

# 多発性硬化症の病態機構解明と新しい治療法 開発に関する研究

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）総合研究報告書  
（平成 9 年度・平成 11 年度）

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）総括研究報告書  
（平成 11 年度）

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）分担研究報告書  
（平成 11 年度）

平成 12 年 3 月

主任研究者 山村 隆  
国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部 部長

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）総括研究報告書  
（平成 11 年度）

多発性硬化症の病態機構解明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 免疫研究部 部長

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解明と新しい治療法開発に関する研究  
平成 11 年度総括研究報告書

主任研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部 部長

**研究要旨** 患者血液、病変部サンプルを解析し、多発性硬化症 (MS) の病態機構における NK 細胞、NKT 細胞の役割を明らかにすることを目標とした。主任研究者は SSCP 法により V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q NKT 細胞の MS および慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチー (CIDP) 患者体内における分布、動態を解析し、末梢血における NKT 細胞の著明な減少は MS の免疫病態を特徴づけるものであり MS 以外の炎症性神経疾患では見られないこと、MS 病変 では NKT 細胞が検出されることは稀であるが、CIDP ではかなり頻繁に検出できることなどを明らかにした。MS における NKT 細胞減少の原因として組織特異的因子の関与が示唆された。一方 NK 細胞の表面抗原解析の結果、Fas (CD95) 抗原を発現する NK 細胞頻度が MS 寛解期で上昇していること、再発直後には対照群のレベルまで低下するが、治療により再度上昇することが明らかになった。またカニクイザルでは、EAE 抵抗性と感作後の NK 細胞上昇が関連していることが示された。NK、NKT 細胞の自己免疫病発症抑制機構が徐々に明らかになり、治療や診断への応用も視界に入ってきた。

**分担研究者**

|       |                           |
|-------|---------------------------|
| 吉良 潤一 | 九州大学脳研神経内科 教授             |
| 橋本 修治 | 天理よろず相談所病院神経内科<br>部長      |
| 寺尾 恵治 | 国立感染研・筑波霊長類センター<br>室長     |
| 田平 武  | 国立精神・神経センター<br>疾病研究第六部 部長 |

**A. 研究目的**

我々はこれまでに NK 細胞や V $\alpha$ 14 NKT 細胞が自己免疫性脳炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) において抑制的に働く調節細胞であることを明らかにしてきた。CD1d 分子に拘束された natural killer (NK) T 細胞は、マウスでは V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 281、ヒトでは V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q TCR invariant 鎖を発現する。主任研究者は今回 SSCP 法を用いて、多発性硬化症

(MS) および慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチー (CIDP) の末梢血および病変サンプルにおける NKT 細胞の変化について検討を加えた。

MS 患者における NK 細胞の研究は遅れている。主任研究者と橋本は、NK 細胞の表面抗原発現をフローサイトメトリーにより解析した。吉良は CD8 T 細胞のサイトカイン産生プロファイルにつき検討した。寺尾は、カニクイザルの EAE および EAN モデルを確立し、感受性のある固体と疾患抵抗性を示す固体の相違点を、各種パラメーターにつき解析した。

**B. 研究方法**

V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q NKT 細胞の検出には、RT-PCR-SSCP 法を用いた。V $\alpha$ 24 特異的プライマーおよび C $\alpha$  特異的プライマーにより、まず V $\alpha$ 24 陽性 TCR 産物を増幅したあと SSCP ゲルに展開し、V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q invariant 鎖特異的なプローブで NKT 細胞 V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q invariant 鎖の発現を確

認した。

分担研究者の研究に関する方法については、各分担研究報告を参照されたい。

### C. 研究結果

MS 寛解期の PBMC では V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q TCR は検出できず、MS 末梢血における NKT 細胞の著明な減少が確認された。他方、増悪期の MS では 26 例中 7 例 (26.9%) に検出され、NKT 細胞の減少は永続的なものではないことが示唆された。他の神経疾患 20 例中 18 例の PBMC で V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q TCR が検出され、そのうち 6 例の CIDP では全例が V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q TCR 陽性であった。

MS の剖検脳では、検索した 25 サンプルのうち 15 サンプル (60.0%) で V $\alpha$ 24 TCR が検出されたが、V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q invariant 鎖を検出できたのは、うち 1 サンプルのみであった。一方、CIDP の生検神経標本の全例で V $\alpha$ 24 TCR が検出され、そのうち 6 例で V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q invariant 鎖を検出できた。一方、対照の生検神経標本 11 例では invariant 鎖を検出できなかった。以上の結果は、CIDP の末梢神経において NKT 細胞浸潤が頻繁に見られることを意味する。

橋本は、MS 患者末梢血 NK 細胞の CD95 抗原陽性率を経時的に解析し、再発時に健常対照者と同レベルまで低下する CD95 陽性率が、治療開始一ヶ月後に上昇することを証明し、一例では CD95 陽性率と病状の逆相関を示した。

寺尾はカニクイザルの EAE、EAN の誘導法を確立し、疾患抵抗性を示す個体では CD16 陽性 NK 細胞の著しい増加が見られることなどを観察した。

吉良はアジア型 MS において Tc1 優位の状態であることを示した。

### D. 考察

自己免疫病における NKT 細胞の数または機能の異常が報告されている。MS においても末梢血 V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q NKT 細胞の著明な減少が確認

できたが、他の炎症性/自己免疫性神経疾患 (CIDP を含む) では NKT 細胞の減少は確認できず、NKT 細胞の減少は MS の免疫学的標識の一つとして認識されるべきものであることが明確になった。また、病変部の解析により、MS 病変では NKT 細胞浸潤はごく稀であり、CIDP では NKT 細胞浸潤がより頻繁であることがわかった。我々の知る限りにおいて、炎症病変局所における NKT 細胞浸潤が証明されたのは本報告がはじめてであり、NKT 細胞が局所のサイトカイン環境を調節する可能性を示唆する興味深い所見である。

なぜ MS では NKT 細胞がこれほど減少するのであろうか？NKT 細胞減少のメカニズムは依然として明確ではないが、末梢神経疾患 (CIDP) と中枢神経疾患 (MS) における大きな相違は、NKT 細胞減少における臓器 (組織) 特異的因子の関与を示唆する。例えば、中枢神経系における CD1d 分子発現レベル亢進、あるいは中枢神経特異的な糖脂質抗原などの局所呈示が、MS における NKT 細胞減少に関与している可能性が考えられる。

NK 細胞の CD95 発現については、現在国立精神・神経センターと天理病院で検討を続けているが、二施設の研究結果は一致しており、NK 細胞 CD95 発現率が MS の病態把握の良いマーカーであることが推測されている。臨床的には治療法決定に役立つ可能性があり、きわめて重要な発見と考える。

EAE の発症抵抗性に NK 細胞の増加が関与していることは、これまでマウスやラットの系では報告されていない。サルで確認を続けるとともに、ヒトにおいて確認できるかどうか検討する必要がある。

### E. 結論

末梢血における NKT 細胞の著明な減少は MS の免疫病態を特徴づけるものであり、CIDP など MS 以外の炎症性神経疾患では見られない。一方、MS 病変 では NKT 細胞が検出されるこ

とは稀であるが、CIDP ではかなり頻繁である (60%)。このように MS と CIDP は NKT 細胞の存在様態において大きく異なる疾患である。MS における NKT 細胞減少のメカニズムは明確でないが、組織特異的な因子 (CD1d 発現、糖脂質発現) が関与している可能性がある。MS の臨床病態と NK 細胞の表面抗原発現の相関は今後の重要な研究テーマである。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### a. 雑誌

- 1) Pal, E., T. Yamamura and T. Tabira: Autonomic regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-4 knockout mice. *J. Neuroimmunol.* 100:149-155, 1999
- 2) Nam, K-H., Zs. Illes, K. Terao, Y. Yoshikawa, and T. Yamamura: Characterization of expanded T cell clones in healthy macaques: ontogeny, distribution and stability. *Developmental and Comparative Immunology* (in press), 2000
- 3) Illes, Z., T. Kondo, J. Newcombe, N. Oka, T. Tabira, and T. Yamamura: Differential expression of natural killer T cell V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Immunol.* (in press), 2000
- 4) Kawamura, K., T. Yamamura, K. Yokoyama, D-H. Chui, Y. Fukui, T. Sasazuki, H. Inoko, C.S. David, and T. Tabira: Induction of autoimmune encephalitis by proteolipid protein 95-116-specific T cells from HLA-DR2 (DRB1\*1502) transgenic mice. *J. Clin. Invest.* (in press), 2000
- 5) Endre Pal、田平 武、谷口 克、山村 隆: 糖脂質による NKT 細胞活性化を介した自己免疫性脳炎の治療. *神経免疫学* 8:52-53, 2000
- 6) 山村 隆、近藤 誉之: T cell receptor と神経免疫疾患. 特集. 脳神経系の分子医学. *Molecular Medicine* 2000 (印刷中)
- 7) 山村 隆: 多発性硬化症. *日本医師会雑誌*

(印刷中)

8) 近藤 誉之、山村 隆: 多発性硬化症の免疫病態. *内科* (印刷中)

9) 山村 隆: NKT 細胞と自己免疫疾患モデル. *最新医学* (印刷中)

#### b. 単行本

- 1) 山村 隆: 神経系の抗原性. 免疫学からみた神経系と神経疾患 (吉田孝人、糸山泰人、錫村明生編), 日本医学館 pp31-39, 1999
- 2) 山村 隆: 神経疾患各論. 脱髄疾患. *神経内科学* (江藤 文夫・飯島 節編), 南江堂, 2000 (印刷中)

## 2. 学会発表

### a. 国際学会

- 1) Yamamura, T., B-N. Zhang, D.H. Chui, T. Tabira, T. Kawano, and T. Taniguchi: The role of NK and NKT cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Experimental Biology '99*. Washington DC, April 20, 1999
- 2) Illes, Zs., T. Tabira and T. Yamamura: Increased frequency of activated cytolytic CD56<sup>+</sup> T-cells in the peripheral blood of patients with multiple sclerosis. The ECTRIMS (European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis) and ACTRIMS 1999, Basel, September 18, 1999
- 3) Illes, Zs., T. Kondo, J. Newcombe, T. Tabira and T. Yamamura: Selective loss of invariant V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells in multiple sclerosis. The ECTRIMS (European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis) and ACTRIMS 1999, Basel, September 18, 1999
- 4) Illes, Zs., 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 ECTRIMS (European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis) and ACTRIMS 1999, Basel, September 18, 1999
- 5) Illes, Zs., T. Kondo, J. Newcombe, T. Tabira and

T. Yamamura: Selective loss of invariant V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q T-cells in multiple sclerosis. *Neuropathology at the Turn of the Millennium*, Bonn, October 6-9, 1999 (die Deutsche Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie)

#### b. 国内学会

- 1) Endre Pal, 田平 武, 山村 隆: 実験的自己免疫性脳炎における交感神経系の関与: 正常マウスとサイトカイン欠損マウスの比較. 第 40 回日本神経学会総会, 東京, 1999 年 5 月 19 日
- 2) 川村 和之, 山村 隆, 田平 武: DR2 トランスジェニックマウス由来の PLP95-116 特異的 T cell line の性状. 第 40 回日本神経学会総会, 東京, 1999 年 5 月 19 日
- 3) 高橋 和也, 田平 武, 山村 隆: 多発性硬化症 CD3 陽性細胞分画における NK 活性抑制性レセプター(KIR)発現の低下. 第 40 回日本神経学会総会, 東京, 1999 年 5 月 19 日
- 4) 川村 和之, 山村 隆, 福井 宣規, 笹月 健彦, 猪子 英俊, 田平 武: HLA-DR2 トランスジェニックマウスにおけるヒト myelin basic protein と proteolipid protein に対する T 細胞応答の解析. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 1999 年 12 月 3 日
- 5) Fazekas, G., T. Tabira, and T. Yamamura: Immunostimulatory CpG oligonucleotides as an effective adjuvant for inducing PLP-specific T helper 1 responses and EAE mediated by the T cells. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 1999 年 12 月 3 日
- 6) 山村 隆, Endre Pal, 張 本寧, 竹田 和由, 奥村 康, 河野 鐵, 谷口 克: 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)における NKT 細胞の役割 - 遺伝子改変動物による解析. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 1999 年 12 月 3 日
- 7) Pal, E., T. Tabira, and T. Yamamura: Effects of  $\alpha$ -galactosylceramide (GC) on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): Inhibition of EAE with GC requires B7.2 blockade. 第 29 回

日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 1999 年 12 月 3 日

8) 高橋 和也, 山村 隆: 多発性硬化症患者末梢血 KIR(killer cell inhibitory receptor) 発現の解析. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 1999 年 12 月 3 日

#### c. 招待講演

- 1) 山村 隆: 多発性硬化症の免疫病態の解析. シンポジウム免疫性神経疾患の発症のメカニズムをめぐって. 第 42 回日本神経化学会, 1999 年 9 月 17 日, 広島
- 2) 山村 隆: 免疫異常としての多発性硬化症研究. 平成 11 年度創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業. 第 4 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー 1999 年 9 月 22 日, 東京
- 3) 山村 隆: 神経筋難病をめぐって. 多発性硬化症. 第 115 回日本医学会シンポジウム. 神経筋難病の update. 1999 年 12 月 2 日, 東京
- 4) Yamamura, T., B-n. Zhang, E. Pal, and S. Miyake: Regulation of autoimmune encephalomyelitis: The role of NK and NKT cells. International Workshop on Induction and Regulation of Autoimmune Disease. 21-25, Feb 2000 at The Horizon at Mission Beach, Queensland, Australia, Supported by Japan Science and Technology Agency Organizing Committee: Takashi Yamamura, David A. Hafler, Vijay K. Kuchroo and Sachiko Miyake
- 5) Yamamura, T., Zs. Illes and T. Kondo: Analysis for T and NKT cell repertoire in CNS and PNS autoimmune diseases. International Workshop on Induction and Regulation of Autoimmune Disease. 21-25, Feb 2000 at The Horizon at Mission Beach, Queensland, Australia, Supported by Japan Science and Technology Agency Organizing Committee: Takashi Yamamura, David A. Hafler, Vijay K. Kuchroo and Sachiko Miyake

**G. 知的所有権の取得状況**

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）分担研究報告書  
（平成 11 年度）

多発性硬化症の病態機構解明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 免疫研究部 部長



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解明と新しい治療法開発に関する研究

平成 11 年度分担研究報告書

主任研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部 部長

**研究要旨** V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q NKT 細胞は免疫調節細胞として機能し、自己免疫疾患においてその数や機能に変調のあることが報告されている。本研究では、まず SSCP 法により V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q NKT 細胞の多発性硬化症(MS)および慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチー (CIDP) 患者体内における分布、動態を解析した。その結果、末梢血における NKT 細胞の著明な減少は MS の免疫病態を特徴づけるものであり CIDP など MS 以外の炎症性神経疾患では見られないこと、MS 病変 では NKT 細胞が検出されることは稀であるが、CIDP ではかなり頻繁に検出できることなどが明らかになった。このように MS と CIDP は NKT 細胞の存在様態において大きく異なる疾患である。MS における NKT 細胞減少のメカニズムとして組織特異的な因子 (CD1d 発現、糖脂質発現) が関与している可能性が推測された。また MS 寛解期の NK 細胞の発現分子の検討の中から、CD95 分子の発現減少が再発予知マーカーとして利用できる可能性が明らかになった。

分担研究者

吉良 潤一 九州大学脳研神経内科 教授  
橋本 修治 天理よろず相談所病院神経内科  
部長  
寺尾 恵治 国立感染研・筑波霊長類センター  
室長  
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

CD1d 分子に拘束された natural killer (NK) T 細胞は、マウスでは V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 281、ヒトでは V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q TCR invariant 鎖を発現する免疫調節細胞である。我々はこれまでに NK 細胞や V $\alpha$ 14 NKT 細胞が自己免疫性脳炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) において調節的に働くことを明らかにしてきた。我々は今回 SSCP 法を用いて、多発性硬化症 (MS) および慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチー

(CIDP) の末梢血および病変サンプルにおける NKT 細胞の変化について検討を加えた。

B. 研究方法

末梢血単核細胞 (PBMC) は、44 例の MS (うち寛解期 18 例、増悪期 26 例)、20 例の MS 以外の神経疾患 (CIDP 6 例、パーキンソン病 3 例、重症筋無力症 2 例、その他の変性疾患、ニューロパチー等) から調製した。また病変部位の解析には、凍結中枢神経標本 (MS 25 サンプル、他の神経疾患 6 サンプル、非神経疾患 6 サンプル) および sural nerve 生検標本 (CIDP 10 サンプル、他のニューロパチー 11 例) を利用した。

V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q NKT 細胞の検出には、RT-PCR-SSCP 法を用いた。V $\alpha$ 24 特異的プライマーおよび C $\alpha$  特異的プライマーにより、まず V $\alpha$ 24 陽性 TCR 産物を増幅したあと SSCP ゲルに展開し、V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q invariant 鎖特異的なプローブで NKT 細胞 V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q invariant 鎖の発現を確

認した。

### C. 研究結果

MS 寛解期の PBMC では V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q TCR は検出できず、MS 末梢血における NKT 細胞の著明な減少が確認された。他方、増悪期の MS では 26 例中 7 例 (26.9%) に検出され、NKT 細胞の減少は永続的なものではないことが示唆された。他の神経疾患 20 例中 18 例の PBMC で V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q TCR が検出され、そのうち 6 例の CIDP では全例が V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q TCR 陽性であった。

MS の剖検脳では、検索した 25 サンプルのうち 15 サンプル (60.0%) で V $\alpha$ 24 TCR が検出されたが、V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q invariant 鎖を検出できたのは、うち 1 サンプルのみであった。一方、CIDP の生検神経標本の全例で V $\alpha$ 24 TCR が検出され、そのうち 6 例で V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q invariant 鎖を検出できた。一方、対照の生検神経標本 11 例では invariant 鎖を検出できなかった。以上の結果は、CIDP の末梢神経において NKT 細胞浸潤が頻繁に見られることを意味する。

最後に MS 剖検脳と CIDP 生検神経標本における CD1d 分子の発現を PCR 法により検討した。MS では 25 サンプル中 18 例 (72.0%) で陽性であったが、CIDP では 9 例中 2 例 (22.2%) においてのみ陽性であった。

### D. 考察

自己免疫病において NKT 細胞の数または機能の異常が報告されている<sup>3,4)</sup>。MS においても末梢血 V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q NKT 細胞の著明な減少が確認できたが、他の炎症性/自己免疫性神経疾患 (CIDP を含む) では NKT 細胞の減少は確認できず、NKT 細胞の減少は MS の免疫学的標識の一つとして認識されるべきものであることが明確になった。また、病変部の解析により、MS 病変では NKT 細胞浸潤はごく稀であり、CIDP では NKT 細胞浸潤がより頻繁であることがわかった。我々の知る限りにおいて、炎症病

変局所における NKT 細胞浸潤が証明されたのは本報告がはじめてであり、NKT 細胞が局所のサイトカイン環境を調節する可能性を示唆する興味深い所見である。

実際、MS と CIDP 病変局所における IFN- $\gamma$  と IL-4 mRNA 発現を RT-PCR 法で検討すると、MS 病変では IFN- $\gamma$  がほぼ一定して検出できるのに対し IL-4 は検出できない。一方、CIDP 病変では IL-4 が一定して検出できず、MS に比較して CIDP の局所環境が相対的に Th2 に偏倚していることが推察される。この結果は局所の NKT 細胞がサイトカイン環境を決定する因子である可能性を支持するが、詳細を明らかにするには今後 single cell level の検討を行う必要がある。

なぜ MS では NKT 細胞がこれほど減少するのであろうか？NKT 細胞減少のメカニズムは依然として明確ではないが、末梢神経疾患 (CIDP) と中枢神経疾患 (MS) における大きな相違は、NKT 細胞減少における臓器 (組織) 特異的因子の関与を示唆する。例えば、中枢神経系における CD1d 分子発現レベル亢進、あるいは中枢神経特異的な糖脂質抗原などの局所呈示が、MS における NKT 細胞減少に関与している可能性が考えられる。

### E. 結論

末梢血における NKT 細胞の著明な減少は MS の免疫病態を特徴づけるものであり、CIDP など MS 以外の炎症性神経疾患では見られない。一方、MS 病変では NKT 細胞が検出されることは稀であるが、CIDP ではかなり頻繁である (60%)。このように MS と CIDP は NKT 細胞の存在様態において大きく異なる疾患である。MS における NKT 細胞減少のメカニズムは明確でないが、組織特異的な因子 (CD1d 発現、糖脂質発現) が関与している可能性がある。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

## a. 雑誌

- 1) Pal, E., T. Yamamura and T. Tabira: Autonomic regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-4 knockout mice. *J. Neuroimmunol.* 100:149-155, 1999
- 2) Nam, K-H., Zs. Illes, K. Terao, Y. Yoshikawa, and T. Yamamura: Characterization of expanded T cell clones in healthy macaques: ontogeny, distribution and stability. *Developmental and Comparative Immunology* (in press), 2000
- 3) Illes, Z., T. Kondo, J. Newcombe, N. Oka, T. Tabira, and T. Yamamura: Differential expression of natural killer T cell V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Immunol.* (in press), 2000
- 4) Kawamura, K., T. Yamamura, K. Yokoyama, D-H. Chui, Y. Fukui, T. Sasazuki, H. Inoko, C.S. David, and T. Tabira: Induction of autoimmune encephalitis by proteolipid protein 95-116-specific T cells from HLA-DR2 (DRB1\*1502) transgenic mice. *J. Clin. Invest.* (in press), 2000
- 5) Endre Pal、田平 武、谷口 克、山村 隆：糖脂質による NKT 細胞活性化を介した自己免疫性脳炎の治療。神経免疫学 8:52-53, 2000
- 6) 山村 隆、近藤 誉之：T cell receptor と神経免疫疾患。特集。脳神経系の分子医学。Molecular Medicine 2000 (印刷中)
- 7) 山村 隆：多発性硬化症。日本医師会雑誌 (印刷中)
- 8) 近藤 誉之、山村 隆：多発性硬化症の免疫病態。内科 (印刷中)
- 9) 山村 隆：NKT 細胞と自己免疫疾患モデル。最新医学 (印刷中)

## b. 単行本

- 1) 山村 隆：神経系の抗原性。免疫学からみた神経系と神経疾患 (吉田孝人、糸山泰人、錫村明生編), 日本医学館 pp31-39,1999
- 2) 山村 隆：神経疾患各論。脱髄疾患。神経内科学 (江藤 文夫・飯島 節編), 南江堂, 2000

(印刷中)

## 2. 学会発表

### a. 国際学会

- 1) Yamamura, T., B-N. Zhang, D.H. Chui, T. Tabira, T. Kawano, and T. Taniguchi: The role of NK and NKT cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Experimental Biology '99*. Washington DC, April 20, 1999
- 2) Illes, Zs., T. Tabira and T. Yamamura: Increased frequency of activated cytolytic CD56<sup>+</sup> T-cells in the peripheral blood of patients with multiple sclerosis. The ECTRIMS (European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis) and ACTRIMS 1999, Basel, September 18, 1999
- 3) Illes, Zs., T. Kondo, J. Newcombe, T. Tabira and T. Yamamura: Selective loss of invariant V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells in multiple sclerosis. The ECTRIMS (European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis) and ACTRIMS 1999, Basel, September 18, 1999
- 4) Illes, Zs., 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 ECTRIMS (European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis) and ACTRIMS 1999, Basel, September 18, 1999
- 5) Illes, Zs., T. Kondo, J. Newcombe, T. Tabira and T. Yamamura: Selective loss of invariant V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q T-cells in multiple sclerosis. *Neuropathology at the Turn of the Millennium*, Bonn, October 6-9, 1999 (die Deutsche Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie)

### b. 国内学会

- 1) Endre Pal、田平 武、山村 隆：実験的自己免疫性脳炎における交感神経系の関与：正常マウスとサイトカイン欠損マウスの比較。第 40 回日本神経学会総会，東京，1999 年 5 月 19 日

- 2) 川村 和之、山村 隆、田平 武：DR2 トランスジェニックマウス由来の PLP95-116 特異的 T cell line の性状. 第 40 回日本神経学会総会, 東京, 1999 年 5 月 19 日
- 3) 高橋 和也、田平 武、山村 隆：多発性硬化症 CD3 陽性細胞分画における NK 活性抑制性レセプター(KIR)発現の低下. 第 40 回日本神経学会総会, 東京, 1999 年 5 月 19 日
- 4) 川村 和之、山村 隆、福井 宣規、笹月 健彦、猪子 英俊、田平 武：HLA-DR2 トランスジェニックマウスにおけるヒト myelin basic protein と proteolipid protein に対する T 細胞応答の解析. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 1999 年 12 月 3 日
- 5) Fazekas, G., T. Tabira, and T. Yamamura: Immunostimulatory CpG oligonucleotides as an effective adjuvant for inducing PLP-specific T helper 1 responses and EAE mediated by the T cells. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 1999 年 12 月 3 日
- 6) 山村 隆、Endre Pal、張 本寧、竹田 和由、奥村 康、河野 鐵、谷口 克：実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)における NKT 細胞の役割 - 遺伝子改変動物による解析. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 1999 年 12 月 3 日
- 7) Pal, E., T. Tabira, and T. Yamamura: Effects of  $\alpha$ -galactosylceramide (GC) on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): Inhibition of EAE with GC requires B7.2 blockade. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 1999 年 12 月 3 日
- 8) 高橋 和也、山村 隆：多発性硬化症患者末梢血 KIR(killer cell inhibitory receptor) 発現の解析. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 1999 年 12 月 3 日

### c. 招待講演

- 1) 山村 隆：多発性硬化症の免疫病態の解析. シンポジウム免疫性神経疾患の発症のメカニズムをめぐって. 第 42 回日本神経化学会、1999

年 9 月 17 日、広島

- 2) 山村 隆：免疫異常としての多発性硬化症研究. 平成 11 年度創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業. 第 4 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー 1999 年 9 月 22 日、東京
- 3) 山村 隆：神経筋難病をめぐって. 多発性硬化症. 第 115 回日本医学会シンポジウム. 神経筋難病の update. 1999 年 12 月 2 日、東京
- 4) Yamamura, T., B-n. Zhang, E. Pal, and S. Miyake: Regulation of autoimmune encephalomyelitis: The role of NK and NKT cells. International Workshop on Induction and Regulation of Autoimmune Disease. 21-25, Feb 2000 at The Horizon at Mission Beach, Queensland, Australia, Supported by Japan Science and Technology Agency Organizing Committee: Takashi Yamamura, David A. Hafler, Vijay K. Kuchroo and Sachiko Miyake
- 5) Yamamura, T., Zs. Illes and T. Kondo: Analysis for T and NKT cell repertoire in CNS and PNS autoimmune diseases. International Workshop on Induction and Regulation of Autoimmune Disease. 21-25, Feb 2000 at The Horizon at Mission Beach, Queensland, Australia, Supported by Japan Science and Technology Agency Organizing Committee: Takashi Yamamura, David A. Hafler, Vijay K. Kuchroo and Sachiko Miyake

### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

# 多発性硬化症患者末梢血中 NK 細胞 Fas 陽性率の 経時的変化に関する検討

主任研究者 山村 隆  
分担研究者 橋本 修治\*  
共同研究者 畠中 めぐみ\*  
高橋 和也

## 目的

ヒトの中枢神経系自己免疫疾患である多発性硬化症 (MS) では、症状寛解期において健常人と比べ Fas 抗原を発現している Natural killer (NK) 細胞が有意に増加している (未発表)。

今回、経時的に MS 患者末梢血中の NK 細胞 Fas 陽性率を調べ、病相と Fas 陽性率に関連性があるかどうか、また MS 再発予測や治療効果判定などに有益であるかどうかを検討した。

## 対象と方法

対象 ; Poser らの診断基準で<sup>1)</sup>、臨床的确实な MS 5 名、検査参考确实な MS 2 名の計 7 名。いずれも症状の急性増悪をきたしたため、天理よろづ相談所病院神経内科に入院した患者で、ステロイドパルス療法 (Methylprednisolone 1g×3 日) 施行前に採血でき、その後も経時的に採血できた患者である。採血に関してはその目的を十分説明し、

国立精神・神経センター  
天理よろづ相談所病院神経内科\*

口頭にて同意を得た。患者群の男女比は、男 : 女 = 1 : 6 で、年齢幅は 22-67 歳、平均年齢 ± 標準偏差は 38.9 ± 15.3 歳であった。ステロイドパルス療法開始前、パルス療法期間終了後、パルス療法開始から 1 ヶ月後、3 ヶ月後の各時点で採血した。うち 1 例はステロイドパルス療法後はステロイド剤内服せず、3 ヶ月目に再発を来している。臨床的确实な 5 名では、Prednisolone 0-12.5mg が隔日で投与されており、少量のステロイド剤服用中に再発を来した症例である。一方、検査参考确实な 2 名は今回が初発であり、ステロイドパルス療法以前はステロイド剤を内服していなかった。パルス療法後は、症例によりまちまちであるが、Prednisolone 0-60mg/日が約 1-2 週間投与され、その後漸減、1 ヶ月目には平均 13.5mg/日 (0-30mg/日) の Prednisolone が投与されていた。検査の対照は 5 名の健常被験者とした。

方法 ; ヘパリン採血した末梢血を 100  $\mu$ l ずつ 5ml チューブに分注し、FITC 標識抗 CD95 (Fas) 抗体、PE 標識抗 CD56 抗体、ECD 標識抗 CD3 抗体、PC5 標識抗 CD45 抗体、および各コントロール抗体を用いて、20 分水温暗所で染色した。その後、0.8% 塩化アンモニウム-EDTA 液で溶血し、0.5% BSA リン

酸緩衝溶液で洗浄後、COULTER 社製フローサイトメーターを用いて解析した。採血から計測まで所要 2 時間以内で行った。NK 細胞 Fas 陽性率は、前方散乱光、側方散乱光および抗 CD45 抗体よりリンパ球分画にゲートをかけ、さらに抗 CD3 抗体、抗 CD56 抗体を用いて、CD3 陰性 CD56 陽性分画を NK 細胞として、NK 細胞中の Fas 陽性細胞の比率を NK 細胞 Fas 陽性率とした。

## 結果

NK 細胞 Fas 陽性率は、ステロイドパルス療法前、パルス療法後、1 ヶ月後の 3 群間比較で、有意な変動を認め (Friedman 検定,  $p=0.0094$ )、パルス後 1 ヶ月には増加していた (Fig. 1)。パルス後 3 ヶ月目も含めた 4 群間比較は、今回パルス後 3 ヶ月目まで追跡できた症例が少なく検定できなかった。しかしパルス後 1 ヶ月目に比べ NK 細胞 Fas 陽性率は低下する傾向を認めた。1 名のみ測定期間中に再発したが、そのときの NK 細胞 Fas 陽性率は寛解期に比べ低下していた (Fig. 2)。

7 例のパルス前 (急性増悪期) NK 細胞 Fas 陽性率は、健常対照に比べ有意差はなかった ( $24.9 \pm 15.8\%$  vs  $18.8 \pm 6.7\%$ , Mann-Whitney の U 検定で  $p=0.68$ ) が、パルス後 1 ヶ月目 (寛解期) の陽性率は、健常対照に比べ有意に高値を示していた ( $45.3 \pm 23.1\%$  vs  $18.8 \pm 6.7\%$ , Mann-Whitney の U 検定で  $p=0.0285$ )。

## 考察

Fas は apoptosis において重要な抗原であるため、実験中の細胞死の影響を省くため今回採血後 2 時間以内に解析を行った。当初予想したとおり、MS 患者では NK 細胞 Fas 陽性率が経時的に変動した。これは実験操作による変動ではないと考えられる。ステロイド剤を服用しながらではあれ、症状の改善が認められた 1 ヶ月目には、NK 細胞 Fas 陽性率は増加していた。これは健常対照と比較しても有意に高値であった。この結果は、寛解期の MS 患者は、健常人と比し、NK 細胞 Fas 陽性率が有意に増加しているという従来の所見 (未発表) を支持するものである。さらに、パルス療法前 (急性増悪期) の NK 細胞 Fas 陽性率は、健常対照と比較した場合有意差はないが、MS 患者群の寛解期 (1 ヶ月目) における陽性率よりは低値であった。このことは、MS の急性増悪期には、NK 細胞 Fas 陽性率が低下することを示唆している。また、MS の動物モデルである Experimental autoimmune encephalomyelitis で NK 細胞が発症抑制的に働くことが知られている<sup>2)</sup>。以上から、MS 患者では、Fas 陽性 NK 細胞が普段から増殖して炎症過程を抑制しており、この細胞が何らかの原因で減少すると、炎症が再燃するのかもしれないという仮説を考えることができる。

今回は急性増悪期から検査を開始した。今後継続して NK 細胞 Fas 陽性率を測定することにより、臨床症状再発の前から NK 細胞 Fas 陽性率の低下が出現するかどうか研究することは、MS の治療や再発予防の観点からも重要である。またステロイドパルス療法が有効

と考えられている他の自己免疫疾患とも比較して、NK 細胞 Fas 陽性率の変動が MS に特有な現象であるかどうか検討する必要がある。

### 結論

MS 患者では、症状にあわせて NK 細胞の Fas 陽性率の変動しており、再発時には低値で、治療効果とともに上昇傾向があることを明らかにした。今後、より長期に観察することによって、再発の予知や再発予防に貢献で

きる可能性がある。

### 文献

- 1)C.M.Poser et al.:New diagnostic criteria for multiple sclerosis:Guidelines for reseach protocols. Ann. Neurol. 13:227-231, 1983
- 2)Zhan B-n, et al. 1997. Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Natural Killer (NK) Cells. J. Exp. Med. 186:1677-1687

Fig1. NK 細胞 CD95 陽性率の推移

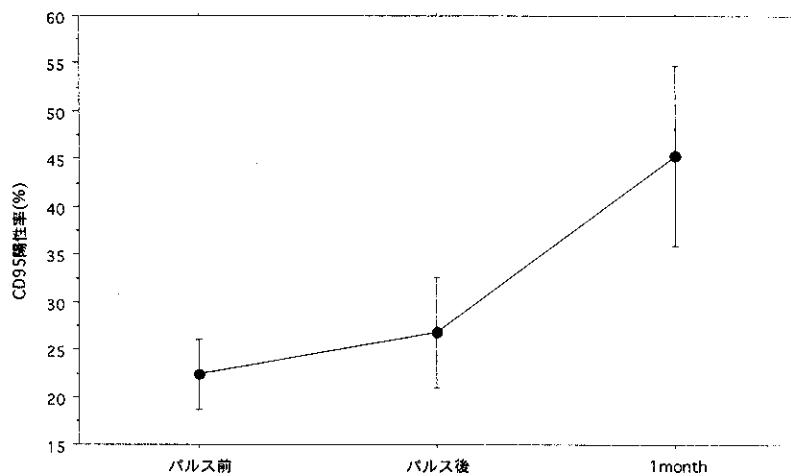
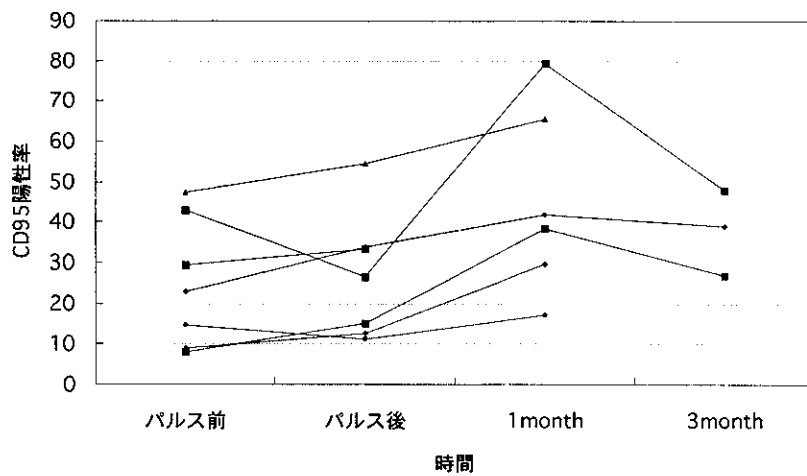
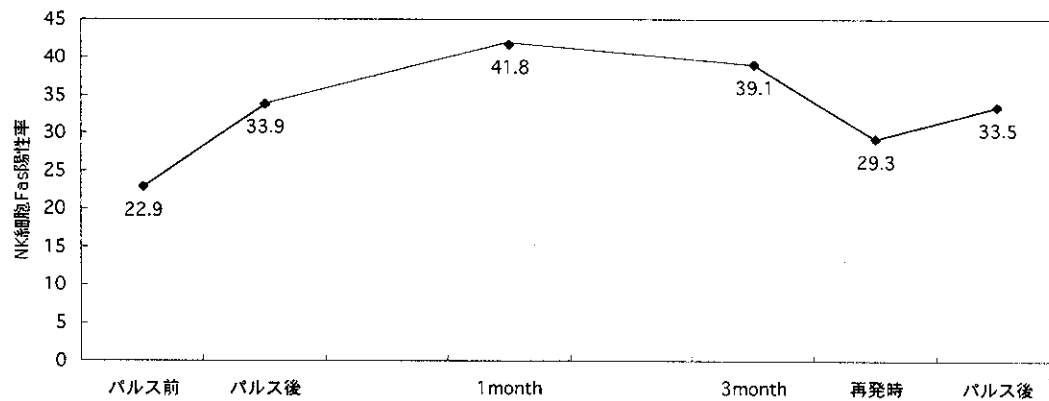


Fig2. 経過観察中再発した1例 (45歳女性)





# カニクイザルを用いた多発性硬化症および慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチーモデルの開発と発症個体での末梢リンパ球サブセットの変化

分担研究者 寺尾 恵治

## 目 的

多発性硬化症 (MS) および慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチー (CIPD) はいずれも自己免疫性疾患と考えられており、その病因および治療法の開発を目的として種々の動物モデルが開発されている。前者では脳乳剤や proteolipid protein (PLP) と完全なジュバントの混合物の免疫で誘発される実験的誘発自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis; EAE) が用いられており、後者では最近 GD1b と完全なジュバントの混合物を免疫して誘発される実験的誘発自己免疫性ポリニューロパチー (Experimental Autoimmune Neuropathy; EAN) の誘発に成功している。

実験動物を用いた発症モデル解析には、1) 発症初期段階での病態の解析が可能であること、2) 同一の処置にもかかわらず、発症個体と非発症個体とが出現する場合に、両者で反応性の差を解析することにより発症に関わる因子を特定できる、という利点がある。一方で、ヒトにきわめて近縁なサル類は種々の疾患モデル動物として有用であることが知られているが、特に自己免疫性の疾患ではヒトに類似した免疫機能を有するサル類は、発症に関わる免疫学的機構を解明し、免疫機能の

---

国立感染症研究所・筑波霊長類センター

修飾を目的とした新規治療法の評価に最も適した動物モデルといえる。本研究はカニクイザルを用いて EAE および EAN の2種類の脳症モデルを開発するとともに、サルモデルを用いて発症に関わる免疫学的機序を主として末梢血リンパ球サブセットレベルの変化から解析することを目的とした。

## 材料と方法

実験には総計 4~6 歳齢のメスカニクイザル 11 頭を用いた。これらのサルはいずれも国立感染症研究所、筑波医学実験用霊長類センターで繁殖、育成された生理的および微生物学的に均質な動物である。本実験のプロトコルは筑波霊長類センター「サル類実験指針」および霊長類学会「サルを用いる実験指針」に従って作成され、国立感染症研究所、動物倫理委員会で承認された。

EAE 誘発実験では、カニクイザル新鮮脳から調整した脳乳剤 (含 10mg 脳組織) と完全なジュバントおよび 7.5ug の百日咳トキシンを混合し、1 頭のカニクイザル背部皮内に十数カ所に分けて接種した。接種後 2 日目に 7.5ug の百日咳トキシンを同様な方法で追加免疫した。なお、脳乳剤を除いた混合物を同様な方法で接種したものを免疫対照とした。

EAN 実験では、ウシ脳から精製した GD1b

(Sigma) 0.5mg と KLH1mg、結核菌死菌 5mg を完全アジュバントと混合し、1 頭のカニクイザル背部皮下に十数カ所に分けて接種した。接種後 3 週間目に同様な方法で追加免疫を行った。なお、免疫対照として GD1b を除いた混合物を同様な方法で接種した。

接種前 7 日目、接種直前、接種後 5~7 日おきに 2ml の静脈血を麻酔下で採血し、末梢リンパ球を分離した。分離したリンパ球を FITC、PE および Cy5 のそれぞれの蛍光色素で標識した抗ヒトモノクローナル抗体で染色し、CD 抗原陽性リンパ球数をフローサイトメトリー (FACS) で測定した。調査対象とした主要リンパ球サブセットは、CD20+/B 細胞、CD3+/T 細胞、CD4+/T 細胞、CD8+/T 細胞、CD16+/NK 細胞および CD14+/単球である。これらのサブセットを CD2、CD28、CD29、CD56、CD58、CD95 に対する抗体で二重、三重染色し、免疫後の末梢垂集団のレベルの変化を追跡した。

接種後毎日 5~10 分間ケージ内行動を観察し、神経症状の有無を判定した。観察結果は視力低下、失調症状、四肢麻痺、横臥、昏睡などを指標として 5 段階にスコアー化して判定した。

## 結 果

表 I に実験条件と転帰を要約して示す。EAE 実験では脳乳剤を免役した 6 頭中 3 頭 (50%) が神経症状を示して死亡した。このうち EAE #3 と EAE #4 でのスコアーの変化を図 1 に示すが、図に示すように EAE を発症した #4 では接種後 2 週目頃から軽度な症状が観察されはじめ、3 週以後急激に病体が進行し 25 日目に死亡した。一方、#3 は接種

後 3~4 週目にかけて一過性の症状が認められたが、接種後 5 週以後にはこれらの症状は消失した。

図 2 はこの 2 頭のサルと免疫対照とした 1 頭のサル、計 3 頭での末梢 B 細胞、T 細胞 NK 細胞の変化を示したものであるが、一過性の症状を示したが発症にいたらなかった #3 (Non EAE) では免疫後 5 週以降で著しい NK 細胞の増加が確認された。このケースでは末梢リンパ球の半数以上が CD16+/NK 細胞で占められている。この CD16+/NK 細胞の大半は CD58 陽性細胞であった。

図 3 は EAE を発症した #17、#19 と発症しなかった #13、#18 での末梢中の 2 種類の NK サブセット (CD8+/NK および CD8-/NK) の変化を示したものである。この場合にも EAE 非発症個体ではいずれも接種直後に CD8-/NK の上昇が、接種後 5 週以降に CD8+/NK 細胞の増加が認められた。

一方、EAN 実験群では表 1 に示すように GD1b を接種した 2 頭がいずれも神経症状を示し、1 頭は死亡、1 頭は安楽殺した。図 1 に示すように発症した 2 頭では EAE に比べて著しい神経症状は見られず、EAN#8 は追加免疫後 2 週目に無動などの軽度の症状が見られた翌日に死亡した。EAN#5 も相前後して眼瞼下垂等の症状が見られたので安楽殺した。

これら 2 頭と GD1b 非投与免疫対照個体でのリンパ球サブセットレベルの変化は、図 4 に示す CD3+/T 細胞、初期活性化マーカー CD69 陽性 CD4+/T 細胞、CD16+/NK 細胞および CD2+/CD8+/NK 細胞のいずれのレベルにおいても、またその他の主要サブセットレベルにおいても 3 者の間で有意な差は認められなかった。

## 考 察

カニクイザルを用いて MS (EAE) および CIDP (EAN) モデルを確立した。発症率は EAE で 50% (3/6)、EAN で 100% (2/2) であったが、発症までの時間および症状は個体により差がみられた。マウスと異なりサル類は遺伝的に不均一であることがその一因と考えられるが、一方で、同一の実験処置を行ったにもかかわらず、発症個体と非発症個体とが出現することは、両者を比較することにより発症に関わる因子を特定することが可能となる。自己免疫性疾患においては特定の免疫細胞または特定の免疫反応が発症に関与している可能性が考えられるが、これまでの動物モデルを用いた解析から、1) 特定の T 細胞レセプターを発現している脳炎惹起性 T 細胞クローンの出現、2) 自己反応性 T 細胞に抑制的に働く NK 細胞の出現、3) 特定の T 細胞レセプター陽性の NK T 細胞の意義、などが明らかにされている。本研究では、カニクイザルで EAE または EAN 発症過程における主要リンパ球サブセットの継時的変化を調査することにより、発症に関与する可能性のあるサブセットを特定しようとした。EAE および EAN のいずれにおいても、免疫処理により一過性に活性化マーカー（例えば CD69 または CD95）陽性の T 細胞レベルが上昇するが、これは免疫対照群でも認められることから完全なジュバントや結核菌、百日咳トキシンによる非特異的活性化の結果と解すべきであろう。

サル類の NK 細胞に関しては、1) CD16 陽性細胞にのみ NK 活性が認められる、2)

CD16 陽性細胞は CD8 の発現により CD8+/CD16 と CD8-/CD16 に大別される、3) ヒトと異なり CD2、CD27、CD56、CD58 はそれぞれ一部の NK 細胞にのみ発現している、ことを明らかにしている。EAE の発症、非発症個体とで CD16 陽性 NK 細胞レベルの変化に有意な差が認められた。すなわち、EAE 非発症個体でのみ NK 細胞レベルが著しく上昇した。この結果は、サルの EAE モデルにおいても、マウスと同様に NK 細胞が EAE 発症に抑制的に働くことが強く示唆される。

これまでのところ、サル類での NK T 細胞の表現型については明らかにされていない。今回は、CD3+/CD16+細胞を NK T 細胞のマーカーとして検討したが、そのレベルは 1% 以下であり、EAE、EAN のいずれの実験群においても CD3+/CD16+細胞のレベルには有意な変化はみられなかった。最近、V $\alpha$ 24 陽性の TCR 多型性のない NK T 細胞がマウスの免疫応答の制御や自己免疫疾患の制御に重要な役割を果たしていることが報告されており、実験的自己免疫性脳炎、脳症の発症における NK T 細胞の役割を解析するためにも、サル類の NK T 細胞の表現型と機能を明らかにしておく必要がある。

## 結 論

カニクイザルを用いた多発性硬化症および慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチーモデルを確立した。発症率はそれぞれ 50%、100% であったが、発症までの時間及び症状には個体差が見られた。多発性硬化症モデルでは非発症個体にのみ CD16 陽性 NK 細胞の有意な上昇が認められることから、カニクイザル

においてもマウスと同様 NK 細胞が発症に抑制的に機能している可能性が示唆された。今回確立したサル脳炎、脳症モデルはヒトの MS および CIDP の発症に関わる免疫学的機序の解明および治療法の開発に有用なモデルと考えられる。

表1：カニクイザルを用いたEAEおよびEAN実験要約

| 実験番号    | 処置     | 転帰               |
|---------|--------|------------------|
| EAE #1  | 免疫対照   | 接種後76日目に安楽殺      |
| EAE #2  | 免疫対照   | 接種後76日目に安楽殺      |
| EAE #3  | 脳乳剤免疫  | 接種後76日目に安楽殺      |
| EAE #4  | 脳乳剤免疫  | 接種後25日目に四肢麻痺、死亡  |
| EAE #13 | 脳乳剤免疫  | 接種後68日目に安楽殺      |
| EAE #17 | 脳乳剤免疫  | 接種後22日目に神経症状、死亡  |
| EAE #18 | 脳乳剤免疫  | 接種後68日目に安楽殺      |
| EAE #19 | 脳乳剤免疫  | 接種後8日目に死亡        |
| EAN #5  | GD1b免疫 | 接種後43日目に神経症状、安楽殺 |
| EAN #8  | GD1b免疫 | 接種後42日目に神経症状、死亡  |
| EAN #6  | 免疫対照   | 接種後50日目に安楽殺      |