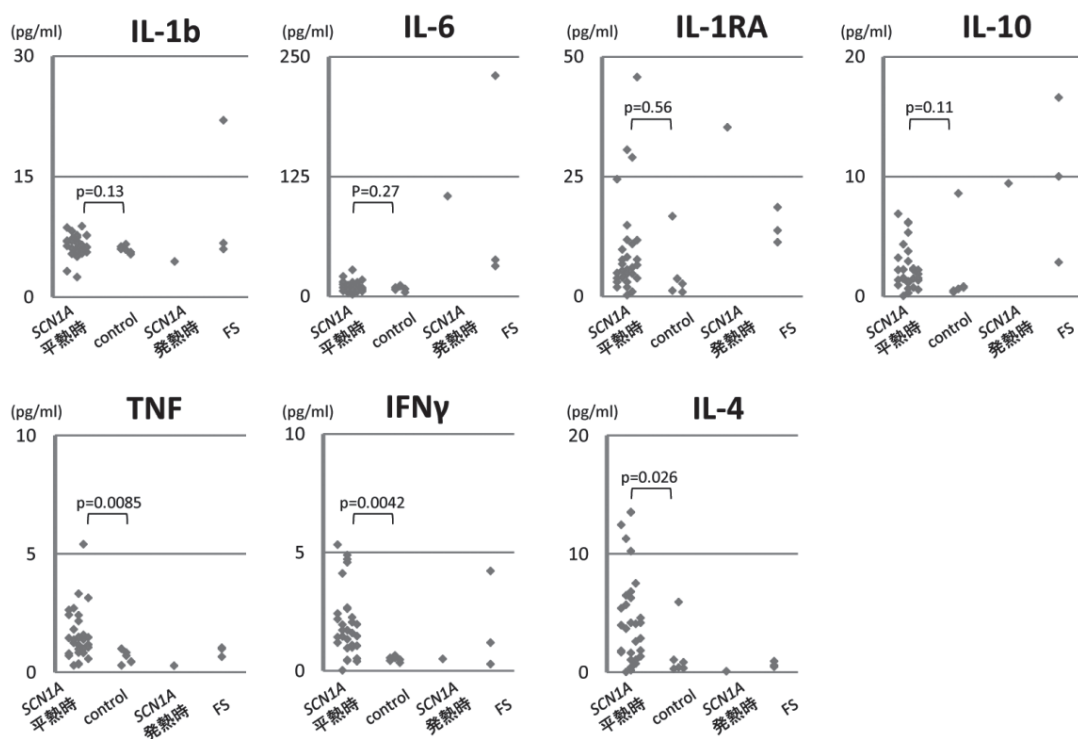
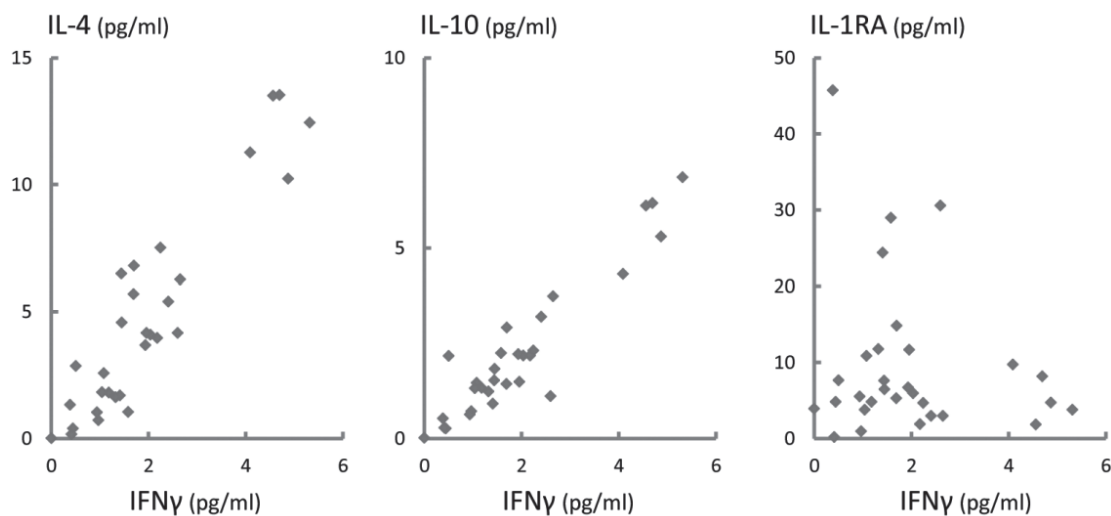


Fig. 1 各群のサイトカイン値の比較

Fig. 2 IFN γ と他のサイトカインとの相関

症後遺障害のある13歳女児である。てんかん発作自体はほとんど消失しており発熱時にも発作を認めなかったため、本研究の目的である発熱時けいれん重積や急性脳症への免疫学的反応の

関与を検討するには不適と考えられた。発熱時については十分な検体が収集できず、評価を控えるべきであると考えた。

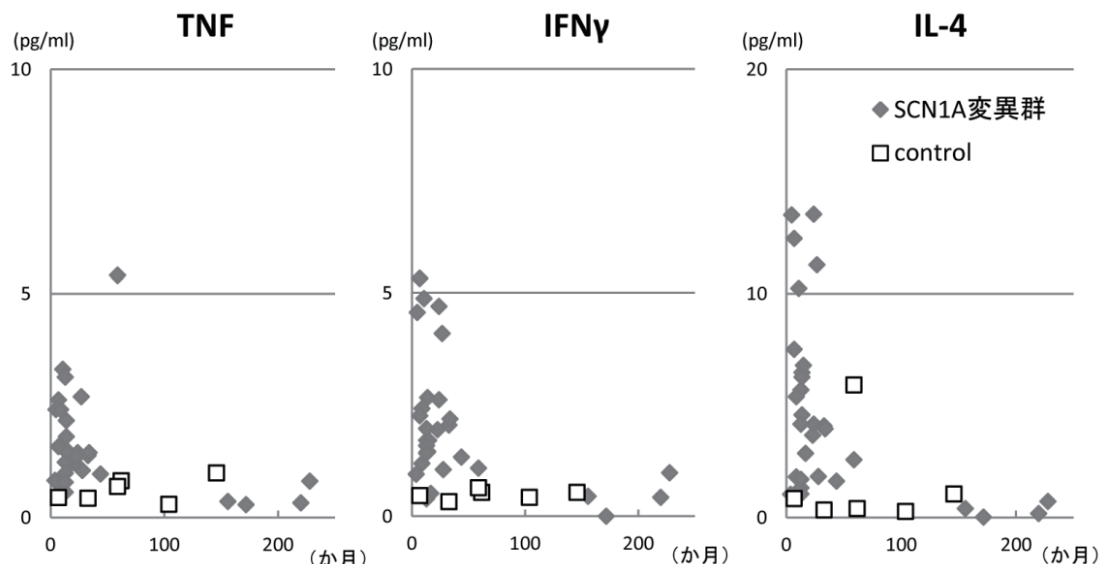


Fig. 3 サイトカイン値の月齢による分布

【考察】

今回我々は、SCN1A変異を持つDravet症候群では平熱時・発熱時ともに免疫状態に特徴がある可能性を想定して解析を行った。発熱時解析については十分な検体が収集できず評価が難しかったが、平熱時検体は30例について解析することができた。

IL-1 β , IL-6については、SCN1A変異群と正常対照とで有意差を認めなかった。IL-1 β はマクロファージや樹状細胞で、IL-6はマクロファージ、内皮細胞、T細胞で主に産生され、炎症を促進する方向に作用する。自然免疫・獲得免疫のどちらにも関与する因子である。特にIL-6は、SCN1A変異群の発熱時検体でも発熱時対照の熱性けいれんでも高値を示していたが、SCN1A変異群の平熱時検体では上昇を認めなかった。これらのサイトカインについては、平熱時におけるSCN1A変異群の免疫状態への関与は少ないと考えられた。

IL-17, IL-22はTh17と関連するサイトカインである。Th17は炎症反応を促進する作用をもつT細胞で、IL-17を分泌して単球系細胞や好中球に作用し、これらの細胞群からIL-1, IL-6, TGF β など炎症性サイトカインの産生を誘導す

る。両サイトカインの上昇を認めないことから、SCN1A変異群においてTh17を介した免疫反応が平熱時に亢進している可能性は低いと考えられた。

今回の解析では、TNF, IFN γ , IL-4が平熱時においてSCN1A変異群で高値であった。後述するように、獲得免疫で働くTh細胞由来の反応としては、IFN γ , IL-4が同時に上昇する状態は起こりにくい。両者が上昇している状態は獲得免疫からでは整合性のある説明は難しく、非常に特殊な状態であると考えられる。

自然免疫においては、細菌・ウイルスなど由来の病原体関連パターンや、傷害された自己細胞由来のDNAやATP、核内タンパク質(HMGB1など)といった傷害関連分子パターンが刺激となる。これらが食細胞のパターン認識レセプターと結合すると、TNFなどのサイトカインが産生される。SCN1A変異群でのTNF高値は、平熱時においても慢性的にマクロファージに何らかの刺激が入力されていることを反映しているのかもしれない。

獲得免疫においては、樹状細胞が提示した抗原と結合するナイーブT細胞がさまざまに分化・増殖して免疫応答が起きる。そのなかで、IFN γ は主にTh1細胞で産生され、IL-4はTh2細胞

胞で産生される。主に細菌や細胞内寄生ウイルスを標的とする免疫応答ではTh1細胞優位な状態となり、産生されたIFN γ はさらにTh1への分化・増殖を誘導する。対して、主に寄生虫を標的とする免疫応答ではTh2細胞優位となり、IL-4はさらにTh2への分化・増殖を誘導する。Th1とTh2は相互に抑制しあうため、どちらか一方による免疫反応が優位な状態となる。今回上昇が確認されたIFN γ とIL-4がTh1, Th2由来とすると、何らかの抗原により、Th1とTh2への分化・増殖が同時に起こっていることになるが、そのような状態は起こりにくいと考えられる。

どのような病態でIFN γ とIL-4が同時に上昇しているかは不明であるが、ひとつの可能性として、自然免疫に属するリンパ球類似細胞Innate lymphoid cells (ILC) の関与があるのかもしれない⁸⁾。ILCは抗原刺激によらず、サイトカインに直接反応して免疫応答する細胞である。獲得免疫におけるTh1, Th2, Th17と類似的作用をもつILCが報告されている。ILC1はTh1類似的作用をもち、IFN γ を産生する。ILC2はTh2類似的作用をもち、IL-4を産生するといわれている。自然免疫に関与するこれらの細胞が、IFN γ , IL-4の上昇に関与しているのかもしれない。また、Natural killer T (NKT) 細胞の関与も考えられる。NKT細胞はリガンドによる刺激を受けると、IFN γ とIL-4の両者を産生する⁹⁾。SCN1A変異群では、何らかの刺激によりNKT細胞が活性化された状態になりやすいのかもしれない。

SCN1A変異群ではTNF, IFN γ , IL-4が有意に高値であったが、SCN1A変異群の方が正常対照よりも低年齢の傾向があったことから、月齢の影響を検討した (Fig. 3)。その結果、正常対照では低年齢であってもこれらの値が高い傾向はなく、SCN1A変異群の特に5歳以下において、高値であるという特徴が浮かび上がった。この年齢は発熱時けいれん重積や急性脳症を起こしやすい時期と重なる。TNF, IFN γ , IL-4が上昇している免疫状態が、これらの症状と関連しているのかもしれない。

今後も継続して、SCN1A変異を持つDravet

症候群の免疫状態にの解明に取り組む必要がある。今回の解析では、平熱時解析は各症例単回である。複数回の平熱時解析を行うことで、平熱時のサイトカインプロファイルの特徴に再現性があるかを確認したい。また、自然免疫を刺激する物質 (傷害関連分子パターン) を解析することも病態解明に役立つと考えられる。特に、HMGB1は臓器不全やショックとの関連だけでなく、薬剤抵抗性のあるてんかん症例で血中においても持続的に高値であったと報告されており⁷⁾、難治てんかんを呈するDravet症候群においても同様の傾向がある可能性がある。さらに、今回十分に行なえなかった発熱時検体についても収集を行い、発熱時免疫反応の解析を行いたい。特に、発熱に伴うけいれん重積時や、急性脳症発症時にどのような特徴があるかを解明することは、治療法の開発につながる可能性があると考えられる。

【文献】

- 1) Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol* 2011; **7**: 31-40.
- 2) Auvin S, Walker L, Gallentine W, Jozwiak S, Tombini M, Sills GJ. Prospective clinical trials to investigate clinical and molecular biomarkers. *Epilepsia* 2017; **58** suppl 3: 20-26.
- 3) Bauer J, Becker AJ, Elyaman W, Peltola J, Rüegg S, Titulaer MJ, et al. Innate and adaptive immunity in human epilepsies. *Epilepsia* 2017; **58** suppl 3: 57-68.
- 4) van Vliet EA, da Costa Araújo S, Redeker S, van Schaik R, Aronica E, Gorter JA. *Brain* 2007; **130**: 521-534.
- 5) Ichiyama T, Suenaga N, Kajimoto M, Tohyama J, Isumi H, Kubota M, et al. Serum and CSF levels of cytokines in acute encephalopathy following prolonged febrile seizures. *Brain Dev* 2008; **30**: 47-52.
- 6) Saitoh M, Ishii A, Ihara Y, Hoshino A, Terashima H, Kubota M, et al. Missense mutations in sodium channel SCN1A and SCN2A predispose children to encephalopathy

- with severe febrile seizures. *Epilepsy Res* 2015 ; **117** : 1-6.
- 7) Walker LE1, Frigerio F2, Ravizza T2, Ricci E1, Tse K1, Jenkins RE, et al. Molecular isoforms of high-mobility group box 1 are mechanistic biomarkers for epilepsy. *J Clin Invest* 2017 ; **127** : 2118-2132.
- 8) Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 2015 ; **517** : 293-301.
- 9) Habu Y, Uchida T, Inui T, Nakasawa H, Fukasawa M, Seki S. Enhancement of the synthetic ligand-mediated function of liver NK1.1 Ag+ T cells in mice by interleukin-12 pretreatment. *Immunology* 2004 ; **113** : 35-43.

