

厚生科学研究研究費補助金

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する研究

平成13年度 総括研究報告書

主任研究者 吉良 潤一

平成14年 (2002)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	----- 22

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。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、前年度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成し、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。そして、8 名の患者血清より、5 つの候補自己抗原 (Rabaptin-5、Heat shock protein 105、NSD1、KIAA1640、KIAA0610) を同定しえた。

今年度は、同定しえた候補自己抗原の内、HSP105 α 、Rabaptin-5 合成蛋白を作成し、ELISA 法による血清、髄液での自己抗体測定、自己反応性 T 細胞の応答を検討した。その結果、Rabaptin-5 では、対照群-疾患群の間に有意差は認められなかったが、HSP105 においては、陽性率は対照群で 3.0% に対し、MS 群では 14.5% と有意に上昇していた ($p=0.0193$)。しかしながら、OS-MS と C-MS との間に有意差は認められなかった。また、髄液においては、O.D. 値を用いた Mann-Whitney U 検定において、OS-MS 群で有意な上昇が認められた ($p=0.04$)。更に HSP105 α に対する自己反応性 T 細胞応答では、健常対照群 5 名、MS 患者群 9 名において HSP105 α に対する CD4⁺CD45RO⁺ T 細胞の自己反応性 T 細胞の検討では、健常対照群においては SI が 2 以上の増殖反応は認められなかったが、MS 群においては 9 名中 3 名に SI が 2 以上の増殖応答が認められた。以上のことより、HSP105 が MS の新規自己抗原である可能性が示唆された。

疾患感受性・抵抗性遺伝子の検討においては、今年度、制限酵素を用いた PCR-RFLP 解析などにより Interleukin (IL)-1 β 、IL-1 receptor antagonist (ra)、Tumor necrosis factor (TNF)- β 遺伝子多型について解析を行った。しかしながら、今回の検討では、対照群と MS 群で多型分布に有意差は認めず、臨床経過や発症年齢などについても有意な相違は認められなかった。

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、そのエピソード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、免疫遺伝学的に、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. SEREX 法による候補自己抗原の同定：前年度、作成したヒト脊髄 cDNA 発現ライブラリーを用い 8 例の OS-MS 患者血清を SEREX 法

にてスクリーニングを行った。1名の患者血清につき、 $5\sim 10\times 10^5$ 個のファージをスクリーニングし、11個の陽性クローンを得て、塩基配列の決定後、最終的に5つの異なる候補自己抗原 (Rabaptin-5, Heat shock protein 105, NSD1, KIAA1640, KIAA0610) が同定された。

上記の候補自己抗原のうち、heat shock protein 105 α (HSP105 α) 並びに Rabaptin-5 の合成蛋白を作成し、ELISA 法にて血清中 IgG 抗体測定を行った。対象は、健常対照群 66名 (平均年齢 46.8歳、男:女=15:51)、OS-MS 患者 35名 (平均年齢 44.3歳、男:女=1:4)、C-MS 患者 34名 (平均年齢 37.1歳、男:女=12:22)。患者血清を 50倍希釈し、二次抗体に抗ヒト IgG を 2000倍希釈したものをを用いて、O.D.450nm にて測定し、健常群の平均+ 2SD 以上を陽性とした。髄液における抗体測定は、神経変性疾患患者髄液 27検体 (対照群 10名、MS 患者 17名) をコントロールとし、OS-MS 患者 21名、C-MS 患者 21名の髄液を用い検討した。また、HSP105 に関しては、自己反応性 T 細胞の検討も行った。

II. 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、Interleukin (IL)-1 β 、IL-1ra、Tumor necrosis factor (TNF)- β 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 94-98名、健常群 104名で、末梢血より得

られた DNA にて解析を行った。① IL-1 β に関しては制限酵素 Taq I を用い、エクソン 5 に存在する C (allele 1) \rightarrow T (allele 2) の多型を検出し、② IL-1ra に関してはイントロン 2 に含まれ、86塩基対よりなる VNTR (variable number of tandem repeat) のリピート数の検討を行った (allele1: 4 repeats, allele2: 2 repeats, allele3: 5 repeats, allele4: 3 repeats, allele5: 6 repeats)。③ TNF- β に関しては制限酵素 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 などとの相関を検討した。

III. 動物モデルの作成 ; OS-MS の動物モデルの作製のため、疾患感受性遺伝子である DP5 (DPA1*02022/DPB1*0501) 遺伝子のトランスジェニックマウスを作製する。

(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

I. SEREX 法による自己抗原同定

OS-MS 患者 8名の血清をスクリーニングすることにより、11個の陽性クローンを得た。このうち、9個はオーバーラップしたクローンであり、最終的に5つの異なる遺伝子 (Rabaptin-5, HSP105, NSD1,

KIAA1640, KIAA0610) が同定された。

i) ELISA による抗体測定

Rabaptin-5 融合蛋白 (N 末より 235AA を欠く、全体の 73% を占める GST 融合蛋白) を作成し、血清・髄液での IgG 抗体測定を行ったが、対照群と MS 並びに各病型において有意差は認められなかった。

HSP105 α 蛋白に対する血清中抗 IgG 抗体の測定では、健常対照群 (陽性率 3.0%) に比べ、全 MS (14.5%) 並びに OS-MS (14.9%)、C-MS (14.7%) にて陽性率は有意に上昇していた (全 MS: $p=0.0193$, OS-MS: $P=0.0341$, C-MS: $p=0.0302$)。しかしながら OS-MS と C-MS では有意差は認められなかった。男女間での検討では、健常対照では男女間に有意差は認められないが、MS 患者では有意差 ($p=0.0350$) が認められ、陽性者は全例女性であった。髄液での検討では、陽性率では神経変性疾患群との間に MS 群で有意差は認められなかったが、O.D. 値を用いた Mann-Whitney U 検定において、OS-MS 群で有意な上昇が認められた ($p=0.04$)。

ii) HSP105 α に対する自己反応性 T 細胞応答

健常対照群 5 名、MS 患者群 9 名において HSP105 α に対する CD4⁺CD45RO⁺T 細胞の自己反応性 T 細胞の検討では、健常対照群においては SI が 2 以上の増殖反応は認められなかったが、MS 群においては 9

名中 3 名に SI が 2 以上の増殖応答が認められた。

II. 疾患感受性・抵抗性遺伝子の検索

① IL-1 β 遺伝子多型: C-MS 患者 98 例および健常対照者 104 例で、制限酵素 Taq I にて PCR-RFLP 解析を行い、allele1(C)、allele2(T) を得て、患者-対照間で比較検討を行った結果、MS 群と対象間に有意差は認められなかった。発症年齢、病型、重症度と IL-1 β 遺伝子多型との間に有意な相関は認められなかった。

② IL-1ra 遺伝子多型: C-MS 患者 98 例および健常対照者 104 例でイントロン 2 に存在する VNTR のリピート数の検討を行った結果、MS と対象間で有意差は認められなかった。発症年齢、病型、重症度と IL-1ra 遺伝子多型との間に有意な相関は認められなかった。

③ TNF- β 遺伝子多型: C-MS 患者 94 例および健常対照群 104 例で、制限酵素 Nco I を用いて PCR-RFLP 解析を行った結果、MS と対象間で有意差は認められなかった。さらに、経過、発症年齢などの臨床データにおける検討も行ったが、有意な相関は示さなかった。

III. 動物モデルの作成

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 HLA-DP5(DPA1*02022/DPB1*0501) 遺伝子のクローニングを行った。プロモーターとしてマウス・インバリアント鎖プロモーターを用いることと

し、Dr. Mathis より pDOI-6 ベクターを得た。pDOI-6 ベクターの Cla I サイトにそれぞれの遺伝子をライゲーションすることによりコンストラクトを作成しえた。現在、マウス胚へのマイクロインジェクションを行っている。

D. 考察

I. SEREX 法による自己抗原同定

SEREX 法にて 5 種類の OS-MS の候補抗原が同定された。HSP105 は、 α と β の 2 種類が存在し、105kDa の HSP105 α の一部がスプライスアウトした 90kDa の蛋白が HSP105 β である。マウスにおける HSP105 の発現は、中枢神経系での発現が非常に多く、in vitro においてはニューロン、ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに常に発現が認められ、熱ストレスにより著明に発現が増大する。ヒトにおいても、多くの組織で発現が認められるが、脳や精巣、肺、大腸粘膜に強い発現が認められる (<http://www.kazusa.or.jp/>)。

今回、HSP105 α における血清中 IgG 抗体測定を行い、健常対照群に対して MS 並びに OS-MS、C-MS 群で有意な上昇が認められたが、OS-MS と C-MS の間では有意な差は認められなかった。抗体陽性率は MS 患者並びに 2 病型ではおよそ 15% 程度である (女性の MS 患者では、抗体陽性率は 20% であった)。この抗 HSP105 α 抗体陽性率の性差は、女

性の有病率の高い MS の病態に何らかの関連があるのかもしれない。また、HSP105 α に対する自己反応性 T 細胞応答についても MS 群において反応性の亢進が示された。これらのことより HSP105 が MS の新規自己抗原であることが示唆された。

今後更に、HSP105 と MS の病態との関連を検討していくと共に、その他の候補自己抗原として同定された、転写調節因子である NSD1 や 2 種類の EST (KIAA1640, KIAA-0610) においても、MS 病態との関連を検討していく予定である。

II. 疾患感受性・抵抗性遺伝子の検索

IL-1 は MS 病巣におけるマクロファージやミクログリアでの発現が高いことなどから、MS の病態に深く関与すると考えられる。Taq I により識別される IL-1 β 遺伝子の exon 5 に存在する多型は、IL-1 β 産生に影響を及ぼすことが知られている。IL-1ra は IL-1 の作用を阻害することにより、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における重症度を改善させたり、MS の増悪期に血清中の IL-1ra が上昇することが知られている。また、IL-1ra 遺伝子の intron 2 に存在する多型は、in vitro において IL-1ra や IL-1 α の産生に影響を及ぼすことが知られている。これらのことから、MS 患者における IL-1 β 、IL-1ra 遺伝子多型の検討を行ったが、いずれも MS、並びに病型や発症年齢などと有意な相関は認められなかった。

MS を含む各種自己免疫疾患では、HLA 多型との相関が報告されている。TNF- β 遺伝子の遺伝子座は HLA 領域に近接していることから、連鎖不均衡により TNF- β 遺伝子多型と各種自己免疫疾患との相関が予想されるが、現在までのところ、HLA との相関以上の関連は認められていない。今回の検討においても、TNFB1、TNFB2 の各々の頻度は、MS 群と対照群において有意な相関は認められず、臨床経過や発症年齢などとも有意な相関は認められなかった。

Ⅲ. 動物モデルの作成

OS-MS の疾患感受性遺伝子である HLA-DP5 (DPA1*02022/DPB1*0501) のトランスジェニックマウスを作成するためのコンストラクトは完成した。DP5-Tg マウスが完成した場合、これまで報告されている自己抗原や現在検索されている新規自己抗原を免疫することにより、EAE を誘導し、その病巣分布・病型について検討していきたい。

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 8 名の血清より 5 つの候補抗原が同定できた。このうち HSP105 は MS の新規自己抗原の可能性が示唆された。今後、HSP105 と MS の病態との関連を検討し、さらに他の候補抗原の OS-MS との関連性を検討する。疾患感受性遺伝子

の検索では、今年度解析した IL-1 β 、IL-1ra、TNF- β はいずれも MS、並びに病型や発症年齢などとは有意な相関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. Matsumoto S, Ohyagi Y, Inoue I, Oishi A, Goto H, Nakagawa T, Yamada T, Kira J. Periodic alternating nystagmus in a patient with MS. *Neurology* 56: 276-277, 2001
2. Osoegawa M, Matsumoto S, Ochi H, Ishiwata K, Nakamura-Uchiyama F, Nawa Y, Yamasaki K, Horiuchi I, Ohyagi Y, Kira J. Localised myelitis caused by visceral larva migrans due to *Ascaris suum* masquerading as an isolated spinal cord tumor. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70: 265-266, 2001
3. 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 hyperIgEemia and mite antigen specific IgE (atopic myelitis) manifest eosinophilic inflammation. *J Neurol Sci* 183:

- 73-78, 2001
4. 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
 5. Minohara M, Ochi H, Matsushita S, Irie A, Nishimura Y, Kira J. Differences between T-cell reactivities to major myelin protein-derived peptides in opticospinal and conventional forms of multiple sclerosis and healthy controls. *Tissue Antigens* 57: 447-456, 2001
 6. Kira J, Horiuchi I, Suzuki J, Osoegawa M, Tobimatsu S, Murai H, Minohara M, Furue M. HTLV-1 Myelitis associated with atopic disorders in Japan: a retrospective clinical study of the past 20 years. *Intern Med* 40: 613-619, 2001
 7. Ochi H, Wu X-M, Osoegawa M, Horiuchi I, Minohara M, Murai H, Ohyagi Y, Furuya H, Kira J. Tc1/Tc2 and Th1/Th2 balance in Asian and Western types of multiple sclerosis, HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and hyperIgEaemic myelitis. *J Neuroimmunol* 119: 297-305, 2001
 8. Horiuchi I, Ochi H, Murai H, Osoegawa M, Minohara M, Furuya H, Kira J. Th2 shift in mononeuritis multiplex and increase of Th2 cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: an intracellular cytokine analysis. *J Neurol Sci* 193: 49-52, 2001
 9. Kira J, Osoegawa M, Horiuchi I, Murai H, Minohara M, Ohyagi Y, Furuya H, Tobimatsu S, Ochi H. History of allergic disorders in common neurologic diseases in Japanese patients. *Acta Neurol Scand* (in press)
 10. Kira J. Atopy and neural damage. *Intern Med* (in press)
2. 学会発表
- 1) 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）2001, 2月
 - 2) 越智博文、三野原元澄、小副川学、村井弘之、吉良潤一；アトピー性脊髄炎と多発性硬化症における黄色ブドウ球菌エンテロトキシン特異的 IgE 抗体の検討：第13回 日本神経免疫学会・学術集会（東

- 京) 2001, 2月
- 3) 越智博文、三野原元澄、小副川学、村井弘之、吉良潤一；アトピー性脊髄炎と多発性硬化症における黄色ブドウ球菌エンテロトキシン特異的 IgE 抗体の検討：第 42 会日本神経学会総会（東京）2001, 5月
 - 4) 吳曉牧、梅風君、越智博文、吉良潤一；炎症性中枢神経疾患での IL-5, IL-13 の検討：第 42 会日本神経学会総会（東京）2001, 5月
 - 5) Minohara M, Nishimura Y, Matsushita S, Kira J. Differences between T cell reactivities to major myelin protein-derived peptides in optico-spinal and conventional forms of MS and healthy controls. The XVII World Congress of Neurology, London, June 2001.
 - 6) Ochi H, Osoegawa M, Kira J. Cytokine profiles in optico-spinal and conventional types of multiple sclerosis (MS), HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) and hyperIgEaemic myelitis. 6th international Congress, Edinburgh, Sep. 2001.
 - 7) 三野原元澄、朴華、堀内泉、小副川学、越智博文、村井弘之、西村泰治、吉良潤一；視神経脊髄型多発性硬化症の新規自己抗原の検索：第 14 回 日本神経免疫学会・学術集会（東京）2002, 2月
 - 8) 梅風君、越智博文、小副川学、張昆南、堀内泉、三野原元澄、村井弘之、吉良潤一；Interferon beta-1b 投与による多発性硬化症での末梢血サイトカイン産生の変化：第 14 回 日本神経免疫学会・学術集会（東京）2002, 2月
 - 9) 堀内泉、荒木令江、戸田年総、越智博文、村井弘之、佐谷秀行、吉良潤一；各種神経疾患における二次元免疫プロッティング法による抗原同定の試み：第 14 回 日本神経免疫学会・学術集会（東京）2002, 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 (OS-MS) が高率に認められ、通常型 MS (C-MS) と混在した状態にある。我々は日本人における C-MS の疾患感受性遺伝子が DRB1*1501 アリルであり、OS-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 OS-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。また、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り、OS-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考えられる。

我々は SEREX 法にて OS-MS の責任自己抗原の検索を可能とするため、前年度、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成した。このヒト脊髄 cDNA 発現ライブラリーを用いて OS-MS 患者血清を SEREX 法にてスクリーニングすることによって同定された候補自己抗原 (Rabaptin-5, HSP105, NSD1, KIAA1640, KIAA0610) は、その抗原性を検討するために蛋白の作成、精製が必要である。このため今年度は、同定された候補自己抗原の内、Rabaptin-5, HSP105 α 蛋白のそれぞれの合成蛋白を作成した。今後も他の候補自己抗原の NSD1 や 2 種類の EST(KIAA1640, KIAA0610) の全長の解明、並びに蛋白作成を行っていく。

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⁺T 細胞が大きな役割を担っていると考えられている。視神経脊髄型 MS (OS-MS) の疾患感受性遺伝子は DPB1*0501 遺伝子であり、通常型 MS (C-MS) では欧米白人と同様に DRB1*1501 遺伝子であることが示され、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。我々は、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、OS-MS では MOG に、C-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 OS-MS と C-MS では異なっていることを報告している。中枢神経系における HLA-クラス II 分子を発現しうるミクログリアは、通常 HLA-DR 分子のみを発現しており、IFN- γ 処理などにより HLA-DQ, -DP の発現が認められる。このことは、OS-MS の疾患感受性遺伝子であ

る HLA-DPB1*0501 が、MS の発症後に発現量が増し抗原提示することで、エピトープの拡大に影響を及ぼすことが考えられる。以上のことより、OS-MS の病型は、視神経や脊髄に特異的に発現する責任自己抗原が存在し、これが疾患感受性を示す HLA-DP5 分子により抗原提示されることで形成されるものと考えられる。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 発現ライブラリーを前年度作成した。このヒト脊髄 cDNA 発現ライブラリーを用いて OS-MS 患者血清を SEREX 法にてスクリーニングすることによって同定された候補自己抗原 (Rabaptin-5, HSP105, NSD1, KIAA1640, KIAA0610) は、その抗原性を検討するために蛋白の作成、精製を行う必要がある。

B. 研究方法

ヒト脊髄 cDNA 発現ライブラリーを用いて OS-MS 患者血清を SEREX 法にてスクリーニングすることによって同定された候補自己抗原 (Rabaptin-5, HSP105, NSD1, KIAA1640, KIAA0610) の内、Rabaptin-5, HSP105 の合成蛋白を作成する。

1) GST-Rabaptin-5 融合蛋白 ; 陽性クローン NK12-1 より in vivo excision 後の pBS-NK12-1 を用い sense; 5'-CAGTCGACATGTATGTAG-CTG-3', antisense; 5'-GTGCG-GCCGCTCATGTCTCAG-3' のプライマ

ーにて PCR 増幅を行い、TA クローニングを行った (Invitrogen, pcDNA3.1)。得られた pcDNA3.1-Rabaptin-5 を制限酵素 Sal I, Not I で切断し、同じ Sal I, Not I にて切断した pGEX-4T-3 (Amersham pharmacia biotech)へ、ベクターライゲーションを行った。pGEX-Rabaptin-5 を大腸菌に transform し、IPTG (final 1mM)にて蛋白発現を誘導し、Sonication 後の上清を Glutathione Sepharose 4B (Amersham pharmacia biotech)を用いて精製した。精製した GST-Rabaptin-5 蛋白は、抗 GST 抗体を用いたウェスタンブロッティング法にて確認した。

2) His-HSP105 α 蛋白; 京都薬科大学、畑山先生より提供された pTrcHis105h を大腸菌に transform し IPTG(final 0.5mM)にて蛋白発現を誘導し、Sonication 後の上清をニッケルカラムを用いて HSP105 α 蛋白を精製した。更にゲルろ過カラムを用いた HPLC にて精製を行った。精製された HSP105 α 蛋白は抗 HSP105 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いたウェスタンブロッティング法にて確認した。

C. 研究結果

OS-MS 患者血清を用いた SEREX 法にて同定された候補自己抗原 5 つの内、Rabaptin-5, HSP105 α の合成蛋白を、上記方法にて作成、精製し得た。GST-Rabaptin-5 融合蛋白は、

Rabaptin-5 蛋白の N 末より 235 アミノ酸を欠く、全体の 73%を占める GST 融合蛋白であり、全体で 639 アミノ酸からなる 102kDa の蛋白質である。一方、HSP105 α 合成蛋白は、全長を網羅している。

D. 考察

今回作成した Rabaptin-5 蛋白は、826 アミノ酸よりなる coiled-coil ドメインをもつ蛋白であり、小胞輸送に関して調節性の働きを持つことが知られている。また、HSP105 蛋白は α と β の 2 種類が存在し、105kDa の HSP105 α の一部がスプライスアウトした 90kDa の蛋白が HSP105 β である。マウスにおける HSP105 の発現は、中枢神経系での発現が非常に多く、in vitro においてはニューロン、ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに常に発現が認められ、熱ストレスにより著明に発現が増大する。ヒトにおいても、多くの組織で発現が認められるが、脳や精巣、肺、大腸粘膜に強い発現が認められる (<http://www.kazusa.or.jp/>)。

今回、Rabaptin-5, HSP105 α の合成蛋白を作成、精製を行った。今後この合成蛋白を ELISA 法や自己反応性 T 細胞応答の検討、ウェスタンブロッティングなどに用いることが可能である。現在、他に同定されている、NSD1 と 2 種類の EST(KIAA1640, KIAA0610)について、全長を網羅する cDNA の単離を行っている。

E. 結論

OS-MS 患者血清を用いた SEREX 法にて同定された候補自己抗原 5 つの内、Rabaptin-5, HSP105 α の合成蛋白を、作成、精製し得た。今後、他に同定されている、NSD1 と 2 種類の EST(KIAA1640, KIAA0610)について、全長を網羅する cDNA の単離、並びに蛋白作成を行っていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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 pancreatitis. *Biochem Biophys Res Comm* 280:1169-1176, 2001
2. Nakatsura T, Senju S, Yamada K, Jyotsuka T, Ogawa M, Nishimura Y. Gene cloning of immunogenic antigens over-expressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Comm* 281: 936-944, 2001
3. Yamada K, Senju S, Shinohara T, Nakatsura T, Murata Y, Ishihara M, Nakamura S, Ohno S, Negi A, Nishimura Y. Humoral immune response directed against LED-GF in patients with VKH.

Immunol Letters 78: 161-168, 2001

4. Nakatsura T, Senju S, Ito M, Nishimura Y*, Itoh K.* (*equal contribution). Cellular and Humoral Immune Responses to A Human Pancreatic Cancer Antigen, CLP, Originally Defined by the SEREX Method *Eur J Immunol* (in press)

2. 学会発表

1. Nishimura Y; Identification of autoantigens associated with Vogt-Koyanagi-Harada disease by immunoscreening of a uveal cDNA expression library, Vogt-Koyanagi-Harada Syndrome second international workshop. (千葉), 2001年6月
2. 西村泰治; Degeneracy in recognition of antigenic peptides by human CD4⁺ T cell clones; it's possible implications to clinical medicine: 感染研学会シンポジウム「第1回 MHC と疾患セミナー」国立感染症研究所 (東京), 2001年8月
3. 中面哲也, 七条茂樹, 伊藤雅昭, 千住覚, 小川道雄, 伊東恭悟, 西村泰治; SEREX 法にて同定した膵癌抗原 KM-PA-2 由来ペプチドに対する細胞性および液性免疫の解析: 第60回日本癌学会 (横浜), 2001年9月
4. 西村泰治, 植村靖史, 藤井慎嗣,

- 田畑博己, 千住 覚; I 型糖尿病患者より樹立した HLA-DR53 拘束性 GAD65 自己反応性 T 細胞により交差認識される多様なエピトープの解析: 日本人類遺伝学会第 46 回大会(埼玉県大宮市), 2001 年 10 月
5. 西村泰治; T 細胞クローンが認識する抗原ペプチドの多様性と自己免疫現象: 第 51 回日本アレルギー学会シンポジウム (福岡市), 2001 年 10 月
 6. 西村泰治; HLA クラス II 多型と自己免疫疾患: 第 10 回日本組織適合性学会, シンポジウム「多因子疾患の遺伝要因としての HLA」(福岡市), 2001 年 11 月
 7. 千住覚, 山田和博, 篠原利通, 村田恭啓, 中面哲也, 石原麻美, 中村聡, 大野重昭, 谷原秀信, 根本昭, 西村泰治; Vogt-小柳-原田病に関連する自己抗原の解析: 第 10 回日本組織適合性学会 (福岡), 2001 年 11 月
 8. 植村靖史, 藤井慎嗣, 千住覚, 田畑博己, 西村泰治; HLA 遺伝子の多型による IDDM への疾患感受性の決定機序の解析: CLIP 置換型 インバリアント鎖遺伝子を用いた GAD65 自己反応性 TCR リガンドの多様性の解析: 第 10 回日本組織適合性学会(福岡), 2001 年 11 月
 9. 中面哲也, 千住覚, 伊藤雅昭, 西村泰治, 伊東恭悟; SEREX 法により同定した膵癌抗原 Coactosin-like protein(CLP) に対する細胞性および液性免疫の解析: 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 2001 年 12 月
 10. 植村靖史, 千住覚, 田畑博己, 藤井慎嗣, 西村泰治; CLIP 置換型 インバリアント鎖遺伝子を用いた GAD65 自己反応性 TCR リガンドの多様性の解析: 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 2001 年 12 月 11~13 日
- 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・副院長

研究要旨

多発性硬化症 (MS) は、複数の遺伝的要因と後天的要因との相互作用によって発症に至る、多因子疾患あるいは複合疾患であると考えられている。現在、MS における遺伝的要因については、HLA 領域との連鎖を証明したのみで、他の遺伝的要因については確たる検討がされていない。多因子疾患である MS では、遺伝的因子についてもいくつかあることが推測され、また、遺伝子多型については、民族間において相違を示すことが考えられる。これらのことから、MS 患者及び健常者から得た DNA を用い、case-control study により日本人における各種遺伝子多型を検討した。

前年度、ビタミン D 受容体遺伝子 (VDRG)、エストロゲン受容体遺伝子 (ERG)、heat shock protein 70 (HSP70) 遺伝子等の多型を、制限酵素を用いた PCR-RFLP 解析を行った。その結果、VDRG 多型と MS との検討で、欧米に比べ日本人で少ないといわれている A allele を有する頻度が対照群と比較して MS 群で有意に高率であることを報告した。VDRG 多型と HLA 多型との相関では、DPB1*0501 を有する患者—対照群において、A allele を有する MS 患者群は、A allele を有さない MS 患者群あるいは A allele を有する対照群より有意に高率であった。ERG の検討では、Pvu II 多型において、MS 患者群で P allele の割合が control 群に比し有意に高かった。一方、ERG の Xba I 多型においては、患者—対照群で genotype および allele frequency に有意な差は認めなかったものの、MS の発症年齢の検討で、Xx の genotype を有する群が、他の XX あるいは xx genotype を有する群よりも若年発症の傾向が認められた。HSP-70 遺伝子多型の検討では、genotype 及び allele frequency の割合に、MS 患者—健常対照者に差は認められなかった。さらに、MS 患者群において、臨床像、経過および MRI 所見と HSP70 遺伝子多型との間に関連は認められなかった。

今年度はさらに、interleukin (IL)-1 β 、IL-1 receptor antagonist (ra)、tumor necrosis factor (TNF)- β 遺伝子多型について解析を行った。しかしながら、今回の検討では、対照群と MS 群で多型分布に有意差は認めず、臨床経過や発症年齢などについても有意な相違は認められなかった。

A. 研究目的

多発性硬化症 (MS) は、複数の遺伝的要因と後天的要因との相互作用によって発症に至る、多因子疾患あるいは複合疾患であると考えられている。現在、MS における遺伝的要因については、HLA 領域との連鎖を証明したのみで、他の遺伝的要因については確たる検討がされていない。多因子疾患である MS では、遺伝的因子についてもいくつかあることが推測され、また、遺伝子多型については、民族間において相違を示すことが考えられる。これらのことから、MS 患者及び健常者から得た DNA を用い、case-control study により日本人における各種遺伝子多型の検討を行った。

B. 研究方法

MS 患者並びに健常者において、interleukin (IL)-1 β 、IL-1 receptor antagonist (ra)、tumor necrosis factor (TNF)- β 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通常型 MS (C-MS) 患者 94-98 名、健常群 104 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。IL-1 β に関しては制限酵素 Taq I を用い、exon 5 に存在する C (allele 1) \rightarrow T (allele 2) の多型を検出し、IL-1ra に関しては intron 2 に含まれ、86 塩基対よりなる VNTR (variable number of tandem repeat) のリピート数の検討を行った (allele 1: 4 repeats, allele 2: 2

repeats, allele 3: 5 repeats, allele 4: 3 repeats, allele 5: 6 repeats)。TNF- β に関しては制限酵素 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 genotype 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文書にて取得した上で行う。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

①IL-1 β 遺伝子多型：C-MS 患者 98 例および健常対照者 104 例で、制限酵素 Taq I にて PCR-RFLP 解析を行い、allele 1 (C)、allele 2 (T) を得て、患者—対照間で比較検討を行った結果、allele frequency では、MS 群で allele 1: 88.8%、allele 2: 11.2% に対し、対照群では allele 1: 83.7%、allele 2: 13.5% と有意差は認められなかった。また genotype frequency においても、MS 群で 1/1: 77.6%、1/2: 22.4%、2/2: 0% に対し、対照群では 1/1: 85.6%、1/2: 14.4%、2/2: 0% であり有意差は認められなかった。発症年齢、病型、重症度と IL-1 β 遺伝子多型との間に有意な相関は認められなかった。

②IL-1ra 遺伝子多型：C-MS 患者 98 例および健常対照者 104 例で intron 2 に存在する VNTR のリピート数の検討を行った結果、allele frequency では、MS 群で allele 1: 95.4%、allele 2: 3.1%、

allele 3: 0.5%、allele 4: 1.0%に対し、対照群では allele 1: 91.8%、allele 2: 6.7%、allele 3: 1.0%、allele 4: 0.5%であり有意差は認められなかった。また genotype frequency においても、MS 群で 1/1: 90.8%、1/2: 6.1%、1/3: 1.0%、1/4: 2.0%に対し、対照群では 1/1: 83.7%、1/2: 13.5%、1/3: 1.9%、1/4: 1.0%であり有意差は認められなかった。発症年齢、病型、重症度と IL-1ra 遺伝子多型との間に有意な相関は認められなかった。

③TNF- β 遺伝子多型：C-MS 患者 94 例および健常対照群 104 例で、制限酵素 Nco I を用いて PCR-RFLP 解析を行った結果、allele frequency では、MS 群で TNFB1: 69%、TNFB2: 31%に対し、対照群では TNFB1: 66%、TNFB2: 34%と有意差は認められなかった。また genotype frequency においても、MS 群で 1/1: 43.3%、1/2: 51%、2/2: 5.7%に対し、対照群では 1/1: 41.5%、1/2: 50%、2/2: 8.5%であり有意差は認められなかった。さらに、経過、発症年齢などの臨床データにおける検討も行ったが、有意な相関は示さなかった。

D. 考察

①IL-1 β 遺伝子多型：IL-1 は MS 病巣におけるマクロファージやミクログリアでの発現が高いことなどから、MS の病態に深く関与すると考えられ、Taq I により識別される IL-1 β 遺伝子の exon 5 に存在する多型は、IL-1 β 産生に影響を及ぼすことが知られてい

る。しかしながら、今回の検討では MS との相関は認められなかった。

②IL-1ra 遺伝子多型：IL-1ra は IL-1 の作用を阻害することにより、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における重症度を改善させ、MS の増悪期に血清中の IL-1ra が上昇することが知られている。また、IL-1ra 遺伝子の intron 2 に存在する多型は、in vitro において IL-1ra や IL-1 α の産生に影響を及ぼすことが知られている。これまでの報告では、この部位の多型では、allele 2 と MS、allele 2 と病型との間に相関が認められるとするものもあるが、否定的な報告もなされている。今回の日本人 MS における検討では、各 allele と MS、並びに病型や発症年齢などと有意な相関は認められず、関連性は低いと考えられた。

③TNF- β 遺伝子多型：MS を含む各種自己免疫疾患では、HLA 多型との相関が報告されている。TNF- β 遺伝子の遺伝子座は HLA 領域に近接していることから、連鎖不均衡により TNF- β 遺伝子多型と各種自己免疫疾患との相関が予想されるが、現在までのところ、HLA との相関以上の関連は認められていない。今回の検討においても、TNFB1、TNFB2 の各々の頻度は、MS 群と対照群において有意な相関は認められず、臨床経過や発症年齢などとも有意な相関は認められなかった。

今後も MS の発症及び経過等に深く関与していると考えられるものを中心に、遺伝子多型等を case-control

study にて解析することにより、MS への遺伝的要因の関与に迫っていく。また、欧米と日本の MS における遺伝的要因の違いも検討し、欧米と比べ日本の発症率が低いといわれていることや、日本に比較的多い病型等に関する遺伝的関与の検討も示唆されるものがあるかもしれない。この研究を通して、近い将来、疾患感受性遺伝子の同定が病態の本質的理解、drug design、発症予防などに応用できる可能性があり、MS の遺伝的関与を考えていく上で大変重要な研究と思われ、継続して検討していく予定である。

E. 結論

今年度、IL-1 β 、IL-1ra、TNF- β 遺伝子多型解析を行い、いずれの多型も MS 群と対照群で有意差は認められず、臨床症状との検討においても有意な相関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. Niino M, Iwabuchi K, Kikuchi S, Ato M, Morohashi T, Ogata A, Tashiro K, Onoé K. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in C5-7BL/6 mice by an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *J Neuroimmunol* 116: 40-48, 2001.
2. Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T,

Yabe I, Sasaki H, Tashiro K. Genetic polymorphisms of IL-1 β and IL-1 receptor antagonist in association with multiple sclerosis in Japanese patients. *J Neuroimmunol* 118: 295-299, 2001.

3. Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Sasaki H, Tashiro K. Heat shock protein 70 gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 58: 93-96, 2001.

2. 学会発表

1. 新野正明, 緒方昭彦, 菊地誠志, 田代邦雄, 西平 順. 多発性硬化症及び神経ベーチェット病患者における髄液中の macrophage migration inhibitory factor (MIF) についての検討. 第 42 回日本神経学会総会, (東京), 2001.
2. 新野正明, 岩渕和也, 阿戸 学, 諸橋大樹, 小野江和則, 菊地誠志, 緒方昭彦, 田代邦雄. ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ 特異的リガンド, トログリタゾンによる実験的自己免疫性脳脊髄炎抑制. 第 31 回日本免疫学会総会, (大阪), 2001.
3. 奥水修一, 菊地誠志, 深澤俊行, 新野正明, 田代邦雄. 多発性硬化症における TNF- β 遺伝子多型についての検討. 第 14 回日本神経免疫学会, (東京), 2002.
4. 宮岸隆司, 新野正明, 深澤俊行, 菊地誠志, 濱田 毅, 田代邦雄. 北海道在住の MS における DRB1*1501, DPB1*0301, DPB1*05

01 の再検討. 第 14 回日本神経免疫学会, (東京), 2002.

5. 新野正明, 岩渕和也, 菊地誠志, 阿戸 学, 諸橋大樹, 緒方昭彦, 小野江和則, 田代邦雄. ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ (PPAR- γ) 特異的リガンド, troglitazone による実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)抑制. 第 14 回日本神経免疫学会, (東京), 2002.
6. Niino M, Iwabuchi K, Kikuchi S, Ato S, Morohashi T, Ogata A, Tashiro K, Onoé K. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in C5-7BL/6 mice by an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . 126th Annual Meeting American Neurological Association, (Chicago), 2001