

モカイン、ケモカインレセプターの両面からの解析が求められる。

結 語

MS 非活動期において末梢血リンパ球の Th1/Th2 バランスは HC と比べ有意差を認めなかったが、ケモカインレセプター (CCR5、CCR3) の表出は CD4 細胞、CD8 細胞のいずれも高値を示した。活動期のみならず非活動期において、MS 患者の末梢血リンパ球は既に免疫賦活状態にあることが示された。

文 献

- 1) 木下俊介ら：多発性硬化症の非活動期における CD8 系抑制 T 細胞. 神経免疫学 7: 62-63, 1999
- 2) Calopa M et al. : T cell subsets in multiple sclerosis : a serial study. Acta Neurol Scand 92: 361-368, 1995
- 3) Oksaranta O et al. : T-cell subpopulations in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with multiple sclerosis. a follow-up study. Neurology 47: 1542-1545, 1996
- 4) Strunk T et al. : Increased numbers of CCR5+ interferon- γ and tumor necrosis factor- α -secreting T lymphocytes in multiple sclerosis. Ann Neurol 47: 269-273, 2000
- 5) Misu T et al. : Chemokine receptor expression on T cells in blood and cerebrospinal fluid at relapse and remission of multiple sclerosis: imbalance of Th1/Th2-associated chemokine signaling. J Neuroimmunol 114: 207-212, 2001

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

Interferon-beta-1b療法導入後早期の多発性硬化症患者における免疫動態について

分担研究者 松井 真¹⁾

共同研究者 荒谷信一¹⁾、王会雲¹⁾、齋田孝彦¹⁾、松島綱治²⁾

研究要旨

IFN- β 療法は、多発性硬化症（MS）患者の再発抑制を目的としているが、少数ながら、早期に一過性の臨床的不安定期を呈する患者を経験することがある。この時期の不安定性の要因を明らかにすることができる可能性を考慮し、IFN- β 療法開始後2週間前後の超早期における免疫動態の変化を細胞性免疫の面からモニタリングすることを試みた。その結果、IFN- β 療法開始後には、Th2細胞のみならずTh1細胞も増加することが判明し、両者のバランスによっては、再発を誘導する方向へ作用する可能性があることが示唆された。

研究目的

多発性硬化症（MS）は、再発・寛解の経過をとる慢性炎症性の脱髄疾患であるが、1993年に米国で認可されたMS治療薬としてのinterferon- β （IFN- β ）隔日皮下注射薬は、2000年秋に本邦でも保険適用が認められた。IFN- β 療法は、MS患者の再発抑制を目的としているが、少数ながら、早期に一過性の臨床的不安定期を呈する患者を経験することがある。この時期の不安定性の要因を明らかにすることができる可能性を考慮し、IFN- β 療法開始後2週間前後の超早期における免疫動態の変化を細胞性免疫の面からモニタリングすることを試みた。

研究方法

対象は再発・寛解型MS14例（女性13名、男性1名）で、IFN- β 開始後、平均5.6回の投与を施行した後に、下記項目を検査した。

(a) 膜表面抗原の解析

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 α 鎖（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、naiveあるいはsuppressor inducer T細胞集団とされるCD4+CD45RA+細胞、dipeptidylpeptidase IV（CD26）陽性のメモリーヘルパーT細胞、さらに、CD11a陽性で細胞傷害性T細胞と考えられるCD8細胞などの分画を検索対象とした。

(b) リンパ球細胞内サイトカインの解析

型通りFicoll-Paque比重遠沈法により末梢血単核球を取り出した後、Brefeldin A（20 μ g/ml）とMonensin（1 μ M）の存在下で培養した。刺激は最終濃度20 ng/mlのPMAと2 μ g/mlのIonomycinにより、4時間かけて行った。培養後の細胞は洗浄し、摂氏4度で30分間、PE標識抗CD4あるいは抗CD8抗体を

- 1) 国立療養所宇多野病院臨床研究部・神経内科
- 2) 東京大学医学部分子予防医学

添加して表面抗原を染色した。さらに、膜表面の固定化に引き続きpermealizationを行った後、FITC標識抗IFN- γ 、IL-2、IL-4、TNF- α 抗体で摂氏4度下45分間、細胞内サイトカインを染色した。二重染色終了後、EPICS XL（Beckman Coulter社）を用いて蛍光陽性細胞を算定した。

研究結果

(1) 4種のサイトカイン陽性細胞については、一定の変動は認められなかった。

(2) CD20陽性B細胞は7.6から4.1%へ減少した（ $p=0.0352$ ）。CD4⁺CCR3⁺ Th2細胞は0.7%から2.1%に増加したが（ $p=0.0425$ ）、CD4⁺CCR5⁺ Th1細胞も0.8%から2.0%に増加した（ $p=0.0445$ ）。CD4⁺CXCR3⁺ Th1細胞は有意の変動を示さなかったが、CD8⁺CXCR3⁺細胞は9.6%から5.9%へ減少した（ $p=0.007$ ）。

考察

IFN- β 療法を開始した後、最初の90日間における再発回数の増加の可能性は統計学には否定されている。従来報告でも、末梢血単核球の産生するサイトカインに関しては、IFN- β 療法の効果は開始後2週の早期には検知できず、6カ月後には、IFN- γ やTNF- α とともに、IL-10のmRNA発現が抑制されていたとする報告があり、Th1型からTh2型への免疫応答のシフトという図式では説明できない。

結論

IFN- β 療法開始後約2週の超早期に、CCR3陽性のTh2細胞のみならず、CCR5陽性のTh1細胞も増加したため、両者のバランスによっては、再発を誘導する方向へ作用する可能性が示唆された。今後は、免疫学的パラメータの経時的な推移と、月単位での臨床経過との関係を追跡調査する必要がある。

健康危険情報 なし

知的財産権の出願・登録状況 該当せず

多発性硬化症の病変形成における単球/マクロファージの関与：

マトリックスメタロプロテアーゼとその組織障害因子を用いた検討

分担研究者 郡山達男 1)

共同研究者 檜垣雅裕 2)、松本昌泰 2)

研究要旨

MSの病変形成における単球/マクロファージの関与を検討する目的で、細胞外基質の蛋白分解酵素の matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) とその組織障害因子の tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) を用いて解析を行った。対象は増悪・寛解型のMS患者37例を用い、対照として年齢を一致させた健常者42名を用いた。血清中のMMP-9とTIMP-1はELISA法で測定した。また、単球/マクロファージ関連因子として、血清monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)と血清macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)をELISA法で測定した。その結果、活動期MS患者では対照に比較して血清MMP-9濃度が有意に上昇していた。MS患者の血清中において、MMP-9濃度は、M-CSF濃度と有意の相関がみられたが、MCP-1濃度とは有意の相関がみられなかった。これに対して、血清TIMP-1濃度はM-CSF濃度およびMCP-1濃度と有意の相関がみられた。以上の結果から、MSにおいて、M-CSFはマクロファージを活性化することにより、マクロファージからのMMP-9の産生を促進し、神経組織の傷害に関与し、これに対してTIMP-1はMCP-1と協力して病変の修復に関与する可能性がある。

研究目的

多発性硬化症 (MS) の病態は血液脳関門の破綻とそれに引き続くマクロファージとTリンパ球の病変部位への浸潤で特徴づけられる。

Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) は、細胞外基質の蛋白分解酵素であり、MSの病態において、血液脳関門の破綻あるいは白血球の中枢神経組織への浸潤に関与することが示唆されている¹⁾。一方、tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) はMMPの活性を調節する内因性の阻害因子である。このことから、TIMP-1は組織損傷において病変の修復に関与する可能性がある。

本研究では、MSの病変形成における単球

/マクロファージの関与を検討する目的で、細胞外基質の蛋白分解酵素の matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) とその組織障害因子の tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) を用いて解析を行った。

研究方法

対象は増悪・寛解型のMS患者37例 (年齢中央値40歳) を用いた。MS患者において、活動期は初発あるいは再発から3カ月未満とし、回復期は3カ月以降とした。対照として年齢を一致させた健常者42名 (年齢中央値41歳) を用いた。

血清中の MMP-9 と TIMP-1 は ELISA 法 (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) で測定した。単球/マクロファージ関連因子として、単球と T リンパ球の走化因子である血清 monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)

1) 広島大学医学部附属病院第三内科

2) 広島大学大学院脳神経内科

とマクロファージの分化と増殖の促進因子である血清 macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)を ELISA 法 (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) で測定した。

統計解析は、3 群間の比較は Kruskal-Wallis 検定を行い、有意差がみられた場合には、2 群間の比較は Mann-Whitney U 検定を用いた。相関は Spearman 順位相関係数を用いて検討した。有意水準 5%未満を有意とした。

研究結果

活動期 MS 患者では対照に比較して血清 MMP-9 濃度が有意に上昇 ($p<0.05$) していた (図 A)。一方、血清 TIMP-1 濃度は 3 群間で有意差がみられなかった (図 B)。

期 MS 患者では対照に比較して血清 MMP-9/TIMP-1 比が有意に上昇 ($p<0.05$) していた。

血清 MCP-1 濃度は 3 群間で有意差がなかった。血清 M-CSF 濃度は活動期 MS 患者では対照および回復期 MS 患者に比べて有意の上昇がみられた (それぞれ、 $p=0.005$ と $P=0.009$)。

MS 患者の血清中において、MMP-9 濃度は、M-CSF 濃度と有意の相関 ($p<0.05$) がみられたが、一方 MCP-1 濃度とは有意の相関がみられなかった。これに対して、血清 TIMP-1 濃度は M-CSF 濃度および MCP-1 濃度と有意の相関がみられた (両者とも $p<0.001$)。

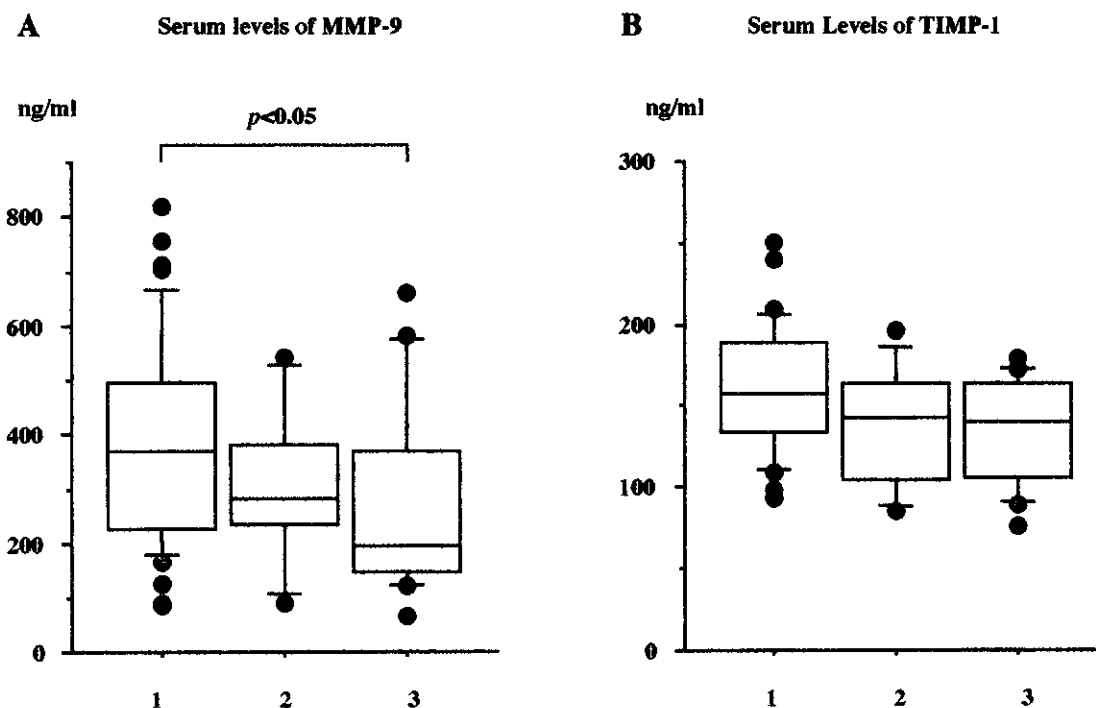


図 多発性硬化症と対照における血清中の MMP-9 濃度と TIMP-1 濃度
 1: 活動期 MS ; 2: 回復期 MS ; 3: 対照

MS の病変形成においては、組織障害に促進的に働く MMP-9 と組織の修復に作用する TIMP-1 とのバランスが重要であると考えられる。そこで、MS 患者の血清中において MMP-9/TIMP-1 比を検討したところ、活動

考察

本研究において、MS 患者では血清 MMP-9 濃度は疾患の活動性を反映して上昇することを示した。MS 患者の髄液中2)あるいは血清中3, 4)で MMP-9 濃度が上昇することが報

告されている。また、MMP-9 濃度は疾患活動性と相関すると報告されている(3, 4)。

本研究では、MS 患者の血清中において MMP-9 濃度と M-CSF 濃度との間に有意の相関がみられたことから、M-CSF はマクロファージの活性化を促進することによりマクロファージからの MMP-9 の産生を促進し、MMP-9 とともに MS の病変形成に関与することが示唆された。

一方、TIMP-1 濃度は MCP-1 濃度および M-CSF 濃度と有意の相関がみられた。MCP-1 は単球/マクロファージの遊走を促進することにより組織の傷害のみでなく修復にも関与することが示唆されている。また、TIMP-1 は MMP を抑制することにより病変の治癒に働くことが示唆されている。これらのことから TIMP-1 は MCP-1 とともに病変の修復に関与する可能性が考えられた。

結論

MSにおいて、M-CSFはマクロファージを活性化することにより、マクロファージからのMMP-9の産生を促進し、神経組織の傷害に関与し、これに対してTIMP-1はMCP-1と協力して病変の修復に関与する可能性がある。

文献

- 1) Hartung HP and Kieseier BC: The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 107: 140-7, 2000.
- 2) Leppert D, et al.: Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. *Brain* 121 (Pt 12): 2327-34, 1998.
- 3) Lee MA, et al.: Serum gelatinase B, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis. A longitudinal clinical and MRI study. *Brain* 122 (Pt 2): 191-7, 1999.
- 4) Waubant E, et al.: Serum MMP-9 and TIMP-1 levels are related to MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 53: 1397-401, 1999.

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

多発性硬化症における Osteopontin について

分担研究者 菊地誠志¹⁾

共同研究者 深浦彦彰¹⁾、緒方昭彦¹⁾、田代邦雄¹⁾、今 重之²⁾、深澤俊行³⁾

研究要旨

OPN は、臓器特異的自己免疫疾患である関節リウマチとの関連や、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)への関与が報告されるため、我々は自己免疫性神経疾患と考えられる多発性硬化症 multiple sclerosis(MS)における OPN の役割を、患者血清、髄液中の OPN の濃度を ELISA, western blotting で測定し、脳病変の OPN を免疫染色することにより検討した。その結果、MS では、正常脳、疾患コントロールの亜急性硬化性全脳炎(SSPE)と比べ、より多くの OPN の expression が検出された。血清中の OPN の濃度は、MS, コントロールの間に統計的な有意差を認めなかった。髄液中の OPN は、血清に比べて、MS、対照群ともに著しい高値を認め、臨床症状の強かった MS 症例では、特異な band が出現し、トロンピンでの切断も不十分であった。

研究目的

Osteopontin (OPN) (early T-cell activation factor-1:Eta-1) は分子量約 6 万前後のリン酸化糖蛋白である。OPN は感染症や炎症性疾患の細胞性免疫に深く関与し、また T 細胞の増殖にも関係する Th1 サイトカインと考えられている。加えて、OPN は、マクロファージ、T 細胞、アストロサイトなど複数種類の細胞の chemoattractant である。Th1 T 細胞が関与していると考えられる自己免疫疾患、多発性硬化症 (MS) における OPN の役割について

検討した。

研究方法

対象は最低 1 年以上経過している臨床的に診断確実な通常型多発性硬化症 10 例及び他の神経疾患 7 症例。血清中の OPN の濃度を ELISA を用いて測定し、コントロールと比較検討した。血清中の OPN の濃度と MS の病態、臨床症状との関連についても検討した。また、髄液中の OPN の濃度を、ELISA と western blotting を用いて測定を試みた。加えて、実際の脱髄病変部位での OPN の出現状況を知るために、MS の脳の標本における OPN の expression を、正常脳や、疾患コントロールとして亜急性硬化性全脳炎(SSPE)を用いて免疫染色を行い、比較検討した。

1) 北海道大学医学部神経内科

2) 北海道大学遺伝子病制御研究所

3) 北祐会神経内科病院

研究結果

MS 患者における血清中の OPN の濃度は、対照群に比べて有意な差は認めなかった。MS の病態、臨床症状と血清中の OPN の濃度の間にも、今回の検討では特に関連は認められなかった。髄液中の OPN は今回試行した ELISA 法では、いずれの検体でも血清に比べて著しい高値を示した。(Table.1) Western blotting では、MS、対照群ともに髄液中に OPN の存在を確認した。臨床症状の強い MS 症例では、髄液中の OPN に特異な band を認め、トロンピンによる切断も不十分であった。MS の白質の脱髄病変では、正常、SSPE に比べてより多くの OPN の expression が、ミクログリアや反応性に増殖したと思われるアストロサイトに認められた。(Fig.1)

考察

今回の我々の検討では、MS の脱髄病変で正常や SSPE よりも多くの OPN の存在が確認されたが、血清における OPN の濃度は、MS とコントロールとで差を認めなかった。髄液中の OPN は、MS、コントロールともに血清よりも著しく高濃度に存在していることが確認された。また、臨床症状が強い MS では、異なる band が出現したり、トロンピンによる切断が不十分であった。今後は症例数を増やして、さらなる検討が必要と思われた。

結論

OPN は、MS の病態において、中枢神経の脱

髄に関して重要な働きをしている可能性が示唆された。

Table.1 OPN in serum and CSF

| | Serum (ng/ml) | CSF (ng/ml) |
|-----------|------------------|----------------|
| MS (n=10) | 65.3±33.2 | >1000 |
| OND (n=7) | 88.2±64.6 | >1000 |

OND; other neurological disease

CSF; cerebrospinal fluid

文献

Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, Sobel RA, Lock C, Karpuj M, Pedotti R, Heller R, Oksenberg JR, Steinman L. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 2001 Nov 23;294(5547):1731-5

Kon S, Maeda M, Segawa T, Hagiwara Y, Horikoshi Y, Chikuma S, Tanaka K, Rashid MM, Inobe M, Chambers AF, Uede T. Antibodies to different peptides in osteopontin reveal complexities in the various secreted forms. *J Cell Biochem.* 2000 Apr;77(3):487-98.

健康危険情報

なし

知的財産の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

MS

SSPE

Normal

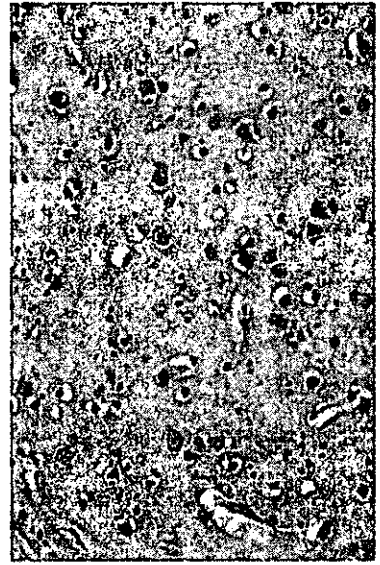
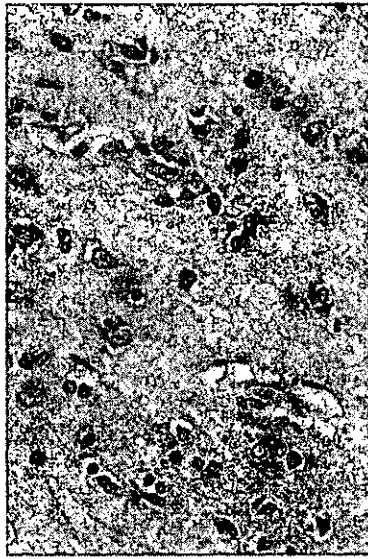
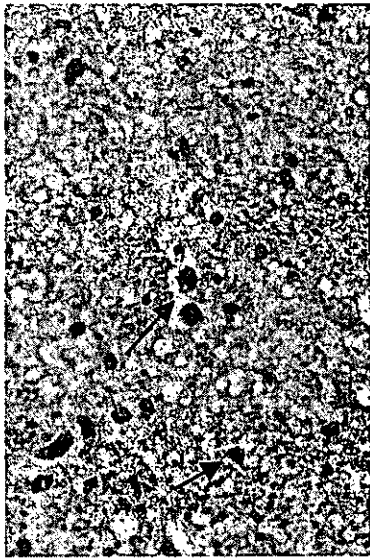


Fig.1

OPN immunostaining

多発性硬化症における HSP105 蛋白に対する調節性 T 細胞の存在

主任研究者 吉良潤一¹⁾

共同研究者 三野原元澄¹⁾、朴華¹⁾、孫曉嘉¹⁾、徳永秀明¹⁾、小副川学¹⁾、越智博文¹⁾、
村井弘之¹⁾、西村泰治²⁾

研究要旨

本研究では、視神経脊髄型多発性硬化症 (OS-MS) の責任自己抗原を同定することを目標としている。私どもはこれまで、SEREX 法により、5 つの異なる候補抗原を同定した。この内、HSP105 蛋白と MS との関連について、①血清抗 HSP105 α -IgG 抗体の MS での上昇、②MS 患者由来 PBMC での HSP105 α に対する自己反応性 T 細胞応答の亢進、③MS 病巣における HSP105 蛋白発現の上昇について報告し、今回更に、④MS 患者由来 PBMC での HSP105 α に対する IL-10 産生細胞数の低下、⑤HSP105-DNA ワクチンによる EAE の増悪が認められた。これらのことより、HSP105 に対する免疫応答には、Th1 あるいは Tc1 応答を誘導し病勢を増悪させる一方、IL-10 等の抗炎症性サイトカインを産生する、いわゆる調節性 T 細胞の存在が示唆され、この応答の MS 患者における低下が、MS 病勢の増悪・発症に関わるものと考えられた。

目的

これまで私どもは、軸索障害の強い OS-MS の病型を形成し得る責任自己抗原を特定するため、SEREX 法を用い OS-MS 患者血清中に存在し中枢神経抗原を認識する自己抗体の検索を行い、その結果、5 つの異なる候補遺伝子を同定した。本研究では、このうちで Heat Shock Protein 105 (HSP105) に対する免疫応答と MS 病態との関連を明らかにすることを目的とした。

対照・方法

1) ELISPOT 法による HSP105 反応性 T 細胞の検討

MS 患者 13 名 (平均年齢 49 歳、男女比 0 : 13)、健常者 13 名 (平均年齢 39.7 歳、男女比 4 : 9) からの血液より抽出した末梢血単核球 (PBMC) を ELISPOT 法を用いて、ヒト HSP105 α (hHSP105 α) 蛋白に対する IFN- γ 、IL-4、IL-10 産生細胞数の検討を行った。

2) HSP105 α による実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) 誘導

8 週齢のメスのマウス (SJL/J, C57BL/6) に、CFA のみの群、陽性コントロール抗原群 (SJL/J : mPLP p139-151、C57BL/6 : mMOG p35-55)、マウス HSP105 α (mHSP105 α) 蛋白 200 μ g、あるいは hHSP105 α 蛋白 200 μ g を CFA と共に day0, 7 に皮下接種した群で、EAE の誘導を比較した。

3) HSP105-DNA ワクチンによる EAE の修飾

Chicken β -Actin promoter を有する pCAGGS ベクター

に、mHSP105 cDNA を組み込んだ pCAGGS-mHSP105 ベクターを DNA ワクチンとして用いた。50 μ g/匹 にて SJL/J, C57BL/6 マウスに 3 週間毎に 2 回筋注し、最終投与より 1 週間後に、ミエリン抗原由来ペプチド (PLP, MOG) にて EAE の誘導を試みた。

結果

1) ELISPOT 法による HSP105 反応性 T 細胞の検討

MS 群でのスポット数の平均は、IFN- γ : 5.4/10⁵、IL-4 : 15.6/10⁵、IL-10 : 165.8/10⁵ であり、健常群においては、IFN- γ : 2.6/10⁵、IL-4 : 15.1/10⁵、IL-10 : 246.3/10⁵ であった。MS 群と健常群を比較した場合、IL-10 のみ MS 群で有意に低かった ($p=0.014$)。また、両群で IL-10 のスポット数は、IFN- γ や IL-4 のスポット数に比べはるかに多かった (図 1)。

2) HSP105 α による EAE 誘導

C57BL/6, SJL/J マウスは、共にミエリン抗原ペプチドにて EAE の発症が認められたが、HSP105 α のみでは EAE の発症は認められなかった。HSP105 α を免疫した群においては、血清で抗 HSP105 α -IgG 抗体が認められた。組織学的検討においても、HSP105 α の接種により中枢神経系への炎症細胞浸潤は認められなかった。

3) HSP105-DNA ワクチンによる EAE の修飾

SJL/J マウスにおいて、EAE 誘導より発症するまでの日数は、HSP105-DNA ワクチン群で平均 10.75 日に対し、コン

¹⁾九州大学医学部神経内科、²⁾熊本大学免疫識別学

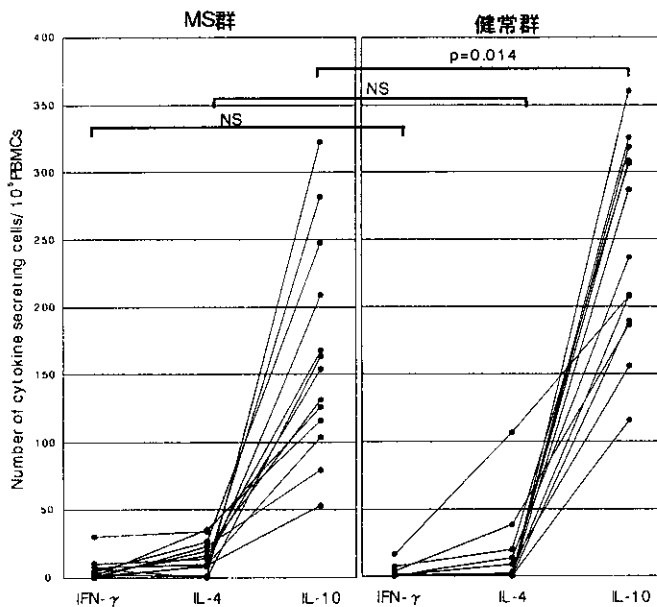


図1 ELISPOT法による、PBMCのHSP105 α に対するサイトカイン産生

コントロール DNA 群では 12.13 日と、HSP105-DNA ワクチン群で有意に発症が早まり ($p=0.023$)、重症化する傾向が認められた (図 2-A)。C57BL/6 マウスにおいても同様に HSP105-DNA ワクチンによる重症化が認められた (図 2-B)。

考察

今回 HSP105 α による EAE の誘導では、発症は認められず抗体応答のみ認められ、HSP105-DNA ワクチンを用いることで、EAE が増悪することが示された。この HSP105-DNA ワクチンは、BALB/c マウスにおいて IgG2a 抗体産生を誘導することから、HSP105 に対して Th1 応答を誘導すると考えられる。これらのことより、HSP105-DNA ワクチンにより HSP105 に対する Th1 あるいは Tc1 応答が誘導された結果、EAE の増悪をきたしたものと考えられ、中枢神経系に高発現する HSP105 が MS の自己抗原としての役割を担っていることを示唆するものである。

一方、ヒトの PBMC の ELISPOT 法による検討では、HSP105 α に対するサイトカイン産生は、著明な IL-10 産生が示されたことから、HSP105 に対する免疫応答は、通常は抗炎症性サイトカイン産生による Th1 応答の抑制を誘導する可能性、すなわち調節性 T 細胞応答が主体であることが示唆された。そして、この応答が健康者に比し、MS 群で低下していたことより、MS では HSP105 に対する調節性 T 細胞応答の異常があることが示唆される。HSP105-DNA ワクチンに

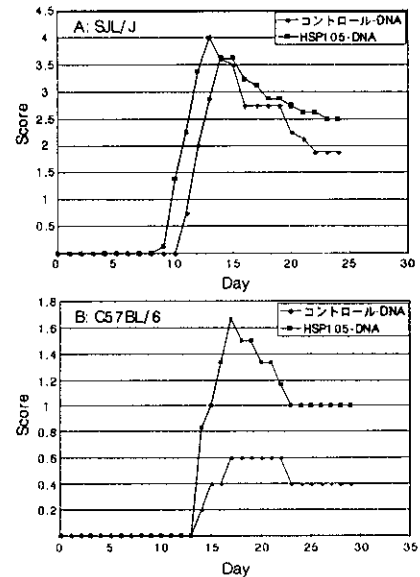


図2 HSP105-DNAワクチンによるEAE増悪

による EAE 増悪と考えあわせると、MS では HSP105 に対する異常な免疫応答が存在し、それが神経障害を増悪させている可能性がある。更に、私どもはこれまで、MS 患者では血清 HSP105-IgG 抗体は健康人に比べ、抗体価が有意に高いことを示してきたが、血清 HSP105 α -IgG 抗体は健康血清にも認められており、IVIG 中の抗 HSP105 α -IgG 抗体の存在も確認している。これら抗体応答が MS や EAE の病態に対し、抑制性に働く可能性が考えられるため、今後、IFA+HSP105 の pre-immunization により抗体応答を誘導した場合の EAE への影響を検討していきたい。

結論

HSP105-DNA ワクチンにより EAE の増悪が認められた。HSP105 に対する PBMC のサイトカイン産生は、IL-10 産生細胞の著明な増加が示され、この応答が MS 患者では健康者に比べ有意に低下していた。MS 患者では HSP105 に対する異常な免疫応答が存在し、病状悪化に寄与している可能性がある。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

多発性硬化症寛解期における CD95⁺NK 細胞の役割

分担研究者 山村 隆¹⁾

共同研究者 高橋 和也¹⁾、三宅幸子¹⁾

研究要旨

これまでに再発・寛解型多発性硬化症(MS)患者の寛解期には、自己免疫性 Th1 細胞を制御する NK 細胞が積極的に関与する可能性を示してきた。今回、CD95 抗原を発現する NK 細胞の頻度により、MS 寛解期が二群(CD95⁺ NK high と low)に分類できることを見出した。NK 細胞を除いた環境で免疫学的解析を行った結果、前者では MS の自己抗原ミエリン塩基性蛋白(MBP)に迅速に反応するメモリーT細胞の頻度が高く、後者では低いことがわかった。CD95⁺ NK high では増加した MBP 反応性T細胞をNK細胞が制御しようとしていることが推察され、CD95⁺ NK low ではMBP反応性T細胞が少なくNK細胞が機能する必要がないものと考えた。一連の解析結果から、MSの寛解期が「くすぶり型寛解」と「完全寛解」に分けられる可能性を提唱する。

研究目的

多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) の寛解期では、CD95 (Fas) を発現する NK 細胞の頻度が有意に増加することを明らかにしてきた (Takahashi et al. J. Clin. Invest. 107: R23-29, 2001)。さらに最近、MS 寛解期 (MS-rem) が、CD95⁺ NK 細胞の頻度によって、二つの亜群 ("CD95⁺ NK-high" と "CD95⁺ NK-low") に分類できることを見いだした。本研究では両群の免疫病態を比較し、CD95⁺ NK 細胞が MS の寛解維持に関与する可能性を検証する。

研究方法

患者および健常人の PBMC より磁気ビーズにより CD56⁺ NK 細胞を除去。ヒトミエリン塩基性蛋白 (MBP) 10^mg/ml を添加して 8 時

1) 国立精神・神経センター免疫研究部

間培養。MBP 刺激によって誘導される IFN- γ 産生細胞を cytokine secretion assay (PNAS 92:1921, 1995)により同定し、その頻度を算定した。CD95⁺ NK 細胞の頻度が高い患者より MBP 特異的 T 細胞クローン(TCC)を樹立。自己 PBMC または CD56⁺ NK 細胞を除去した PBMC を抗原提示細胞として、TCC の MBP に対する反応性(増殖反応、サイトカイン産生)を評価した。サイトカイン (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TNF- α) 産生能は ELISA, Cytometric bead array を用いて分析した。CD95⁺NK細胞の表面抗原発現(HLA-DR、CD69、CD8、CD16、CD57、CD94、CD158a、NKB1、U5) をフロー・サイトメーターで解析した。

研究結果

1) 健常者と MS-rem の PBMC において CD95 陽性細胞のNK細胞全体における割合を検

討した。MS-rem では健常者の平均値+2SD (35.9%) を越える症例が全体の約 4 分の 3 を占めた。これらの症例を "CD95⁺ NK-high"、残りの症例を "CD95⁺ NK-low" と定義した。

- 2) 健常者および "CD95⁺ NK-high"、"CD95⁺ NK-low" の PBMC を MBP で 8 時間刺激しても、IFN- γ 産生細胞はほとんど増加しなかった。しかし、"CD95⁺ NK-high" の PBMC から NK 細胞を除去した細胞では、MBP 刺激 8 時間後に CD4 陽性 T 細胞の 0.08%-0.50% が IFN- γ 産生細胞として同定された。この頻度は、他の方法で評価された MS 患者末梢血における MBP 特異的メモリー T 細胞の頻度にはほぼ一致する。"CD95⁺ NK-low" および健常者では NK 細胞を除去しても、MBP 刺激による IFN- γ 産生細胞の誘導は見られなかった。
- 3) NK 細胞を除いた PBMC を抗原提示細胞として利用した場合、MBP 特異的クローン (TCC) の細胞増殖応答には特に変化は見られなかったが、IFN- γ 産生細胞の頻度が増加し、培養上清中の IFN- γ も増加した。他のサイトカインについては、このような変化は見られなかった。
- 4) CD95 陽性 NK 細胞は、U5 陰性の分画 (NK 細胞障害活性が低い分画) で比較的増加していることが確認された。

考察

本研究では、CD56 陽性 NK 細胞をあらかじめ除去してから、MBP 反応性 T 細胞の頻度を算定する新しいアッセイを開発し、MS の免疫病

態を解析した。MBP 反応性メモリー T 細胞は NK 細胞の存在しない環境においてのみ、また "CD95⁺ NK-high" においてのみ検出された。この結果から、"CD95⁺ NK-high" 患者では、表面的には寛解期にあるように見えても、活動性のある状態 (くすぶり状態) にあるものと考えた。

結論

多発性硬化症の寛解期は、CD95⁺ NK 細胞の多寡により二つの亜群に分けられることを示した。CD95⁺ NK 細胞の多いグループ ("CD95⁺ NK-high") では、MBP 反応性メモリー T 細胞の頻度が高く、疾患活動性の比較的高い状態にあると思われる (smoldering state)。この状態では、CD95⁺ NK 細胞が積極的に疾患抑止的に機能することが推測される。一方、"CD95⁺ NK-low" では、MBP 反応性メモリー T 細胞の頻度は低く、NK 細胞が活動する必要がないのではないかと推測している。MS の寛解や再発のメカニズムを理解する上で、まったく新しい知見である。

健康危険情報

なし

知的財産の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

新規糖脂質リガンド OCH による多発性硬化症治療の可能性： ヒト NKT 細胞クローンによる解析

荒木 学¹⁾ 三宅幸子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、我々は多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) における NKT 細胞の関与を明らかにしてきた¹⁾²⁾。今回は、MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) に治療効果を示した合成糖脂質 OCH³⁾ のヒト NKT 細胞に対する作用をヒト NKT 細胞クローンを用いて解析した。

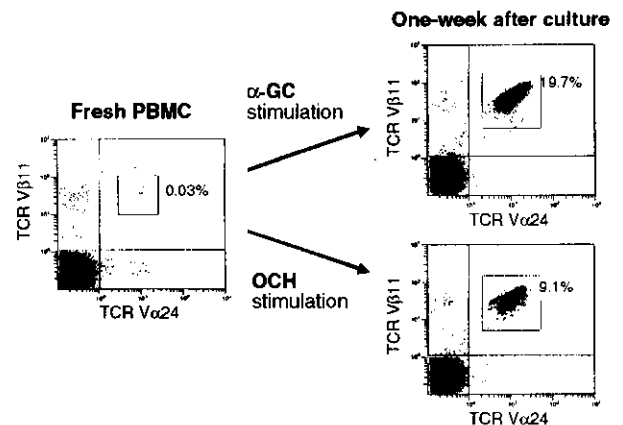
方法

- 1) ヒト (健康) PBMC に α -galactosylceramide (α -GC)、OCH 刺激による短期細胞培養を行い、培養 7 日目に flow cytometry にて NKT 細胞頻度を測定した。
- 2) cell sorter にて CD4⁺ NKT 細胞または CD4⁺CD8⁻ (double negative, DN) NKT 細胞の single cell sorting を行い、PHA 反復刺激にて NKT 細胞クローンを樹立した。
- 3) CD1d-transfectant を用いて NKT 細胞クローンの CD1d 拘束性を確認、また DNA sequence にて invariant V α 24 鎖発現を確認した。
- 4) CD4⁺ NKT 細胞クローンと DN NKT 細胞クローンの各々 α -GC、OCH 刺激に対するサイトカイン (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TNF- α) 産生を ELISA、Cytometric bead array (Becton Dickinson) を用いて定量した。

結果および考察

健康者 3 例の末梢血 V α 24⁺V β 11⁺ NKT 細胞頻度は各々 0.035、0.025、0.417% で、 α -GC 刺激による培養細胞中の V α 24⁺V β 11⁺ NKT 細胞頻度は 8.6、19.8、42.0% に増加した。一方で OCH 刺激の場合も、 α -GC 刺激に比べると頻度は低いものの各々 3.7、9.1、37.3% に増加し、OCH もヒト NKT 細胞のリガンドとして作

用した (図 1)。



(図 1) 糖脂質 α -GC または OCH 刺激による短期培養。数値はリンパ球ゲート内の V α 24⁺V β 11⁺ 細胞頻度。

樹立した DN NKT 細胞クローン、CD4⁺ NKT 細胞クローンともに CD1d 拘束性を示した。各クローンの T 細胞受容体 V α 鎖の遺伝子配列は、VJ 結合部の N 領域にセリン残基をコードする形での一塩基挿入がみられ、invariant V α J α Q 鎖を発現していた。

DN NKT 細胞クローンは、 α -GC 刺激にて Th1 サイトカインである IFN- γ ・TNF- α 、および Th2 サイトカインである IL-4・IL-5・IL-10 を産生するが、それに比べて OCH 刺激時には、全体的にサイトカイン産生は少なく、Th1 または Th2 サイトカイン産生誘導能の相対的偏倚を認めなかった (図 2)。

一方、CD4⁺ NKT 細胞クローンでは、 α -GC 刺激にて比べて、Th1 サイトカイン産生誘導能を著明に低下させるのに対し、Th2 サイトカイン産生誘導能は減少することなく保持され、相対的に Th2 偏倚する結果を示した (図 3)。

これらの結果より、新規糖脂質 OCH は CD4⁺ NKT 細胞に対して、そのサイトカイン産生誘導能を変化させるリガンドであることが示された。このことは、MS 寛解期において、末梢血 CD4⁺ NKT 細胞が相対的に保持され、そのサイトカイン産生が Th2 偏倚することからも⁴⁾、MS 患者由来の NKT 細

胞に対しても同様またはそれ以上の作用、効果が期待できると考えられる。

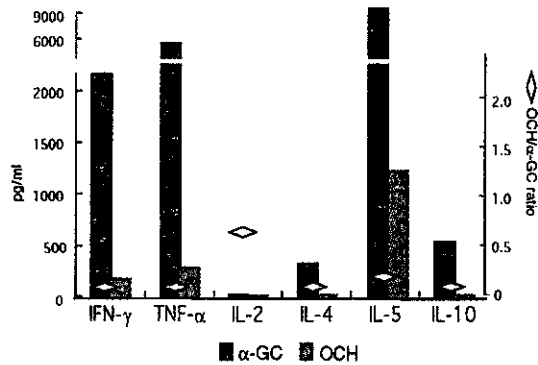


図2 サイトカイン産生 (DN NKT 細胞クローン)

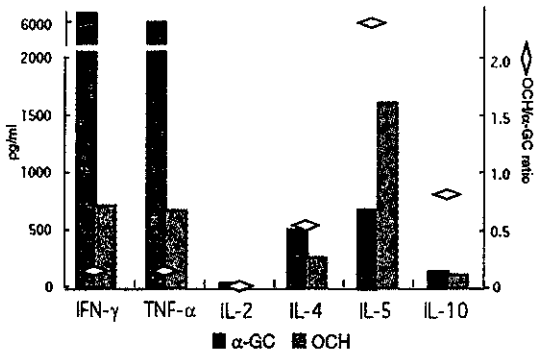


図3 サイトカイン産生 (CD4+ NKT 細胞クローン)

まとめ

- 1) 新規糖脂質 OCH はα-GC 同様に invariant Vα24 NKT 細胞のリガンドとして作用することをヒト NKT 細胞クローンを用いて証明した。
- 2) OCH はα-GC に比べて、CD4+ NKT 細胞クローンのサイトカイン産生誘導能を相対的に Th2 偏倚させることから、多発性硬化症に対しても治療薬として有効である可能性を示した。

文献

- 1) Miyamoto, K. et al. 2001. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 bias of natural killer T cells. *Nature*. 413: 531.
- 2) Illés, Z. et al. 2000. Differential expression of NK T cells Vα24JαQ invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Immunol.* 164: 4375.
- 3) Pál, E. et al. 2001. Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of Vα24 NKT cells. *J. immunol.* 166: 662

- 4) Araki, M. et al. 2003. Th2 bias of CD4+ natural killer T cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int. Immunol.* (in press)

ヒト培養脳毛細血管内皮細胞 (HBMEC) の糖脂質組成

分担研究者 神田 隆¹⁾

共同研究者 久保寺尚子¹⁾ 大和田潔¹⁾ 山脇正永¹⁾ 笠間健嗣²⁾ 有賀敏夫³⁾

水澤英洋¹⁾

研究要旨

ヒト脳毛細血管由来内皮細胞(HBMEC)の純度の高い培養に成功した。HBMECの糖脂質パターンを分析し、ヒト臍帯静脈由来内皮細胞(HUVEC)との比較検討を試みた。両細胞とも主要中性糖脂質はGb3、Gb4、LacCerの3者で、酸性糖脂質はGM3とLM1が主体であった。HBMECはHUVECと比較して中性糖脂質の含有量が多く、酸性糖脂質が少なかった。SGPGはHBMEC、HUVECのいずれでも確認可能であったが、HBMECでの含有量はHUVECと比較して遙かに少なく、また、両者とも増殖期に発現が強い傾向が明らかであった。本研究で明らかとなった中枢神経由来内皮細胞の糖脂質パターンの特異性は、MSをはじめとする中枢神経系自己免疫疾患の発症・進展に関与している可能性がある。

研究目的

脳毛細血管を構成する内皮細胞(brain microvascular endothelial cell, BMEC)は血液脳関門(blood-brain barrier, BBB)の本体であり、脳実質と全身循環系間のinterfaceとして重要なシステムである。我々はこれまでウシ脳毛細血管由来内皮細胞のほぼ純粋に近い培養系を確立してその含有糖脂質を分析、GM3が主要酸性糖脂質であること、GM1、GD1a、GD1b、GT1bなどの酸性糖脂質も微量成分として含有すること、培養初期にはSGPGの発現も見られることなどを報告した¹⁾。ヒト培養脳微小血管由来内皮細胞(HBMEC)に関しては、不死化した細胞系列での分析データがあるのみ²⁾、より純粋な培養の困難な初代培養系列における糖脂質の解析はいままでなされていなかった。今回、我々はほぼ純粋に近いHBMECの初代培養に成功し、その糖脂質の解析を行ったのでここに報告する。BBBを構成しない全身臓器の内皮細胞の代表としてヒト臍帯静脈由来内皮細胞(HUVEC)を用い、その構成糖脂質との比較検討を行った。

研究方法

1. HBMECの初代培養

68歳女性剖検例(肺癌、死後14時間)大脳・小脳を用いた。可及的無菌的に大脳皮質・小脳皮質を切離し、複数回の洗浄後に軟膜を剥離除去した。細切の

のちにDounce homogenizerを用いてホモジナイズし、比較的大きな(BBBに関与していない)血管を孔径230 μ mの無菌ネットで除去した後、dispase、collagenase/dispaseで酵素処理を行った。洗浄後に15% dextran/DMEM液に浮遊させて遠沈、pelletとなった内皮細胞成分を回収して、I型コラーゲンを塗布したプラスチック皿上に培養した。培養液としてはEBM-2培地(Bio-Whittaker)を用いた。培養開始10-14日目に純度の高いコロニーをクローニングし、継代培養に移行、培養第3代までの細胞を用いた。

2. 細胞系列からの糖脂質の精製

HUVECは三光純薬から購入した。それぞれの細胞系列を10cmプラスチック培養皿にほぼコンフルエントの状態(2.6×10^6 cells / dish)またはセミコンフルエント(60-70%)の状態を回収した。クロロホルム-メタノール混液で総脂質を抽出し、DEAE-Sephadex A-25カラムにて中性糖脂質および酸性糖脂質画分に分離した。各画分はSephadex LH-20カラムで脱塩した。

3. 糖脂質の構造解析

精製した中性糖脂質をシリカゲルのHigh-performance薄層クロマトグラフィー(HPTLC)にスポットして、クロロホルム:メタノール:水=60:35:5の溶液で展開した。酸性糖脂質は、クロロホルム:メタノール:0.2% CaCl₂=55:45:10の溶液で展開した。各展開後のプレートはFar-Eastern blot / mass spectrometryを用いて糖脂質の構造解析を行った。

4. HPTLC-免疫染色法

展開後のプレートをpolyisobutylmethacrylateで

1) 東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学

2) 東京医科歯科大学機器分析センター

3) エーザイ(株)研究所

Table 1 Major Glycolipids in HUVEC and HBMEC (ng/mg protein)

| | HUVEC | HBMEC |
|--------|-------|-------|
| Gb3 | 7.99 | 26.2 |
| Gb4 | 20.7 | 74.0 |
| LacCer | 14.4 | 16.1 |
| GM3 | 243.8 | 62.3 |
| LM1 | 161.7 | 54.9 |

コーティング後、一次抗体、続いてHRP 標識二次抗体で反応させ、コニカイムノステインキットで検出した。

研究結果

1. HBMEC、HUVEC の主要な中性糖脂質として

Figure 1 SGPG content of HUVEC and HBMEC in non-confluent and confluent states

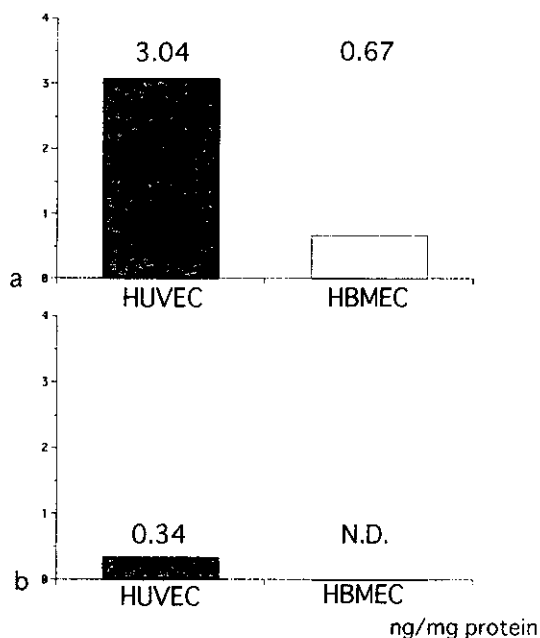


Figure 1. SGPG content of HUVEC and HBMEC in non-confluent (a) and confluent (b) states. SGPG was extremely reduced at confluent state and was not detected in HBMEC after confluency.

Gb4、Gb3、LacCer が検出された。Gb4、Gb3の2者ではHBMECがHUVECの約3倍の含有量を示した。

2. HBMEC、HUVEC の主要な酸性糖脂質はGM3とLM1であった。中性糖脂質とは反対に、HBMECでの酸性糖脂質含有量はHUVECと比較して明らかに低値であった。コレラトキシンを用いて微量の糖脂質を解析したところ4種の ganglio-N-tetraose

系 ganglioside (GM1, GD1a, GD1b, GT1b) が検出された。

3. HUVECでは抗SGPG抗体によるHPTLC免疫染色法により、HUVECの酸性糖脂質画分にSGPGの存在が認められた(Figure 1)。またセミコンフルエントの状態では、コンフルエントものよりも約10倍の発現が認められた。HBMECではセミコンフルエントの状態に置いてもSGPGの発現はHUVECと比較して明らかに少なく(Figure 1)、コンフルエントの状態では検出限界以下であった。

考察

ガングリオシドをはじめとする糖脂質は、細胞膜に局在して細胞間接着や細胞間の情報伝達、細胞内シグナリングなどに関与する重要な物質であるが、最近では各種神経疾患において自己抗体のターゲットとなりうるということがしだいに明らかとなっており、免疫性神経疾患の病理・生理を考える上で欠くことのできない地位を占めている。

今回の我々の検索では、まずヒトBMECのウシBMECとの相違点明らかとなった。ウシBMECの主要中性糖脂質はであり、ヒトBMECとは明らかに異なっていた。また、ウシBMECでも主要な酸性糖脂質はGM3とLM1であったが、前者は総量でng/mlとヒトBMECと比べて倍の含有量があり、その下流に位置するGM1, GD1aなどのガングリオシドもヒトBMECでははるかに低値であった。この相違が種差によるものか、あるいは培養液を含む培養条件の違いによる差であるのかは今後の検討課題であるが、in vitroのバリアーモデル^{3,4)}を構成する際に比較的純粋なmassを得やすいウシ細胞を用いることの妥当性は、今後論議を要する問題であろう。我々の施設でも、培養条件の改善によってヒトBMECの純粋に近い培養が可能となっており、これからはBBBの細胞学的研究はヒト細胞を用いたものが主流になっていくものと考えられる。

もう一点注目すべきは、全身一般臓器の代表としてのHUVECとの構成糖脂質の違いである。HBMECでは明らかにガングリオシドの含有量がHUVECと比べて少ないことが明らかになった。内皮細胞の膜表面に表現されているガングリオシドは、外界からの刺激の伝達をつかさどるinterfaceであり、また、自己免疫のターゲットともなりうることを考慮すると、HBMECにおけるガングリオシドの発現低下は、BBBでの外界からの侵襲を避けるprotectiveな意味合いを持つ可能性が考えられる。HBMECでのSGPG発現低下も同様のメカニズ

ムが考えられるが、増殖中の細胞ではSGPG量が
増えることも確認できた。岡ら⁵⁾はHNK-1糖鎖を
発現させたCOS細胞では細胞接着性が低下するこ
とを報告しており、細胞移動におけるHNK-1抗原
の重要性を指摘している。増殖中の内皮細胞は管腔
形成にあたって至適な位置へmigrateする必要が
あり、増殖期のSGPG発現はこの意味では合目的
であるが、これは同時に、BBB破壊から修復の過程
で内皮細胞の増殖が起こるとHNK-1抗原がより強
く内皮細胞表面に発現することを示唆する。SGPG
がリンパ球表面に発現するL-selectinのリガンドと
して作用することを我々は報告しており⁶⁾、BBBの
破壊がさらなる免疫現象を惹起して炎症の増悪に
関与する可能性を示しているものと考えられる。

結論

HBMECの糖脂質パターンを分析し、HUVECとの
比較検討を試みた。両細胞とも主要中性糖脂質は
Gb3、Gb4、LacCerの3者で、酸性糖脂質はGM3
とLM1が主体であった。HBMECはHUVECと比較
して中性糖脂質の含有量が多く、酸性糖脂質が少な
かった。SGPGはHBMEC、HUVECのいずれでも確
認可能であったが、HBMECでの含有量はHUVECと
比較して遙かに少なく、また、両者とも増殖期に発
現が強い傾向が明らかであった。本研究で明らかと
なった中枢神経由来内皮細胞の糖脂質パターンの特
異性は、MSをはじめとする中枢神経系自己免疫疾
患の発症・進展に関与している可能性がある。

文献

- 1) Kanda T et al.: Glycosphingolipid antigens in cul-
tured microvascular bovine brain endothelial cells:
sulfo-glucuronosyl paragloboside as a target of
monoclonal IgM in demyelinating neuropathy. *J Cell
Biol* 126: 235-246, 1994.
- 2) Duvar S et al.: Glycosphingolipid composition of
a new immortalized human cerebromicrovascular
endothelial cell line. *J Neurochem* 75: 1970-1976.
- 3) Kanda T et al.: Anti-GM1 antibody facilitates leak-
age in an in vitro blood-nerve barrier model. *Neurol-
ogy* 55: 585-587, 2000.
- 4) Kanda T et al.: Sera from Guillain-Barré patients
enhance leakage in blood-nerve barrier model.
Neurology 60: 301-306, 2003.
- 5) 岡昌吾ほか: 神経系における糖鎖の役割. 糖鎖リ
モデリングによるHNK-1糖鎖の解析を中心に. *細
胞工学* 20: 187-192, 2001.

- 6) Kanda T et al.: Interleukin-1beta up-regulates the
expression of sulfolucuronosyl paragloboside, a
ligand for L-selectin, in brain microvascular endot-
helial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7897-7901,
1995.

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

免疫性脱髄における PACAP の効果

分担研究者 錫村明生¹⁾

共同研究者 加藤秀紀^{1,2)}、伊藤淳¹⁾、川ノ口潤¹⁾、満間典雅¹⁾、水野哲也¹⁾

研究要旨

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide(PACAP)は、ホルモン作用、神経伝達作用などのほかに最近では神経保護作用や抗炎症作用も報告されている。今回我々は、PACAP が多発性硬化症の治療薬となりうるかを検討するために、マウスの MOG 誘導実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)に対して PACAP を投与し経過を観察した。その結果、PACAP 投与群ではコントロール群に比べ症状の軽減は十分ではなかったが、発症が著明に遅延していた。PACAP 投与群から抽出した脾臓細胞を MOG で再刺激するとコントロール群に比べ炎症性サイトカインの産生が著明に抑制されていた。脊髄の組織でも PACAP 投与群では炎症細胞浸潤が著明に減少していた。In vitro では LPS で刺激したマクロファージ、ミクログリアの TNF- α 、IL-6 などの炎症性サイトカインや IL-12 の産生を PACAP は用量依存性に抑制し、RT-PCR では LPS 刺激で増強した B7-1, B7-2 の mRNA の発現を抑制した。これらから、マクロファージ、ミクログリアから出される IL-12 の抑制、B7.1, B7.2 などの costimulatory molecules 発現の抑制により、EAE の induction phase を抑制し、発症を遅延させたと考えられた。臨床応用の可能性については、投与量・投与期間・副作用などのさらなる検討が必要と考えられた。

研究目的

PACAP は、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化を指標にヒツジ脳視床下部から単離・同定されたポリペプチドで、視床下部・脳、副腎、膵臓など全身に広く分布し、ホルモン作用や神経伝達に関する作用だけではなく脳虚血時の神経保護作用やインスリン分泌作用など多様な機能が報告されている[1]。最近では、免疫系に対する作用やマウスの実験的関節炎に対して症状の改善に有効であったとの報告もある[2-3]。そこで本研究では、PACAP が多発性硬化症の治療薬となりうるかを検討するため、EAE に対する効果、ミクログリア、マクロファージに対する作用を検討した。

研究方法

EAE は、6~8 週齢の雌 C57BL6J マウスに、CFA とエマルジョン化した MOG₃₅₋₅₅200 μ g を免疫して作製した。PACAP2.5nmol 投与群、5nmol 投与群、PBS を投与するコントロール群に分けて、day-1 から day19 まで

隔日で腹腔内注射し、臨床症状をスコア化し比較検討した。次に、5nmol 投与群とコントロール群のマウスの脾臓細胞を MOG₃₅₋₅₅ ペプチドで刺激し、IFN- γ ・TNF- α を ELISA 法で測定した。また、Day17 の 5nmol 投与群、コントロール群のマウスから脊髄を採取し、固定後 HE 染色を行い比較した。C57BL6J マウスから分離・培養したミクログリア、マクロファージのサイトカイン産生や NO 産生に対する PACAP の効果を ELISA 法、グリース法を用いて、抗原提示細胞の costimulatory molecules に対する影響を RT-PCR を行い、検討した。

研究結果

EAE の症状発現日はコントロール群で 11.9 \pm 2.1 日、PACAP2.5nmol 投与群で 13.6 \pm 1.8 日、5nmol 投与群で 17.6 \pm 2.1 日で PACAP5nmol 投与は発症を著明に遅延させたが、今回は症状の改善については有意差が得られなかった(図1)

PACAP 5nmol 投与群のマウスの脾臓細胞では、MOG₃₅₋₅₅ ペプチド刺激に対する IFN- γ 、TNF- α の産生が減少していた(図2)。PACAP5nmol 投与群の脊髄の HE 染色標本では、コントロール群と比べ炎症細胞

1)名古屋大学環境医学研究所神経免疫分野

2)名古屋市立大学神経内科

浸潤が軽度であった。

PACAP は LPS で刺激したマクロファージ、ミクログリアの TNF α , IL-12 の産生を抑制し、NO 産生も抑制させた。また、RT-PCR では、抗原提示関連遺伝子である B7-1, B7-2 の発現も抑制していた。(図 4)

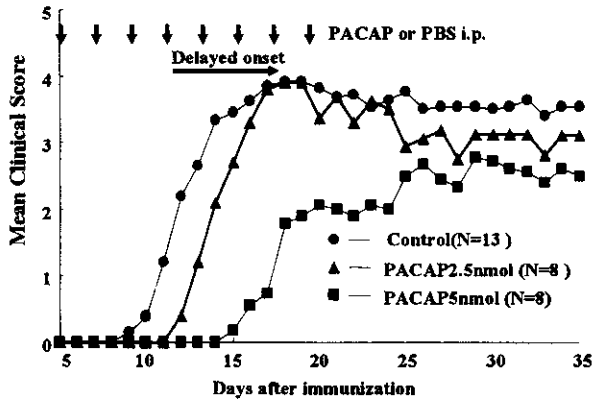


図 1.EAE 経過

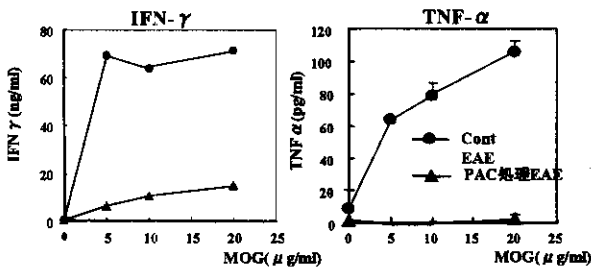


図2.MOG 反応性 T 細胞のサイトカイン産生能

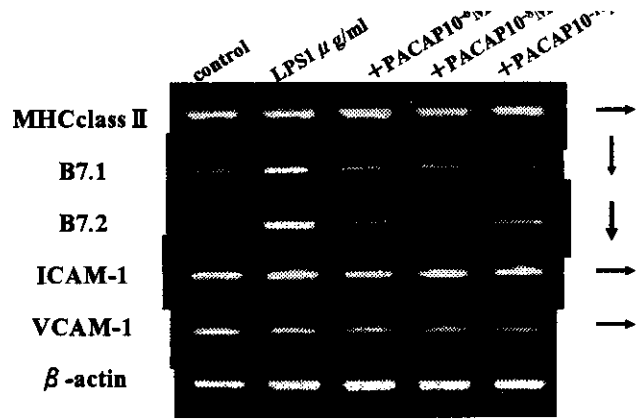


図3.PACAP の抗原提示細胞の costimulatory molecule に対する影響 (RT-PCR)

考察

PACAP は MOG₃₅₋₅ で誘導したマウスの EAE の発症を遅延させたが、これは、主にマクロファージ、ミクログリアの IL-12 産生の抑制、costimulatory molecules の発現抑制、炎症性サイトカイン産生の抑制によるものと考えられた。

しかし、collagen 誘導の関節炎モデルにおいて報告されたような著明な臨床症状の改善は今回は認められなかった。これは、EAE との発症機序の違いや、病変の部位の違いも考えられ、臨床応用のためには、今後さらに PACAP の投与量、投与期間、投与間隔などの検討が必要と考えられる。

結論

PACAP は MOG で誘導したマウスの EAE の発症を遅延させた。MS に対して有効な治療薬である可能性が示唆されたが、今後のさらなる検討が必要と考えられる。

文献

- 1) Arimura A.. 1998.Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. Jpn J Physiol.Oct;48(5):301-31.
- 2) Delgado M, Jonakait GM, Ganea D. 2002.Vasoactive

intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit chemokine production in activated microglia. *Glia*. Aug;39(2):148-61.

3) Abad C, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP, Delgado M. 2001. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits collagen-induced arthritis: an experimental immunomodulatory therapy. *J Immunol*. Sep 15;167(6):3182-9.

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得:なし

実用新案登録:なし