

199800372A

厚生科学研究費補助金  
(脳科学研究事業)

多発性硬化症の病態機構と新しい治療法開発  
に関する研究

平成10年度研究報告書

主任研究者  
山村 隆

平成11年3月

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

多発性硬化症の病態機構と新しい治療法開発に関する研究

主任研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第六部 室長

研究要旨

最近の我々の研究により、natural killer (NK)細胞、および natural killer T (NK-T)細胞が、自己免疫病の発症抑制に決定的な役割を果たしていることがわかってきた。本年度はNK-T細胞を欠損するJ $\alpha$ 281ノックアウト・マウスを利用し、多発性硬化症の動物モデル自己免疫性脳炎(EAE)におけるNK-T細胞の役割を証明した。さらにNK-T細胞の糖脂質リガンドであるアルファ-ガラクトシル・セラミドを合成し、本リガンドがインターフェロン・ガンマ欠損マウスにおけるEAEを抑制することを証明した。この観察は、インターフェロン・ガンマ産生を誘導せずにNK-T細胞を刺激する方法の開発研究へと発展し、最終的にB7-2とCD28分子の相互作用を阻害した条件下での糖脂質投与によりEAEの治療が可能なことまで明らかになった。このようにして自己免疫病の糖脂質による治療が世界ではじめて成功した。

分担研究者

原 英夫 九州大学脳研神経内科助手  
高 昌星 信州大学第三内科講師  
田平 武 国立精神・神経センター  
疾病研究第六部 部長

A. 研究目的

難治性自己免疫疾患多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS)は自己免疫性T細胞の介在する自己免疫病であり、免疫学の理論に則った治療が成功することが期待されている。我々は、これまで独自にMSの免疫学的機構に関する研究を行ってきたが、これまで癌の研究者のテーマであったnatural killer (NK)細胞やnatural killer T (NK-T)細胞が自己免疫病予防、または制御の鍵を握る細胞であることを明らかにした (J. Exp. Med. 186: 1677-1687, 1997; 論文投稿中)。本研究の目的は、多発性硬化症におけるNK細胞やNK-T細胞の異常を明らかにし、それらの異常を矯正し疾患の制御に結びつくような方法を開発することにある。昨年度は、MS患者の末梢血においてNK-T細胞が著明に減少していることを証明できた (論文準備中)。本年度は、NK-T細胞の作用機構に関する解析と、NK-T細胞リガンドによる治療実験において、大きな成果が得られたので報告する。

B. 研究方法

1. 感作EAEはミエリン・オリゴデンドロサイト糖蛋白(MOG)35-55ペプチドと完全フロイントの免疫によった (詳細は J. Exp. Med. 186: 1677-1687, 1997 に記載)。受身型EAEはMOG35-55 特異的T細胞株の移入によって誘導した。TCR J $\alpha$ 281<sup>-/-</sup>マウスは、千葉大学谷口克教授より供与を受けた。

2.  $\alpha$ -galactosyl ceramide ( $\alpha$ -GalCer)治療実験には、wild-type C57BL6 (B6)マウス、IL-4<sup>-/-</sup>マウス、IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスを利用し、 $\alpha$ -GalCerはEAE誘導操作を加えて2日以内に腹腔内投与した(2  $\mu$ g/mouse)。

3.  $\alpha$ -GalCerでパルスした抗原提示細胞による治療実験は、B6マウスの脾細胞を用いて行った。すなわち脾細胞を $\alpha$ -GalCer単独、あるいは抗B7-2抗体、抗B7-1抗体単独、または各々の抗体と $\alpha$ -GalCerにより4時間パルスし、よく洗浄してから静脈内に移入した(1 x 10<sup>7</sup>個/マウス)。

C. 研究結果

1. wild-type B6マウスでは、MOG35-55感作後12-18日後にmildなEAEの発症を見た。一方、NK-T細胞を欠損するJ $\alpha$ 281<sup>-/-</sup>マウスでは、一週間以上も早期に発症した(免疫後5-8日)。このような早期発症は、これまで報告がないだけでなく、EAEを誘導する脳炎惹起性T細胞が、数少ない未分化な前駆細胞から誘導されるというこれまでのドグマを否定するものである。

2. NK-T細胞のないマウスでは、感作EAEの早期発症に伴って血清中IFN- $\gamma$ の著明な上昇が見られた。抗IFN- $\gamma$ 抗体をin vivo投与したところ、発症は5日以上遅延した。すなわち、EAEの早期発症にIFN- $\gamma$ の関与することが明らかになった。

3. 受身型EAEの発症日はwild-type B6マウスでもJ $\alpha$ 281<sup>-/-</sup>マウスでも差がなく、NK-T細胞の調節効果は主にinduction phaseに向けられていることがわかった。

4.  $\alpha$ -GalCer単回投与によるEAEの治療実験の結果、wild-typeマウスのEAEはまったく修飾されないことがわかった。一方、IL-4<sup>-/-</sup>マウスのEAEは有意に増悪し、またIFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスのEAEは有意に抑制された。これらの結果は、NK-T細胞がIL-4とIFN- $\gamma$ を重要なmediatorとして使っているという事実からうまく説明される。すなわち、 $\alpha$ -GalCerによる刺激の結果、wild-typeマウスのNK-T細胞は、機能的に等しい量のIL-4とIFN- $\gamma$ を放出するために見かけ上EAEの増悪も抑制も起こらない。しかし、IL-4またはIFN- $\gamma$ がノックアウトされた条件では、それぞれIFN- $\gamma$ の効果（疾患増悪）、IL-4の効果（疾患抑制）が顕著に見られるものと考えられる。

5. つぎにwild-type B6マウスのNK-T細胞を刺激してIL-4産生のみを誘導するような条件を探った。T細胞の研究では、costimulation signalを阻害するような条件下でTCRシグナルを入れると、疾患抑制的なサイトカイン（IL-10やIL-4など）の産生が誘導できることが報告されている。そこで、wild-type B6マウスのNK-T細胞を、さまざまな抗体の存在下において $\alpha$ -GalCerで刺激し、培養上清中のIFN- $\gamma$ とIL-4を測定した。その結果、抗B7-2抗体存在下の刺激では、IL-4の産生が増強され、かつIFN- $\gamma$ 産生が完全に阻害されることがわかった。

6. そこで、抗B7-2抗体と $\alpha$ -GalCerの存在下に、wild-type B6マウスの脾細胞を4時間培養し、良く洗浄したあとMOG<sub>35-55</sub>で感作を受けたマウスに注入した。その結果、対照の脾細胞（抗体単独、または $\alpha$ -GalCer単独）に比較して、抗B7-2抗体と $\alpha$ -GalCerで培養した脾細胞は、明らかにEAE症状を軽減させた。

#### D. 考察

J $\alpha$ 281<sup>-/-</sup>マウスを利用した実験の結果、これまで抗体を使った実験により示唆されていたNK-T細胞のEAEに対する免疫調節効果が、一点の疑いもないものとなった。これまで我々は、MSの

末梢血においてNK-T細胞数が著明に減少していることを報告しているが、MS病態において大変重要な意味を持つ現象ではないかと考えられるに至った。

$\alpha$ -GalCerによる転移癌の治療実験は既に報告されているが、自己免疫病が糖脂質で治療できたという報告はこれまでない。我々は最初wild-type B6マウスを利用して試みたが、失敗に終わった。その後遺伝子ノックアウト・マウスを活用することによって、なぜうまく行かないのか理由がわかった。すなわち $\alpha$ -GalCerによる刺激は、NK-T細胞が転移癌を排除する活性とともに、IFN- $\gamma$ 産生、IL-4産生を誘導する。IFN- $\gamma$ 産生は明らかに治療的観点からは好ましくないものなのである。

そこでIFN- $\gamma$ 産生を誘導しない条件を探索した結果、抗B7-2抗体+ $\alpha$ -GalCer投与の有効性を見だし、 $\alpha$ -GalCerによるEAE治療の成功に至った。これまで報告のない成果であり、今後大きな展開が期待できる。

#### E. 結論

NK-T細胞は自己免疫性脳炎の調節の鍵を握る細胞であり、糖脂質により活性化することにより治療的効果が得られることが明確になった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Zhang, B-n., and T. Yamamura: The role of natural killer (NK) cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. Proceedings for the 10th International Congress of Immunology 1089-1092, 1998

2) Iles, Z., T. Kondo, K. Yokoyama, T. Ohashi, T. Tabira, and T. Yamamura: Identification of autoimmune T cells among in vivo expanded CD25<sup>+</sup> T cells in multiple sclerosis. J. Immunol. 162:1811-1817, 1999

3) 山村 隆: SSCP法で見た多発性硬化症の増悪. 神経内科 vol. 49 (suppl. 1) 84-85, 1998

4) 山村 隆: SSCP法による多発性硬化症免疫病態の解析. 神経免疫学 7:24-25, 1999

5) 川村 和之、山村 隆、福井 宣規、笹月 健彦、Chella S. David、猪子 英俊、田平 武: HLA-DR2 トランスジェニックマウスから樹立した proteolipid protein 95-116 特異的 T cell line の性状について. 神経免疫学 7:28-29, 1999

6) 張 本寧、川村 和之、田平 武、山村 隆:

$\beta$ 2-microglobulin<sup>+</sup>マウスにおける hyperacute EAE の誘導とその解析. 神経免疫学 7:30-31, 1999

7) Fazekas, G., T. Tabira and T. Yamamura: Enhancement of active and passive EAE by T cell receptor peptide specific T cells. Neuroimmunology 7: 32-33, 1999

8) 山村 隆: T細胞ワクチン、T細胞レセプターワクチンを利用した免疫制御療法. 医学のあゆみ 185: 239-243, 1998

9) 山村 隆: T細胞と自己免疫病. Mebio 15: 56-61, 1998

10) 山村 隆: 調節細胞研究から多発性硬化症治療へ. 医学のあゆみ 185:937-940, 1998

11) 山村 隆: NK細胞による免疫制御. 免疫 Immunology Frontier 8:290-293, 1998

12) 山村 隆: NK細胞、NKT細胞と自己免疫病. 最新医学 53:2724-2727, 1988

13) 山村 隆: 免疫性神経疾患におけるT細胞レセプターの解析. Brain Medical 10:17-22, 1998

14) 山村 隆: NK細胞と神経免疫疾患. 神経免疫学 6:13-18, 1998

15) 山村 隆、張 本寧: NK、NKT細胞による自己免疫性脳炎の調節. Annual Review 免疫 1999, 中外医学社, pp 300-306, 1998

## 2. 学会発表

1) Yamamura, T., B-n. Zhang, T. Tabira. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer cells. American Academy of Immunology Meeting (98' Experimental Biology) April 22, 1998

2) Kawamura, K., T. Yamamura, T. Tabira. Proteolipid protein 95-116-specific response in DR2 transgenic mice. The International Society of Neuroimmunology, Fifth International Congress. Montreal. August 24, 1998

3) Nakagaki, K., T. Yamamura, K. Nakagaki, T. Ishida, T. Tabira. Feline immunodeficiency virus-associated neuropathological alterations induced by inflammatory cytokines. The International Society of Neuroimmunology, Fifth International Congress. Montreal. August 26, 1998

4) Illes, Z., T. Kondo, K. Yokoyama, T. Ohashi, T. Tabira, and T. Yamamura. Identification of autoimmune T-cells among in vivo expanded CD25<sup>+</sup> T-cells in multiple sclerosis. The International Society of Neuroimmunology, Fifth International Congress.

Montreal. August 26, 1998

5) Illes, Z., T. Yamamura, T. Kondo, T. Tabira, J. Newcombe. Selective loss of invariant Va24-JaQ<sup>+</sup> T-cells in multiple sclerosis. The International Society of Neuroimmunology, Fifth International Congress. Montreal. August 26, 1998

6) Yamamura, T., B.n. Zhang, T. Tabira, M. Taniguchi. Differential roles of NK and NK-T cells for regulation of EAE. The International Society of Neuroimmunology, Fifth International Congress. Montreal. August 26, 1998

7) Zhang, B.n., T. Tabira, and T. Yamamura. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. The International Society of Neuroimmunology, Fifth International Congress. Montreal. August 26, 1998

8) Zhang, B.n., T. Tabira, and T. Yamamura. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. 10th International Congress of Immunology, New Delhi, 1-6 November, 1998

9) Zsolt Illes, T. Yamamura, T. Kondo and T. Tabira: Selective loss of invariant V $\alpha$ 24<sup>+</sup> T-cells in the peripheral blood of MS. 第39回日本神経学会総会, 京都, 1998年5月20日

10) 原 英夫, 越知 博文, 吉良 潤一, 山村 隆, Gyogyo Fazekas, 田平 武: 可溶型 T cell receptor の作成と EAE の解析. 第39回日本神経学会総会, 京都, 1998年5月20日

11) 張 本寧, 山村 隆, 田平 武: 自己免疫性脳脊髄炎の免疫調節におけるNK-T細胞とNK細胞の役割. 第39回日本神経学会総会, 京都, 1998年5月20日

12) 川村 和之, 山村 隆, 田平 武: DR2トランスジェニックマウスから樹立した proteolipid protein 95-116 特異的 T cell line の性状. 第39回日本神経学会総会, 京都, 1998年5月21日

13) 出塚次郎, 菊川公紀, 近藤譽之, 田中恵子, 田中正美, 山村 隆, 田平 武, 辻 省次: 多発性筋炎及び封入体筋炎患者の筋内浸潤 T細胞の T細胞レセプターの解析と  $\beta$ 鎖優先使用の有無の検討. 第39回日本神経学会総会, 京都, 1998年5月22日

14) 張 本寧, 山村 隆:  $\beta$ 2-microglobulin<sup>+</sup>マウス

スにおける hyperacute EAE の誘導とその解析. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会, 神戸, 1998 年 12 月 3 日

15) 山村 隆, Tong-chao Geng: ミエリン塩基性蛋白(MBP)とプロテオリピッド蛋白(PLP)を共認識する T 細胞による脳炎誘導. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会, 神戸, 1998 年 12 月 3 日

16) 川村 和之、山村 隆、田平 武、福井 宣規、笹月 健彦、猪子 英俊: DR2 トランスジェニックマウス(Tg)における DR2 拘束性 T 細胞エピソードに対する免疫応答の解析. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会, 神戸, 1998 年 12 月 3 日

17) Gyorgy Fazekas, Takeshi Tabira, Takashi Yamamura: Regulatory potential of T cell receptor peptide specific T cells: Characterization of alpha chain CDR3 peptide specific T hybridomas. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会, 神戸, 1998 年 12 月 3 日

18) Endre Pal, Takeshi Tabira, Takashi Yamamura: Sympathetic nervous system modulation of the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会, 神戸, 1998 年 12 月 3 日

19) Ki-Hoan Nam, Zsolt Illes, Akiko Yamanaka, Hiroshi Shibata, Keiji Terao, Yasuhiro Yoshikawa, Takashi Yamamura: Detection of macaque monkey T cell clonality using single-strand conformation polymorphism (SSCP). 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会, 神戸, 1998 年 12 月 3 日

20) 川村 和之、山村 隆、福井 宣規、笹月 健彦、Chella S. David、猪子 英俊、田平 武: HLA-DR2 トランスジェニックマウスから樹立した proteolipid protein 95-116 特異的 T cell line の性状について. 第 11 回日本神経免疫学会学術集会, 東京, 1999 年 2 月 16 日

21) 張 本寧、川村 和之、田平 武、山村 隆:  $\beta$ 2-microglobulin<sup>+</sup>マウスにおける hyperacute EAE の誘導とその解析. 第 11 回日本神経免疫学会学術集会, 東京, 1999 年 2 月 16 日

22) Gyorgy Fazekas, Takeshi Tabira, and Takashi Yamamura: Enhancement of active and passive EAE by T cell receptor peptide specific T cells. 第 11 回日本神経免疫学会学術集会, 東京, 1999 年 2 月 16 日

23) 山村 隆: 多発性硬化症の病態と感染因子の影響. 第 39 回日本神経学会シンポジウム-2 感染

と免疫の関連. 平成 10 年 5 月 21 日, 京都.

24) Yamamura T: Regulation of EAE by NK and NKT cells. International Symposium "Immunoregulation and Multiple Sclerosis - Basic Understanding and Therapeutic Implications" Organized by: Department of Demyelinating Disease and Aging National Institute of Neuroscience, NCNP. Supported by: Ministry of Health and Welfare and Japan MS Society, November 18, 1998, Kodaira

25) 山村 隆: SSCP 法による多発性硬化症免疫病態の解析. 第 11 回日本神経免疫学会. シンポジウム"日本における多発性硬化症の臨床的・免疫学的多様性"平成 11 年 2 月 17 日、東京

26) Yamamura T and Ben-ning Zhang: Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer and natural T cells. Interactive Workshop-28. Neuroimmunobiology and autoimmune disorders of CNS including prions (chair H.Wekerle and V.K. Kuchroo). 10th International Congress of Immunology, New Delhi, 1-6 Nov 1998

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

多発性硬化症の病態機構と新しい治療法開発に関する研究

分担研究者 原 英夫 九州大学医学部脳研神経内科 助手

研究要旨

多発性硬化症の病態を解明し新しい治療法を導入するに当たって、T細胞の調節機構の基礎研究は重要である。本年度は、T細胞とアストロサイトの細胞間相互作用に関与する未知の因子の同定を試みた。活性化アストロサイト細胞株に特異的に発現する未知のcDNAを選別し、CHO細胞に遺伝子導入した。その中から、脳炎惹起性T細胞の細胞死を誘導できるクローン数個が見いだされた。グリア由来産物を用いた新しい治療法の確立に結びつく可能性がある。

A. 研究目的

脳内における免疫応答の調節機構を解明し、その中から治療に有用な物質を同定することを本研究の目的とした。今年度は、アストロサイト由来の自己反応性T細胞抑制因子を解明し、その遺伝子をクローニングした。

B. 研究方法と結果

マウス由来のアストロサイト細胞株 (G26-24) を培養し、IFN- $\gamma$  で処理したアストロサイトの 1st strand cDNA より、未処理のアストロサイトの mRNA を subtraction し、一本鎖の subtracted cDNA ライブラリーを作成した。これをプローブとして先に作成しておいた IFN- $\gamma$  で処理したアストロサイト由来の cDNA フェージライブラリーをスクリーニングした。その結果、IFN- $\gamma$  で処理したアストロサイトに特異的に発現している cDNA、約 100 クローン が得られた。

100 個の cDNA クローンを全てシーケンスし解析した。各クローンの homology 検索を NIH の gene database を用いて行ったところ、既知のクローンは、47 クローンで、heat shock protein や MHC class I などがあった。一部 homology が認められたクローンは7個で、espin などの遺伝子と 50-100 塩基 の範囲で homology が認められたが、残りのシーケンスは未知であった。全く未知のクローンは46クローンであった。

未知の cDNA クローンを動物細胞発現ベクターに組み込み、CHO cell line へ遺伝子導入し、蛋白を発現させた。一方で、SJL/J マウスに MBP を

免疫し、そのリンパ節・脾細胞からリンパ球を分離し、MBP 反応性 T 細胞株を作成した。この MBP 反応性 T 細胞を先程の遺伝子導入した CHO cell line の上で共培養し、どの遺伝子を導入した CHO cell line において T 細胞に apoptosis が誘導されるか解析した。その結果、数個のクローンにおいて、T 細胞の apoptosis の誘導が認められた。

C. 考察と結論

多発性硬化症の動物モデル EAE においては、脳炎惹起性 T 細胞の脳内アポトーシス誘導が示唆されている。EAE の回復するメカニズムは複雑であるが、少なくとも一部にはグリア細胞と T 細胞の相互作用が関与する可能性が考えられている。我々の研究は、グリア細胞由来因子の中に脳内免疫応答を強力に制御するものがあるという予測のもとに開始された。既にアストロサイトの産生する TGF- $\beta$  の役割が示唆されているが、今回未知の物質の中から T 細胞抑制活性を持つ物質を同定できた。脳内免疫応答の遺伝子治療などに有用である可能性があり、今後も研究を継続する必要がある。

D. 研究発表

本研究に関しては公表を控えている。

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

多発性硬化症の病態機構と新しい治療法開発に関する研究

分担研究者 高 昌星 信州大学第三内科 講師

**研究要旨**

免疫性脱髄疾患の発症機序を検索するため、副刺激因子である B7-1, B7-2 分子の果たす役割を検討した。SJL/J マウスに TMEV-IDD を作成し、感染あるいは感作後抗 B7-1 あるいは B7-2 モノクローナル抗体を投与、症状観察後種々の免疫学的検索を行った。対照群では全例発症したが抗 B7-1 抗体投与群では有意に発症を抑制、抗 B7-2 抗体投与群では発症を増悪させた。対照群及び抗 B7-2 抗体投与群では Th1 系サイトカイン産生が優位であり、抗 B7-1 抗体投与群では Th 1 系サイトカイン産生の抑制がみられた。また両抗体投与群では TTMEV-IDD では増悪傾向にあった。今回の研究により B7-1 は Th 1 への分化に B7-2 は Th 2 の分化に深く関与しているという従来の説が脱髄疾患モデルにおいても裏付けられ、病因に重要な役割を果たしていることが示された。なを両者をブロックした際の結果については TMEV-IDD では CD28 からは正のシグナルと、CTLA-4 からは負のシグナルのバランスに疾患による差があるものと考えられた。

**A. 研究目的**

T細胞の活性化には T細胞受容体複合体を介した認識シグナルと CD28 分子を介した副刺激が必要である。B7-1, B7-2 は T細胞上に発現する CD28 や CTLA-4 に結合し、T細胞の活性化やその抑制を制御しており、Th1/Th2 細胞の誘導に深く関与している。一方 CD4 陽性 Th1 細胞が中心的な役割を果たすタイラー脳脊髄炎ウイルスによる免疫性脱髄疾患（TMEV-IDD）はともに代表的なヒト多発性硬化症（MS）の動物実験モデルである。今回 TMEV-IDD の発症機序を検索するため、CD28 分子のリガンドである B7-1, B7-2 分子の果たす役割を検討した。

**B. 研究方法**

モノクローナル抗体(mAb)の作製：

抗 B7-1(CD80)mAb(3H5--rat, RM80--mouse), 抗 B7-2 (CD86)mAb(24F--rat, PO3--mouse)産生ハイブリドーマは各々培養増殖させた後ヌードマウス腹腔内に移入し抗体を得た。各抗体は protein G column にて精製後使用した。

脱髄疾患動物モデルの誘導および mAb 投与：

TMEV-IDD は SJL/J マウスの右大脳半球にタイラー脳脊髄炎ウイルス BeAn8386 を脳内感染させて誘導した。マウスを 4 群に分け day4, 14 に mAb(500mg/100ml/mouse)に抗 B7-1mAb(RM80), 抗 B7-2 mAb(PO3)を投与した。

A 群--control rat IgG,

B 群-- 抗 B7-1mAb(RM80)

C 群--抗 B7-2 mAb(PO3),

D 群--抗 B7-1mAb(RM80)+抗 B7-2 mAb(PO3)

臨床症状の観察、症状の評価：

TMEV-IDD

Normal: 0, Slight waddling gait: 1, Waddling gait: 2  
Spastic hind limb paralysis: 3 Severe hind limb paralysis accompanied by incontinence: 4

抗原特異的遅延型過敏反応：脳内接種 50 日後各マウスの耳の厚さをデジマチックマイクロメータにて測定した。この後 10ml PBS 中 5 mg の精製 TMEV を耳の背側に注入し 24 時間後に同様に測定し耳の厚さの増加度を検討した。

抗原特異的T細胞増殖アッセイ：各群のマウスあるいはラットをエ-テル麻酔下にて屠殺後、脾細胞を取り出し、96穴培養マイクロプレートにて1穴あたり $5 \times 10^5$ に調整してRPMI1640, 0.5%同種血清中で培養した。3穴ずつ同条件で各穴に特異抗原を1, 5mgずつ加えて刺激し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で72時間培養した。こののち各穴にトリチウムチミジンを1mCi加え24時間後にハーベストし、液体シンチレーションカウンターにて細胞のトリチウムチミジンの取り込みを測定した。

抗TMEV抗体：マウスは屠殺前に採血し、血清を保存した。紫外線不活化精製TMEVを抗原としてELISA法にて抗TMEV抗体を測定した。

ELISPOTアッセイ：個々の脾細胞のサイトカイン産生能についてELISPOT法について検討した。培養マイクロプレートの各穴の底にニトロセルロース膜をしきに各種抗サイトカイン抗体を吸着させた。この膜上に脾細胞を $1 \times 10^5$ /穴の割合で入れ、培養液中で24時間培養した。このニトロセルロース膜をウサギ抗マウスサイトカイン抗体と反応させ、さらにヤギアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ抗体と反応させた後基質を加え、膜上のサイトカインをスポットとして出現させ拡大鏡下にてスポット数を算定した。

組織学的検索：各5匹のマウスをパラホルムアルデヒドで灌流固定後、パラホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドにて浸潤固定し、標本作製した。

### C. 研究結果

TMEV-IDDでは抗B7-1抗体投与群では非特異的IgG投与群に比し明らかな抑制が認められた。抗B7-2抗体投与群、両抗体投与群では明らかな差が認められなかった。また抗原特異的遅延型過敏反応、抗原特異的T細胞増殖アッセイともに抗B7-1抗体投与群では非特異的IgG投与群に比し抗原特異的細胞性免疫反応の低下がみとめられた。これに対し抗B7-2抗体投与群、両抗体投与群では明らかな差が認められなかった。抗TMEV抗体は4群いずれも抗TMEV抗体の上昇がみられ、4群間に有意な

差異は認められなかったがアイソタイプの検索では、抗B7-1抗体投与群ではIgG2aが検出されなかったのに対し他の3群ではIgG2aも検出された。ELISPOT法による脾細胞のサイトカイン産生能では抗B7-1抗体投与群では炎症性サイトカインであるTNF $\alpha$ , IFN-gの産生能は他群に比し低下していたが、IL4, IL10などのTh2系サイトカインは比較的優位の傾向にあった。

### D. 考察

T細胞はAPCから抗原特異的な第1シグナルとCD28, CTLA-4などの副刺激分子を介した第2シグナルを受け取ることによって、初めて抗原に対して増殖、分化反応を起こす。副刺激分子のなかでもCD28からは正のシグナルが、CTLA-4からは負のシグナルが伝達され、このバランスによりT細胞の反応の調節が行われていると考えられるが、詳細は不明である。CD4陽性Th1細胞が中心的な役割を果たすTMEV-IDDにおいてこの副刺激が脱髄疾患の病因にどのような影響を与えているかこれまで詳細な検討が行われていなかった。今回の研究によりB7-1はTh1への分化にB7-2はTh2の分化に深く関与しているという従来の説が脱髄疾患モデルにおいても裏付けられた結果となった。

TMEV-IDDではCD28からは正のシグナルと、CTLA-4からは負のシグナルのバランスに疾患による差があるもの考えられた。

### E. まとめ

免疫性脱髄疾患の発症機序を検索するため、副刺激因子であるB7-1, B7-2分子の果たす役割を検討した。SJL/JマウスにTMEV-IDDを作成し、感染あるいは感作後抗B7-1あるいはB7-2モノクローナル抗体を投与、症状観察後種々の免疫学的検索を行った。対照群では全例発症したがTMEV-IDD, EAEともに抗B7-1抗体投与群では有意に発症を抑制、抗B7-2抗体投与群では発症を増悪させた。対照群及び抗B7-2抗体投与群ではTh1系サイトカイン産生が優位であり、抗B7-1抗体投与群ではTh1系サイトカイン産生の抑制がみられた。今回の研究によりB7-1はTh1への分化にB7-2はTh2の分化に深く関与しているという従来の



説が脱髄疾患モデルにおいても裏付けられ、病因に重要な役割を果たしていることが示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Inoue A, Koh C-S, et al: Suppressive effect on Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease by the administration of anti-IL-12 antibody. *J Immunol* 5586, 1998
- 2) Yauch RL, Palma JP, Yahikozawa H, Koh C-S, Kim BS: Role of individual T-cell epitopes of Theiler's virus in the pathogenesis of demyelination correlates with the ability to induce a Th1 response. *J Virol* 72: 6169, 1998

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

多発性硬化症の病態機構と新しい治療法開発に関する研究

分担研究者 田平 武 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第六部 部長

**研究要旨**

多発性硬化症の病態を解明し新しい治療法を導入するに当たって、霊長類を利用した研究は齧歯類では得ることのできない情報をもたらす。本研究ではカニクイザルに実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導する条件を決定し、カニクイザル NK 細胞のフロー・サイトメトリーによる解析法、サル T 細胞抗原受容体 (TCR) クロノタイプの SSCP 法による解析法などを確立した。サルの NK 細胞が CD8 抗体、CD56 抗体、CD16 抗体の組み合わせによって、二つの分画に分離できること、それぞれの EAE における動態はまったく異なることなどが、はじめて明らかになった。

研究協力者

山村 隆 国立精神・神経センター

疾病研究第六部 室長

寺尾 恵治 国立感染研筑波霊長類センター

室長

(VLA subfamily)、CD14 (モノサイト・マーカー)、CD58 (LFA-3) である。

3. ヒト SSCP 法を改変して、カニクイザルの SSCP 法を確立した。プライマーその他の詳細な条件については論文 (Nam et al.) 発表まで未公表とする。

**A. 研究目的**

多発性硬化症 (MS) の病態の研究において、霊長類に誘導した EAE は魅力ある材料として注目されている。ヒトで利用できる抗体の相当の部分がそのまま転用できること、ヒトの治療薬 (遺伝子治療を含む) の検討材料として適していること、などがその理由である。しかし、国際的に見ても、霊長類が利用できる研究施設はごく限られており、基礎的な研究も充分とは言えない。本研究では、MS のモデルとしてカニクイザルの EAE を確立し、サルに適した先端的な解析法を、基盤技術として確立することを目的とした。

**B. 研究方法**

1. EAE の誘導には 3-6 歳雌カニクイザルを選び、同種脳と完全フロイント・アジュバントのホモジェネートを作製し皮下接種した。同日および 48 時間後に百日咳トキシンを静脈内投与し、以後連日臨床観察した。

2. 1 週間毎に採血し、フロー・サイトメトリーで検討した。使用した抗体は、抗 CD20 (B 細胞マーカー)、抗 CD16、抗 CD56、抗 CD3、抗 HLA-DR、抗 CD4、抗 CD8、抗 CD25、抗 CD69 (早期活性化マーカー)、抗 CD28、抗 CD29

**C. 研究結果**

1. 百日咳トキシンを投与しない条件で EAE は誘導できなかった。しかしトキシンを追加することによって、6 頭中 4 頭に明らかな EAE を誘導することに成功した。発症は早いもので免疫後 2 週間、遅いもので 3 週間後であり、対光反射消失に引き続いて、麻痺、無動などの症状を呈した。

2. 末梢血のフロー・サイトメトリー検索では、まずカニクイザルの NK 細胞が、CD8+CD16+ の分画と CD8-CD56+CD16+ の分画に分かれることが明らかになった。さらに、CD8+CD16+ NK 細胞は、EAE 誘導操作の後増加傾向にある一方で、CD8-CD16+ NK 細胞は、明らかに減少した。したがって NK 細胞分画間の機能的な差異が明らかになった。

3. SSCP 法によるカニクイザル TCR レパトアの解析法が確立した。cell sorting を組み合わせることにより、CD8 陽性分画におけるクローン増殖が著しいこと、クローン増殖は最低三ヶ月間以上続くこと、個体差を越えた同一クローンの増殖が見られることなど、が明らかになった。

**D. 考察**

今回の研究は将来の研究へ向けた基盤研究で

あるが、決して予報的なものではなく直ちに利用可能な技術開発に成功したものと評価できる。

霊長類の EAE は、将来グリア増殖因子等による遺伝子治療を導入する際に有用であり、SSCP 法は TCR ワクチンの有効性評価などに役立つであろう。

## E. 結論

カニクイザルに EAE を誘導する方法とその評価系を確立した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Illes, Z., T. Kondo, K. Yokoyama, T. Ohashi, T. Tabira, and T. Yamamura: Identification of autoimmune T cells among in vivo expanded CD25<sup>+</sup> T cells in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 162:1811-1817, 1999
- 2) 川村 和之、山村 隆、福井 宣規、笹月 健彦、Chella S. David、猪子 英俊、田平 武：HLA-DR2 トランスジェニックマウスから樹立した proteolipid protein 95-116 特異的 T cell line の性状について。 *神経免疫学* 7:28-29, 1999
- 3) 張 本寧、川村 和之、田平 武、山村 隆： $\beta$ 2-microglobulin<sup>g</sup>-マウスにおける hyperacute EAE の誘導とその解析。 *神経免疫学* 7:30-31, 1999
- 7) Fazekas, G., T. Tabira and T. Yamamura: Enhancement of active and passive EAE by T cell receptor peptide specific T cells. *Neuroimmunology* 7: 32-33, 1999

### 2. 学会発表

- 1) Yamamura, T., B-n. Zhang, T. Tabira Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer cells. American Academy of Immunology Meeting (98' Experimental Biology) April 22, 1998
- 2) Kawamura, K., T. Yamamura, T. Tabira. Proteolipid protein 95-116-specific response in DR2 transgenic mice. The International Society of Neuroimmunology, Fifth International Congress. Montreal. August 24, 1998
- 3) Nakagaki, K., T. Yamamura, K. Nakagaki, T. Ishida, T. Tabira. Feline immunodeficiency virus-associated neuropathological alterations induced by inflammatory cytokines. The International Society of Neuroimmunology, Fifth International Congress.

Montreal. August 26, 1998

- 4) Illes, Z., T. Kondo, K. Yokoyama, T. Ohashi, T. Tabira, and T. Yamamura. Identification of autoimmune T-cells among in vivo expanded CD25<sup>+</sup> T-cells in multiple sclerosis. The International Society of Neuroimmunology, Fifth International Congress. Montreal. August 26, 1998
- 5) Illes, Z., T. Yamamura, T. Kondo, T. Tabira, J. Newcombe. Selective loss of invariant Va24-JaQ<sup>+</sup> T-cells in multiple sclerosis. The International Society of Neuroimmunology, Fifth International Congress. Montreal. August 26, 1998
- 6) Yamamura, T., B.n. Zhang, T. Tabira, M. Taniguchi. Differential roles of NK and NK-T cells for regulation of EAE. The International Society of Neuroimmunology, Fifth International Congress. Montreal. August 26, 1998
- 7) Zhang, B.n., T. Tabira, and T. Yamamura. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. The International Society of Neuroimmunology, Fifth International Congress. Montreal. August 26, 1998
- 8) Zhang, B.n., T. Tabira, and T. Yamamura. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. 10th International Congress of Immunology, New Delhi, 1-6 November, 1998
- 9) Zsolt Illes, T. Yamamura, T. Kondo and T. Tabira: Selective loss of invariant V $\alpha$ 24<sup>+</sup> T-cells in the peripheral blood of MS. 第 39 回日本神経学会総会, 京都, 1998 年 5 月 20 日
- 10) 原 英夫, 越知 博文、吉良 潤一、山村 隆、Gyogyo Fazekas, 田平 武：可溶性 T cell receptor の作成と EAE の解析。 第 39 回日本神経学会総会, 京都, 1998 年 5 月 20 日
- 11) 張 本寧、山村 隆、田平 武：自己免疫性脳脊髄炎の免疫調節における NK-T 細胞と NK 細胞の役割。 第 39 回日本神経学会総会, 京都, 1998 年 5 月 20 日
- 12) 川村 和之、山村 隆、田平 武：DR2 トランスジェニックマウスから樹立した proteolipid protein 95-116 特異的 T cell line の性状。 第 39 回日本神経学会総会, 京都, 1998 年 5 月 21 日