

多発性硬化症における中枢神経内免疫動態の多元的解析

分担研究者 齋田 孝彦
(国立療養所宇多野病院神経内科)

研究要旨

多発性硬化症 (MS) では、炎症病巣の形成にケモカインが重要な役割を果たしており、ケモカイン受容体のうち CCR5 と CXCR3 は Th1 細胞に、CCR3 と CCR4 は Th2 細胞に発現されていることから、MS 疾患活動性のモニタリング手段として利用できる可能性がある。そこで、再発・寛解型 MS28 例 (女性 19 名、男性 9 名) について、互いに独立した活動期 (n=27) および非活動期 (n=10) の計 37 回、髄液の解析を行った。その結果、活動期 MS 髄液の特徴は、髄液細胞数と IP-10 および CD25 陽性の活性化ヘルパー T 細胞の増加と、CD11a あるいは CXCR3 陽性の CD8 細胞の減少であることが判明した。さらに、活性化ヘルパー T 細胞は IFN- γ および IP-10 値と相関した。対照的に、CD11a あるいは CXCR3 陽性の CD8 細胞は、抗炎症性サイトカインである IL-4 値と相関した。

多発性硬化症における中枢神経内免疫動態の多元的解析

齋田 孝彦¹⁾ 松井 真 荒谷 信一 王 会雲

目 的

中枢神経系ミエリン抗原に対する自己免疫機序が想定されている多発性硬化症 (MS) では、近年、炎症性病変の形成にケモカインが重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。その中でも、IP-10, RANTES, MIP-1 α , MCP-1などのケモカインが注目されている。一方、ケモカインに対する受容体のうち、CCR5とCXCR3はTh1細胞に、CCR3とCCR4はTh2細胞に主として発現されていることが判明した。これらの成果は、従来よりIL-2、IFN- γ やTNF- α などの炎症性サイトカインが中枢神経組織 (CNS) 内での脱髄に関与していることが明らかにされているものの、病態形成に関わる要因として新たにケモカインやケモカイン受容体を考慮する必要があることを示唆している。実際にCNS内で進行しつつある病態を把握するためには、末梢血よりも病変部位に近い髄液サンプルの検討が必要であり、また、MSの治療手段の開発あるいは治療効果をモニタリングする上でより重要な情報を得ることができると考えられる。今回、MSにおける中枢神経内免疫動態の詳細を明らかにするため、髄液中の免疫効果物質としてのサイトカイン・ケモカインレベルの測定を行うとともに、髄液細胞におけるケモカイン受容体その他の機能関連表面抗原の発現も同時に検索した。

対 象

対象は再発・寛解型MS28例 (女性19名, 男性9名) で、互いに独立した活動期 (n=27) および非活動期 (n=10) の計37回、腰椎穿刺により得た髄液について下記項目を検査した。

方 法

a) 膜表面抗原の解析

1) Th1細胞の指標として知られるCCR5およびCXCR3、およびTh2細胞の指標として知られるCCR3とCCR4の4種のケモカイン受容体について、CD4およびCD8細胞における発現を検索した。また、IL-2受容体 (CD25) を発現した活性化ヘルパーT細胞、機能的に helper inducer T細胞として分類されるCD4+CD29+細胞、 suppressor inducer あるいは naive helper T細胞として位置づけられるCD4+CD45RA+細胞、さらに、CD11a陽性で細胞傷害性T細胞と考えられるCD8細胞や、CD11a陰性で抑制性の機能的リンパ球集団を含むとされるCD8細胞などの分画も検索対象とした。

2) 得られた髄液は、細胞数算定用の分を除いて、4℃下800rpmで8分間低速遠沈し髄液細胞を回収した。髄液細胞は染色1項目あたり50 μ lの2.5%FCS添加PBSに浮遊させ、以下のようなFITC/PE標識抗体の組み合わせにより二重染色を行った。CD4/CCR3, CCR4/CD4, CD4/CCR5, CD8/CCR5, CXCR3/CD4, CXCR3/CD8, CD4/CD25, CD4/CD29, CD8/CD11a。

各項目の二重染色はいずれも4℃で45分間行い、フローサイトメトリーにより蛍光陽性細胞を算定した。なお、細胞回収後の髄液は次項の検査に供した。

b) 液性免疫パラメータおよび免疫効果物質の測定

1) 髄液アルブミン・IgG値を血清と同時に測定し、IgG indexとTourtelotteらの報告した計算式によりCNS内IgG 1日産生量を算出した。

2) IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , RANTES, MCP-1, MIP-1 α , IP-10をELISAで測定した。

¹⁾ 国立療養所宇多野病院神経内科

結 果

- 1) 活動期 MS 髄液では、非活動期 MS 髄液に比して細胞数と IP-10 の増加が認められ、CD4 細胞特に CD25 陽性の活性化ヘルパー T 細胞の増加と、CXCR3 陽性 CD8 細胞の減少が特徴的であった (表)。
- 2) 髄液細胞数は IFN- γ と有意の相関を認めたが、他のサイトカイン・ケモカインとは相関を認めなかった。
- 3) IP-10 は、髄液 IgG レベルはもとより、中枢神経内 IgG1 日産生量とも有意の相関を示した。
- 4) CD4⁺CCR4⁺細胞は IFN- γ と正の相関を示した。Th1 とされる CD4⁺CCR5⁺細胞については、MCP-1 と負の相関が認められたが、CD4⁺CXCR3⁺細胞については有意の相関を示すサイトカイン・ケモカインは存在しなかった。他方、CD8⁺CXCR3⁺細胞は IL-4 と正の相関を示した。
- 5) CD4⁺CD25⁺活性化ヘルパー T 細胞は IFN- γ および IP-10 と相関を認めた。対照的に、CD11a 陽性の CD8 細胞は、IL-4 と正の相関を、MIP-1 α とは負の相関を認めた。

表 1：活動期 MS と非活動期 MS を識別する髄液免疫

パラメータ	(mean%)	
項 目	活動期 MS	非活動期 MS
細胞数 (/mm ³)	7.6	1.4
IP-10 (pg/ml)	1900	599
TNF- α (pg/ml)	9.5	27.4
CD4 (%)	67.6	56.2
CD4+CD25+ (%)	5.8	2.1
CD8+ (%)	22.8	31.7
CD8+CD11a+ (%)	15.5	22.6
CD8+CXCR3+ (%)	23.7	31.6

考察とまとめ

- (1) IP-10 は、従来全く指摘がされていない、MS の中枢神経内液性免疫異常と密接に関連している可能性が示唆された。
- (2) CD25 陽性活性化ヘルパー T 細胞は、炎症惹起性 Th1 サイトカインである IFN- γ はもとより、炎症性ケモカインと定義し得る IP-10 の髄液レベルと相関していること

から、MS における炎症病巣形成に重要な役割を果たしていると推定される。

(3) CD8 細胞の亜分画は、CD11a 陽性細胞集団 (従来は細胞傷害性 T 細胞と定義) でも、CXCR3 陽性細胞集団でも炎症抑制性サイトカインである IL-4 と相関しており、実際に免疫制御機能を担っている可能性を示唆している。この点を明らかにするためには、特に CD8⁺CXCR3⁺細胞分画について cell sorting 等の手技で enrich した後に、機能的解析を行うことが重要であると考えられた。

(4) CD4 細胞集団におけるケモカイン受容体発現と免疫効果物質との連関のうち、CD4⁺CCR5⁺Th1 細胞と MCP-1 の負の相関は、後者が Th2 シフトを誘導するとされる最近の報告に合致するものの、CD4⁺CCR4⁺細胞と Th1 サイトカインである IFN- γ との相関の意義については今後の検討が必要である。

(5) 活動期 MS 髄液で TNF- α が有意に低値を示した結果については、治療手段との関係を含めて再度の検討が必要であると考えられた。

文 献

- 1) 王 会雲, 他: 多発性硬化症患者におけるケモカイン受容体陽性細胞解析の意義. *Neuroimmunology* 8; 38-39, 2000.
- 2) 王 会雲, 他: 多発性硬化症患者における髄液中ケモカイン受容体陽性細胞とケモカインおよびサイトカインレベルとの関連について. *Neuroimmunology* 9; 52-53, 2001.
- 3) 松井 真, 他: 中枢性脱髄疾患とケモカイン/ケモカイン受容体. *Neuroimmunology* 9; 213-217, 2001.
- 4) Wang H-Y et al: Immunological disturbances in the central nervous system linked to MRI findings in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 2002 (in press).
- 5) 南木敏宏: MCP-1 による Th2 シフトの制御. *臨床免疫* 36; 594-599, 2001.

多発性硬化症患者の Tumor Necrosis Factor- α 3'-非翻訳領域 における遺伝子多型の検討

分担研究者 祖父江 元
(名古屋大学神経内科)

研究要旨

今回我々は炎症性サイトカインの1つである腫瘍壊死因子 tumor necrosis factor- α (TNF- α) の3'側の非翻訳領域(3'-UTR)に、AUUUA など、A と U の繰り返し配列からなる AU-rich element と呼ばれる mRNA の不安定化シグナル領域が存在することに着目し、この領域における一塩基多型を再発寛解型 MS 患者、非炎症性神経疾患患者、健常人とで比較検討した。その結果、症例数が少ないが MS に特異的な多型はみられなかった。

多発性硬化症患者の Tumor Necrosis Factor- α の 3'-非翻訳領域における遺伝子多型の検討

祖父江 元¹⁾ 朝倉 邦彦¹⁾²⁾ 河合 邦幸¹⁾ 犬飼 晃¹⁾ 大原義朗²⁾

目 的

ヒトゲノムプロジェクトによりヒトゲノムの全塩基配列が報告された。ヒトゲノムの 99.9%は各個人間で共通しており、残りの 0.1%が疾患感受性、環境因子などに対する反応性などの個人差を規定していると考えられている。最近ではこのヒトゲノムの全塩基配列決定をうけ、患者個人のゲノム情報をもとにしたオーダーメイドあるいはテーラーメイド医療の実現に向けて一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) の解析が盛んに行われている。多発性硬化症 (MS) は、複数の遺伝的要因と環境要因によって発症すると考えられており、MS でも他の疾患と同様に疾患感受性に関与する遺伝子の検索が行われている。

腫瘍壊死因子 tumor necrosis factor- α (TNF- α) は、各種自己免疫疾患で重要な役割をもつと考えられている炎症性サイトカインの 1 つであり、MS においてもその病態への関与が示唆されている。すでに TNF- α のプロモーター領域における多型が検討され、-376 における多型と MS 感受性との関連が示唆されている¹⁾。一方、3'側の TNF- α 3'-非翻訳領域 (3'-UTR) には、AUUUUA など、A と U の繰り返し配列からなる AU-rich element と呼ばれる領域が存在する。この AU-rich element は他のサイトカインや増殖因子等の 3'-UTR にも存在し、mRNA の不安定化シグナルとして知られている^{2) 3)}。今回、我々は TNF- α 3'-UTR とくに AU-rich element の多型を MS 患者と非炎症性神経疾患患者とで比較検討した。

方 法

再発寛解型 MS 30 例、非炎症性神経疾患 30 例、健常人 15 例の末梢血白血球より DNA を分離し、T7 プロモーター配列を含んだ TNF- α 3'-UTR 特異的なプライマーを用いて TNF- α 3'-UTR を増幅した後、Non-Isotopic RNase Cleavage Assay (NIRCA) 法により多型の検出

を行った。即ち、T7 プロモーター配列を含んだ PCR 産物を、T7 RNA ポリメラーゼにより転写を行い、RNase を用いてヘテロ接合体のミスマッチ部分の 1 本鎖 RNA のみを切断することにより多型を検出を試みた。この NIRCA 法では通常ヘテロ接合体における多型しか検出できない。本研究では、ホモ接合体における多型検出のため、既知の野性型 (wild-type) の PCR 産物を加えて人為的にヘテロ接合体を形成させて、ホモ接合体多型の検出もあわせて行った。

結 果

再発寛解型 MS におけるヘテロ接合体多型の頻度は 1 例 / 30 例 (図 1)、ホモ接合体多型の頻度は 0 例 / 30 例、非炎症性神経疾患対照群におけるヘテロ接合体多型の頻度は 1 例 / 30 例 (図 1)、ホモ接合体多型の頻度は 0 例 / 30 例であった。健常対照群ではヘテロ接合体多型、ホモ接合体多型はともに 15 例中 1 例も認められなかった (図 1)。ヘテロ接合体多型を認めた PCR 産物の塩基配列を解析した結果、AU-rich element 内には多型は認められなかった。

考 察

今回の解析では、TNF- α 3'-UTR に多型は認められたが、症例数が少なく、MS と対照群の間での検討を行うには至らなかった。また、AU-rich element の中には多型は認められなかった。解析した症例総数が少なく、症例を蓄積し解析を継続中である。

文 献

- 1) Fernandez-Arquero M., Arroyo R., Rubio A. et al. Primary association of a TNF gene polymorphism with susceptibility to multiple sclerosis. *Neurology* 53: 1361-1363, 1999
- 2) Hel Z., DiMarco S., Radzich D. Characterization of the RNA binding proteins forming complexes with a novel putative regulatory region in the 3'-UTR of TNF- α mRNA. *Nuc. Acid Res.* 26: 2803-2812, 1998

1) 名古屋大学医学部神経内科

2) 金沢医科大学微生物学

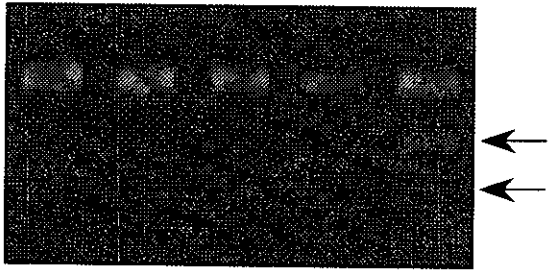
3) Kontoyiannis D., Pasparakis M., Pizarro T.T. et al. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: Implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 10: 387-398, 1999

図1 RNase Cleavage Assay

ヘテロ接合体の電気泳動パターン

各群5例ずつ代表的な泳動パターンを示す

a) 再発寛解型MS



矢印はRNaseで切断されたRNA断片を示す

b) 非炎症性神経疾患



矢印はRNaseで切断されたRNA断片を示す

c) 健常対照



RNaseで切断されたRNA断片は認めない

アストロサイト由来の免疫抑制因子による EAE の治療

分担研究者 田平 武

(国立療養所中部病院長寿医療研究センター)

研究要旨

多発性硬化症の脱髄巣において浸潤したT細胞の50~60%がアポトーシスを起こしている事が報告されている。我々は、アストロサイト由来の自己反応性 T 細胞にアポトーシスを誘導する因子として、SPARC/osteonectin と未知の遺伝子の G-7cDNA をクローニングした。G-7 蛋白は、実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)の脱髄巣、特に血管周囲の細胞浸潤が著明な部位において認められた。さらに CD4⁺T cell の細胞膜上に G-7 蛋白が付着している像が認められた。次に、G-7 発現レトロウイルスベクターを用いて EAE の治療を試みた。G-7 を発現する microglia cell line を腹腔投与し、C57BL/6 マウスに EAE を発症させると、有意に EAE の発症の遅延と症状の改善が認められた。G-7 蛋白は、免疫抑制剤として有効な治療法の開発に発展する可能性がある。

アストロサイト由来の免疫抑制因子による EAE の治療

原 英夫¹⁾²⁾、Gyorgy Fazekas²⁾、田平 武¹⁾

目 的

昨年度の班会議において、マウス・アストロサイト細胞株 G26-24 を用いて、インターフェロンガンマ処理と未処理の各 cDNA より subtracted cDNA ライブラリーを作成し、PLP 反応性 T 細胞にアポトーシスを誘導するアストロサイト由来の因子として、SPARC/osteonectin と未知の遺伝子の G-7cDNA をクローニングしたことを報告した。今回は、実験的アレルギー性脳脊髄炎(experimental allergic encephalomyelitis,EAE) の脱髄巣における G-7 蛋白の発現を免疫組織染色にて解析し、さらに G-7 発現レトロウイルスベクターを用いて EAE の治療を試みたので報告する。

方 法

1. SJL/J マウスに PLP ペプチドを免疫し EAE を発症させ、症状ピーク時の脳を用いて凍結切片を作成し、以下の各抗体を用いて免疫組織染色を行った。抗 CD4 抗体、抗 GFAP 抗体(アストロサイト)、microglia マーカー、抗 Mac-1 抗体 (マクローファージ)、抗 G-7 抗体。
2. G-7 cDNA をレトロウイルスベクターに組み込み、脳へ homing 機能を持つ C57BL/6J マウス由来の Ra2 microglia cell に導入した。G-7 発現 Ra2 microglia cell ; 1×10^6 cells, 2×10^6 cells を各 B6 マウス(1 群 3 匹)に腹腔投与し、2 日後 MOG ペプチドを同マウスに免疫し EAE を発症させ、発症日、EAE score の変動などを検討した。コントロールとして、mock レトロウイルスベクター導入 Ra2 microglia

cell を腹腔投与した B6 マウスと、細胞を投与しない B6 マウスに同様に EAE を発症させた。

結 果

1. SJL/J マウスに PLP ペプチドを免疫し EAE を発症させた脳を用いて、脱髄の強い炎症部位と、リンパ球浸潤が殆ど認められない非炎症部位を各抗体で染色し比較した。脱髄巣においては、CD4 陽性 T 細胞の浸潤、G-7 陽性細胞の増加、著明な microglia の活性化・増殖を認めた。一方、非炎症部位においては、G-7 発現細胞は殆ど認められず、microglia の活性化は起こっていなかった。アストロサイトの増殖と Mac-1 陽性細胞は、両部位において大きな変化は認められなかった。CD4 陽性 T 細胞膜上には、G-7 蛋白が結合している像が認められた。
2. G-7 発現レトロウイルスベクターを Ra2 microglia cell に導入し腹腔投与した B6 マウスでは、コントロールと比べ発症の遅延(コントロール: 10.7 ± 0.58 days, Ra2 群: 15.0 ± 2.83 days) と EAE スコアの改善(コントロール: 2.67 ± 1.67 , Ra2 群: 1.00 ± 0.82) が認められた。特に Cumulative clinical score の著明な改善(コントロール: 23.33 ± 6.11 , Ra2 群: 5.33 ± 7.57) が認められた。

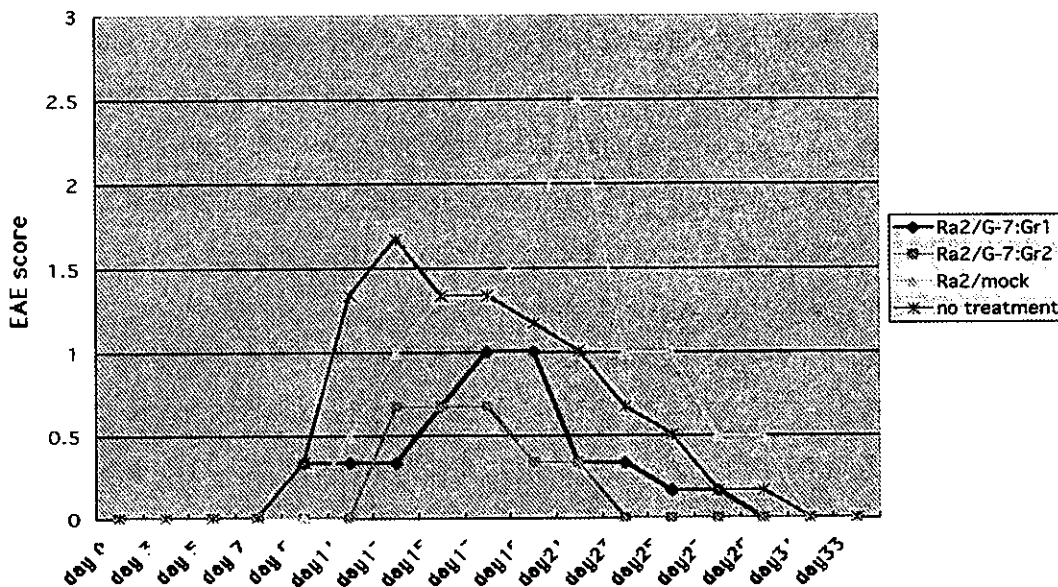
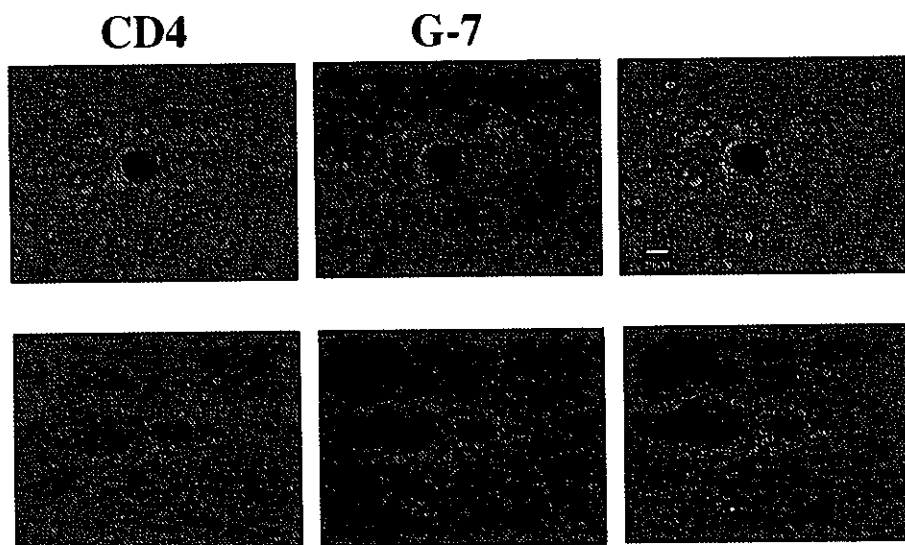
考 察

多発性硬化症の動物モデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎は、自己ミエリン抗原反応性 T 細胞により引き起こされると考えられている。中枢神経系に炎症性脱髄が

1) 国立療養所中部病院長寿医療研究センター
2) 国立精神神経センター神経研究所 6 部

起こり、その後炎症は徐々に終演する。中枢神経系に浸潤したT細胞の50~60%がアポトーシスを起こしている事が報告されている(1)。しかし、T細胞にアポトーシスを引き起こす細胞はまだ同定されていない。その1つは、ミクログリアなどの抗原提示細胞であり、またアストロサイトの関与も報告されている(2)。そこで我々は、アストロサイト由来の自己反応性T細胞にアポトーシスを誘導する因子として、SPARC/osteonectin と未知の遺伝子のG-7cDNA をクローニングした。実験的アレルギー性脳脊髄炎の炎症部位におけるG-7蛋白の発現を解析した。G-7蛋白は、EAEの脱髄巣、特に血管周囲の細胞浸潤が著

明な部位において認められた。さらにCD4⁺T cellの細胞膜上にG-7蛋白が付着している像が認められた。G-7蛋白を産生・分泌する細胞がどの種類の細胞であるかは未確認の状況で、現在検索を続けている。次に、G-7発現レトロウイルスベクターを用いてEAEの治療を試みた。G-7を発現するmicroglia cell lineを腹腔投与し、B6マウスにEAEを発症させると、有意にEAEの発症の遅延と症状の改善が認められた。今後、リコンビナントG-7蛋白を作成し、EAEや多発性硬化症の治療に応用する予定である。



まとめ

アストロサイト細胞からクローニングした免疫抑制機能を持つ未知の蛋白 G-7 の EAE 脱髄巣における局在を解析した。G-7 蛋白は炎症部位に多く発現し CD4⁺T cell の細胞膜上に結合して認められた。また、G-7 を発現する microglia cell line を投与すると有意に EAE の症状の改善が認められたので、G-7 蛋白は、免疫抑制剤として有効な治療法の開発に発展する可能性がある。

参考文献

- 1) Pender MP: Activation-induced apoptosis of autoreactive and alloreactive T lymphocytes in the target organ as a major mechanism of tolerance. *Immunol Cell Biol* 77(3): 216-223, 1999.
- 2) Gold R, Schmied M, Tontsch U, Hartung HP, Wekerle H, Toyka KV, Lassmann H: Antigen presentation by astrocytes primes rat T lymphocytes for apoptotic cell death.. A model for T-cell apoptosis in vivo. *Brain* 119:651-659, 1996.

脱髄疾患における酸化ストレスに関する遺伝子多型と テーラーメイド治療

分担研究者 高 昌星
(信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科)

研究要旨

多発性硬化症 (MS) やギラン・バレー症候群 (GBS) などの脱髄疾患の発症に反応性酸素や窒素が関与していることが明らかにされており、酸化ストレスが関与していることが知られている。外界から様々なストレスを受けながら発症する者と発症しない者が存在し、これらはストレスに対する応答の違いから来るものと考えられ、それはストレスや複数の遺伝子と環境因子との複雑な関わり合いによって発症すると考えられる。最近、こうした脱髄疾患の発症に酸化ストレスの関与が示唆されている。そこで本研究では脱髄疾患における抗酸化ストレス酵素の遺伝子の1塩基多型を解析することにより脱髄疾患各個人の病態を鑑別し、それぞれの病態にあったテーラーメイド治療法を確立させるのに役立てようとした。そのためミトコンドリア DNA 上にある酸化ストレスに関与する酵素である NADH デヒドロゲナーゼ第二サブユニット遺伝子 5178 塩基の遺伝子多型を融解分析を行い解析した。MS 患者ではミトコンドリア DNA 上にある NADH デヒドロゲナーゼ第二サブユニット遺伝子 5178 塩基は Mt5178A が 37% であり、Mt5178C が 63% と健常集団 (45%) に比して Mt5178C が多かった。GBS 患者では Mt5178A が 34% であり、Mt5178C が 66% と Mt5178C を有する者が多く、Mt5178C を有する者は脱髄疾患に対し疾患感受性が高いことが示唆された。Mt5178C は酸化ストレスに関与する遺伝子であり、脱髄疾患の疾患感受性に酸化ストレスが関与していることが示唆される。

脱髄疾患における酸化ストレスに関する遺伝子多型とテラーメイド治療

分担研究者：高 昌星¹⁾，市川 元基¹⁾

研究協力者：二階堂敏夫²⁾，野村恭一³⁾

所属施設：信州大学・医療短大¹⁾，信州大学大学院・臓器発生制御医学²⁾，
埼玉医科大学・神経内科³⁾

A. 研究目的

多発性硬化症 (MS) やギラン・バレー症候群 (GBS) などの脱髄疾患は外界から様々なストレスを受けながら発症する者と発症しない者が存在し、これらはストレスに対する応答の違いから来るものと考えられ、それには複数の遺伝子と環境因子との複雑な関わり合いによって発症すると考えられる。最近、こうした脱髄疾患の発症に酸化ストレスの関与が示唆されている。そこで本研究では脱髄疾患における抗酸化ストレス酵素の遺伝子の 1 塩基多型を解析することにより脱髄疾患各個人の病態を鑑別し、それぞれの病態にあったテラーメイド治療法を確立させるのに役立つ。

B. 研究方法

健常者および脱髄疾患患者の同意を得た上で、厚生省「ヒト遺伝子解析」に関するガイドラインに従い、健常者および脱髄疾患患者血液から自動 DNA 抽出装置を用いて DNA の抽出を行い、ミトコンドリア DNA 上にある NADH デヒドロゲナーゼ第二サブユニット遺伝子 5178 塩基の遺伝子 1 塩基多型を融解分析を行い解析した。脱髄疾患患者から得られた DNA 50ng を鋳型として NADH デヒドロゲナーゼ第二サブユニット遺伝子の配列より作成したプライマーを用い、PCR で増幅し、5178 塩基付近のフルオレセインの標識したプライマーと LCRed640 で標識したプライマーを用い、PCR を 40 サイクル行い、融解曲線分析を行うことによって遺伝子の 1 塩基多型を解析した。

C. 研究結果

250 名の健常対照者、56 名の MS 患者および 35 名の GBS 患者におけるミトコンドリア DNA 上にある NADH デヒドロゲナーゼ第二サブユニット遺伝子 5178 塩基の遺伝子多型を融解分析を行い解析した。ミトコンドリア DNA 上にある NADH デヒドロゲナーゼ第二サブユニット遺伝子 5178 塩基 A から C への転換はアミノ酸レベルではメチオニンからロイシン置換を引き起こす。MS 患者ではミトコンドリア DNA 上にある NADH デヒドロゲナーゼ第二サブユニット遺伝子 5178 塩基は Mt5178A が 37% であり、Mt5178C が 63% と健常集団 (45%) に比して Mt5178C が多かった。GBS 患者ではミトコンドリア DNA 上にある NADH デヒドロゲナーゼ第二サブユニット遺伝子 5178 塩基は Mt5178A が 34% であり、Mt5178C が 66% と健常集団 (45%) に比して Mt5178C が多かった。

D. 考察

ミトコンドリア DNA 上にある NADH デヒドロゲナーゼ第二サブユニット遺伝子 5178 塩基 A から C への転換はアミノ酸レベルではメチオニンからロイシン置換を引き起こす。MS および GBS 患者では Mt5178C を有する者が多く、Mt5178C を有する者は MS や GBS などの脱髄疾患に対し疾患感受性が高いことが示唆された。Mt5178C は酸化ストレスに関与する遺伝子であり、MS や GBS などの脱髄疾患の疾患感受性に酸化ストレスが関与していることが示唆される。今後、酸化ストレス酵素の遺伝子 1 塩基多型と脱髄疾患との関連性を解析し、病

態を鑑別し、発症予知に役立たせるとともに、病態にあったテラーメイド治療法を確立することが可能となると考えられる。

E. 結論

脱髄疾患患者では Mt5178C を有する者が多く、Mt5178C を有する者は脱髄疾患に対し疾患感受性が高いことが示唆された。Mt5178C は酸化ストレスに關与する遺伝子であり、脱髄疾患の疾患感受性に酸化ストレスが關与していることが示唆された。本研究により発症予知および抗酸化ストレス治療をはじめとしたテラーメイド治療法の確立に役立つことが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sekiguchi Y, Ichikawa M, Inoue A, Itoh M, *Koh C-S, : Brain-derived gangliosides suppress the chronic relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in NOD mice induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide. J Neuroimmunol, 116: 196-205, 2001
2. Inaba Y, Ichikawa M, Inoue A, Itoh M, Kyogashima M, Sekiguchi Y, Nakamura S, Komiyama A, *Koh C-S: Plasma thrombin-antithrombin III complexis associated with the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neurol Sci, 185: 89-93, 2001
3. Nohara C, Akiba H, Nakajima A, Inoue A, Koh C-S, Ohshima H, Yagita H, Mizuno

Y, Okumura K: Amelioration of experimental auto-immune encephalomyelitis with anti-OX40 ligand monoclonal antibody: A critical role for OX40 ligand in migration, but not development, of pathogenic T cells. J Immunol 166: 2108-2115, 2001
Yahikoza H, Palma JP, Dalcanto M, Kang H-K, Koh C-S, Kim BS: Increased susceptibility of C57L/J male mice after castration and restoration of resistance by treatment with estrogen to Theiler's virus induced demyelinating disease. J Neuroimmunol, (submitted)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

NKT 細胞の新規リガンドによる多発性硬化症モデルの治療

分担研究者 山村 隆

(国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部)

研究要旨

我々は、多発性硬化症の動物モデル EAE を使って、新しい治療薬の開発に取り組んできた。本年度は NKT 細胞の新規糖脂質リガンドの中から、NKT 細胞の IL-4 産生を介して治療効果を発揮する物質 (OCH) の同定に成功した。NKT 細胞は CD1d 分子に結合した糖脂質を認識するリンパ球で、免疫調節細胞として重要な役割を果たすことが推測されている。従来知られている糖脂質リガンドは、NKT 細胞の IL-4 産生と同時に、インターフェロン・ガンマの産生も誘導するために、EAE に対する抑制効果を発揮しなかった。OCH は既存物質のスフィンゴシン鎖を短縮したアナログで、NKT 細胞の IL-4 産生を選択的に誘導する。OCH の経腹腔内投与、および経口投与は、EAE の発症を著明に抑制することから、今後多発性硬化症の治療薬としての発展が期待される。

NKT細胞の新規リガンドによる多発性硬化症モデルの治療

宮本 勝一¹⁾ 三宅 幸子¹⁾ 山村 隆¹⁾

目 的

ナチュラルキラー T (NKT) 細胞は、T 細胞受容体 (TCR) α 鎖に固定鎖 (マウスでは Va14-Ja281) を発現し、多型性のない CD1d 分子により提示された糖脂質をリガンドとするリンパ球である。TCR を介した刺激により IL-4 や IFN γ を短時間で大量に産生することから、その免疫調節機能が注目されている。動物モデルでは NKT 細胞が自己免疫病の発症を阻止する調節機能をもつことが示され、NKT 細胞の機能異常が、自己免疫疾患の病態に関与することも推測されている。

自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) はヒトの多発性硬化症のモデルとされ、Th1 細胞が介在する自己免疫病モデルである。我々は以前から、C57BL6 (B6) マウスに MOG ペプチドで誘導した EAE を利用して、NKT 細胞の自己免疫病における役割の解析を続けてきた。NKT 細胞の代表的な糖脂質リガンドである α -ガラクトシルセラミド (α GC) を用いて EAE に対する効果を評価したが、何ら変化が見られなかった。サイトカインノックアウトマウスなどを使った一連の解析の結果、 α GC が EAE に無効である理由は、NKT 細胞に Th1 抑制的な IL-4 のみならず Th1 促進的な IFN γ の産生を促すためであるとの結論に至った。

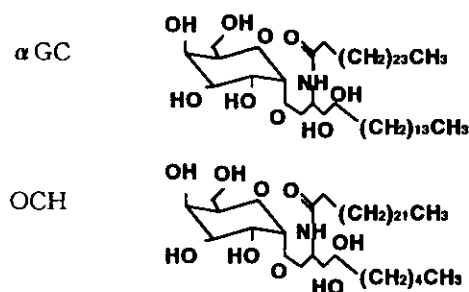
そこで我々は、NKT 細胞に選択的に IL-4 産生を促して EAE を抑止するような糖脂質リガンドを探索したところ、 α GC の誘導体の一つ (OCH) がこのような性質を持つことを発見した。OCH の EAE への効果を中心に報告する。

方 法

図 1 に示すような α GC の誘導体を作成し、各々を B6 マウスに投与し、血清中サイトカイン (IFN γ 、IL-4) を経時的にサンドイッチ ELISA 法にて定量した。in vitro では、B6 マウスの脾細胞 (10^6 /well) に α GC の誘導体で刺激し、サイトカインや増殖反応を評価した。また B6 マウスを用いた MOG ペプチド (35-55 残基) 100 μ g/匹と CFA との emulsion に

感作した EAE に α GC、およびその誘導体 (100 μ g/kg) を感作当日に経口投与し、臨床症状や血清 MOG 抗体価などを評価した。また作用機序の評価のため、NKT ノックアウトマウスおよび IL-4 ノックアウトマウスを使用し上記と同様の実験を行った。

図 1 α GC の合成誘導体の構造



結 果

OCH は α GC の sphingosine 鎖を短くした誘導体である。これを B6 マウスに投与すると短時間で血清中の IL-4 が選択的に上昇する。一方、 α GC を投与すると、IL-4 だけでなく IFN γ も上昇する (図 2)。NKT ノックアウトマウスでは、OCH や α GC 投与による血中サイトカインの上昇はみられないことから、OCH の作用は NKT 細胞を介するものであることがわかった。In vitro でこれらの誘導体に対する脾細胞の反応を検討すると、サイトカイン産生については、in vivo 投与での結果と同様の傾向がみられ、OCH 添加により IL-4 が優位に産生された。その選択的な IL-4 誘導能に一致して、OCH を一回経口投与するだけで EAE は強く抑制された (図 3)。また OCH 投与群では抗 MOG (35-55) IgG1 が選択的に上昇しており、MOG に対する自己免疫応答が OCH により Th2 に偏倚することがわかった (図 4)。抗 IL-4 抗体による中和実験と IL-4 ノックアウトマウスを使った実験では、OCH と抗 IL-4 抗体を同時投与すると EAE の抑制はみられなくなること、IL-4 ノックアウトでは OCH の EAE 抑制効果はみられないことが確認され (図 5)、OCH の EAE 抑制には IL-4 が重要

¹⁾国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

な役割を果たすことが明らかになった。

図2 α GC 誘導体投与 (in vivo) による血清サイトカインの経時的変動

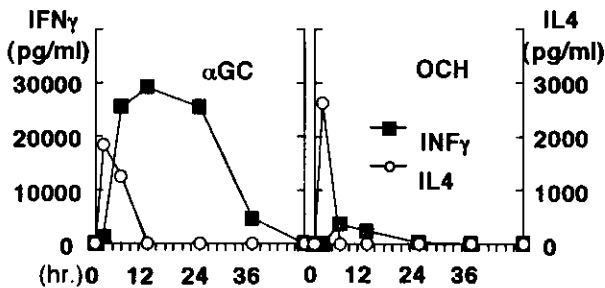


図3 α GC 誘導体投与による NKT 細胞依存性 EAE 抑制効果

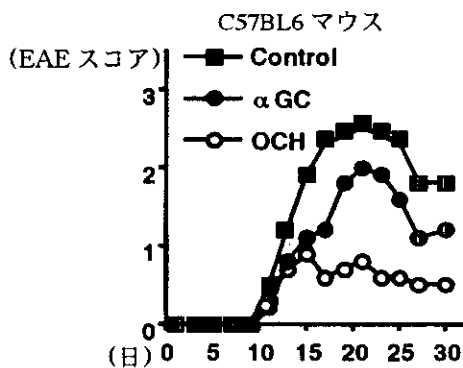
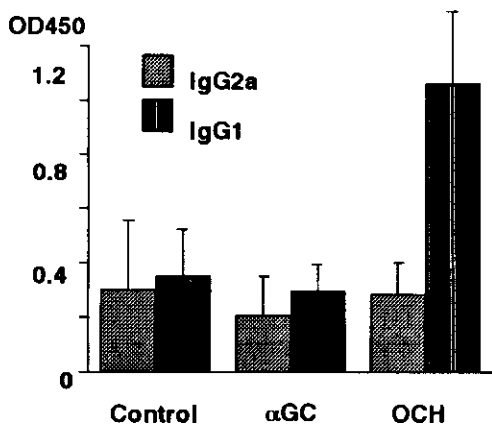


図4 抗 MOG 抗体アイソタイプ測定



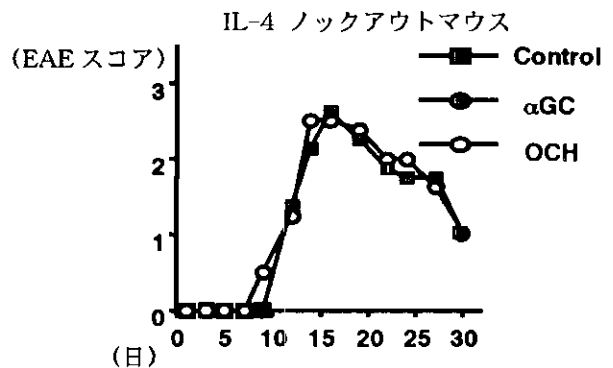
考 察

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 GC 誘導体 OCH の合成に成功した。また、この作用を通じて、 α GC 誘導体の経口投与により、自己抗原である MOG に対する反応を Th2 に偏倚させることによって EAE を抑制できることがわかった。OCH は、ペプチドの altered peptide のように、NKT 細胞に α GC とは異なる刺激を伝え

ていると考えられる。今後はこのシグナルの違いについての解析が重要である。また、OCH 反応性の細胞の V β 鎖が α GC と同様に、V β 8 鎖を発現しているのか、異なる T 細胞受容体の組み合わせとなっているかについても検討が必要である。

このように NKT 細胞を適切に刺激すると疾患予防的にはたらくことから、今後 NKT 細胞を標的とした多発性硬化症の再発予防に有効な治療法の開発が期待できる。今回の誘導体は、 α GC のスフィンゴシン鎖を短くしたものであるが、今後さらに新しい誘導体をスクリーニングすることにより、さらに EAE 抑制効果の高いリガンドが得られる可能性が考えられる。また、 α GC 誘導体が関節炎や自己免疫性糖尿病などの、他の自己免疫疾患にも効果があるかどうか、今後の重要な検討課題である。

図5 α GC 誘導体投与による IL-4 依存性 EAE 抑制効果



ま と め

NKT 細胞を刺激し、Th2 サイトカインを選択的に産生させることによって、EAE を抑制できる α GC 誘導体の合成に成功した。以上のことより、NKT 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 MS の治療法の開発が期待される。

文 献

- Miyamoto K, Miyake S and Yamamura T.
A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 bias of natural killer T cells. *Nature* 413:531-534, 2001
- Gumpez J, Miyake S, Yamamura T et al.
A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 of natural killer T cells. *J.Exp. Med.* (in press)

多発性硬化症寛解期における CD4-CD8- (DN) NKT 細胞の減少と Th2 偏倚 CD4+ NKT 細胞の相対的優位の意義

分担研究者 山村 隆

(国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部)

研究要旨

我々は、これまでに多発性硬化症 (MS) の寛解期では NK 細胞が IL-5 を産生する NK2 タイプに偏倚すること、NKT 細胞数が減少することを報告してきた。最近になって、CD4-CD8- (DN) の NKT 細胞と CD4+ の NKT 細胞では、機能的に大きな相違があることが指摘されている。そこで本年度は、MS 末梢血の NKT 細胞を DN と CD4+ に分けて、その数や機能の解析を行った。その結果、MS の寛解期では、DN NKT 細胞は著明に減少しサイトカイン産生能が低下していること、それに対して CD4+ NKT 細胞は減少の程度が少なく、また IL-4 を大量に産生するように変化していること (Th2 偏倚) がわかった。NKT 細胞全体としては、Th2 に偏倚している傾向が示され、NKT 細胞は NK 細胞とともに MS の再発抑制に効果を示す可能性が示唆された。

多発性硬化症寛解期における CD4⁺CD8⁻(DN) NKT 細胞の減少と Th2 偏倚 CD4⁺NKT 細胞の相対的優位の意義

荒木 学¹⁾ 近藤 誉之¹⁾ 山村 隆¹⁾

目的

NKT 細胞は CD1d 拘束性に糖脂質 α -galactosylceramide (α -GC) を認識し、T 細胞抗原受容体には invariant V α 24J α Q 鎖を発現する。NKT 細胞は大量の IL-4 や IFN- γ を産生し、免疫調節に重要な役割を担うとされており、I 型糖尿病¹⁾ や全身性硬化症²⁾ などの自己免疫疾患の末梢血においてその減少が確認されている。我々は多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) の寛解期に NKT 細胞が著明に減少することを明らかにしてきた³⁾。今回の研究の目的は、MS (寛解期、再発期) における末梢血 NKT 細胞を CD4⁺ NKT 細胞と CD4⁺CD8⁻ (double negative, DN) NKT 細胞のサブタイプに分類、その数的・機能的変化を解析することである。

方法

対象は再発寛解期 MS 患者 39 名、うち寛解期 27 名 (男 10 女 17)、再発期 12 名 (男 3 女 9)、健常コントロール 15 名 (男 6 女 9)。寛解期は 3 ヶ月以上、自覚症状や理学所見の悪化を認めず、MRI 画像上造影効果を認めないことを判断基準とし、また、治療としてステロイド剤、免疫抑制剤の投与されていない症例に限定した。各検体より末梢血リンパ球分画内の NKT (V α 24⁺V β 11⁺)、CD4⁺ NKT、DN NKT 細胞頻度を Flow cytometry を用いて測定。また、CD1d-tetramer を用いて、末梢血中の CD1d 拘束性 T 細胞頻度を測定した (MS 寛解期、対照コントロール各 6 例)。NKT 細胞の機能解析のために、 α -GC を用い in vitro にて NKT enriched culture を誘導し、培養開始 20~30 日目に cell sorter にて NKT 細胞を分取、 α -GC による再刺激、または、Dynabeads CD3/CD28 T cell expander 刺激により NKT 細胞の増殖反応 (methyl-³H 取り込み)、サイトカイン (IL-4、IFN- γ) 産生を ELISA にて測定した。

結果および考察

1) MS における末梢血 NKT 細胞の減少 (図 1A)
MS 寛解期において末梢血 DN NKT (V α 24⁺V β 11⁺) 細胞頻度 (MS: 0.007 \pm 0.002%、Control: 0.065 \pm 0.026%、 $p < 0.005$)、 α -GC 刺激後 DN NKT 細胞頻度 (培養 7 日目、MS: 0.65 \pm 0.13%、Control: 4.12 \pm 1.81%、 $p < 0.01$) の減少を認めた。一方、末梢血 CD4⁺ NKT 細胞頻度については有意な減少を認めなかった (MS: 0.005 \pm 0.002%、Control: 0.013 \pm 0.006%、 $p = 0.18$)。CD1d 拘束性細胞についても、MS 寛解期において減少を認めた (MS: 0.076 \pm 0.046%、Control: 0.294 \pm 0.120%)。

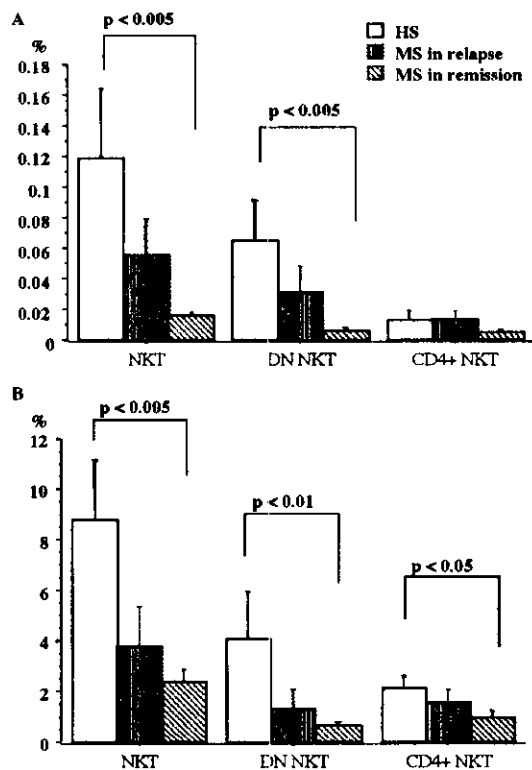


図 1. PBMC 中 NKT 細胞頻度 (A) α -GC 刺激 7 日目 NKT 細胞頻度 (B)

¹⁾国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

表 1. Total NKT, DN NKT, CD4⁺ NKT 細胞のサイトカイン産生能

NKT cells	HS or MS	No.	IL-4 (pg/ml) ^a	IFN- γ (pg/ml) ^a	IL-4/IFN- γ ratio ^a
Total NKT	HS	6	58.4 \pm 11.6	368.2 \pm 77.4	0.20 \pm 0.13
	MS remission	9	75.6 \pm 6.5	307.8 \pm 59.3	0.51 \pm 0.23
CD4 ⁺ (DN) NKT	HS	7	59.5 \pm 13.1	577.4 \pm 195.5	0.16 \pm 0.04
	MS remission	7	27.1 \pm 8.8*	232.4 \pm 39.3	0.13 \pm 0.03
CD4 ⁺ NKT	HS	7	140.8 \pm 27.9	411.2 \pm 135.2	0.49 \pm 0.13
	MS remission	7	321.9 \pm 82.7**	351.2 \pm 66.6	0.99 \pm 0.17

^aThe values indicate the means \pm SE of each samples

* p <0.05 compared with HS, ** p <0.01 compared with HS

2) α -GC 刺激に対する NKT 細胞の反応 (図 1B)

in vitro において α -GC の刺激で NKT 細胞は 200 ~300 倍に増加したが、MS 群と対照群でその増加率に相違は認めなかった。培養開始 7 日目に NKT 細胞頻度を測定、末梢血と同様に MS 寛解期における NKT 細胞の減少を認めた (p <0.005)。DN NKT 細胞、CD4⁺ NKT 細胞ともに有意な減少を示したが、DN NKT 細胞の減少がより顕著であった (DN NKT: p <0.01, CD4⁺ NKT: p <0.05)。また、MS 症例において NKT 細胞は減少するものの、CD4⁺ NKT 細胞が DN NKT 細胞に比して相対的に優位となり、対照群との相違がより明瞭となった。*in vitro* にて増加した NKT 細胞は、 α -GC に特異的に反応し、末梢血と同様の機能を有すること確認した。

3) NKT 細胞のサイトカイン産生 (表 1)

MS 群、対照群に関わらず、CD4⁺ NKT 細胞は DN NKT 細胞に比べて IL-4 をより多く産生するパターンを示した。MS 寛解期では DN NKT 細胞の IL-4、IFN- γ 産生が共に減少する傾向にあり、その一方、CD4⁺ NKT 細胞は IL-4 をより多く産生し (p <0.01)、相対的に Th2 偏倚を示した。

過去の文献では、I 型糖尿病における DN NKT 細胞減少とその Th1 偏倚の病態への関与²⁾ が示されるなど、DN NKT 細胞の機能分析が中心になされてきた。今回の研究では、CD4⁺ NKT 細胞の数的、機能的変化の解析を加えることにより、MS の寛解維持を説明し得る新たな知見を得た。

まとめ

MS 寛解期では、DN NKT 細胞が減少し、そ

のサイトカイン産生も減少、一方、Th2 偏倚した CD4⁺ NKT 細胞が相対的優位の状態となることから、NKT 細胞全体のサイトカイン産生を Th1 から Th2 にシフトする免疫調節の役割として、CD4⁺ NKT 細胞が MS 寛解維持に重要である可能性が示された。

文献

- 1) Wilson SB. et al. 1999. Extreme Th1 bias of invariant V α 24J α Q T cells in type 1 diabetes. *Nature*. 391: 177-181.
- 2) Sumida T. et al. 1995. Selective reduction of T cells bearing invariant V α 24J α Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis. *J. Exp. Med.* 182: 1163-1168.
- 3) Illes Z. et al. 2000. Differential expression of NKT cells V α 24J α Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. immunol.* 164: 4375-4381.

ヒト IgM 抗体による脱髄の治療： Toxin-induced demyelination における検討

分担研究者 祖父江 元
(名古屋大学神経内科)

研究要旨

我々は健常成人血漿プールより IgM のみを精製し、Theiler ウイルスを用いた MS 実験モデルで髄鞘再生促進能があることを報告してきた。今回この IgM 製剤が免疫系の関与の少ない中毒性脱髄モデルにおいても髄鞘再生があるかどうかを検討した。その結果、市販のヒト γ -グロブリン製剤では無効であったが、ヒト IgM 製剤では髄鞘再生が促進されることを確認した。