

—— 研究助成報告 ——

West症候群の後遺症克服に向けて —末梢血液中細胞内サイトカインとペリサイトの検討—

山 中 岳¹⁾, 高 田 美友子²⁾

要旨：West症候群（WS）の病態にサイトカインを含む炎症反応が関与することが示唆され、血液脳関門のタイトジャンクション機能を促進的に調節するペリサイト（血管周皮細胞）が、中枢にて神経炎症へ関与することが指摘されている。今回、WSを対象に各種細胞の細胞内サイトカインとペリサイトの関与について検討した。細胞内サイトカインの検討にて、IL-1 β 、IL-1RA陽性のCD14+単球の割合がコントロール群に比べて有意に高値であり、ペリサイトのバイオマーカーであるPDGFR β ・CD13をコントロール群と比較したところ、WS群ではPDGFR β が有意に低値、CD13は有意に高値であった。WS患者の血清もしくは髄液をヒト由来脳ペリサイトに負荷して検討したが、脳ペリサイトのPDGFR β mRNA発現量の有意な変化や明らかな形態学的異常は確認されず、今後は血液脳関門培養モデルなどにより検討を行う予定である。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2023；34：87-92

Key Words：West症候群，細胞内サイトカイン，ペリサイト，IL-1 β ，神経炎症

【序論】

West症候群（WS）は最も予後不良なてんかん症候群のひとつであり、多くの患児に神経学的後遺症を残す。WSの病態は明らかではないが、サイトカインを含む炎症反応が絡んでいることが示唆されている。てんかんのモデルマウスの研究により、Interleukin-1 β （IL-1 β ）はけいれんに対し促進的に働き、そのアンタゴニストであるInterleukin-1 receptor antagonist（IL-1RA）は強力な抗けいれん作用があることが知られている¹⁾。しかしながら、WSにおけるこれらサイトカインの検討は一定の見解を得られていないのが現状である^{2,3)}。一方でこれらのサイトカインを産生する末梢の細胞が血液脳関門を通過し、中枢へと侵入することが、てんかん原生の一因となり得ることが示唆されている⁴⁾。

ペリサイトは、血管内皮細胞を裏打ちして血液脳関門のタイトジャンクションを物理的に強化するだけでなく、中枢での免疫応答に寄与することが指摘されている⁵⁾。本研究ではWSの神経炎症の病態における末梢血中のサイトカインを検討するだけでなく、脳内炎症の起因となる細胞について同定を試みた。WSの病態におけるペリサイトの関与を検討するため、WS患者の末梢血のペリサイトマーカーを測定し、in vitroにてWS患者由来の血清もしくは髄液をヒトペリサイトに負荷し、ペリサイトを機能的・形態学的に評価した。

【対象・方法】

1. フローサイトメトリー法による細胞内サイトカインの検討

WS 13例（潜因性2例・症候性11例，平均5ヶ月；3-7ヶ月）とコントロール群10例（平均9；

¹⁾ 東東京医科大学 小児科・思春期学分野
〒160-0023 東京都新宿区西新宿6-7-1]

²⁾ 福岡大学 薬学部 応用薬剤学研究室
〒814-0133 福岡市城南区七隈8丁目19-1]

Tab. 1 WSとコントロールの細胞内サイトカインレベルの比較

(%)	West syndrome patients	Controls	p value
Monocytes			
IL-1 β	6.5(4.0, 18.4)	0.75(0.4, 1.2)	0.000*
IL-1RA	0.47(0.28, 2.4)	0.35(0.14, 0.43)	0.039*
IL-6	0.14(0.04, 0.34)	0.15(0.02, 0.30)	0.478
TNF- α	2.0(0.55, 2.3)	0.55(0.35, 22.2)	0.514
B cells			
IFN- γ	1.7(1.0, 3.3)	4.7(3.7, 5.4)	0.7
Granzyme A	0.26(0.01, 0.76)	0.25(0.02, 0.47)	0.37
Granzyme A	0.02(0.01, 0.04)	0.25(0.02, 0.47)	0.84
NKT-like cells			
IFN- γ	1.56(0.25, 4.2)	0.29(0.12, 0.66)	0.22
Granzyme A	0.04(0.02, 0.07)	0.12(0, 0.13)	0.69
Granzyme A	0(0, 0.06)	0.01(0, 0.02)	0.84
NK cells			
IFN- γ	0.27(0.2, 0.82)	0.66(0.33, 1.9)	0.09
Granzyme A	0.69(0.58, 1.3)	0.95(0.21, 4.2)	0.40
Granzyme A	0.02(0.01, 0.09)	0.28(0.05, 0.4)	0.13

6-12ヶ月)の末梢血単核細胞をPMAとIonomycin(リンパ球), LPS(単球)で刺激培養し, CD4+/8+T細胞, B細胞/NK細胞/NKT細胞, 単球の細胞内サイトカイン(IL-1 β , IL-1RA, IFN- γ , IL-10, IL-17, Granzyme A等)をBD FACS Cant IIにて測定した。血液のサンプリングはACTH加療前の発作期に行っている。また, 同時期の27種類の血漿中サイトカイン・ケモカイン(IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-1b, IL-1RA, , TNF-a, bFGF, G-CSF, GM-CSF, IFN-g, IP-10, CCL-2, -3, -4, PDGF, RANTES, VEGF, TNF-a)を網羅的に測定し, 正常コントロール群と比較し評価した(東京医科大学倫理承認番号: SH3779)。

2. ペリサイトマーカーの検討

WS 18例(潜因性6例, 症候性12例, 平均6; 4-8ヶ月)とコントロール群9例(平均11; 5.00-13.5ヶ月)のペリサイトのバイオマーカーであるPDGFR β (plasma platelet derived growth factor receptor β)とCD13 (aminopeptidase N)をELISA法にて測定した。血液のサンプリングはACTH加療前の発作期に行っている。さらにWS患者における脳内PDGFR β 発現変化を検討するため, WS患者2名(潜因性1例, 症候性1例)の血清もしくは髄

液を無血清培地で10倍希釈し, ヒト由来脳ペリサイト(HBVP)に負荷し, 24時間もしくは56時間培養した。ペリサイトの形態学的変化は, 患者血清に24時間, 患者髄液に24, 56時間暴露されたHBVPを顕微鏡で観察することで評価した。また, ペリサイトにおけるPDGFR β mRNA発現量の変化は, 患者血清に24時間, 患者髄液に56時間暴露されたHBVPから抽出したRNAを用いてrealtime RT-PCR法にて評価した(東京医科大学 倫理承認番号: T2019-0148)。

【結果】

1. フローサイトメトリー法による細胞内サイトカインの検討

WS群は単球内のIL-1 β , IL-1RA, CD8+T細胞内のIFN- γ が対照群と比較して有意に高値を示した(Tab. 1)。その他の細胞内サイトカインと血漿中サイトカイン・ケモカインの検討ではコントロール群と比較して有意な所見は得られなかった。後遺症のないWS群では, CD8+T細胞およびCD4+T細胞の細胞内IFNおよびIL-6が後遺症のある群に比べ有意に高かった。後遺症のあるグループでは, IL-1 β およびIL-1RA陽性単球の数が後遺症のないグループより高値であったが有意差は確認されなかった⁶⁾。

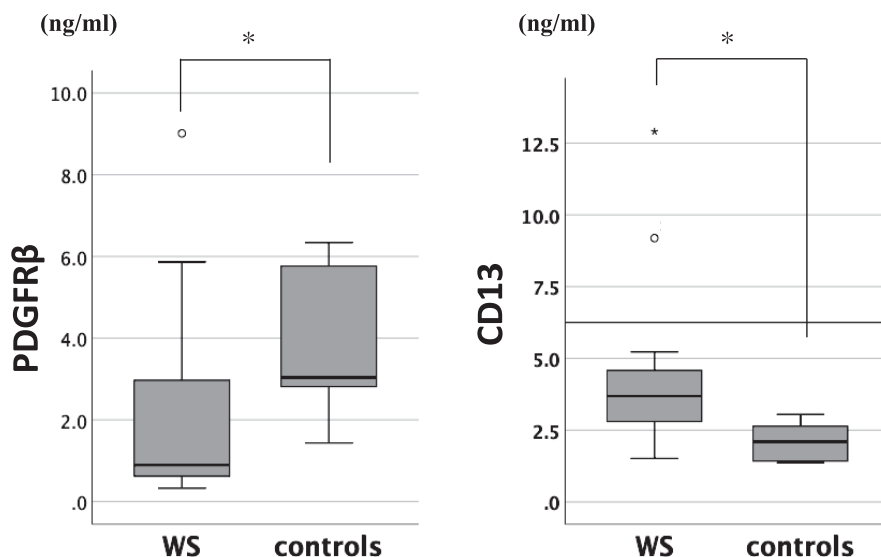


Fig. 1 WSとコントロールの血清PDGFR β とCD13の比較

免疫蛍光表現法により単球, CD4+ T細胞, CD8+ T細胞, B細胞, NK細胞, NKT細胞の割合を検討したが, WS患者とコントロール間で差がなく, 潜因性と症候性の患者の間にも有意差は認められなかった⁶⁾。

2. ペリサイトマーカーの検討

血清CD13値は対照群(中央値2.10; IQR 1.41-2.77, ng/ml)と比較し, WS群で有意に高値(中央値3.69; IQR 2.80-4.60, ng/ml)であり, 血清PDGFR β 値は対照群(中央値 3.03, IQR 2.17-5.86, ng/ml)と比較し, WS群で有意に低値(0.90; 0.61-3.09, ng/ml)であった(Tab. 2)。症候性と潜因性の比較では, PDGFR β ($p=0.49$) およびCD13 ($p=0.89$) ともに有意差は認められなかった(投稿中)。

HBVPのPDGFR β のmRNA発現レベルは, 血清と髄液にて処理してもコントロールと比較し, 明らかな変化はみられず, 組織学的にもペリサイトの形態学的異常は確認されなかった。

【考察】

てんかんの病態にサイトカインを含む炎症反応が関与することが徐々に明らかになりつつあるが⁷⁾, てんかん患者を対象としたサイトカイ

ンの検討にて再現性のある安定したデータを得ることは必ずしも容易ではない^{8,9)}。特にてんかん原生との関与も指摘されているIL-1 β を捉えることが困難であることは近年でも指摘されている¹⁰⁾。本研究にて, WS患者の血漿ではなく, 単球の細胞内サイトカインの解析にてIL-1 β の有意な上昇が確認され, WSの病態に末梢の単球もしくは単球から産生される免疫応答が関与している可能性を見出した⁶⁾。中枢性疾患のひとつであるてんかんに対して, こうした末梢の細胞を検討することの意義を裏付ける報告が散見される^{11,12)}。本来, 中枢における免疫の主な役割を果たしているのはマイクログリアであるが, けいれん重積モデルマウスにて, 末梢血液中の単球が中枢に侵入し神経障害を引き起こし¹¹⁾, さらに小児難治性てんかんの脳組織の解析ではマイクログリアではなく, 末梢の単球を含めた抗原提示細胞が, てんかんの臨床像に相関するとの報告がある¹²⁾。我々はフローサイトメトリーにて難治性てんかんを対象に末梢細胞を解析したところ, 末梢のT細胞やNK細胞ではなく, 単球の細胞内IL-1 β がコントロール群と比較して高値であり, さらにけいれん頻度と相関することを報告した¹³⁾。本研究との結果とも矛盾なく, フローサイトメトリーによる細胞内サイト

カインの解析には再現性があり、てんかん患者の免疫学的機序を解析するうえで有用な可能性が高い。こうした末梢の細胞が中枢に侵入する病態に対していかに対応するか、我々は血液脳関門のタイトジャンクションの一部を担っているペリサイトに注目した。

ペリサイトは、血管内皮細胞を裏打ちして物理的に血液脳関門のタイトジャンクションを強化しているだけではない。ペリサイトはミクログリア、脳血管内皮細胞、アストロサイトと比較して炎症刺激に最も高感度に応答し、ペリサイトがミクログリアの活性化を誘導することから、ペリサイトが中枢にて免疫応答の司令塔として機能している可能性がある⁵⁾。さらに多発性硬化症などの中枢性免疫疾患との関連が指摘されている^{14, 15)}。本研究にて、血清ペリサイトマーカーを検討したところ、PDGFR β が低下し、CD13が上昇するという興味深い知見が得られた。CD13は神経炎症を介して血液脳関門の障害を誘導するとされるmatrix metalloproteinase (MMP)を活性化することが報告されている¹⁶⁾。何らかの要因によりCD13が上昇し、MMPが活性化されることにより血液脳関門の破壊と共にペリサイトが障害され、ペリサイトに発現しているPDGFR β が二次的に低下していると推察した。一方で、WS患者由来の血清・髄液を負荷してもヒト由来ペリサイトのPDGFR β のmRNA発現レベル、形態学的変化は確認できなかった。本研究にてWSの病態にペリサイトがいかに関与しているか判断することはできず、今後は血液脳関門培養モデルなどにより検討を行う予定である。近年、ペリサイトがてんかん診療の新たな治療ターゲットとなり得ることが示唆されており^{17, 18, 19)}、WSの新たな治療戦略としてペリサイトをターゲットに引き続き研究を継続したい。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人てんかん治療研究振興財団に心より御礼申し上げます。

【参考文献】

- 1) Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol* 2011 ; **7** : 31-40.
- 2) Kawashima H, Suzuki K, Yamanaka G, Kashiwagi Y, Takekuma K, Amaha M, et al. Anti-glutamate receptor antibodies in pediatric enteroviral encephalitis. *Int J Neurosci* 2010 ; **120** : 99-103.
- 3) Shandra O, Moshe SL, Galanopoulou AS. Inflammation in Epileptic Encephalopathies. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2017 ; **108** : 59-84.
- 4) Yamanaka G, Morichi S, Takamatsu T, Watanabe Y, Suzuki S, Ishida Y, et al. Links between Immune Cells from the Periphery and the Brain in the Pathogenesis of Epilepsy: A Narrative Review. *Int J Mol Sci* 2021 ; **22**.
- 5) Matsumoto J, Takata F, Machida T, Takahashi H, Soejima YM, 2014 #2081, Funakoshi M, et al. Tumor necrosis factor- α -stimulated brain pericytes possess a unique cytokine and chemokine release profile and enhance microglial activation. *Neurosci Lett* 2014 ; **578** : 133-138.
- 6) Takamatsu T, Yamanaka G, Ohno K, Hayashi K, Watanabe Y, Takeshita M, et al. Involvement of Peripheral Monocytes with IL-1 β in the Pathogenesis of West Syndrome. *J Clin Med* 2022 ; **11**.
- 7) Vezzani A, Moneta D, Richichi C, Aliprandi M, Burrows SJ, Ravizza T, et al. Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia* 2002 ; **43 Suppl 5** : 30-35.
- 8) de Vries EE, van den Munckhof B, Braun KP, van Royen-Kerkhof A, de Jager W, Jansen FE. Inflammatory mediators in human epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 2016 ; **63** : 177-190.
- 9) Yamanaka G, Morishita N, Morichi S, Takeshita M, Tomomi U, Ishida Y, et al. Serial Analysis of Multiple Serum Cytokine Responses to

- Adrenocorticotrophic Hormone Therapy in Patients With West Syndrome. *J Child Neurol* 2018 ; **33** : 528-533.
- 10) Clarkson BDS, LaFrance-Corey RG, Kahoud RJ, Farias-Moeller R, Payne ET, Howe CL. Functional deficiency in endogenous interleukin-1 receptor antagonist in patients with febrile infection-related epilepsy syndrome. *Ann Neurol* 2019 ; **85** : 526-537.
 - 11) Varvel NH, Neher JJ, Bosch A, Wang W, Ransohoff RM, Miller RJ, et al. Infiltrating monocytes promote brain inflammation and exacerbate neuronal damage after status epilepticus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016 ; **113** : E5665-5674.
 - 12) Xu D, Robinson AP, Ishii T, Duncan DS, Alden TD, Goings GE, et al. Peripherally derived T regulatory and gammadelta T cells have opposing roles in the pathogenesis of intractable pediatric epilepsy. *J Exp Med* 2018 ; **215** : 1169-1186.
 - 13) Yamanaka G, Takamatsu T, Morichi S, Yamazaki T, Mizoguchi I, Ohno K, et al. Interleukin-1 β in peripheral monocytes is associated with seizure frequency in pediatric drug-resistant epilepsy. *J Neuroimmunol* 2021 ; **352** : 577475.
 - 14) Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 2010 ; **468** : 557-561.
 - 15) Rivera FJ, Hinrichsen B, Silva ME. Pericytes in Multiple Sclerosis. *Adv Exp Med Biol* 2019 ; **1147** : 167-187.
 - 16) Sina A, Lord-Dufour S, Annabi B. Cell-based evidence for aminopeptidase N/CD13 inhibitor actinonin targeting of MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation. *Cancer Lett* 2009 ; **279** : 171-176.
 - 17) Klement W, Blaquiére M, Zub E, deBock F, Boux F, Barbier E, et al. A pericyte-glia scarring develops at the leaky capillaries in the hippocampus during seizure activity. *Epilepsia* 2019 ; **60** : 1399-1411.
 - 18) Sakai K, Takata F, Yamanaka G, Yasunaga M, Hashiguchi K, Tominaga K, et al. Reactive pericytes in early phase are involved in glial activation and late-onset hypersusceptibility to pilocarpine-induced seizures in traumatic brain injury model mice. *Journal of Pharmacological Sciences* 2021 ; **145** : 155-165.
 - 19) Yamanaka G, Takata F, Kataoka Y, Kanou K, Morichi S, Dohgu S, et al. The Neuroinflammatory Role of Pericytes in Epilepsy. *Biomedicines* 2021 ; **9** : 759.

