

HUVEC のネオラクト系ガングリオシド及び SGPG の構造解析と代謝. 第 43 回日本神経学会総会、札幌

5) 金澤俊郎、斉藤友紀、三浦義治、大和田潔、神田 隆、水澤英洋: Vasculitic neuropathy における腸管穿孔の検討. 第 43 回日本神経学会総会、札幌

6) 笹栗弘貴、山脇正永、神田 隆、水澤英洋、大場康子、森田定雄、水澤英洋: 重症筋無力症における嚥下障害パターンの検討. 第 43 回日本神経学会総会、札幌

7) 三木一徳、斉藤友紀、金澤俊郎、松本容秋、石川欽也、神田 隆、水澤英洋: ステロイド反応性腫大性脊髄病変の臨床経過・画像所見の検討. 第 43 回日本神経学会総会、札幌

8) 山脇正永、神田 隆、水澤英洋: 多発性硬化症における抗血管内皮細胞抗体の解析. 第 43 回日本神経学会総会、札幌

9) 西田陽一郎、斉藤友紀、石川欽也、山脇正永、横田隆徳、神田 隆、水澤英洋、網野猛志: 急性期反射性交感神経性ジストロフィー(RSD)は筋 MRI で異常信号を示す. 第 43 回日本神経学会総会、札幌

10) 藤本陽子、Tedder Thomas、山脇正永、神田 隆、水澤英洋: 中枢神経免疫・炎症性疾患におけるミクログリア CD83 の関与. 第 43 回日本神経

学会総会、札幌

11) 日野太郎、小林 禅、石川欽也、神田 隆、水澤英洋: 脳腫瘍様の病変を呈した多発性硬化症の臨床的特徴. 第 43 回日本神経学会総会、札幌

12) 文村優一、新谷周三、椎貝達夫、神田 隆、水澤英洋: アルコール多飲を背景とした末梢神経障害の臨床病理学的検討. 第 43 回日本神経学会総会、札幌

13) 廣田裕明、常深泰司、三浦義治、大和田潔、稲葉 彰、横田隆徳、神田 隆、水澤英洋: ビタミン B1 欠乏症における truncal neuropathy の検討. 第 43 回日本神経学会総会、札幌

14) 三木一徳、石川欽也、斉藤友紀、神田 隆、南 勲、吉澤靖之、遠藤多嘉志、小池盛雄、桶田理喜、水澤英洋: 小脳症状を伴った、抗 VGCC 抗体陽性 Lambert-Eaton 筋無力症候群の 1 剖検例. 第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会、東京

15) 山脇正永、神田 隆、水澤英洋: 末梢神経における糖脂質局在: Axolemma, myelin, Ranvier node 分画を用いた検討. 第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会、東京

16) 山脇正永、神田 隆、水澤英洋: Guillain-Barre 症候群における抗ガングリオシド抗体産生細胞の解析. 第 14 回日本神経免疫学会学術集会、東京

17) 藤本陽子、Thomas Tedder、山脇正永、神田 隆、水澤英洋: CD83 はミクログリアの活性化に關与している; CD83 ノックアウトマウスにおけるミクログリア機能の検討. 第 14 回日本神経免疫学会学術集会、東京

c. 招待講演

1) 神田 隆: 末梢神経疾患の診断. 第 32 回日本小児神経学会セミナー、逗子, 2002 年 11 月 2 日

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山村 隆	臓器特異的自己免疫病のNK/NKT細胞による調節	今西二郎、淀井淳司、湊長博、山本一彦編	別冊・医学のあゆみ、免疫疾患-state of arts. Ver. 2	医歯薬出版	東京	2002	pp 443-446
三宅幸子、山村 隆	NKT細胞糖脂質リガンドによる自己免疫性疾患制御	奥村康、平野 俊夫、佐藤昇志編	Annual Review免疫 2003	中外医学社	東京	2002	pp 71-77
山村 隆	神経免疫疾患の研究の進歩-多発性硬化症の病態機構と新しい治療法開発に関する研究		脳科学研究はここまで進んだ	じほう	東京		印刷中
山村 隆	多発性硬化症. 改訂第3版「外来診療のすべて」	高久史磨総監修		メジカルレビュー社	東京		印刷中

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyamoto K, Oka N, Kawasaki T, Miyake S, Yamamura T, and Akiguchi I	New cyclooxygenase-2 inhibitors for treatment of experimental autoimmune neuritis	Muscle and Nerve	25	280-282	2002
Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, and Brenner MB	Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining	J. Exp. Med.	195	625-636	2002
Kondo T, Takahashi K, Kohara N, Takahashi Y, Hayashi S, Takahashi H, Matsuo H, Yamazaki M, Inoue K, Miyamoto K, and Yamamura T	Heterogeneity of presenile dementia with bone cysts (Nasu-Hakola disease): Three genetic forms	Neurology	59	1105-1107	2002

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Araki M, Kondo T, Gumperz JE, Brenner MB, Miyake S and <u>Yamamura T</u>	Th2 bias of CD4 ⁺ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission	Int. Immunol.	15	279-288	2003
Sakami S, Nakata A, <u>Yamamura T</u> , and Kawamura N	Stressors increase in vitro T cell apoptosis in humans	Neuroimmunomodulation	10	224-231	2002-2003
Miyamoto K, <u>Miyake S</u> , Schachner M, and <u>Yamamura T</u>	Heterozygous null mutation of myelin P0 protein enhances susceptibility to autoimmune neuritis targeting P0 peptide	Eur. J. Immunol.	33	656-665	2003
Watabe K, Sakamoto T, Kawazoe Y, Michikawa M, Miyamoto K, <u>Yamamura T</u> , Saya H and Araki N	Tissue culture methods to study neurological disorders: Establishment of immortalized Schwann cells from murine disease models	Neuropathology			in press
Chiba A, Miyamoto K, Hashimoto H, <u>Yamamura T</u> , and <u>Miyake S</u>	Natural killer T-cell activation by OCH, a sphingosine truncated analogue of α -galactosylceramide, prevents collagen-induced arthritis				submitted
Takahashi K, <u>Miyake S</u> , Endoh M and <u>Yamamura T</u>	The regulatory role for natural killer cells in the "smouldering" state of multiple sclerosis.				submitted

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Bedoui S, <u>Miyake S</u> , Miyamoto K, Oki S, Kawamura N, Beck- Sickinger A, von Horsten S, and <u>Yamamura T</u>	Neuropeptide Y suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: Y1 receptor-specific induction of a TH2 shift in vivo				submitted
Bedoui S, Kawamura N, Straub RH, Pabst R, <u>Yamamura T</u> , and von Horsten S	Review. Relevance of neuropeptide Y for the neuroimmune crosstalk	J. Neuro- immunol.	134	1-11	2003
<u>Yamamura, T.</u> , K. Miyamoto, Zs. Illes, E. Pal, M. Araki, and <u>S. Miyake</u>	Synthetic glycolipids as potential therapeutics for autoimmune disease	Curr. Topics. Medic. Chem.			in press
宮本勝一、 <u>三宅幸子</u> 、 水野美歩、岡伸幸、 <u>山村 隆</u>	実験的自己免疫性脳脊 髄炎 (EAE) の治療に おける選択的COX-2阻 害剤の効果	神経免疫学	10	106-107	2002
林 幼偉、 <u>三宅幸子</u> 、 <u>山村 隆</u>	CD4 ⁺ CD25 ⁺ T細胞によ る実験的自己免疫性脳脊 髄炎(EAE)の調節	神経免疫学	10	108-109	2002
<u>山村 隆</u>	シンポジウム「日本に おける多発性硬化症の 多様性とその病態」動 物モデルからの提言	臨床神経学			印刷中
宮本勝一、 <u>三宅幸子</u> 、 水野美歩、岡 伸幸、 <u>山村 隆</u>	実験的自己免疫性脳脊 髄炎 (EAE) の治療に おける選択的COX-2阻 害剤の効果	神経免疫学	10	251-254	2002
<u>三宅幸子</u> 、 <u>山村 隆</u>	NKT細胞と実験的自己 免疫性脳脊髄炎.免疫病 研究の最先端. 分子制 御というアプローチ	Mebio	19	61-67	2002
荒木 学、高橋和也、 <u>山村 隆</u>	多発性硬化症における NK細胞、NKT細胞の 関与	神経内科	56	312-318	2002

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
山村 隆	NKT細胞と新しい自己免疫病治療薬	Medical Science Digest	28	306-307	2002
宮本勝一、三宅幸子、山村 隆	糖脂質による自己免疫病の制御	感染・炎症・免疫	32	200-201	2002
山村 隆、宮本勝一、長山成美、三宅幸子	NK・NKT細胞による実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の発症制御	蛋白質核酸酵素増刊号	47	1115-1120	2002
宮本勝一、三宅幸子、山村 隆	自己免疫性脳脊髄炎に対するNKT細胞糖脂質リガンド療法	神経免疫学	10	209-211	2002
佐藤準一、山村 隆	多発性硬化症におけるインターフェロンベータ療法の効果発現機序	医療			印刷中
山村 隆	NKT細胞による自己免疫疾患の制御	Molecular Medicine			印刷中
長山 成美、山村 隆	抗コレステロール薬によるTh2優位の誘導（MSの治療への応用は可能か？）	臨床免疫			印刷中
Rao N, Miyake S, Reddi AL, Douillard P, Ghosh AK, Dodge IL, Zhou P, Fernandes ND and Band H.	Negative regulation of Lck by Cbl ubiquitin ligase	Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	99	3794-3799	2002

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Kikuchi S</u> , Shinpo K, Niino M, Tsuji S, Iwabuchi K, Onoe K, Tashiro K.	Prostaglandin E1 protects cultured spinal neurons against the effects of nitric oxide toxicity.	Neuropharmacology	42	714-723	2002
Niino M, <u>Kikuchi S</u> , <u>Fukazawa T</u> , Yabe I, Tashiro K.	No association of vitamin D-binding protein gene polymorphisms in Japanese patients with MS.	J. Neuroimmunol.	127	177-179	2002
<u>Kikuchi S</u> , <u>Fukazawa T</u> , Niino M, Yabe I, Miyagishi R, Hamada T, Tashiro K.	Estrogen receptor gene polymorphism and multiple sclerosis in Japanese patients: interaction with HLA-DRB1*1501 and disease modulation.	J. Neuroimmunol	128	77-81	2002
Niino M, <u>Kikuchi S</u> , <u>Fukazawa T</u> , Tashiro K.	Genetic susceptibility to multiple sclerosis: implications of genetic research on MS therapy.	Expert Review of Neurotherapeutics	2	329-338	2002
Niino M, <u>Kikuchi S</u> , <u>Fukazawa T</u> , Miyagishi R, Yabe I, Tashiro K.	An examination of the Apo-1/Fas promoter Mva I polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis.	BMC Neurol	2	8	2002
<u>Kikuchi S</u> , Niino M, Shinpo K, Terae S, Tashiro K.	Intracranial hemorrhage in neuro-Behçet's syndrome.	Intern Med.	41	692-695	2002
<u>Kikuchi S</u> , Niino M, <u>Fukazawa T</u> , Yabe I, Tashiro K.	An assessment of the association between IL-2 gene polymorphisms and Japanese patients with multiple sclerosis.	J Neurol Sci.	205	47-50	2002
Niino M, <u>Kikuchi S</u> , Miyagishi R, <u>Fukazawa T</u> , Yabe I, Tashiro K.	An examination of the association between $\beta 2$ adrenergic receptor polymorphisms and multiple sclerosis.	Mult. Scler.	8	475-478	2002
<u>Kikuchi S</u> , Shinpo K, Niino M, Tashiro K.	Subacute syphilitic meningomyelitis with characteristic spinal MRI findings.	J. Neurol.	250	106-107	2003
<u>Kikuchi S</u> , <u>Fukazawa T</u> , Niino M, Yabe I, Miyagishi R, Hamada T, Hashimoto S, Tashiro K.	HLA-related subpopulations of MS in Japanese with and without oligoclonal IgG bands.	Neurology	60	647-651	2003
Niino M, <u>Kikuchi S</u> , <u>Fukazawa T</u> , Yabe I, Tashiro K.	Genetic polymorphisms of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients.	J. Neuroimmunol.			in press
<u>Fukazawa T</u> , <u>Kikuchi S</u> , Niino M, Yabe I, Hamada T, Tashiro K	Multiphasic demyelinating disorder with acute transverse myelitis in Japanese.	J Neurol.			in press
Houzen H, Niino M, <u>Kikuchi S</u> , <u>Fukazawa T</u> , Nogoshi S, Matsumoto H, Tashiro K.	The prevalence and clinical characteristics of MS in northern Japan	J. Neurol. Sci.			in press
菊地 誠志, 深澤 俊行, 新野 正明, 宮岸 隆司, 田代 邦雄.	疫学および免疫学的側面からみた候補遺伝子の検討.	神経免疫学	10	21-22	2002
輿水 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.	神経免疫学	10	48-49	2002

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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*0501の再検討.	神経免疫学	10	50-51	2002
新野 正明, 岩淵 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.	神経免疫学	10	110-111	2002
菊地 誠志, 深澤 俊行, 新野 正明, 宮岸 隆司, 東 琢哉, 田代 邦雄.	疫学および免疫学的側面からみた多発性硬化症関連候補遺伝子の検討.	神経免疫学	10	185-190	2002
深澤 俊行, 出井 聡	神経難病 その診断から福祉の実際まで -MS (多発性硬化症) -	Modern Physician	22	573-578	2002
深澤 俊行	多発性硬化症における対症療法.	Modern Physician	22	931	2002
深澤 俊行	多発性硬化症寛解期におけるIFN β 1-bの導入-患者への説明の秘訣.	Modern Physician	22	1160	2002
深澤 俊行	脊椎脊髄疾患と薬物療法-特発性炎症性脱髄疾患 (多発性硬化症, 急性散在性脳脊髄炎)	脊椎脊髄ジャーナル			in press
深澤 俊行	多発性硬化症の疾患感受性遺伝子	日本臨床			in press
高砂子由佳子, 野村恭一, 大野良三, 島津邦男	慢性期ラクナ梗塞におけるリンパ球接着分子LFA-1, VLA-4と血管内皮接着分子ICAM-1, VCAM-1および脳血管危険因子との関連	脳卒中	23	316-324	2001
柴木謙次, 野村恭一, 大野良三, 島津邦男	人参養栄湯による実験的自己免疫性脳脊髄炎の抑制	神経治療	19	159-166	2002
野村恭一	ダニと神経疾患 21世紀の神経免疫学展望	別冊医学のあゆみ		109-114	2001
Takashi Kanda; Masanaga Yamawaki and Hidehiro Mizusawa	Sera from Guillain-Barre patients enhance leakage in blood-nerve barrier model	Neurology	60	301-306	2003
藤本陽子, 藤本学, 吉竹聡子, 大河内仁志, 山脇正永, 神田隆, Thomas F. Tedder, 水澤英洋	CD83によるミクログリア活性化の制御	Neuroimmunology	10	243-249	2002

20020748

以降 P.84ーP.158までは以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、P.78- P.83の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

V. 平成 14 年度班会議プログラム

「多発性硬化症に対するインターフェロン
療法の効果の発現及びその持続性に関する
要因などの解析に関する研究」班

主任研究者 山村 隆

平成 14 年度班会議
抄録集

日程： 平成 14 年 12 月 17 日 (火)

場所： 全共連ビル 1 階 No.2 会議室

住所： 東京都千代田区平河町 2-7-9

TEL： 03-5215-9501

日 程

平成14年12月17日（火）

開会の辞

プロジェクト研究の確認とお願い 主任研究者： 山村 隆

教育講演（1） 座長： 神田 隆

DNA マイクロアレイの疾病研究への応用 座長： 三宅 幸子

教育講演（2） 座長： 山村 隆

MS の免疫療法 座長： 太田 宏平

MS 臨床関連トピック 座長： 川井 充

プロジェクト研究の途中経過と成果報告 佐藤 準一 他

閉会の辞

プログラム

1:00 -1:10 ご挨拶 ~ プロジェクト研究の確認とお願い
国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 山村 隆

1:10 -1:40 教育講演 (1) 座長: 神田 隆

インターフェロン療法- この一年の話題
北海道大学神経内科 深浦 彦彰
北祐会神経内科病院 深澤 俊行

1:40 -2:20 DNA マイクロアレイの疾病研究への応用 座長: 三宅 幸子

1. 培養ヒト脳毛細血管由来内皮細胞に発現する遺伝子の解析
東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学 神田 隆 他

2. Gene Chip を用いた DNA アレイ解析の実例とその問題点についての検討
国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 三宅 幸子 他

2:20- 2:50 教育講演 (2) 座長: 山村 隆

インターフェロンシグナルと免疫疾患
- IRF ファミリー転写因子欠損マウスの解析から
東京大学医学部免疫学教室 高柳 広

2:50-3:05 コーヒーブレイク

3:05-3:30 MS の免疫療法 座長: 太田 宏平

3. アミノ酸代謝阻害剤による EAE の抑制及びインターフェロン β の持つ役割
順天堂大学脳神経内科 横山 和正

4. 免疫吸着療法は多発性硬化症の免疫異常を調節し再発を抑制する
埼玉医科大学神経内科 野村 恭一 他

3:30-4:10 MS 臨床関連トピック 座長: 川井 充

平成 14 年度

「多発性硬化症に対するインターフェロン療法の効果の発現及び
その持続性に関する要因等の解析に関する研究」
班会議抄録用紙

演題：

培養ヒト脳毛細血管由来内皮細胞に発現する遺伝子の解析

所属・氏名：

東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学
神田 隆、大和田潔、岡本尚子、山脇正永、水澤英洋

【目的】血液脳関門(BBB, blood-brain barrier)の本体である脳毛細血管内皮細胞における遺伝子発現パターンを、臍帯静脈由来内皮細胞との比較で明らかにする。

【方法】 Cell Culture: ヒト脳毛細血管内皮細胞(HBMEC)は、68歳女性剖検脳(死後14時間)から採取した。可及的無菌的に大脳・小脳皮質を採取し、抗生物質を添加したDMEMで数回洗浄した後に軟膜を剥離し、細切後Dounce homogenizerを用いてhomogenizeした。比較的大きな血管を孔径230 μ mの無菌ネットで除去した後、dispaseおよびcollagenase-dispaseで処理し、15%デキストラン/DMEM溶液に浮遊させて血管成分(主に内皮細胞塊からなる)を遠沈分離した。洗浄後、内皮細胞塊をI型コラーゲン塗布60mm plastic dish (Biocoat)上に播種し、EBM-2 media (BioWhittaker)を用いて37 $^{\circ}$ C、5%CO₂の条件下で培養を行った。培養10-14日目に純度の高い内皮細胞コロニーをクローニングし、継代培養に用いた。本実験には培養3-代目までのものを用いた。内皮細胞の同定には①抗von Willebrand抗原を用いた免疫染色、②Dil-acetylated LDLのuptakeの二つを用い、HBMECの純度はほぼ98%以上を確保可能であった。ヒト臍帯静脈由来内皮細胞(HUVEC)は三光純薬から購入したのものを用いた。

DNA microarray: DNA chipはHuman 3K CHIP (Takara)を用いた。amplified RNAを鋳型とし、reverse transcriptaseにより逆転写反応でCy3, Cy5dUTPをとりこませた。Internal controlとしてlambda polyA RNAを逆転写反応時に等量ずつ添加し、ハイブリダイゼーションには65 $^{\circ}$ C、14時間の条件下でCy3標識プローブとCy5標識プローブを混合して使用した。洗浄後、Affymetrix 428 array scannerを使用し、Cy3, Cy5各検出波長において、シグナル強度に応じた3段階の検出感度で測定を行った。

【結果】HBMECにはBBB特異的蛋白であるATP-binding cassette subfamily B, member 1 (MDR, P-glycoprotein)とglucose transporter 1 (GLUT1)の遺伝子が発現し、HUVECには全く発現していないことをまず確認した。Table 1に検索したケモカイ

ンのリストとそのメッセージの発現を示す。今回調べ得た24種類のケモカインの内、非刺激状態でHBMECにメッセージが確認できたのは8種類、HUVECでは9種類であった。非刺激状態でHBMECに陽性、かつHUVECに陰性であるのはCX₃CL1 (fractalkine)とCXCL10で、CXCL1(GRO1 oncogene)は両者とも陽性でHBMECのシグナル強度がHUVECに勝っていた。CCL5 (RANTES)およびCXCL2 (GRO2 oncogene)は HUVECのシグナルがHBMECに勝っていた。CCL7, CCL18, CXCL12の3者はHUVECにのみきわめて低いシグナルが確認された。

Table 1 Chemokines expressed in non-stimulated HBMEC and HUVEC

CCL1 (I-309)	null
CCL2 (MCP-1)	B=U
CCL3 (Mip-1a)	null
CCL4 (Mip-1b)	null
CCL5 (RANTES)	B<U
CCL7 (MCP-3)	U
CCL11 (eotaxin)	null
CCL13 (MCP-4)	null
CCL16 (HCC-4/LEC)	null
CCL18 (PARC/DC-CK1/MIP-4/AMAC-1)	U
CCL19 (ELC/MIP-3b/exodus-3/CKb11)	null
CCL20 (LARC/MIP-3a/Exodus)	null
CCL21 (SLC/6CKine/exodus-2/TCA-4)	null
CCL25 (TECK)	null
CXCL1 (GRO1 oncogene)	B>U
CXCL2 (GRO2 oncogene)	B<U
CXCL4 (PF4)	null
CXCL8 (IL8)	B=U
CXCL9 (monokine induced by interferon)	null
CXCL10	B
CXCL12 (stromal-derived factor)	U
CXCL13 (BLC/BCA-1)	null
CX ₃ CL1 (fractalkine)	B
EMAP II	B=U

null, not expressed.; B, expressed in HBMEC; U, expressed in HUVEC

【考察】血管内皮細胞は全身臓器にあまねく存在する重要な細胞であるが、臓器毎のcharacterの違いが近年次々に明らかになっており、BBBの細胞学的理解にはBBBを構成する内皮細胞の分析が必須である。発表者のグループは長らくウシ脳毛細血管由来内皮細胞を用いた機能解析を行っていたが、種差の問題や使用できる抗体、DNAプローブの限界から、ヒト細胞培養法の確立をこの数年間目指していた。今回、メッセージの解析が可能なレベルの純度の高いヒト脳毛細血管由来内皮細胞の培養に成功し、上記の結果を得た。培養BMECにはHUVECに存在しないBBB特異蛋白であるP-glycoprotein, GLUT1のメッセージを確認し、本実験で用いたHBMECがBBBを構成する毛細血管内皮細胞由来のものであることが明らかとなった。今回の解析で明らかになったケモカインの発現パターンのみをとってみても、HBMECと全身諸臓器の内皮細胞の代表としてのHUVECとでは大きな差異があり、この違いがBBBを介する免疫現象を制御している可能性が考えられる。現在、HBMECに対してTNF- α 、およびMS治療薬として広く用いられているinterferon β 1bを添加し、同刺激下におけるメッセージ発現の解析が進行中である。

【結論】①ヒト脳毛細血管由来内皮細胞の純度の高い培養に成功し、非刺激状態におけるケモカインを中心としたメッセージ発現をDNA arrayを用いて分析した。②HUVECとの比較で、明らかな発現パターンの相違を確認した。

平成 14 年度

「多発性硬化症に対するインターフェロン療法の効果の発現及びその持続性に関する要因などの解析に関する研究」班

演題

「Gene Chip を用いた DNA アレイ解析の実例とその問題点についての検討」

三宅幸子、大木伸司、高橋和也、山村隆

国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

目的：Gene Chip を用いた DNA アレイによる解析を行い、cDNA アレイとの比較によって、利点、問題点について検討した。

方法： α -GC の誘導体の中から、EAE を抑制する誘導体 OCH の合成に成功した。そこで、OCH と α -GC による NKT 細胞刺激による遺伝子発現の違いについて Affimetrix 社の Gene Chip を用いて解析を行った。NK 細胞を除去するために抗アシアロ GM1 抗体を投与し、40 時間後に OCH もしくは α -GC を末梢での NKT 細胞の比率が高い MHC Class II ノックアウトマウスの腹腔内に投与した。1.5 時間後(early phase)と 12 時間後(late phase)に肝臓ならびに脾臓よりリンパ球を抽出し、MAX ビーズを用いて NK1.1 抗体による positive selection を行い、NKT 細胞を得た。この細胞から mRNA を抽出し、約 6,000 種類のマウス完全長遺伝子および約 6,000 の EST が解析可能な GeneChip Murine Genome U74A Ver.2 (Affimetrix 社) を用いて遺伝子発現を検討した。解析には、Gene Spring® (TDB/SiG)を用い、コントロール群、OCH 投与群、 α -GC 投与群の 3 群で比較した。

ヒトの臨床検体を用いた解析としては、全身性エリテマトーデス患者において、T 細胞刺激によって著しくアポトーシスの亢進する群と、軽度亢進する群、健常コントロールの 3 群で T 細胞刺激前後での遺伝子プロファイルを約 12,000 種類のヒト完全長遺伝子が解析可能な Human Genome U95A

Array(Affimetrix 社) を用いて検討した。解析には、Gene Spring® (TDB/SiG) を用いた。

結果: マウスの系においては、クラスター解析によって、early phase では α -GC 投与群でのみ増加するもの、OCH 投与群でのみ増加するもの、 α -GC 投与群・OCH 投与の両群で低下するものがみられた。 α -GC 投与群でのみ増加する遺伝子の多くは、OCH でも誘導されているが発現の程度は低かった。これらの遺伝子群にはサイトカインや、ケモカインなどが多数みられ、他の実験系から得られた結果とよく一致した。

臨床サンプルを用いた系においては、患者間でのばらつきが多いが、クラスター解析によって挙動の一致する遺伝子のプロファイルが得られた。これらの遺伝子発現が他の実験系と一致するかについては、real time PCR や細胞表面分子の Flow cytometry を用いた解析などにより、現在検討中である。

考察: Gene Chip を用いた解析は、他の実験結果ともよく合致し、信頼性のあるものと考えられた。cDNA アレイと比較して、Gene Chip での解析は、EST を含む多数の遺伝子の解析が可能であること、多数の群間での比較が容易であるなどの利点があった。しかし、EST については、その後どのように標的を選定していくかについての課題が残った。また、Chip が高価であり大量のサンプル解析には不適である。臨床応用に使う場合、Gene Chip でスクリーニングし、遺伝子を絞り込んでから、廉価な cDNA アレイを作製し、臨床応用することが現実的であると考えられた。

平成 14 年度

「多発性硬化症に対するインターフェロン療法の効果の発現及び
その持続性に関する要因等の解析に関する研究」

演題 : アミノ酸代謝阻害剤による EAE の抑制及びインターフェロン β のもつ役割

所属、氏名 : 順天堂大学脳神経内科 横山 和正

研究目的

インターフェロン β 療法の日本での使用症例数はすでに 1500 症例を越え、再発を予防でき個体差が認められること。さらには再発した場合でも臨床症状が軽度におさえられることが欧米の報告例同様、あきらかとなってきた。しかし中には使用時期を考えなかったための再発や、重篤な副作用もしくは、中止後の増悪も散見されている。これらの事実は個々の症例、ときには同じ個人でもその時期によってはインターフェロンによる免疫寛容を維持するメカニズムが異なっていることを示唆している。

昨年度は代表的な active challenge による実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)において必須アミノ酸代謝を介した生理的免疫寛容機構が症状を抑制する可能性を明らかにした。

本年は昨年報告したアミノ酸代謝阻害剤が 1) 誘発方法が異なる実験的自己免疫性脳脊髄炎に対して同じ効果を発揮するのか、2) 細胞性免疫が EAE と同様病態に重要と考えられる NOD マウスを利用した I 型糖尿病モデルにおいても発病抑制効果を持つのかを検討し、アミノ酸代謝阻害剤の寛容のメカニズムをさらに解析することを目的とした。

研究方法

double blind 下に必須アミノ酸であるトリプトファンの酸化酵素である indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)代謝阻害剤を MBP-TCR トランスジェニックマウスの皮下に埋め込んだ群とプラセボコントロール群とに分け、EAE の発症期間、重症度について検討した。

ここで MBP-TCR トランスジェニックマウスは EAE の自然発症率が 5-30%であるが PTX を腹腔内に投与することで 2 週間以内に 100%のマウスに病気を引き起こすことができるためこの系を利用することとした。

IDDM モデルでは糖尿病の発現までに約 4-8 週間必要であり尿検査で糖尿病の有無を判定することができる。しかしわれわれが使用してきた除放剤の効果は 10 日前後であるため IDDM モデルを利用した実験系では経過中 IDO 代謝阻害剤の血中濃度を維持することが困難であり IDO gene を発現させたベクターを作製し in vivo での実験を行った。

結果

IDO 代謝阻害剤、プラセボコントロール群いずれにおいてもトランスジェニックマウスを利用した EAE の重症度の改善、症状の発現を遅らせることはできなかった。IDDM マウスにおける実験系においても糖尿病の発現頻度、期間を低下させることができなかった。

考察

免疫寛容に関しては同一のモデルで最終像は同じであっても常に同じ機序が働いているとは限らない。これは昨年度の報告で導入期にのみ IDO 代謝阻害剤による EAE の抑制効果が認められたが効果期には抑制効果が認められなかったことを考えると、本年度の実験で PTX 投与による MBP-TCR トランスジェニックマウスにおける EAE の誘導をブロックできなかったことは、このマウスにおいて発症の抑制には効果期における特異的な免疫寛容の誘導が必要であると考えられ、導入期に免疫寛容を誘導すると考えられるアミノ酸代謝阻害薬の抑制効果は認められなかった。多発性硬化症患者にインターフェロン治療を行う上でもこのような個体差、使用時期による寛容のメカニズムのさらなる解析を並行して行っていくことが重要であり遺伝子治療と同様テーラーメイド医療を実践し、より有効な特異的な治療を行っていく上の基礎実験として今回の結果は興味深い。

結論

自己免疫疾患における免疫寛容は一様ではなく病期及び個体差も考える必要がある。