

Nya fynd kan leda till individ Anpassad behandling av MS

Befintliga behandlingar av multipel skleros (MS) slår brett mot immunsystemet. Nu har forskare vid Karolinska Institutet utvecklat en metod för att identifiera vilka immunceller som är inblandade hos olika patienter. Med hjälp av metoden har man funnit fyra nya målmolekyler för MS som kan få betydelse för framtida individ Anpassad behandling. **Mattias Bronge**, doktorand vid institutionen för klinisk neurovetenskap vid Karolinska Institutet berättar här om fynden som nyligen har publicerats i Science Advances.

Multipel skleros är en kronisk inflammatorisk sjukdom i det centrala nervsystemet (CNS) som sannolikt är autoimmun. MS debuterar oftast i 20–40 års åldern och med cirka 20.000 drabbade i Sverige är det en av de ledande orsakerna till neurologisk funktionsnedsättning bland vuxna i arbetsför ålder. Symtomatologin är bred, då inflammationen kan uppstå i olika delar av CNS, men innefattar ofta synrub-

ningar på grund av inflammation i synnerven, domningar och pareser i extremiteter, trötthet och kognitiv nedsättning. Den klassiska bilden är distinkta skov med neurologiska symtom med hel eller delvis regress emellan med övergång till en progressiv fas efter 10–20 år. Cirka 15 procent av patienterna debuterar dock med progressiv sjukdom.¹

Någon direkt orsak till MS har inte kunnat identifieras utan sjukdomen

tros beror på ett samspel mellan både genetik och miljöfaktorer. Stora ”genome-wide association studies” har identifierat över 200 riskgener som de flesta påverkar det adaptiva immunförsvaret, där Human Leukocyte Antigen (HLA)-DRB1*15:01 utgör den klart starkaste risken. I miljön är det framför allt Epstein-Barr-virusinfektion, rökning och låga vitamin-D nivåer som ökar risken.²

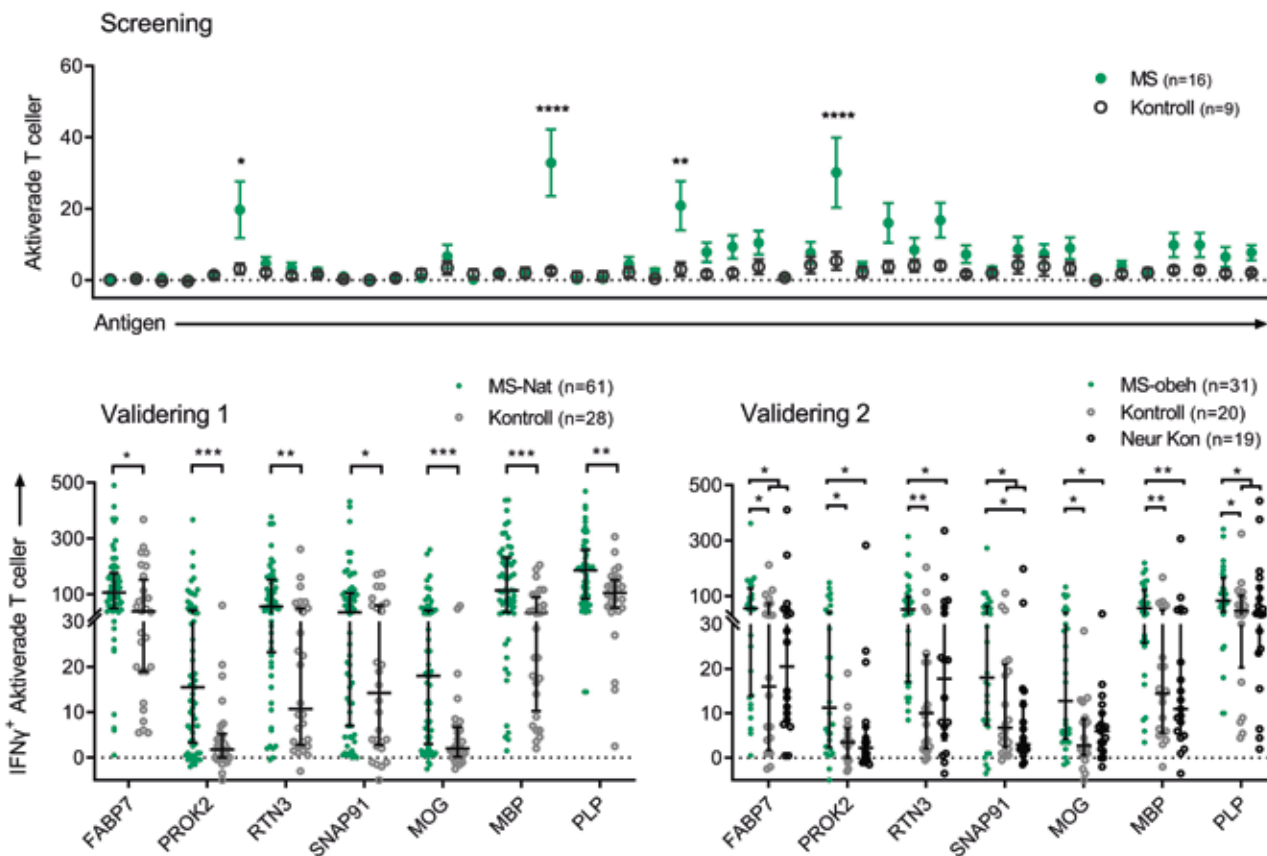


Patofysiologin karakteriseras av en infiltration av immunceller från det adaptiva immunförsvaret, framför allt T-celler, över blod-hjärnbarriären och efterföljande fokal inflammation och bildandet av inflammatoriska plack med demyelinisering och axonal skada som följd. Då den rådande hypotesen är att MS är en autoimmun sjukdom som orsakas av ett missriktat adaptivt immunförsvaret mot specifika strukturer

i hjärnan, så kallade autoantigen, har mycket tid lagts på att identifiera exakt vilka autoantigenen är, något som är nödvändigt både för att förstå sjukdomens etiopatogenes och för att förbättra diagnostik och öppna upp för nya behandlingsstrategier. Hittills har en handfull autoantigen, framför allt myelinproteiner, identifierats men den kända repertoaren i MS är sannolikt långt ifrån komplett.³ Det har generellt

varit svårt att studera autoreaktiva T-celler då de är förhållandevis få, många metoder inte tillräckligt känsliga och ett enda "nyckel"-antigen kanske inte existerar.

I takt med att antigen-specifika immunoterapier blir ett mer realistiskt behandlingsalternativ för autoimmunitet har vikten av att identifiera relevanta autoantigen blivit allt större då en mer fullständig repertoar utgör ett absolut



Figur 1. Antalet aktiverade T-celler efter stimulering med CNS-specifika antigen. Överst: Resultat från screening. Nedre vänster: Resultat från första validering med en större natalizumabbehandlad kohort. Nedre höger: Resultat från andra valideringen med en obehandlad kohort. Bild utarbetad från Bronge M, et al. 2022.⁶

krav för effektiv behandling. Den här strategin har potentialen att vara både effektiv och säker, och i musmodeller där autoantigenen är kända har behandlingsstudier varit mycket lyckade.⁴ Antigen specifik terapi har dock inte varit lika framgångsrik i människa och en förklaring är att en effektiv behandling kräver att fler autoantigen inkluderar, och gärna på ett skraddarsytt sätt för patienternas individuella sjukdomsdrivande autoantigen.^{3,5} Syftet med vår studie var att genom en bred screening av T-cellsreaktivitet mot CNS-proteiner identifiera tidigare okända autoantigen i MS.⁶

BRED SCREENING AV AUTOREAKTIVITET

I ett samarbete med Kungliga Tekniska Högskolan och Human Protein Atlas⁷ skapade vi en panel av antigen som representerade 63 olika proteiner med selektiv expression i CNS. Tidigare föreslagna autoantigen ingick men den stora majoriteten bestod av tidigare, i



Resultaten talar för att den stora variationen i sjukdomens kliniska presentation också återspeglas i de underliggande immunologiska processerna.

denna kontext, ostuderade proteiner. För att öka känsligheten i efterföljande experiment användes en ny metod där antigenen kopplades till fagocyterbara mikropartiklar vilka tas upp av antigenpresenterande celler som monocyter, för intracellulärt processande av antigen och presentation av till T-celler.

Då autoreaktiva T-celler hos patienter korsar blod-hjärnbarriären och således finns i hjärnan, valde vi att studera patienter som behandlades med natalizumab, en antikropp som blockerar denna passage för att på så sätt öka chansen att just relevanta T-celler befinner sig i blodet vid provtagstillfället. Immunceller från personer med MS och matchade friska kontroller isolera-

des fram från venösa blodprov och stimulerades med antigenpanelen i en FluoroSpot-assay,⁸ en metod som gör det möjligt att identifiera enstaka aktiverade T-celler genom detektion av cytokinutsöndring.

En ökad mängd pro-inflammatoriska T-celler hos personer med MS jämfört med friska kontroller reagerade mot fyra tidigare okända autoantigen: Fatty Acid-binding Protein 7 (FABP7), Prokineticin-2 (PROK2), Reticulon-3 (RTN3) och Synaptosomal Associated Protein 91 (SNAP91). Resultaten presenteras i Figur 1, översta grafen. De nya identifierade autoantigenen har spridd expression i CNS och framför allt i neuron och stödjeceller (glia), sna-

rare än i de myelinproducerande oligodendrocyterna vars protein studerats mest i denna kontext tidigare.

VALIDERING I STÖRRE MATERIAL

För att validera resultaten från screeningen upprepades försöken i ytterligare kohorter, först i en större kohort av natalizumabbehandlade personer med MS och matchade friska kontroller. Detta följdes sedan av repetition i en kohort av obehandlade personer med MS, friska kontroller och personer med andra neurologiska sjukdomar, för att försäkra att resultaten inte enbart berodde på natalizumabbehandlingen.

Återigen sågs en ökad mängd T-celler som framför allt producerade det proinflammatoriska cytokinet interferon-gamma som svar på de fyra nya autoantigenen samt tre tidigare kända myelinautoantigen (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein, Myelin Basic Protein och Proteolipid Protein) hos både natalizumabbehandlade och obehandlade personer med MS [Figur 1, nedre graferna]. De autoreaktiva T-cellerna var primärt CD4⁺ T-hjälparceller och beroende av HLA-DR-presentation av sitt respektive autoantigen för att kunna aktiveras.

Förekomst av autoantikroppar i plasma undersöktes också i ett stort material av personer med MS och kontroller, men ingen ökad förekomst hos patienter av autoantikroppar specifika mot autoantigenen kunde detekteras.

INDIVIDUELLA

AUTOANTIGENPROFILER

I den obehandlade patientgruppen var T-cellssvaren mycket heterogena både



De identifierade autoantigenen öppnar upp för nya diagnostiska metoder med mätning av autoreaktivitet, vilket kan vara användbart i fall där diagnostik av patienter är svår.

avseende styrkan på och mönstret av T-cellsautoreaktiviteten och varje individ uppvisade en i princip unik autoantigenprofil [Figur 2]. Resultaten talar för att den stora variationen i sjukdomens kliniska presentation också återspeglas i de underliggande immunologiska processerna. Denna heterogenitet innebar också att känsligheten och specificiteten för enskilda autoantigenreaktiviteter att särskilja mellan MS och icke-MS inte var särskilt hög (Receiver Operating Characteristic, ROC, med ett värde på 0,67–0,77). För att utvärdera om autoreaktivitet kunde ha värde som diagnostiskt test gick vi vidare och skapade en modell där i stället antalet olika autoreaktiviteter användes för att särskilja mellan MS och icke-MS. Detta i sin tur genererade ett test med hög sensitivitet och specificitet, med en ROC-värde på 0,88 [Figur 2].

Det fanns inga starka korrelationer mellan autoreaktivitet och ålder, EDSS (expanded disability status scale), sjukdomsduration eller behandlingstid. Dock var autoreaktiviteten generellt högre hos män än kvinnor, vilket passar in med observationen att män ofta har en aggressivare sjukdom. Intressant nog fanns också hög autoreaktivitet hos patienter trots mångårig framgångsrik natalizumabbehandling, något som

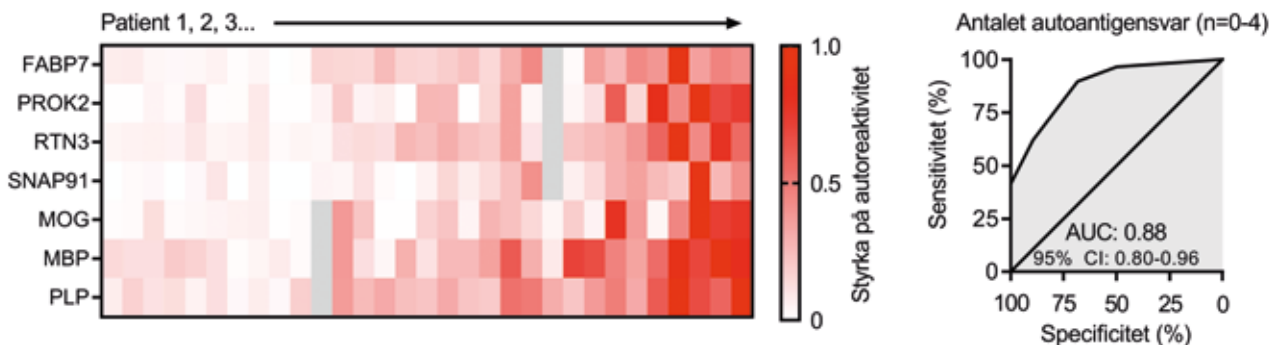
kan förklara den höga risken för skov efter avslut av behandling.

INFILTRERAR HJÄRNAN

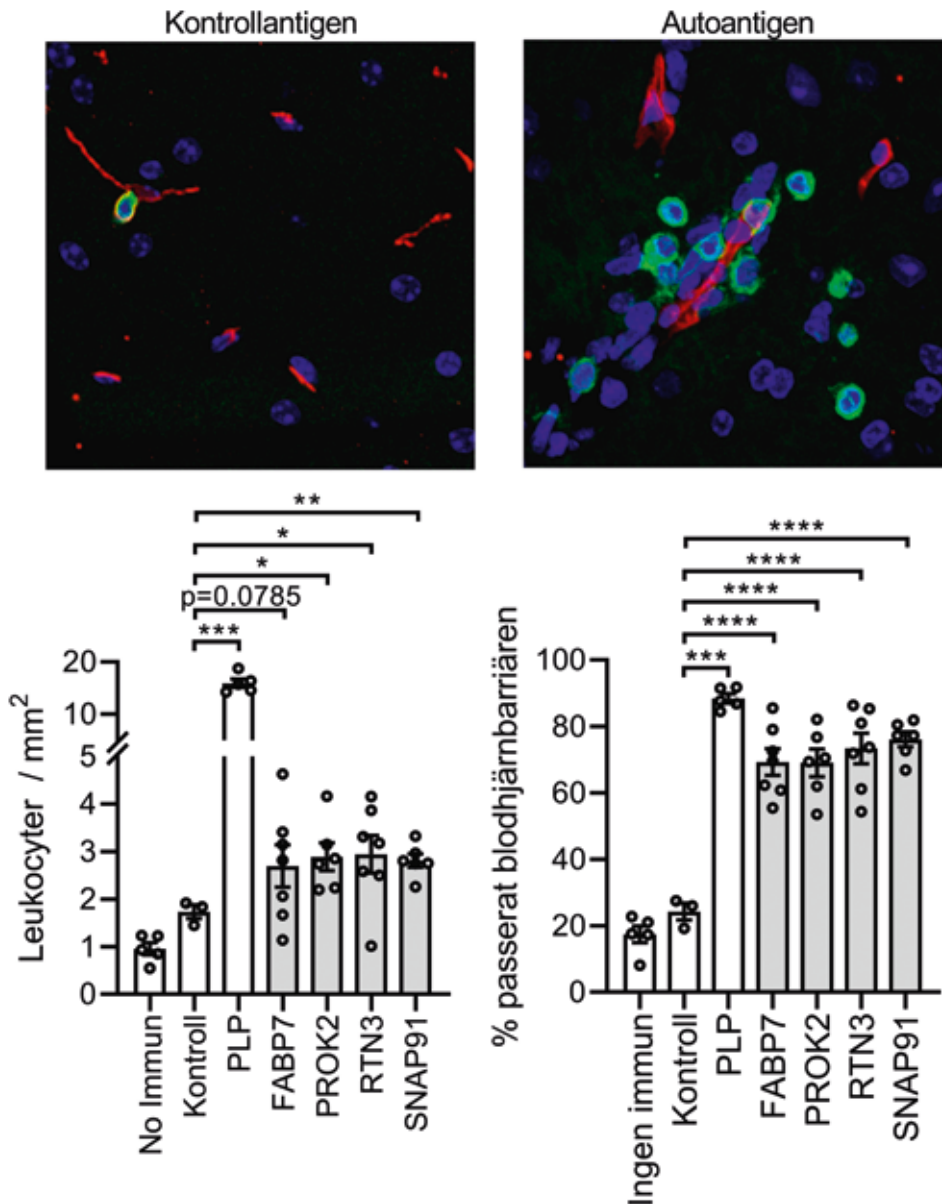
För att undersöka om T-celler specifika mot just dessa autoantigen har potential att angripa CNS användes en musmodell där möss immuniserades mot antigenen. Hjärnan och ryggmärgen undersöktes sedan med mikroskopi. I modellen kunde vi se att möss utvecklade ett immunsvaret mot samtliga antigen efter immunisering, vilket också ledde till att leukocyter migrerade till CNS och passerade blod-hjärnbarriären, vilket inte syntes vid immunisering med ett kontrollantigen [Figur 3]. Detta talar för att autoreaktiva T-celler specifika mot de nya autoantigenen får encefalitogena egenskaper och kan bidra till patofysiologin vid MS.

IMPLIKATIONER

Sammanfattningsvis har vi i denna studie identifierat fyra nya MS-autoantigen genom en bred screening av T-cellsreaktivitet. Våra resultat pekar också mot att inget enskilt autoantigen verkar vara nyckeln bakom MS utan att det är en immunologiskt heterogen sjukdom där snarare summan av flertalet olika autoreaktiviteter bidrar till sjukdomsutveckling. De identifierade



Figur 2. Autoreaktiva profiler och diagnostisk potential. Vänster: Enskilda autoreaktivitetsprofiler hos obehandlade personer med MS. Varje kolumn representerar en individ. Styrkan på autoreaktivitet normaliserad till en 0–1-skala. Höger: ROC-kurva som visar sensitivitet och specificitet baserat på antalet autoreaktiviteter från 0–4. Bild utarbetad från Bronge M, et al. 2022.⁶



Figur 3. Autoreaktiva T-celler infiltrerar hjärnparenkymet. Överst: Representativa immunohistokemiska bilder från mushjärna efter immunisering med kontrollantigen (vänster) eller autoantigen (höger). Blå färg representerar cellkärnor (DAPI), grön färg leukocyter (CD45) och röd färg blodkärlsendotel (podocalyxin). Nedre: Totalt antal detekterade leukocyter och andelen som passerat över blodhjärnbarriären efter immunisering med olika antigen. Bild utarbetad från Bronge M, et al. 2022.⁶

autoantigenen öppnar upp för nya diagnostiska metoder med mätning av autoreaktivitet, vilket kan vara användbart i fall där diagnostik av patienter är svår. Samtidigt utgör de också mål för framtida försök med bredare antigen-specifika immunoterapier med förhoppningsvis bättre effekt än vad man hittills lyckats nå där man bara, till stor del på grund av brist på kunskap, endast använt sig av enstaka autoantigen. Vidare kan en metod att identifiera individuella autoreaktiva profiler bidra till att kunna "subgruppera" personer med MS och hjälpa till att styra individuella behandlingsval. För detta krävs det dock vidare studier med fokus på att se huruvida autoantigenprofiler kan fungera som biomarkörer för prognos,

något vi håller på med för tillfället. En sista observation är att autoreaktiva T-celler finns kvar i blodet i många år trots effektiv natalizumabbehandling, där T-cellerna inte möter sitt CNS-autoantigen och alltså teoretiskt bör minska i antal. Detta antyder att de på något sätt underhålls med stimulering av sitt antigen även utanför CNS, vilket skulle kunna tyda på att exempelvis virus eller andra mikroorganismer utgör det primära målet för det i MS missriktade immunsvaret.



MATTIAS BRONGE
Doktorand, Institutionen för klinisk neurovetenskap, Karolinska Institutet
mattias.bronge@ki.se

REFERENSER

1. Reich DS, Lucchinetti CF & Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2018; 378:169-180.
2. Olsson T, Barcellos LF & Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2017; 13:25-36.
3. Hohlfeld R, Dornmair K, Meinl E & Wekerle H. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: autoreactive CD4+ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets. *Lancet Neurol* 2015; (2015).
4. Anderton SM. Peptide immunotherapy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biomed J* 2015; 38:206-214.
5. Wraith D. Autoimmunity: Antigen-specific immunotherapy. *Nature* 2016; 530:422-423.
6. Bronge M, et al. Identification of four novel T cell autoantigens and personal autoreactive profiles in multiple sclerosis. *Sci Adv* 2022; 8:eabn1823.
7. Uhlen M, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015; 347:1260419.
8. Dillenbeck T, Gelius E, Fohlstedt J & Ahlborg N. Triple Cytokine FluoroSpot Analysis of Human Antigen-Specific IFN-gamma, IL-17A and IL-22 Responses. *Cells* 2014; 3:1116-1130.