

appearing white matter (NAWM)に関心領域を設定した。撮像シーケンスは PRESS 法 (point resolved spectroscopy), TR 2000 msec, TE 136 msec, 積算 128 回, 水抑制パルスは chemical shift selective (CHESS, 帯域 1ppm)法を用いた。スペクトル解析は装置付属の標準プログラム (MRS-Pro)による自動解析で行った。NAA, Cho の各ピークは Cr の面積値との比をとり, 定性的に評価し, MS 症例とコントロールのスペクトルを検討した。また IFN β 1-b 投与7例の治療導入前及び2年後の MRS について, 未治療の 11 例と比較し検討した。統計にはそれぞれ Mann-Whitney の U 検定および Wilcoxon の符号付順位検定を用いた。

【結果】

MS では病巣部, NAWM のいずれにおいても, 有意な NAA/Cr の低下を認めた(表1)。急性期病巣では, NAA/Cr の著明な低下と Cho/Cr の上昇, Lac の出現を認め, ステロイド治療により臨床症状の改善とともに, NAA/Cr は上昇, Cho/Cr は低下, Lac は消失した。また NAWM の NAA/Cr は, EDSS と負の相関があった(図2)。IFN β 1-b 投与7例では, 2年後の NAA/Cr は上昇傾向にあった($P=0.28$)が, 未治療群では, 一定の傾向はなかった。

【考察】

NAA は成人では神経細胞にのみ存在する物質で, その生理的な役割は不明ではあるが, 神経細胞および軸索のマーカーと考えられている。Cho は細胞膜リン脂質に由来し, 脱髄や腫瘍で上昇する。Cr は脳内で一定の濃度であることか

ら内因性基準物質として用いられ, Lac は嫌気性代謝物質として組織の炎症過程を反映する。慢性期病巣での NAA/Cr の低下は病理学的には, 軸索の密度と相関することが確認されている²⁾が, 今回の検討では病巣のみならず, NAWM においても NAA/Cr の低下を認め, かつ機能予後と相関しており, MRS は MS における大脳白質全体の軸索傷害および神経細胞死を反映する可能性が示唆された。神経細胞死は MS の進行度を測るのに重要な指標であり, 将来的には治療の指標になりうる可能性がある。急性期病巣においても NAA/Cr の低下を認めたことは, MS の軸索障害は従来考えられていたよりも早い時期に起こっており, MS の一次病変である可能性があることを示唆している。

図1

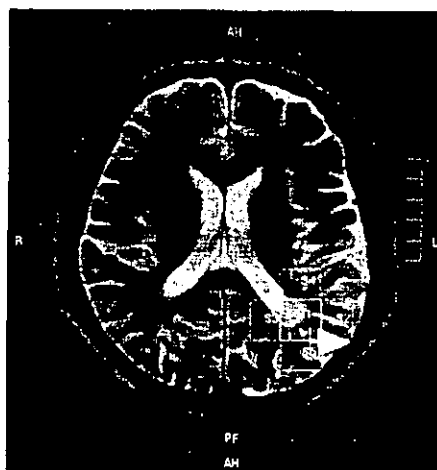
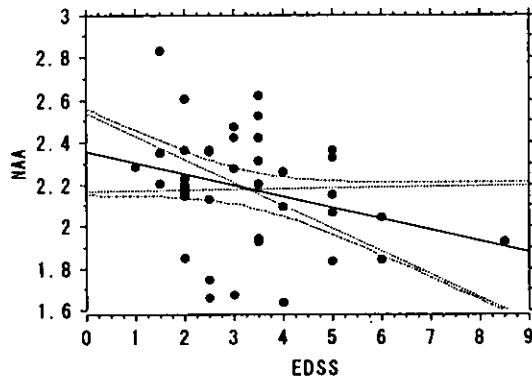


表1

	NAA/Cr	Cho/Cr
MS lesion	2.01 ± 0.23*	1.12 ± 0.02
NAWM	2.18 ± 0.27**	1.13 ± 0.18
control	2.49 ± 0.31	1.18 ± 0.20

* $P < 0.001$, ** $P = 0.04$

図 2



また 2 年間の IFN β 1-b 治療により NAA/Cr の上昇を認めたことは、その機序は不明であるが、IFN β 1-b は神経細胞・軸索障害を改善しうる可能性があることを示唆している。

【結論】

¹H-MRSを用いてMSの病態について検討した。MRSは、脱髄、炎症所見や、従来の画像診断ではとらえられなかった白質全体の神経細胞死・軸索障害等の病態を詳細に反映する。MSでは、NAWMにおいても有意な神経細胞死・軸索障害がある。また、病巣部における軸索障害は比較的早期よりおこり、MSの一次病変である可能性がある。

文献

- 1) Jenifer C. et al. MR lesion load and cognitive function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. AJNR 1999;20:1951-1955
- 2) Andreas Bitch, Wolfgang Bruck et al. Inflammatory CNS demyelination: Histopatologic correlation with In vivo quantitative proton MR spectroscopy. AJNR 1999; 20: 1619-1627

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

RRMS, SPMS, PPMSの免疫病理学的背景は異なるか？

分担研究者 松井 真¹⁾

共同研究者 荒谷信一¹⁾、王会雲¹⁾、小澤恭子¹⁾、齋田孝彦¹⁾、松島綱治²⁾

研究要旨

PPMSやSPMSに独自の免疫病態が存在するか否かについて検討する目的で、RRMS30名（急性増悪期17例、安定期13例）、SPMS8名、PPMS5名について末梢血リンパ球の細胞内サイトカインおよび膜表面抗原検索を試みた。その結果、PPMSでは、IL-4産生性のTh2細胞とともに炎症性サイトカインであるTNF- α を産生するCD4細胞の両者が増加しており、RRMSやSPMSとは異なる免疫病態に基づく疾患である可能性が示唆された。一方SPMSではTNF- α がRRMSからSPMSへの病態変容に関与している可能性が明らかになった。

研究目的

再発・寛解型多発性硬化症（RRMS）患者の薬物治療の適応判断やその有効性の判定には、疾患活動性の客観的な評価が不可欠である。われわれは、従来使用されてきた再発回数やMRI画像上のガドリニウム造影病巣数などの指標のほかに、外来検査として施行可能な末梢血リンパ球の細胞内サイトカイン検索が有用であることを報告してきた。一方、一次性進行型MS（PPMS）や二次性進行型MS（SPMS）においては、客観化された臨床指標を設定することは困難である。今回われわれは、細胞内サイトカインおよび膜表面抗原検索によって細胞性免疫を評価することにより、RRMSの急性期や安定期の患者で得られた結果と比較検討することで、PPMSやSPMSに独自の免疫病態が存在するか否かについて検討することを試みた。

研究方法

1) 対象は15歳から65歳までのclassical typeのMS患者に限定した。また、ステロイド内服中の患者およびIFN- β 治療中の患者は対象から除外した。その結果、全患者数43名（男女比16：27、平均年齢35.9歳）の内訳は、RRMSが30名（うち急性増悪期17例、安定期13例）、SPMSが8名、PPMSが5名であった。

2) 表面抗原解析によるリンパ球亜分画の同定
末梢血より取り出した単核球は、2重染色1項目あたり50 μ lの2.5%FCS添加PBSに浮遊させ、4°Cで45分間二重染色し、フローサイトメトリー

（EPICS XL, Beckman Coulter社）で解析した。CD4陽性ヘルパーT細胞についてはCCR5およびCXCR3を発現したTh1細胞、CCR3およびCCR4を発現したTh2細胞、さらにCD4+CD25+活性化T細胞、CD4+CD26+メモリーT細胞、CD4+CD29+ helper inducer T細胞を検索対象とした。またCD8細胞側では、CD11a陽性細胞傷害性T細胞やCCR5あるいはCXCR3抗原を発現した亜分画についても検索した。

3) 細胞内サイトカイン陽性リンパ球の解析

Th1サイトカインとしてIFN- γ とIL-2を、Th2サイ

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

トカインとしてIL-4を、さらに炎症性サイトカインであるTNF- α も検索対象とした。単核球を最終濃度20ng/mlのPMAと2 μ g/mlのIonomycinにより刺激し、Brefeldin A（20 μ g/ml）とMonensin（1 μ M）の存在下で4時間培養した。PE標識抗CD4および抗CD8抗体を用いて表面抗原を染色した後、FITC標識抗体により細胞内の各サイトカインを染色し、フローサイトメトリーで解析した。

研究結果

(1) Kruskal-Wallisおよびone-factor ANOVAのいずれの解析法においても、活動期および安定期RRMS、SPMS、PPMSの4群間を有意に識別する、表面抗原解析によるリンパ球亜分画は存在しなかった。

(2) 細胞内サイトカイン検索結果では、CD4+IL-4+およびCD4+TNF- α +細胞が4群比較で有意に異なっていた（Kruskal-Wallis法）。IL-4を産生するTh2細胞存在率は、安定期RRMS（平均1.25%）やPPMS（平均1.52%）に比し活動期RRMS（平均0.68%）において有意の低値を認めた。さらに、PPMSではSPMS（平均0.75%）よりもむしろ高値であった。他方、CD4+TNF- α +細胞存在率は、活動期RRMSで最も低く（平均10.3%）、安定期RRMS（平均14.0%）、SPMS（平均15.2%）、PPMS（平均19.7%）のいずれとも有意に異なっていた。

考察および結論

PPMSでは、IL-4産生性のTh2細胞とともに炎症性サイトカインであるTNF- α を産生するCD4細胞の両者が増加しており、RRMSやSPMSとは異なる免疫病態に基づく疾患である可能性が示唆された。SPMSではTh2細胞は急性期RRMSと同様低値ながら、CD4+TNF- α は安定期のレベルであり、TNF- α がRRMSからSPMSへの病態変容に関与している可能性が示唆された。

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

フローサイトメトリーによる多発性硬化症患者のサイトカイン産生能 検索結果とその分子免疫学的背景

分担研究者 松井 真¹⁾

共同研究者 王会雲¹⁾、荒谷信一¹⁾、齋田孝彦¹⁾、近藤誉之²⁾

研究要旨

細胞内サイトカインの検索は、再発・寛解型多発性硬化症 (MS) 患者の免疫モニタリング手段として有用であるが、フローサイトメトリーによる解析結果が実際の単核球内サイトカインメッセージ解析の結果とどのように関連しているかを検討した。その結果、IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α のうちIL-4検索結果のみがMSの臨床症状の推移に即して変動し、しかも両検査の結果が一致していた。したがって、IL-4産生細胞は、MSの免疫病態に直結した疾患活動性の指標として測定する意義があることが判明した。

研究目的

再発・寛解型多発性硬化症 (MS) 患者の急性増悪期には、ステロイドの大量点滴静注療法 (パルス療法) が有効であることが知られている。われわれは、MS患者の免疫モニタリング手段として細胞内サイトカインの検索が有用であることを発表してきた。しかし、フローサイトメトリーによる解析結果が実際の単核球内サイトカインメッセージ解析の結果とどのように関連しているかを検討した報告は皆無である。今回、MS急性期からパルス療法を経て回復期に至る過程を追跡調査し得た症例で比較検討することを試みた。

研究方法

対象は再発・寛解型MS患者4例 (女性3名, 男性1名)。症例1は45歳・女性。急性期とパルス療法後の回復期の2回、細胞内サイトカイン染色と未刺激単核球のRT-PCR解析を施行した。症例2は54歳・女性。パルス療法後ではあるが活動期である時期と、回復期に入りIFN- β 開始後早期の2回、両検査を施行した。症例3は32歳・男性。再発時の急性期には両検査とも施行したが、パルス療法後の回復期にはRT-PCR解析のみ施行し得た。症例4は60歳・女性。急性期および回復期とも、RT-PCR解析のみ施行した。

(a) リンパ球細胞内サイトカインの解析

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。培養後は、摂氏4度で30分間、PE標識抗CD4あるいは抗CD8抗体を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permeabilization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、EPICS XLを用いて蛍光陽性細胞を算定した。

1) 国立療養所宇多野病院臨床研究部・神経内科

2) 福井赤十字病院神経内科

(b) RT-PCR

未刺激単核球の凍結サンプルからGenElute (Sigma社製) を用いて全RNAを抽出した後 (回収率0.5~2.0 μ g/ 10^6 cells)、RNA PCR Kit (AMV) Ver.2.1 (Takara社製) を使用してRT-PCRを行った。最終productは、1.5%アガロースゲル上で電気泳動し、UV254nmで検出されるバンドをデジタルカメラ (EDAS/Kodak社製) に取り込み保存した。検索対象としたサイトカインはIL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p40, IFN- γ , TNF- α およびTGF- β である。

研究結果

(1) RT-PCR解析の結果、4名中3名のMS患者 (#1, #3, #4) では、急性期のIL-2 messageを検出せず、回復期に検出された。もう#2では、既に治療が開始されており、IL-2 messageは初回から検出された。しかし、同日採血でIL-2陽性リンパ球存在率を検索し得た2名の患者 (#1, #2) では、両検査は平行した結果を示さなかった。

(2) IL-4 messageは、4名中3名の患者 (#1, #2, #3) で活動期には検出されず、回復期にfaintながら特異バンドが検出された。同日採血でIL-4陽性リンパ球の存在率を検索し得た2名の患者 (#1, #2) では、この経過と一致した結果が得られた。

考察および結論

フローサイトメトリーによる末梢血リンパ球のサイトカイン産生能検査はPMAによる非特異的刺激を加えて解析するが、RT-PCRは未刺激単核球についての解析であるため、両検査は本質的に異なる視点から免疫学的機能を評価するものである。それにも関わらず、IL-4産生細胞は臨床経過に即した変動を示し、両検査は互いに矛盾しない結果を示した。したがって、IL-4産生細胞はMSの免疫病態に直結した疾患活動性の指標として測定する意義があることが判明した。

健康危険情報 なし

知的財産権の出願・登録状況 該当せず

新しい調節性 T 細胞 (V α 7.2-J α 33 invariant T cells) の多発性硬化症における役割

分担研究者 山村 隆¹⁾

共同研究者 Zsolt Illés¹⁾、三宅 幸子¹⁾

研究要旨

多発性硬化症 (MS) 患者末梢血においては、CD1d 拘束性で V α 24-J α Q インバリエント鎖を発現する natural killer T (NKT) 細胞の数と機能に変化が現れ、MS の自己免疫病態との関連が示唆されている。本年度は、NKT 細胞と類似した特徴を備え、“第二の NKT 細胞”とも呼称される V α 7.2-J α 33 インバリエント T 細胞に注目し、SSCP 法により、その末梢血および MS 病変部位における発現を解析した。その結果、MS 脳病変の 50% で V α 7.2-J α 33 インバリエント TCR が検出され、患者髄液の 73% で同インバリエント TCR が検出された。このリンパ球は腸管粘膜内に集簇し腸内細菌叢の影響を受けることから、消化管免疫の調節細胞としての役割が強調されている。しかし、我々の研究結果は、同細胞が MS 病態に関与することを意味し、自己免疫病態の調節細胞としても機能することを示唆する。

研究目的

T 細胞レパトアには TCR にインバリエント鎖を発現する細胞集団が存在し、その中でも代表的なものが、V α 24-J α Q インバリエント鎖を発現する NKT 細胞である。しかし、その他にも、V α 7.2-J α 33、V α 4-J α 29、V α 19-J α 48 などのインバリエント鎖を発現する T 細胞の存在が確認されている (1)。

我々はこれまで MS 患者の末梢血における V α 24-J α Q NKT 細胞の数と機能の変化について解析を加え、CD4 陰性 NKT 細胞の減少、CD4 陽性 NKT 細胞の Th2 偏倚などの変化を明らかにしてきた (2,3)。本年度は V α 7.2-J α 33 TCR を発現する細胞に注目し、SSCP 法および

び定量的 PCR による解析を試みた。この細胞のマウスのホモログについては、Lantz ら (4,5)、および Shimamura ら (6) が独立して解析を進めてきたが、その多くが NK 細胞マーカーを発現することから、第二の NKT 細胞とも呼称されるようになっている。

研究方法

MS 患者の髄液、剖検脳、CIDP などの末梢神経疾患の生検神経組織は、以前 NKT 細胞の検討に用いたものを利用した (2)。V α 7.2-特異的プライマーと C α 特異的プライマーにより PCR 増幅をかけた後、C α 特異的、J α 33 特異的、または V α 7.2-J α 33 インバリエント鎖特異的プローブに hybridize する TCR クロノタイプを描出した。V α 7.2-J α 33 T 細胞の定量的

1) 国立精神・神経センター神経研究所
免疫研究部

解析には、LightCycler による Real-time PCR を用いた。

研究結果

- 1) SSCP 解析の結果、健常者の末梢血では全例 (9/9) でインバリアント鎖が検出され、V α 7.2-J α 33 T 細胞が病態にかかわりなくクローン増殖を起こしていることが示された。また、MS 患者末梢血でも、その多くで同インバリアント鎖が検出された。
- 2) MS の末梢血では、NKT 細胞数が減少していることが明らかになっている。そこで、第二の NKT 細胞 (V α 7.2-J α 33 T 細胞) も末梢血中で減少している可能性が考えられた。しかし、定量的 PCR の結果、健常者と MS 末梢血において、インバリアント TCR mRNA の発現レベルの差は認められなかった。
- 3) MS の凍結脳病変 (14 サンプル) を SSCP 解析した結果、7 サンプルで V α 7.2 陽性の T 細胞が検出され、そのすべてがインバリアント鎖特異的のプロープに反応した。一方、同じ病変における NKT 細胞インバリアント鎖 (V α 24-J α Q) の検出頻度は低かった (1/14)。
- 4) MS 再発時に得られた髄液 11 サンプル中 8 サンプルで、V α 7.2-J α 33 インバリアント鎖が検出された。MS の脳病変で検出頻度が高いこととあわせて、V α 7.2-J α 33 T 細胞が MS の病態に積極的に関与することが推測された。
- 5) 対照として V α 19 陽性 T 細胞について SSCP 解析を行った。健常者および MS 患者の

末梢血サンプル全例で V α 19 陽性 TCR が検出されたが、MS 病変ではまったく検出されなかった。

考察

MS の病態は自己反応性 T 細胞と、それを制御する調節細胞のバランスで規定される面が大きく、調節細胞の研究は MS 病態を解明する上においてきわめて重要である。今回我々は V α 7.2-J α 33 T 細胞に注目し、同細胞が MS の脳病変に浸潤していることを証明した⁷⁾。

インバリアント TCR 鎖を発現する T 細胞は、系統的に古い細胞であり、自然免疫と獲得免疫の橋渡しをする重要な役割が推測されている。V α 7.2-J α 33 T 細胞については、その多くが NK 細胞のマーカーを発現することが示され、第二の NKT 細胞と呼ぶことも可能な細胞集団である。NKT 細胞が CD1d 分子に結合した糖脂質を認識し、大量のサイトカインを産生することが示されているのに対し、この第二の NKT 細胞は MHC class Ib 分子である MR1 分子に拘束されることが、最近 Lantz らによって証明された (5)。さらに彼らは、この細胞が腸管の lamina propria に集積し、腸内免疫の制御に関与する可能性を指摘している。また、germ-free のマウスでは検出できないことから、腸内細菌の成分が V α 7.2-J α 33 T 細胞の維持に重要であることを示している。このような事実から、Lantz らは、この第二の NKT 細胞を mucosal-associated invariant T cell (MAIT) と呼ぶことを提唱している。

しかし、我々の研究結果は、この細胞が腸

管だけでなく、MS の脳病変や脳脊髄液に存在することを明確にした。すなわち、第二の NKT 細胞が腸管免疫の制御だけではなく、自己免疫応答の制御にも関与する可能性を示唆し、きわめて興味深いものである。

近年日本人 MS 患者の病型が変化し、その西欧化が進んでいるということが認識されているが、この点に関して、分担研究者の山村は食生活などのライフスタイルの変化を重視している。もしこの仮説が妥当であるとするならば、腸管に由来し腸内細菌叢に影響を受ける調節細胞 V α 7.2-J α 33 T 細胞の活性の変化が関係する可能性もある。

結論

第二の NKT 細胞、あるいは MAIT 細胞（腸管粘膜関連インバリアント T 細胞）と呼ばれる調節細胞が、MS の病変や髄液で検出されることを明らかにした。第二の NKT 細胞は、日

本人 MS の西欧化の原因を探るうえにおいて、重要な研究対象となるかもしれない。

文献

- 1) Han M et al. *J. Immunol.* 163:301, 1999
- 2) Illés Z et al. *J. Immunol.* 164:4375, 2000
- 3) Araki M et al. *Int Immunol* 15:279, 2003
- 4) Tilloy F et al. *J Exp Med* 189: 1907, 1999
- 5) Treiner E et al. *Nature* 422: 164, 2003
- 6) Shimamura M and Huang YY. *FEBS Lett* 516:97, 2002
- 7) Illés Z et al. *Int Immunol* 16: 223, 2004

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

IFN-β1bによる多発性硬化症患者末梢血の免疫調節細胞と 細胞傷害活性の経時的変化

分担研究者 太田宏平¹⁾

共同研究者 清水優子²⁾、大原久仁子²⁾、大橋高志²⁾、竹内千仙²⁾、岩田 誠²⁾

研究要旨

近年、Natural Killer 細胞 (NK 細胞)、Natural Killer T 細胞 (NKT 細胞)、CD25+CD4+制御性T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞は免疫調節に重要な役割を担っており注目されている。再発寛解を繰り返す、中枢神経の代表的な自己免疫疾患である多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) の再発進行を抑制する治療薬として、IFN-β1b が本邦でも認可、使用されるようになった。今回我々は、IFN-β1b のMSに対する免疫学的治療効果について、上記の免疫調節細胞と細胞傷害活性の経時変化を検討した。その結果、IL-2反応性NK細胞と $\gamma\delta$ T細胞、および、細胞傷害活性は、IFN-β1b投与1年後以降より有意な低下をきたした。以上から、IFN-β1bはNK細胞および細胞傷害機能を低下させることにより、MSの病勢を抑制し、1年後以降に治療効果を発現する可能性が示唆された。

研究目的

NK細胞)、NKT細胞、CD25+CD4+制御性T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞は免疫調節に重要な役割を担っており注目されている。また、IL-2反応性 $\gamma\delta$ T細胞は強い細胞傷害活性をもち、NK細胞様の役割を果たしていると考えられている。中枢神経の代表的な自己免疫疾患であるMSの再発進行を抑制する治療薬として、IFN-β1bが本邦でも認可、使用されるようになり、3年が経過した。今回我々は、IFN-β1bのMSに対する免疫学的治療効果について、上記の免疫調節細胞と細胞傷害活性の経時変化を検討したので報告する。

研究対象および方法

対象：IFN-β1b (2MIU~8MIU:隔日皮下注射)を投与したMS患者15例(男女比4:11)。

1) 東京理科大学 理学部

2) 東京女子医大 脳神経センター神経内科

二次性進行型10例,再発寛解型5例)。平均年齢 36.0 ± 10.1 歳。

方法：①IFN-β1b投与前、投与1、3、6ヶ月、1年、2年後のMS患者のPBMCを分離、FACSを用いNK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、CD25+CD4+T細胞、CD3+CD56+細胞、 $V\alpha 24+V\beta 11+CD3$ +細胞、NK・ $\gamma\delta$ T細胞をフローサイトメータで測定した。②PBMCをIL-2添加で短期培養し、上記を測定した。③K562を標的細胞、IL-2反応性T細胞をeffector細胞とし、LDH定量法により細胞傷害活性%を測定した。④NK細胞の細胞内サイトカイン産生はIFN-β1bを投与した患者6例について検討した。末梢血にヘパリンNaを添加し、PMA, Ionomycin, Brefeldin Aにて4時間刺激後IFN- γ 、IL-4に対するモノクローナル抗体で染色、CD56陽性細胞の細胞内サイトカインを測定した。

(なお、統計解析はFriedman検定を行い、P値0.05未満を有意水準とした。IFN-β1b治療

前と各期間の治療後の比較は Wilcoxon 符号付き順位検定を用いた。))

研究結果

- ①NK 細胞: IL-2 培養後 NK 細胞は 1 年後以降有意に低下した ($p < 0.05$) (図 1)。NK 細胞数の優位な変化は投与前後では認められなかった。
- ②強い細胞傷害活性を持つとされる IL-2 培養後 $\gamma\delta$ T 細胞は、1 年後以降、有意に低下 ($p < 0.05$)。培養後の NK・ $\gamma\delta$ T 細胞、CD3+CD56+細胞も 1 年後以降に有意に低下した ($p < 0.05$)。
- ③NKT 細胞および CD25+CD4+制御性 T 細胞は IFN- β 1b 投与前後で有意差はなかった。
- ④細胞傷害活性は IFN- β 1b 投与後 1、3 ヶ月後に高値となるが、1 年後以降、有意に低下した ($p < 0.05$) (図 2)。
- ⑤CD56+細胞の細胞内サイトカイン産生は、INF- γ は低下、IL-4 は増加していたが、有意差は認められなかった (図 3、4)。

考察

IFN- β 1b による免疫調節細胞について、RR-MS では NK 細胞が IFN- β 1b 投与 1 ヶ月~3 ヶ月後に著明に低下¹⁾²⁾、MS の活動性病変数、NK 細胞数と細胞傷害活性の増加には正の相関があり、IFN- β 1b 投与によって活動性病変が減少することは NK 細胞の減少と関連する³⁾、と報告されている。

MS 患者末梢血における NK1 (IFN- γ) /NK2 (IL-4, IL-5, IL-13) バランスについては、①緩解期 MS では、NK2(IL-5 産生)に偏奇している⁴⁾、②IFN- β 1b 投与で NK 細胞の IFN- γ 、IL-4 産生ともに低下する (有意差なし)²⁾、などの報告が見られるが一定の見解は得られていない。

我々の今回の検討では、NK 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞、および細胞傷害活性について、IFN- β 1b

投与初期は、これまでの報告とは異なり、むしろ高値であったが、1 年後以降に有意に低下した。また NK 細胞 (CD56+細胞) の NK1/NK2 について検討した結果、有意差は認められなかったが、IFN- γ は低下し、NK2 へ偏奇している可能性が示唆された。

結論

以上の結果から、IFN- β 1b は、IL-2 反応性 NK 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞および細胞傷害機能を低下させることにより MS の病勢を抑制し、1 年以降より治療効果を発現すると考えられた。

図 1 : IFN- β 1b による NK 細胞の変化

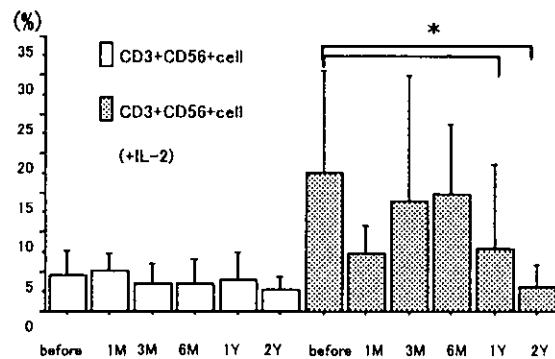


図2 : IFN-β1b による細胞傷害活性の変化

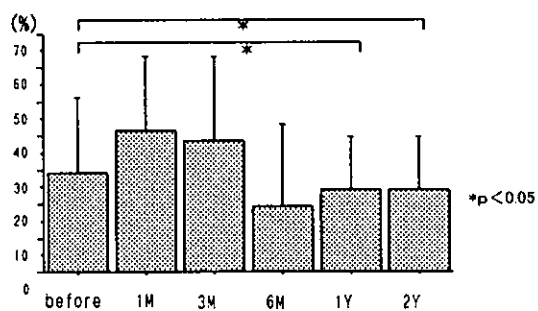


図3 : IFN-β1b 投与における CD56+細胞の細胞内 IL-4 産生の変化

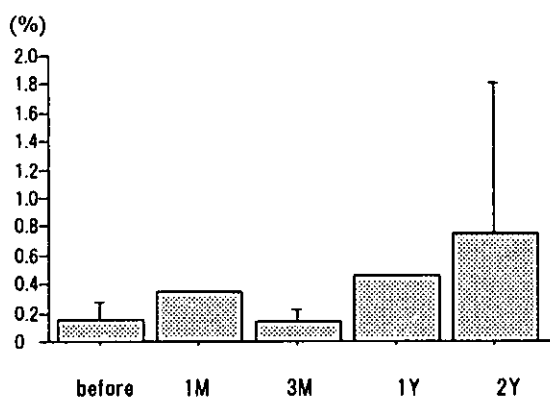
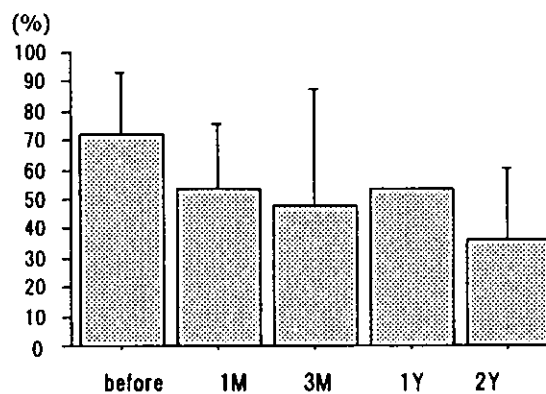


図4 : IFN-β1b 投与における CD56+細胞の細胞内 IFN-γ 産生の変化



参考文献

- 1) Perini P. et al. J Neuroimmunol 105: 91-95. 2000
- 2) Furlan R. et al. J Neuroimmunol 111: 86-92. 2000
- 3) Kastrukoff LF. et al. J Neuroimmunol 86: 123-133. 1998.
- 4) Takahashi K, et al J Clin Invest 107: R23-R29. 2001

多発性硬化症における血液脳関門型の 血管内皮細胞間接着分子の VE-cadherin の検討

分担研究者 郡山達男¹⁾

共同研究者 檜垣雅裕¹⁾、松本昌泰²⁾

研究要旨

多発性硬化症 (MS) の病態における血液脳関門を形成している血管内皮細胞の細胞間接着分子の vascular-endothelial cadherin (VE-cadherin) の意義を明らかにする目的で、MS 患者血清中の VE-cadherin の動態を解析した。対象は増悪・寛解型の MS 患者 32 例を用い、対照として健康者 38 名を用いた。血清 VE-cadherin は ELISA 法で測定した。血管内皮細胞の傷害の指標として血管内皮因子の血漿 von Willebrand 因子 (vWF) 活性と血清可溶性 thrombomodulin (sTM) を、血管内皮細胞の修復の指標として血管増殖因子の血漿 hepatocyte growth factor (HGF) を測定した。その結果、血清 VE-cadherin 濃度は、活動期 MS 患者では寛解期 MS 患者および対照と比べて高い傾向があったが、3 群間で有意差はなかった。MS 患者において血清 VE-cadherin 濃度は血管内皮因子の血漿 vWF 活性や血清 sTM 濃度との間には有意の関連はみられず、これに対して血管増殖因子の血漿 HGF 濃度との間に関連の傾向がみられた。このことから、VE-cadherin は血管内皮細胞の再生にもとづく血液脳関門の修復を反映して血中濃度が上昇する可能性が考えられた。

研究目的

多発性硬化症 (MS) の病変形成において、血液脳関門の破綻とそれに引き続く白血球の血管内皮細胞を通過し病変部位への侵入が重要な過程である。血液脳関門におけるバリアー機構の主要な構造に、血管内皮細胞間の細胞結合装置である tight junction と adherens junction がある。Vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin) は、adherens junction の代表的な細胞間接着分子である。VE-cadherin は、

血管内皮細胞間 (paracellular) の分子量の大きな分子の透過性や白血球の血管外遊走を制限している¹⁾。

本研究では、MS の病態における血液脳関門を構成している血管内皮細胞における細胞間接着分子の VE-cadherin の意義を明らかにする目的で、MS 患者血清中の VE-cadherin の動態を解析した。

研究方法

対象は増悪・寛解型の MS 患者 32 例 (平均年齢 40.8 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、

1) 広島大学医学部附属病院脳神経内科

2) 広島大学大学院脳神経内科学

寛解期は3カ月以降とした。対照として年齢を一致させた健常者38名（平均年齢41.2歳）を用いた。

血管内皮細胞間接着分子として、血清可溶性VE-cadherinはELISA法（Bender MedSystems, Vienna, Austria）で測定した。血管内皮因子として、血管内皮細胞の傷害／活性化の指標である血漿von Willebrand因子（vWF）活性は固定血小板法で、血管内皮細胞の傷害の指標である血清可溶性thrombomodulin（sTM）はELISA法で測定した。血管内皮細胞の修復の指標として血管増殖因子の血漿hepatocyte growth factor（HGF）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。回帰分析は分散分析（ANOVA）を用いた。有意水準5%未満を有意とした。

研究結果

MS患者および対照において血清VE-cadherin濃度が測定感度（0.75ng/ml）以上であった例は、活動期のMS患者では26.5%（9例／34例中）、寛解期MS患者では22.2%（6例／27例中）および対照では18.8%（3例／16例中）であった（図）。測定感度以上であった例における血清VE-cadherin濃度は、活動期MS患者では 1.76 ± 0.99 ng/ml（平均±標準誤差）、寛解期MS患者では 1.29 ± 0.32 ng/mlおよび対照では 1.28 ± 0.52 ng/mlであり、3群間で有意差がなかった。

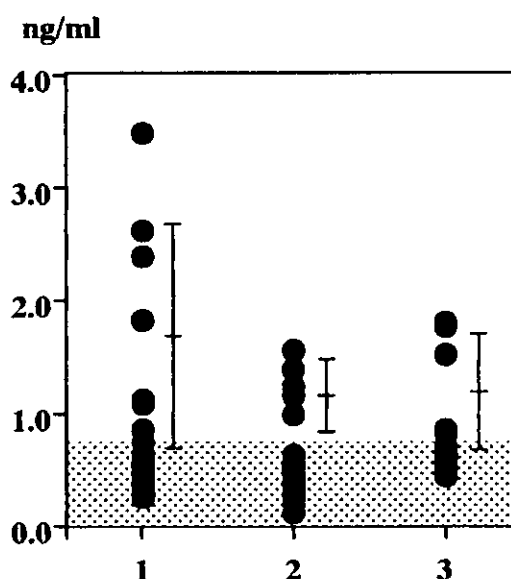


図 多発性硬化症患者と対照における血清VE-cadherin濃度

1：活動期MS患者（n=34）；2：寛解期MS患者（n=27）；3：健常対照（n=16）

■：測定感度以下（<0.75ng/ml）

我々は従来から、血漿vWF活性は活動期MS患者において、寛解期MS患者および対照に比べて有意に高値であり、同様に血清sTMは活動期MS患者において対照に比べて有意に高値であることから、これらの血管内皮因子はMSにおいては血液脳関門を形成している血管内皮細胞の傷害／活性化を反映してその血中濃度が上昇することを報告している2）。

我々は以前に、血漿HGF濃度は活動期MS患者において対照に比べて有意に高値であることから、この産生が亢進したHGFは損傷した血管内皮細胞の修復に関与する可能性を報告している3）。

MS患者において、血清VE-cadherin濃度

を目的変数とし、血漿 vWF 活性と血清 sTM 濃度および血漿 HGF 濃度を説明変数として回帰分析を行ったところ、MS 患者では血清 VE-cadherin 濃度は、血漿 vWF 活性および血清 sTM 濃度との間には有意の関連はなかったが、血漿 HGF 濃度との間に関連の傾向があった (表 1)。

表 1. 多発性硬化症患者における血清 VE-cadherin 濃度と血管内皮因子および血管増殖因子との関連

目的変数：血清VE-cadherin濃度			
説明変数	n	F値	p値
血漿vWF活性	41	0.76	0.390
血清sTM濃度	40	0.21	0.650
血漿HGF濃度	30	3.04	0.092

考察

血液脳関門を構成している脳微小血管内皮細胞の細胞接合装置として tight junction と adherens junction がある。Tight junction の主要な構成分子として occludin や claudin などが知られており、adherens junction の主要な構成分子として VE-cadherin がある。

これらの細胞間接着分子の免疫反応性の密度分布は、血液脳関門型の脳微小血管内皮細胞と非血液脳関門型の筋微小血管内皮細胞との間で相違があるとされている⁴⁾。Occludin や claudin-5 とともに VE-cadherin は筋微小血管内皮細胞においては密度が低く、これに対して脳微小血管内皮細胞においては密度が高いことが報告されている (表 2)。そこで、

本研究では血液脳関門型の脳微小血管内皮細胞に比較的に選択的に分布している VE-cadherin に注目して検討を行った。

表 2. BBB type および non-BBB type の微小血管内皮細胞における細胞間接着分子の免疫反応性の密度分布

細胞間接着分子	BBB type 脳微小血管 内皮細胞	non-BBB type 筋微小血管 内皮細胞
ZO-1	+++	++
Occludin	++	- (±?)
Claudin-1	±?	-
Claudin-5	++ (+)	-
JAM	++	- (±?)
VE-cadherin	++ (+)	±
E, N, P-cadherin	±	±
α-Catenin	++	+ (++)
β-Catenin	+ (++)	+

文献 1) より一部改変して引用

BBB: blood-brain barrier; ZO: zonula occludens protein; JAM: junctional adhesion molecule

本研究において、血清 VE-cadherin 濃度が測定感度以上であった例における血清 VE-cadherin 濃度は、活動期 MS 患者群では寛解期 MS 患者群および対照群と比べて高い傾向があったが、3 群間で有意差はなかった。

MS における血管内皮細胞間接着分子に関する報告では、MS 患者の活動性病変の血管内皮細胞において、tight junction を構成する occludin と ZO-1 の免疫反応性の減少がみられることから、tight junction の傷害があることが示されている⁵⁾。また、MS 患者の活動期の血清は培養血管内皮細胞における

occludin と VE-cadherin の発現を抑制することが示されている6)。

本研究において、MS 患者における VE-cadherin と血管内皮細胞の傷害の指標である血管内皮因子および血管内皮細胞の修復の指標である血管増殖因子の HGF との関連を検討したところ、血清 VE-cadherin 濃度は血管内皮因子の血漿 vWF 活性や血清 sTM 濃度との間には有意の関連はみられず、これに対して血管増殖因子の血漿 HGF 濃度との間に関連の傾向がみられた。このことから、VE-cadherin は血管内皮細胞の再生にもとづく血液脳関門の修復を反映して血中濃度が上昇する可能性が考えられた。

結論

MS において血清 VE-cadherin 濃度は血管内皮細胞の再生にもとづく血液脳関門の修復を反映する可能性がある。

文献

- 1) Gotsch U, et al.: VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci* 110 (Pt 5):583-8, 1997.
- 2) 郡山達男、ほか：多発性硬化症における血管内皮の活性化・障害—von Willebrand 因子と thrombomodulin を用いた検討—。臨床神

経 37:287-291, 1997.

3) 郡山達男、ほか：多発性硬化症の血管内皮細胞の損傷と修復における血管増殖因子の役割。神経免疫 8: 40-1, 2000.

4) Vorbrodt AW and Dobrogowska DH. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. *Brain Res Rev* 42:221-42, 2003.

5) Plumb J, et al.: Abnormal endothelial tight junctions in active lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain Pathol* 12:154-69, 2002.

6) Minagar A, et al.: Serum from patients with multiple sclerosis downregulates occludin and VE-cadherin expression in cultured endothelial cells. *Mult Scler* 9:235-8, 2003.

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

E-セレクトインに対する siRNA 導入による白血球の

ヒト血管内皮への接着抑制

分担研究者 神田隆¹⁾

共同研究者 横田隆徳¹⁾、叶内匡¹⁾、水澤英洋¹⁾ 西脇康信²⁾、吉田雅幸²⁾

研究要旨

免疫性神経疾患の神経細胞障害には脳血管関門を通過して浸潤する多核白血球が重要な働きをすると考えられ、その白血球通過の阻害は神経障害の進展を抑制する可能性がある。今回、白血球の血管内皮細胞接着に関わっている E-セレクトインの発現を short interference RNA (siRNA) を用いて抑制を試みた。E-セレクトインに対する siRNA は強制発現した E-セレクトインおよびヒト臍帯静脈内皮細胞およびヒト脳血管内皮細胞に IL1 β によって誘導される内因性の E-セレクトインを 90%以上抑制した。siRNA 発現型 DNA ベクターも同様に有効に作用した。さらにこの siRNA はヒト臍帯静脈内皮細胞に対する遊走白血球の接着能を有効に抑制した。したがって、siRNA は免疫性神経疾患の遺伝子治療の有効な手段となる可能性がある。

研究目的

免疫性神経疾患の神経細胞障害には脳血管関門を通過して浸潤する多核白血球の関与が考えられ、白血球の血管内皮細胞接着に関わっている E-セレクトインの発現抑制は神経障害の進展を抑制する可能性がある。従来、線虫などでターゲット分子の発現抑制に 2 本鎖 RNA によって生ずる転写後遺伝子抑制である RNA interference (RNAi) は有効な方法であったが、哺乳動物では副反応のため利用できなかった。最近、21 塩基の short interference RNA (siRNA) を導入することにより毒性なく

遺伝子抑制が可能となった。そこで培養ヒト血管内皮細胞に誘導される E-セレクトインの siRNA による発現抑制について検討した。

方法：ヒト E-セレクトインの mRNA の 2 次構造の解析から数カ所の siRNA をデザインして、21 mer RNA-DNA キメラオリゴヌクレオチドを作成した。これを HEK293T 培養細胞にヒト E-セレクトイン発現ベクターと共発現させて、有効な siRNA 配列をスクリーニングした。有効な siRNA をヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) とヒト脳血管内皮細胞 (HBMEC) の primary culture に導入し、IL-1 β を加え誘導される E-セレクトインの量を Western blotting にて検討した。有効な siRNA 配列を独自の stem 型にデザインして pol III 系の RNA promotor

1) 東京医科歯科大学院脳神経機能病態

2) 同難治病態代謝解析学

下で発現させ、細胞内でプロセスされて siRNA となる DNA ベクターを構築し、その有効性を確かめた。

次にヒト E-セレクトインに対する siRNA を発現した HUVEC 上で多核白血球 (HL60) を吹きかけてその接着能の変化について検討した。

結果: E-セレクトインに対する siRNA は強制発現した E-セレクトインおよびヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) とヒト脳血管内皮細胞に IL1 β によって誘導される内因性の E-セレクトインを 90%以上抑制した (Fig. 1)。DNA ベクターに組み込んだ発現型 siRNA も同様に有効に強制発現した E-セレクトインを抑制した。

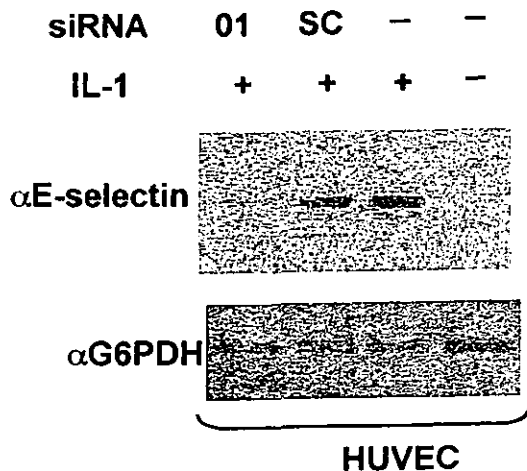


Fig. 1. siRNA silencing of exogenous E-selectin gene expression in HEK293 cells. siRNA to human E-selectin (01 ~ 05) and a scrambled control siRNA 01 sequence (SC), each at 60 nM, were co-transfected into HEK293 cells with E-selectin cDNA (1 μ g) and EGFP cDNA (1 μ g) as described in Materials and methods. The cell lysates were subjected to Western blotting analysis using anti-E-selectin mAb (7A9). The lysate from HUVEC stimulated with IL-1 β (IL-1) was used as positive control. Blots are representative of 4 similar experiments.

遊走白血球接着実験では shear stress = 1.0 dyne/cm² の流量下、E-セレクトインに対する siRNA を導入した HUVEC 上で遊走白血球の接着能 (rolling, adhesion) の抑制効果を認めた (Fig. 2)。

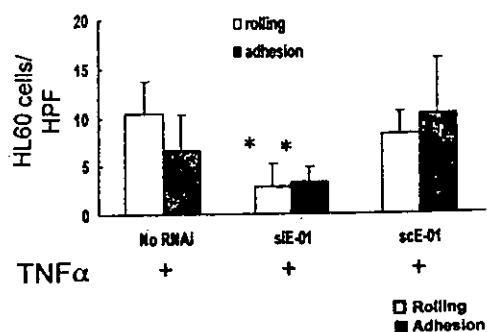


Fig. 2. Transfection of RNAi into HUVEC was performed as described in Fig. 3 and adhesion assay was carried out under flow (shear stress = 1.0 dyne/cm²). The number of adherent and rolling cells was quantitated from captured images using image analysis software and described as the number of interacting cells in each high power field in the microscope area view (shear stress = 1.0 dyne/cm²). **p* < 0.05 vs. NoRNAi

考察: siRNA は従来の遺伝子発現抑制に用いられた antisense DNA/RNA や ribozyme に比較してはるかに強力な抑制効果を有していた。しかも、siRNA オリゴヌクレオチドは効率良く内皮の初代培養細胞に導入され有効に内因性の E-セレクトインを抑制した。この siRNA は HUVEC を用いた in vitro アッセイ系で、遊走白血球の接着能が実際に抑制できることを示せた。さらに siRNA を DNA ベクターを用いた発現型 siRNA にも導入できたことから、アデノウイルスなどのウイルスベクターにも導入が可能となって、遺伝子治療の戦略として有望と考えられた。

健康危険情報

なし

結論： siRNA はヒト脳血管内皮細胞における内因性 E-セレクトイン発現を著明に抑制し、遺伝子治療の有効な手段となる可能性がある。

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

共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫性神経疾患における バリアー浸潤細胞解析の試み

分担研究者 神田 隆

共同研究者 石橋 哲 山脇正永 沼田幸代 金 紅蓮 水澤英洋

研究要旨

共焦点レーザー顕微鏡によるpseudo 3D法を用いて、in vitroの血液脳関門モデルにおいてバリアーを越えて接着・浸潤するリンパ球の動態を明らかにする方法を開発した。ヒト脳毛細血管由来内皮細胞(HBMEC)は蛍光色素DiOで標識し、ヒトリンパ球は二次抗体としてTRITC標識したものをを用いた。対照成人7例から得られたリンパ球は、BMEC非刺激の条件下では内皮下への侵入は殆ど観察されないが、TNF α 刺激後のHBMECに対しては有意の侵入細胞の増加を認めた。侵入細胞はCCR4陽性細胞がCXCR3陽性細胞よりも優位であった。本方法は、免疫性神経疾患におけるバリアー浸潤細胞を質的・量的に評価する方法として有用であると考えた。

研究目的

[目的] 多発性硬化症をはじめとする免疫性神経疾患の成立には、血液脳関門(BBB)を越えて中枢神経内へ侵入するリンパ球が重要な役割を担っているが、BBBを越える時点でどのようなリンパ球が選択され、中枢神経内の炎症に参画するかは明らかではない。今回我々は、共焦点レーザー顕微鏡によるpseudo 3D法を用いて、BBB構成内皮細胞に対し、リンパ球が接着・浸潤する動態をin vitroで定量的に評価する方法を確立したので、その概要について報告する。

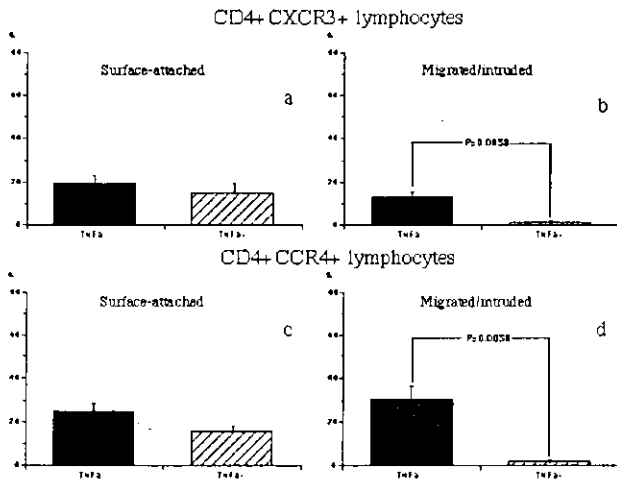
[方法] Cellagen Disc(ICN, USA)上にヒト剖検脳毛細血管由来内皮細胞(HBMEC)を単層培養し、confluencyを確認した後にDiOを用いて蛍光標識した。HBMECの初代培養は68歳女性剖検例(肺癌、死後14時間)を用いた。大脳TNF α (10ng/ml)で18時間刺激した後、7名の対照例から得られたリンパ球 5×10^5 - 1×10^6 /wellを播種、6時間後に4% paraformaldehydeで固定して抗CXCR3および抗CCR4抗体を用いた免疫染色を行った。リンパ球側の染色の二次抗体にはTRITC標識したものをを用いた。赤色蛍光で標識されたリンパ球の単層BMEC(緑色蛍光で標識)に対する位置関係をLeica社共焦点レーザー顕微鏡によるpseudo 3D再構成を用い

て評価し、単層BMEC上に接着しているリンパ球とBMEC内および直下へと遊走しているリンパ球の割合をCXCR3陽性細胞、CCR4陽性細胞のそれぞれについて検討した。

[結果] TNF α 非刺激の条件下では、CCR4陽性細胞、CXCR3陽性細胞ともBMEC内・直下へ遊走しているリンパ球は殆ど認められなかった(図1)。TNF α 刺激後の単層HBMECに付着するCCR4陽性細胞はCXCR3陽性細胞よりも有意に多く認められた。CXCR3陽性細胞の多くがHBMEC表面にとどまっているのに対し、CCR4陽性細胞はHBMEC下にもぐり込んでいるものが多数観察された(図2)。

[考察] 今回我々の用いた共焦点レーザー顕微鏡によるpseudo 3D法に基づく解析は、単に内皮細胞に対する親和性を検討するのみにとどまらず、リンパ球の遊走がどのサブセットを中心に起こっているかを定量的に確かめることのできる有用な手法である。Fabryらは、同一のペプチド抗原に特異的なTh1とTh2のクローンをを用いてマウスの培養平滑筋細胞/周細胞と脳毛細血管由来内皮細胞を比較したところ、平滑筋細胞/周細胞はTh1を、脳毛細血管由来内皮細胞はTh2を選択的に活性化することを見いだしているが、今回の我々の結果でも対照症例から得られたリンパ球ではTh2細胞有意のHBMEC親和性が観察された。今後は多発性硬化症急性期を主な疾患対象として、リンパ球の接着動態の変化をTh1/Th2バランスを中心に評価すること、リンパ球の選択的な

Figure 1 Attached and Migrated lymphocytes on HBMEC monolayer in conditions with TNF α and without TNF α



Mean percentage of CD4+CXCR3+ lymphocytes attached on the surface of BMEC monolayer (a) and migrated/intruded into BMEC monolayer (b), and that of CD4+CCR4+ lymphocytes attached (c) and migrated/intruded (d). Solid bars represent TNF α -stimulated conditions and hatched bars represent non-stimulated conditions. Although the number of surface-attached (non-migratory) lymphocytes did not change with or without TNF α stimulation (a and c), migrated or intruded lymphocytes are rarely observed in non-stimulatory conditions (c and d). Bars = SEM.

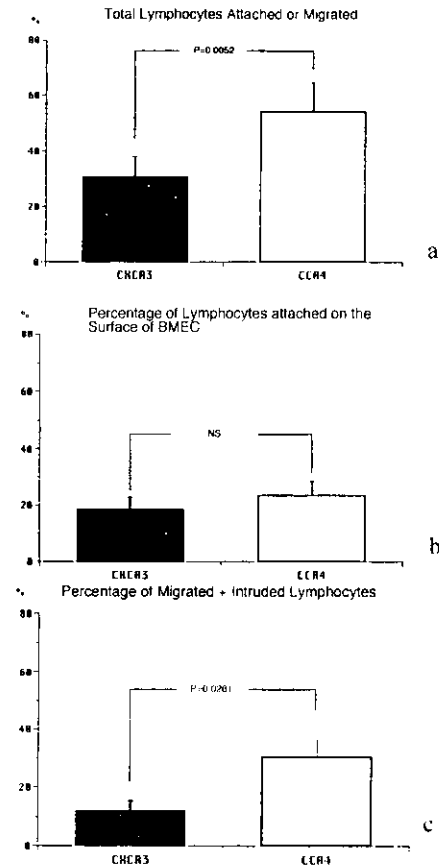
HBMEC 接着・浸潤の driving force の実体を明らかにすることを中心に本研究を進展させる予定である。

[結語] 脳毛細血管由来内皮細胞への接着・浸潤は成人リンパ球では Th1 細胞よりも Th2 細胞が優位であることが明らかになった。共焦点レーザー顕微鏡による pseudo 3D 法に基づく解析の有用性を明らかにした。

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) Fabry Z et al. Differential activation of Th1 and Th2 CD4+ cells by murine brain microvessel endothelial cells and smooth muscle/pericytes. *J Immunol* 151:38-47, 1993.
- 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

Figure 2 Comparison of CCR4+ and CXCR3+ lymphocytes attached and migrated/intruded on TNF α -stimulated BMEC monolayer



Although no significant difference was noted between surface-attached (non-migratory) CXCR3+ lymphocytes (solid bar) and CCR4+ lymphocytes (b), mean percentages of total (a) and migrated/intruded (c) CCR4+ lymphocytes were significantly larger than those in CXCR3+ lymphocytes. Bars = SEM.

enhance leakage in blood-nerve barrier model. *Neurology* 60: 301-306, 2003.

- 5) 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.

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

多発性硬化症患者の髄液中 Osteopontin の測定

分担研究者 菊地誠志¹⁾

共同研究者 深浦彦彰¹⁾、宮崎雄生¹⁾、宮岸隆司²⁾、深澤俊行³⁾、今 重之⁴⁾、
上出利光⁴⁾

研究要旨

Osteopontin 以下 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ている。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 の役割を調べるため、患者髄液中の OPN の濃度を ELISA で測定し検討した。その結果、MS では、髄液中の OPN は、MS において対照群に比べ著しい高値を認めた。また、増悪寛解型の MS では、2 次性進行型の MS よりも高値の OPN の産生を認めた。

研究目的

多発性硬化症 (MS) は中枢神経の慢性炎症性疾患である。MS 脳病変の high-through put cDNA のシーケンシングにより、Osteopontin (以下 OPN) をコードする transcript が MS プラークにおいて最も豊富に存在し、また、MS 脳病変では OPN は反応性のアストロサイトやミクログリアにより多く expression していることが報告されている。¹⁾ 昨年、我々は 1) 血清中の OPN 濃度が MS において他の神経疾に比べて上昇傾向にあること、2) MS 脳病変の OPN expression が正常脳に比べて上昇していること、3) MS 髄液中の OPN 濃度は血清に比べて著しく上昇している事を

報告した。OPN のサイトカインとしての働き、その特徴的な組織における分布状況を鑑みて、OPN の髄液中の蛋白レベルでの濃度が、MS の疾患活動性にどのような影響を与えているのかについて検討を加えた。

研究方法

北祐会神経内科病院、北海道大学病院神経内科を受診した 24 名の増悪寛解型 (relapsing remitting 以下 RR)、4 名の 2 次性進行型 (secondary progressive 以下 SP) の MS 患者髄液中の OPN の濃度を、12 名の他神経疾患患者 (other neurological disease 以下 OND) を対照群として測定した。方法は以前に報告したごとく ELISA を用いた。²⁾

研究結果

異なる臨床病型における MS 患者髄液中の OPN の濃度を図に示す。12 症例の OND にお

-
- 1) 北海道大学神経内科
 - 2) 西円山病院神経内科
 - 3) 北祐会神経内科病院
 - 4) 北海道大学遺伝子病制御研究所