

多発性硬化症の発症機構解明と 治療法の開発

(H12-脳-013)

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
平成 12 年度 研究報告書

平成 13 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)

目 次

- ・ 総括研究報告.....1~6
多発性硬化症の発症機構解明と治療法の開発に関する研究
山村 隆

- ・ 分担研究報告..... 7~10
 - 1. 多発性硬化症の発症機構解明と治療法の開発に関する研究
三宅 幸子

 - 2. 多発性硬化症の発症機構解明と治療法の開発に関する研究
近藤 誉之

- ・ 研究成果の刊行に関する一覧表.....11~12

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
総括研究報告書
多発性硬化症の発症機構解明と治療法の開発に関する研究

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

研究要旨 本研究では多発性硬化症(MS)患者の予後を向上させるために、1) MS の疾患活動性の評価や予後推測に有用なマーカーの同定、2) NK細胞、NKT細胞の異常から見た MS 免疫病態の把握、3) MS の遺伝素因の解析、4) NKT細胞を標的とする治療薬開発の研究を行った。本年度は、MS の末梢血細胞の細胞表面抗原、サイトカイン産生能を解析した結果、MS 寛解期では NK細胞が CD95 (Fas)分子を弱く発現し、IL-5 を強く産生していることを見いだした。このような性質は、最近 Trinchieri らによって報告されている NK2 細胞のそれに近似している。さらに試験管内で誘導した NK2 細胞は Th1 細胞の誘導を阻害することも明らかにした。MS の脳炎惹起性 T細胞は Th1 細胞であり、NK2 に偏倚した NK細胞は MS の寛解維持に積極的に関与している可能性がある。また CD1d 拘束性 NKT細胞の研究を継続し、MS 寛解期に樹立された NKTラインは Th2 に偏倚していることを発見した。また NKT細胞の糖脂質リガンドの中から MS の動物モデルを抑制する新規物質を同定した。関連して NKT細胞の細胞内シグナル解析も進めた。

分担研究者

三宅 幸子	国立精神・神経センター 神経研究所免疫研究部 室長
近藤 誉之	国立精神・神経センター 神経研究所免疫研究部 室長

A. 研究目的

本研究では多発性硬化症(MS)患者の予後を向上させるために、先端技術を駆使して MS の病態機構解明と治療法開発に関する基盤研究を行う。病態機構に関連して、1) MS の疾患活動性の評価や予後推測に有用なマーカーの同定、2) NK細胞、NKT細胞の異常から見た MS 免疫病態の把握、3) MS の遺伝素因の解析を進め、治療法開発に関連して、4) NKT細胞を標的とする治療薬開発の研究を行った。

B. 研究方法

1) 患者 NK細胞の発現する表面抗原と産生サイトカインの解析：国立精神・神経センター武蔵病院外来通院中の MS 患者より採血後二時間以内にリンパ球を分離し、蛍光標識した抗 CD3 抗体、抗 CD56 抗体、抗 CD95 抗体などによる多重染色を行い、NK細胞の発現する CD95 分子量をフローサイトメトリーにより評価した。定性的 RT-PCR 法および定量的 PCR (Light Cycler システム) により IL-4、IL-5、IFN- γ 、IL-12R β 2 鎖などの mRNA 発現量を検討した。さらに蛋白レベルでサイトカイン産生の変調が見られるかどうか調べるために、磁気分離装置 (MACS) によって分離した NK細胞を、PMA および ionomycin で刺激し、その培養上清中のサイトカインを ELISA で測定した。2) NK2 細胞の機能に関する解析：in vitro で誘導した NK1 細胞または NK2 細胞と同一人から分離した T細胞を共培養して PMA と ionomycin で刺激し、8 時間後に細胞を固定し、細胞内のサイトカイン

ン (IL-4 と IFN- γ) を蛍光標識した特異抗体で染色し、フローサイトメトリーにより解析した。NK1 細胞の誘導には recombinant IL-12 と抗 IL-4 抗体を添加した培養液を、NK2 細胞の誘導には recombinant IL-4 と抗 IL-12 抗体を添加した培養液を用いた。3) NKT 細胞ライン樹立法の確立と機能評価：NKT 細胞のリガンドであるアルファ・ガラクトシルセラミド (α -GC) によって NKT 細胞を刺激し IL-2 を含む培地で 1-2 週間増殖させた。NKT 細胞ラインを PMA/ionomycin で刺激後、細胞内サイトカイン発現をフローサイトメトリーで評価した。4) α -GC アナログによる EAE 治療実験：EAE は B6 マウスを MOG35-55 ペプチドで感作することにより誘導し、アナログは経口、または腹腔内投与した。アナログ投与後血清中のサイトカインを経時的に測定し、T 細胞増殖反応、抗 MOG 抗体価測定は通常の方法によった。

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 の NK 細胞機能的偏倚に関する研究：

MS 寛解期の末梢血 NK 細胞では、健常者、MS の再発、甲状腺炎、他の神経疾患に比較して、CD95 分子の発現が有意に亢進していることが判明した。さらに、再発による入院直後、ステロイド・パルス療法直後、治療開始一ヶ月後に同一患者における NK 細胞の CD95 発現を検討したところ、入院直後に低下した CD95 発現が、一ヶ月後には寛解期 MS のそれと同じレベルまで上昇することが判明した。RT-PCR 法により IL-4、IL-5、IFN- γ 、IL-12R β 2 鎖などの mRNA 発現を検討したが、定性的な方法では MS と健常人間で明らかな差を認めなかった。そこで、Light Cycler システムを導入して定量的 PCR を行った。その結果、MS 寛解期では

再発時に比べて IL-5 mRNA が約 50 倍に上昇していること、IFN- γ や IL-12R β 2 鎖は低下傾向にあること、すなわち NK2 に偏倚していることがわかった。蛋白レベルで IL-5 産生の亢進が見られるかどうか調べるために、磁気分離装置 (MACS) によって分離した NK 細胞を、PMA および ionomycin で刺激し、その培養上清中のサイトカインを ELISA で測定した。その結果、寛解期 MS において IL-5 産生の著明な亢進が認められ、定量的 PCR の結果をサポートした。以上の結果は、MS の寛解期において NK 細胞が NK2 に偏倚していることを示唆した。

NK2 偏倚の機能的な意義を明らかにするために、in vitro で誘導した NK1 細胞または NK2 細胞と同一人から分離した T 細胞を共培養して、PMA と ionomycin で刺激した。PMA/ionomycin 刺激 8 時間後に、細胞を固定し細胞内サイトカイン (IL-4 と IFN- γ) を蛍光標識した特異抗体で染色したところ、NK2 と共培養した T 細胞では細胞内 IFN- γ 陽性細胞数が対照に比べ減少することが判明した。この結果から、NK2 細胞は Th1 細胞の誘導を抑制すること、MS 寛解期における NK 細胞の NK2 偏倚は寛解維持に積極的な役割を果たしているものと考察した。

MS の NKT 細胞変調に関する研究：

大多数の NKT 細胞が V β 11 と V α 24 遺伝子を使用することから、多発性硬化症および対照の末梢血リンパ球中、抗 V β 11 抗体と抗 V α 24 抗体で double-positive に染まる細胞の割合を算定した。これまで SSCP 法で示してきたように (J. Immunol. 164:4375-4381, 2000)、寛解期の MS では対照および MS 再発時に比べて NKT

細胞の著明な減少が見られた。NKT 細胞のリガンドである α -GC によって NKT 細胞を刺激し培養したところ、健常者および MS 再発時の血液リンパ球から NKT 細胞が急速に増殖することが確認された。しかし、MS 寛解期のサンプルでは NKT 細胞の増殖が見られる群（レスポンダー）とまったく増殖の見られないグループ（ノン・レスポンダー）に分かれた。NKT 細胞ラインを PMA/ionomycin で刺激後、細胞内サイトカイン発現をフローサイトメトリーで評価したところ、健常者から樹立したラインに比較して、MS 寛解期患者より樹立したラインでは、IL-4 陽性細胞数が圧倒的に多いことを見いだした。この結果は、患者寛解期において NKT 細胞が Th2 に偏倚していることを示唆した。また寛解期患者由来の NKT ラインでは CD4 陽性細胞の頻度が増加していた。以上の結果は、寛解期には NK 細胞は NK2 に偏倚するが、NKT 細胞は Th2 に偏倚していることを意味する。NK2 も Th2 もともに Th1 脳炎惹起性 T 細胞を抑制する能力を持つので、両者は協力して脳炎惹起性 Th1 細胞の活性化を抑制し MS の寛解維持に関与しているものと考えられる。

MS の発症因子・遺伝マーカーの研究：

MS の遺伝素因マーカーの候補として CD1d 多型は重要でないことが判明した。近藤班員は MS と健常者でリンパ球 CD1d 発現レベルに差のないことを示した。

NKT 細胞を標的とした糖脂質治療薬の研究：

申請者らはこれまで NKT 細胞のリガンドである α -GC の投与法を工夫して、EAE を抑

制することにはじめて成功した (J. Immunol. 166:662-668, 2001)。本年度は、 α -GC のアナログの中から NKT 細胞に IL-4 の産生のみを選択的に誘導する物質を同定することに成功した (特許申請準備中)。本物質を経口的に投与することにより、MS の動物モデルである EAE の臨床症状は著明に抑制され、抗原特異的免疫応答が Th2 偏倚していることもわかった。またこの新規物質は、ヒトの NKT ラインに対して Th2 偏倚を誘導することがわかり、MS 治療薬としての可能性が示唆された (論文投稿準備中)。

三宅班員はこの新しい糖脂質による免疫調節機構に関して、サイトカイン産生や免疫グロブリン isoform の解析を行った。

D. 考察

本年度の研究から NK 細胞、NKT 細胞が MS の寛解維持に積極的な役割を果たすことが明らかになった。寛解期に特徴的な NK 細胞の遺伝子発現パターンとして、CD95、IL-5 の発現亢進が明らかになったが、DNA マイクロアレイで数千種類の遺伝子を調べれば、はるかに多くの遺伝子において、その発現亢進または発現低下が明らかになると思われる。MS の病態把握は経験のある神経内科医にとってもしばしば困難であるが、研究の結果病態評価が客観的に容易に行えるようになることが期待される。

NKT 細胞は条件によって異なる免疫調節効果を発揮することが我々などの研究によって示されている。NKT 細胞による免疫調節が正に働くか負に働くかは、その産生する IFN-g

と IL-4 のバランスによって規定されることが徐々に明らかになってきた。今回 NKT による IL-4 の産生を選択的に誘導するリガンドを発見したが、MS の動物モデル EAE を抑制することがわかった。まだ予報的な段階ではあるが、今後 NKT 細胞を標的にした治療法の開発が重要であることを示唆している。

E. 結論

MS 寛解期において NK 細胞は NK2 に偏倚し、NKT 細胞は Th2 に偏倚していることが明確になった。再発に伴って NK の NK2 偏倚と NKT の Th2 偏倚は解除されるので、NK 細胞と NKT 細胞が MS 寛解の維持に積極的に関与していることが推測される。NK 細胞、NKT 細胞の変化は MS の病態を反映し、これらの細胞の発現する分子を解析することにより、MS の医療に有用な病態マーカーがさらに増えることが推測される。NK 細胞や NKT 細胞を標的とする治療法開発は魅力的な研究課題であるが、NKT 細胞の糖脂質リガンドの中に、Th1 介在性自己免疫病に対して治療効果を発揮する可能性のある物質が存在することが明らかになった。以上、NK 細胞、NKT 細胞の自己免疫病における調節機構の解明、および NK 細胞、NKT 細胞を標的にした治療法開発へ向けた大きな進展が見られた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

a. 雑誌

1) Illes, Z., T. Kondo, J. Newcombe, N. Oka, T.

Tabira, and T. Yamamura: Differential expression of natural killer T cell V α 24J α Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. **J. Immunol.** 164:4375-4381, 2000

2) Kawamura, K., T. Yamamura, K. Yokoyama, D-H. Chui, Y. Fukui, T. Sasazuki, H. Inoko, C.S. David, and T. Tabira: HLA-DR2 restricted responses to proteolipid protein 95-116 peptide cause autoimmune encephalitis in transgenic mice. **J. Clin. Invest.** 105:977-984, 2000

3) Nam, K-H., Zs. Illes, K. Terao, Y. Yoshikawa, T. Yamamura: Characterization of expanded T cell clones in healthy macaques: ontogeny, distribution and stability. **Dev. Comp. Immunol.** 24: 703-715, 2000

4) Pal, E., T. Tabira, T. Kawano, M. Taniguchi, S. Miyake, T. Yamamura: Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of Va14 natural killer (NK) T cells. **J. Immunol** 166: 662-668, 2001

5) Takahashi, K., S. Miyake, T. Kondo, K. Terao, M. Hatakenaka, S. Hashimoto and T. Yamamura: Natural killer type 2 (NK2) bias in remission of multiple sclerosis. **J. Clin. Invest.** 107:R23-R29, 2001

b. 単行本

1) 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, pp183-190, 2000

2) 近藤 誉之, 山村 隆: 多発性硬化症の病態と治療. Annual Review 神経 2001 (柳澤信夫、篠原幸人、岩田 誠、清水輝夫、寺本明編), 中外医学社 (東京) pp230-237, 2001

c. 総説

1) 山村 隆, 近藤 誉之: T cell receptor と神経免疫疾患. 特集. ゲノム時代の脳神経系医学. Molecular Medicine 臨時増刊号 vol 37: 105-110, 2000

- 2) 山村 隆: 多発性硬化症. 第 115 回日本医学学会シンポジウム記録集. pp59-64, 2000
- 3) 近藤 誉之、山村 隆: 多発性硬化症の免疫病態. 内科 85:617-621, 2000
- 4) 山村 隆: NKT 細胞と自己免疫疾患モデル. 最新医学 55:858-863, 2000
- 5) 山村 隆: 多発性硬化症の発症機序. Current Insights in Neurological Science 8: 10-11, 2000
- 6) 山村 隆, 三宅幸子, 高橋和也: NK と NKT による自己免疫性脳脊髄炎の制御. 免疫・Immunology Frontier 10:304-307, 2000
- 7) 山村 隆: 多発性硬化症の病態と治療. Bio Clinica 15:937-941, 2000
- 8) 山村 隆: 特集 多発性硬化症治療の最新情報. その病態と治療. 難病と在宅ケア 6: 7-10, 2001

2. 学会発表

a. 国際学会

- 1) Yamamura, T. and E. Pal: Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by ligand activation of natural killer (NK) T cells. Immunology 2000 (The American Association of Immunologists and the Clinical Immunology Society Joint Annual Meeting), Seattle, May 16, 2000
- 2) Miyamoto, K., S. Miyake, Melitta Schachner and T. Yamamura: Higher susceptibility of heterozygous P0 knockout mice to P0-induced experimental autoimmune neuritis (EAN): Lower P0 expression in the thymus may be a cause. the 13th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases. Kanagawa, November 10, 2000

b. 国内学会

- 1) 高橋 和也、山村 隆: 多発性硬化症(MS)

患者寛解期末梢血 Natural Killer (NK)細胞における IL-5 産生能亢進. 第 41 回日本神経学会総会, 松本, 2000 年 5 月 25 日

2) Endre Pal, 田平 武, 三宅 幸子、山村 隆: 糖脂質による NKT 細胞活性化を介した実験的自己免疫性脳炎 (EAE) の抑制. 第 41 回日本神経学会総会, 松本, 2000 年 5 月 26 日

3) 川村 和之、崔 得華、田平 武、山村 隆: 多発性硬化症のヒト化動物モデルとしての HLA-DR2 I-A0/0 マウス. 第 41 回日本神経学会総会, 松本, 2000 年 5 月 26 日

4) 宮本 勝一、三宅 幸子、那須 薫、Melitta Schachner、山村 隆: P0+/-マウスにおける胸腺内 P0 発現低下と実験的神経炎 (EAN) 感受性の亢進. 第 30 回日本免疫学会総会. 仙台、2000 年 11 月 16 日

5) 那須 薫、三宅 幸子、高橋 和也、山村 隆: IL-2 活性化 NK 細胞による EAE の抑制. 第 30 回日本免疫学会総会. 仙台、2000 年 11 月 16 日

6) 高橋 和也、近藤 誉之、三宅 幸子、山村 隆: 多発性硬化症(MS)寛解期に末梢血 NK 細胞は NK2 に偏倚し TH1 T 細胞を抑制する. 第 30 回日本免疫学会総会. 仙台、2000 年 11 月 16 日

7) Illes Zsolt, Takeshi Tabira, Takashi Yamamura: Increased frequency and expansion of activated cytolytic CD56+ T-cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients. 第 30 回日本免疫学会総会. 仙台、2000 年 11 月 16 日

c. 招待講演

1) 山村 隆: 臓器特異的自己免疫疾患とその制御. 第 50 回日本アレルギー学会総会シンポジウム 10. 自己免疫疾患の病態と治療をめぐる最近の進歩. 2000 年 11 月 30 日、横浜

2) 三宅 幸子、山村 隆: シンポジウム 1. 自己免疫病と免疫調節の分子機構. 細胞内シグ

ナル伝達とその異常を中心に- Cbl ファミリー
による免疫調節機構の解析. 第 13 回日本神経
免疫学会. 東京, 2001 年 2 月 1 日

Ⅱ. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

「新規糖脂質リガンドによる自己免疫治
療」申請手続き中

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）

（総括・分担）研究報告書

「多発性硬化症の発症機構解明と治療法の開発」に関する研究

分担研究者 三宅 幸子 国立精神神経センター神経研究所免疫研究部室長

研究要旨

NKT細胞を刺激して、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を抑制できる α ガラクトシルセラミド誘導体の合成に成功した。この誘導体は、NKT細胞を刺激して IL-4 を優位に産生させ、Th2 優位な免疫応答を引き起こすことにより EAE 疾患抑制効果があることが明らかとなった。

また、EAE の症状出現時に IL-2 活性化 NK 細胞を移入することにより EAE が軽快することから、NK 細胞は EAE の effector phase に重要な役割をもつことが示唆された。

A. 研究目的

NKT 細胞、NK 細胞による自己免疫疾患調節機構を解明し、これら調節性細胞を利用した新規治療法の確立を目的とする。

B. 研究方法

CS7BL6J マウスに MOG35-55 ペプチドを免疫し、多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導した。NKT ノックアウトマウスにも同様に EAE を誘導し、臨床症状の違いを検討した。NKT 細胞を刺激する α ガラクトシルセラミドの誘導体を合成し、EAE の治療効果のあるものをスクリーニングした。また合成誘導体投与個体の病理学的検索、血清中の抗 MOG 抗体のアイソタイプの測定を行った。これらの合成誘導体をマウスに投与し、ELISA にて血清中のサイトカインを測定した。また、これらの合成誘導体による *in vitro* における脾細胞増殖反応、サイトカイン産生能を検討した。NK 細胞の EAE に対する影響を検討するため、CS7BL6 もしくは、NKT ノックアウトマウスより脾細胞を調整し、IL-2 (1000U/ml) にて 48 時間刺激し、接着性の細胞のみを回収、さらに IL-2 存在下で 72 時間培養した NK 細胞 (純度 90% 以上) (1×10^6) を抗原感作時、もしくは症状出現期

から週 1 回の頻度で経静脈的に投与し臨床症状を観察した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、必要不可欠の実験を厳選した。動物の苦痛を最小限にするため、処置には熟練者があつた。

C. 研究結果

NKT ノックアウトマウスでは、EAE の発症が早まることから、何らかの疾患誘導作用があることが示唆された。また、これまで抗 B72 抗体存在下で α ガラクトシルセラミドを加えた抗原提示細胞を移入することによって、IL-4 優位のサイトカイン産生をおこし、疾患を抑制できることを示してきた。今回はさらに臨床応用を考え、 α ガラクトシルセラミドの誘導体を合成し、EAE を抑制する誘導体を得た。この誘導体は、経腹腔投与、経口投与のいずれでも効果が見られた。病理学的検索の結果、誘導体投与群では病変への浸潤細胞の減少を認めた。血清中の抗 MOG 抗体のアイソタイプを測定し、IgG1/IgG2a 比の上昇が認められ、免疫応答が Th2 に偏倚していることがわかった。

未処置マウスにこの誘導体を投与後、経時的に血清中のサイトカインを測定し、IL-4 / IFN 比がコントロー

ル群、ガラクトシルセラミド投与群に比較して上昇していることを見出した。In vitro においては、ガラクトシルセラミドに比較すると軽度な増殖反応を認めた。サイトカイン産生では IL-4 / IFN 比は上昇していた。EAE の抑制効果が IL-4 によるものかどうかを検討するために、抗 IL-4 抗体を α ガラクトシルセラミド誘導体と同時投与すると EAE の抑制効果が消失した。IL-2 で活性化した NK 細胞 (NK-LAK) を症状出現期移入すると、EAE の症状が軽快した。この効果は、NKT ノックアウトマウスから分離した脾細胞から誘導した NK—LAK 細胞でより強くみられた。

D. 考察

NKT 細胞に IL-4 を優位に産生させ、Th2 優位の反応をおこせる α ガラクトセラミド誘導体を合成できることが明かとなった。また、この作用を通じて、ガラクトセラミド誘導体の経口投与により、EAE を抑制できることがわかった。このように NKT 細胞は疾患予防にはたらくことから今後 NKT 細胞を標的とした再発の予防に有効な治療法の開発が期待できる。

一方 NK 細胞は、むしろ症状出現後に強い疾患抑制効果があり、effector phase において EAE からの回復期に重要な役割があることが示唆された。

E. 結論

NKT 細胞・NK 細胞を有効な方法で刺激することにより、EAE を抑制できることがわかった。今後、これらの免疫調節細胞を介した多発性硬化症の治療法の開発が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Endre Pal et al. Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of V α 14 NKT cells. J. Immunol. : 166, p662-668, 2001
- 2) Kazuya Takahashi et al. Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis. J. Clin. Inv. : 107, R23-R29, 2001
- 3) 山村隆他. NK と NKT による自己免疫性脳脊髄炎の制御. 免疫 Immunology Frontier : 10.304—307, 2000

2. 学会発表

- 1) 三宅幸子 : Cbl ファミリーによる免疫調節機構の解析第 13 回日本神経免疫学会シンポジウム
- 2) 宮本勝一他. P0+/-マウスにおける胸腺内 P0 発現低下と実験的神経炎 (EAN) 感受性の亢進 第 30 回日本免疫学会総会
- 3) 那須薫他. IL-2 活性化 NK 細胞による EAE の抑制. 第 30 回日本免疫学会総会
- 4) 高橋和也他. 多発性硬化症 (MS) 寛解期に末梢血 NK 細胞は NK2 に偏倚し TH1T 細胞を抑制する. 第 30 回日本免疫学会総会
- 5) 宮本勝一他. P0+/-マウスにおける胸腺内 P0 発現低下と実験的神経炎 (EAN) 感受性の亢進 第 13 回日本神経免疫学会総会
- 6) 那須薫他. IL-2 活性化 NK 細胞による EAE の抑制. 第 13 回日本神経免疫学会総会

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）（総括・分担）研究報告書

「多発性硬化症の発症機構解明と治療法の開発」に関する研究

分担研究者 近藤 誉之 国立精神神経センター神経研究所免疫研究部室長

研究要旨

分担研究者は総括研究者とともに多発性硬化症末梢血において NKT 細胞の頻度が減少していることを報告してきた。このプロジェクトにおいては NKT 細胞の発現が遺伝的に決定されているか、また NKT 細胞のリガンドである CD1d の発現が量的あるいは質的に異なっていることに一義的原因があるか等を解明することを目標として検索を進めている。現在までの解析では NKT 細胞の頻度は遺伝的にある程度規定されていることが示唆されている。一方、CD1d の発現に関しては多発性硬化症患者と健常人で相違を認めていない。

A. 研究目的

多発性硬化症における NKT 細胞頻度の減少がそのリガンドである CD1d の発現と相関があるかを検討する。

B. 研究方法

米国国立衛生研究所 (NIH) の Roland Martin 博士より供与された健常人と多発性患者が組みとなっている一卵生双生児 4 組の NKT 細胞 mRNA の発現を Light Cycler 定量 PCR 法や RT-PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) 法で解析した。

日本人多発性硬化症患者 18 例、健常人 7 例末梢血より単核球を分離し、単球分画における CD1d 分子の発現を flowcytometry にて解析し、Mean Fluorescence Intensity (MFI) を調べた。また、NKT 細胞を Va24(+)Vb11(+)細胞として flowcytometry で同定し、NK 細胞の頻度を CD1d の発現と相関があるかを検討した。

C. 研究結果

Light Cycler 定量 PCR 法にて日本人コントロール 2 名、アメリカ人コントロール 3 例中 2 例が増幅が確認され定量可能であったが、一卵生双生児においては 4 組 8 例すべてが定量レベルに達しなかった。一方、アクチン遺伝子は全症例で同様に増幅されたが、6 例では増幅そのものが確認できなかった。定量レベルに達しなかったが増幅が確認された 2 例は SSCP 法で NKT 細胞

に相当するバンドを認めた。白人コントロール例についての SSCP 法での検討は未試行であるが、日本人においては全例バンドが確認された。

CD1d の MFI は日本人健常人では平均 40.7 (標準偏差 20.0)、日本人多発性硬化症では平均 32.3 (標準偏差 17.4) であった。統計的有意差はないが、平均値において多発性硬化症患者では CD1d の発現低下の傾向があった (注; CD1d を発現している単球の頻度には差を認めなかった)。

しかし、CD1d の MFI が 60 を超える 2 症例においても NKT 細胞は末梢血中で検出レベル以下であり、個々の症例において CD1d の発現と NKT 細胞の頻度との相関は認めなかった。

D. 考察

一卵生双生児の末梢血を用いた検討により、NKT 細胞の頻度が遺伝的に規定されており、疾患感受性に関与している可能性が強く示唆された。

CD1d は NKT 細胞の T 細胞受容体のリガンドである。従って NKT 細胞の胸線における選択に関与し、末梢においても生存シグナルを T 細胞受容体を介して NKT 細胞に伝えている可能性がある。その意味で多発性硬化症患者末梢血で CD1d の発現がやや低下されていたことは興味深い。NKT 細胞の実際の頻度とは相関を

しておらず、患者、健常人コントロールでの発現の幅が存在することなどから、現時点では末梢血 CD1d の発現と NKT 細胞の頻度の相関の証明はされていない。一層の検討を要する課題である。

E. 結論

末梢血 NKT 細胞頻度は多発性硬化症の疾患感受性に関与する。

G. 研究発表

1. 論文発表

Bielekova B et al., 2000. Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: Results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat Med* 6: 1167-1175

Kazuya Takahashi et al., 2001. Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis. *J. Clin Inv* 107: R23-R29

2. 学会発表

近藤 誉之ほか：特異抗原を要しない樹状細胞による自己免疫 T 細胞の部分的活性化と維持。第 30 回日本免疫学会総会（仙台）

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山村 隆	神経疾患各論 脱髄疾患	江藤文夫 飯島 節	神経内科学	南江堂	東京	2000	pp183-190
近藤 誉之 山村 隆	多発性硬化症 の病態と治療	柳澤信夫 篠原幸人 岩田 誠 清水輝夫 寺本 明	Annual Review 神経 2001	中外医学社	東京	2001	pp230-237

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Illes, Z., T. Kondo, J. Newcombe, N. Oka, T. Tabira, T. Yamamura	Differential expression of natural killer T cell V α 24J α Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.	J. Immunol.	164	4375-4381	2000
Kawamura, K., T. Yamamura, K. Yokoyama, D-H. Chui, Y. Fukui, T. Sasazuki, H. Inoko, C.S. David, T. Tabira	HLA-DR2 restricted responses to proteolipid protein 95-116 peptide cause autoimmune encephalitis in transgenic mice.	J. Clin. Invest.	105	977-984	2000
Nam, K-H., Zs. Illes, K. Terao, Y. Yoshikawa, T. Yamamura	Characterization of expanded T cell clones in healthy macaques: ontogeny, distribution and stability.	Dev. Comp. Immunol.	24	703-715	2000
Pal, E., T. Tabira, T. Kawano, M. Taniguchi, S. Miyake, T. Yamamura	Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of Va14 natural killer (NK) T cells.	J. Immunol.	166	662-668	2001
Takahashi, K., S. Miyake, T. Kondo, K. Terao, M. Hatakenaka, S. Hashimoto, T. Yamamura	Natural killer type 2 (NK2) bias in remission of multiple sclerosis.	J. Clin. Invest.	107	R23-R29	2001

雑誌 (つづき)

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
山村 隆 近藤 誉之	T cell receptor と神経免疫疾患 特集. ゲノム時代の 脳神経系医学	Molecular Medicine. 臨時増刊号	37	105-110	2000
山村 隆	多発性硬化症	第 115 回日本 医学会シンポ ジウム記録集		59-64	2000
近藤 誉之 山村 隆	多発性硬化症の免疫病態	内科	85	617-621	2000
山村 隆	NKT 細胞と自己免疫疾患モデル	最新医学	55	858-863	2000
山村 隆	多発性硬化症の発症機序	Current Insights in Neurological Science.	8	10-11	2000
山村 隆 三宅 幸子 高橋 和也	NK と NKT による自己免疫性脳 脊髄炎の制御	免疫 Immunology Frontier.	10	304-307	2000
山村 隆	多発性硬化症の病態と治療	Bio Clinica.	15	937-941	2000
山村 隆	特集.多発性硬化症治療の最新情 報. その病態と治療	難病と在宅 ケア	6	7-10	2001