

低下していた。IL-4 産生は肝単核球、脾細胞では低下していたが、リンパ節細胞では、コントロール群と比較して同程度の産生がみられた。

D. 考察

V α 19 NKT 細胞を刺激し、増殖反応、サイトカイン産生がみられる合成糖脂質の中で、EAE の治療効果のあるものをスクリーニングし、免疫時の腹腔内投与で EAE 発症を抑制する合成糖脂質 (リガンド 1b) を発見した。今後はこの合成糖脂質類似のものをさらにスクリーニングし、EAE 抑制にどの構造が重要かについて決定する予定である。リガンド 1b は、EAE 誘導時の一回投与で有効だが、EAE 発症後投与でも有効であるかどうかを検討し、priming に作用するのか、effector phase に作用するのかを明らかにする必要がある。

また、リガンド 1b が V α 19 NKT 細胞を介して EAE を抑制しているかどうかについては、V α 19 ノックアウトマウスが得られ次第検討が必要である。リガンド 1b は、マウスに in vivo 投与した場合、EAE を抑制できない他の合成糖脂質と比較して、検出されるどのサイトカインがに差があるのか現在まだわかっていない。したがって、C α ノックアウト V α 19 トランスジェニックマウスを用いて、リガンド 1b 投与後に遺伝子プロファイルの網羅的解析を行う予定である。現在 V α 19 NKT 細胞を特異的に同定できる方法がないため、モノクローナル抗体の作製もしくは、MRI テトラマーの作製も重要である。

E. 結論

EAE を抑制する合成糖脂質を発見した。この糖脂質は、V α 19 NKT 細胞を刺激して、EAE を抑制することが推定されたが、今後作用機序について

の検討が重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

原著

1. Koike F, Satoh J-i, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T and Yamamura T. Microarray analysis identifies interferon β - regulated genes in multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.** 139(1-2): 109-118, 2003
2. Bedoui S, Miyake S, Miyamoto K, Oki S, Lin Y, Kawamura N, Beck-Sickingler A, non Horsten S and Yamamura T. Neuropeptide Y (NPY) suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: NPY Y1 receptor-specific inhibition of autoreactive Th1 responses in vivo. **J. Immunol.** 171(7): 3451-3458, 2003
3. Nakamura T, Sonoda K-H, Faunce DE, Gumperz J, Yamamura T, Miyake S and Stein-Streilein J. CD4+ NKT cells, but not conventional CD43+ T cells, are required to generate efferent CD8+ T regulatory cells following antigen inoculation in an immune-privileged site. **J. Immunol.** 171(3): 1266-1271, 2003
4. Stanic AK, Shashidharamurthy R, Bezbradica JS, Matsuki N, Yoshimura Y, Miyake S, Choi EY, Schell TD, Van Kaer L, Tevethia SS, Roopenian DC, Yamamura T and Joyce S: Another view of T cell antigen recognition: cooperative engagement of glycolipid antigens by V α 14J α 18 natural TCR. **J. Immunol.** 171(9): 4539-4551, 2003

5. Chiba A, Oki S, Miyamoto K, Hashimoto H, Yamamura T and Miyake S. Natural killer T cell activation by OCH, a sphingosine truncated analogue of alpha-galactosylceramide, suppresses collagen-induced arthritis. **Arthritis Rheum.** 50(1): 305-313, 2004
6. Oki S, Asako C, Mizuno M, Tomi C, Yamamura T and Miyake S. Duration of antigenic stimulation and transcriptional activation determine differential cytokine production by natural killer T (NKT) cells. Under revision for publication in **J. Clin. Invest.** In press

総説

1. 三宅幸子、千葉麻子：NKT 細胞合成糖脂質リガンドによる関節炎の治療 **臨床免疫** 40(1): 61-65, 2003
2. 三宅幸子：神経ペプチドと自己免疫疾患 **Brain Medical** 15(4): 27-32, 2003
3. 山村隆、林幼偉、三宅幸子：多発性硬化症の進行を抑制する免疫細胞 **Brain Medical** 15(4)55-59, 2003
4. 三宅幸子：NKT 細胞と自己免疫疾患 **内科** 93(2): 213-216, 2004
5. 三宅幸子：免疫制御細胞と自己免疫疾患 **Mol. Med.** 41(2):177-182, 2004
6. 三宅幸子：ナチュラルキラーT 細胞を標的とした多発性硬化症糖脂質治療 **医学のあゆみ** 208(5):449-453, 2004
7. 三宅幸子：自己免疫性脳脊髄疾患の糖脂質療法 **Annual Review 神経 2004** 柳澤信夫、篠原幸人、岩田誠、清水輝夫、寺本明編、中外医学社、東京 237-244, 2004

II 学会発表

国際学会

- 1) Chiba A, Oki S, Miyamoto K, Yamamura T and Miyake S. A synthetic glycolipid OCH prevents Th1-mediated autoimmune diseases by inducing Th2 bias of natural killer T (NKT) cells. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 3rd annual Meeting, Paris, France, May 17, 2003. (Clinical Immunology, 104:S122, 2003)
- 2) Oki S, Chiba A, Yamamura T and Miyake S. The molecular basis of preferential IL-4 production by murine natural killer T cells stimulated with altered glycolipid ligand

国内学会

- 1) 荒木学、三宅幸子、山村隆：新規糖脂質 OCH リガンドによる多発性硬化症治療の可能性ーヒト NKT 細胞クローンによる解析、第 15 回日本神経免疫学会、2003 年 12 月 4 日、長崎
- 2) 林幼偉、宮本勝一、三宅幸子、橋本修治、山村隆：PO(+/-)ヘテロミュータントマウスと類似のヒトの遺伝子疾患の検討、第 15 回日本神経免疫学会、2003 年 12 月 4 日、長崎
- 3) 千葉麻子、橋本博史、山村隆、三宅幸子：NKT 細胞を標的とした自己免疫疾患制御法の開発、第 47 回日本リウマチ学会、2003 年 4 月 24 日、東京
- 4) 千葉麻子、阿部香織、山中健次郎、山村隆、橋本博史、三宅幸子：T 細胞受容体刺激により、チロシンリン酸化ならびにアポトーシスが著明に亢進する SLE 患者リンパ球の解析、第 47 回日本リウマチ学会総会、2003 年 4 月 24 日、東京
- 5) 大木伸司、千葉麻子、山村隆、三宅幸子：OCH 刺激 NKT 細胞による選択的な IL-4 産生の分子機構の解析、第 33 回日本免疫学会、2003 年 12 月 9 日、福岡

- 6) 荒木学、三宅幸子、山村隆：合成糖脂質 OCH
リガンドによるヒト細胞 Th2 偏倚（ヒト NKT
細胞クローンによる解析）、第 33 回日本免疫
学会、2003 年 12 月 9 日、福岡
- 7) 千葉麻子、橋本博史、山村隆、三宅幸子：T
細胞受容体刺激により、アポトーシスならび
にチロシンリン酸化が著明に亢進する SLE 患
者リンパ球の解析、第 33 回日本免疫学会、2003
年 12 月 9 日、福岡
- 8) 林幼偉、ベドゥーサミー、三宅幸子、山村隆：
Neuropeptide Y による実験的自己免疫性脳せき
髄炎 (EAE) の制御、第 33 回日本免疫学会、2003
年 12 月 9 日、福岡
- 9) 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 Kaer
Luc、三宅幸子、山村隆、小野江和則：変性脂
質負荷によるマクロファージの CD1d 発現増
強、第 33 回日本免疫学会、2003 年 12 月 9 日、
福岡
- 10) Inui T, Nakashima H, Habu Y, Nakagawa
R, Fukasawa M, Kinoshita M, Seki Sh.
Neutralization of TNF- α abrogates multiple
organ failure induced by α -GalCer without
attenuating its antitumor effect in aged
mice. 第 33 回日本免疫学会、2003 年 12 月 9
日、福岡

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

多発性硬化症脱髄巣反応性アストロサイトに発現する 14-3-3 蛋白質のアストログリオーシスにおける役割

佐藤 準一、山村 隆、川井 充、有馬 邦正

国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部

国立精神・神経センター武蔵病院 神経内科 臨床検査部

研究要旨

多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は視神経・大脳・脊髄など中枢神経系白質に炎症性脱髄巣が多発し、様々な神経症状が再発と寛解を繰り返して進行する難病である。病理学的には急性期にCD4⁺ T 細胞やマクロファージを主体とするリンパ球浸潤と髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトの細胞死および脱髄を認める。回復期には髄鞘再生も見られるが、炎症が遷延化すると軸索傷害(axonal injury)を来して不可逆的な後遺症を残す。また炎症性サイトカイン TNF α , IL-1, IL-6, IFN γ はアストロサイトの増殖を促進し、その結果陳旧性脱髄巣は肥大したアストロサイトによって形成されるグリア癆痕(glial scar)でおおわれる。Glial scar はコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを豊富に含み、再生途上の軸索の伸長に対しては障壁を形成する。従ってアストログリオーシス(astrogliosis)を人為的に制御することにより、軸索再生を促進し神経学的後遺症を軽減する治療法を開発出来る可能性があるが、現在までその分子細胞学的メカニズムは十分解明されていない。本研究では MS 脱髄巣に出現する反応性アストロサイト(reactive astrocytes)が 14-3-3 蛋白質を高発現することに着目し、14-3-3 結合蛋白質を同定したところ、アストロサイト細胞骨格蛋白質中間径フィラメント(intermediate filaments; IF)のビメンチン(vimentin)と神経膠原繊維酸性蛋白質(glial fibrillary acidic protein; GFAP)であった。本研究の結果は、14-3-3 蛋白質が reactive astrocytes において vimentin と GFAP を束ねる分子シャペロンとして働き、intermediate filament network を制御している可能性を示唆する。

A. 研究目的

14-3-3 蛋白質(以下 14-3-3)は脳に豊富に含まれている 30-kDa 酸性蛋白質で 7 種類の isoform (β , γ , ϵ , η , ζ , θ , σ)に分離される。2種類の isoform

は N 末端で homodimer や heterodimer を形成し、特異なリン酸化セリンエピトープ(RSXpSXP)を有する 2 つの蛋白質に同時に結合して引き寄せる働きがある。すなわち 14-3-3 は

Ras/Raf-1/MAPK 系や Akt-BAD 系におけるシグナル伝達因子アダプター分子として働き、神経細胞分化・増殖・死を制御している。14-3-3 は脳組織破壊の際に髄液に遊出し、その検出は Creutzfeldt-Jakob 病では生前診断の重要な指標となる。しかし 14-3-3 は脳脊髄炎など非プリオン神経疾患の髄液でも検出され、マウス全脳培養系では神経細胞・グリア細胞が 14-3-3 を発現する(Satoh J et al. Eur Neurol 41: 216-225, 1999)。最近我々は多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) で再発後に重篤な後遺症を残す症例の髄液で 14-3-3 β isoform を検出可能なことを報告し、予後の指標となることを示唆した (Satoh J et al. J Neurol Sci 212: 11-20, 2003)。また MS 脳脊髄組織において 14-3-3 蛋白質が神経細胞とアストロサイトに高発現していることを報告した (Satoh J et al. Neuropathology 23: A14, 2003; Barin Pathol Suppl: S48, 2003)。本研究では MS 病巣における 14-3-3 各 isoform 発現を isoform 特異的抗体を用いて免疫組織学的に解析し、また培養ヒトアストロサイトにおける 14-3-3 結合蛋白質を同定した。

B. 研究方法

1) 症例: MS 症例は死亡時 29 歳女性 secondary progressive MS (#791), 40 歳女性 secondary progressive MS (#744), 43 歳女性 primary progressive MS (#609), 33 歳男性 secondary progressive MS (#544) の 4 症例を解析した。全例 conventional form で #744, #609, #544 は終末期は寝たきり状態。47 歳男性 acute cerebral infarction (#719), 84 歳男性 acute cerebral infarction (#786), 62 歳男性 chronic cerebral

infarction (#789), 56 歳男性 chronic cerebral infarction (#807), 36 歳女性 schizophrenia (#523), 61 歳男性 schizophrenia (#826) を対照とした。

2) 免疫組織化学: ホルマリン固定大脳組織切片を脱パラフィンと microwave 処理後に 8 種類の anti-14-3-3 protein isoform-specific antibody (IBL および Santa Cruz Biotechnology) で染色し、2 次抗体は Histofine Simple Stain kit (Nichirei) を用い DAB で発色した。また隣接切片を anti-GFAP antibody (Dako), anti-MBP antibody (Dako), anti-CD68 antibody (Dako), anti-neurofilament antibody (Nichirei) で染色した。

3) ヒトアストロサイト純培養: 無血清培養で継代したヒト胎児脳由来神経前駆細胞を 10% FBS 添加 DMEM で培養することにより、アストロサイト純培養 (GFAP⁺ >95%) を樹立した。一部はアストロサイト誘導後に無血清で培養を継続した。また既報 (Satoh J et al. Eur Neurol 41: 216-225, 1999) に従い免疫細胞染色とウエスタンブロット解析を行った。

4) アストロサイト結合蛋白質の同定: 培養ヒトアストロサイト全蛋白質を 2D-PAGE で分離・転写し、E. coli で発現・精製した recombinant human 14-3-3 ϵ protein with Xpress tag を probe として Far Western 解析を行い、特異的 spot をゲルから切り出し trypsin 処理後、質量分析 (mass spectrometry) で peptide fragments を同定した。

C. 研究結果

1) 全症例で大脳半卵円中心白質・脳室周囲白質・脳梁・視神経・小脳白質・橋・延髄・頸髄に散在する、軸索脱落とグリオーススを伴う脱髄巣を認めた。#744, #609 は血管周囲性

リンパ球・マクロファージ浸潤が目立つ active lesions が多く、#791, #544 は inactive lesions が多かった。

2) 免疫組織化学的には大脳皮質錐体細胞などの神経細胞の細胞体や突起・腫大軸索は $\beta, \gamma, \zeta, \eta, \theta$ で染色された。脱髄巢の反応性アストロサイト (reactive astrocytes) は $\beta, \gamma, \varepsilon, \zeta, \eta, \theta, \sigma$ で染色されたが、 ε は reactive astrocytes 特異的に発現しており大多数の reactive astrocytes にその発現を認め、 σ は少数の reactive astrocytes に発現していた。 σ を発現するアストロサイトは 2 核のものが多く見られた。また脳梗塞症例の reactive astrocytes も ε, σ で染色された。脱髄巢に残存するオリゴデンドロサイト (surviving oligodendrocytes) は β, η, θ で染色された。ミクログリアやマクロファージは β, ζ, η で染色された。

3) 培養ヒトアストロサイトは σ を除く全ての isoform を発現しており、発現量は無血清培養に比較して 10%FBS 添加培地における培養で 1.6-18.7 倍増加した。

4) 培養ヒトアストロサイトの 14-3-3 結合蛋白質として Ser-39, 72, 83 phosphorylated vimentin と GFAP を同定し、免疫沈降で両者と 14-3-3 $\varepsilon, \zeta, \beta$ との結合を確認した。また vimentin に関しては MS 脱髄巢の reactive astrocytes においてもその発現を認めた。

D. 考察

14-3-3 は神経細胞で構成的に高発現し、その発現は MS 脱髄巢では reactive astrocytes で増加している。特に ε はほとんどの reactive astrocytes に高発現し、特異的マーカーと成る可能性が有る。また σ は少数の reactive astrocytes に限局

して高発現し、神経細胞では発現を認めない。培養系でも無血清培養 (growth-arrested cultures) に比較して 10%FBS 添加培養 (proliferating cultures) で発現量が著明に増加する。以上の点から 14-3-3 は isoform 特異的にアストロサイトの増殖シグナル制御に関与している可能性がある。さらに培養ヒトアストロサイトでは 14-3-3 は vimentin および GFAP と結合していることが判明した。Type III intermediate filaments (IF) である vimentin, GFAP の発現量は静止期アストロサイト (resting astrocytes) に比較して、反応性アストロサイトにおいて顕著に増加することが知られている。すなわちアストロサイトの増殖・肥大化では細胞骨格蛋白質 IF の再構築が起こるが、この過程で 14-3-3 も発現量が増加し、vimentin と GFAP を束ねる分子シャペロンとして働いている可能性がある (Figure)。

E. 結論

MS 脱髄巢において 14-3-3 は reactive astrocytes で高発現しており、vimentin と GFAP をつなぐアダプターとして働き、IF network を制御している可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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 57: 441-455, 2003.

2) 佐藤 準一、山村 隆：多発性硬化症治療

への新しい展望. 最新医学 58: 130-142, 2003.

3) 佐藤 準一: 脳の炎症とグリア細胞の役割. BRAIN MEDICAL 15: 15-20, 2003.

4) 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応答遺伝子. Bio Medical Quick Review Net 2004 (印刷中).

5) Koike F, Satoh J-I, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T: Microarray analysis identifies interferon β -regulated genes in multiple sclerosis. J Neuroimmunol 139: 109-118, 2003.

6) Satoh J-I, M. Yukitake, K. Kurohara, H. Takashima, and Y. Kuroda: Detection of the 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid of Japanese multiple sclerosis patients presenting with severe myelitis. J Neurol Sci 212: 11-20, 2003.

7) Satoh J-I, Nakanishi M, Koike F, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T. Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. Neurobiol Dis 2004, submitted for publication.

8) Satoh J-I, Yamamura T, Arima K: The 14-3-3 protein epsilon isoform, expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis, binds to vimentin and glial fibrillary acidic protein in cultured human astrocytes. Am J Pathol 2004, submitted for publication.

2. 学会発表

国際学会

1) Satoh J-I, Koike F, Fukazawa T, Kawai M, Yamamura T: Interferon- β -responsive genes in multiple sclerosis. 55th Annual Meeting of the American Academy of Neurology, Honolulu, Hawaii, April 2, 2003.

2) Satoh J-I, Kurohara K, Yukitake M, Takashima H, Kuroda Y, Yamamura T: Detection of the 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis. 55th Annual Meeting of American Academy of Neurology. Honolulu, Hawaii, April 2, 2003.

3) Satoh J-I, Yamamura T, Kawai M, Arima K: The 14-3-3 protein is expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis. 15th International Congress of Neuropathology. Torino, September 16, 2003.

国内学会

1) 佐藤 準一、古池 史子、中西 恵美、三枝 隆博、山村 隆: 多発性硬化症特異的遺伝子発現プロファイル. 第 44 回日本神経学会総会. 東京、2003 年 5 月 17 日.

2) 佐藤 準一、三枝 隆博、山村 隆、小川 雅文、川井 充、: 多発性硬化症脱髄巣における 14-3-3 蛋白質の発現. 第 44 回日本神経病理学会総会学術研究会. 名古屋、2003 年 5 月 29 日.

3) 佐藤 準一: 多発性硬化症患者と健常者の末梢血リンパ球遺伝子発現プロファイルの比較解析. 第 2 回東京 MS 研究会. 東京、2003 年 9 月 5 日.

4) 佐藤 準一、中西 恵美、尾上 祐行、古池 史子、山村 隆: 多発性硬化症患者と健

常者の末梢血リンパ球遺伝子発現プロフィールの比較解析. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会. 福岡, 2003 年 12 月 9 日.

5) 中西 恵美、佐藤 準一、荒浪 利昌、山村 隆：ApoE 欠損マウスにおける実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の重症化. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会. 福岡, 2003 年 12 月 9 日.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得(出願中)

- 1) 多発性硬化症に対するインターフェロン・ベータ薬物治療の有効性予測法
- 2) 多発性硬化症特異的遺伝子発現プロフィールの解析

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

非特異的サプレッサー細胞を誘導する新規ペプチド療法 開発に関する研究

分担研究者 山村 隆

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部部长

研究要旨

自己免疫疾患に対する治療戦略には抗原特異的治療と非特異的治療があり、ペプチド療法は抗原特異的機序を介するものと考えられてきた。しかし、本研究者らは PLP136-150 ペプチドで感作した SJL/J マウスの所属リンパ節細胞の中に、抗原非特異的なサプレッサー細胞が誘導されることを発見した。このサプレッサーの誘導によって、PLP136-150 で感作したマウスは、EAE 再誘導に抵抗性を獲得する。一方、米国で汎用されている PLP139-151 で感作したマウスでは、サプレッサーは誘導されないことがわかった。この結果は、抗原非特異的なペプチド療法の開発の可能性を示し、サプレッサー細胞の性状や誘導に必要な条件などの研究が重要であることを意味する。

A. 研究目的

自己免疫疾患に対する先端的な治療戦略は、抗原特異的治療と抗原非特異的な治療に大別される。前者の代表が抗原ペプチド療法であり、自己抗原ペプチドそのもの、あるいはペプチドの変換体（altered peptide ligand; APL）の治療成績が発表されている。ミエリン塩基性蛋白ペプチドの APL は多発性硬化症の患者に投与されたが、一部で著明な再発を誘導したために開発が中止となっている。

一方、抗原非特異的な治療法には、従来の免疫抑制剤やステロイドも含まれる

が、分担研究者らは抗炎症性サイトカインを NKT 細胞などの調節細胞に産生させる方法の開発を精力的に進めてきた。近年の調節細胞の研究結果は、抗原非特異的メカニズムが有効に作用することを示し、アナフィラキシーなどの問題も回避できることから、洗練された抗原非特異的療法に対する期待が高まっている。

我々は最近、抗原非特異的なペプチド療法が新たな治療戦略として有望であると考え検討を続けている。本報告書では、その発想のもとになった実験結果を示し、その意義を論じる。

B. 研究方法

SJL/J マウス（日本 Charles River）に合成ペプチド感作によって EAE を誘導した。EAE 誘導に用いたペプチドは、PLP139-151、PLP136-150、PLP178-191、MBP89-101、MOG92-106 の各配列であり、完全フロイント・アジュバント（CFA）で混和したホモジェネートを接種することにより誘導した。初回免疫から約 1 か月後に、同一または異なるペプチドで追加感作し、EAE の再誘導が可能かどうか評価した。感作リンパ節細胞のペプチドに対する細胞増殖反応はチミジンの取込みにより評価し、サイトカイン産生能は ELISA および CBA で測定した。

C. 研究結果

現在日本 Charles River で維持されている SJL/J マウスを利用したところ、EAE を誘導できたペプチドは PLP136-150、PLP139-151、および PLP178-191 ペプチドのみであった。その中で、PLP139-151 で誘導した EAE では寛解率が低く再発が比較的多かった。一方、PLP136-150 で誘導した場合には、ほぼ寛解に入り再発しなかった。PLP178-191 では寛解率は高いが再発率が高かった。

PLP139-151 および PLP178-191 による EAE から回復したマウスに、同一または異なるペプチドで再感作すると EAE の再誘導が観察された。しかし、PLP136-150 による EAE から回復した

マウスでは、同一または異なるペプチドで感作しても EAE は再誘導できなかった。

PLP136-150 で初回感作したマウスでは、PLP139-151 で初回感作したマウスに比較して、二回目の感作に用いたペプチドに対する recall response が抑制されている傾向が明瞭であった。

PLP136-150 による初回感作で、PLP139-151、PLP136-150、PLP178-191 による EAE の誘導が抑制できることから、エピトープ非特異的な抑制機構の関与が推測された。そこで、PLP136-150 または PLP139-151 で感作し、EAE の回復が見られてから所属リンパ節細胞、または脾臓細胞を調製し、ナイーブな SJL/J マウスに移入し、これらのマウスを PLP139-151 で感作して EAE を誘導した。その結果、PLP136-150 感作マウスの所属リンパ節細胞を移入されたマウスでは、EAE の発症が抑制されることがわかった。

D. 考察

EAE の回復後、EAE の再誘導に対して抵抗性を獲得する現象は、ラット EAE モデルでは良く知られている。この抵抗性については、抗原特異的要素と抗原非特異的要素の両者が関与すると言われていたが、最近では研究している研究者はいないようである。

一方、SJL マウスの EAE では、再感作による EAE 誘導が可能であることが知ら

れて来た。このラットとマウスの乖離は、もっぱらマウスの免疫系の特徴と考えられてきたようである。しかし、今回の我々の検討により、SJL マウスにおいてもペプチド配列を選べば、ラット EAE と同じような再誘導抑制の結果が得られることが明らかになった。PLP139-151 と PLP136-150 は両端の 4 残基を除くと、同一のコア配列を含んでおり、エピトープ非特異的なサプレッサーを誘導することもわかった。今後サプレッサー細胞の性状や、その誘導に重要な残基を明らかにすることにより、新たなペプチド療法を開発することも可能ではないかと考えている。

E. 結論

PLP136-150 ペプチドの感作によって、SJL マウスに EAE 再誘導を抑制するサプレッサー細胞が誘導できる。サプレッサーの作用機構はエピトープ非特異的であり、これまでに知られているペプチド療法のメカニズムとは異なる。誘導されたサプレッサーが CD25⁺CD4⁺調節 T 細胞であるか否か、サプレッサー細胞誘導に重要なペプチド構造は脳炎惹起性 T 細胞誘導に必要なものと同一か否かなど、今後検討されるべき課題が山積している。この古くて新しい問題に取り組むことによって、新規な治療法の開発にまで発展する可能性は十分ある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakamura T, Sonoda K-H, Faunce DE, Gumperz J, Yamamura T, Miyake S, Stein-Streilein J: CD4⁺ NKT cells, but not conventional CD4⁺ T cells, are required to generate efferent CD8⁺ T regulatory cells following antigen inoculation in an immune-privileged site. *J. Immunol.* 171:1266-1271, 2003

Bedoui S, Miyake S, Lin Y, Miyamoto K, Oki S, Kawamura N, Beck-Sickinger A, von Hoersten S, and Yamamura T: Neuropeptide Y (NPY) suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: NPY Y₁ receptor-specific inhibition of autoreactive Th1 responses in vivo. *J. Immunol.* 171: 3451-3458, 2003

Stanic AK, Shashidharamurthy R, Bezradica JS, Matsuki N, Yoshimura Y, Miyake S, Choi EY, Schell TD, Van Kaer L, Tevethia SS, Roopenian DC, Yamamura T and Joyce S: Another view of T cell antigen recognition: Co-operative engagement of glycolipid antigens by V α 14J α 18 natural TCR. *J. Immunol.* 171:4539-4551, 2003

Chiba A, Oki S, Miyamoto K, Hashimoto H, Yamamura T, and Miyake S: Natural killer T-cell activation by OCH, a sphingosine truncated analogue of α -galactosylceramide, prevents

collagen-induced arthritis. *Arthr. Rheumat.* 50:305-313, 2004

Illes Zs, Shimamura M, Newcombe J, Oka N, and Yamamura T: Accumulation of V α 7.2J α 33 invariant T cells in autoimmune inflammatory lesions of the nervous system. *Int. Immunol.* 16: 223-230, 2004

山村 隆、三宅 幸子：実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) に対する NKT 細胞の機能制御治療とその応用. *Molecular Medicine 臨時増刊号「免疫 2004」* (岸本忠三編集), 中山書店 (東京), pp 305-311, 2003

山村 隆：NKT 細胞と自己免疫：調節性 CD4⁺NKT 細胞の役割. *Molecular Medicine* 40 : 562-568, 2003

山村 隆：多発性硬化症の発症機構と NK 細胞/NKT 細胞. *日本臨床* 61: 1329-1334, 2003

山村 隆：NKT 細胞を介した自己免疫疾患制御. *炎症と免疫* 11 : 616-622, 2003

佐藤 準一、山村 隆：多発性硬化症治療への新しい展望. *最新医学* 58:1926-1938, 2003

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* 40: 205-208, 2003

長山 成美、山村 隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎と多発性硬化症. 特集 *Molecular mimicry (分子模倣) と疾患. 医学のあゆみ* 206:845-848, 2003

山村 隆：近未来の多発性硬化症治療. *BIO Clinica* 18: 1069-1073, 2003

山村 隆、林 幼偉、三宅 幸子：多発性硬化症の進行を抑制する免疫細胞. 特集 *脳と免疫. Brain Medical* 15: 401-405, 2003

2. 学会発表

山村 隆、佐藤準一、宮本勝一、三宅幸子：シンポジウム「神経疾患の克服」神経疾患の免疫療法. 第 26 回日本医学会総会. 福岡国際会議場. 福岡. 2003 年 4 月 5 日

山村 隆、荒木 学、三宅 幸子：新規糖脂質 OCH による自己免疫病態の制御. ワークショップ 13. 第 92 回日本病理学会総会. 2003 年 4 月 25 日, 福岡

山村 隆、三宅 幸子：合成糖脂質抗原と Th1/Th2 バランス. シンポジウム「気管支喘息・新しい治療戦略」第 15 回日本アレルギー学会春期臨床大会. 横浜. 2003 年 5 月 12 日

山村 隆：多発性硬化症における NKT 細胞の役割. シンポジウム『自己免疫疾患とトレランス破綻のメカニズム』第 31 回日本臨床免疫学会. 東京. 2003 年 10 月 9 日

山村 隆、荒木 学、三宅 幸子：新規糖脂質 OCH による自己免疫病態の制御. ワークショップ 13. 第 92 回日本病理学会総会. 2003 年 4 月 25 日, 福岡

Yamamura, T: Immunology of Asian multiple sclerosis. *MS Across Continents: Insights from Asia and the Middle East. A programme organized under the auspices of the MS Forum.* Bangkok, Thailand, Oct. 10, 2003

H. 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

ヒト培養脳毛細血管内皮細胞(HBMEC)の糖脂質組成：ヒト 臍帯静脈由来内皮細胞との比較検討

分担研究者 神田 隆 東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学分野助教授

研究協力者 岡本尚子¹、大和田潔¹、山脇正永¹、笠間健嗣²、有賀敏夫³、金 紅蓮¹、水澤英洋¹

¹東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学、²同機器分析センター、³(株)エーザイ

研究要旨

ヒト初代培養脳毛細血管由来内皮細胞(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者であった。酸性糖脂質はGM3とLM1が主体で、HBMECでは両者とも増殖期に発現が少なく、confluent stateで増加が見られた。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り、新規治療法の開発に示唆を与えるものである。

A. 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で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。

B. 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10 cm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%)の状態でも回収した。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。

Table 1 Glycosphingolipid Composition of Cultured HBMEC and HUVEC

	HBMEC-C	HBMEC-NC	HUVEC-C	HUVEC-NC	(ng/mg protein)
Acidic GSLs					
GM3	153.3 ± 40.1	31.8 ± 13.8*	290.1 ± 20.7	153.3 ± 24.2	
LM1	72.9 ± 12.9	22.2 ± 4.5**	109.9 ± 39.2	58.0 ± 10.1	
GM1	0.89 ± 0.11	0.77 ± 0.20	1.06 ± 0.21	0.75 ± 0.06	
GD1a	0.54 ± 0.08	0.46 ± 0.12	0.37 ± 0.11	0.33 ± 0.09	
GD1b	trace	trace	trace	trace	
GT1b	0.31 ± 0.12	0.34 ± 0.11	0.31 ± 0.06	0.22 ± 0.11	
Neutral GSLs					
LacCer	36.9 ± 12.7	22.8 ± 11.0	46.0 ± 17.4	42.4 ± 6.7	
Gb3	68.5 ± 16.4	76.5 ± 23.1	32.4 ± 8.3	33.6 ± 7.8	
Gb4	231.5 ± 60.4	169.9 ± 47.9	149.4 ± 66.2	150.6 ± 38.0	

* P<0.05 vs. HBMEC-C and P<0.01 vs. HUVEC-C.

**P<0.01 vs. HBMEC-C and P<0.05 vs. HUVEC-C

HBMEC-C, human brain microvascular endothelial cell, confluent state; HBMEC-NC, human brain microvascular endothelial cell, non-confluent state; HUVEC-C, human umbilical cord vein endothelial cell, confluent state; HUVEC-NC, human umbilical cord vein endothelial cell, non-confluent state. N=3, values were expressed as ng ± SEM per mg protein.

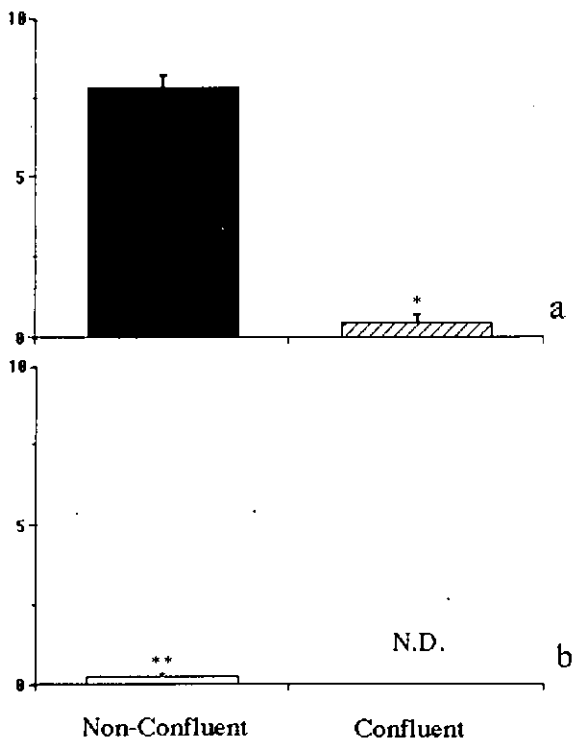


Figure 1. SGPG content in HUVEC (a) and HBMEC (b) at non-confluent state and after confluency. Bar = SEM. *, P<0.0001; **, P<0.001 vs. HUVEC at non-confluent state (black bar).

4. HPTLC-免疫染色法

展開後のプレートを polyisobutylmethacrylate でコーティング後、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。

C. 研究結果

1. HBMEC、HUVEC の主要な中性糖脂質として Gb4、Gb3、LacCer が検出された。Gb3 の含量は HBMEC が HUVEC の約 2 倍であった。中性糖脂質の量は細胞の密集度と関連がなかった。

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 と比較して低値で、とくに HBMEC セミコンフルエント時の GM3、LM1 はコンフルエントの HUVEC、HBMEC と比較して有意に低値であった。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。

D. 考察

ガングリオン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もの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⁾を構成する際などに比較的純粋な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。

E. 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 cultured 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 leakage in an in vitro blood-nerve barrier model. *Neurology* 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 sulfoglucuronosyl paragloboside, a ligand for L-selectin, in brain microvascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7897-7901, 1995.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

1. Takashi Kanda, Masanaga Yamawaki, Hidehiro Mizusawa. Sera from Guillain-Barré patients enhance leakage in blood-nerve barrier model. *Neurology* 60: 301-306, 2003.

2. Fumiko Koike, Jun-ichi Satoh, Sachiko Miyake, Yamamoto T, Mitsuru Kawai, Seiji Kikuchi, Kyoichi Nomura, Yokoyama K, Kohei Ota, Takashi Kanda, Toshiyuki Fukazawa, Takashi Yamamura: Microarray analysis identifies interferon b-regulated genes in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 139: 109-118, 2003.
3. Satoru Ishibashi, Takanori Yokota, Toshiaki Shiojiri, Takashi Matsunaga, Hiroaki Tanaka, Kazutaka Nishina, Hideaki Hirota, Akira Inaba, Masahito Yamada, Takashi Kanda, Hidehiro Mizusawa: Reversible acute axonal polyneuropathy associated with Wernicke-Korsakoff syndrome: impaired physiological nerve conduction due to thiamine deficiency? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74: 674-676, 2003.
4. 野口悦正、土山高明、松本 卓、藤ヶ崎浩人、稲葉 彰、横田隆徳、神田 隆、水澤英洋: 2つのことなる機序のニューロパチーをともなったシェーグレン症候群の1例-発症機序と治療法に関する考察-。 *臨床神経学* 43: 539-543, 2003.
5. Takashi Kanda, Yukiyo Numata, Hidehiro Mizusawa: Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75: 2004, in press.
6. 神田 隆: 単一病変の多発性硬化症. *Current Insights in Neurological Sciences* 11: 10-11, 2003.
7. 神田 隆: 病巣部位診断の原則. 末梢神経. *Clinical Neuroscience* 21: 336-337, 2003.
8. Takashi Kanda: Editorial: Chronic hepatitis C infection and peripheral neuropathy; is mixed cryoglobulinemia really important? *Intern Med* 42: 377-378, 2003.
9. 神田 隆: 多発性硬化症. 血液脳関門の破綻の機序とその修復. *日本臨床* 61: 1402-1408, 2003.
10. 神田 隆: 末梢性ニューロパチーの病理形態学. *神経進歩* 47: 481-491, 2003.
11. 神田 隆: 末梢神経疾患の診断. -末梢神経の pathology を中心に-. *小児神経学の進歩* 第32集. 19-27, 2003.
12. 神田 隆: 改訂脊髄小脳変性症のすべて. 診断の進め方と鑑別診断. *難病と在宅ケア* 9: 43-46, 2003.
13. 神田 隆: シャルコー・マリー・トゥース病. *脳と神経* 55: 576-586, 2003.
14. 神田 隆: バリアー破綻と液性因子. *神経免疫学* 11: 237-241, 2003.

15. 大和田潔、神田 隆: 中枢神経疾患におけるプログラム細胞死とアポトーシス. *細胞* 35: 326-329, 2003.
16. 神田 隆: 免疫系と神経系を隔てるバリアー. *Brain Medical* 15: 353-359, 2003.

II 学会発表

国際学会

1. Kanda, T., Ariga, T., Kubodera, H., Jin, H.L., Owada, K., Kasama, T., Yamawaki, M., Mizusawa, H.: Glycosphingolipid Composition of Primary Cultured Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Neuroscience 2003, New Orleans, USA*

国内学会

1. 山脇正永、神田 隆、水澤英洋: 中枢神経系における糖脂質局在: myelin, Ranvier node 分画を用いた検討. 第44回日本神経病理学会総会学術研究会、名古屋
2. 横手裕明、越川淳也、高島 実、石橋 哲、三條伸夫、神田 隆、猪狩 亨、桶田理喜、水澤英洋: 常染色体優性遺伝性進行性外眼筋麻痺の一部検例. 第44回日本神経病理学会総会学術研究会、名古屋
3. 石橋 哲、坂本昌己、藤ヶ崎浩人、石川欽也、小松崎八寿子、谷澤 徹、桶田理喜、神田 隆、水澤英洋: Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF)の一部検例. 第44回日本神経病理学会総会学術研究会、名古屋
4. 松本 卓、沼田幸代、神田 隆、水澤英洋: 多発性筋炎(PM)における抗 HLA class I antigen 抗体の診断的有用性についての検討. 第44回日本神経病理学会総会学術研究会、名古屋
5. 野口悦正、佐藤 望、松本 卓、藤ヶ崎浩人、稲葉 彰、山脇正永、横田隆徳、神田 隆、水澤英洋: シェーグレン症候群に伴うニューロパチーに対するステロイドパルス療法および免疫グロブリン大量療法的作用機序の検討. 第15回日本神経免疫学会学術集会、長崎
6. 宇野佳孝、日詰正樹、野口悦正、石橋 哲、袖山信幸、藤ヶ崎浩人、稲葉 彰、横田隆徳、神田 隆、水澤英洋: Diabetic radiculoplexus neuropathyの発症機序および免疫抑制療法に対する反応性の検討. 第15回日本神経免疫学会学術集会、長崎
7. 神田 隆、大和田潔、岡本尚子、山脇正永、水澤英洋: 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. 第15回日本神経免疫学会学術集会、

長崎

8. 横田隆徳、叶内 匡、神田 隆、水澤英洋、吉田雅幸：E-セレクトインに対する siRNA 導入によるヒト血管内皮への白血球接着抑制。第 15 回日本神経免疫学会学術集会、長崎
9. 大和田潔、神田 隆、岩崎孝之、山脇正永、水澤英洋：免疫性神経疾患における NF- κ B を介した血液神経関門破壊のメカニズム。第 15 回日本神経免疫学会学術集会、長崎
10. 山脇正永、神田 隆、大和田潔、岡本尚子、水澤英洋：ヒト脳血管内皮細胞における IL-1/Toll レセプター及び関連分子の発現。第 15 回日本神経免疫学会学術集会、長崎
11. 神田 隆：ワークショップ：血液脳関門・血液神経関門の基礎と臨床；バリアーの生理と破綻・修復のメカニズムを探る：バリアー破綻と液性因子。第 15 回日本神経免疫学会学術集会、長崎
12. 石橋賢士、斉藤和幸、叶内 匡、石川欽也、山脇正永、神田 隆、水澤英洋：Pharyngeal cervical brachial weakness を認めた Miller Fisher 症候群の 1 例。第 8 回日本神経感染症学会学術集会、宇部
13. 山脇正永、神田 隆、水澤英洋：末梢神経 Ranvier node 分画における糖脂質局在。第 44 回日本神経学会総会、横浜
14. 神田 隆、沼田幸代、山脇正永、水澤英洋：CIDP 患者の末梢神経を構成する微小血管では BNB 関連蛋白の変化が見られる。第 44 回日本神経学会総会、横浜
15. 松本 卓、佐藤 望、袖山信幸、金子英司、小寺 実、神田 隆、吉澤靖之、水澤英洋：PRES の原因と発症機序の多様性についての検討。第 44 回日本神経学会総会、横浜
16. 叶内 匡、横田隆徳、大村真紀、神田 隆、水澤英洋、吉田雅幸：培養ヒト脳血管内皮細胞において siRNA は E-セレクトインの発現を抑制した。第 44 回日本神経学会総会、横浜
17. 西田陽一郎、三浦義治、稲葉 彰、横田隆徳、神田 隆、水澤英洋：中枢運動伝導時間の著明な延長を示す筋萎縮性側索硬化症の臨床的特徴について。第 44 回日本神経学会総会、横浜
18. 久保寺尚子、大和田潔、有賀敏夫、笠間健司、山脇正永、神田 隆、水澤英洋：ヒト培養脳微小血管由来内皮細胞(HBMEC)の構成糖脂質解析。第 44 回日本神経学会総会、横浜
19. 宇野佳孝、山脇正永、神田 隆、水澤英洋：Miller Fisher syndrome (MFS)における遅発性顔面神経麻痺。第 44 回日本神経学会総会、横浜
20. 野口悦正、網野猛志、田尾 修、岩田 剛、大

- 和田潔、常深泰司、藤ヶ崎浩人、横田隆徳、神田 隆、水澤英洋、稲葉 彰：多巣性伝導ブロックを伴ったサルコイドニューロパチー3例の検討。第 44 回日本神経学会総会、横浜
21. 日詰正樹、山脇正永、神田 隆、水澤英洋、田中宏明：当施設における過去 23 年間の重症筋無力症の臨床的解析。第 44 回日本神経学会総会、横浜
22. 新美祐介、日詰正樹、野口悦正、大久保卓哉、石川欽也、藤ヶ崎浩人、山脇正永、神田 隆、水澤英洋、清澤源弘：視神経原発と考えられた悪性リンパ腫の 1 例。第 506 回日本内科学会関東地方会、東京
23. 立石知也、宇野佳孝、松本 卓、藤ヶ崎浩人、横田隆徳、神田 隆、水澤英洋：両側尾状核から被殻に病変を認めた Varicella Zoster Virus (VZV) encephalomyelitis の 1 例。第 508 回日本内科学会関東地方会、東京
24. 田中 啓、野口悦正、佐藤 望、藤ヶ崎浩人、神田 隆、水澤英洋、山本 晃：動眼神経麻痺で発症した悪性リンパ腫の 1 例。第 509 回日本内科学会関東地方会、東京
25. 小田柿智之、田中啓、野口悦正、藤ヶ崎浩人、神田 隆、水澤英洋、渡辺 守：強い筋痛を認めるも CK 上昇を伴わない筋炎を合併した潰瘍性大腸炎の 1 例。第 510 回日本内科学会関東地方会、東京
26. 久保文人、日詰正樹、山脇正永、神田 隆、水澤英洋、成相 直：中枢性尿崩症を合併した家族性もやもや病の 1 例。第 164 回日本神経学会関東地方会、東京
27. 青柳誠、三木一徳、相川光弘、小寺 実、神田 隆：膀胱直腸障害にて発症した、乳線原発性悪性リンパ腫による抗 MAG 抗体陽性自己免疫性多発ニューロパチーの一例。第 164 回日本神経学会関東地方会、東京
28. 野口悦正、三浦義治、横田隆徳、神田 隆、水澤英洋、宮崎晋平：遷延するたこつぼ型心筋障害を呈したギランバレー症候群の 1 例。第 165 回日本神経学会関東地方会、東京
29. 若林志穂子、宇野佳孝、石川欽也、神田 隆、水澤英洋：劇症横紋筋融解症を呈した皮膚筋炎の一例。第 166 回日本神経学会関東地方会、東京
30. 神田 隆：シンポジウム：血液脳関門、血液神経関門と免疫性神経疾患。第 8 回グリア研究会、名古屋

H. 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

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	書籍名、 書籍全体の 編集者名	巻・頁・出 版社・出版 年・出版地
山村 隆、三宅 幸子	実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) に対するNKT細胞の機能制御治療とその応用	Molecular Medicine 臨時増刊号 「免疫2004」 岸本忠三編	pp 305-311, 中山書店 2003、東京
三宅 幸子	自己免疫性脳脊髄疾患の糖脂質療法	Annual Review 神経2004 柳沢信夫 篠原幸人、岩田誠 清水輝夫、寺本明 編	237-24 2004 中外医学社 東京

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・頁 出版年
Nakamura T, Sonoda K-H, Faunce DE, Gumperz J, Yamamura T, Miyake S Stein-Streilein J	CD4+ NKT cells, but not conventional CD4+ T cells, are required to generate efferent CD8+ T regulatory cells following antigen inoculation in an immune-privileged site.	J. Immunol.	171:1266- 1271, 2003.
Bedoui S, Miyake S, Lin Y, Miyamoto K, Oki S, Kawamura N, Beck- Sickinger A, von Hoersten S, and Yamamura T	Neuropeptide Y (NPY) suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: NPY Y1 receptor-specific inhibition of autoreactive Th1 responses in vivo.	J. Immunol.	171:3451- 3458, 2003.
Stanic AK, Shashidharamurthy R, Bezradica JS, Matsuki N, Yoshimura Y, Miyake S, Choi EY, Schell TD, Van Kaer L, Tevethia SS, Roopenian DC, Yamamura T and Joyce S	Another view of T cell antigen recognition: Co-operative engagement of glycolipid antigens by V α 14J \cdot 18 natural TCR.	J. Immunol.	171:4539- 4551, 2003.
Chiba A, Oki S, Miyamoto K, Hashimoto H, Yamamura T, and Miyake S	Natural killer T-cell activation by OCH, a sphingosine truncated analogue of a-galactosylceramide, prevents collagen-induced arthritis.	Arthr. Rheumat.	50:305-313, 2004.
Illes Zs, Shimamura M, Newcombe J, Oka N, and Yamamura T	Accumulation of V α 7.2J α 33 invariant T cells in autoimmune inflammatory lesions of the nervous system.	Int. Immunol.	16:223-230, 2004.
Shimamura M, Huang Y-Y, and Goji H	Antibody production in early life supported by maternal lymphocyte factors.	Biochim. Biophys. Acta, Molecular Basis of Diseases.	1637:55-58, 2003.

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・頁 出版年
Shimamura M, Kobayashi K, Watanabe H, Huang Y-Y, Okamoto N, Kanie O, Goji H and Kobayashi M	Generation of Val4 NKT cells in vitro from hematopoietic precursors residing in bone marrow and peripheral blood.	Eur. J. Immunol.	(in press)
Satoh I-I, Yukitake M, Kurohara K, Takashima H, and Kuroda Y	Detection of the 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid of Japanese multiple sclerosis patients presenting with severe myelitis.	J. Neurol. Sci.	212:11-20, 2003
Kanda T, Yamawaki M, and Mizusawa H	Sera from Guillain-Barre patients enhance leakage in blood-nerve barrier model.	Neurology	60:301-306, 2003
山村 隆	NKT細胞と自己免疫:調節性CD4 ⁺ NKT細胞の役割	Molecular Medicine	40:562-568, 2003
山村 隆	多発性硬化症の発症機構とNK細胞/NKT細胞	日本臨床	61:1329-1334, 2003
山村 隆	NKT細胞を介した自己免疫疾患制御	炎症と免疫	11:616-622, 2003
佐藤 準一, 山村 隆	多発性硬化症治療への新しい展望	最新医学	58:1926-1938, 2003
長山 成美, 山村 隆	実験的自己免疫性脳脊髄炎と多発性硬化症. 特集Molecular mimicry (分子模倣) と疾患	医学のあゆみ	206:845-848, 2003
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	40:205-208, 2003
山村 隆	近未来の多発性硬化症治療	BIO Clinica	18:1069-1073, 2003
山村 隆, 林 幼偉, 三宅 幸子	多発性硬化症の進行を抑制する免疫細胞. 特集脳と免疫	BRAIN MEDICAL	15:401-405, 2003
三宅 幸子, 千葉 麻子	NKT細胞合成糖脂質リガンドによる関節炎の治療	臨床免疫	40:61-65, 2003
三宅 幸子	神経ペプチドと自己免疫疾患	BRAIN MEDICAL	15:27-32, 2003
三宅 幸子	NKT細胞と自己免疫疾患	内科	93:213-216, 2004
三宅 幸子	ナチュラルキラーT細胞を標的とした多発性硬化症の糖脂質治療	医学のあゆみ	208:449-453, 2004
佐藤 準一	脳の炎症とグリア細胞の役割	BRAIN MEDICAL	15:15-20, 2003