

—— 研究助成報告 ——

自己免疫性てんかんの病態マーカーの探索と 難治性てんかに潜む自己免疫性てんかんの同定

錦 織 隆 成

要旨：我々は、自己免疫性てんかんを診断するための免疫学的指標の確立を目指している。研究1で、まず扁桃体腫大を伴う側頭葉てんかん患者とLGI-1 抗体陽性の自己免疫性てんかん患者において末梢血リンパ球を解析した。CD4陽性T細胞における活性化マーカーCD25およびCD69の発現上昇、濾胞性T細胞（Tfh）のTh2型細胞（Tfh2）へのシフト、という共通のリンパ球偏移があることを見出した。続いて研究2で、Diagnostic criteria for possible autoimmune encephalitis¹⁾を満たす側頭葉てんかん患者に対象を拡大し解析を行った。同患者群では、制御性T細胞の頻度が低下し、Tfh2シフトの傾向を認めた。本研究により、これまで診断が困難であった自己免疫性てんかん患者群を同定し、より適切な治療介入に寄与することが期待される。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2021；32：115-120

Key Words：自己免疫性てんかん, 自己免疫性脳炎, LGI-1抗体, 扁桃体腫大, 濾胞性T細胞, 制御性T細胞

■序論

自己免疫性脳炎は、精神症状、意識障害、痙攣発作といった広範な症状を来し、leucine-rich glioma inactivated 1 (LGI-1) や N-methyl-D-aspartate receptor などの中枢神経系に対する自己抗体を生じる¹⁾。自己免疫性てんかんは自己免疫性脳炎の不全型とも考えられており、てんかんが前傾にたち、自己免疫性脳炎に関連する抗体が陽性となり、内側側頭葉を中心にMRIやPETでの異常所見や髄液の異常所見を伴うことが多い。抗てんかん薬に加えて、自己免疫性脳炎に準じた免疫治療が行われる。また既知の抗神経抗体が陰性ながら、同様の臨床症状や検査異常を伴い、免疫治療に反応する症例も存在するが^{2, 3)}、抗神経抗体以外の免疫学的指標はまだない。

この問題を解決するために、我々はまず、“研究1”で、抗神経抗体陰性で扁桃体腫大を伴う側頭葉てんかんをMRI画像によるVolumetry

を用いて診断し、既知抗体陽性の自己免疫性てんかんと、扁桃体腫大を伴う側頭葉てんかに共通する免疫学的異常を探索した。ここで得られた知見をベースに、“研究2”で研究対象を“臨床的に自己免疫性てんかンを疑う症例”に広げ、既知の自己抗体陰性の自己免疫性てんかんを診断するための免疫学的指標の確立を目指した。

■研究1

【方法】

Freesurfer (version 5.3) を用いて、健常人と側頭葉てんかん患者の頭部単純MRI画像で扁桃体のVolumetryを行った。扁桃体体積/全脳体積比とLaterality index = (右扁桃体体積 - 左扁桃体体積) / (右扁桃体体積 + 左扁桃体体積) を算出し、これらの値のいずれかが健常人の+2SD以上で、かつ既知の抗神経抗体は陰性の側頭葉てんかんを、扁桃体腫大を

伴う側頭葉てんかん (Temporal lobe epilepsy with Amygdala enlargement; TLE-AmyE) と診断した。LGI-1抗体陽性の自己免疫性てんかん (LGI-1てんかん), GAD抗体陽性の自己免疫性てんかん (GADてんかん), 健常群 (HS) の各群を設定した。また, 既報告にある自己免疫性脳炎および自己免疫性てんかん患者の以下の臨床的特徴; 急性から亜急性発症, 多様なてんかん発作型, AED抵抗性, 自己免疫疾患の既往歴と家族歴, 先行感染, CSFやPETに基づく中枢神経系の炎症所見, 内側側頭葉のT2強調像高信号域, 海馬硬化, 60歳以降発症, を一つも有さない部分てんかん群をてんかんコントロール群 (Non-autoimmune focal epilepsy; NAFE) に設定した^{1, 3, 4)}。フローサイトメトリを用いて, LGI-1てんかん, GADてんかん, TLE-AmyE, HS, NAFEの末梢血中のT細胞サブセットや活性化マーカーを解析し, 自己免疫性てんかんに共通する免疫学的異常を探索した。

【結果】

TLE-AmyE 16例, LGI-1てんかん 8例, GADてんかん 6例, HS 15例, NAFE 10例を解析した。LGI-1てんかんとTLE-AmyEでは, HSおよびNAFEに比べて, 末梢血CD4陽性T細胞 (CD4⁺ T) 中のCD25⁺Foxp3⁻細胞の頻度が上昇し, CD69⁺細胞の頻度も高い傾向にあった。CD4⁺ T中のCD25⁺Foxp3⁺ T細胞 (制御性T細胞) の頻度に明らかな差を認めなかった。

またLGI-1てんかんとTLE-AmyEではCD45RA⁻ CD4⁺ T細胞 (memory CD4⁺ T) 中のCCR4⁺ CXCR3⁻ Th2細胞の頻度が高い傾向にあり, CCR4⁻ CXCR3⁺ Th1細胞の頻度が低く, Th2/Th1比が上昇していた。CD4⁺ T中のCXCR5⁺ CD4⁺ T細胞 (circulating follicular helper T; cTfh) の頻度は各群で差を認めなかった。LGI-1てんかんとTLE-AmyEではHSおよびNAFEに比べて, cTfh中のCCR4⁺ CXCR3⁻ CXCR5⁺ cTfh2細胞の頻度が高い傾向にあり, CCR4⁻ CXCR3⁺ CXCR5⁺ cTfh1細胞の頻度が低く, cTfh2/cTfh1比が上昇していた。cTfh中のCCR4⁺ CCR6⁺ CXCR5⁺ cTfh17の頻度は明らかな差を認めなかった。

【考察】

LGI-1てんかんとTLE-AmyEで共通して, リンパ球活性化マーカーであるCD25およびCD69の発現上昇, memory CD4⁺ TのTh2シフト, cTfhのTfh2シフト, という共通のリンパ球偏移を認めた。このことから我々は, 扁桃体腫大が自己免疫性てんかんに疑う指標になりうると考えた。

一方で, 実際の診療の場においては, Volumetryは行っておらず, 目視的なMRI画像診断や臨床経過をもとに自己免疫性てんかんに疑う症例をスクリーニングしている。我々は研究1で得られた知見をもとに, 臨床により即した形で対象を拡大し, 発症様式とMRI異常から臨床的に自己免疫性てんかんに疑う患者を選定し, リンパ球活性化やTfh2シフトなどのリンパ球偏移が認められるかについて検証するとともに, 自己免疫性てんかんの新たな診断バイオマーカーを探索した。

■研究2

【方法】

抗神経抗体陽性が判明している自己免疫性てんかん (Autoimmune epilepsy; AE) 及び, 抗神経抗体が陰性もしくは不明ながら Diagnostic criteria for possible autoimmune encephalitis¹⁾ を満たすてんかん (Clinically suspected autoimmune epilepsy; csAE), 上記の臨床診断基準を満たさないてんかんコントロール (Epilepsy control; EC) を設定した。各群のMRI所見や髄液所見などの臨床的特徴を収集するとともに, フローサイトメトリを用いて, AE群, csAE群, EC群, 及び健常群 (Healthy control; HC) の末梢血リンパ球のT細胞サブセットや活性化マーカーを解析した。

【結果】

AE群として, LGI-1抗体陽性例3名, Ma2抗体陽性例1例, 免疫組織染色における抗neuropil抗体陽性例2例を解析した。またcsAE群8例, EC群6例, HC群9例を解析した。MRI

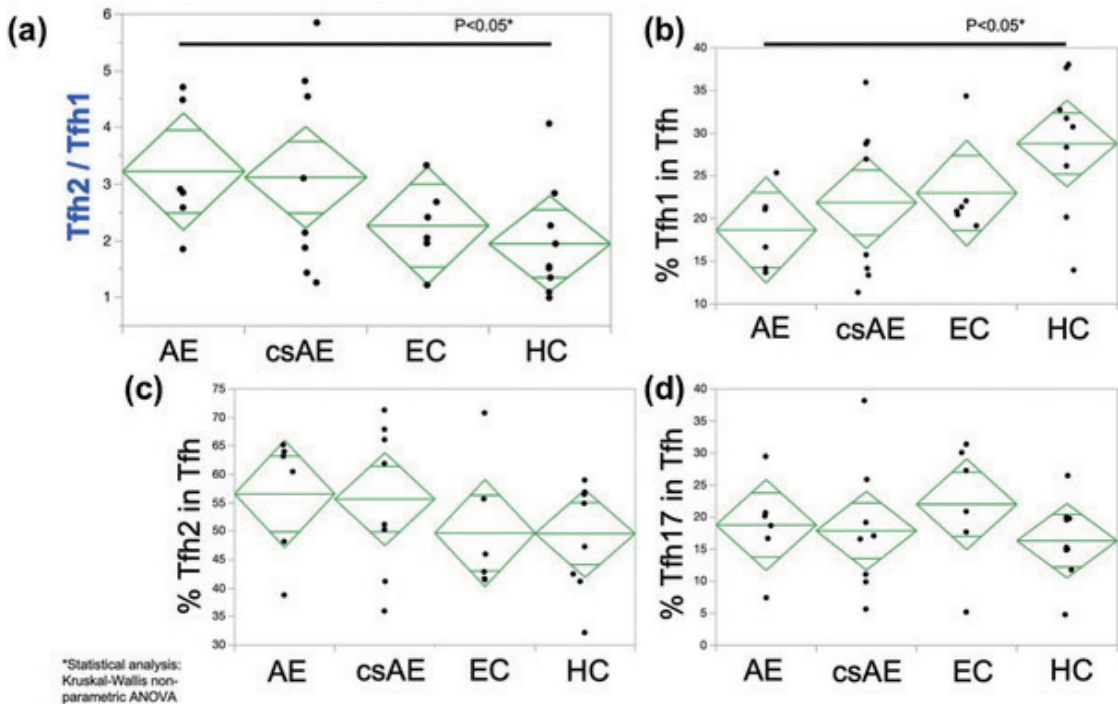


Fig. 1 末梢血CXCR5⁺CD4⁺T (Tfh) 中のサブセットの頻度およびサブセット比

所見では、AE群の2例で扁桃体腫大、3例で内側側頭葉のT2強調像高信号を認め、csAE群の6例で扁桃体腫大、2例で脳実質のT2強調像高信号域を認めた。髄液検査所見では、AE群の2例で髄液タンパク上昇を認め、csAE群の3例でOCB陽性、4例で髄液タンパク上昇を認めたが、自己免疫性脳炎の特徴の一つとされる髄液細胞増多をきたす症例は認めなかった。脳波所見では、AE群の2例およびcsAE群の5例で両側性のてんかん性放電を認めた。

フローサイトメトリを用いた末梢血リンパ球解析では、各群のCD4⁺T中のCXCR5⁺cTfh細胞の頻度に差を認めなかった。AE群及びcsAE群はHC群およびEC群に比べ、CXCR5⁺CD4⁺cTfh中のCCR6⁺CXCR3⁺cTfh1細胞の頻度が低く、CCR6⁺CXCR3⁺cTfh2細胞の頻度、およびTfh2/Tfh1比が高い傾向を認めた (Fig. 1a, b, c)。CCR6⁺CXCR3⁺Tfh17細胞の頻度に明らかな差は認めなかった (Fig. 1d)。cTfh中の共刺激因子ICOSの発現の差を認めなかつ

た。またAE群及びcsAE群ではHC群およびEC群に比べ、CD4⁺T中のCD25⁺CD127^{dim}細胞 (制御性T細胞) の頻度が低下していた (Fig. 2a)。またHCに比べ、AE群や一部のcsAE群、EC群でCD4⁺T中のCD25⁺CD127^{high}CD4⁺T細胞の頻度が上昇していた (Fig. 2b)。

【考察】

末梢血中のTfh細胞はTh1, Th17, Th2型の性質をもとにTfh1, Tfh2, Tfh17細胞に分類され、皮膚筋炎や視神経脊髄炎においてTfh2やTfh17が自己抗体産生性の病態に関与することが報告されている^{5, 6)}。これまで得られた結果から、自己免疫性てんかんではTfh2シフト、制御性T細胞の低下、CD4⁺Tの活性化マーカーの上昇が起きていると考える。一部のcsAE群患者はAE群と共通のT細胞偏移をもつことから、亜急性経過で側頭葉など脳実質にFLAIR高信号を伴うてんかん患者は、既知の抗神経抗体が陰性であっても自己免疫性の機序

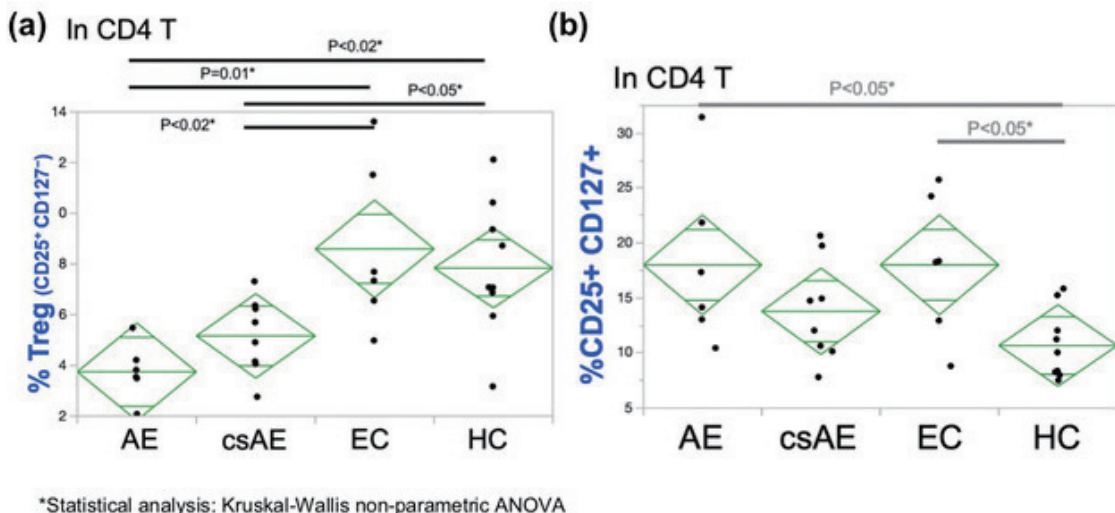


Fig. 2 末梢血CD4⁺T中の制御性T細胞（Treg）および活性化T細胞（CD25⁺CD127⁺）の頻度

を持つ可能性が示唆された。

一方で、てんかん患者の免疫学的な多様性も明らかになった。研究1のてんかんコントロール群は、上述したinclusionの基準により部分てんかんで治療抵抗性がない比較的均一な集団を設定したが、研究2ではより対象を広くとり、全般性てんかんや脳挫傷後てんかん、てんかん手術後の難治性てんかん症例もてんかんコントロール群に含めた。研究1ではNAFE群でT細胞中の活性化マーカーの上昇は認めなかった一方で、研究2ではてんかんコントロール群でもCD25⁺細胞の頻度が上昇している症例を認めた。このことから、自己免疫性脳炎/てんかん患者以外のてんかん患者の一部においても、T細胞免疫がその病態と関連している可能性がある。

本研究の問題点として、研究1、研究2とも研究に組み入れた既知の抗神経抗体陽性の自己免疫性てんかん患者数が少なかった点がある。また、てんかん発症から末梢血リンパ球を評価するまでの期間が均一でない点も統計的なばらつきに関連した可能性がある。

■結論および今後の見通し

亜急性経過で側頭葉など脳実質にFLAIR高信号を伴うてんかん患者は、既知の抗神経抗体が陰性であっても自己免疫性の機序を持つ可能

性がある。

現在、自己免疫性てんかんにおける免疫学的指標を確立するため、上述の患者群の末梢血中および髄液中リンパ球において、他施設共同で多数例の患者をリクルートし研究を継続している。また将来的には、得られた免疫学的な知見を、現在ある自己免疫性てんかんの診断アルゴリズム⁴⁾や診断基準案²⁾と組み合わせることも、自己免疫性てんかんの診断精度を高めるために有用な可能性がある。てんかん症候群の病態は多様であるが、本研究により、既知の自己抗体陰性である症例を含め診断が困難であった自己免疫性てんかん患者群を正確に同定し、より早期かつ適切な治療介入を可能とすることが期待される。

文献

- 1) Graus F, Titulaer MJ, Balu R, Benseler S, Bien CG, Cellucci T, et al.
A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *Lancet Neurol* 2016 ; 15 : 391-404.
- 2) Dubey D, Alqallaf A, Hays R, Freeman M, Chen K, Ding K, et al. Neurological Autoantibody Prevalence in Epilepsy of Unknown Etiology. *JAMA Neurol* 2017 ; 74 (4) : 397-402.
- 3) Toledano M, Britton JW, McKeon A, Shin C,

- Lennon VA, Quek AML et al. Utility of an immunotherapy trial in evaluating patients with presumed autoimmune epilepsy. *Neurology* 2014 ; **82** : 1578-1586.
- 4) 坂本光弘, 松本理器, 十川 純平, 端祐一郎, 武山博文, 小林勝哉 ら. 自己免疫性てんかんにおける診断アルゴリズムの提唱とその有用性の予備的検討. *臨床神経* 2018 ; **58** : 609-616.
- 5) Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, et al. Human blood CXCR5 (+) CD4 (+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 2011 ; **34** : 108-21.
- 6) Nicolas P, Ruiz A, Cobo-Calvo A, Fiard G, Giraudon P, Vukusic S, et al. The Balance in T Follicular Helper Cell Subsets Is Altered in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder Patients and Restored by Rituximab. *Front Immunol* 2019 ; **10** : 2686.

