

injection of α -GalCer on the day of EAE induction or after EAE onset is not preventive against EAE not only in Japan but in laboratories in the USA as well.

Concluding remarks

As we discussed in this review, ligand stimulation of regulatory cells is an attractive strategy for prevention or treatment of autoimmune diseases. Our results support the idea that NKT cell stimulation with glycolipid ligand is truly useful in control of autoimmune disease in model systems. Whereas both rodent and human NKT cells recognize α -GalCer in the context of CD1d, human NKT cells also recognize the OCH analogue (Araki et al. unpublished). Owing to the evolutionary conservation and the homogeneous ligand specificity of NKT cells, we could apply a glycolipid ligand like OCH for the treatment of human disease without considering species barrier or genetic heterogeneity of humans. Apart from considering the clinical point, our current energy should be focused on understanding how stimulation with different glycolipid ligands leads to differential effector functions of NKT cells. Screening of AGLs for inducing functional modulation of NKT cells is also important as this process would help us identify novel ligands of clinical value. It is also surely worth while to screen natural products in the same manner. Although microbial lipids have not been identified as NKT cell ligands, it can be speculated that they are probably an interesting natural source of useful ligands for CD1-restricted regulatory cells.

REFERENCES

- [1] Hohlfield, R. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain* 1997, 120 (Pt5), 865-916.
- [2] Bashir, K.; Whitaker, J.N. Current immunotherapy for demyelinating diseases. *Arch. Neurol.* 2002, 59, 726-731.
- [3] Steinman, L. Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy. *Neuron* 1999, 24, 511-514.
- [4] Kuchroo, V.K.; Anderson, A.C.; Waldner, H.; Munder, M.; Bettelli, E.; Nicholson, L.B. T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. *Annu. Rev. Immunol.* 2002, 20, 101-123.
- [5] Panitch, H.S.; Hirsch, R.L.; Schindler, J.; Johnson, K.P. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 1987, 37, 1097-1102.

- [6] Bielekova, B.; Goodwin, B.; Richert, N.; Cortese, I.; Kondo, T.; Afshar, G.; Gran, B.; Eaton, J.; Antel, J.; Frank, J.A.; McFarland, H.F.; Martin, R. Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 1167-1175.
- [7] Martin, R.; McFarland, H. F. Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **1995**, *32*, 121-182.
- [8] Steinman, L. Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 762-764.
- [9] Ota, K.; Matsui, M.; Milford, E.L.; Mackin, G.A.; Weiner, H.L.; Hafler, D.A. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* **1990**, *346*, 183-187.
- [10] Ohashi, T.; Yamamura, T.; Inobe, J.; Kondo, T.; Kunishita, T.; Tabira, T. Analysis of proteolipid protein (PLP)-specific T cells in multiple sclerosis: identification of PLP95-116 as an HLA-DR2,w15-associated determinant. *Int. Immunol.* **1995**, *7*, 1771-1778.
- [11] Wallstrom, E.; Khademi, M.; Abderson, M.; Weissert, R.; Linington, C.; Olsson, T. Increased reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides and epitope mapping in HLA DR2 (15)+ multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* **1998**, *28*, 3329-3335.
- [12] Chen, L.Z.; Hochwald, G.M.; Huang, C.; Dakin, G.; Tao, H.; Cheng, C.; Simmons, W.J.; Dranoff, G.; Thorbecke, G.J. Gene therapy in allergic encephalomyelitis using myelin basic protein-specific T cells engineered to express latent transforming growth factor-beta1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*: 12516-12521.
- [13] Setoguchi, K.; Misaki, Y.; Araki, Y.; Fujio, K.; Kawahata, K.; Kitamura, T.; Yamamoto, K. Antigen-specific T cells transduced with IL-10 ameliorate experimentally induced arthritis without impairing the systemic immune response to the antigen. *J. Immunol.* **2000**, *165*: 5980-5986.
- [14] Wekerle, H.; Bradl, M.; Linington, C.; Kaab, G.; Kojima, K. The shaping of the brain-specific T lymphocyte repertoire in the thymus. *Immunol. Rev.* **1996**, *149*, 231-243.
- [15] Bendelac, A.; Rivera, M. N.; Park, S.; Roark, J. H. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* **1997**, *15*, 535-562.
- [16] Godfrey, D. I.; Hammond, K. J.; Poulton, L. D.; Smyth, M. J.; Baxter, A. G. NKT cells: facts, functions and fallacies, *Immunol. Today* **2000**, *21*, 573-583.
- [17] Shevach, E.M. Certified professionals. CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells. *J. Exp. Med.* **2001**, *193*, F41-F46.
- [18] Zhang, B.N.; Yamamura, T.; Kondo, T.; Fujiwara, M.; Tabira, T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J. Exp.*

Med. **1997**, 186, 1677-1687.

[19] Pedotti, R.; Mitchell, D.; Wedermeyer, J.; Karpuj, M.; Chabas, D.; Hattab, E.M.; Tsai, M.; Galli, S.J.; Steinman, L. An unexpected version of horror autotoxicus: anaphylactic shock to a self-peptide. *Nat. Immunol.* **2001**, 2, 216-222.

[20] Wilson, S. B.; Kent, S. C.; Patton, K. T.; Orban, T.; Jackson, R. A.; Exley, M.; Porcelli, S.; Schatz, D. A.; Atkinson, M. A.; Balk, S. P.; Strominger, J. L.; Hafler, D. A. Extreme Th1 bias of invariant V α 24J α Q T cells in type 1 diabetes. *Nature* **1999**, 391, 177-181.

[21] Illés, Z.; Kondo, T.; Newcombe, J.; Oka, N.; Tabira, T.; Yamamura, T. Differential expression of NK T cell Va24JaQ invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Immunol.* **2000**, 164, 4375-4381.

[22] Kronenberg, M.; Gapin, L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat. Immunol.* **2002**, 2, 557-568.

[23] Kawano, T.; Cui, J.; Koezuka, Y.; Toura, I.; Kaneko, Y.; Motoki, K.; Ueno, H.; Nakagawa, R.; Sato, H.; Kondo, E.; Koseki, H.; Taniguchi, M. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V α 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* **1997**, 278, 1626-1629.

[24] Brossay, L.; Naidenko, O.; Burdin, N.; Matsuda, J.; Sakai, T.; Kronenberg, M. Structural requirements for galactosylceramide recognition by CD1-restricted NK T cells. *J. Immunol.* **1998**, 161, 5124-5128.

[25] Brossay, L.; Chioda, M.; Burdin, N.; Koezuka, Y.; Casorati, G.; Dellabona, P.; Kronenberg, M. CD1d-mediated recognition of an α -galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J. Exp. Med.* **1998**, 188, 1521-1528.

[26] Spada, F.M.; Koezuka, Y.; Porcelli, S.A. CD1d-restricted recognition of a synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J. Exp. Med.* **1998**, 188, 1529-1534.

[27] Schofield, L.; McConville, M.J.; Hansen, D.; Campbell, A.S.; Fraser-Reid, B.; Grusby, M.J.; Tachado, S.D. CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. *Science* **1999**, 283, 225-229.

[28] Gumperz, J.E.; Roy, C.; Makowska, A.; Lum, D.; Sugita, M.; Podrebarac, T.; Koezuka, Y.; Porcelli, S.A.; Cardell, S.M.; Brenner, M.B.; Behar, S.M. Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. *Immunity* **2000**, 12, 211-221.

[29] Pal, E.; Tabira, T.; Kawano, T.; Taniguchi, M.; Miyake, S.; Yamamura, T. Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of V α 14 NKT cells. *J. Immunol.* **2001**, 166,

662-668.

- [30] Windhagen, A.; Scholz, C.; Hollsberg, P.; Fukaura, H.; Sette, A.; Hafler, D.A. Modulation of cytokine patterns of human autoreactive T cell clones by a single amino acid substitution of their peptide ligand. *Immunity* 1995, 2, 373-380.
- [31] Moody, D.B.; Besra, G.S.; Wilson, I.A.; Porcelli, S.A. The molecular basis of CD1-mediated presentation of lipid antigens. *Immunol. Rev.* 1999, 172, 285-296.
- [32] Miyamoto, K.; Miyake, S.; Yamamura, T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 2001, 413, 531-534.
- [33] Wang, B.; Geng, Y. B.; Wang, C. R. CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes. *J. Exp. Med.* 2001, 194, 313-320.
- [34] Hong, S.; Wilson, M. T.; Serizawa, I.; Wu, L.; Singh, N.; Naidenko, O. V.; Miura, T.; Haba, T.; Scherer, D. C.; Wei, J.; Kronenberg, M.; Koezuka, Y.; van Kaer, L. The natural killer T-cell ligand α -galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat. Med.* 2001, 7, 1052-1056.
- [35] Sharif, S.; Arreaza, G. A.; Zucker, P.; Mi, Q. S.; Sondhi, J.; Naidenko, O. V.; Kronenberg, M.; Koezuka, Y.; Delovitch, T. L.; Gombert, J. M.; Leite-De-Moraes, M.; Gouarin, C.; Zhu, R.; Hameg, A.; Nakayama, T.; Taniguchi, M.; Lepault, F.; Lehuen, A.; Bach, J. F.; Herbelin, A. Activation of natural killer T cells by α -galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune type 1 diabetes. *Nat. Med.* 2001, 7, 1057-1062.
- [36] Jahng, A.W.; Maricic, I.; Pedersen, B.; Burdin, N.; Naidenko, O.; Kronenberg, M.; Koezuka, Y.; Kumar, V. Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 2001, 194, 1789-1799.
- [37] Singh, A.K.; Wilson, M.T.; Hong, S.; Olivares-Villagomez, D.; Du, C.; Stanic, A.K.; Joyce, S.; Sriram, S.; Koezuka, Y.; Van Kaer, L. Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 2001, 194, 1801-1811.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Structure of α -galactosylceramide and its derivatives

Previous studies [23,24] showed that the 2-hydroxyl group of the galactose moiety and the 3,4-hydroxyl groups of the phytosphingosine are critical for NKT cell recognition of α -GalCer. The 2-hydroxyl group is replaced by NH_2 in the NH analogue, whereas the 3,4-hydroxyls are removed in the 3,4D analogue. The OCH

analogue has a shorter sphingosine chain compared with α -GalCer.

Figure 2: Modulation of NKT cell cytokine production by co-stimulation blockade or with an altered ligand

α -GalCer induces production of both Th1 (IFN- γ) and Th2 (IL-4) cytokines, and therefore, is unable to control EAE (middle). We have found that NKT cells predominantly produce IL-4 when they are stimulated with α -GalCer in the absence of CD28/B7.2 co-stimulation [29] or if stimulated with an altered ligand OCH [32].

Figure 3: Effect of glycolipid ligands *in vivo*

A: Changes in serum cytokine levels after injection of α -GalCer or OCH

B6 mice were injected intraperitoneally with 100 μ g/kg of α -GalCer or OCH, and serum samples were obtained at indicated times after injection. Serum levels of IL-4 and IFN- γ were measured by using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

B: Preventive effects of OCH against EAE

Wild-type B6 or IL-4^{-/-} mice were injected with an inoculum containing 100 μ g of MOG35-55 peptide and 1 mg of *Mycobacterium tuberculosis* in incomplete Freund's adjuvant. Pertussis toxin (200 ng) was injected intravenously on day 0 and day 2 after immunization. Oral administration of OCH on the day of sensitization significantly suppressed the development of EAE (left). In contrast, OCH was not effective in IL-4 knockout mice (right), or when OCH was co-injected with anti-IL-4 mAb. The clinical signs were scored as follows: 0, no clinical signs, 1, partial loss of tail tonicity; 2, completely limp tail and abnormal gait; 3, partial hind-limb paralysis; 4, complete hind-limb paralysis; 5, fore- and hind-limb paralysis or a moribund state.

Table: Suppression of EAE with NKT cell stimulation by glycolipid ligands

Mice	Glycolipid	NKT cell production of		EAE
		IL-4	IFN- γ	
Wild-type B6	α -GalCer	+	+	<i>no change</i>
IFN- γ ^{-/-}	α -GalCer	+	-	<i>suppressed</i>
IL-4 ^{-/-}	α -GalCer	-	+	<i>enhanced</i>
Wild-type B6	α -GalCer+anti-B7.1	+	+	<i>no change</i>
Wild-type B6	α -GalCer+anti-B7.2	+	-	<i>suppressed</i>
Wild-type B6	<i>OCH</i>	+	-	<i>suppressed</i>

This is the summary of the results obtained in our laboratory [29, 32].

Fig 1 Yamamura

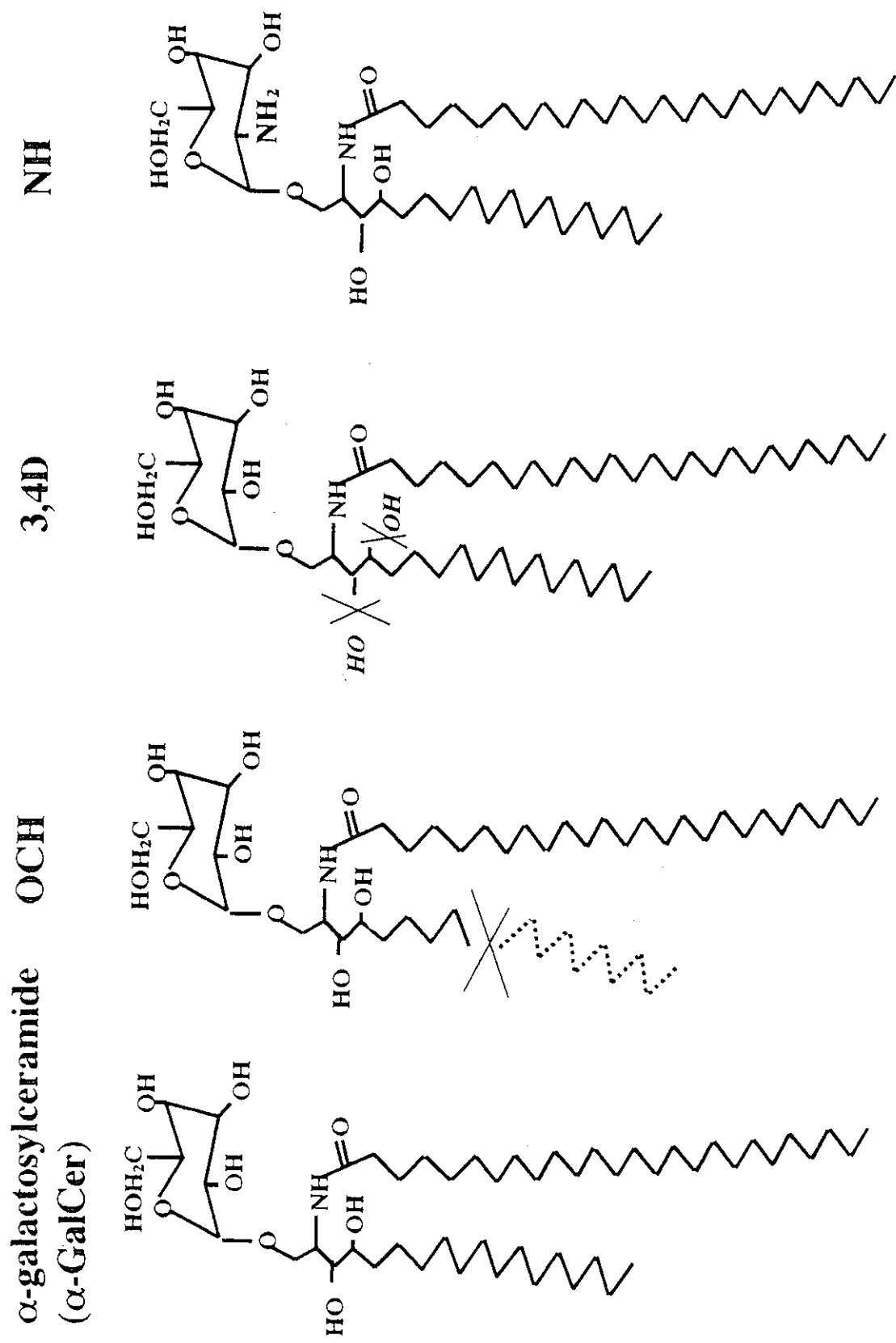
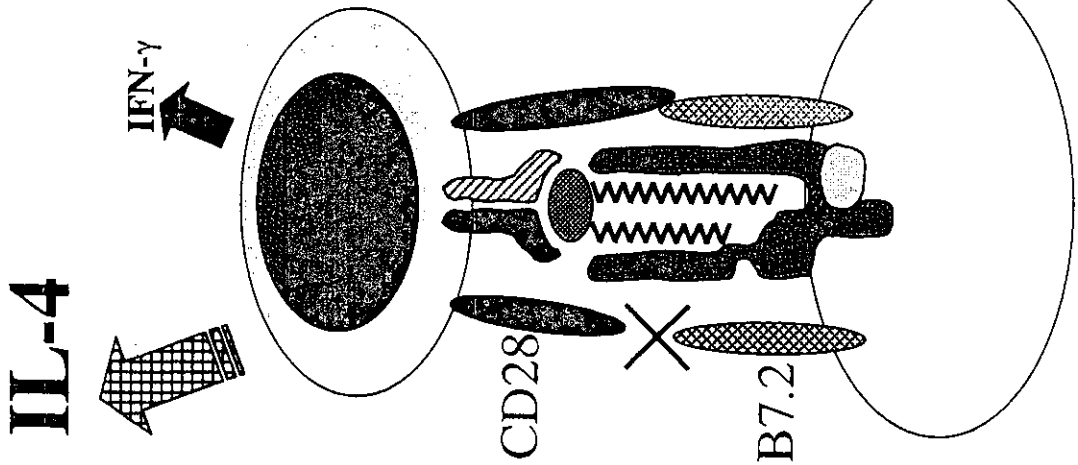
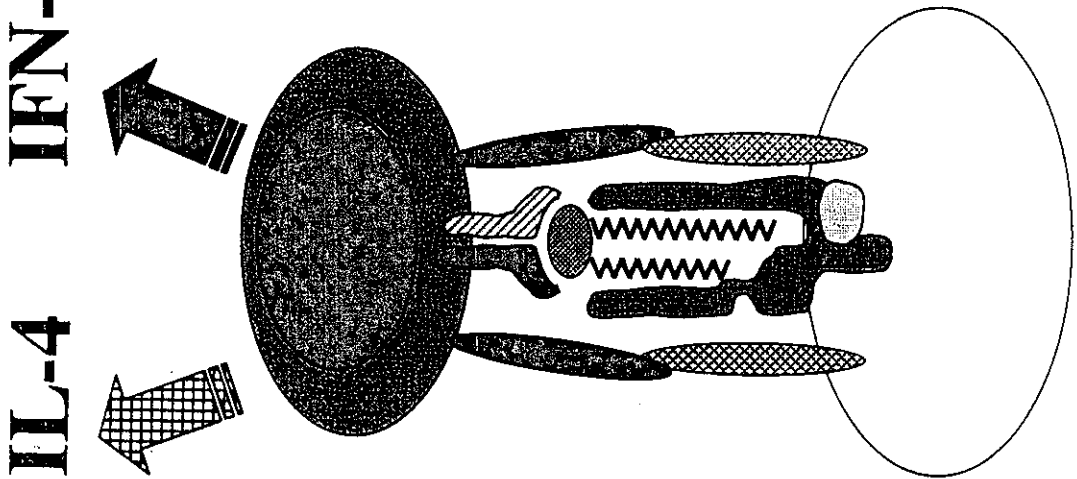


Fig 2 Yamamura

α -GC with costimulation blockade



α -GalCer



Altered ligand (OCH)

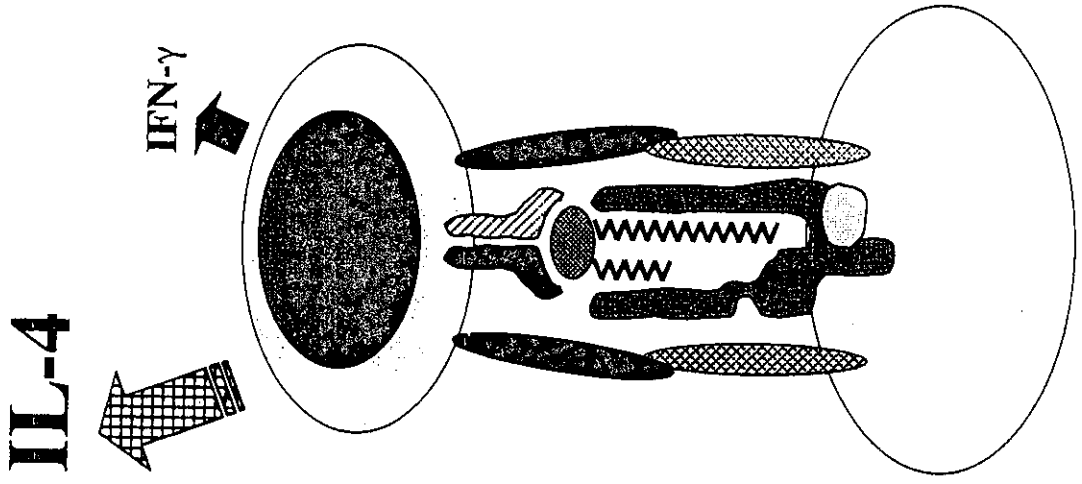
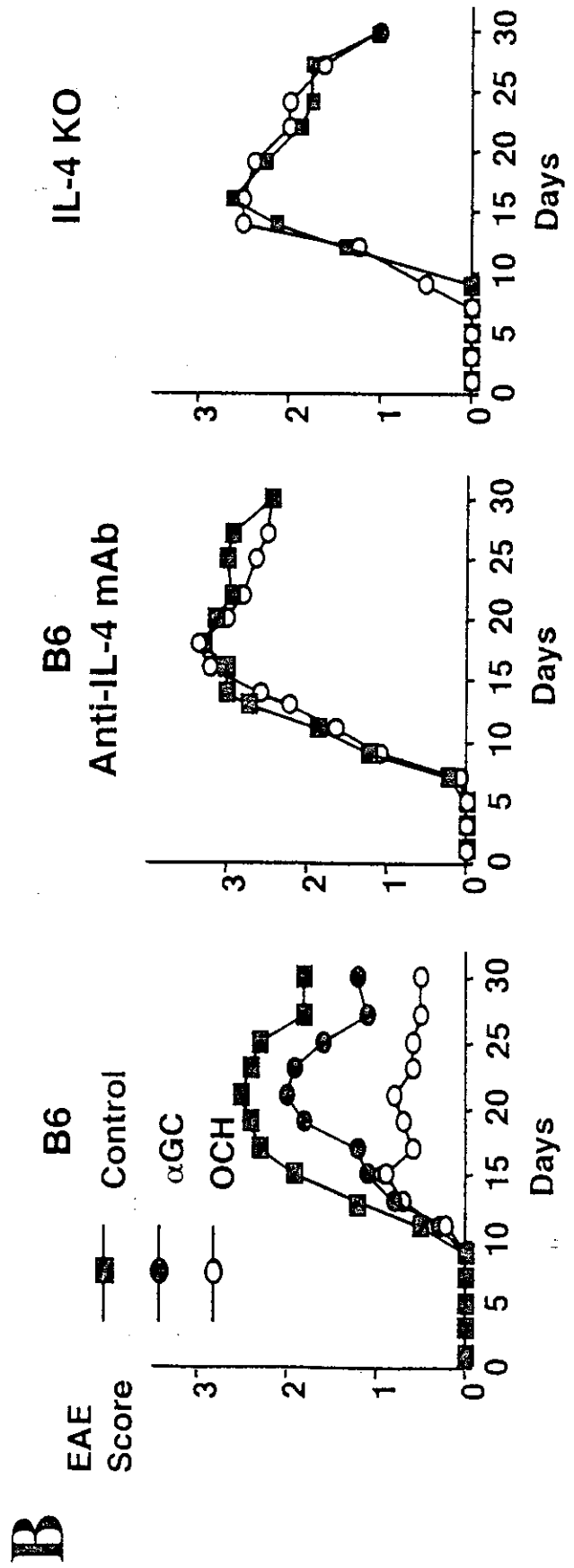
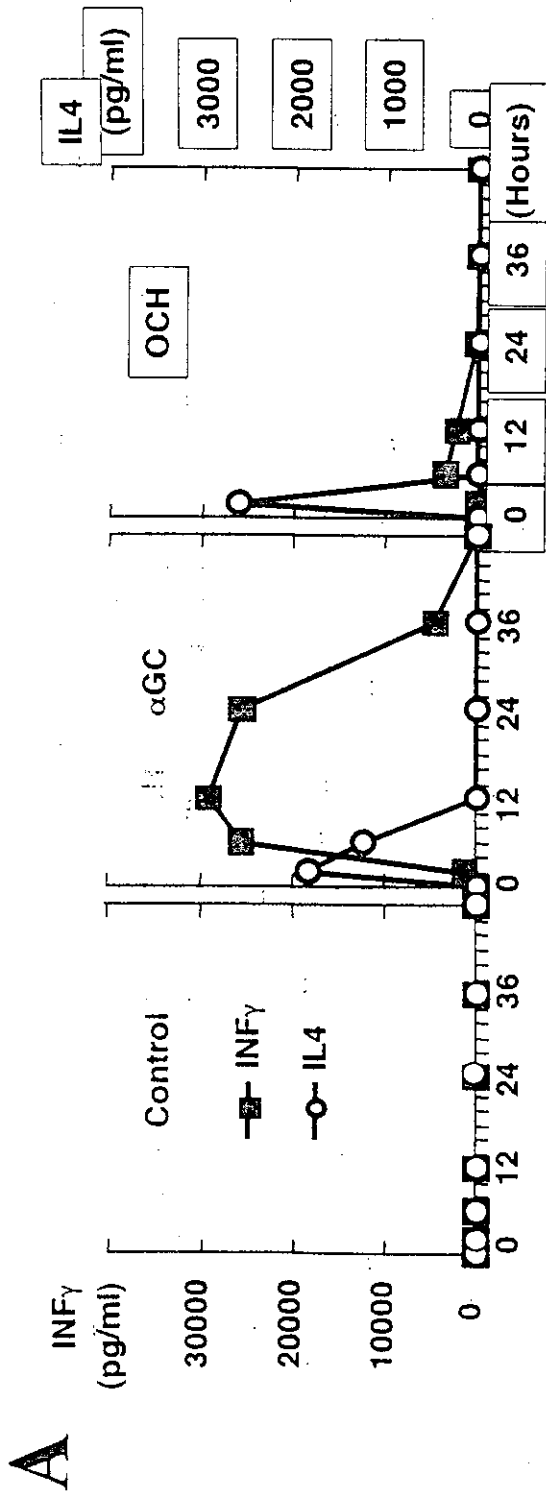


Fig 3 Yamamura



II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

「多発性硬化症の発症機構解明と治療法の開発」に関する研究

分担研究者 三宅 幸子 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部室長

研究要旨

NKT 細胞を刺激して、多発性硬化症 (MS) の実験モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を抑制できる α ガラクトシルセラミド (α GC) 誘導体 OCH の合成を行った。OCH は、 α GC のスフィンゴシン鎖を短縮した誘導体である。OCH は、NKT 細胞を刺激して IL-4 を優位に産生させ、Th2 優位な免疫応答を引き起こすことにより EAE を抑制する。本年度は、OCH による刺激によって Th2 サイトカインが選択的に産生される分子機序について検討するため、OCH もしくは α GC 投与後の NKT 細胞の遺伝子変化を DNA マイクロアレイを用いて検討した。 α GC の刺激では、刺激後 90 分で Th1, Th2 サイトカインの他、多くのケモカインの mRNA が誘導されたが、OCH の刺激では、Th1 サイトカインの誘導はほとんど見られず、ケモカインについても低レベルで誘導されるのみであった。OCH は、 α GC と比較して炎症性サイトカインや、ケモカインの誘導が少なく、自己免疫治療剤としてより望ましいことが分かった。

A. 研究目的

我々は多発性硬化症 (MS) の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を抑制する NKT細胞糖脂質リガンド OCH を合成した。OCH は、NKT 細胞を刺激して、Th2 サイトカインを選択的に大量に産生させることによって、Th1 病である EAE を抑制する。そこで OCH による刺激が Th2 サイトカインの産生を選択的に誘導する機序を分子レベルで解明することを目的とする。

B. 研究方法

NK 細胞を除去するために抗アジアロ 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。

C. 研究結果

上記方法で得られた NKT 細胞は、肝臓単核球から分離した場合は、90%以上の純度が得られ、脾臓肝臓単核球から分離した場合は、75%以上

の純度で得られた。純度が高いことから、肝臓から分離した NTK 細胞の遺伝子プロファイルの解析を行い、さらに脾臓から分離した NKT 細胞でも同様の傾向がみられる遺伝子を中心に解析を行った。 α GC 刺激 1.5 時間後で誘導され、12 時間後には消失するものとしては、IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-13, IFN- γ , TNF- α , LT, GM-CSF など多くのサイトカイン遺伝子が含まれた。この中で、多くのサイトカインは OCH 刺激でも mRNA が誘導されたが、その程度は弱い場合が多く、その中でも IFN- γ , TNF- α , LT はほとんど誘導されなかった。同様の動態をする遺伝子として、ケモカインも数多く見られた。刺激後 12 時間で主に発現が誘導されてくるものとしては、IL-1 受容体、IL-3 受容体、IL-6 受容体、IL-8 受容体、IL-10 受容体、IFN- γ 受容体、LT 受容体、GM-CSF 受容体など、サイトカイン受容体が多く見られた。これらの受容体は、OCH 刺激でも同程度に誘導されていた。刺激後に発現が低下するものとしては、NKRP1A, NKRP1B, NKRP1C, Ly49H, Ly49G, Ly49D, Ly49C, Ly49B, Ly49I, NKG2D, NKG2A といった NK 受容体、パーフォリン、グランザイムといった NK 関連の分子の mRNA であった。また、CD3、T 細胞受容体の mRNA の発現も低下していた。刺激による細胞表面からの internalization に加えて mRNA レベルでもこれらの分子の発現が抑制されることがわかった。

D. 考察

これまででは、OCH 投与後の血清サイトカインの測定、もしくは脾臓細胞に OCH を添加した培養液中のサイトカイン測定によって OCH、 α GC 刺激によるサイトカインを検討してきた。これら

の系は、生理的であるが多くの細胞とのクロストークが想定され、純粋に NKT 細胞レベルでおこっている変化をとらえていない。そこで、生理的条件下で刺激をした後、NKT 細胞を分離して解析することによって、NKT 細胞自体の変化のみを捕らえることができた。NKT 細胞は、刺激後わずか 90 分で多くのサイトカインやケモカインの mRNA が誘導され、12 時間後にはすでに低下しており、刺激に対して極めて迅速に反応することができる細胞であることがわかる。現在、生体内でのリガンドが特定されていないので、生理的にどのような刺激が入り、どのようなサイトカインが関与しているかについては今後の検討が待たれる。また、NKT 細胞は生体内での Th2 サイトカインの重要な産生源になっていると考えられるが、これほど大量の Th2 サイトカインを産生する機序については不明である。今回いくつかの転写因子の変化がみられ、今後の詳細な検討が必要であると考えられた。自験データでは NKT 細胞は、くり返し刺激することによって、サイトカイン産生が著しく低下するが、その機序については不明である。今回と同様の方法を用いた検討により解明されることが期待できる。

E. 結論

OCH は、NKT 細胞を刺激して、主に Th2 サイトカインの mRNA の発現を数時間以内で誘導した。 α GC と比較して、炎症性サイトカインや、ケモカインの誘導が少なく、自己免疫治療剤としてより望ましいことが分かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

1. 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**. Vol. 99: 3794-3799, 2002
2. Araki M, Kondo T, Gumpers JE, Brenner MB, Miyake S and Yamamura T. Th2 Bias of CD4⁺ Natural Killer T Cells Derived from Multiple Sclerosis in Remission. **Int. Immunol.** 15(2) 279-288
3. Miyamoto K, Miyake S, Schachner M, Yamamura T. Heterozygous null mutation of myelin protein zero (PO) enhances susceptibility to autoimmune neuritis targeting PO peptide. **Eur. J. Immunol.** 33 (3) 656-665
4. Yamamura T, Miyamoto K, Illes Z, Pal E, Araki M, Miyake S. Synthetic glycolipids as potential therapeutics for autoimmune disease. **Curr. Topics. Med. Chem.** In Press
5. 宮本勝一、三宅幸子、水野美歩、岡伸幸、山村隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の治療における選択的 CX-2 阻害剤の効果；**Neuroimmunology** 10 (2) : 251-254, 2002
6. 三宅幸子：NKT 細胞と自己免疫疾患制御；**アレルギー・免疫**, 19 (9) 92-98, 2002
7. 三宅幸子、山村隆：NKT 細胞糖脂質リガンドによる自己免疫疾患制御；**Annual Review 免疫** 2003, 71-77, 2003
8. 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；**タンパク質 核酸 酵素**, 47 (16) 2382-2387, 2002
9. 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(3) 44-45, 2002

II 学会発表

国際学会

- 1) Katsuichi Miyamoto, Sachiko Miyake, and Takashi Yamamura: Prevention of autoimmune encephalomyelitis by a novel glycolipid ligand for natural killer T cells. **Experimental Biology 2002**, New Orleans, USA, April 3, 2001
- 2) Asako Chiba, Takashi Yamamura, Katsuichi Miyamoto Sachiko Miyake. A new synthetic glycolipid OCH prevents collagen-induced arthritis by inducing Th2 bias of natural killer (NK) T cells. **FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 2nd Annual Meeting**, San Francisco, USA, June 28, 2002. (**Clinical Immunology**, 103:S82, 2002)
- 3) Asako Chiba, Takashi Yamamura, Sachiko Miyake. A New Synthetic Glycolipid OCH Suppresses Collagen-induced Arthritis by Inducing Th2 bias of Natural Killer (NK) T cells. **Arthritis Rheum.** 46(9) 103:S, 2002

国内学会

- 1) 宮本 勝一、三宅幸子、山村 隆：新規糖脂質による自己免疫病モデルの治療、第 99 回日本内科学会総会、平成 14 年 3 月 28 日-30 日、名古屋
- 2) 三宅幸子、宮本勝一、千葉麻子、山村隆：NK・NKT 細胞による自己免疫疾患の特異的制法の研究、第 46 回日本リウマチ学会総会、平成 14 年 4 月 23 日、大阪
- 3) 千葉麻子、橋本博史、山中健次郎、山村隆、三宅幸子：抗 CD3+抗 CD28 抗体刺激による SLE 患者末梢血 T リンパ球のシグナル伝達異常、第 46 回日本リウマチ学会総会、平成 14

- 年4月24日、大阪
- 4) 宮本 勝一、三宅幸子、山村 隆：新たな糖脂質による多発性硬化症モデルの治療、第43回日本神経学会総会、平成14年5月29日、札幌
 - 5) 三宅幸子、千葉麻子、山村隆：NKT細胞合成糖脂質リガンド OCHによる自己免疫疾患治療法の開発、第30回日本臨床免疫学会総会、平成14年12月4日、東京
 - 6) 千葉麻子、高橋和也、阿部香織、橋本博史、山中健次郎、山村隆、三宅幸子：T細胞受容体刺激による apoptosis の著明亢進を示す SLE患者 T細胞の解析、第30回日本臨床免疫学会総会、平成14年12月3日、東京
 - 7) 林幼偉、三宅幸子、山村隆：CD4⁺CD25⁺T細胞による実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の調節、第30回日本臨床免疫学会総会、平成14年12月4日、東京
 - 8) 荒木学、三宅幸子、山村隆：多発性硬化症における NKT細胞減少は長期ステロイド治療により補正される、第30回日本臨床免疫学会総会、平成14年12月4日、東京
 - 9) Sachiko Miyake, Asako Chiba, Shinji Oki, Katsuichi Miyamoto, Takashi Yamamura: A synthetic glycolipid OCH prevents killer T (MLT) cells、第32回日本免疫学会、平成14年12月6日、東京
 - 10) 千葉麻子、山村隆、三宅幸子：NKT細胞合成糖脂質リガンド OCHによるコラーゲン関節炎の抑制、第32回日本免疫学会、平成14年12月6日、東京
 - 11) Sammy Bedoui, Sachiko Miyake, Katsuichi Miyamoto, Stephan von Horsten, Annette Beck-Sickinger, Takashi Yamamura. Evidence for a regulatory role of Neuropeptide Y in Experimental autoimmune encephalomyelitis、第32回日本免疫学会、平成14年12月6日、東京
 - 12) Xianofeng Jiang, Kenji Kuroiwa, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura, Nobuhiro Ohkochi, Masaru Taniguchi, Kenichiro Seino: Effect of glycolipid ligands for NKT cells in allogenic transplant rejection、第32回日本免疫学会、平成14年12月47日、東京
 - 13) 中井之人、岩淵和也、藤井聡、石森直樹、綿野敬子、三島鉄也、中山俊憲、谷口克、Van KaerLuc、三宅幸子、山村隆、小野江和則：α-GalCer および OCHによる NKT細胞の活性化はいずれも動脈硬化促進性に寄与する、第32回日本免疫学会、平成14年12月5日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

HCV 感染と末梢神経病変についての研究

分担研究者 岡 伸幸 兵庫医科大学医学部総合内科 講師

研究要旨 C型肝炎ウイルス(HCV)は肝外病変も引き起こすことが知られ、混合型クリオグロブリン血症、結節性多発動脈炎、膜性増殖性糸球体腎炎、シェーグレン症候群などとの関連が報告されている。クリオグロブリン血症は従来からニューロパチーの基礎疾患のひとつとされており、HCV のニューロパチー発症への関与が示唆される。そこで本研究は神経生検にてニューロパチーを確認した症例の中から HCV との関連が示唆される症例を選択し、その臨床像、病理所見を検討した。抗 HCV 抗体陽性で明らかな基礎疾患を有しない症例 12 例のニューロパチー症状は、運動感覚型 4 例、感覚型 8 例で、痛みしびれは 9 例に認めた。軸索障害が主が 10 例、脱髄—軸索障害混合型を 2 例に認めた。polyneuropathy 型は 10 例、multiple mononeuropathy 型は 2 例であった。クリオグロブリン血症は 4 例に認めた。全例に四肢の痛みを認め、組織学的には 1 例に小動脈炎を認めた。1 例は軸索変性後の神経再生所見、2 例は有髄線維密度の低下のみの所見であった。小動脈炎の免疫組織学的検討では浸潤細胞は CD4 陽性細胞、マクロファージが占めた。HCV 感染が病態と関連すると考えられるニューロパチーが存在する。原因不明のニューロパチー患者には HCV 感染の有無を調べる必要がある。

A. 研究目的

わが国で C 型肝炎ウイルス(HCV)持続感染者は 200 万人以上いるといわれ、肝硬変、肝癌に進展する危険性を有する。HCV は肝外病変も引き起こすことが知られ、混合型クリオグロブリン血症、結節性多発動脈炎、膜性増殖性糸球体腎炎、シェーグレン症候群などとの関連が報告されている。クリオグロブリン血症は従来からニューロパチーの基礎疾患のひとつとされており、HCV のニューロパチー発症への関与が示唆される。そこで本研究は神経生検にてニューロパチーを確認した症例の中から HCV との関連が示唆される症例を選択し、その臨床像、病理所見を検討した。

B. 研究方法

1990 年から 2002 年までの間に京都大学神経

内科、兵庫医科大学神経内科で神経生検を検索した 533 症例の中で抗 HCV 抗体陽性を示した症例は 26 例であった。そのうち、Churg-Strauss 症候群、アルコール性、ビタミン B1 欠乏、IgM-M 蛋白血症(抗 MAG 抗体陽性)、糖尿病、遺伝性運動感覚性ニューロパチーなどのニューロパチーの明らかな原因を示した例を除いた症例は 12 例であった。これらの症例につき、臨床症状、血液生化学所見、神経伝導検査などの電気生理学的所見、生検所見を検討した。病理学的に 2.5%グルタルアルデヒド、1%オスミウム酸固定後、エポキシ包埋し切片をトルイジンブルー染色して観察した。あわせてときほぐし線維法を行った。また細胞浸潤を認めた症例では細胞種の同定のため、凍結切片を用いてヘマトキシリン-エオジン染色、さらに CD3、

CD4、CD20、CD68 に対する抗体により免疫組織学的に検討した。

生検にあたってはインフォームドコンセントを行い、個人情報の秘密厳守のもとで生検標本を研究に用いることについて同意を取得した。

C. 研究結果

抗 HCV 抗体陽性で明らかな基礎疾患を有しない 12 例の内訳を図に示す。年齢 46-77 歳 (平均 61.8 歳)、男 10 例、女 2 例であった。ニューロパチーの罹患期間は生検まで 20 日から 6 年にわたった。ニューロパチー症状は、運動感覚型 4 例、感覚型 8 例で、痛みしびれは 9 例に認めた。polyneuropathy 型は 10 例、multiple mononeuropathy 型は 2 例であった。電気生理学的所見は軸索障害が主が 10 例、脱髄—軸索障害混合型を 2 例に認めた。髄液蛋白上昇は検索 8 例中 3 例に認めた。神経生検では、有髄線維密度低下を全例に認め、 $220-5,980/\text{mm}^2$ であった。急性の軸索変性は 5 例、軸索変性後の神経再生所見を 2 例、脱髄所見を 2 例に認めたが、活動性の神経変性所見を認めない例が 3 例あった。血管炎を 3 例に認めたが、好酸球浸潤を認めた症例はなかった。慢性炎症性脱髄性多発神経根炎の診断基準を満たした症例が 2 例、結節性多発動脈炎が 1 例であった。

クリオグロブリン血症は 4 例に認めた。その内訳を表 1 に示す。全例に四肢の痛みを認め、組織学的には 1 例に小動脈炎を認めた。1 例は軸索変性後の神経再生所見、2 例は有髄線維密度の低下のみの所見であった。小動脈炎の免疫組織学的検討では浸潤細胞は CD4 陽性細胞、マクロファージが占めた。

D. 考察

HCV が原因となる諸症状はウィルスそのものの直接作用でなく、むしろ免疫反応によるものといわれる。混合型クリオグロブリン血症、結節性多発動脈炎、膜性増殖性糸球体腎炎、シェーグレン症候群などとの関連が報告されている。たとえば不適切な抗原抗体反応の結果、免疫複合体が形成され血管壁に沈着、血管炎を引

き起こすメカニズムが推測される。本研究の対象となったニューロパチーでは、原因が特定できる症例を除いた 12 例では HCV との関連が十分には証明できないものの、その多くが免疫異常が推測される症例である。とくにクリオグロブリン血症、結節性多発動脈炎はすでに HCV との関連が示されている疾患である。

ニューロパチー症状の特徴としては、感覚障害を主とした例が多く、中でも痛み、しびれの強い場合が多かった。病理学的に血管炎の頻度は低かったものの軸索障害がその背景にあると考えられる。

クリオグロブリン血症は HCV 陽性患者の 20-80% に認められるとされ、病期、重症度によって異なると思われる。本検討では 33% であったが、その病理所見は均一でなく、必ずしも HCV との関連を明らかにできなかった。しかし全例が痛みしびれを主症状としており、病態としては一定で病理所見の多様性は病期の違いによるのかもしれない。

脱髄病変を示した CIDP が 2 例含まれていることは今後の検討を要する点である。それと関連して、HCV 感染とともに脳白質病変を呈した症例の報告がある。原因不明のニューロパチー患者には HCV 感染の有無を調べる必要がある。

E. 結論

HCV 感染が病態と関連すると考えられるニューロパチーが存在する。HCV 陽性患者ではクリオグロブリン血症、血管炎が比較的多く、神経症状では過半数が痛み、しびれを呈した。原因不明のニューロパチー患者には HCV 感染の有無を調べる必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyamoto K, Oka N, Kawasaki T, Miyake S, Yamamura T, Akiguchi I. New cyclooxygenase-2 inhibitors for treatment of

- experimental autoimmune neuritis. *Muscle Nerve.*, 25, 280-282, 2002
2. Kieseier BC, Tani M, Mahad D, Oka N, Ho T, Woodroffe N, Griffin JW, Toyka KV, Ransohoff RM, Hartung HP. Chemokines and chemokine receptors in inflammatory demyelinating neuropathies: a central role for IP-10. *Brain* 125:823-834, 2002
3. Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, Koike H, Nakagawa M, Yoshikawa H, Ohnishi A, Hayasaka K, Onodera O, Baba M, Yasuda H, Saito T, Nakashima K, Kira J, Kaji R, Oka N, Sobue G; Study Group for Hereditary Neuropathy in Japan. Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients. *Brain* 126:134-51, 2003
4. Kawasaki T, Oka N, Tachibana H, Akiguchi I, Shibasaki H. Oct6, a transcription factor controlling myelination, is a marker for active nerve regeneration in peripheral neuropathies. *Acta Neuropathol.* 105:203-208, 2003
5. Mizutani K, Oka N, Kusunoki S, Kaji R, Kanda M, Akiguchi I, Shibasaki H. Amyotrophic lateral sclerosis with IgM antibody against gangliosides GM2 and GD2. *Internal Medicine*, in press
6. 奥智子、児玉典彦、岡伸幸、立花久大、強皮症を伴った末梢神経障害の病理所見、末梢神経、12, 145-148, 2001
7. 川崎照晃、岡伸幸、秋口一郎、西谷裕、Charcot-Marie-Tooth病 type1A(CMT1A)における転写調節因子の発現に関する検討、末梢神経、12, 115-117, 2001
8. 西村裕之、津田健吉、川端啓太、岡伸幸、立花久大 放射線脊髄症のMRI、*神経内科* 56:92-95, 2002
9. 津田健吉、西村裕之、武田正中、岡伸幸、立花久大 健忘と多発ニューロパチーを伴った葉酸欠乏症の1例 *内科*、89, 984-986, 2002
2. 学会発表
1. 奥智子、岡伸幸、児玉典彦、立花久大 炎症性ニューロパチーにおける転写因子 NF-kappaBとCREBの発現 第43回日本神経学会総会、5.29-31, 札幌, 2002
2. 児玉典彦、奥智子、岡伸幸、武田正中、西村裕之、川端啓太、立花久大 感覚障害型血管炎ニューロパチーの臨床的検討 第43回日本神経学会総会、5.29-31, 札幌, 2002
3. 寺井久司、景山卓、武井良之、谷尾宣子、人見健文、村瀬永子、目崎高広、池田昭夫、岡伸幸、木村淳、柴崎浩 触覚低下・深部感覚脱失および多関節脱臼を呈した先天性感覚性ニューロパチーの兄妹例 第43回日本神経学会総会、5.29-31, 札幌, 2002
4. 川崎照晃、岡伸幸、秋口一郎、八木秀雄、立花久大、西谷裕 ヒトのシュワン細胞の転写調節因子と髄鞘形成との関係 第43回日本神経学会総会、5.29-31, 札幌
5. 奥智子、岡伸幸、児玉典彦、立花久大 血管炎によるニューロパチー:p-ANCA陽性例と陰性例の比較 第13回日本末梢神経学会学術総会、9.22, 浜松, 2002
- 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

図1
HCV陽性との関連が疑われたニューロパチー12例の内訳

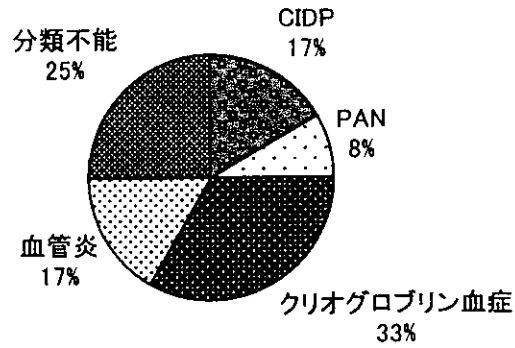


表1
HCV陽性 クリオグロブリン血症を伴ったニューロパチー4例のまとめ

No	年齢性	神経症状	電気生理所見	髄液蛋白	有髄神経線維密度	生検所見	生検まで経過
1	51F	四肢痛み 多発神経炎型	軸索障害	31mg/dl	1520/mm2	小動脈炎	1. 5ヶ月
2	66M	四肢しびれ 多発神経炎型	軸索障害	未検査	5240	神経再生	1年5ヶ月
3	68M	両下肢運動感覚障害 熱感 多発神経炎型	軸索障害	111	5980	活動性変化なし	1. 5ヶ月
4	77M	四肢運動感覚障害 痛み 多発単神経炎型	軸索障害	101	4550	活動性変化なし	1年

日本人多発性硬化症における vitamin D-binding protein 遺伝子多型解析

分担研究者 菊地 誠志

北海道大学大学院医学研究科脳科学専攻神経病態学講座神経内科学 講師

研究要旨 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患者 107 例および健常対照者 109 例において、vitamin D-binding protein 遺伝子の多型 (codon 416 及び 420) を MS 患者-健常対照群で検討し、また、MS の臨床症状への影響などを検討した。その結果、vitamin D-binding protein 遺伝子多型の分布については、MS 患者-健常対照者に差はなく、MS 患者群において、発症年齢、経過 (relapsing-remitting type, secondary progressive type) と vitamin D-binding protein 遺伝子多型との間に関連はなかった。

A. 研究目的

多発性硬化症 (MS) は、人種による発症率の違いや、家族内発症、双生児研究などから遺伝的要因は確実に存在すると考えられている。現在まで多くの研究者により、いろいろな観点から多くの遺伝子多型が検討されており、我々も免疫学的、環境的要因から、疾患感受性遺伝子となりうるものの遺伝子多型を検討してきている。一方、MS は高緯度地域に発症率が高いと言われ、紫外線を介した vitamin D の関与が以前から検討されてきた。我々は、これまで、vitamin D receptor 遺伝子多型の検討を行いその結果を報告してきた。vitamin D-binding protein (DBP) は、vitamin D の transport protein としての役割の他、炎症において重要な役割を果たしており、C5a を介して好中球の走化性を亢進させたり、macrophage を活性化したりする。これらのことから、DBP は、MS に何らかの影響を持つのではないかと考えられ、これまでその遺伝子多型と MS の関連についての報告がいくつかなされてきた。しかし、今までのところ、関連があるという報告とないという報告が混在している。そこで、今回我々は、4q12

に存在する DBP 遺伝子の exon 11 にあり、アミノ酸変異を伴う、2 箇所 (codon 416 及び 420) の遺伝子多型について検討した。尚、この多型による違いは、DBP の serum concentration への違いに影響するという報告があり、免疫疾患では HIV との相関も指摘されている。

B. 研究対象・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 107 例の通常型 MS 患者及び健常対照者 109 例である。MS 患者の臨床的背景は Table 1 に示す。尚、MS の診断は McDonald の診断基準に従った。健常者の内訳は、男性 72 例、女性 35 例の計 107 例、採血時の年齢は 33.1 ± 9.5 (平均 \pm SD) で、患者群とは性差、年齢において有意な差は認めていない。採血については、書面にて informed consent を行い、同意を得られた場合のみ採血を行った。末梢血より DNA を分離し、DBP の各遺伝子多型は PCR-RFLP にて検出した。その後、各多型における健常者群と MS 患者群との比較、MS 患者における病型や発症年齢の比較を検討した。

C. 研究結果

MS 患者の臨床像を Table 1 に示す。男女比は約 1:3, 採血時の年齢は 35.5 ± 10.9 (平均 \pm SD), 再発緩解型と二次性進行型の比は約 2:1, 平均 EDSS は 3.0 であった。患者及び健康者の各遺伝子多型の分布を Table 2 に示す。Codon 416 及び 420 における genotype frequency, allele frequency は割合として、ほとんど差がなく、有意差はつかなかった。その他、発症年齢, 再発緩解型と二次性進行型における, genotype frequency の差は特に認められなかった (Table 3 and Table 4)。

D. 考察

これまで、今回検討した DBP の遺伝子多型と MS の関連についてはいくつかの報告があり、Iceland からのもものでは相関 (codon 416 Asp, codon 420 Thr) が認められたとのことだった (Arnason et al., 1980)。しかし、その後になされた、Holland や Sweden からの報告では、今回検討した DBP 遺伝子多型と MS との相関は認められないというものであった (Høllsberg et al., 1988; Lindblom et al., 1988)。更に、最近カナダから報告された family-based study でも、DBP 遺伝子多型と MS との関連は認められないというものであった (Steckley et al., 2000)。今回の我々のデータでは、有意な相関は得られなかったが、遺伝子多型は人種による差があることが多く、実際、今回検討した多型でも欧米人との比較では、人種差が報告されている。今後の更なる検討は必要と考えられる。

E. 結論

MS の発症や臨床症状に vitamin D-binding protein 遺伝子多型が関係している可能性は低いと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kikuchi S, 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*. 2002; 42: 714-723.
- 2) Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. No association of vitamin D-binding protein gene polymorphisms in Japanese patients with MS. *J Neuroimmunol*. 2002; 127: 177-179.
- 3) Kikuchi S, Fukazawa T, 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*. 2002; 128: 77-81.
- 4) Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Tashiro K. Genetic susceptibility to multiple sclerosis: implications of genetic research on MS therapy. *Expert Review of Neurotherapeutics* 2002; 2: 329-338.
- 5) Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, 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*. 2002; 2: 8.
- 6) Kikuchi S, Niino M, Shinpo K, Terae S, Tashiro K. Intracranial hemorrhage in neuro-Behçet's syndrome. *Intern Med*. 2002; 41: 692-695.
- 7) Kikuchi S, Niino M, Fukazawa T, Yabe I,