

【要約】

Increased cerebrospinal fluid metalloproteinase-2 is associated with blood-brain barrier disruption in neuromyelitis optica

(視神経脊髄炎において髄液MMP-2は上昇し、血液脳関門の破綻に關与する)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：桑原 聡教授)

内田 智彦

## 【背景】

視神経脊髄炎（neuromyelitis optica : NMO）は視神経炎と長大脊髄病変を特徴とする中枢性炎症性神経疾患である。アストロサイトの足突起に発現するアポリン4（aquaporin-4 : AQP4）を標的とする抗 AQP4 抗体は、NMO における重要なバイオマーカーである。血清抗 AQP4 抗体が中枢神経に移行するためには血液脳関門（blood-brain barrier : BBB）の破綻が必要であるが、その機序は明らかにされていない。一方で、血液脳関門の破綻を反映する髄液／血清アルブミン比（Q albumin : Qalb）は NMO で上昇することが報告されている。

metalloproteinases (MMPs) が BBB を破綻させることが報告されている。MMPs の主な作用は細胞外マトリックスの分解や再編成である。MMPs が分解する細胞外マトリックスにはIV型コラーゲンやラミニンも含まれており、これらは BBB の重要な構成成分である。MMPs の活動性は主に遺伝子発現、他の MMPs や tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) によって調節されている。さらに遺伝子発現は Th17 細胞関連のサイトカインによっても調節される。そのため MMPs、TIMPs、Th17 細胞関連サイトカインは BBB 破綻と関連することになる。本研究の目的は NMO の病態において MMPs が BBB 破綻に関与するのか、関与する場合に、MMPs と TIMPs、Th17 細胞関連サイトカインがどのような関係性を示すのかを明らかにすることである。

## 【方法】

血清および髄液検体が保存されている 2010 年版 McDonald 診断基準を満たす再発寛解型多発性硬化症（multiple sclerosis : MS）29 例、NMO29 例（Wingerchuk の診断基準を満たす NMO19 例、2015 年版 Wingerchuk の診断基準を満たす抗 AQP4 抗体陽性の NMO spectrum disorder10 例）、対照神経疾患（other neurological

diseases : ONDs) 27 人 (非炎症性疾患 17 人、炎症性疾患 10 人) を対象とした。NMO、MS においては急性期の検体のみを用いた。髄液中の MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-12, MMP-13) , TIMPs (TIMP-1, TIMP2, TIMP-3, TIMP-4), cytokines (interleukin [IL] -1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, interferon [IFN] - $\gamma$ , tumor necrosis factor [TNF]- $\alpha$ ) を Bio-Rad 社の Bio-Plex マルチプレックス法を用いて測定した。測定結果を NMO 群、MS 群、ONDs 群で比較した。髄液検体で有意差のあった項目は血清でも同様に測定し比較した。測定結果から髄液／血清比を算出した。NMO において BBB 破綻の指標として Qalb を用い各項目との相関解析を行った。その中で Qalb と最も相関のある項目は臨床所見、検査所見との相関解析を行った。NMO2 剖検例の脳幹検体を用いて免疫染色を行った。

## 【結果】

①NMO 群では髄液 MMP-2 (vs MS;  $P = 0.005$  vs ONDs;  $P = 0.022$ )、TIMP-1 (vs MS;  $P = 0.002$  vs ONDs;  $P = 0.01$ )、IL-6 (vs MS;  $P = 0.01$  vs ONDs;  $P = 0.01$ )、髄液 MMP-2/TIMP-2 が他群に比し有意に高値であったが血清で有意差のある項目は認めなかった。②髄液／血清 MMP-2、IL-6 比の中央値はいずれも 1.0 以上であり中枢神経内での産生が示唆された。③髄液／血清アルブミン比は髄液 MMP-2 ( $\rho = 0.7532$ ;  $P < 0.0001$ )、TIMP-1 ( $\rho = 0.6041$ ;  $P = 0.001$ )、IL-6 ( $\rho = 0.4497$ ;  $P = 0.021$ )と相関を示し、MMP-2 と最も強い相関を示した。④髄液 MMP-2 は髄液 IL-6 ( $\rho = 0.547$ ;  $P = 0.002$ )、髄液細胞数 ( $\rho = 0.493$ ;  $P = 0.008$ )、髄液蛋白 ( $\rho = 0.751$ ;  $P < 0.0001$ )、IgG index ( $\rho = 0.598$ ;  $P = 0.001$ )と相関を示した。⑤髄液 IL-6 と髄液 TIMP-1 ( $\rho = 0.691$ ;  $P < 0.0001$ )は相関を示した。⑥NMO 剖検例の脳幹検体において血管周囲にマクロファージ様の MMP-2, TIMP-1 陽性細胞を認めた。

## 【考察】

NMO における MMPs による BBB 破綻の報告はわずかである。血清 MMP-9、髄液 TIMP-1 が NMO で上昇し、血清 MMP-9 が Qalb と相関を示したと報告されている。また、急性期の NMO 患者血清を BBB 由来血管内皮細胞に作用させると MMP2/9 の自己分泌が促進し、BBB 機能を低下する。BBB 機能は MMPs 阻害薬を用いると回復すると報告されている。これらの報告から NMO においても MMPs が BBB 機能を破綻させると考えられるが、これらの研究では髄液 MMP-2 は測定されていない。今回の研究では髄液 MMP-2 と Qalb が強い相関を示したことから、髄液 MMP-2 が BBB 破綻に関与していると考えられる。髄液／血清 MMP-2 比からは MMP-2 は中枢優位に産生されていると考えられる。NNO 剖検例の病理検査では血管周囲に MMP-2 陽性細胞を認めている。これらの結果から、髄液 MMP-2 は中枢神経内で血管外の細胞から分泌され、BBB を破綻すると考えられる。

また、髄液 IL-6 は、髄液 MMP-2, TIMP-1 と相関関係を示した。IL-6 を作用させると MMP-2, TIMP-1 の分泌が促進することや、IL-6 と MMP-2 および TIMP-1 の m-RNA が相関を示したことが報告されている。これらのことから NMO の重要なバイオマーカーの 1 つである髄液 IL-6 の刺激により髄液 MMP-2、TIMP-1 の分泌が促進していると推察した。

MMP-2 の活動性はプラスミンやアンギオテンシン II などからも調節をうけている。プラスミンは MMP-2 の活動性を促進し、プラスミン阻害剤がその作用を阻害する。また、アンギオテンシン II が MMP-2 の分泌を促進し、TIMP-2 の分泌を抑制し、アンギオテンシン II 受容体拮抗薬がその作用を阻害すると報告されている。これらのことからプラスミン阻害薬やアンギオテンシン II 受容体拮抗薬は MMP-2 を標的とした NMO の新規治療になりえると考えた。

今回の研究では MMP-2、TIMP1、IL-6 の分泌細胞を明らかに示していないため、*in vitro* BBB モデル株を用いるなどさらなる検証が必要である。また、今回測定した MMP-2 は活性型 MMP-2 以外の不活型 MMP-2 も含まれている。ザイモグラフィーを用いるなど活性型 MMP-2 を評価することで、より詳細に病態を解明できると考えている。

#### 【結論】

今回の研究で、NMO において髄液 MMP-2 が BBB 破綻に重要な役割を果たし、その分泌に IL-6 が関与している可能性が推察された。MMP-2 を標的とした新規治療に発展することが期待される。