

厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業

多発性硬化症の神経免疫学的研究—疾患感受性および疾患抵抗性遺伝子を利用した視神経脊髄型多発性硬化症の責任自己抗原の検索に

関与する研究

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 吉良 潤一

平成13年 (2001)年 4月

## 目 次

I. 総括研究報告	
多発性硬化症の神経免疫学的研究—疾患感受性および 疾患抵抗性遺伝子を利用した視神経脊髄型多発性硬化 症の責任自己抗原の検索に関する研究 .....	1
吉良潤一	
II. 分担研究報告	
1. 責任自己抗原の検索 .....	9
西村泰治	
2. 疾患感受性・抵抗性遺伝子の検索 .....	14
菊地誠志・深澤俊行	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	19
IV. 研究成果の刊行物・別冊	

厚生科学研究費補助金 (脳科学研究事業)

総括研究報告書

多発性硬化症の神経免疫学的研究—疾患感受性および疾患抵抗性遺伝子を利用した視神経脊髄型多発性硬化症の責任自己抗原の検索に関する研究

研究者 吉良 潤一 九州大学大学院医学研究院・神経内科・教授

### 研究要旨

日本人の多発性硬化症 (MS) は、臨床的に、免疫遺伝学的に、そして T 細胞の自己抗原に対する免疫応答においても異なる、視神経脊髄型 MS (OS-MS) と通常型 MS (C-MS) の 2 つの病型が混在している。私どもの発見した OS-MS の疾患感受性遺伝子は HLA-DPB1\*0501 であり、C-MS の HLA-DRB1\*1501 と比較した場合、T 細胞に抗原提示される抗原ペプチドが結合するペプチド収容溝のうち、ポケット 1 に対応するアミノ酸配列が大きく異なることから、この 2 病型では提示される抗原ペプチドが全く異なることが予想される。また、髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトについて、近年、視神経や脊髄には大脳とは異なる特有の前駆細胞が多く存在することが示されており、OS-MS の病型の形成に関与する、視神経、脊髄に特有な責任自己抗原の存在が示唆される。本研究では、日本人に頻度の高い OS-MS の責任自己抗原の同定を行う一方で、九大・北大での多数例の MS 患者を集積し、MS の各病型ごとの新たな疾患感受性・抵抗性遺伝子を発見することも系統的に行っていく。

我々は、OS-MS の責任自己抗原を同定するために、ヒト脊髄より抽出した mRNA をもとに cDNA を合成し、λファージベクターに組み込むことで、ヒト脊髄 cDNA 発現ライブラリーを作製した。このライブラリーをもとに、OS-MS 患者からの血清を用いて SEREX 法にて責任自己抗原の同定を試みた。1 名の患者で、 $5 \times 10^5$  個のファージのスクリーニングにより 7 つの陽性クローンが得られ、その塩基配列の解析の結果、Rabaptin-5、KIAA0610 の 2 種類の蛋白が同定できた。さらに他の患者では  $1 \times 10^6$  個のファージのスクリーニングにより、7 つの陽性クローンを得た。現在、この陽性クローンの塩基配列の決定と、Rabaptin-5、KIAA0610 蛋白の OS-MS との関連の検討並びに、他の患者血清でのスクリーニングを継続している。疾患感受性・抵抗性遺伝子の検討においては、制限酵素を用いた PCR-RFLP 解析によりビタミン D 受容体遺伝子、エストロゲン受容体遺伝子多型では、C-MS 患者と健常群とでは有意差が認められたが、HSP70(Heat Shock Protein 70)では有意差が認められなかった。現在、 $\beta$ -adrenergic receptor の遺伝子多型について検討を行っている。

分担研究者

西村泰治 熊本大学医学研究科・免疫識別学・教授

菊地誠志 北海道大学医学研究科・神経内科学・助手

深澤俊行 北祐会神経内科病院・神経内科学・部長

#### A. 研究目的

日本人の多発性硬化症 (MS) は、臨床症候から見た病巣が視神経と脊髄に限られる視神経脊髄型 MS (OS-MS) と、それ以外の中枢神経系にも多巣性に病巣を有する通常型 MS (C-MS) が混在している。臨床的にこの2つの病型を比較すると、OS-MS では、①女性の罹患率が高い、②発症年齢がより高齢、③再発しやすい、④総合障害度が高い、⑤脳 MRI 上の病巣が少ない、⑥脊髄 MRI での異常信号域の長さが長く、萎縮を呈しやすい、⑦細胞・蛋白増加が高度、などの特徴を示す。欧米白人における MS では、疾患感受性遺伝子として HLA-DRB1\*1501 が知られている。一方、我々は、日本人の MS 患者を OS-MS と C-MS とに分類し、疾患感受性遺伝子を検討した結果、C-MS では欧米白人と同様に DRB1\*1501 と正の相関にあるのに対し、OS-MS では相関は認められず、DPB1\*0501 と正の相関にあることを発見した。この各々の疾患感受性を示す HLA クラス II 分子は、T 細胞に抗原提示される抗原ペプチドが結合するペプチド収容溝を形成するアミノ酸配列が

異なるため、全く異なる抗原ペプチドを T 細胞に抗原提示していることが予想される。また、それぞれの病型の患者末梢血単核球 (PBMC) をミエリン蛋白由来ペプチドにて刺激した場合、そのエピトープの拡大する傾向が異なり、OS-MS では MOG への拡大、C-MS では PLP へ拡大する傾向が強いことが示され、これらは各々の疾患感受性を示す HLA クラス II 分子の違いに由来する可能性が考えられた。以上のように、日本人における MS は、臨床的にも、免疫遺伝学的にも、また、T 細胞の自己抗原に対する免疫応答においても異なる2つの病型が存在している。近年、MS の主要な標的であるオリゴデンドロサイトについて、視神経や脊髄には大脳とは異なる特有の前駆細胞が多く存在することが示されており、OS-MS の病型の形成に関与する、視神経、脊髄に特有な責任自己抗原の存在が示唆される。本研究では、日本人に頻度の高い OS-MS の責任自己抗原の同定を第一の目的とする。さらに、九大・北大で多数例の MS 患者を集積し、MS の各病型ごとに新たな疾患感受性・抵抗性遺伝子を発見していくことを第二の目的とする。

#### B. 研究方法

I. ヒト脊髄 cDNA 発現ライブラリーの作製；OS-MS の責任自己抗原を患者血清にてスクリーニングするため、ヒト脊髄 cDNA 発現ライブラリーを作製した。ヒト脊髄由来の Poly

A+mRNA(Clontech)を購入し、ランダムプライマーを用いて 2nd strand cDNA を合成した。cDNA の末端を平滑化し、Eco RI-Not I-Bam HI アダプターのライゲーション後、λZAP II ベクターの Eco RI サイトにベクターライゲーションを行い、in vitro packaging を行うことで、ヒト脊髄 cDNA 発現ライブラリーを作製しえた。

II. SEREX 法によるスクリーニング；1次抗体として、OS-MS 患者1名よりの血清を用いて、SEREX 法にてスクリーニングを行った。上記ヒト脊髄 cDNA 発現ライブラリーのλファージを大腸菌(XL1 Blue MRF)に感染させ、NZY プレート上に溶菌斑が出現したところで IPTG により蛋白発現を誘導し、ニトロセルロース膜に発現蛋白を転写した。ヒト脊髄由来蛋白質の転写された膜に対し、大腸菌・ファージで吸収した OS-MS 患者血清を1次抗体とし、2次抗体として、酵素標識された mouse anti-human IgG(Southern Biotechnology)を用いた。基質添加後、化学発光を X 線フィルム上に検出し、陽性クローンをプレートからひろい、in vivo excision 後、プラスミド DNA を精製し、DNA シークエンスを行った。

III. 疾患感受性・抵抗性遺伝子の検索；MS 患者並びに健常者において、Vitamin D receptor gene(VDRG)、Estrogen receptor gene (ERG)、Heat shock protein 70 (HSP 70)遺伝子における遺伝子多型の検討を行った。

対象は、最低1年以上経過している診断確実な C-MS 患者 77-107 名、健常群 73-95 名で、末梢血より得られた DNA で制限酵素を用いた PCR-RFLP 解析を行った。VDRG に関しては制限酵素 Apa I ないし Bsm I、ERG では制限酵素 Pvu II ないし Xba I、HSP 70 では制限酵素 Bsr BI、Pst I、Nco I を用いた。それぞれで得られた遺伝子多型は、MS の臨床症状、MRI 所見、HLA genotyping 等との相関を検討した。

IV. 動物モデルの作製；OS-MS の動物モデルを作製するため、疾患感受性遺伝子である DP5(DPA1\*02022/DPB1\*0501)のトランスジェニックマウスの作製中である。

(倫理面への配慮)

遺伝子多型の解析について、患者のインフォームドコンセントを収得した上で行う。以前に採取されたサンプルについても、再度インフォームドコンセントを文書にて収得する。

### C. 研究結果

I. OS-MS の責任自己抗原の検索；OS-MS 患者1名の血清を1次抗体とし、SEREX 法にてスクリーニングを行った。およそ  $5 \times 10^5$  個のファージのスクリーニングにより、陽性クローンを7つ得た。それぞれの塩基配列を決定した結果、7つの内3つは frame shift した陰性クローンであったが、2つは Rabaptin-5、残り2つは KIAA0610 蛋白であった。さらにもう1例の OS-MS 患者では、1×

10<sup>6</sup>個のファージのスクリーニングで7つの陽性クローンが得られた。

II. 疾患感受性・抵抗性遺伝子の検索；①Vitamin D receptor 遺伝子多型：C-MS 患者 77 例および健常対照者 95 例で、制限酵素 Apa I ないし Bsm I にて PCR-RFLP 解析を行い、それぞれの遺伝子多型 AA, Aa, aa および BB, Bb, bb を得て、患者・対照間で比較検討を行った結果、Bam I 多型においては、[b] allele および bb genotype の頻度が MS 群で有意に高かった ( $p=0.0138$ ,  $p=0.0263$ )。Apa I 多型においては、AA genotype および[A] allele の頻度が MS 群で高かった ( $p=0.0070$ ,  $p=0.0321$ )。さらに、bA/bA 陽性者は、健常対照に比べ MS 患者では有意に多かった ( $p=0.0003$ )。VDRG 多型と臨床像、経過および MRI 所見との間に相関は認められなかった。VDRG 多型と HLA 多型とでは、[A] allele を持つ MS 患者では、対照およびそれ以外の MS 患者と比較して DPB1\*0501 が有意に高率であり ( $p=0.0319$ ,  $p=0.0165$ )、DRB1\*1501 を有する割合も有意に高かった ( $p=0.0431$ ,  $p=0.0089$ )。

②Estrogen receptor 遺伝子多型の検索：C-MS 患者 79 例および健常対照者 73 例で制限酵素 Pvu II ないし Xba I にて PCR-RFLP 解析を行い、それぞれの遺伝子多型 PP, Pp, pp および XX, Xx, xx を得て、患者・対照間で比較検討を行った結果、Pvu II 多型において、PP, Pp および[P] allele の割合が、MS において有意に高かった

( $p=0.0005$ ,  $p=0.0004$ )。Xba I 多型の検討では有意差は認めなかったが、Xx を有する男性患者の発症年齢 ( $24.67 \pm 7.14$ ) が、XX ないし xx を有する群 ( $32.46 \pm 8.68$ ) より有意に低かった ( $p=0.0381$ )。

③Heat shock protein 70 遺伝子多型の検索：C-MS 患者 107 例および健常対照群 77 例で、HSP70-1, -2, -hom においてそれぞれ制限酵素 Bsr BI, Pst I, Nco I にて PCR-RFLP 解析を行ったが、今回の検討では患者・対照間で有意差は認められなかった。

III. 動物モデルの作製；OS-MS の疾患感受性遺伝子である DP5(DPA1\*02022/DPB1\*0501) ホモの健常人より、それぞれの遺伝子をクローニングした。現在、コンストラクトを作製中である。

#### D. 考察

OS-MS の責任自己抗原の検索；OS-MS 患者 1 名の血清のスクリーニングにより、Rabaptin-5、KIAA0610 蛋白の 2 つを同定した。Rabaptin-5 は、両終末に coiled-coil ドメインを持つ 862 個のアミノ酸よりなる蛋白で、小胞輸送に関与する。KIAA0610 蛋白は、塩基配列の一部が同定されているが機能は不明の蛋白であり、その発現部位が脳のみならず肝・筋・脳・腎など多岐にわたっている。他の OS-MS 患者でのスクリーニングでは、7 つの陽性クローンを得ている。現在、この陽性クローンの塩基配列の決定、並びに Rabaptin-5、

KIAA0610 蛋白の OS-MS との関連性を検討し、さらに他の患者血清にてスクリーニングを継続している。

疾患感受性・抵抗性遺伝子の検索；

①Vitamin D receptor 遺伝子多型：今回の検討により、MS と VDRG 多型との相関が認められた。活性化ビタミン D である 1,25-Dihydroxy-vitamin D3 の受容体は末梢血単核球や活性化T細胞にも発現し、IL-1, 2, 6, 12 や TNF $\alpha$ 、TNF $\beta$ 、IFN- $\gamma$ の産生に関わることが知られており、今回の検討により、VDRG 多型と MS との間に相関が認められたことより、VDRG 多型が MS の発症に関与することが示唆された。しかしながら、臨床像との間には相関は認められず、MS の発症後の経過には関与しないものと考えられた。

②Estrogen receptor 遺伝子多型の検索：MS は、若年女性に多く、妊娠後期に再発率が低く、出産後高くなるといわれており、性ホルモンの関与が示唆される。近年、エストロゲンの免疫抑制作用の報告や EAE へのエストロゲン投与により、その発症を遅らせたり、症状を軽減したりすることが報告されている。さらに、ERG の PP および Pp はエストロゲンの効果を減弱させることが示唆されている。今回の検討により PP および Pp が MS で有意に高かったことから、ERG 多型が MS の発症に関与している可能性が示唆された。

③Heat shock protein 70 遺伝子多型の検索：MS 患者の末梢血 T 細胞に

おいては HSP70 に対する増殖反応が亢進しており、その遺伝子は HLA クラス III 領域に存在し、その多型が自己免疫疾患との関連が示唆されている。しかしながら、今回の検討では患者-対照間で有意差は認められなかった。現在、 $\beta$ 2 adrenergic receptor 遺伝子多型の検討を行っている。

## E. 結論

OS-MS の責任自己抗原を同定するため、OS-MS 患者血清を用い、SEREX 法にてスクリーニングを行った。OS-MS 患者 1 名の血清より Rabaptin-5、KIAA0610 蛋白が同定できた。さらに他の患者血清より陽性クローンが 7 つ得られた。今後、この陽性クローンの塩基配列の決定、並びに Rabaptin-5、KIAA0610 蛋白の OS-MS との関連性を検討する。制限酵素を用いた PCR-RFLP 解析により、VDRG 多型、ERG 多型と MS との間に相関が認められたが、HSP70 では有意差は認められなかった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kira J, Horiuchi I, Suzuki J, Osoegawa M, Tobimatsu S, Murai H, Minohara M, Furue M, Ochi H. Myelitis with atopy in Japan: a retrospective clinical study

- of the past 20 years. Intern Med: (in press)
- 2) Minohara M, Ochi H, Matsushita S, Irie A, Nishimura Y, Kira J. Differences between T-cell reactivities to major myelin protein-derived peptides in optico-spinal and conventional forms of multiple sclerosis and healthy controls. Tissue Antigens: (in press)
  - 3) Noerager BD, Inuzuka T, Kira J, Blalock JE, Whitaker JN, Galin FS. An IgM anti-MBP Ab in a case of Waldenstrom's macroglobulinemia with polyneuropathy expressing an idiotype reactive with an MBP epitope immunodominant in MS and EAE. J Neuroimmunol 113: 163-169, 2001.
  - 4) Kikuchi H, Osoegawa M, Ochi H, Murai H, Horiuchi I, Takahashi H, Yamabe K, Iwaki T, Mizutani T, Oda M, Kira J. Spinal cord lesions of myelitis with hyperIgE-emia and mite antigen specific IgE (atopic myelitis) manifest eosinophilic inflammation. J Neurol Sci 183: 73-78, 2001.
  - 5) Osoegawa M, Matsumoto S, Ochi H, Ishikawa K, Nakamura-Uchiyama F, Nawa Y, Yamasaki K, Horiuchi I, Ohyagi Y, Kira J. Localized myelitis caused by visceral larva migrans due to *Ascaris suum* masquerading a spinal cord tumor. J Neurol Neurosurg Psychiatry 70: 265-266, 2001.
  - 6) Kira J. A novel feature disclosed in optico-spinal multiple sclerosis in Asians. Int Med 39: 272, 2000.
  - 7) Wu X, Osoegawa M, Yamasaki K, Kawano Y, Ochi H, Horiuchi I, Minohara M, Ohyagi Y, Yamada T, Kira J. Flow cytometric differentiation of asian and western types of multiple sclerosis, HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) and hyperIgE-aemic myelitis by analyses of memory CD4 positive T cell subsets and NK cell subsets. J Neurol Sci 177: 24-31, 2000.
  - 8) Horiuchi I, Yamasaki K, Osoegawa M, Ohyagi Y, Okayama A, Kurokawa T, Yamada T, Kira J. Acute



myelitis following asthma attacks with onset after puberty. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68: 665-668, 2000.

- 9) Yamasaki K, Horiuchi I, Minohara M, Osoegawa M, Kawano Y, Ohyagi Y, Yamada T, Kira J. Hyperprolactinemia in opticospinal multiple sclerosis. *Intern Med* 39: 296-299, 2000.
- 10) Horiuchi I, Kawano Y, Yamasaki K, Minohara M, Furue M, Taniwaki T, Miyasaki T, Kira J. Th1 dominance in HAM/TSP and the optico-spinal form of multiple sclerosis versus Th2 dominance in mite antigen-specific IgE myelitis. *J Neurol Sci* 172: 17, 2000.

## 2. 学会発表

- 1) 三野原元澄、小副川学、山崎賢智、堀内泉、松下祥、西村泰治、吉良潤一；アジア型多発性硬化症におけるミエリン蛋白自己反応性 T 細胞の解析：第 12 回 神経免疫学会（東京）2000, 2 月
- 2) 呉暁牧、小副川学、山崎賢智、堀内泉、三野原元澄、吉良潤一；各種炎症性中枢神経疾患における Tc1/Tc2 バランスの検討：第 12 回 神経免疫学会（東京）2000, 2 月
- 3) 三野原元澄、小副川学、山崎賢智、堀内泉、松下祥、西村泰治、吉良潤一；アジア型多発性硬化症におけるミエリン蛋白自己反応性 T 細胞の解析：第 41 回 日本神経学会総会（松本）2000, 5 月
- 4) 呉暁牧、小副川学、山崎賢智、堀内泉、三野原元澄、吉良潤一；各種炎症性中枢神経疾患における Tc1/Tc2 バランスの検討：第 41 回 日本神経学会総会（松本）2000, 5 月
- 5) Minohara M, Matsushita S, Nishimura Y, Kira J; Analysis of Myelin antigen specific autoreactive T cells from opticospinal multiple sclerosis patients. 125<sup>th</sup> Annual meeting, American Neurological Association, Boston, October 2000
- 6) 三野原元澄、松下祥、西村泰治、吉良潤一；アジア型多発性硬化症におけるミエリン蛋白自己反応性 T 細胞の解析：第 30 回 日本免疫学会総会（仙台）2000, 11 月

- 7) 吳曉牧、越智博文、小副川学、三野原元澄、梅風君、村井弘之、吉良潤一；炎症性中枢神経疾患における IL-5, IL-13 の検討：第13回日本神経免疫学会・学術集会（東京）2000, 2月

H. 知的財産権の出願・登録状況  
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

多発性硬化症の神経免疫学的研究—疾患感受性および疾患抵抗性遺伝子を利用した視神経脊髄型多発性硬化症の責任自己抗原の検索に関する研究

責任自己抗原の検索

分担研究者 西村 泰治 熊本大学医学研究科・免疫識別学・教授

研究要旨

日本人の多発性硬化症 (MS) は、欧米白人に比べ視神経脊髄型 MS が高率に認められ、通常型 MS と混在した状態にある。我々は日本人における通常型 MS の疾患感受性遺伝子が DRB1\*1501 アリルであり、視神経脊髄型 MS では DPB1\*0501 アリルであることを発見した。この 2 つの病型に疾患感受性を示す、DR15(DRA\*0101/DRB1\*1501)分子と DP5(DPA1\*0202/DPB1\*0501)分子のペプチド結合モチーフを比較すると、DR15 分子ではポケット 1 (P1)に対応するアミノ酸残基はフェニルアラニンなどの疎水性残基であるが、DP5 分子ではリジンなどの正荷電のアミノ酸残基が結合するため、各々の疾患感受性を示す HLA-クラス II 分子は全く異なるペプチドを T 細胞に抗原提示していることが示唆される。また、HLA-クラス II 多型は人種間において偏りがあり、アジア人種において高率に認められる DPB1\*0501 アリルは欧米白人においては頻度が低く、このことが視神経脊髄型 MS がアジア人種に高い頻度で認められる由縁と考えられる。

近年、MS の主要な標的であるオリゴデンドロサイトは、視神経や脊髄と大脳とではその前駆細胞が異なるとする見方がある。1 型アストロサイトより分泌される PDGF は、O-2A 前駆細胞の重要な分化促進因子であり、O-2A 前駆細胞上の PDGF 受容体と結合しオリゴデンドロサイトへ分化させる。PDGF のノックアウトマウスでは、視神経では著明に、脊髄においても高度に前駆細胞並びに成熟オリゴデンドロサイトの減少が認められるが、大脳や脳幹での減少は軽度である。このことは MS の主要な標的であるオリゴデンドロサイトが、視神経・脊髄と大脳とでは、その発生段階において異なる細胞集団より発生していることを示している。我々はこの観点より、視神経脊髄型 MS の病型の形成には、視神経・脊髄に特異的に発現する責任自己抗原が存在すると確信している。我々は SEREX 法にて視神経脊髄型 MS の責任自己抗原の検索するため、大脳ではなく脊髄由来 mRNA を用いてヒト脊髄 cDNA 発現ライブラリーを作製した。これを用い、視神経脊髄型 MS 患者血清を 1 次抗体として、視神経脊髄型 MS の責任自己抗原の検索が可能と考えられる。

## A. 研究目的

多発性硬化症 (MS) の発症や経過には免疫系の関与が示唆されており、特に自己反応性 CD4<sup>+</sup>T 細胞が大きな役割を担っていると考えられている。これら自己反応性 CD4<sup>+</sup>T 細胞は HLA-クラス II 分子上に抗原提示された自己の蛋白由来ペプチドを認識し、増殖反応やサイトカイン産生などの免疫応答を示す。T 細胞に抗原提示する HLA-クラス II 分子のペプチド収容溝は非常に多型性に富み、個々の分子において抗原提示されるペプチドも異なっており、この多型により個人個人の免疫応答の多様性が生じている。欧米白人における MS の疾患感受性遺伝子は、DRB1\*1501 アリルが知られており、DR15(DRA\*0101/ DRB1\*1501)分子のペプチド収容溝の構造、ペプチド結合モチーフが解明されている。我々は、アジア人種における MS では、通常型 MS は欧米白人と同様に DRB1\*1501 と正の相関に有るが、視神経脊髄型 MS は相関せず、DPA1\*0202/DPB1\*0501 と正の相関を示すことを発見した。この 2 つの病型それぞれに疾患感受性を示す、DR15 分子と DP5(DPA1\*0202/DPB1\*0501)分子のペプチド結合モチーフを比較すると、DR15 分子ではポケット 1 (P1)に対応するアミノ酸残基はフェニルアラニンなどの疎水性残基であるが、DP5 分子ではリジンなどの正荷電のアミノ酸残基が結合するため、各々の疾患感受性を示

す HLA-クラス II 分子は全く異なるペプチドを T 細胞に抗原提示していることが示唆される。実際に各病型の患者末梢血単核球よりミエリン蛋白である MBP, PLP, MOG 自己反応性 T 細胞を樹立した場合、視神経脊髄型 MS では MOG に、通常型 MS は PLP に対してよりエピトープの拡大が認められ、自己抗原蛋白に対する免疫の破綻も視神経脊髄型 MS と通常型 MS では異なっている。また、HLA-クラス II 多型は人種間において偏りが認められ、アジア人種において高率に認められる DPB1\*0501 アリルは欧米白人においては頻度が低く、このことが視神経脊髄型 MS がアジア人種に高い頻度で認められる由縁と考えられる。以上のことより、視神経脊髄型 MS の病型の形成には、視神経や脊髄に特異的に発現する責任自己抗原が存在する可能性が示唆される。我々はこの責任自己抗原を SEREX 法にて検索する時に用いる、ヒト脊髄 cDNA 発現ライブラリーの作製を行った。

## B. 研究方法

視神経脊髄型 MS の責任自己抗原を患者血清にてスクリーニングするため、ヒト脊髄 cDNA 発現ライブラリーを作製を試みた。ヒト脊髄由来の Poly A+mRNA (Clontech)を購入し、ランダムプライマーを用いて 2nd strand cDNA を合成した。cDNA の末端を平滑化し、Eco RI-Not I-Bam HI アダプター (TaKaRa)のライゲ

ション後、λ ZAP II ベクター (STRATAGENE)の Eco RI サイトにベクターライゲーションを行い、in vitro packaging を行った。これにより作製されたヒト脊髄 cDNA ライブラリーは、SEREX 法で用いるため、1 度だけ増幅を行い、そのタイターを測定した。各プラークのインサートサイズは、T3, T7 プライマーを用いて PCR を行い、アガロースゲルで電気泳動を行い確認した。

### C. 研究結果

上記方法にて、ヒト脊髄 cDNA 発現ライブラリーを作製しえた。SEREX 法にて使用するため、1 度だけライブラリーの増幅を行い、そのタイターを測定した。NZY プレート上の溶菌斑を 10 個拾い、それぞれを SM Buffer に懸濁し、その上清中に存在するファージのインサートの確認を行った。T7, T3 プライマーを用いて PCR を行い、アガロースゲルにて電気泳動を行った結果、ファージのインサートはそれぞれ異なるサイズで認められ、平均およそ 3kb であった。

### D. 考察

ラット視神経より分離される oligodendrocyte-type-2-astrocyte precursor cell (O-2A 前駆細胞)はオリゴデンドロサイトもしくは 2 型アストロサイトのいずれかのグリア細胞に分化する。1 型アストロサイトより分泌される PDGF(platelet-derived

growth factor)は、O-2A 前駆細胞の重要な分化促進因子であり、O-2A 前駆細胞上の PDGF 受容体と結合しオリゴデンドロサイトへ分化させる。ヒトにおける PDGF 受容体陽性細胞は胎齢 45 日頃より脊髄腹側部より出現し、増殖しながら背側へ移動・ミエリン形成し成熟オリゴデンドロサイトとなる。PDGF を過剰発現させたマウスでは、前駆細胞の過剰な増殖が認められる。一方、PDGF のノックアウトマウスでは、視神経では著明に、脊髄においても高度に前駆細胞並びに成熟オリゴデンドロサイトの減少が認められるが、大脳や脳幹での減少は軽度である。このことは MS の主要な標的であるオリゴデンドロサイトが、視神経・脊髄と大脳とでは、その発生段階において異なる細胞集団より発生していることを示している。我々はこの観点より、視神経脊髄型 MS の病型の形成には、視神経・脊髄に特異的に発現する責任自己抗原が存在すると確信している。我々は SEREX 法にて視神経脊髄型 MS の責任自己抗原の検索するため、大脳ではなく脊髄由来 mRNA を用いてヒト脊髄 cDNA 発現ライブラリーを作製しえた。これを用い、視神経脊髄型 MS 患者血清を 1 次抗体として、視神経脊髄型 MS の責任自己抗原の検索が可能と考えられる。

### E. 結論

視神経脊髄型 MS の病型形成に関わる責任自己抗原を SEREX 法を用

いて検索するため、ヒト脊髄 cDNA 発現ライブラリーを作製しえた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Nakatsura T, Senju S, Yamada K, Jotsuka T, Ogawa M, Nishimura Y. Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Comm* 281: 936-944, 2001.

2) Yamada K, Senju S, Nakatsura T, Murata Y, Ishihara M, Nakamura S, Ohno S, Negi A, Nishimura Y. Identification of a novel autoantigen UACA in patients with panuveitis. *Biochem Biophys Res Comm* 280: 1169-1176, 2000.

##### 2. 学会発表

1) Nishimura Y, Chen Y-Z, Matsuoka T, Matsushita S: Modification of human CD4+ T cell responses by altered peptide ligands (APL). 自己免疫病の誘導と調節機構に関する国際ワークショップ (ケアンズ)

2000, 2月

2) Nishimura Y; Analyses of HLA class II-associated susceptibility to autoimmune disease uveitis and IDDM. 1st International Seminar on Immunology, Pathogenesis and Regulation of Immunological Refractory Disease (Tokyo) November, 2000

3) 中面哲也、千住覚、城塚透子、小川道雄、西村泰治; SEREX 法によるヒト膵癌抗原の同定; HSP105 は種々のヒト癌細胞に特異的に高発現する: 第4回 基盤的癌免疫研究会総会 (札幌) 2000, 8月

4) 中面哲也、千住覚、山田和博、城塚透子、小川道雄、西村泰治; SEREX 法によるヒト膵癌抗原の同定; HSP105 は種々のヒト癌細胞に特異的に高発現する: 第59回 日本癌学会総会 (横浜) 2000, 10月

5) 山田和博、千住覚、Shinohara T、松下祥、村田恭啓、中面哲也、石原麻美、中村聡、大野重昭、根本昭、西村泰治; 疾患感受性が HLA と強く相関する Vogt-小柳-原田病における自己抗原の解析: 第45回 日本人類遺伝学会 (福岡)

2000, 10月

- 6) 山田和博、千住覚、  
**Shinohara T**、村田恭啓、  
中面哲也、石原麻美、中村  
聡、大野重昭、根木昭、西  
村泰治；Vogt・小柳・原田病  
関連自己抗原の解析：第3  
0回 日本免疫学会総会・  
学術集会（仙台）2000, 11  
月

- 7) 中面哲也、千住覚、山田和  
博、城塚透子、伊藤雅昭、  
小川道雄、伊東恭悟、西村  
泰治：SEREX 法により同  
定したヒト膀胱癌抗原の解  
析：第30回 日本免疫学  
会総会・学術集会（仙台）  
2000, 11月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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

多発性硬化症の神経免疫学的研究—疾患感受性および疾患抵抗性遺伝子を利用した視神経脊髄型多発性硬化症の責任自己抗原の検索に關与する研究

疾患感受性・抵抗性遺伝子の検索

分担研究者 菊地 誠志 北海道大学医学研究科・神経内科学・助手  
深澤 俊行 北祐会神経内科病院・神経内科学・部長

#### 研究要旨

多発性硬化症 (MS) は heterogeneous な疾患であり、その発症や病型形成などには関連ある遺伝子が複数存在すると考えられる。MS の関連遺伝子を検索する場合、MS の病型、疫学的事実および自己免疫疾患として推測される発症機序から候補遺伝子を選定し、その多型分析から疾患感受性遺伝子、抵抗性遺伝子を検索することは、大規模な全ゲノムスクリーニングに比べ効率的であり、これらから得られた情報は MS の病態の解明に有用であることは勿論、治療手段の開発にも役立つものと考えられる。本研究では、候補遺伝子として、核内レセプター群、補体・補体関連分子、サイトカイン・サイトカイン受容体、ケモカイン受容体の遺伝子多型について case-control 型分析を行っていく。今回、ビタミン D 受容体 (VDRG)、エストロゲン受容体 (ERG)、Heat shock protein 70 (HSP70) 遺伝子多型を、制限酵素を用いた RFLP 解析を行った。その結果、①VDRG 多型：通常型 MS 患者—健常対照者間で制限酵素 Apa I ないし Bsm I にて PCR-RFLP 解析を行った結果、Bam I 多型においては、[b] allele および bb genotype の頻度が MS 群で有意に高く、Apa I 多型では、AA genotype および [A] allele の頻度が MS 群で高かった。さらに、bA/bA 陽性者は、健常対照に較べ MS 患者で有意に多かった。このことより、VDRG 多型が MS の疾患感受性に關与することが示唆された。②ERG 多型：通常型 MS 患者—健常対照者間で制限酵素 Pvu II ないし Xba I にて PCR-RFLP 解析を行った結果、Pvu II 多型において、PP, Pp および [P] allele の割合が、MS において有意に高く、Xba I 多型の検討では有意差は認めなかったが、Xx を有する男性患者の発症年齢が、XX ないし xx を有する群より有意に低かった。以上より PP および Pp が MS の発症に關与している可能性が示唆された。③HSP 70 遺伝子多型：C-MS 患者—健常対照群間で、HSP70-1, -2, -hom においてそれぞれ制限酵素 Bsr BI, Pst I, Nco I にて PCR-RFLP 解析を行ったが、今回の検討では患者-対照間で有意差は認められなかった。



## A. 研究目的

多発性硬化症（MS）は heterogeneous な疾患であり、その発症や病型形成などには関連ある遺伝子が複数存在すると考えられる。MS の代表的疾患感受性遺伝子は HLA-DRB1\*1501 アリルであるが、日本人の MS は視神経脊髄型 MS と通常型 MS が混在しており、この通常型 MS のみが欧米白人と同様に DRB1\*1501 アリルと正の相関が認められる。一方、日本人に高率に認められる視神経脊髄型 MS は、DRB1\*1501 アリルとは相関は認められず、DPB1\*0501 アリルと正の相関が認められる。さらに、DPB1\*0301 アリルは通常型 MS とは正の相関にあるが、視神経脊髄型 MS とは負の相関にある。つまり、視神経脊髄型 MS にとって、DPB1\*0501 アリルは疾患感受性遺伝子、DPB1\*0301 アリルは疾患抵抗性遺伝子と言える。MS に関連する疾患感受性・疾患抵抗性遺伝子を検索する場合、MS の病型、疫学的事実（高緯度地方、女性に多いなど）および自己免疫疾患として推測される発症機序から候補遺伝子を選定し、その多型分析から疾患感受性遺伝子、抵抗性遺伝子を検索することは、大規模な全ゲノムスクリーニングに比べ効率的であり、これらから得られた情報は MS の病態の解明に有用であることは勿論、治療手段の開発にも役立つものと考えられる。本研究では、候補遺伝子として、核内レセプター群（エストロゲ

ンなどの性ホルモン、ビタミン A, D などの脂溶性ビタミンの受容体）、補体・補体関連分子、サイトカイン・サイトカインレセプター、ケモカインレセプターの遺伝子多型について case-control 型分析を行っていく。

## B. 研究方法

MS 患者並びに健常者において、Vitamin D receptor gene(VDRG)、Estrogen receptor gene (ERG)、Heat shock protein 70 (HSP 70) 遺伝子における遺伝子多型の検討を行った。対象は、最低1年以上経過している診断確実な C-MS 患者 77-107 名、健常群 73-95 名で、末梢血より得られた DNA で制限酵素を用いた PCR-RFLP 解析を行った。VDRG に関しては制限酵素 Apa I ないし Bsm I、ERG では制限酵素 Pvu II ないし Xba I、HSP 70 では制限酵素 Bsr BI、Pst I、Nco I を用いた。それぞれで得られた遺伝子多型は、MS の臨床症状、MRI 所見、HLA genotyping 等との相関を検討した。

（倫理面への配慮）

遺伝子多型の解析について、患者のインフォームドコンセントを取得した上で行う。以前に採取されたサンプルについても、再度インフォームドコンセントを文書にて取得する。

## C. 研究結果

① Vitamin D receptor 遺伝子多型：C-MS 患者 77 例および健常対照者 95 例で、制限酵素 Apa I ないし Bsm

IにてPCR-RFLP解析を行い、それぞれの遺伝子多型AA, Aa, aaおよびBB, Bb, bbを得て、患者-対照間で比較検討を行った結果、Bam I多型においては、[b] allele および bb genotypeの頻度がMS群で有意に高かった( $p=0.0138$ ,  $p=0.0263$ )。Apa I多型においては、AA genotype および[A] alleleの頻度がMS群で有意に高かった( $p=0.0070$ ,  $p=0.0321$ )。さらに、bA/bA陽性者は、健常対照に較べMS患者では有意に多かった( $p=0.0003$ )。VDRG多型と臨床像、経過およびMRI所見との間に相関は認められなかった。VDRG多型とHLA多型とでは、[A] alleleを持つMS患者では、対照およびそれ以外のMS患者と比較してDPB1\*0501が有意に高率で( $p=0.0319$ ,  $p=0.0165$ )、DRB1\*1501を有する割合も有意に高かった( $p=0.0431$ ,  $p=0.0089$ )。

②Estrogen receptor 遺伝子多型の検索：C-MS患者79例および健常対照者73例で制限酵素Pvu IIないしXba IにてPCR-RFLP解析を行い、それぞれの遺伝子多型PP, Pp, ppおよびXX, Xx, xxを得て、患者-対照間で比較検討を行った結果、Pvu II多型において、PP, Pp および[P] alleleの割合が、MSにおいて有意に高かった( $p=0.0005$ ,  $p=0.0004$ )。Xba I多型の検討では有意差は認めなかったが、Xxを有する男性患者の発症年齢( $24.67 \pm 7.14$ )が、XXないしxxを有する群( $32.46 \pm 8.68$ )より有意に低かった( $p=0.0381$ )。

③Heat shock protein 70 遺伝子多型の検索：C-MS患者107例および健常対照群77例で、HSP70-1, -2, -homにおいてそれぞれ制限酵素BsrBI, Pst I, Nco IにてPCR-RFLP解析を行ったが、今回の検討では患者-対照間で有意差は認められなかった。

#### D. 考察

①Vitamin D receptor 遺伝子多型：今回の検討により、MSとVDRG多型との相関が認められた。活性化ビタミンDである1,25-Dihydroxyvitamin D3の受容体は末梢血単核球や活性化T細胞にも発現し、IL-1, 2, 6, 12やTNF $\alpha$ ,  $\beta$ , IFN- $\gamma$ の産生に関与することが知られており、VDRG多型がMSの発症に関与することが示唆された。しかしながら、臨床像との間には相関は認められず、MSの発症後の経過には関与しないものと考えられた。

②Estrogen receptor 遺伝子多型の検索：MSは、若年女性に多く、妊娠後期に再発率が低く、出産後高くなるといわれており、性ホルモンの関与が示唆される。近年、エストロゲンの免疫抑制作用の報告やEAEへのエストロゲン投与により、その発症を遅らせたり、症状を軽減したりすることが報告されている。さらに、ERGのPPおよびPpはエストロゲンの効果を減弱させることが示唆されており、今回の検討によるPvu II多型において、PP, Pp および[P] alleleの割合が、MSにおいて有意に高かつ

たことより、PP および Pp が MS の発症に関与している可能性が示唆された。また、男性において Xba I 多型における Xx を有することで、発症年齢の若年化に関係していることが示唆された。女性における Xba I 多型と骨密度の研究では、エストロゲン濃度が低下する閉経前後では、Xx を有する群でそれまで高かった骨密度が他の群に比べ有意に低下することが指摘されており、Xx を有する場合エストロゲン濃度が低下すると効果が減弱する可能性が示唆される。エストロゲン濃度が低い男性において、有意に MS の発症年齢が低下していることから、エストロゲンが発症予防に関連していて、Xx を有する場合エストロゲンの効果が減弱することが一つの可能性として考えられる。

③Heat shock protein 70 遺伝子多型の検索：MS 患者の末梢血 T 細胞においては HSP70 に対する増殖反応が亢進しており、その遺伝子は HLA クラス III 領域に存在し、その多型が自己免疫疾患との関連が示唆されている。しかしながら、今回の検討では患者-対照間で有意差は認められなかった。現在、 $\beta 2$  adrenergic receptor 遺伝子多型の検討を行っている。

#### E. 結論

制限酵素を用いた PCR-RFLP 解析により、VDRG 多型、ERG 多型と MS との間に相関が認められたが、HSP70 では有意差は認められなかった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Fukazawa T, Yamasaki K, Ito H, Kikuchi S, Minohara M, Horiuchi I, Tsukishima E, Sasaki H, Hamada T, Nishimura Y, Tashiro K, Kira J. Both the HLA-DPB1 and -DRB1 alleles correlate with risk for multiple sclerosis in Japanese: Clinical phenotypes and gender as important factors. *Tissue Antigens* 55: 199-205, 2000.
- 2) Niino M, Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S, Sasaki H, Tashiro K. Vitamin D receptor gene polymorphism, in multiple sclerosis and the association with HLA class II alleles. *J Neurol Sci* 177: 65-71, 2000.
- 3) Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. Estrogen receptor gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 179: 70-75, 2000.

##### 2. 学会発表

- 1) 新野正明、菊池誠志、深澤俊行、矢部一郎、佐々木秀直、田代邦夫；多発性硬化症にお

けるエストロゲン受容体遺伝子多型についての検討：第12回 日本神経免疫学会（東京）2000,2月

- 2) 新野正明、菊池誠志、深澤俊行、矢部一郎、佐々木秀直、田代邦夫；多発性硬化症におけるエストロゲン受容体遺伝子多型についての検討：第41回 日本神経学会総会（松本）2000,5月

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし