

Table 2. The genes expressed differentially in non-T cells between MS and controls

No.	Symbol	Genbank accession number	Description	Presumed function	Possible involvement in apoptosis regulation	Significance (p-log)
<i>The upregulated genes</i>						
1	ICAM1	NM_000201	Intercellular adhesion molecule-1	a cell surface glycoprotein ligand (CD54) for LFA-1 and Mac-1	(+)	1.11E-09
2	CDC42	NM_001791	Cell division cycle 42	a small GTPase that regulates diverse cellular functions	(+)	1.49E-08
3	RIPK2	NM_003821	Receptor-interacting serine/threonine kinase 2	a protein kinase interacting with CLARP in the Fas-signaling pathway	(+)	1.88E-07
4	IL1R2	NM_004633	IL-1 receptor, type II	a decoy receptor for IL-1 that inhibits IL-1 activity	unknown	4.56E-07
5	MAD	NM_002357	Max dimerization protein	a transcriptional repressor that competes with MYC for binding to MAX	(+)	1.00E-06
6	CXCL2	NM_002089	Chemokine, CXC motif, ligand 2	a chemokine designated MIP2 binding to CXCR2	(+)	1.91E-06
7	SODD	NM_004874	Silencer of death domains	an adaptor protein designated BAG4 associated with HSP70 and the death domain of TNFR1 and DR3	(+)	3.13E-06
8	<u>TOP2A</u>	NM_001067	Topoisomerase 2 alpha	a DNA topoisomerase	(+)	4.82E-06
<i>The downregulated genes</i>						
9	<u>SMARCA3</u>	NM_003071	SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 3	a DNA helicase-like chromatin remodeling enzyme	(+)	3.95E-08
10	RGS14	NM_006480	Regulator of G protein signaling 14	a downregulator of signaling through G protein-coupled receptors	(+)	5.44E-08
11	COX15	NM_078470	Cytochrome c oxidase assembly protein COX15	a protein essential for assembly of COX	(+)	6.43E-08
12	AKAP11	NM_016248	A-kinase anchor protein 11	a protein anchoring the regulatory subunit of protein kinase A	(+)	1.68E-07
13	TCF17	NM_005649	Transcription factor 17	a transcriptional repressor of renal genes designated Kid-1	(+)	1.92E-07
14	CDC25B	NM_021874	Cell division cycle 25B	a tyrosine phosphatase that activates the cyclin dependent kinase CDC2	(+)	2.40E-07
15	GZMA	NM_006144	Granzyme A	a cytotoxic T cell- and NK cell-specific serine protease	(+)	2.49E-07
16	CHST4	NM_005769	Carbohydrate sulfotransferase 4	an N-acetylglucosamine 6-O sulfotransferase	unknown	3.46E-06
17	BCL2	NM_000633	B-cell CLL/lymphoma 2	a mitochondrial membrane protein that blocks the apoptotic death	(+)	4.81E-07
18	CR2	NM_001877	Complement component receptor 2	a membrane receptor (CD21) for C3d	(+)	5.88E-07
19	<u>RPA1</u>	NM_002945	Replication protein A1	a single-stranded DNA-binding protein that regulates DNA replication	(+)	6.72E-07
20	<u>POLR2H</u>	NM_006232	RNA polymerase II, subunit H	a subunit of RNA polymerase II	(+)	7.28E-07
21	E2F5	NM_001951	E2F transcription factor 5	a transcription factor of the E2F family	(+)	1.00E-06
22	RAB7L1	NM_003929	Ras associated protein RAB7-like 1	a RAS-related small GTP-binding protein	(+)	1.49E-06
23	NFATC3	NM_173165	Nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3	a component of DNA-binding transcription complex that regulates the gene expression in T cells	(+)	1.66E-06
24	HSPA1L	NM_005527	Heat shock 70-kD protein-like 1	a constitutive member of the HSP70 family	(+)	1.87E-06
25	<u>RBBP4</u>	NM_005610	Retinoblastoma-binding protein 4	a nuclear protein binding to RB1	(+)	3.13E-06
26	<u>PRKDC</u>	NM_006904	Protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit	a nuclear serine/threonine protein kinase	(+)	3.36E-06
27	RASSF1	NM_170714	Ras association domain family 1	a lung tumor suppressor gene having a Ras-association domain	(+)	3.49E-06
28	<u>DAXX</u>	NM_001350	Death-associated protein 6	a protein that interacts with the death domain of Fas	(+)	5.16E-06
29	EGF	NM_001963	Epidermal growth factor	a potent mitogenic factor for the cells of both ectodermal and mesodermal origin	(+)	5.74E-06
30	NPR2L	NM_006545	Nitrogen permease regulator 2-like	a possible tumor suppressor gene	unknown	1.13E-05

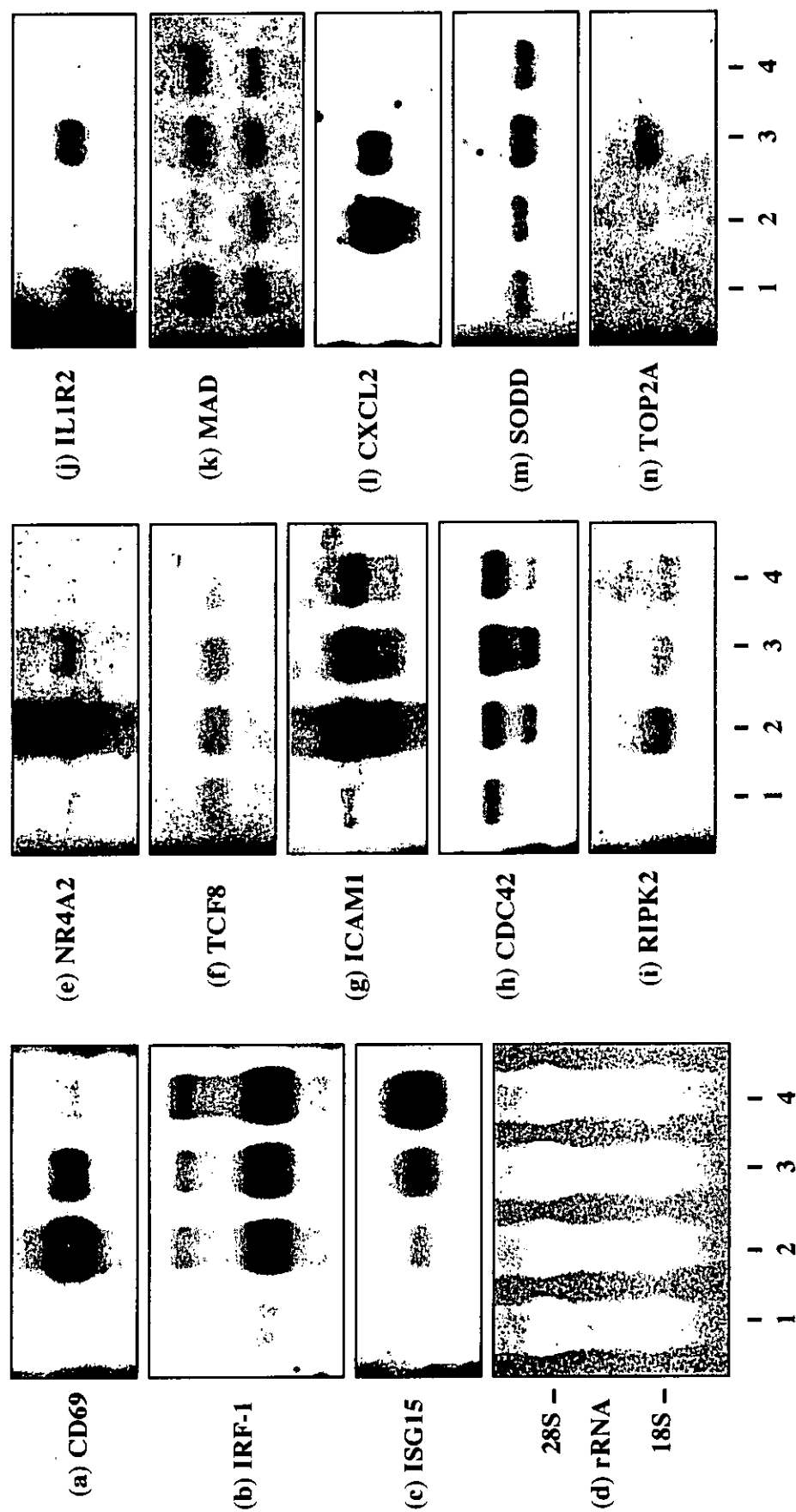


Figure 1. The expression of the genes upregulated in MS was identified in cultured PBMC in an activation-dependent manner.

Lanes (1-4) represent (1) untreated, (2) 25 ng/ml PMA plus 1 µg/ml IOM for 6 h, (3) 1 µg/ml plate-bound anti-CD3 mAb for 24 h, and (4) 100 ng/ml IFNγ for 24 h.

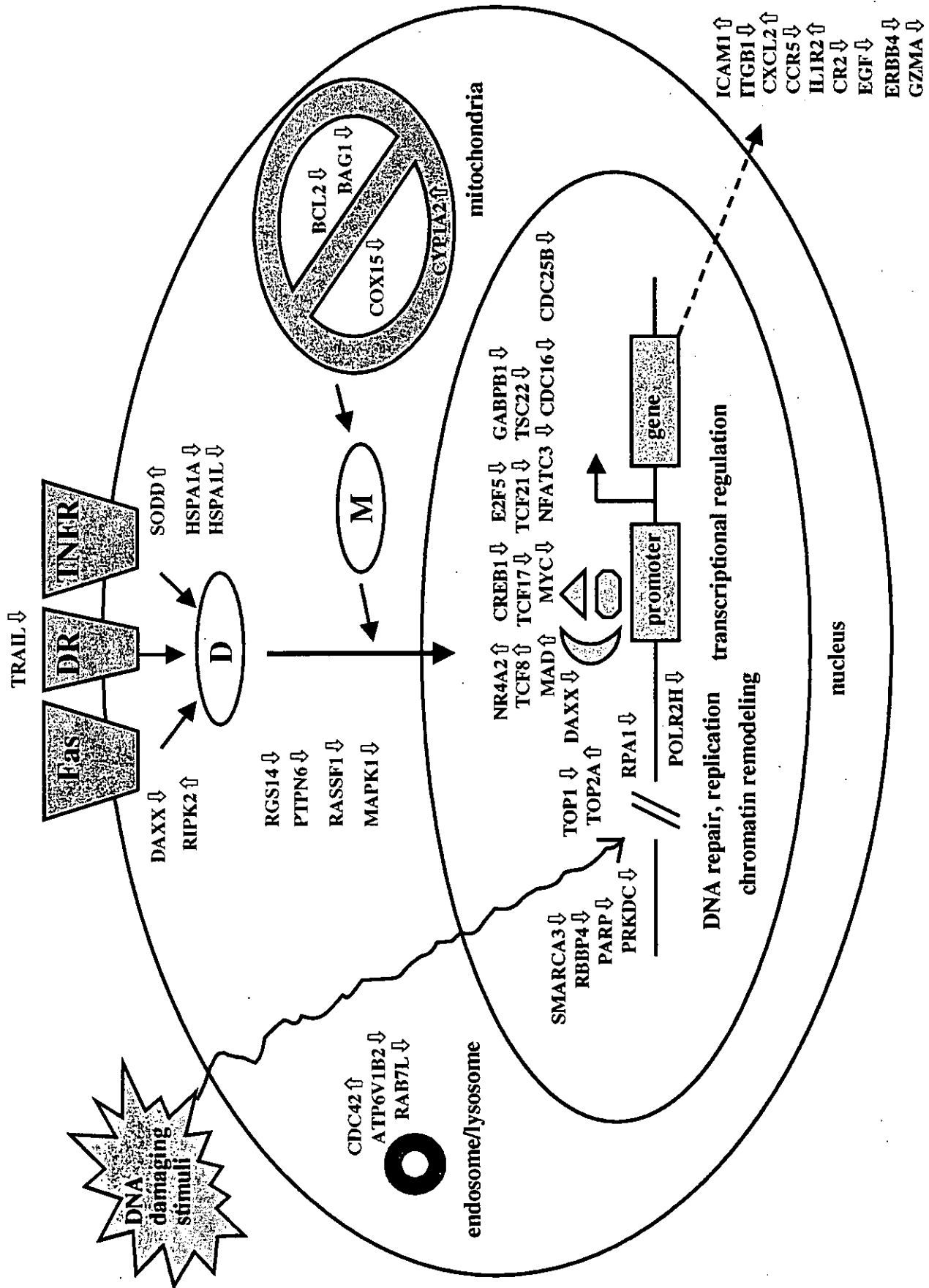


Figure 2. Aberrant expression of apoptosis signaling-related genes in MS lymphocytes.

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

「DNA マイクロアレイによる免疫寛容関連遺伝子解析」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

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を行うにあたって、多発性硬化症では T 細胞の遺伝子プロファイルが健常人とは異なることが明らかとなってきた。そこで、この遺伝子プロファイルが疾患特異的で診断的に有効かどうかを検討するため、全身性エリテマトーデス(SLE)、関節リウマチ等の末梢血単核球における遺伝子プロファイルを検討した。SLE では、リンパ球減少があることに加え、T 細胞分離後の回収が著しく悪く、T 細胞分離後の解析は困難であった。末梢血単核球全体では多発性硬化症とは異なる遺伝子プロファイルであり、多発性硬化症でみられた特徴的な遺伝子プロファイルは、疾患特異的であることが示唆された。

A. 研究目的

多発性硬化症では T 細胞の遺伝子プロファイルが健常人とは異なることが明らかとなってきた。そこで、このプロファイルが他の自己免疫疾患と比較して疾患特異性があるかどうかを検討するため、SLE、関節リウマチ等の検体での検討した。

B. 研究方法

SLE、関節リウマチの自己免疫疾患患者の末梢リンパ球から total RNA を分離し、約 39,000 種類のヒト完全長遺伝子が解析可能な Human Genome U133 Array(Affimetrix 社)を用いて検討した。解析には、Gene Spring® (TDB/SiG)を用いた。

C. 研究結果

SLE の末梢血リンパ球から T 細胞を分離して、遺伝子プロファイルの解析をこころみたが、十分な mRNA が得られなかった。そこで、末梢血単核球における遺伝子プロファイルを検討したところ、SLE では健常人とは異なるが多発性硬化症 T 細胞における遺伝子プロファイルとも異なっていた。SLE 末梢血単核球で健常人と比較して 2 倍以上に上昇していた遺伝子は、CDC42EP3, SEC24B, rab6 GTP ase activating protein, Rab36, CPNE3, IL-18, TNFSF4, KARP-1 binding protein, RBM15, CLMN, Mitochondrial ribosomal protein S6, LIN7c, PROL2, NIBDIA, DCL-1, MGCHGC15606, CSPG2, GIBAS, Chondroitin sulfate proteoglycan2, Trombospondin1, dehydrorotate dehydrogenase, RNASE4, PPDPR, ST3GALValpha2, 3sialyltransferase, inositol1, 4, 5tresphoshate receptor type2,

RCOR, SP2, MONOA, KH domain RNA binding などであった。関節リウマチにおける T 細胞における遺伝子プロファイルに関しては現在検討中である。

D. 考察

多発性硬化症では T 細胞の遺伝子プロファイルが健常人とは異なることが明らかとなってきた。そこで、このプロファイルが他の自己免疫疾患もしくは、他の中枢神経疾患と区別しうる特異的なものかを検討することが今後重要と考えられる。診断的に有効かどうかを検討するため、本研究では、中枢神経系に病変をおこしうる SLE と比較した。SLE においては、リンパ球数が減少しており、技術的に T 細胞のみの遺伝子プロファイル解析が困難であったため、末梢単核球全体を用いて検討したが、その遺伝子発現は多発性硬化症とは大きく異なり、多発性硬化症でみられた特徴的な遺伝子プロファイルは、疾患特異的であることが示唆された。今後は、T 細胞分離が可能であり、かつ多発性硬化症と病態の類似性が指摘されている関節リウマチ等の検体を用いた検討が重要である。

E. 結論

SLE 末梢血単核球で上昇のみられた遺伝子群は、多発性硬化症で上昇がみられた遺伝子群と異なっていた。今後、本研究は多発性硬化症に特異的な DNA チップの開発につながると考えられた。

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-Sickinger 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 細胞を標的とした糖脂質による多発性硬化症の分子治療 **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：P0(+/-)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 Th 2 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脊髄炎
(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、岩渕和也、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 CD 1 d 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

厚生労働科学研究補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

「特発性炎症性脱髄疾患(IIDD)の理解における attack-related severity の重要性
—病変分布／経過／attack-related severity による三次元的理解」

分担研究者 菊地 誠志¹⁾

共同研究者 深澤俊行²⁾、深浦彦彰¹⁾、宮崎雄生¹⁾、宮岸隆司³⁾

研究要旨

多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) に代表される特発性炎症性脱髄疾患 (idiopathic inflammatory demyelinating disorders; IIDD) の概念整理は、診断、病態理解はもちろん治療選択においてもきわめて重要である。従来、IIDD の疾患分類は、病変分布と臨床経過という二つの軸の関係で理解されてきた。今回我々は、「再発の激しさ ; attack-related severity」を、病態理解および治療選択のために考慮すべき第三の軸として検討を加えたが、視神経脊髄型 MS と通常型 MS の fulminant と考えられる症例は、病変分布の特異性という点以外はきわめて類似した臨床像を呈し、いっぽう、通常型 MS の fulminant の症例、non-fulminant の症例では臨床像がかなり異なっていたなど、様々の相違点が認められた。今後は、3つの軸を念頭においた三次元的理解が重要と思われる。

A. 研究目的

IIDD の分類、疾患概念の理解における再発時の重症度—attack-related severity の重要性を検討する。

B. 研究方法

多発性硬化症 (MS) の診断基準を満たす 193 例を対象とした。193 例のうち、以下に示した 7 項目のいずれかを満たした 58 例を fulminant MS (FIMS) と分類した。1) 急性横断性脊髄炎を呈した、2) 一回の attack で視力が 0.1 以上に回復しない、3) 両側同時の視力低下、

4) 再発に直接関連した呼吸障害/意識障害、5) 全身痙攣発作、6) 脊髄病変が MRI 上で 3 椎体以上に及ぶ、7) 病変が MRI 上で破壊性あるいは腫瘍様。これら 58 例のなかで、臨床的に判断された病変部位が視神経と脊髄に限局したものが 26 例あり、これらを OS-FIMS と分類し、それ以外の 32 例の FIMS を nonOS-FIMS と分類した。上記の 7 項目を満たさない残りの 135 例を nonFIMS と分類した。nonFIMS のうち 4 例のみが臨床的に判断される病変部位が視神経と脊髄に限局しており nonF1-OSMS と分類した。OS-FIMS、nonOS-FIMS、nonFIMS の 3 群間での臨床像、髄液所見、免疫遺伝学的背景などを比較検討した。

1) 北海道大学神経内科
2) 北祐会神経内科病院
3) 西円山病院神経内科

C. 研究結果

OS-FIMS と nonOS-FIMS は病変分布の特異性という点以外はきわめて類似した臨床像を呈し、いっぽう、FIMS と nonFIMS では臨床像がかなり異なっていた。nonOS-FIMS における髄液 oligoclonal IgG bands (OCB) の出現率は OS-FIMS と同程度にきわめて低率であった。多変量解析の結果からは、OCB の陽性率が低いのは OSMS という病変分布の特異性によるのではなく FIMS か否かが関与していた。HLA-DPB1*0501 との相関は OSMS に特徴的なものではなく、OS-FIMS と nonOS-FIMS に共通しており、その他の HLA 多型背景も、ふたつの FIMS 間ではきわめて類似しており、FIMS と nonFIMS との間ではかなり異なっていた。CTLA-4 遺伝子 exon 1 の A/G 多型の分析では、FIMS における G allele および GG genotype の頻度が、対照および nonFIMS に比べて有意に高頻度であった。OS-FIMS の頻度は近年減少しているいっぽう、nonOS-FIMS および nonFIMS の頻度は上昇しており、さらに、出生年別にみた症例数の分布は、nonOS-FIMS と nonFIMS で驚くほど類似していた。nonF1-OS は 4 例 (2.1%) と稀であり、いずれも側脳室周囲白質に小病変をみとめ、OCB が検討された 3 例のうち 2 例 (67%) が OCB 陽性で、髄液細胞数はいずれも正常域であった。

D. 考察

OSMS あるいは neuromyelitis optica (NMO) に関する報告は多いが、その定義は必ずしも一定していない。元来、視神経と脊髄は MS の好発部位であり、また、臨床的に確認された病変が視神経と脊髄のみあっても MRI などにて

subclinical な病変が確認されることはまれではない。また、「激しい再発」は、OSMS あるいは NMO の特徴のひとつとも考えられてきたが、わが国においては OSMS が近年若年化していると考えられ定義はさらに混乱している。我々の検討結果からは、FIMS 群では病変分布にかかわらず臨床像、髄液所見、HLA 背景などが極めて類似しており、いっぽう、nonFIMS 群とはかなり異なっていた。再発の重症度—attack-related severity—に關与する因子としては、標的抗原の相違 (髄鞘 or/and 軸索など)、各種の免疫制御因子の反応動態の相違などが考えられるが、我々の結果からは、少なくとも一部、遺伝的に規定された活性化 T cell の CTLA4 を介する制御機構の相違が關与している可能性がある。さらに、OS-FIMS の頻度は近年減少しているいっぽう、nonOS-FIMS および nonFIMS の頻度は上昇しており、さらに、出生年別にみた症例数の分布が nonOS-FIMS と nonFIMS で驚くほど類似していた事実は、病変分布の相違への環境因子の影響を示唆しているかもしれない。

E. 結論

従来、IIDD の分類は主として「病変分布」と「臨床経過」の 2 つの軸で理解されてきたが、「再発の激しさ ; attack-related severity」も病態理解および治療選択のために考慮すべき第三の軸として重要であり、3 つの軸を念頭においた三次元的理解が重要と思われる。病変分布の特異性にあまりに執着することは、本質的な免疫病態の相違を見落とすことになりかねない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

<総論>

- 1 新野 正明, 菊地 誠志, 深澤俊行, 田代 邦雄. 多発性硬化症の病型—脊髄型に 焦点をあてて. 脊椎脊髄ジャーナル 14:180-188, 2001
- 2 菊地誠志、深澤俊行、田代邦雄. 多発性硬化症の遺伝子多型解析. 神経内科 56:319-325, 2002
- 3 Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Tashiro K. Genetic susceptibility to multiple sclerosis: Implications of genetic research on MS therapy. Expert Rev Neurotherapeutics 2(3):89-98, 2002
- 4 深澤俊行、菊地誠志、田代邦雄. 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 16:589-592, 2003
- 5 深澤俊行、菊地誠志、新野正明、矢部一郎、宮岸隆司、深浦彦彰、濱田 毅、田代邦雄. 多発性硬化症の疾患感受性遺伝子. 日本臨床 61:1311-1316, 2003
- 6 深浦彦彰、菊地誠志. 活動期における IL-18 の役割. 日本臨床 61:1416-1421, 2003

<原著>

- 1 Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Sasaki H, Tashiro K. Genetic polymorphism of IL-1 β and IL-1 receptor antagonists in association with multiple sclerosis in Japanese patients. J Neuroimmunol 118: 295-299, 2001
- 2 Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Sasaki H, Tashiro K. Heat shock protein 70 gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. Tissue Antigens 58: 93-96, 2001
- 3 Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. No association of vitamin D-binding protein gene polymorphism in Japanese patients with MS. J Neuroimmunol 127: 177-179, 2002
- 4 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 128: 77-81, 2002
- 5 Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Miyagishi R, Yabe I, Tashiro K. An examination of the Apo-I/Fas promoter Mva I polymorphism in Japanese patients

- with multiple sclerosis. *BMC Neurology* 2:8-12, 2002
- 6 Niino M, Kikuchi S, Miyagishi R, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. An examination of the association between $\beta 2$ adrenergic receptor polymorphisms and multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* 8: 475-478, 2002
 - 7 Kikuchi S, Niino M, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. An assessment of the association between IL-2 gene polymorphism and Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 205: 47-50, 2002
 - 8 Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. Genetic polymorphisms of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients. *J Neuroimmunol* 136: 125-129, 2003
 - 9 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: 109-118, 2003
 - 10 Houzen H, Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Nogoshi S, Matsumoto H, Tashiro K. The prevalence and clinical characteristics of MS in northern Japan. *J Neurol Sci* 211: 49-53, 2003
 - 11 Kikuchi S, Fukazawa T, Niino M, Yabe I, Miyagishi R, Hamada T, Hashimoto SA, Tashiro K. HLA-related subpopulations of MS in Japanese with and without oligoclonal IgG bands. *Neurology* 60: 647-651, 2003
 - 12 Yabe I, Kawashima A, Kikuchi S, Higashi T, Fukazawa T, Hamada T, Sasaki H, Tashiro K. Caveolin-3 gene mutation in Japanese with rippling muscle disease. *Acta Neurol Scand* 108: 47-51, 2003
 - 13 Fukazawa T, Kikuchi S, Niino M, Yabe I, Hamada T, Tashiro K. Multiphasic demyelinating disorder with acute transverse myelitis in Japanese. *J Neurol* 250: 624-626, 2003
 - 14 Yabe I, Higashi T, Kikuchi S, Sasaki H, Fukazawa T, Yoshida K, Tashiro K. GNE mutations causing distal myopathy with rimmed vacuoles with inflammation. *Neurology* 61: 384-386, 2003
 - 15 Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. Polymorphisms of

- apolipoprotein E and Japanese patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 9: 382-386, 2003
- 16 Miyagishi R, Niino M, Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S, Tashiro K. C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2003 Dec;145(1-2):135-8.
- 17 Murata J, Kitagawa M, Uesugi H, Saito H, Iwasaki Y, Kikuchi S, Tashiro K, Sawamura Y. Electrical stimulation of the posterior subthalamic area for the treatment of intractable proximal tremor. *J Neurosurg.* 2003 Oct;99(4):708-15.
- 18 Yabe I, Higashi T, Kikuchi S, Sasaki H, Fukazawa T, Yoshida K, Tashiro K. GNE mutations causing distal myopathy with rimmed vacuoles with inflammation. *Neurology.* 2003 Aug 12;61(3):384-6.
- 19 Tajima Y, Kishimoto R, Sudoh K, Miyazaki Y, Kikuchi S, Tashiro K. Spinal Magnetic Resonance Image alterations in human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy patients before and after immunomodulating treatments. *J Neurol.* 2003 Jun;250(6):750-3. No abstract available.
- 20 Tamura I, Kikuchi S, Otsuki M, Tashiro K. The writing of arabic numerals, kanji, and kana in brain-damaged patients. *Neuroreport.* 2003 May 6;14(6):861-5.
- II 学会発表
- 国際学会
- 1) Hikoaki Fukaura , Toshiyuki Fukazawa, Seiji Kikuchi: Increased Osteopontin in CSF and Brains from Multiple Sclerosis. Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS) 3rd Annual Meeting. Paris, France. May 15-19, 2003
- 2) Hikoaki Fukaura , Toshiyuki Fukazawa, Seiji Kikuchi: Increased Osteopontin in Cerebrospinal Fluid and Brains from Patients with Multiple Sclerosis. 128th Annual Meeting of the American Neurological Association. The San Francisco Marriott, San Francisco, USA. Oct 19-22, 2003.
- 国内学会
- (ア) 宮崎雄生, 深澤俊行, 新野正明, 矢部一郎, 宮岸隆司, 深浦彦彰, 菊地誠志, 佐々木秀直, 田代邦雄: 視神

経脊髄型MSにおける Osteopontin,
vitamin D Receptor, Estrogen
Receptor 1 遺伝子多型の検討, 第 16
回日本神経免疫学会学術集会, 平成 16
年 1 月 30 日－31 日, 東京

(イ) 深浦彦彰、深澤俊行、菊地誠志、多
発性硬化症 (MS) におけるオステオ
ポンチン (OPN) の検討。第 44 回日
本神経学会総会。平成 15 年 5 月 15
日－17 日、パシフィコ横浜、神奈川
県。

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

厚生労働科学研究補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

「視神経脊髄型 MS における Osteopontin, Vitamin D Receptor, Estrogen Receptor
遺伝子多型の検討」

分担研究者 菊地 誠志¹⁾

共同研究者 宮崎雄生¹⁾、深浦彦彰¹⁾、宮岸隆司²⁾、深澤俊行³⁾

研究要旨

われわれは以前に single nucleotide polymorphism (SNP) を検討することにより osteopontin (OPN), vitamin D receptor (VDR), estrogen receptor 1 (ER) 遺伝子多型が通常型多発性硬化症 (conventional multiple sclerosis: CMS) の疾患感受性に関連していることを明らかにしたが、今回の研究ではこれら 3 遺伝子多型と視神経脊髄型多発性硬化症 (opticospinal multiple sclerosis: OSMS) の疾患感受性との関連を検討した。その結果、OPN 遺伝子多型に関しては CMS と同様に OSMS の疾患感受性との関連が示され、VDR 遺伝子多型に関しても同様の傾向が見られた。このことより、この 2 遺伝子多型は OSMS, CMS のみならず、日本人の特発性炎症性脱髄性疾患全般の発症に関連している可能性が考えられた。一方 ER 遺伝子多型と OSMS 発症との関連は認めず、OSMS, CMS の病態の差異に関連している可能性が考えられた。

A. 研究目的

視神経脊髄型多発性硬化症 (opticospinal multiple sclerosis: OSMS) の発症と osteopontin (OPN), vitamin D receptor (VDR) および estrogen receptor 1 (ER) 遺伝子多型との関連を検討する。

B. 研究方法

少なくとも 1 年の観察期間において、病変が臨床的に視神経と脊髄に局限している患者を OSMS

とし、患者は北海道在住の日本人 OSMS 患者 23 名、対照は北海道在住の健常日本人 138 名とした。患者、対照より同意を得た上で採血を行い、白血球より DNA を抽出した。OPN 遺伝子 8090 番目塩基に存在する C/T single nucleotide polymorphism (SNP), VDR 遺伝子 intron 8 に存在する A/G SNP, ER 遺伝子 intron 1 に存在する C/T SNP の遺伝子型を PCR-restriction fragment length polymorphism 法を用いて同定した。次いで各候補遺伝子の遺伝子型、対立遺伝子頻度を χ^2 乗検定を用いて患者、対照間で比較検討した。

-
- 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

C. 研究結果

OPN 遺伝子 8090 番目塩基に存在する C/T SNP では CC 遺伝子型, C 対立遺伝子頻度が OSMS では対照に比べて有意に高かった (それぞれ $p=0.023$, $p=0.002$). VDR 遺伝子 intron 8 に存在する A/G SNP では AA 遺伝子型, A 対立遺伝子頻度が OSMS で高い傾向が見られた (それぞれ $p=0.055$, $p=0.050$). ER 遺伝子 intron 1 に存在する C/T SNP ではいずれの遺伝子型, 対立遺伝子頻度とも OSMS 患者, 対照との間に有意な違いは認めなかった.

D. 考察

われわれは以前に, 今回検討した 3 遺伝子多型が通常型多発性硬化症 (conventional multiple sclerosis: CMS) の疾患感受性に関連していることを明らかにした. 今回の検討では OPN に関しては OSMS 疾患感受性との関連が示され, VDR に関しても CMS と同様の傾向が見られた. ところで, OPN 遺伝子多型の背景は日本人と西洋人では異なる事が示されており, 加えて西洋人 CMS の検討では OPN 遺伝子多型と疾患感受性との関連は認めていない. また VDR 遺伝子多型の背景も日本人と西洋人では異なることが示されている. 従って, これら 2 遺伝子多型は日本人 MS の特徴と関連している可能性が考えられ, さらに, 両病型発症との関連を認めたことから, MS のみならず日本人の特発性炎症性脱髄性疾患全般の発症と関連している可能性が示唆された. 一方, ER 遺伝子多型と疾患感受性との関連は CMS, OSMS では異なり, 両者の病態の差異と関連している可能性が考えられた.

E. 結論

OPN 遺伝子 8090 番目の塩基に存在する C/T SNP は OSMS の発症と関連しており, 更には日本人特発性炎症性脱髄性疾患全般の発症と関連している可能性がある. VDR 遺伝子 intron 8 に存在する A/G SNP に関しても同様の傾向が見られた. 一方 ER 遺伝子 intron 1 に存在する C/T SNP と OSMS 発症との関連は見られなかった.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

<総論>

- 1 新野 正明, 菊地 誠志, 深澤俊行, 田代 邦雄. 多発性硬化症の病型—脊髄型に 焦点をあてて. 脊椎脊髄ジャーナル 14:180-188, 2001
- 2 菊地誠志, 深澤俊行, 田代邦雄. 多発性硬化症の遺伝子多型解析. 神経内科 56:319-325, 2002
- 3 Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Tashiro K. Genetic susceptibility to multiple sclerosis: Implications of genetic research on MS therapy. Expert Rev Neurotherapeutics 2(3):89-98, 2002
- 4 深澤俊行, 菊地誠志, 田代邦雄. 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 16:589-592, 2003

- 5 深澤俊行、菊地誠志、新野正明、矢部一郎、宮岸隆司、深浦彦彰、濱田 毅、田代邦雄. 多発性硬化症の疾患感受性遺伝子. 日本臨床 61:1311-1316, 2003
- 6 深浦彦彰、菊地誠志. 活動期における IL-18 の役割. 日本臨床 61:1416-1421, 2003

<原著>

- 1 Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Sasaki H, Tashiro K. Genetic polymorphism of IL-1 β and IL-1 receptor antagonists in association with multiple sclerosis in Japanese patients. J Neuroimmunol 118: 295-299, 2001
- 2 Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Sasaki H, Tashiro K. Heat shock protein 70 gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. Tissue Antigens 58: 93-96, 2001
- 3 Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. No association of vitamin D-binding protein gene polymorphism in Japanese patients with MS. J Neuroimmunol 127: 177-179, 2002
- 4 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 128: 77-81, 2002

- 5 Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Miyagishi R, Yabe I, Tashiro K. An examination of the Apo-I/Fas promoter Mva I polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. BMC Neurology 2:8-12, 2002
- 6 Niino M, Kikuchi S, Miyagishi R, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. An examination of the association between β 2 adrenergic receptor polymorphisms and multiple sclerosis. Multiple sclerosis 8: 475-478, 2002
- 7 Kikuchi S, Niino M, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. An assessment of the association between IL-2 gene polymorphism and Japanese patients with multiple sclerosis. J Neurol Sci 205: 47-50, 2002
- 8 Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. Genetic polymorphisms of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients. J Neuroimmunol 136: 125-129, 2003
- 9 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: 109-118, 2003
- 10 Houzen H, Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Nogoshi S, Matsumoto H, Tashiro K. The prevalence and clinical characteristics of MS in northern Japan. *J Neurol Sci* 211: 49-53, 2003
- 11 Kikuchi S, Fukazawa T, Niino M, Yabe I, Miyagishi R, Hamada T, Hashimoto SA, Tashiro K. HLA-related subpopulations of MS in Japanese with and without oligoclonal IgG bands. *Neurology* 60: 647-651, 2003
- 12 Yabe I, Kawashima A, Kikuchi S, Hogashi T, Fukazawa T, Hamada T, Sasaki H, Tashiro K. Caveolin-3 gene mutation in Japanese with rippling muscle disease. *Acta Neurol Scand* 108: 47-51, 2003
- 13 Fukazawa T, Kikuchi S, Niino M, Yabe I, Hamada T, Tashiro K. Multiphasic demyelinating disorder with acute transverse myelitis in Japanese. *J Neurol* 250: 624-626, 2003
- 14 Yabe I, Higashi T, Kikuchi S, Sasaki H, Fukazawa T, Yoshida K, Tashiro K. GNE mutations causing distal myopathy with rimmed vacuoles with inflammation. *Neurology* 61: 384-386, 2003
- 15 Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. Polymorphisms of apolipoprotein E and Japanese patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 9: 382-386, 2003
- 16 Miyagishi R, Niino M, Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S, Tashiro K. C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2003 Dec;145(1-2):135-8.
- 17 Murata J, Kitagawa M, Uesugi H, Saito H, Iwasaki Y, Kikuchi S, Tashiro K, Sawamura Y. Electrical stimulation of the posterior subthalamic area for the treatment of intractable proximal tremor. *J Neurosurg.* 2003 Oct;99(4):708-15.
- 18 Yabe I, Higashi T, Kikuchi S, Sasaki H, Fukazawa T, Yoshida K, Tashiro K. GNE mutations causing distal myopathy with rimmed vacuoles with inflammation. *Neurology.* 2003 Aug 12;61(3):384-6.
- 19 Tajima Y, Kishimoto R, Sudoh K, Miyazaki Y, Kikuchi S, Tashiro K.

Spinal Magnetic Resonance Image alterations in human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy patients before and after immunomodulating treatments. J Neurol. 2003 Jun;250(6):750-3. No abstract available.

- 20 Tamura I, Kikuchi S, Otsuki M, Tashiro K. The writing of arabic numerals, kanji, and kana in brain-damaged patients. Neuroreport. 2003 May 6;14(6):861-5.

II 学会発表

国際学会

- 1) Hikoaki Fukaura, Toshiyuki Fukazawa, Seiji Kikuchi: Increased Osteopontin in CSF and Brains from Multiple Sclerosis. Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS) 3rd Annual Meeting. Paris, France. May 15-19, 2003
- 2) Hikoaki Fukaura, Toshiyuki Fukazawa, Seiji Kikuchi: Increased Osteopontin in Cerebrospinal Fluid and Brains from Patients with Multiple Sclerosis. 128th Annual Meeting of the American Neurological Association. The San Francisco Marriott, San Francisco, USA. Oct 19-22, 2003.

国内学会

- 1) 宮崎雄生, 深澤俊行, 新野正明, 矢部一郎, 宮岸隆司, 深浦彦彰, 菊地誠志, 佐々木秀直, 田代邦雄: 視神経脊髄型 MS における Osteopontin, vitamin D Receptor, Estrogen Receptor 1 遺伝子多型の検討, 第 16 回日本神経免疫学会学術集会, 平成 16 年 1 月 30 日 - 31 日, 東京
- 2) 深浦彦彰, 深澤俊行, 菊地誠志, 多発性硬化症 (MS) におけるオステオポンチン (OPN) の検討, 第 44 回日本神経学会総会, 平成 15 年 5 月 15 日 - 17 日, パシフィコ横浜, 神奈川県。

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

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

多発性硬化症患者髄液とアミノ酸代謝に関する研究

分担研究者 横山和正 順天堂大学脳神経内科

研究要旨

多発性硬化症に対するインターフェロン療法の効果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にあたって、本研究ではまず多発性硬化症と他の神経疾患の髄液基礎データを収集しその後小数例におけるインターフェロン開始前後での髄液でのアミノ酸代謝、NO、IgG index、MRI と臨床上的 EDSS 変化との比較解析を行った。インターフェロンの効果発現に関してはアミノ酸代謝への影響も考えられたが特に増悪期の髄液アミノ酸の変化は重篤度を反映しているがインターフェロンの影響は受けていないと考えた。一方 NO 代謝は低下していることや髄液 IgG index の低下はインターフェロンの効果発現を示していると考えた。

A. 研究目的

インターフェロン使用により患者の再発回数のみならず再発時の重症度が軽快することが報告されている。今回はその効果発現機構を解析するために多発性硬化症の患者増悪期、インターフェロン使用前後における髄液のアミノ酸組成、NO に関しては半減期が短く速やかに分解されるため NO 代謝産物について検討し他の神経疾患との比較を行なった。

B. 研究方法

多発性硬化症の再発は症状（EDSS）、造影 MRI、髄液中の IgG index によって評価されている。炎症性疾患もしくは原因不明の入院した神経疾患の患者には我々の科では診断確定及び鑑別も含めて髄液検査が必須の検査として行われるが、今回我々は寛解増悪型の多発性硬化症の

再発期の緩解期の髄液、コントロールとしての他の神経疾患の髄液中の 41 種のアミノ酸分析、NO 代謝産物である亜硝酸イオン、硝酸イオンの変化の測定を行った。それぞれの患者の髄液細胞数、タンパク、糖 IgG index、多発性硬化症患者においては MBP、オリゴクローナルバンドの測定も併せて行った

症例は説明と同意を得た順天堂大学入院患者 8 名、外来健常者であることが判明した 1 名に関して診断確定目的もしくは重篤度の評価目的に行った髄液検査での髄液を採取し 1500 rpm 5 分で遠心を行った。検体は氷点下 -80 度にて凍結し一括して測定を行った。症例は多発性硬化症 3 名、肥厚性硬膜炎 1 名、健常人 1 名、筋萎縮性側索硬化症（ALS）1 名、髄膜炎 1 名、multifocal motor neuropathy（MMN）、CIDP（chronic

inflammatory demyelinating polyneuropathy) 各1名である。

髄液におけるアミノ酸41種、亜硝酸、硝酸イオンを HPLC による解析を行った。アミノ酸はニンヒドリン反応を利用し発色させ吸光度は570, 440 nm での変化を測定し定量した。硝酸イオン、亜硝酸イオンは除たんばくしたサンプルを分離還元しナフチルエチレンジアミンと反応させその UV 吸収 (540 nm) を測定したアミノ酸分析に関しては HPLC にて行った。各アミノ酸および髄液細胞数、IgG index、MBP、EDSS、Gd MRI と比較検討した。

倫理面への配慮

髄液検査に関しては一般に提出される髄液検査の残りを遠心し測定することでデータ収集目的の検査では無いことを説明し同意を得た。

C. 研究結果

MS 再発例においてステロイドパルス前での IgG index は今回全例において0.7以下であり EDSS 変化と相関していなかった。またインターフェロン使用群で IgG index が低い傾向が認められた (図1)。髄液 MBP 高値の症例で EDSS スコアがより増悪していた。前年度の報告で我々はマウスでのトリプトファン分解酵素阻害剤が実験的アレルギー性脳脊髄炎を抑制したことよりトリプトファン代謝への影響、また神経細胞へのダメージに関連すると考えられるグルタミン酸、GABA に関しても測定を行ったが今回の髄液量では検出できなかった。亜硝酸イオンはすべての症例で1以下であり疾患

による変動は無かった。MS 再発群、他の神経疾患群における髄液アミノ酸組成に有意な差は認めなかった。しかし硝酸イオンは多発性硬化症群で低い傾向があった。ただし EDSS 悪化が著明で髄液 MBP の上昇例患者において threonine, asparagine, glutamine, glycine, alanine, methionine, tyrosine, phenylalanine, histidine, arginine が上昇していた一方、硝酸イオンは低値であった。インターフェロン導入で髄液細胞数、IgG index, 硝酸イオンが低下した。

D. 考察

昨年までの報告でアミノ酸代謝阻害剤にて EAE の治療が可能であることを報告したが、本年は前年度までの基礎実験を元に各神経疾患での髄液アミノ酸の変化を確認し、特に多発性硬化症の増悪期、病変による違いがどう影響し、インターフェロンの使用により変化があるのかについて検討した。多発性硬化症ではインターフェロンβの効果発現の詳細は不明であるがもともとインターフェロンはウイルスに感染した線維芽細胞から分泌される抗ウイルス活性をもつ糖タンパク質であり、抗ウイルス活性の他に細胞増殖抑制作用、抗腫瘍効果、NK細胞活性化、免疫調節作用を持つことで治療として用いられてきたサイトカインである。以上のような pleiotropic effect により多発性硬化症患者において免疫環境を変化させることにその特徴があると考えられる。そのため一般に液性免疫がその本体と考えられている重症筋無力症がインターフェロンの副作用として報告されているこ