

重症筋無力症胸腺における T cell receptor の解析

藤原一男¹⁾、永田哲也¹⁾、小野寺 宏¹⁾、糸山泰人¹⁾、松谷隆治²⁾、
鈴木隆二²⁾、石井直人³⁾、菅村和夫³⁾、大内将弘⁴⁾、井口篤志⁵⁾、田林暁一⁵⁾

目的

重症筋無力症(MG)においては、高頻度に胸腺腫/胸腺過形成を合併し、胸腺摘出によるMG症状の著明な改善が得られることなどから、胸腺でのリンパ球の反応がMG発症に本質的な役割を担っていると考えられる。今回、(1)MG及び正常胸腺細胞のT cell receptor (TCR)のレパトアを定量的に解析し、対照群と異なる偏ったレパトアがみられるかどうかを検討した。また、(2)昨年度の本研究を一步進めて、MG胸腺細胞におけるTCRの発現、また胸腺細胞の機能に重要なIL-2受容体の発現の変化がみられる細胞 populationの有無について表面マーカー解析により検討した。

方法

(1)MG10例、健康人7例の胸腺組織からRNAを抽出し、adaptor ligation-mediated PCR-microplate hybridization assay (Matsutani T et al, 1997)法を用いて、すべてのTCR α 鎖可変領域(TCRAV)及び β 鎖可変領域(TCRBV)のレパトアを定量的に解析し、比較した。

また、偏ったレパトアがみられた症例についてはCDR3領域をV鎖特異的のprimersで増幅し、denaturing polyacrylamide gelにて電気泳動(CDR3 size spectratyping)し、clonalな変化かどうか確かめた。

(2)臨床症状出現後6ヶ月以内かつ免疫抑制剤未使用のMG胸腺(全例に過形成を認めた)7例及び正常胸腺6例を用いてCD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, CD19, IL-2受容体(IL-2R)各サブユニットの発現をflow cytometryにより3-color解析した。

結果

(1)健康人10例はすべて互いに類似したレパトアのパターンを示した。一方、MG患者のうち2例(MG8 & MG9)において健康人と比較して高い頻度を示すV segment (MG8ではVA16-1, VB6-4, VB15-1, VB23-1, MG9ではVA10-1, VB13-4等)がみられた。この2例はいずれも高齢発症で、胸腺摘出時にはステロイドが投与されていた。他の8例のMG(高齢発症1例、ステロイド投与1例を含む)では健康人のパターンと差はなかった(図1、図2)。

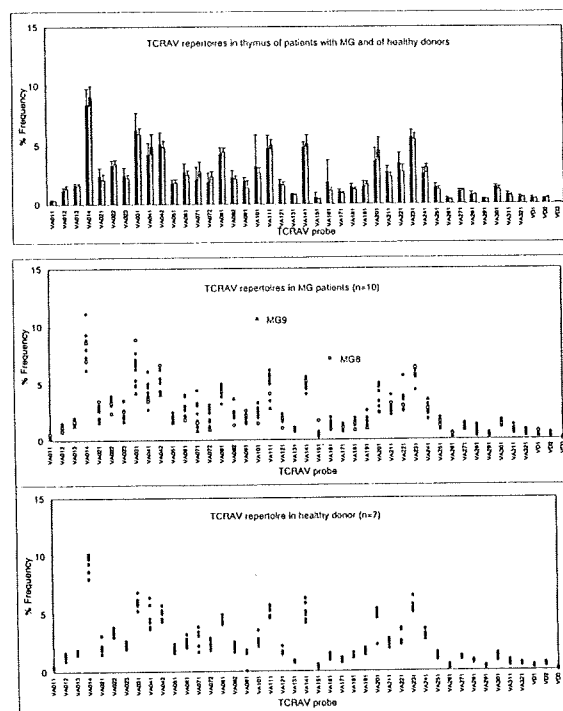


図1. TCR α 鎖可変領域(TCRAV)のレパトア

レパトア解析で変化のなかったMG患者(MG-N)4例、健康人(HD)4例、及び変化のみとめられたMG8, MG9に関してCDR3 size spectratypingを施行したところ、MG-N4例とHD4例では検索したすべてのVB segmentで、polyclonalなバンドが検出された。一方、MG8, MG9では健康人より増加したVB segment (MG8ではVB6-4, VB23-1, MG9ではVB13-4)においてclonalなバンドが検出された。また、顕著な変化がみられなかったVB segment (VB1-1, VB2-1)の中でも一部にclonalなバンドが検出された(図3)。

(2)正常胸腺ではdouble positive (DP) T cellのpopulationが大部分を占めており、single positive (SP) T cellのpopulationが14%であるのに対して、MG胸腺においてはSP populationが胸腺細胞の43%に増加していた。一方、CD4+SP/CD8+SP比及び、TCR $\alpha\beta$ / $\gamma\delta$ 細胞比は正常群とMG群とで差はなかった。MG胸腺ではB細胞populationが有意に増加していた。

IL-2R α subunit陽性細胞はMG群で有意に増加していた。しかしIL-2R α subunit陽性細胞はMG群のdouble

1)東北大学医学部神経内科
2)シオノギ医学研究所
3)東北大学医学部免疫学
4)国立仙台病院心臓血管外科
5)東北大学医学部胸部外科

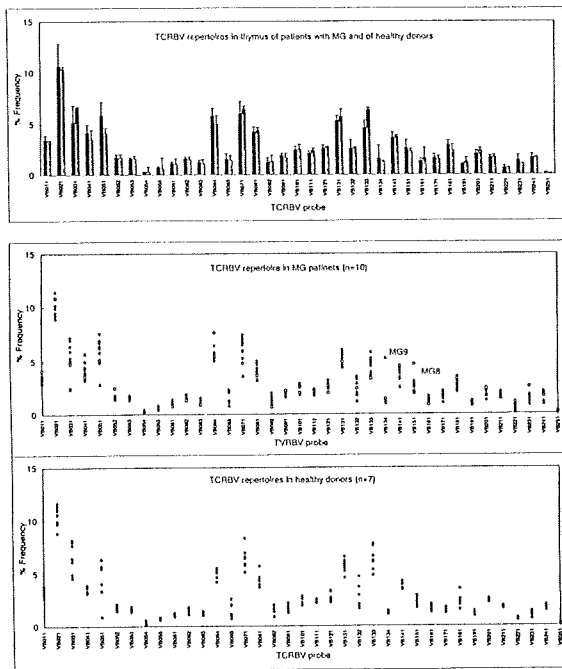


図2. TCR β鎖可変領域(TCRBV)のレパトア

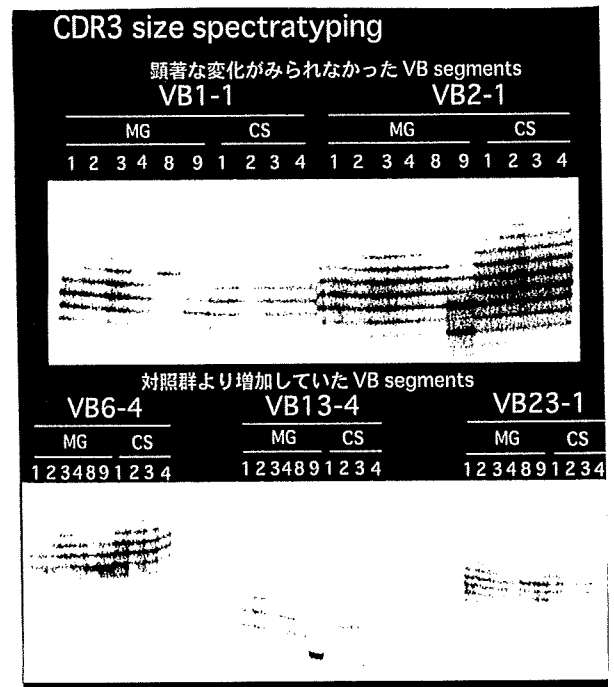


図3.CDR3 size spectratyping

negative(DN)細胞においてのみ増加していた。

IL-2R β subunit 陽性 T cell は MG 群で正常群より有意に増加していたが、陽性率が低く subpopulation での解析はできなかった。

IL-2R γ subunit 陽性細胞は MG 胸腺の DN 細胞において正常群より増加しており、これは B cell における増加と考えられた。

考 察

(1) 今回得られた結果は、少数の MG 患者の胸腺では、多様性の低いレパトアを持つ T 細胞群が存在することを示している。このことが、胸腺内の何らかの抗原に反応して増殖している T 細胞の存在を示すものか、negative selection の異常か、あるいは高齢発症やステロイド投与が何らかの影響を及ぼしているのか現時点では不明だが、さらに検討する必要がある。

(2) SP 細胞及び DP 細胞における IL-2R の各サブユニットの発現レベルは MG と正常胸腺で差がないことが明らかになった。この結果は、MG 胸腺における自己(アセチルコリン受容体)反応性 T cell クローンの出現には、成熟過程の T cell における正常胸腺とは異なる IL-2 受容体の発現を伴ったシグナル伝達が必要ではないことを示している。一方、MG 胸腺の B 細胞における IL-2 受容体 γ サブユニット発現レベルの増加は、IL-2 受容体 γ サブユニットが共通して媒介する IL-2, IL-4 や IL-7 などを経した B cell のシグナル伝達機構の変調が存在する可能性がある。

まとめ

(1) MG 10 例、健常人 7 例の胸腺における TCR レパトアを定量的に解析した。その結果、少数の MG 例の胸腺においてのみ多様性の低いレパトアを持つ T 細胞群が存在することが示された。

(2) MG 7 例、健常人 6 例の胸腺単核細胞の表面マーカーを解析した。SP 細胞及び DP 細胞における IL-2R の各サブユニットの発現レベルは MG と正常胸腺で差は明らかではなかった。また IL-2R γ subunit 陽性細胞は MG 胸腺の B cell における増加の可能性があり B 細胞の分化増殖に関与しているかもしれない。

文 献

- 1) Matsutani T, et al. Analysis of TCRαV and TCRβV repertoires in healthy individuals by microplate hybridization. Hum Immunol, 1997.
- 2) Gorski J, et al. Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping, Correlation with immune status. J Immunol, 152:5109-5119, 1994.

Lambert-Eaton筋無力症候群：本邦110症例の臨床的検討

中村 龍文 中尾 洋子 本村 政勝 藤本 武士
 吉村 俊朗 江口 勝美

目 的

平成5年度から7年度にかけて、本研究班のプロジェクトの一環としてLambert-Eaton筋無力症候群（LEMS）の実態調査が行われたが(1)、我々は、その後も血清中抗電位依存性カルシウムチャンネル（VGCC）抗体の測定に携わることにより、全国諸施設よりLEMSの症例を集積してきた。今回、個々の症例を分析し、本症候群の臨床的特徴と血清学的特異抗体の意義を検討した。

対 象・方 法

平成4年から平成10年の間に血清抗VGCC抗体測定依頼がありLEMSと診断された110症例を対象とした。

抗体測定依頼のあった時点と、その4ヶ月から7年の経過を追った時点で文書による追跡調査を行った。調査項目は、性別、発症年齢、悪性腫瘍の種類、LEMS発症から悪性腫瘍確認までの期間、初発症状、初診時神経学的所見、電気生理学的所見、抗VGCC抗体価とした。

血清抗P/Q型VGCC抗体は従来の方法に従い、ヒト小脳をジギトニンで可溶化して得られたVGCC抗原を¹²⁵I- ω -conotoxin MVIICで標識し、患者血清を加え免疫沈降法により測定した。

結 果

男女比は約3：1で男性に多く、発症年齢は17～80歳（平均62歳）であった。悪性腫瘍合併率は、肺小細胞癌（SCLC）が61%と圧倒的に多く、その他の癌は8%、癌未発見は31%であった。LEMSの症状発現と悪性腫瘍発見の時間的關係は、84%が悪性腫瘍発見に先だってLEMSの症状が認められた。

初発症状としては、74%が下肢筋力低下にもとづく歩行障害で発症しており、ついで易疲労性（32%）、上肢筋力低下（19%）を呈していた（図1）。また、発症時より自律神経症状を来す例（14%）や、重症筋無力症様の眼症状で発症する例（13%）も認められた。

長崎大学医学部第一内科

図 1. Initial symptoms (n=110)

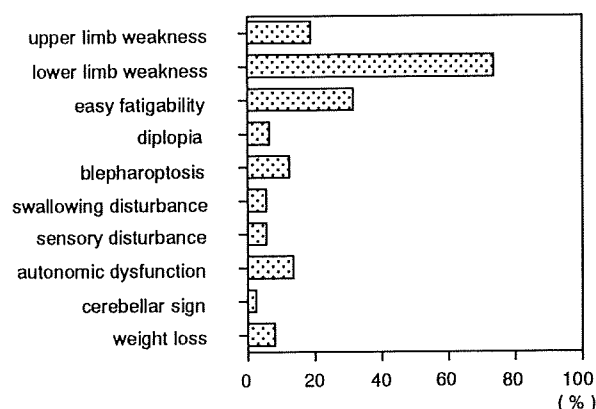


図 2. Neurological findings (n=110)

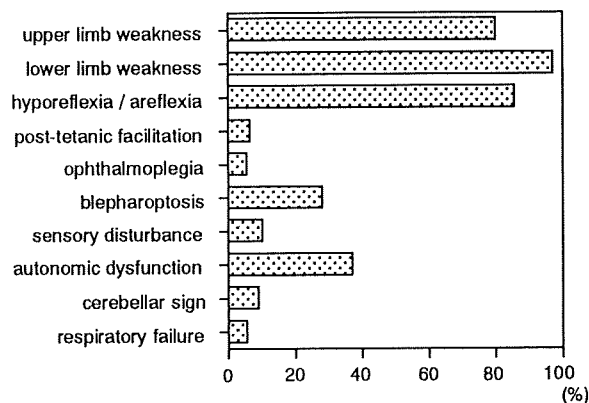


図 3. Autonomic dysfunction (n=110)

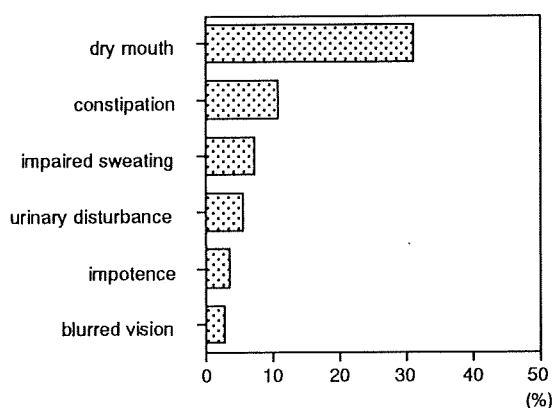
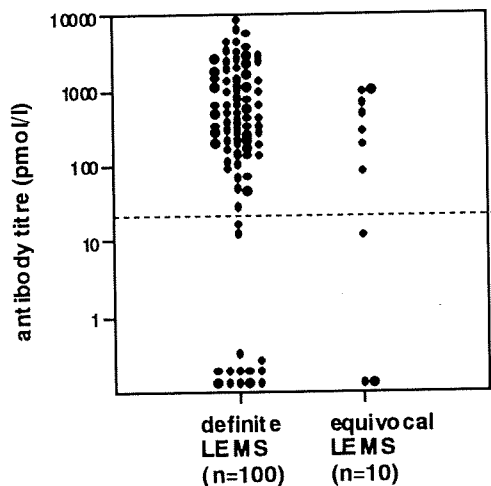


図 4. Anti-P/Q type VGCC antibody



初診時神経学的所見では、下肢筋力低下が97%、次いで深部腱反射低下・消失(86%)、上肢筋力低下(80%)の順に認められた(図2)。眼症状では眼瞼下垂が28%と多く、眼筋麻痺は6%であった。自律神経症状は37%で認められ、口渴がもっとも多く(31%)、ついで便秘(11%)、その他発汗低下、排尿障害、インポテンツ、霧視などがみられた(図3)。小脳失調症状は9%で認められた。

今回得られた臨床所見を、平成7年の本研究班による報告(1)とON'eillらの報告(2)と比較すると、男女比、発症年齢、SCLC合併率、神経筋接合部症状はほぼ同様の結果であったが、自律神経症状は白人LEMSに比べ出現頻度は低いものの、前回報告より多くの症例で認められた(表1)。

また、LEMSの中には電気生理学的にequivocalで2倍に満たないwaxing現象を呈する症例が約1割認められたが、その臨床像は2倍以上の明らかなwaxing現象を示すdefinite LEMS群とほぼ同様であり(表2)、血清中抗VGCC抗体陽性率にも大差はなかった(図4)。

一方、抗VGCC抗体が検出されないseronegative LEMSが15%認められた(図4)。seronegative LEMSでは男女比は約1:1と男性が比較的少なく、悪性腫瘍合併率はSCLCが12%と低率であったが、発症年齢、神経筋接合部症状、自律神経症状は抗体陽性のseropositive LEMSとほぼ同様であった(表3)。

表 1. 過去の報告との比較

	本報告 (n=110)	平成7年度本研究班 (n=45)	ON'eill et al (n=50)
男女比	3 : 1	2 : 1	2 : 1
発症年齢	62歳	61歳	54歳
SCLC合併率	61%	53%	62%
神経筋接合部症状	97%	91%	92%
自律神経症状	37%	11%	80%
抗VGCC抗体陽性率	85%	71%	not tested

表 2. Definite LEMSとequivocal LEMSの比較

	definite LEMS (n=100)	equivocal LEMS (n=10)
男女比	3 : 1	2 : 1
発症年齢	63歳	57歳
SCLC合併率	61%	60%
神経筋接合部症状	97%	100%
自律神経症状	36%	50%
抗VGCC抗体陽性率	86%	70%

表 3. Seropositive LEMSとseronegative LEMSの比較

	seropositive LEMS (n=93)	seronegative LEMS (n=17)
男女比	4 : 1	1 : 1
発症年齢	62歳	63歳
SCLC合併率	70%	12%
神経筋接合部症状	97%	100%
自律神経症状	38%	35%

考 案・結 論

本邦のLEMSの臨床像に関して、男女比、平均発症年齢、SCLC合併率は1988年のON'eillらの報告とほぼ同じ結果であった。神経学的所見では、本邦のLEMSでは自律神経症状の発現頻度は低いものの、神経筋接合部症状はほぼ同じであった。

電気生理学的にequivocalな症例でもdefinite LEMSとほぼ同様の臨床像を示し、その7割で血清抗VGCC抗体がLEMSの診断に有用であった。とくに発症初期のLEMSや重症筋無力症との鑑別が困難な症例などで、2倍に満たないwaxing現象を認めながらLEMSが疑われた場合、その診断に血清抗P/Q型VGCC抗体測定が重要であると考えられた。

また、抗P/Q型VGCC抗体が検出されないseronegative LEMSが15%に認められた。seronegative LEMSでは、肺小細胞癌の合併率が低く、男性の罹患率が相対的に低い傾向がみられるものの、その臨床像はseropositive LEMSとほぼ同様であった。

謝 辞

今回の追跡調査にご協力いただきました諸先生方に感謝いたします。

文 献

- 1) 平成7年度 厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班 傍腫瘍性神経症候群プロジェクトグループ: 本邦における傍腫瘍性神経症候群のアンケートによる実態調査. 臨床神経学 37: 93-98, 1997
- 2) ON'eill, J.H. et al: The Lambert-Eaton myasthenic syndrome. A review of 50 cases. Brain 111: 577-596, 1988

P/Q 型電位依存性カルシウムチャネル $\alpha 1$ サブユニット S5-S6 リンカー リコンビナント蛋白作製とその応用

岩佐 和夫* 駒井 清暢* 高守 正治* 森 泰生**

目 的

Lambert-Eaton 筋無力症候群 (LEMS) は、悪性腫瘍に合併したり腫瘍の発症に先行し遠隔、非転移性に発症する傍腫瘍性神経症候群の一つであり、特に肺小細胞癌と神経系に共通の抗原を認識する抗体が証明されている。この抗体は、骨格筋を支配する末梢神経終末の P/Q 型電位依存性カルシウムチャネル (VGCC) 機能を阻害し、神経からのアセチルコリン (ACh) 遊離障害を起こし、その結果筋無力症状を惹起するものである。

これまで LEMS 患者血清中にドメイン II およびドメイン IV S5-S6 リンカー領域合成ペプチドと反応する抗ペプチド抗体を検出し P/Q 型 VGCC 分子構造の中の少なくとも上記2領域が LEMS 自己抗体のエピトープであることを示してきた。しかし、アミノ酸 N 末端や ϵ アミノ基をもつリシンと反応する Bolton-Hunter 試薬を用いた抗ペプチド抗体の測定法では、リシンを多く含むドメイン III S5-S6 リンカー合成ペプチドの立体構造に変化が生じている可能性が高いことが考えられた。このため Bolton-Hunter 試薬を使用した抗ペプチド抗体測定ではドメイン III S5-S6 リンカーが LEMS 自己抗体のエピトープではないとすることはできなかった。一方、ドメイン III S5-S6 リンカー領域の合成ペプチドを抗原としラットに免疫したところ LEMS の実験モデル動物が作製可能であることが証明された。さらに、P/Q 型 VGCC では SS2 セグメントのグルタミン酸を他のアミノ酸に置換することによってカルシウム選択性や透過性に最も影響を与えるドメインがドメイン III であること、N 型と P/Q 型 VGCC とのキメラ実験でドメイン III の置換がトキシン結合能に最も影響を与えることからドメイン III の重要性が推測され、LEMS 自己抗体がドメイン III S5-S6 リンカーを認識するか否かについて検討することが LEMS の病態把握、発症メカニズムを考察するうえで重要と考えられた。

今回我々は、P/Q 型 VGCC の $\alpha 1$ サブユニット ドメ

イン III S5-S6 リンカー部リコンビナント蛋白を作製、この蛋白を用いたイムノブロットを行い、LEMS 患者血清中にこの蛋白と反応する抗体が存在するのか検討した。

対 象

臨床症状、電気生理学的に LEMS と診断された患者 36 例の血清を使用した。抗 VGCC 抗体陽性例は 32 例で抗体価は 15.4 から 9399 pmol/l であった。4 例は抗 VGCC 抗体は陰性であった。また 36 例中 20 例は悪性腫瘍を伴っていた。コントロールとして、神経症状を伴わない小細胞性肺癌患者 10 例、重症筋無力症 10 例 (5 例は胸腺腫を伴っていた)、健康正常者 10 例の血清を使用した。

方 法

P/Q 型 VGCC $\alpha 1A$ cDNA より、 $\alpha 1$ サブユニット ドメイン III S5-S6 リンカー部にあたる DNA 配列をサブクローニングし、GST 蛋白とフュージョンするようにベクター pGEX-4T-3 内に挿入、このベクターを E.coli に transfect し蛋白発現を IPTG にて誘導した。また同時にベクター pGEX-4T-3 のみを E.coli に transfect し GST 蛋白のみを誘導した。得られた蛋白は glutathion sepharose カラムにて精製した。

得られた GST-ドメイン III S5-S6 リンカー フュージョン蛋白と GST 蛋白はペアになるように 12.5% SDS-PAGE にて電気泳動し、PVDF 膜にブロットした後 3% BSA にてブロックした。患者血清およびコントロール血清は 100 倍希釈し 4°C 一晩反応させた。また同時に 5000 倍希釈したラット抗ドメイン III S5-S6 リンカー ポリクローナル抗体および 5000 倍希釈したマウス抗 GST2 モノクローナル抗体を同様に反応させた。二次抗体は 2500-5000 希釈した HRP 標識抗ヒト IgG 抗体、HRP 標識抗ラット IgG 抗体、HRP 標識抗マウス IgG 抗体を使用した。洗浄後 DAB にて発色させバンドの有無を判定した。

* 金沢大学医学部神経内科

** 岡崎生理学研究所液性情報

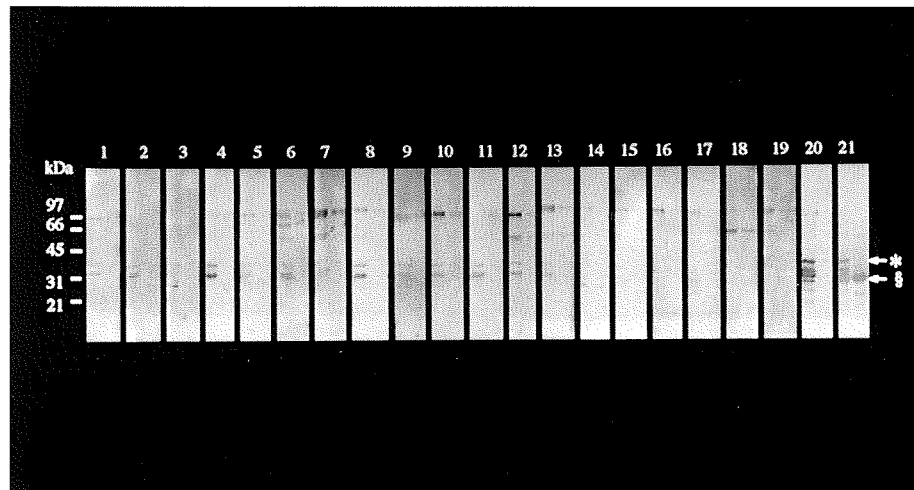


図1. P/Q型電位依存性カルシウムチャネル (VGCC) $\alpha 1$ サブユニットドメイン III S5-S6 リンカー-リコンビナント蛋白に対する Lambert-Eaton 筋無力症 (LEMS) 患者血清の反応
一つの枠内の左レーンは GST-ドメイン III フュージョン蛋白, 右レーンは GST 蛋白を電気泳動. レーン 1-15: 抗 VGCC 抗体陽性 LEMS 血清, レーン 16-19: 抗 VGCC 抗体陰性 LEMS 血清, レーン 20: ラット抗 P/Q 型 VGCC $\alpha 1$ サブユニットドメイン III S5-S6 リンカー ペプチド ポリクローナル抗体, レーン 21: マウス抗 GST2 モノクローナル抗体. レーン 1-8, 14, 15 は小細胞性肺癌合併. *: GST-ドメイン III S5-S6 リンカー フュージョン蛋白, §: GST 蛋白

結果

図に結果の一部を示した. 一つの枠内の左レーンは GST-ドメイン III フュージョン蛋白, 右レーンは GST 蛋白を電気泳動したものである. レーン 20 はラット抗ドメイン III S5-S6 リンカー ポリクローナル抗体, およびレーン 21 はマウス抗 GST モノクローナル抗体を反応させたものである. これらの抗体の反応より左レーンに認められる 39kDa の蛋白が目的の GST-ドメイン III S5-S6 リンカーのフュージョン蛋白と同定した. レーン 20 左レーンの 39kDa 蛋白より低分子量の蛋白でラット抗ドメイン III S5-S6 リンカー ポリクローナル抗体と反応した蛋白は, 蛋白精製自にフュージョン蛋白が変性したものと考えられた. レーン 21 の右レーンの 29kDa 蛋白は GST 蛋白である.

LEMS 患者では 36 例中 18 例 50% が 39kDa の蛋白と反応したが, GST 蛋白とは反応を示さなかった. この 39kDa 蛋白と反応した血清は全例 VGCC 抗体は陽性で, VGCC 抗体陰性の LEMS 患者血清は反応しなかった. また, 重症筋無力症, 健康正常人血清はこの 39kDa 蛋白と反応しなかった. しかし, 小細胞性肺癌の症例では 10 例中 2 例が弱いながらこの 39kDa 蛋白と反応を示した.

考察

LEMS では P/Q 型 VGCC に対する自己抗体の出現が主

な病因と考えられている. LEMS では悪性腫瘍に先立って症状が出現したり, 悪性腫瘍を伴っていることが多く, 悪性腫瘍との関連が考えられているが, 自己抗体出現に至るメカニズムや抗 P/G 型 VGCC 抗体と病態との関連については不明な点が多い. これまで, 我々は LEMS における抗 P/Q 型 VGCC 抗体の認識部位についてカルシウムチャネルとして機能している $\alpha 1$ -サブユニットに注目し, 特に $\alpha 1$ -サブユニットの中でも膜外に大きく露呈し抗体との反応を起こしうる可能性が高い S5-S6 リンカーに抗体認識部位を求めてきた. その結果, $\alpha 1$ サブユニットの各ドメインの S5-S6 リンカー領域のうち LEMS 患者血清中にドメイン II およびドメイン IV S5-S6 リンカー領域と反応する抗体を検出した. それぞれの抗体価は, 抗 P/Q 型 VGCC 抗体価と有意な相関を示し, P/Q 型 VGCC 分子構造の中に少なくとも上記 2 領域が LEMS 自己抗体のエピトープであることが示された. しかし, Bolton-Hunter 試薬を用いた抗ペプチド抗体の測定法では, ドメイン III S5-S6 リンカーのペプチドの立体構造に変化が生じ, ドメイン III S5-S6 リンカーを抗体が認識するものか否かについては結論は出ていなかった. 一方, 動物実験モデル作製では, ドメイン II に引き続きドメイン III S5-S6 リンカー領域の合成ペプチドを抗原としルイスラットに免疫したところ, これらの動物実験モデルではペプチド抗体とともに抗 P/Q 型 VGCC 抗体も認められ, 電気生理学的にも LEMS を発症したことが証明された. 今回このよう

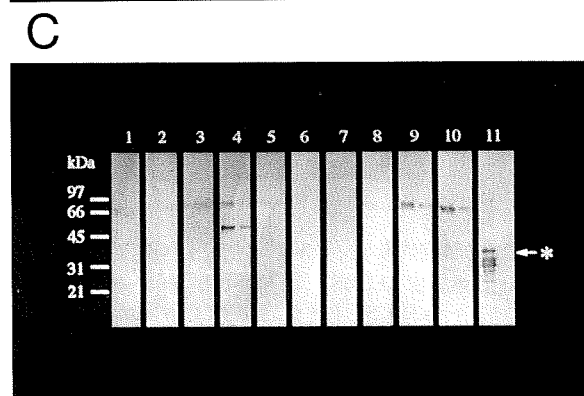
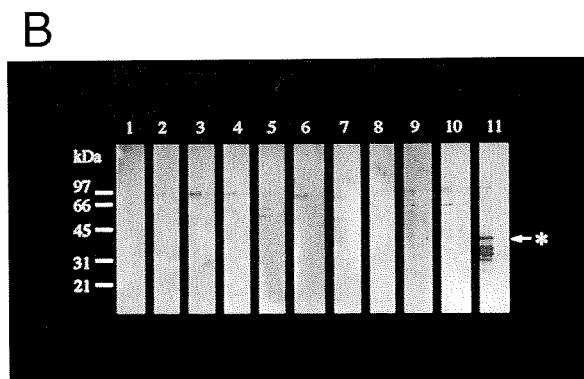
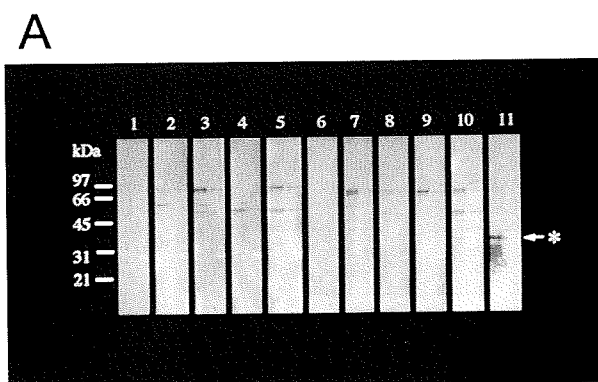


図2. P/Q型電位依存性カルシウムチャンネル (VGCC) $\alpha 1$ サブユニットドメイン III S5-S6 リンカーリコンビナント蛋白に対する重症筋無力症患者, 小細胞性肺癌患者, 健康正常人血清の反応
一つの枠内の左レーンは GST-ドメイン III フェージョン蛋白, 右レーンは GST 蛋白を電気泳動
A レーン 1-10: 重症筋無力症.
B レーン 1-10: 小細胞性肺癌. レーン 9, 10 は 39kDa 蛋白と反応した.
C レーン 1-10: 健康正常人.
A-C のレーン 11 はラット抗 P/Q 型 VGCC $\alpha 1$ サブユニットドメイン III S5-S6 リンカーペプチドポリクローナル抗体

な背景を元にドメイン III に対する抗体の有無を検討したところ, 抗 P/Q 型 VGCC 抗体陽性の 32 例中 18 例 (56%) でドメイン III S5-S6 リンカーに対する抗体が陽性となった. LEMS では P/Q 型 VGCC の $\alpha 1$ -サブユニットや β サブユニットに対する抗体の存在が証明されており, 特に $\alpha 1$ -サブユニットに対する抗体は LEMS の病態に関する可能性があり重要である. この $\alpha 1$ -サブユニットのうちドメイン III S5-S6 リンカーを抗体が認識するということは, 同部位がカルシウムチャンネルとしての機能として重要な部位であることとともに, LEMS の病態にも重要な部位であることが考えられた. また今回の結果は悪性腫瘍に伴い自己抗体が産生されるメカニズムを考える際貴重な手がかりとなることが考えられた.

また, 今回小細胞性肺癌にてドメイン III S5-S6 リンカーに対する抗体が認められたが, Lennon らは神経症状を認める癌患者の 54% および神経症状を示さない癌患者の 24% で抗 P/Q 型 VGCC 抗体を認めたとしており, 比較的高い率で癌患者に抗 P/Q 型 VGCC 抗体が出現している可能性が伺われた.

結 論

LEMS 患者血清中の P/Q 型 VGCC $\alpha 1$ サブユニット ドメイン III S5-S6 リンカーに対する抗体は合成ペプチドを用いた方法では検出できなかったが, リコンビナント蛋白に

て S5-S6 リンカー部蛋白を全域にわたり作製することにより, 50% で抗体の存在が確認できた.

このことは, Bolton-Hunter 試薬によるペプチドの損傷のほかに, 立体構造の重要性, また抗体の認識部位を考察するうえで興味深いものであった.

さらに, ドメイン III S5-S6 リンカー抗体の抗体価と VGCC 抗体価との関係, また病状との関連を調べることにより, LEMS の病態と抗体との関連や LEMS 発症のメカニズムがより明らかになる可能性がある.

尚, 本研究を行うにあたり血清をお送りいただいた長崎大学 本村政勝先生を始めとする多数の施設の諸先生方にこの場を借りて深謝申し上げます.

文 献

- Takamori M, Iwasa K et al: Neurology 48: 1261-1265, 1997
 Ellinor PT, Yang J, et al: Neuron 15: 1121-1132, 1995
 Ellinor PT, Zhang JF, et al: Nature 372: 272-275, 1994
 Takamori M, Komai K et al: J Neurol Sci, 1999 in print
 Pinto A, Gillard S, et al: Proc Natl Acad Sci USA 95(14): 8328-33, 1998
 Lennon VA, Kryzer TJ, et al: N Eng J Med 332: 1467-1474, 1995

Case	年齢	性別	臨床診断	筋痙攣	EMG			抗体	K ⁺ 電流抑制
					fasc.	mkd.	n-myt		
1.	82	男性	Isaacs syndrome	+	+	+	+	+	+
2.	43	女性	Isaacs syndrome	+	+	+	+	-	+
3.	14	女性	Isaacs syndrome	+	+	+	+	+	+
4.	35	男性	Isaacs syndrome	+	+	+	+	+	+
5.	47	女性	Isaacs syndrome	+	+	+	+	-	+
6.	63	女性	Isaacs syndrome	+	+	+	+	-	+
7.	67	男性	Isaacs syndrome	+	+	+	-	+	+
8.	43	男性	IGM	+	-	+	+	+	+
9.	18	女性	IGM	+	-	-	-	-	+
10.	71	男性	CFS	+	-	+	-	-	+
11.	31	男性	CFS	+	+	+	-	-	+
12.	50	男性	MG, thymoma, cramp	+	-	+	-	+	+
13.	55	女性	MG, muscle cramp	+	-	-	-	+	+
14.	44	男性	MG, myokymia	-	-	+	-	+	+
15.	20	女性	muscle cramp	+	-	-	-	-	-
16.	70	女性	muscle cramp	+	-	+	-	+	+
17.	30	女性	muscle cramp	+	-	-	-	-	+
18.	53	男性	muscle cramp?	-	-	-	-	-	-
19.	20	女性	facial myokymia	-	-	+	-	+	+
20.	23	男性	Stiff-person syn.?	+	-	+	-	-	-
21.	55	男性	lumber radiculopathy	+	-	-	-	-	-

IGM: Idiopathic generalized myokymia CFS: Cramp fasciculation syndrome
fasc: fasciculation potential mkd: myokymic discharge n-myt: neuromyotonia

表1. 症例及び結果一覧

考 察

我々はIsaacs症候群患者血清中に抗VGKC抗体が存在すること¹⁾、及び患者γ-グロブリンにより培養神経細胞のK⁺電流が抑制されること²⁾³⁾をこれまで報告している。今回Isaacs症候群以外の筋痙攣を主体とするCFSやIGMの患者でも抗VGKC抗体が存在し、K⁺電流が抑制されたことは、これら筋痙攣を来す疾患の中にもIsaacs症候群と同様の病態生理をもつものがあり、一つの疾患スペクトラムを形成すると考えられる。また今回筋痙攣、あるいはmyokymiaを有するMG患者全例に抗VGKC抗体、K⁺電流抑制が認められたことに関してはIsaacs症候群にはしばしば抗AChR抗体が陽性である事、thymomaとmyokymiaの合併例が少ない事などから興味ある結果である。

筋電図所見との関連では上述の通りmyokymiaとK⁺電流抑制との間に有意な相関が認められた。これはVGKCの障害の程度を反映しているのかもしれない。すなわち障害の程度が小さいとmyokymiaが認められ、さらに障害が強くなるとneuromyotoniaが出現する可能性が考えられる。patch clampでは軽度の障害でも測定可能のためこれらの間に相関が認められたものと考えられる。

抗VGKC抗体陰性例でもK⁺電流抑制が認められる点に関しては抗VGKC抗体のassay系の問題、抗体のepitopeの違い、等の可能性が考えら、今後検討すべき課題である。

抗体とK ⁺ 電流抑制		P<0.05
抗体陽性	←→ fasciculation	P=0.69
	myokymia	P=0.13
	neuromyotonia	P>0.99
K ⁺ 電流抑制	←→ fasciculation	P=0.08
	myokymia	<u>P<0.05</u>
	neuromyotonia	P=0.11

表2. 筋電図所見との関連

結 語

1. Isaacs症候群を含む筋痙攣、myokymiaを有する患者21例で抗VGKC抗体、K⁺電流抑制の有無を検討した。
2. Isaacs症候群では7例中4例で抗VGKC抗体が認められ、7例全例でK⁺電流の抑制が見られた。
3. Isaacs症候群以外の患者では14例中6例で抗VGKC抗体陽性で抗体陰性8例中4例でもK⁺電流の抑制が見られた。
4. 臨床診断がMGで、筋痙攣あるいはmyokymiaを有する患者では3例全例で抗VGKC抗体、K⁺電流抑制いずれも認められた。
5. 筋電図所見との関連ではmyokymiaとK⁺電流抑制との間に有意な相関が認められた。
6. Isaacs症候群以外の疾患でもIsaacs症候群類似の病態により筋痙攣、myokymiaを呈するものが存在することが示唆された。

文 献

- 1) Arimura K, Watanabe O, Kitajima I, et.al: Anti-bodies to potassium channels of PC12 in serum of Isaacs' syndrome: Western blot and immunohistochemical studies. Muscle Nerve 20: 299-305, 1997
- 2) Sonoda Y, Arimura K, Kurono A, et.al.: serum of Isaacs' syndrome suppresses potassium channels in PC-12 cell lines. Muscle Nerve 19: 1439-1446, 1996
- 3) 長堂竜維, 園田至人, 有村公良他 : Isaacs 症候群及びその近縁疾患で抑制される K^+ 電流 channel の subtype について. 脳波と筋電図 26:158, 1998
- 4) Jamieson PW, Katirji MB: Idiopathic generalized myokymia. Muscle Nerve 17: 42-51. 1994
- 5) Tahmouh AJ, Alonso RJ, Tahmouh GP, et. al. Cramp-fasciculation syndrome: A treatable hyperexcitable peripheral nerve disorder. Neurology 41: 1021-1024, 1991

アンチセンスによるHuDの発現抑制とPC12細胞の神経分化への影響

犬塚 貴¹⁾、中野亮一¹⁾、菊川公紀²⁾、保住 功¹⁾、辻 省次²⁾

目 的

傍腫瘍性神経症候群にみられる抗Hu抗体は、神経細胞の核および細胞質とも反応する力価の高い抗体であることから、抗体による神経細胞の傷害性が検討されてきた。しかしこれまでGreenleeら¹⁾がprimary cultureにおいて、抗体がラット小脳顆粒細胞を傷害するという報告をしている以外は、その傷害性を示唆する報告はみられない。我々は傍腫瘍性神経症候群にみられる抗Hu抗体による傷害性や、抗体によって認識される神経抗原HuDの機能を明らかにすることを目的に、神経系培養細胞PC12の培養系に抗体を補体やTNF α などと共に添加したり、micro injectionによって細胞内に抗体を直接注入したが、細胞傷害性は認められなかった²⁾。HuDは神経細胞の分化・維持に関わる可能性が指摘されている³⁾ことから、PC12細胞のNGF添加による分化誘導に対して、抗Hu抗体あるいはHuDアンチセンスオリゴヌクレオチド(anti-s-ON)の影響を調べた。抗体の添加ではまったく変化が認められなかったが、anti-s-ONではHuDの発現と細胞形態に変化がみられたので報告する。

方 法

HuDのanti-s-ON、s-ONの存在下でPC12細胞にNerve growth factor (NGF)を添加して分化誘導を行い、顕微鏡下で細胞の形態を観察した。その後、培養細胞を集めホモジネートしてSDS-PAGEを行い、ゲルを銀染色して発現蛋白全体の変化を調べ、一部はニトロセルロース膜にブロットして、抗Hu抗体を用いた免疫ブロット法によりHuDの発現を調べた。細胞からmRNAを抽出しdifferential displayを行いその変化を調べた。

アンチセンス・オリゴヌクレオチドの設定は、一般にイニシエーションコドン近傍や、そのやや上流のリボ

ゾーム結合部位を示唆するプリンに富んだ部分を含むことが推奨されており、この部分にAnti-s-ON (5'-GCTCC ATGGTGCTAATTATCATC-3')を作製した。そのs-ONをコントロールにした。予備実験ではHuDの第3番目のRNA recognition motifの始めに相当する部位にもanti-s-ONを作製したが、効果は認められなかった。オリゴヌクレオチドの安定性や、細胞内への透過性を良くするために、ヌクレオシド間のフォスフォジエステル基の酸素を硫黄に置換した。

実験スケジュール：コラーゲンコートした96穴プレートまたは、75 cm²フラスコに10⁴ cells/cm²の密度でPC12細胞を播いて、10%HS, 5%FBSを含むDMEMで24時間培養後、血清濃度を1/10に下げ、anti-s-ONまたはs-ONを最終濃度40 μ Mになるように培養液に加えた。48時間後、NGFを最終濃度50ng/mlになるように培養液に加えた。anti-s-ONまたはs-ONは48, 72, 96時間後にも同様に加え、7日目に顕微鏡下で細胞の形態を観察し、その後細胞を集めホモジネートにした。オリゴヌクレオチドの濃度と投与時期については、予備実験において効果があり且つ細胞毒性ができるだけ低いところに設定した。

結 果

s-ON存在下では、NGFの効果による突起伸長ははっきり観察されたが、anti-s-ON存在下では、はっきりした突起伸長はみられなかった。SDS-PAGEの銀染色ゲルの観察ではanti-s-ON存在下とs-ON存在下の間に、蛋白の組成に明らかな差は検出できなかった。抗Hu抗体を用いた免疫ブロット法によるHuDの発現の検索では、s-ON存在下ではHuDの発現がみられたが、anti-s-ON存在下では著しい発現抑制がみられた。differential displayによるmRNAの発現については、再現性を求めて検討中である。

考 按

HuDのanti-s-ONの存在下で、1) NGF添加によるPC12細

1) 新潟大学医学部附属病院神経内科

2) 新潟大学脳研究所神経内科

胞の突起伸展が抑制され、2) HuD蛋白の発現の抑制が観察された。これらの変化は抗体の存在下では観察されず、anti-s-ONの存在下ではじめてみられた。これは Dobashiら⁴⁾の観察結果を支持するものであった。HuDは ショウジョウバエの分化を司るElavとのホモロジーが高いことなどから神経分化における機能が推定されているが³⁾、PC12細胞のNGF添加による神経分化に関わる可能性が示唆された。HuD蛋白はRNA recognition motifを有し、いくつかのオンコジーンやサイトカインなどの mRNAのAU rich elementに結合して、それらの蛋白の発現に影響を与えることが考えられており⁵⁾、発現蛋白のカスケードの全体像を捉えるためにdifferential displayによる解析が有効と考え、現在検討を行っている。

ま と め

HuDのanti-s-ONが、NGF添加によるPC12細胞の突起伸展を抑制し、HuD蛋白の発現も抑制したことから、HuD蛋白はPC12細胞のNGF添加による神経分化に関わる可能性がある。

文 献

- 1) Greenlee JE et al: Type IIa ('anti-Hu') antineuronal antibodies produce destruction of rat cerebellar granule neurons in vitro. *Neurology* 43: 2049-2054, 1993
- 2) 犬塚 貴ほか: 抗Hu抗体陽性患者IgGのPC12培養細胞への影響. 厚生省特定疾患 免疫神経疾患調査研究班 平成8年度研究報告書, 92-94, 1997.
- 3) Szabo A et al: HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to Elav and Sex-lethal. *Cell*, 67: 325-333, 1991
- 4) Dobashi Y et al: Expression of HuD protein is essential for initial phase of neuronal differentiation in rat pheochromocytoma PC12 cells. *BBRC*, 244: 226-229, 1998
- 5) Chung S et al: Purification and properties of HuD, a neuronal RNA-binding protein. *J Biol Chem.* 271: 11518-11524, 1996

傍腫瘍性神経症候群に関連する ELAV 様神経蛋白の RNA 結合の解析

酒井宏一郎

目 的

肺小細胞癌を伴う傍腫瘍性神経症候群患者に抗神経細胞核抗体 (抗 Hu 抗体) が出現するが、抗体が認識する 3 種類の神経抗原は、互いに相同が高い神経特異的 ELAV-like 蛋白である。この蛋白は各々 3 個の RNP-type の RNA 認識領域 (RRM) を有する RNA 結合蛋白であり、特定の RNA の 3' 非翻訳配列 (UTR) に存在する AU-rich element (ARE) と結合して mRNA の安定性を制御し、神経細胞の代謝に重要であることが示唆されている。抗神経細胞核抗体は ELAV 様蛋白の RRM をエピトープとして認識していることより、抗体が蛋白の RNA 結合を阻害して疾患の発症につながる可能性が考えられている。

神経特異的 ELAV 様蛋白の RNA との結合を解析することは、神経細胞における ELAV 様蛋白の機能や、傍腫瘍性神経症候群にみられる神経変性の機序を解明する上で重要である。今回、我々は、傍腫瘍性神経症候群の自己抗原である神経特異的 ELAV 様蛋白の RNA について検討した。さらには、免疫性神経疾患や神経系の感染症において重要な役割を果たしている TNF-alpha について、神経特異的 ELAV 様蛋白との関連について検討した。

方 法

組み換え体蛋白は pGEX ベクターに組み換え、大腸菌に形質転換させた後、1 mM IPTG によって GST 融合蛋白を誘導し、glutathione 4B Sepharose カラムで精製して用いた。

RNA 結合能の解析には、interleukin-3 (IL-3) mRNA と TNF-alpha mRNA 3' UTR ARE に相当する 30 塩基対の oligoribonucleotide を用いた。

gel-shift assay は、蛋白とラベルし oligoribonucleotide を binding buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5% Triton X100, 1 mM dithiothreitol, 10% glycerol, 250 mg/ml yeast tRNA, 0.5 mg/ml bovine serum albumin) 中で 37 °C 10 分間反応させ、6% polyacrylamide 非変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、autoradiography で検出した。見かけ

上の解離定数 (K_d) は、Fried and Crothers の方法によって定量し、Scatchard plot によって解析した。

UV cross-linking assay では、剖検脳から採取された海馬と神経芽腫細胞株 IMR-32 を lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.5, 40 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 5% glycerol, 0.5% NP-40 and proteinase inhibitors) にて水中 30 分間反応させ、lysate を調整した後、oligoribonucleotide と 37 °C で 10 分間反応させ、SDS 化と加熱した後、13% SDS-PAGE で泳動分離し、オートラジオグラフィーで解析した。

結 果

HuC/ple21 蛋白の deletion mutant を作製して、IL-3 mRNA の ARE との結合について gel-shift assay により検討した。第 1 RRM には 4 個の beta-sheet 構造が存在しているが、それぞれの deletion と intact な RRM2 からなる deletion mutant を用いて検討したが、いずれも IL-3 mRNA とは結合しなかった。さらに、第 2 RRM の第 4 beta-sheet 構造に相当するアミノ酸残基 185-192 のみを第 1 RRM と結合させたところ、第 1 RRM 単独では RNA との有意な結合はみられなかったが、この第 4 beta-sheet 構造部分と第 1 RRM からなるペプチドは IL-3 mRNA の ARE と結合した。この結合の親和性は 0.826 nM であり、連結した第 1 第 2 RRM の見かけ上の K_d が 0.95 nM と同程度の親和性であった。このように、第 1 RRM の beta-sheet 構造は IL-3 mRNA との結合に重要であり、加えて、第 2 RRM の第 4 beta-sheet 構造部分に相当する 8 個のアミノ酸残基が、第 2 RRM 全体の結合を代償し得ることが証明された。

次に、この IL-3 mRNA の結合に重要な領域は、3 種類の神経特異的 ELAV 様蛋白では、限られた数のアミノ酸残基のみが異なっている。Hel-N1 の ARE との結合は第 3 RRM を介し、第 1 と第 2 RRM と結合する HuD や HuC/ple21 とは異なる。Hel-N1 と他の ELAV 様蛋白と異なるアミノ酸残基は、第 1 RRM の第 1 alpha-helix に相当する部分に存在する 4 番目と 4 番目の 2 個のア

ミノ酸のみである。この部分は HeI-N1 では、それぞれ glutamic acid と leucine となっている。HuC/ple21 のアミノ酸残基をそれぞれ HeI-N1 のアミノ酸残基に変換して ARE との結合を検討したところ、単独に変換したペプチド E42D と L44F とともに RNA と結合した。その見かけ上の Kd は、各々 0.649 nM と 0.96 nM であり、HuC/ple21 のペプチドと差異を認めなかった。しかしながら、両者を同時に変換した E42D/L44F では、有意な結合はみられなかった。このことは、42番目のアミノ酸残基と44番目のアミノ酸残基の両者が、IL-3 mRNA の ARE との結合に重要であることを示している。

TNF-mRNA の 3' UTR には ARE が存在する。ヒト海馬組織と IMR-32 neuroblastoma cell line の細胞質蛋白をこの ARE と反応させ、UV cross-linking assay により解析すると、IMR-32 細胞では 38 kDa の蛋白とヒト海馬組織では 34 と 42 kDa の二つの蛋白が結合することが証明された。この分子量から、TNF-alpha mRNA ARE に結合する蛋白が ELAV-like 蛋白である可能性が考えられる。抗 Hu 抗体を反応中に加えて gel-shift assay より検討したところ、抗体により細胞質蛋白と RNA の結合が阻害された。この結果は、両者の RNA 結合蛋白はヒト ELAV-like 蛋白であることが強く示唆された。これを確認する目的で、HuC/ple21 を用いて、TNF-alpha mRNA との結合について調べたところ、TNF-alpha mRNA との結合が証明された。この結合は、見かけ上の Kd として 10.8 nM と有意に高い親和性をであった。TNF-alpha mRNA は c-myc や IL-3 mRNA ARE との結合と同様に第1第2 RRM と結合し、さらには第1 RRM と第2 RRM の8個のアミノ酸残基と結合したことから、IL-3 mRNA と同じ部位と結合していると推定された。この結合は poly (U) homoribopolymer によって阻害されるが、poly (A) homoribopolymer には影響されず、class1 ARE である c-myc mRNA ARE によりその結合が阻害されたことから、TNF mRNA の AUUUA モチーフの uridine stretch を認識して結合していることが確認された。

さらに、TNF-alpha の産生は、IMR-32 細胞では interferon-gamma と LPS によって産生が促され、IL-4 によって抑制される。IMR-32 細胞を *in vitro* において、両者のサイトカインの存在下で培養して、ELAV 様蛋白の発現を検討し、interferon-gamma と LPS による刺激では、明らかな変化は認められなかったが、IL-4 で培養した場合、ELAV-like 蛋白の発現の低下が観察された。

考 察

神経系以外に存在する RNA 結合蛋白には、それぞれ単

独或いは複数の RNA 認識配列がその結合に関与している。複数の RRM が関与している蛋白としては、hnRNP A1、ASF/SF2、sxl、PABP、nucleolin などがある。これらの蛋白においては、第1 RRM と第2 RRM の共同作用が必要であり、特に第1 RRM が主たる役割を担っていると考えられている。今回の我々の研究の結果から、ELAV 様蛋白についても同様に、第1 RRM が重要であることが推定された。第2 RRM の役割としては、第1 RRM と RNA が結合した後に、第2 RRM がさらに RNA と結合して、第1 RRM と RNA との結合の安定性に関与している可能性が考えられている。このことは、第2 RRM の第4 beta-sheet 構造に相当する 185-192 に位置するアミノ酸残基が IL-3 mRNA の結合に直接関与している可能性を強く示唆するものである。さらには、第1 RRM の2個のアミノ酸残基が、同様に RNA との直接の結合に関与しているか、或いは2個のアミノ酸残基が RNA の結合に必要な立体構造に重要であると考えられる。今後、このように特定の限られたアミノ酸残基がヒト ELAV 様神経特異的蛋白の IL-3 mRNA との結合において重要であることを示唆するものである。患者の抗体の結合に、この42番目と44番目のアミノ酸残基が重要であるか検討する必要がある。

今回の研究によって、我々は TNF-alpha mRNA と神経特異的 ELAV 様蛋白の結合を初めて証明した。TNF-alpha は、多発性硬化症や AIDS dementia、或いは cerebral malaria などの疾患に重要な役割を果たしていると考えられている。TNF-alpha は、中枢神経系では、ミクログリアやアストログリアから産生されていることが知られているが、近年、神経細胞自体からも産生されていると報告されている。TNF-alpha の産生は転写段階と転写後の段階で制御されていると考えられており、転写後の調節は、3' UTR の ARE に結合、解離することによって調節されていると考えられている。これまでに、T細胞やマクロファージにおいて、TNF-alpha mRNA ARE に結合する蛋白が幾つか同定されてきたが、今回の研究により、ヒト神経特異的 ELAV 様蛋白もまた、神経細胞内で TNF-alpha mRNA と結合することが証明された。このことにより、神経特異的 ELAV 様蛋白が TNF-alpha の産生を制御している可能性が推定される。神経細胞において、TNF-alpha がどのような役割を果たしているのか不明な点が多いが、IL-3 と共に神経細胞の生存に関わっている可能性も考えられている。このことは、神経細胞の変性に神経特異的 ELAV 様蛋白が密接に関与していることを強く示唆するものである。

今後、神経細胞におけるヒト神経特異的 ELAV 様蛋白

の役割を更に明らかにしていくことが、傍腫瘍性神経症候群や多くの神経変性疾患の病態の解明や治療法の開発に重要であると考えられる。

まとめ

神経特異的 ELAV 様蛋白 ple21 の mRNA 3'UTR ARE との結合には、第 1 RNA 認識領域の 42 番目と 44 番目のアミノ酸残基と第 2 RNA 認識領域の 185-192 番目の 8 個のアミノ酸残基が重要であることが明らかになった。また、神経特異的 ELAV 様蛋白は TNF-alpha mRNA 3' UTR ARE と結合することを証明した。

文 献

- 1、 Sakai K, Gofuku M, Kitagawa Y, Ogasawara T, Hirose G, Koh S-C, Yamazaki M, Yanagisawa NL. S, A hippocampal protein associated with paraneoplastic limbic encephalitis, *Biochem Biophys Res Comm*, 199: 1200-1208,1994.
- 2、 Kumagai T, Kitagawa Y, Hirose G, Sakai K. Antibody recognition and RNA binding of a neuronal nuclear autoantigen associated with paraneoplastic neurological syndromes and small cell lung carcinoma. *J Neuroimmunol* 93:37-44,1999.
- 3、 Sakai K, Kitagawa Y, Hirose G. Analysis of the RNA recognition motifs of human neuronal ELAV-like proteins in binding to a cytokine mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* in press.
- 4、 Sakai K, Kitagawa Y, Hirose G. Binding of neuronal ELAV-like proteins to the uridine-rich sequence in the 3'-untranslated region of tumor necrosis factor- α messenger RNA. *FEBS lett* in press.

Crow-Fukase 症候群における高 VEGF 血症の起源についての検討.

有村公良, 橋口照人, 松室健士, 渡邊 修, 是枝快房, 納 光弘

目的

我々はこれまで Crow-Fukase 症候群において血清中に vascular endothelial growth factor (VEGF) が異常に増加していること¹⁾, また VEGF の中で VEGF₁₆₅ がより強力な血管透過性活性を示すことを明らかにした. VEGF はその生理活性として, 血管新生作用, 血管透過性亢進作のみならず, 凝固系の活性化, 骨芽細胞の刺激などの多彩な作用を持ち, それらの多くが Crow-Fukase 症候群の病態と密接に関連していることが強く示唆される. また近年 VEGF は血小板蛋白質の一つであり血小板凝集反応に伴って放出されることが報告され, 血小板の血管壁への粘着・凝集によってその局所濃度を高め種々の生理活性を発現していると推測されている²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾. 今年度は異常高値を示す血清 VEGF の由来について検討した. また multicentric Castleman 病患者で血清 VEGF が高値にもかかわらず, Crow-Fukase 症候群の臨床症状を伴わない症例が見られたので, この症例における VEGF の isoform についても検討した.

対象・方法

1. 血小板中の VEGF の測定

Crow-Fukase 症候群患者 5 例において血清および血漿の VEGF 濃度をサンドイッチ ELISA 法にて測定した. 次に血小板中の VEGF 濃度を測定する目的で, 2 例の患者より調製した platelet-rich plasma (PRP) の Thrombin/CaCl₂ による凝固反応後の上清と platelet-poor plasma (PPP) の VEGF 濃度を測定比較した. さらに 1 例の患者より調製した PRP の thrombin による血小板凝集反応を lumiaggregometer にて測定の上, 血小板凝集反応前後における上清の VEGF 濃度を測定比較した.

2. 組織の免疫染色

Crow-Fukase 症候群患者の骨髄, リンパ節, 骨硬化性病変の病理標本を polyclonal VEGF 抗体で免疫染色を行った.

3. VEGF isoform の同定

Crow-Fukase 症候群患者 2 例と Castleman 病患者 1 例の血清および 1 例のリンパ節培養上澄液を Hiprep Sephacryl S-100 ゲルで濾過後, 各 fraction の VEGF 濃度を ELISA 法で測定し, さらに monoclonal VEGF₁₂₁ 抗体を用いた immunoblot で確認した.

結果

- (1) 5 例の CROW-FUKASE 症候群患者における血清/血漿の VEGF 濃度 (pg/ml) は各々 8634/152, 3724/127, 2376/78, 1507/133, 384/36 であり, いずれの症例においても血清の VEGF 濃度は血漿のそれに比べ著しい高値を示した. (Fig1) (2) 2 例の患者より調製した PRP の thrombin/CaCl₂ による凝固反応後の上清の VEGF 濃度は PPP のそれに比べ血清での値に近い高値を示した. (Fig2) (3) 1 例の患者より調製した PRP の thrombin による血小板凝集反応前後の VEGF 濃度は反応前: 161pg/ml, 反応後: 1979pg/ml であった.
2. 患者骨髄, リンパ節, 骨硬化性病変の免疫染色では, 抗体で染色される細胞は形質細胞のほか白血球, マクロファージ様細胞でも染色が認められた.
3. 2 例の Crow-Fukase 症候群では増加している VEGF の isoform は VEGF₁₆₅ が主であるのに対し, 高 VEGF 血症を伴う Castleman 病患者では, VEGF₁₂₁ が主であった. (Fig3)

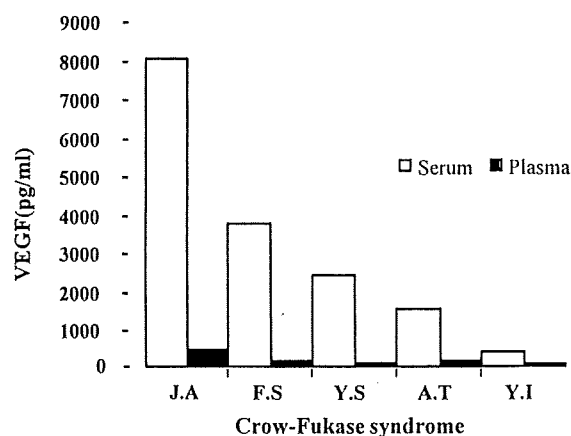


Fig 1. VEGF concentrations in serum and plasma

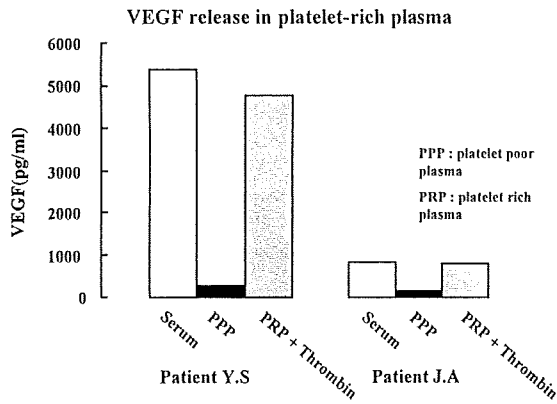


Fig 2. Clotting of PRP from two patients with Crow-Fukase syndrome by thrombin/CaCl₂ resulted in higher VEGF levels in nearly equal amount to serum levels

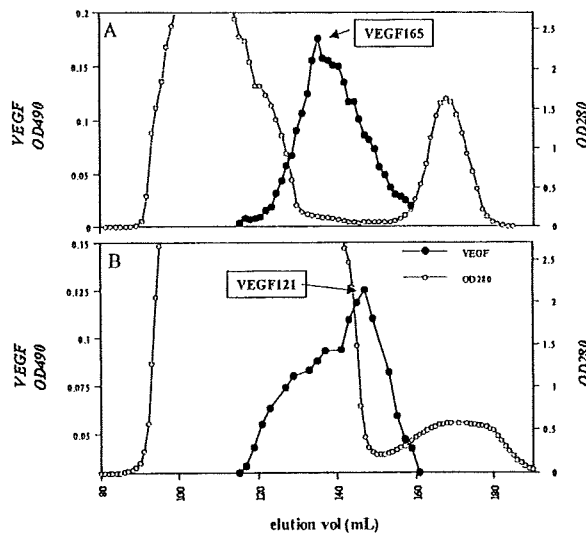


Fig 3. VEGF isoform in patients with Crow-Fukase syndrome and Castleman syndrome

考察

今回の結果から、Crow-Fukase 症候群患者では血清中の高濃度 VEGF の多くが血小板由来であり、凝集反応に伴って放出されることが明らかとなった。Crow-Fukase 症候群では慢性凝固亢進状態が存在することが知られている。このような状態下では、VEGF を過剰に含む血小板が血管壁へ粘着・凝集し局所での VEGF 濃度を著しく高め、血管透過性亢進、血管新生、凝固、炎症、血管修復などの生理活性を過剰発現させるものと推測される。このようにして、局所で著しく増幅された VEGF 濃度は Crow-Fukase 症候群の病態と深く関連していることが考えられた。また今回血小板中の VEGF がトロンビンなどによる凝集反応で一気に放出されることから、抗トロンビン製剤や血小板凝集抑制剤が有効であることが考えられる。実際抗トロンビン製剤であるアルガトロバンが本症に有効との報告が多く、今回の結果はそれを裏付ける結果であった。次に VEGF の産生

細胞については、これまで Crow-Fukase 症候群における骨病変、とくにその中の形質細胞である可能性を報告してきた。今回の検討では、その他に VEGF はマクロファージ、白血球などでも産生されており、Crow-Fukase 症候群においては、これらの細胞を介してサイトカインネットワークが賦活化されている可能性が示唆された。また VEGF の isoform の検討では、Crow-Fukase 症候群で増加しているのは主に VEGF₁₆₅ であるのに対し、高 VEGF 血症を伴うにもかかわらず、Crow-Fukase 症候群の臨床症状を示さなかった Castleman 病では、VEGF₁₆₅ に比較して生理活性の弱い VEGF₁₂₁ が主に増加していることから、臨床症状の差異は VEGF の isoform の違いによる可能性が示唆された。

結語

1. Crow-Fukase 症候群において、血中では VEGF は主に血小板中に存在し、トロンビンなどによる凝集反応で放出される事により、局所での VEGF 濃度を著しく高め、その生理活性を過剰に発現させる事が考えられた。
2. Crow-Fukase 症候群では VEGF は骨病変の形質細胞のほか、マクロファージ、白血球などでも産生されており、本症におけるサイトカインネットワークの賦活化との関連が示唆された。
3. Crow-Fukase 症候群では VEGF の isoform は主に生理活性の強い VEGF₁₆₅ であり、Castleman 病との臨床症状の差は isoform の違いによる可能性が考えられた。

文献

- 1) Watanabe O. et al. Overproduction of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is causative in Crow-Fukase (POEMS) syndrome. *Muscle Nerve* 21: 1390-1397, 1998.
- 2) Mohle R. et al. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 663-668, 1997.
- 3) Maloney JP. et al. In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am. J. Physiol.* 275: H1054-H1061, 1998.

- 4) Banks RE. et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br. J. Cancer.* 77: 956 – 964, 1998.
- 5) Webb NJ. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin. Sci. Colch.* 94: 395 – 404, 1998

末梢神経微小血管由来内皮細胞のバリアー機能に対する各種サイトカインの影響

水澤 英洋 岩崎 孝之 神田 隆

目 的

Guillain-Barre 症候群など自己免疫性末梢神経疾患の成立には、自己抗体や各種サイトカインなどの液性因子が、血液神経関門 (blood nerve barrier, BNB) を経て血中から末梢神経実質へ移行する事が重要とされているが、BNB の機能それ自体については依然不明とされている。今回我々は、BNB のバリアー機能に対する液性因子の影響を調べる目的で、末梢神経微小血管内皮細胞 (peripheral nerve microvascular endothelial cell, PnMEC) の単層培養からなる BNB モデルを作成し、そのバリアー機能の指標である膜電気抵抗 (transendothelial electrical resistance, TEER) と inulin-clearance を、各種サイトカインの影響下で測定し比較検討した。

方 法

1) PnMEC は、牛の馬尾神経内膜組織より各種酵素処理と、高分子デキストラン、Percoll gradient を用いて分離した。2) 24 well culture insert (孔径 $0.4 \mu\text{m}$) の上面に PnMEC を confluent まで培養し、*in vitro* の BNB モデルを作成した。3) IL-1 β 、TNF α 、VEGF をおのおのの culture insert に 10 ng/ml の濃度となるよう投与し、投与前及び投与後 15 分、30 分、60 分、120 分の各時点での TEER を、Endohm-6 を用いて測定した。4) TEER 測定の場合と同様に各サイトカインをおのおのの culture insert に投与した後、[carboxyl- ^{14}C]-inulin ($0.1 \mu\text{Ci/ml}$) を culture insert 内に加え、投与後 20 分、40 分、60 分での culture insert 外の ^{14}C -inulin 濃度を液体シンチレーション法を用いて測定し、次式の通り各 inulin-clearance を算出した。

$$C_{\text{in}} = V_L \times \text{CPM}_L / \text{CPM}_U$$

C_{in} : clearance of inulin (μl)

V_L : volume of lower compartment (μl)

CPM_L : radioactivity of ^{14}C -inulin in lower compartment (CPM/ μl)

CPM_U : radioactivity of ^{14}C -inulin in upper compartment (CPM/ μl)

結 果

各群の TEER を比較すると (Fig. 1)、コントロールの TEER に有意な変化は認めなかったが ($12.96 \pm 1.25 \Omega\text{cm}^2 \sim 12.40 \pm 0.72 \Omega\text{cm}^2$)、各サイトカインを投与された群の TEER はいずれも有意に低下し、IL-1 β では 15 分後で $9.55 \pm 0.94 \Omega\text{cm}^2$ と最も有意に低下し ($p < 0.001$)、TNF α では 30 分後に $9.73 \pm 1.17 \Omega\text{cm}^2$ と、VEGF では

60 分後に $9.87 \pm 1.04 \Omega\text{cm}^2$ とおのおの最も有意に低下した ($p < 0.001$)。

各群の inulin-clearance を比較すると (Fig. 2)、いずれのサイトカインを投与した群においても、すべての時点でコントロールと比べ有意な増加を認めた ($p < 0.005 \sim p < 0.0001$)。Inulin 投与後 20 分及び 40 分の時点では、IL-1 β の群が最も高い inulin-clearance を示したが ($7.72 \pm 0.16 \mu\text{l}$, $12.34 \pm 0.75 \mu\text{l}$)、60 分の時点では、TNF α が最も高値であった ($19.79 \pm 4.18 \mu\text{l}$)。一方、有意差の程度で比較すると、VEGF の群が 40 分及び 60 分の時点で最もコントロールと比べ有意な inulin-clearance の増加を示した ($p < 0.0001$, $p < 0.0005$)。

考 察

近年、Guillain-Barre 症候群や chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy などの炎症性末梢神経疾患において、IL-1 β 、TNF α 等の炎症性サイトカインが上昇している事が報告され、その病態との関係が注目されている。また、Crow-Fukase 症候群では VEGF が著増しており、その病態に深く関与していることが指摘されている。今回の結果では、IL-1 β 、TNF α 、VEGF のいずれによっても、BNB モデルの TEER の低下と inulin-clearance の増加を来たしており、いずれのサイトカインも PnMEC のバリアー機能を低下させると考えられる。このバリアー機能を低下させる程度は、各サイトカイン間で大きな違いを認めないが、IL-1 β は TEER、inulin-clearance 共に 15~20 分後の早い時点で強い変化を来している点が特徴的である。炎症性末梢神経疾患で増加しているこれらのサイトカインが、*in vivo* においても BNB のバリアー機能を修飾し、自己抗体をはじめとする各種液性因子の末梢神経実質内への移行に影響する事で、各疾患の病態に深く関与していると推測される。

結 論

牛の馬尾末梢神経内膜組織由来の PnMEC を用いて BNB モデルを作成し、そのバリアー機能の指標となる TEER と inulin-clearance に対する IL-1 β 、TNF α 、VEGF の影響を検討した。いずれのサイトカインも、有意な TEER の低下と inulin-clearance の増加を来たし、PnMEC のバリアー機能を低下させると考えられた。炎症性末梢神経疾患の病態に、サイトカインによる BNB 機能の修飾が関与することが推測された。