

氏 名 やまもと まもる  
山本 真守

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 391 号

学位授与年月日 令和 4 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程  
生命・臨床医学 専攻

学位論文題目 Identification of double-stranded DNA in the cerebrospinal fluid of  
patients with acute neuromyelitis optica spectrum disorder  
(視神経脊髄炎患者の脳脊髄液中の二本鎖DNAの同定)

論文審査委員

(主査)	教 授	山本 善裕
(副査)	教 授	岸 裕幸
(副査)	特命教授	服部 憲明
(副査)	教 授	高雄 啓三
(指導教員)	教 授	中辻 裕司

様式2

論 文 要 旨

論 文 題 目

視神経脊髄炎関連疾患患者の脳脊髄液中の二本鎖DNAの同定

氏 名 山本 真守

#### 〔背景および目的〕

視神経脊髄炎関連疾患（NMOSD）は、主に視神経と脊髄が傷害される中枢神経系（CNS）の炎症性疾患である。NMOSD患者の大多数では、特異性の高い自己抗体である抗アクアポリン4抗体（抗AQP4抗体）が血中で検出される。アクアポリン4（AQP4）は、CNSのアストロサイトに豊富に発現する水チャネル分子であることが知られている。NMOSDの病因における抗AQP4抗体の本質的な役割は、*in vitro*および*in vivo*モデルの両方で実証されている。抗AQP4抗体は、補体依存性細胞傷害を誘発することによりアストロサイトの傷害（ネクローシス）を引き起こす。抗AQP4抗体の直接的な細胞傷害効果に加えて、NMOSDの病理は、好中球、好酸球、およびミクログリアの関与によっても特徴づけられる。宿主由来のdsDNAは、特定の状況、特に自己免疫において免疫応答を加速することが知られている。核およびミトコンドリアにdsDNAが存在するが、アポトーシス、壊死、およびNETs(neutrophil extracellular traps)を放出するNETosisにより、自己由来のdsDNAが細胞外に放出される。アストロサイトの壊死と好中球の浸潤はNMOSD病変の特徴であるため、自己由来のdsDNAが脳脊髄液(CSF)中に大量に放出され、CNS炎症の増幅に寄与すると推測される。しかし、NMOSD患者における自己由来のdsDNAの関与を示す報告はこれまでにない。

本研究では、dsDNAがNMOSD患者の髄液で増加しているかどうかを調べることを目的とした。

#### 〔方法並びに成績〕

髄液サンプルは、2009年から2019年に富山大学附属病院、大阪大学附属病院、近畿大学病院に入院したNMOSD患者24名、多発性硬化症(MS)患者26名、他神経疾患(OND)患者42名から採取した。NMOSD患者はすべて抗AQP4抗体陽性であり、2015年のNMOSD診断基準を満たした。MSは2010年のマクドナルド診断基準に従って診断し、2名のclinically isolated syndrome (CIS)患者が含まれていた。ONDの患者(n=42)は、慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP、n=13)、ギランバレー症候群(GBS、n=4)、ミラーフィッシャー症候群(MFS、n=2)、筋萎縮性側索硬化症(ALS、n=12)、パーキンソン病(PD、n=7)、および特発性正常圧水頭症(iNPH、n=4)であった。本研究は、富山大学附属病院(承認番号:29-32)、大阪大学附属病院(承認番号:12091-6)、近畿大学病院(承認番号:25-138)の倫理委員会によって承認され、すべての患者から書面によるインフォームドコンセントが得られた。髄液サンプルは再発期に24人のNMOSD患者から採取され、内9人については治療後(静脈内メチルプレドニゾロン(IVMP)治療)にも採取された。MS患者からの26の髄液サンプルはすべて、再発期に採取された。髄液サンプルを2,000g、4℃で10分間遠心分離し、上清を分注し、分析まで-80℃で保存した。DNA抽出SPキット(和光、大阪、日本)を使用して、プロトコルに従って髄液

サンプルからDNAを抽出した。Qubit™dsDNA HSアッセイキット（Invitrogen、アメリカ合衆国）及び、Qubit®2.0蛍光光度計を使用して測定した。

NMOSD患者の平均年齢は54.3歳、平均罹病期間は36.0か月、平均総合重症度スケール（EDSS）は3.9であった。これらの患者の脊髄（83%）、脳（50%）、視神経（33%）に病変を認めた。MS患者の平均年齢は44.3歳、平均罹病期間は74.3か月、平均EDSSは3.3であった。病変は、これらの患者の脊髄（76.9%）、脳（93.3%）、および視神経（15.4%）に認められた。対照群としてのOND患者の平均年齢は60.9歳であり、平均罹病期間は25.3ヶ月であった。髄液サンプルは、NMOSD（n=24）、MS（n=26）、およびOND（n=42）の患者から腰椎穿刺によって得られた。NMOSD患者ではMS患者に比べて髄液細胞数が、 $23.7 \pm 47.56/\text{mm}^3$ （平均±SD）と有意に高かった。また多核球が $11.0 \pm 35.0/\text{mm}^3$ と増加していた。髄液蛋白濃度、ミエリン塩基性蛋白（MBP）、またはIgGインデックスのレベルに有意差は認めなかった。

dsDNAレベルは、NMOSDで $0.10 \pm 0.14 \text{ ng}/\mu\text{l}$ （平均±SD）、MSで $0.04 \pm 0.03 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、ONDで $0.02 \pm 0.01 \text{ ng}/\mu\text{l}$ であった。NMOSD患者の髄液 dsDNA濃度はOND患者よりも有意に高く（ $p < 0.01$ ）、MS患者よりも高い傾向が強かった（ $p = 0.0513$ ）。NMOSDで治療後の髄液サンプルが9人の患者から得られた。それら9人全員の患者はIVMP治療を受けた。NMOSD患者の髄液 dsDNA濃度は、再発期の $0.10 \pm 0.14 \text{ ng}/\mu\text{l}$ から治療後の $0.03 \pm 0.02 \text{ ng}/\mu\text{l}$ に有意に減少した。


NMOSD患者では、髄液 dsDNA濃度と髄液細胞数（ $\rho = 0.7717$ 、 $p = 0.0088$ ）、髄液タンパク質濃度（ $\rho = 0.3860$ 、 $p = 0.0160$ ）および髄液 MBP（ $\rho = 0.7357$ 、 $p = 0.0314$ ）の間には有意な正の相関を認めた。髄液 dsDNA濃度とIgGインデックスの間には有意な相関は認めなかった（ $\rho = 0.0571$ 、 $p = 0.2886$ ）。一方、MSの患者では、髄液 dsDNA髄液と、髄液細胞数（ $\rho = 0.1220$ 、 $p = 0.6935$ ）、髄液蛋白濃度（ $\rho = 0.0813$ 、 $p = 0.4084$ ）、MBP（ $\rho = 0.3270$ 、 $p = 0.0643$ ）およびIgGインデックス（ $\rho = 0.1298$ 、 $p = 0.4828$ ）の間には有意な相関を認めなかった。

#### 〔総括〕

これまで多発性硬化症（MS）、視神経脊髄炎関連疾患（NMOSD）において二本鎖DNA（dsDNA）を測定した報告は無かったため、本研究ではバイオマーカーの乏しいこれらの疾患において髄液中dsDNAが何らかのマーカーとなり得るかを検証した。その結果、NMOSDおよびMSにおいて髄液dsDNAが他神経疾患と比較して有意に高値を示すことを発見した。NMOSDにおけるdsDNAはMSより高値を示す傾向がみられたが有意ではなかった。またNMOSD群にはdsDNAが著明高値を示す一部の患者群が存在したが、これらの患者はいずれも脊髄の長大病変を有していたり、臨床的に重篤であった。またdsDNA値は炎症を反映する髄液細胞数や髄液蛋白などと正の相関を示した。さらにdsDNA値はステロイ

ドパルス療法後に有意に低下した。以上より髄液dsDNAは特にNMOSD患者の疾患活動性や重症度、治療反応性を反映するバイオマーカーとなり得る可能性を示した。dsDNAの由来としてはNMOSDでは障害されたアストロサイトからの放出やNETosisが関与している可能性が考えられ、MSでは傷害されたオリゴデンドロサイトあるいは2次的に傷害されたアストロサイトから放出された可能性が考えられるが今後の検証が必要である。また今回のNMOSD患者が24名、MS患者が26名と十分ではなかったため今後症例を蓄積して解析してゆくことも必要である。

## 学位論文審査の要旨

報告番号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	山本 真守
論文審査委員	職 名 (主査) 教授 (副査) 教授 (副査) 教授 (副査) 特命教授	氏 名 山本 善裕 高雄 啓三 岸 裕幸 服部 憲明	
指導(紹介)教員	教授	中辻 裕司	
(論文題目 英文の場合は和訳, 日本文の場合は英訳を付記すること) <b>Identification of double-stranded DNA in the cerebrospinal fluid of patients with acute neuromyelitis optica spectrum disorder</b> (視神経脊髄炎患者の脳脊髄液中の二本鎖DNAの同定)			(判定)  合格
(論文審査の要旨) 〔目的〕 視神経脊髄炎関連疾患(NMOSD)は、主に視神経と脊髄が傷害される中枢神経系(CNS)の炎症性疾患である。視神経脊髄炎の患者の大多数では、特異性の高い自己抗体である抗アクアポリン4抗体(AQP4-Ab)が血中で検出される。アクアポリン4(AQP4)は、中枢神経系(CNS)の星状細胞に豊富に発現する水チャネル分子であることが知られている。NMOSDの病因におけるAQP4-Abの本質的な役割は、in vitroおよびin vivoモデルの両方で実証されている。AQP4-Abは、補体依存性細胞毒性を誘発することにより星状細胞の傷害を引き起こす。AQP4-Abの直接的な細胞毒性効果に加えて、NMOSDの病理は、好中球、好酸球、およびミクログリアの基本的な関与によっても特徴づけられる。宿主由来のdsDNAは、特定の状況、特に自己免疫において免疫応答を加速することが知られている。核およびミトコンドリアにおけるdsDNAの厳密に調節された細胞内局在にもかかわらず、アポトーシス、壊死、およびNETosisとして造られた特定の形態の死は、自己由来のdsDNAの細胞外放出を誘導する。いくつかの刺激が好中球のNETosisを引き起こすことが報告されており、特定の条件下では、例えば、活性酸素種(ROS)が豊富な環境では、自己由来のdsDNAが高度な免疫原性活性を発揮する。アストロサイトの壊死と好中球の浸潤はNMOSD病変の特徴であるため、自己由来のdsDNAが脳脊髄液(CSF)中に大量に放出され、CNS炎症の増幅に寄与すると推測される。しかし、NMOSD患者における自己由来のdsDNAの関与を示す報告はこれまでにない。本研究では、dsDNAがNMOSD患者のCSFで増加しているかどうかを調べることを目的とした。  〔方法並びに成績〕 CSFサンプルは、2009年から2019年に富山大学附属病院、大阪大学附属病院、近畿大学附属病院に入院したNMOSD患者24名、多発性硬化症(MS)患者26名、他神経疾患(OND)患者42名から採取した。NMOSD患者はすべてAQP4-Ab陽性であり、2015			

年のNMOSD診断基準を満たした。MSは2010年のマクドナルド診断基準に従って診断し、CISの2人の患者がMSグループに含まれた。CSFサンプルは再発期に24人のNMOSD患者から採取され、内9人については治療後（静脈内メチルプレドニゾロン（IVMP）治療）にも採取された。CSFサンプルを2,000×g、4℃で10分間遠心分離し、等分して、分析まで-80℃で保存した。DNA抽出器SPキット（和光、大阪、日本）を使用して、製造元のプロトコルに従ってCSFサンプルからDNAを抽出した。Qubit™dsDNA HSアッセイキット（Invitrogen、アメリカ合衆国）を使用して、選択性の高いdsDNAを取得し、Qubit®2.0蛍光光度計を使用して測定した。

視神経脊髄炎患者の平均年齢は54.3歳、平均罹病期間は36.0か月、平均総合重症度スケール（EDSS）は3.9だった。これらの患者の脊髄（83%）、脳（50%）、視神経（33%）に病変を認めた。MS患者の平均年齢は44.3歳、平均罹病期間は74.3か月、平均EDSSは3.3であった。病変は、これらの患者の脊髄（76.9%）、脳（93.3%）、および視神経（15.4%）に認められた。対照群としてのOND患者の平均年齢は60.9歳であり、平均罹病期間は25.3ヶ月であった。

CSFサンプルは、NMOSD（n=24）、MS（n=26）、およびOND（n=42）の患者から腰椎穿刺によって得られた。NMOSD患者ではMS患者に比べてCSF細胞数が、有意に高かった（ $23.7 \pm 47.56$ 細胞/mm<sup>3</sup>）。タンパク質、MBP、またはIgGインデックスのレベルに有意差は認めなかった。

dsDNAレベルは、NMOSDで $0.1 \pm 0.14$  ng/μl（平均±SD）、MSで $0.04 \pm 0.03$  ng/μl、ONDで $0.02 \pm 0.01$  ng/μlであった。視神経脊髄炎患者のdsDNAレベルはOND患者よりも有意に高く（ $p < 0.01$ ）、MS患者よりも高い傾向が強かった（ $p = 0.0513$ ）。NMOSDで治療後のCSFサンプルが9人の患者から得られた。それら全員の患者はIVMP治療を受けた。NMOSD患者の髄液 dsDNA濃度は、再発期の $0.10 \pm 0.14$  ng/μlから治療後の $0.03 \pm 0.02$  ng/μlに有意に減少した。

NMOSD患者では、髄液 dsDNA濃度と髄液細胞数（ $\rho = 0.7717$ 、 $p = 0.0088$ ）、髄液タンパク質濃度（ $\rho = 0.3860$ 、 $p = 0.0160$ ）および髄液 MBP（ $\rho = 0.7357$ 、 $p = 0.0314$ ）の間には有意な正の相関を認めた。髄液 dsDNA濃度とIgGインデックスの間には有意な相関は認めなかった（ $\rho = 0.0571$ 、 $p = 0.2886$ ）。一方、MSの患者では、髄液 dsDNA髄液と、髄液細胞数（ $\rho = 0.1220$ 、 $p = 0.6935$ ）、髄液蛋白濃度（ $\rho = 0.0813$ 、 $p = 0.4084$ ）、MBP（ $\rho = 0.3270$ 、 $p = 0.0643$ ）およびIgGインデックス（ $\rho = 0.1298$ 、 $p = 0.4828$ ）の間には有意な相関を認めなかった。

#### 〔総括〕

山本氏は本研究において、これまで明確なバイオマーカーが確立されていない多発性硬化症（MS）、視神経脊髄炎関連疾患（NMOSD）において、髄液中の二本鎖DNA（dsDNA）が新たなマーカーとなり得るかを検証した。NMOSDは、アストロサイトの壊死と好中球の浸潤が病態の特徴であり、自己由来のdsDNAが脳脊髄液（CSF）中に大量に放出され、中枢神経系炎症の増幅に寄与すると推測されているため、CSF中のdsDNAに着目した。

その結果、NMOSDにおいてCSF中のdsDNAが他神経疾患と比較して有意に高値を示すこと、dsDNA値は炎症を反映する髄液細胞数や髄液蛋白などと正の相関を示すこと、さらにdsDNA値はステロイドパルス療法後に有意に低下することを初めて明らかにした。この点において新規性が認められる。今後更なる症例の積み重ねと、より詳細な経時的なdsDNA値の測定等を行うことにより、医学における学術的重要性や臨床的発展性につながることを期待できる。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。