

とは興味深い。またアミノ酸代謝に及ぼす影響は今まで報告されていない。

今回インターフェロン使用患者でも重篤な症状変化を示した再発患者はアミノ酸の有意な変化が認められた。

特に EDSS の悪化が明らかである症例においてタウリン、アラニン、アルギニン、グリシン、フェニルアラニンが上昇していた。しかしインターフェロンによる同一症例での変化は明らかではない。髄液 IgG index は再発時の MRI での活動性病変と相関すると報告されている。1999 年 Rudick らの報告では2年間のインターフェロン使用により髄液細胞数の低下はあるものの IgG index の変化は無いとしている。今回我々の再発症例での IgG index が低い傾向、さらには同一患者でインターフェロン使用後 IgG index が低下しているという事実はインターフェロンの効果と考えて良いかもしれない。オリゴデンドロサイトには AMPA/カイニン酸受容体はあるが、NMDA 受容体は無く、グリア細胞障害によるグルタミン酸の上昇は無いと考えられている。今回我々の再発例でグルタミン酸の検出ができなかったことは神経細胞の障害が無かったことを示しているかもしれない。脂肪が多く脂質酸化反応を受けやすい白質、抗酸化物質の一つであるグルタチオン含量が少なく鉄含量も多くフリーラジカルによって障害を引き起こされやすいオリゴデンドロサイトがその標的細胞である多発性硬化症において、NO 代謝産物は髄液、血液、尿で上昇し病勢と相関すると報告されている。NO は BBB を破壊し脱髄、神経軸索変成を引き起こすと同時

に免疫調節作用などの dual effect を持っている。我々のインターフェロン使用症例で基礎値が低下したこと、使用例の増悪時に硝酸イオンが高値を示さなかったことはインターフェロンの NO 代謝を介しての免疫調節作用を示唆している可能性もある

細胞の体積調節機能を持つタウリン、nitric oxide (NO)の唯一の基質であるアルギニン、シナプス後抑制に関与すると考えられるグリシン、興奮性アミノ酸であるセリンの変化は他の興奮性アミノ酸であるグルタミン酸、アスパラギン酸の測定が今回不可能であったこともありその影響に関しては明言できないが多発性硬化症に特異性がある可能性もあり今後の症例の蓄積が望まれる。また抑制性アミノ酸である GABA に関しては検出することができなかったため今後検出システムの鋭敏化が必要である。

E. 結論

多発性硬化症では症状の重症度とある一群のアミノ酸変化が相関すると考えられたが NO 代謝は亢進していなかった。インターフェロン使用例では IgG index が再発時にも比較的低値を示しさらには硝酸イオンも低値であり効果発現に関連している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

2004年度神経学会総会予定

H. 知的財産権の出願、登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

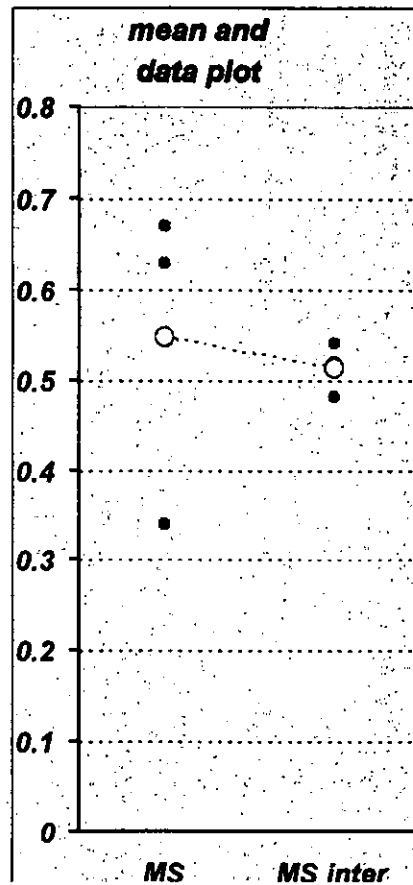
3. その他

なし

図 1

インターフェロン使用後の IgG index の変化について

IgG index の 比



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

arundic acid(ONO-2506)の多発性硬化症実験動物（慢性進行性・再発寛解型 EAE）
に対する抑制効果に関する研究

分担研究者 野村恭一 埼玉医科大学神経内科助教授
共同研究者 富岳 亮、滝沢功一、大貫 学、三井隆男
高砂子由佳子、木下俊介、高濱美里、井口貴子

研究要旨

再発寛解型の多発性硬化症（MS）の再発抑制療法として、現在、インターフェロン（INF）療法が行われているが、その治療効果は約 50%であり、INF 治療抵抗性の症例では新たな治療法が求められている。近年、MS の急性増悪時における脳内の astrocyte の役割が重要視されている。今回、我々は astrocyte の機能改善薬である arundic acid（ONO-2506）に注目し、ONO-2506 が MS の再発抑制薬になり得るかについて検討した。慢性進行型 EAE、再発寛解型 EAE モデルに ONO-2506 を連日、隔日に経口投与し、神経症候を観察した。その結果、ONO-2506 は連日、隔日の経口投与により慢性進行型、再発寛解型 EAE の神経症候の抑制効果を示した。ONO-2506 は MS の再発抑制薬になりうる可能性を認めた。

A. 研究目的

われわれはこれまでに ONO-2506 を腹腔内投与あるいは経口投与により MS の実験モデルである慢性進行型 EAE ならびに再発寛解型 EAE の発症を予防することを報告した。本研究では、MS 再発抑制を目的とした ONO-2506 治療を想定し、ONO-2506 を経口投与するにあたり、作用機序を考慮し連日投与と隔日投与による EAE 予防効果の比較検討を行った。

B. 研究方法

- ①慢性進行型 EAE モデル作成には C57BL6 マウス 15 匹、②再発寛解型 EAE モデル作成には NODLT マウス 15 匹を使用した。
- EAE モデルの作成：抗原として、ミエリン・オリゴデンドロサイト・糖蛋白（MOG）のアミノ酸配列 35-55 残基に相当するペプチド（MOG35-55、クラブ

ウ社製）を用い、EAE を誘導した。100 μ g/マウスを両側の鼠径部皮下に分注、接種した。神経症候の発現を確実に安定化させるために、pertussis toxin を尾静脈から注入した。神経症候は臨床スコアを用い、抗原接種日より 60 日間、連続観察した。

- ONO-2506 の経口投与法：抗原接種日から連日あるいは隔日で ONO-2506 を経口投与した。胃ゾンデをセットした注射器に ONO-2506 を必要量とり、確実に固定したマウスの口腔から胃ゾンデを挿入し、ONO-2506 を注入した。
- ONO-2506 の経口投与量：ONO-2506 投与量は前回の実験結果から 30mg/kg とした。

① C57BL6 マウス（慢性進行型 EAE モデル）は、ONO-2506 を 30mg/kg、抗原接種日から 30 日間、連日投与（連日

投与群)または隔日投与(隔日投与群)を行った。

- ② NODLT マウス(再発寛解型 EAE モデル)は、ONO-2506 を 30mg/kg、抗原接種日から 60 日間、連日投与(連日投与群)または隔日投与(隔日投与群)を行った。

C. 研究結果

1. 慢性進行型 EAE モデルの検討 (C57BL6 マウス: 図 1)

- ① コントロール群は、抗原接種後 12 日に神経症候を発現し、その後、平均臨床スコアは徐々に増悪を認め、26 日に 3.4 に達し 30 日まで持続した。
- ② ONO-2506 連日投与群は、13 日に神経症候を発現し、23 日から 25 日にかけて平均臨床スコアは 2.25 に達し、その後 1.75 に軽減した。
- ③ ONO-2506 隔日投与群は、20 日に平均臨床スコア 0.667 の神経症候を発現し、21 日から 0.33 に軽減し、その後 30 日まで持続した。

2. 再発寛解型 EAE モデルの検討 (NODLT マウス: 図 2)

- ① コントロール群は、抗原接種後 14 日に神経症候を発現し、21 日に平均臨床スコア 1.6 のピークを示し、26 日に改善する 1 回目の EAE を認め、抗原接種後 38 日に 2 回目の EAE を発現、48 日に平均臨床スコア 2 のピークを示し、54 日に改善した。
- ② ONO-2506 連日投与群は、抗原接種後 21 日から 25 日にかけて平均臨床スコア 0.6 を示す 1 回目の EAE を認め、抗原接種後 35 日に 2 回目の EAE を発現、48 日に平均臨床スコア 0.4 のピ

ークを示し、55 日に改善した。

- ③ ONO-2506 隔日投与群は、抗原接種後 21 日に 1 日のみ平均臨床スコア 0.2 を示す 1 回目の EAE を認め、抗原接種後 36 日から 42 日にかけて平均臨床スコア 0.25 の 2 回目の EAE を認めた。

D. 研究結論

- ① C57BL6 マウスによる慢性進行型 EAE モデルでは、ONO-2506 を 30mg/kg の経口投与により、隔日投与群は連日投与群と同様の EAE 予防効果を認めた。
- ② DLT マウスの EAE モデルでは、ONO-2506 を 30mg/kg の経口投与により、隔日投与群は連日投与群と同様の EAE 予防効果を認めた。
- ③ ONO-2506 は慢性進行型・再発寛解型 EAE の予防効果を示した。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

I. 論文発表

1. 野村恭一、三井隆男、高濱美里、柴木謙次、高砂子由佳子、滝澤功一、大貫 学、富岳 亮、大野良三: 寛解再発型多発性硬化症に対する免疫吸着療法; 平成 14 年度 厚生省免疫性神経疾患調査研究班 23-25, 2003
2. 木下俊介、富岳 亮、野村恭一、島津邦男: 多発性硬化症の非活動期における末梢血リンパ球サブセットおよびケモカインレセプターの検討; 神経免疫学、11 (1): 57-58, 2003
3. Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T and Yamamura T: Microarray analysis identifies interferon b-regulated genes in multiple sclerosis.; J.

Neuroimmunol.139 : 109-118. 2003

4. 野村恭一：自己反応性の抗大脳基底核抗体と大脳基底核病変を有するレンサ球菌感染後 ADEM ; Brain & Nerve.12 : 13-14.2003
5. 野村恭一：多発性硬化症 -最新の基礎・臨床研究-血漿浄化療法 ; 日本臨床. 61 (8) : 1388-1395. 2003
6. 野村恭一：寛解再発型多発性硬化症に対する Natalizumab の比較試験 ; Brain & Nerve.12 : 2003
7. 野村恭一、柴木謙次、高砂子由佳子、島津邦男：過性の軟口蓋・咽頭筋麻痺を呈した 1 小児例 ; 末梢神経.14 (1) 2003
8. 三井隆男、野村恭一、大熊 彩、茅野秀一、島津邦男：NK 細胞増多症に多発根神経炎を呈した 1 例 ; 末梢神経.14 (1) 2003

II. 学会発表

1. 野村恭一、大島裕紀、三井隆男、大熊 彩、木下俊介、富岳 亮、糸川かおり、島津邦男：IVIg 治療抵抗性となった CIDP に対してタクロリムスが有効であった 1 例 ; 第 2 回 重症筋無力症とプログラフ講演会 2003
2. 高砂子由佳子、木下俊介、富岳 亮、野村恭一、島津邦男：多発性硬化症の非活動期における末梢血リンパ球サブセットおよびケモカインレセプターの検討 ; 第 15 回 日本神経免疫学会、2003
3. 木下俊介 富岳 亮 野村恭一 高砂子由佳子 高濱美里 滝澤功一 大島裕紀 島津邦男：第 44 回 日本神経学会総会 2003
4. 三井隆男、野村恭一、大貫 学、島津邦男：脱髄型・軸索障害型ギラン・バレー症候群の臨床的検討 ; 第 44 回 日本神経学会総会 2003
5. 高濱美里、野村恭一、大貫 学、富岳 亮、島津邦男：免疫吸着療法は寛解再発型の多発性硬化症の免疫異常を調節し再発を抑制する ; 第 44 回 日本神経学会総会、2003
6. 三井隆男、野村恭一、大熊 彩、滝澤功一、島津邦男：NK 細胞増多症を伴った多発根神経炎の 1 例 ; 第 14 回 日本末梢神経学会 2003
7. 野村恭一、高砂子由佳子、柴木謙次、島津邦男：一過性の軟口蓋・咽頭筋麻痺を呈した 1 小児例 ; 第 14 回 日本末梢神経学会 2003
8. 高砂子由佳子、野村恭一、高濱美里、大熊 彩、木下俊介、前田晃宏、島津邦男：精神症状で発症し、意識障害・痙攣を呈したコクサッキーウイルス A4 による予後良好な亜急性脳炎の 1 例 ; 第 8 回日本神経感染症学会、2003
9. 野村恭一、大島裕紀、高砂子由佳子、木下俊介、三井隆男、大貫 学、富岳 亮、島津邦男 ; 第 23 回 日本アフェレンス学会 2003

G. 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

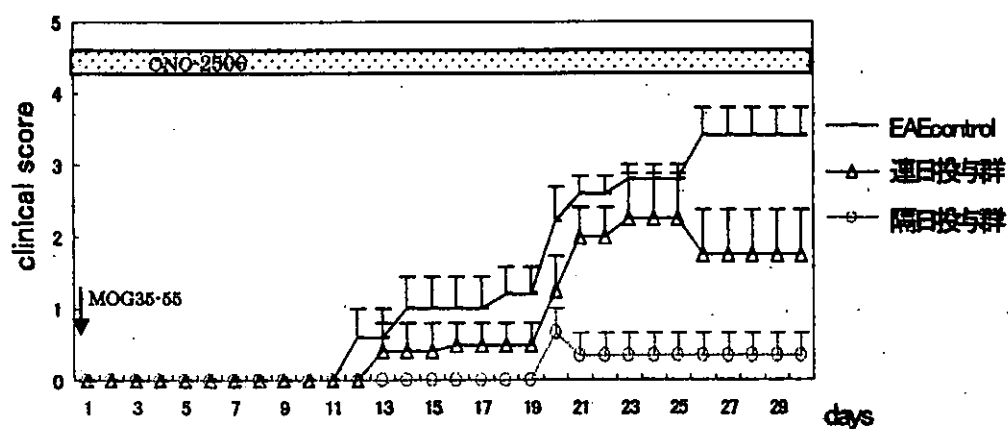


図 1. 慢性進行型 EAE モデルの検討

ONO-2506 を 30mg/kg、連日投与あるいは隔日投与し、神経症候の抑制効果を検討した。隔日投与群においても神経症候の抑制効果を示した。

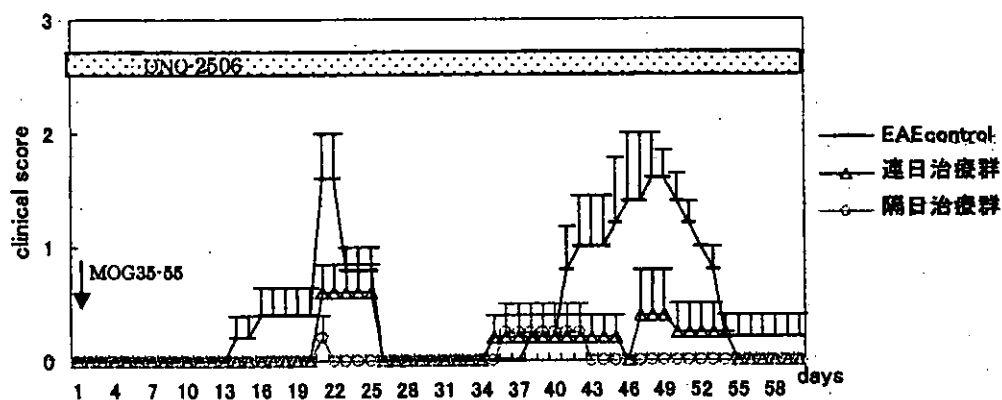


図 2. 再発寛解型 EAE モデルの検討

ONO-2506 を 30mg/kg、60 日間、連日投与あるいは隔日投与し、神経症候の抑制効果を検討した。隔日投与群においても初回 EAE ならびに再発 EAE の神経症候を抑制した。

「多発性硬化症の診断、McDonald の診断基準をもちいて」

分担研究者：太田 宏平^{1,2}

共同研究者：大橋 高志¹、竹内 千仙¹、大原 久仁子¹、清水 優子¹、岩田 誠¹

1 東京女子医科大学脳神経センター神経内科、 2 東京理科大学理学部

研究要旨 日本人多発性硬化症 (MS) における McDonald の診断基準の有用性を検討するために、自験例の検査所見と照らし合わせ、臨床所見との対比を試みた。従来考えられているとおり、我々の検討でも、脳幹から脊髄にかけて病巣がほぼ限局する症例では、MRI 基準を満たしづらい結果となった。より早期からインターフェロン (IFN) 療法などによる予防的治療を導入するためには、MS の診断をより確実に行うことが必要であり、等電点電気泳動法によるオリゴクローナル IgG バンドの測定や、適切な時期での MRI の撮像が必要であると思われる。また、初回発作時から単独で MRI 基準を満たす症例では、IFN 療法の導入を考慮してもよいと思われる。

A. 目的

多発性硬化症 (MS) の臨床診断には、臨床徴候の時間的・空間的多相性を証明することが重要であるが、MRI を診断に用いることでより確実な診断が可能となる。インターフェロン (IFN) 療法など、MS の再発・予防を目的とした治療法は、発症早期より導入することにより予後を改善する可能性があり、早期診断の重要性が増している。2001 年に発表された International Panel による MS 診断基準、いわゆる McDonald の診断基準では、MRI 所見や髄液陽性所見（オリゴクローナル IgG バンド (OCB) 陽性、または IgG index 上昇）を組み合わせで診断することが可能となっている。しかし、日本人 MS では脳病変の少ない症例が多く、OCB の陽性率も低いため、McDonald の診断基準を満たさない症例も多くみられる。この研究では、日本人 MS における McDonald の診断基準の有用性を検討するために、自験例の検査所見と照らし合わせ、

臨床所見との対比を試みた。

B. 研究方法

対象は 2000 年 6 月から 2003 年 8 月までの間に当科に入院し、MS ないしは MS 疑いと診断された症例のうち、十分な情報を得ることができた症例 39 例で、男性 8 例、女性 31 例である。調査期間中の当科初回入院時の診断は、再発寛解型 MS が 24 例、一次進行型 MS が 1 例、初回発作での入院、いわゆる clinically isolated syndrome (CIS) が 14 例であった。

当科初回入院時、および、その後の再発時における各対象の脳 MRI axial 像 (T2 強調画像、Gd 造影 T1 強調画像) および脊髄 MRI sagittal 像 (T2 強調画像、Gd 造影 T1 強調画像) での病巣の局在について検討した。テント下病巣、皮質直下病巣、脳室周辺病巣および脊髄病巣の個数を調べ、Gd 造影による増強効果の有無を確認した。同時に、髄液 IgG index および OCB の結果、視

覚誘発電位 (VEP) での P100 潜時延長の有無を調べた。以上の結果を McDonald の診断基準と照らし合わせ、MS の病型ごとに对比した。

C. 研究結果

調査期間中の初回入院時にすでに再発寛解型MSと診断されていた24症例のうち、MRIの基準を満たしていたのは12例で、髄液所見にかかわらず単独でMRI基準を満たしたのは8例であった(図1)。MRIの基準を満たさなかった症例は12例で、9例は脳病巣が少なく、かつ髄液所見も正常であったのがその理由であった。これらの症例はその後の経過が不明であった1例を除いて全て2年以内に臨床的再発がみられており、再発寛解型MSとして矛盾しないと考えた。残りの3例のうち、1例はMRI所見が非典型的で、15ヶ月後に死亡しており、他の2例はMRIで病変を認めていないことから、これらはMS以外の疾患であった可能性が考えられる。慢性進行型MSと診断された症例の頭部MRIでは、9個以上の脳病変があり、MRI基準は満たしていたが、髄液所見、VEPがいずれも正常であり、McDonaldの診断基準は満たしていなかった。

調査期間中に初回発作で当科に入院したCIS症例14例のうち、MRIの基準を満たしていたのは2例で、MRI基準を単独で満たした症例はそのうち1例であった。後に臨床的に再発が確認され、MSと診断された症例は3例であった。これらはいずれも病巣がほぼ脳幹から脊髄に局限しており、テント上

の病巣は全くないか、あっても少数のみであった(図2)。残りの11例のうち10例は1年以上に渡って再発がないことが確認されており、MRI上、新しい病巣が確認された症例もなかった。MRI基準を満たしていた2例のうち、1例は18ヶ月で再発し、もう1例は2年間再発がなかった。

D. 考察

従来、MSの診断に用いられてきた Poser らの診断基準では、臨床徴候の時間的・空間的多相性が求められ、臨床的な再発が確認されるまで確定診断をすることができなかった。McDonald の診断基準では、Birkhofらおよび Tintore らの基準をまとめた厳格なMRIの基準が採用され、この基準を満たしたものは空間的多相性として捉えることが可能となった。このMRIの基準では、造影病巣の存在もしくはT2病巣が9個以上、テント下病巣、皮質直下病巣、3個以上の脳室周辺病巣、の4項目のうち、3項目以上を満たす必要がある。脊髄病変は脳病変に置き換えられるとの記載があるが、脳幹および脊髄のみの病巣では単独でMRI基準を満たすことはできない。

脊髄病変の取り扱いに関しては、McDonaldの診断基準では、脊髄の腫脹がないか軽度であること、長さが2椎体を超えないことなどが特徴としてあげられている。我々が経験する日本人MSの脊髄病変はこれらの特徴と合致していないことが少なくない。

CISで空間的多相性を証明するためには、前述のMRI基準を満たすか、髄液異常と2個

以上のMRI病巣が確認されればよいとされている。今回の検討では、IgG indexはほぼ全例で測定されているものの、OCBが測定されていない症例も多数あった。測定されている場合でも陽性例は少なく、ほとんど診断に寄与できていなかった。そのため、従来考えられているとおり、我々の検討でも、脳幹から脊髄にかけて病巣がほぼ限局する症例では、MRI基準を満たしづらい結果となった。

今回の検討では多くの症例でVEPが正常であったが、再発寛解型MSでもVEPの異常をMRI基準に含めることができれば、日本人MSでは基準を満たす症例が増えることが予想される。また、McDonaldの診断基準では、発症から3ヶ月以上たった時点でMRIを施行し、新たな造影病巣を確認すれば、空間的多相性を証明できる。今回、対象とした症例は、多くがMcDonaldの診断基準が発表される以前のものであり、当然のことではあるが、再発までの適切な時期にMRIが施行されていなかった。今後は、日本人MSでの臨床データを蓄積して、脊髄病変に重きを置き、VEP所見を含めたMRI基準を作成することが重要であると思われる。さらに、OCBの測定を等電点電気泳動法で行うこと、適切な時期にMRIの撮像を行うことなどに留意すれば、McDonaldの診断基準を用いることによって、臨床的再発を待たずしてMSの診断をより確実にできる可能性があり、IFN療法の早期導入が可能になるものと考えられた。

E. 結論

日本人 MS では MRI で非典型的な所見を呈することが多く、単独で MRI 基準を満たす症例は少ない。より早期から IFN 療法などによる予防的治療を導入するためには、MS の診断をより確実に行うことが必要であり、等電点電気泳動法による OCB の測定や、適切な時期での MRI の撮像が必要であると思われる。また、初回発作時から単独で MRI 基準を満たす症例では、IFN 療法の導入を考慮してもよいと思われる。

参考文献

- 1) McDonald WI, et al: Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50: 121-127, 2001.
- 2) Barkhof F, et al: Comparison of MR imaging criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 120: 2059-2069, 1997.
- 3) Tintore M, et al: Isolated demyelinating syndromes. Comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Am J Neuroradiol* 21: 702-706, 2000.
- 4) 中島一郎ら: MRI 診断法. *日本臨床* 61, 1340-1346, 2003.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大橋高志：脳炎と髄膜炎。神経疾患の総合的治療。毎日ライフ 4： 92-96, 2003.
- 2) 大橋高志：筋萎縮性側索硬化症。プチナース 12： 24-25, 2003.
- 3) 清水優子：重症筋無力症(MG)。毎日ライフ 34(4)： 82-87, 2003
- 4) 太田宏平：多発性硬化症。毎日ライフ 34(4)： 87-91, 2003
- 5) 太田宏平：免疫グロブリン療法（特集：多発性硬化症）。日本臨床 61(8)： 1374-1380, 2003
- 6) 太田宏平：重症筋無力症の内視鏡的胸腺摘出術。柳澤信夫、篠原幸人、岩田誠、清水輝夫、寺本明編, Annual Review 2004 神経, 中外医学社, 東京, 2004, pp293-300
- 7) Koike F, Satoh J, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T: Microarray analysis identifies interferon beta-regulated genes in multiple sclerosis. J Neuroimmunol 139(1-2): 109-18, 2003

2. 学会発表

- 1) 大橋高志、中原順子、内潟雅信、岩田誠：急性期脳梗塞クリニカルパス導入の試み。第 25 回東京女子医科大学神経懇話会, 東京. 11.10, 2003.
- 2) 大橋高志、内潟雅信、中原順子：急性期脳梗塞パッケージ式クリニカルパス導入の試み。第 44 回日本神経学会総会, 横浜. 5. 16, 2003.
- 3) 朴千仙、太田宏平、清水優子、大橋高志、大原久仁子、岩田誠：多発性硬化症のインターフェロン治療についての MRS での検討。第 44 回日本神経学会総会, 横浜. 5. 16, 2003.
- 4) 清水優子、太田宏平、大原久仁子、大橋高志、岩田誠：IFN- β 1b 療法を行った多発性硬化症 (MS) 患者末梢血中の免疫調節細胞と細胞傷害活性の検討。日臨免会誌 26:237, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

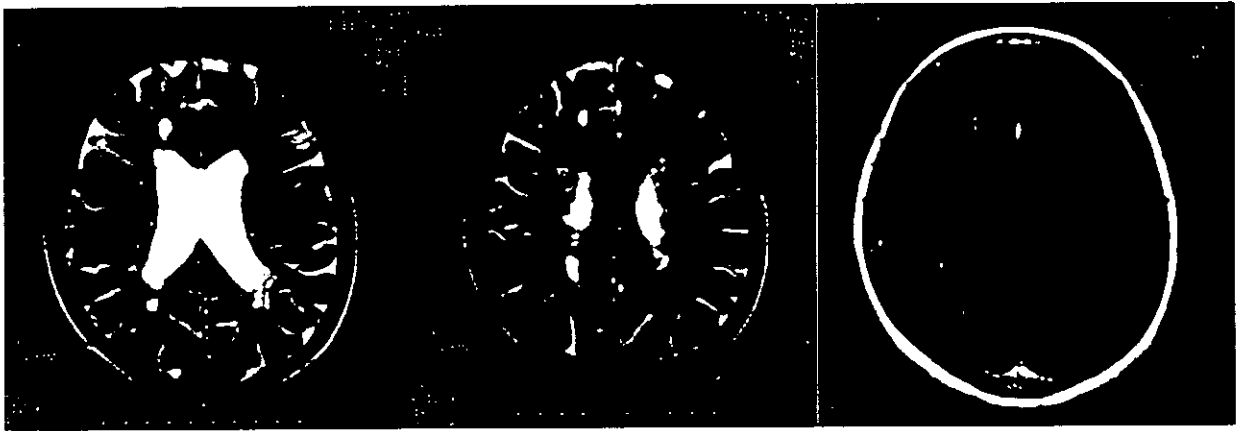
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1



31 歳、女性。頭部 MRI T2 強調画像（左、中央）および Gd 造影 T1 強調画像（右）。両側側脳室周辺、皮質直下に多数の病巣があり、右前頭葉の病巣は Gd 造影で増強効果がみられる。

図 2



42歳、女性。頸髄MRI T2強調画像（左）およびGd造影T1強調画像（右）。頸髄の腫脹を伴うT2病巣がC4以下に認められ、一部Gd造影による増強効果を伴っている。

IFN β による培養脳毛細血管由来内皮細胞の遺伝子発現変化

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

研究要旨

【目的】血液脳関門(BBB)における種々の遺伝子発現を、培養ヒト脳毛細血管由来内皮細胞(HBMEC)を用いて検討した。本研究ではchemokine, chemokine receptor 及びその関連分子の動態について主に解析を行った。【方法】IFN β にて刺激したHBMECと非刺激のHBMECによる比較を行った。さらに、TNF α を添加したHBMECを用いてIFN β にて刺激したHBMECと非刺激のHBMECによる比較をおこなった。DNA チップはHuman 3K Chip (Takara)を用いた。【成績】IFN β にてchemokineではCXCL1, CXCL2, IL-8, Mig, MCP-1, MCP-3, IP10, fractalkine の上昇、MIP-1 α , CCL11, CCL13, CCL18, CCL19, CCL21, RANTES, CXCL13 の低下を認めたが、MIP-1 β , SDF-1 については変動を認めなかった。【結論】今回の結果ではIFN β の脳毛細血管由来内皮細胞に対する作用として、IL-8, MCP-1, MCP-3, fractalkine などの遺伝子は発現亢進がみられ、RANTESは発現が抑制されることが明らかとなった。

A. 研究目的

血液脳関門(BBB, blood-brain barrier)は多発性硬化症をはじめとする自己免疫性神経疾患において、自己感作性細胞のhomingに関与し、中枢神経系への炎症の第一段階を惹起する場である。Homingに関与する因子としてはselectin, integrinなどの細胞接着因子(CAM, cell adhesion molecule)が重要な役割を果たすが、近年CAMの直接の調節因子としてchemokine, chemokine receptorが注目されている。今回の検討ではBBBにおける、chemokine, chemokine receptor 及びその関連分子の動態について検討するために、培養ヒト脳毛細血管内皮細胞(HBMEC)を用いて解析を行った。

B. 研究方法

細胞培養及びサイトカイン刺激

HBMECは女性剖検脳から採取した。定法により毛細血管内皮細胞を分離・継代培養を行った。内皮細胞の同定には抗 von Willebrand 因子と Dil-acetylated LDLにて行い、純度98%以上の培養細胞を用いた。IFN β による遺伝子発現調節を確認するために、IFN β にて刺激したHBMECと非刺激のHBMECによる比較を行った。また、炎症性サイトカイン存在下におけるIFN β による遺伝子発現調節を確認するために、TNF α を添加したHBMECを用いてIFN β にて刺激したHBMECと非刺激のHBMECによる比較をおこなった。各条件のHBMECはスクレイ

パーにて収集後、直ちにmRNA抽出を開始した。

DNA microarray.

DNA チップはHuman 3K Chip (Takara)を用いた。PolyA RNAを鋳型とし、reverse transcriptaseにより逆転写反応でCy3, Cy5-dUTPを取り込ませた。Cy3及びCy5標識プローブを混合して65℃、14時間でハイブリダイゼーションを行った。測定はAffymetrix 428 Array ScannerにてCy3, Cy5各検出波長において、シグナル強度に応じた3段階で測定した。データ解析はBioDiscovery ImaGene Ver.4.2を用いた。

今回の検討では細胞接着因子、chemokine, chemokine receptor およびその関連分子に関して解析した。

C. 研究結果

IFN β にて刺激したHBMECと非刺激のHBMECによる比較の結果、chemokineではCXCL1, CXCL2, IL-8, Mig, MCP-1, MCP-3, TECK, fractalkine の上昇、MIP-1 α , CCL11, CCL13, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21 の低下を認めたが、MIP-1 β , RANTES, SDF-1 については変動を認めなかった。Chemokine receptor の解析ではCCR1, CCR2, CCR4, CXCR4の発現低下を認めた。

また、IFN β にて刺激したHBMECではglucose transporter 1 (GLUT1)の遺伝子発現は亢進していた。

D. 考察

IFN β は MS の再発予防において使用されているが、その詳細なメカニズムは必ずしも明らかではない。MS 患者由来リンパ球における chemokine, chemokine receptor の IFN β 作用については RANTES, MIP-1 α , CCR5, MCP-1 等の発現低下が報告されている。一方、血管内皮側の IFN β による作用としては ICAM-1, VCAM-1 などの CAM の発現低下、monocyte の接着能低下の報告はあるが、chemokine, chemokine receptor の発現に関しては報告はない。

今回の結果では、脳毛細血管由来血管内皮細胞は IFN β によって、CCR1, CCR2, CCR4, CXCR4 などの chemokine receptor は主として down-regulation され、IFN β はリンパ球の接着に関して抑制的に作用することが示唆された。一方、これまでの単球を用いた報告と異なり、IFN β の血管内皮細胞に対する作用として、IL-8, MCP-1, MCP-3, fractalkine などの chemokine 遺伝子が誘導されることも明らかとなった。このメカニズムの意義については、現在さらに解析中である。

E. 結論

IFN β は脳毛細血管由来内皮細胞に対して、IL-8, MCP-1, MCP-3, fractalkine などの遺伝子の発現を亢進させる一方、RANTES の発現を抑制することが明らかとなった。IFN β は BBB を構成する内皮細胞に対して必ずしも炎症を抑制する方向にのみ働いているわけではなく、MS に対する有効性は複合的な要因が関与しているものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takashi Kanda, Masanaga Yamawaki, Hidehiro Mizusawa. Sera from Guillain-Barre 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の作用機序の検討。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、齊藤和幸、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

多発性硬化症の分子遺伝学的病型分類の試み

佐藤 準一、中西 恵美、尾上 祐行、古池 史子、山村 隆

国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部

研究要旨 多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は中枢神経系白質に多発する炎症性脱髄巣を特徴とする慢性再発性脳脊髄炎である。MS では何らかの遺伝的素因を有する個体において、脳炎惹起性自己抗原に分子相同性を示す外来抗原を認識して活性化した自己反応性 CD4⁺ Th1 T 細胞が誘導されるが、単一遺伝子が発症を規定する疾患ではない(complex immunogenetic background)。従って MS の病態は均一ではなく、臨床経過・病変分布・治療反応性の観点から、再発・寛解型と進行型、大脳型と視神経脊髄型、IFN β 治療反応型(responder)と不応型(nonresponder)に分けられる。病理学的にも細胞浸潤、IgG や補体の沈着、オリゴデンドロサイトのアポトーシスの点で 4 型に分類されている。しかし多彩な病態を呈する各サブグループの分子遺伝学的基盤は明らかにされていない。DNA microarray は細胞機能遂行に重要な数千・数万の遺伝子の発現を短時間で包括的に解析出来る利点がある。本研究では 1,258 cDNA microarray を用いて、MS 患者 74 例(IFN β 治療群 47 例と未治療群 27 例)および健常者(control subjects; CN)22 名の末梢血 T 細胞における遺伝子発現パターンを比較解析して、統計学的に有意な発現差異を示す遺伝子群を抽出した。さらにクラスター解析により特異的遺伝子発現パターンを呈する MS サブグループを同定して、その分子遺伝学的特徴(gene expression signature)を明らかにし、臨床的パラメーターとの対応を試みた。

A. 研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は若年成人に好発し、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グリオーシスや軸索傷害を来して不可逆的な後遺症を残す。MS は脳炎惹起性中枢神経系自

己抗原に分子相同性を示すウイルスなどの外来抗原を認識し活性化した自己反応性 CD4⁺ Th1 T 細胞が、血液脳関門を通過して中枢神経系組織内に浸潤し、炎症を惹起することにより発症が規定されていると考えられている(自己免疫機序)。一卵性双生児の研究より、MS 発症には何らかの遺伝的因子と環境因子の相互作用が関与していると考えられている。しかし現在まで MS 特異的自己抗原や遺伝子は同定されていない。従って治療は抗炎症・抗浮腫薬である副腎皮質ステロイドの投与が主体であり、また再発抑制のため免疫調節薬イ

インターフェロンベータ(IFN β)が併用されるが、未だ特効薬はない。MSの病態は均一ではなく、臨床経過から再発・寛解型(relapsing-remitting MS; RRMS)・2次進行型(secondary progressive MS; SPMS)・1次進行型(primary progressive MS; PPMS)に分類され、進行型MSでは軸索傷害や神経変性機序の関与が報告されており、治療に対する改善が乏しい。また病巣分布の特徴から中枢神経系全般に分布する脳型(classical form; CMS)と視神経・脊髄に限局する視神経脊髄型(opticospinal form; OSMS)に分類される。さらに治療反応性からIFN β responder とIFN β nonresponder に分類される。このように多彩な病態を呈するMSの分子細胞生物学的基盤は明らかにされていない。

遺伝子アレイ(gene expression array)は細胞における数千・数万種類の遺伝子の発現パターンを一回の実験で短時間に包括的・網羅的・系統的に解析出来るという利点を有する。本研究ではDNA microarrayを用いてMSの分子免疫遺伝学的全体像の把握を試みた。すなわちMSおよび健常者の末梢血T細胞における遺伝子発現プロファイルを比較解析し、クラスター解析(hierarchical clustering)に基づき特異的遺伝子発現パターンを示すMSサブグループ(subgroup)を同定して、その分子遺伝学的特徴(gene expression signature)を明らかにし、臨床的パラメーターとの対応を試みた。

B. 研究方法

McDonald診断基準を満たす74例のactive MS (55 women, 19 men; the mean age 36.4 ± 10.7 ; the mean EDSS 2.8 ± 2.1)を対象とした。MS群は北大、北祐会病院、埼玉医大、順天堂大、東京女子医大、東京医科歯科大、国立精神・神経センター武蔵病院の神経内科を受診しエ

ントリーされたMS患者(罹病期間 8.0 ± 5.6 年)で、66例のRRMSと8例のSPMSから構成され、エントリー時点でIFN β 治療(開始予定)群47例とIFN β 未治療(継続予定)群27例である。CMSが59例で、OSMSを含むnon-CMSが15例である。原則として発症から2年以上経過し、過去2年間およびエントリー後2年間の臨床情報が得られる症例を対象とし、全例文書によるinformed consentを得た。また22名の健常者(control subjects; 16 women, 6 men; the mean age 38.6 ± 12.3)をCN群とした。

末梢血リンパ球(peripheral blood mononuclear cells; PBMC)からAutoMACSを用いてCD3⁺T細胞を分離、RNAを抽出・増幅してcDNA作成時にCy5でラベルした。また上記以外の健常者3名のRNAからCy3ラベルcDNAを作成しuniversal referenceとし、1,258 cDNA microarray (Hitachi Life Science)上で競合的hybridizationを行って蛍光強度を測定し、規準化(global normalization)後にCyber-T (regularized t) testでMS群versus CN群間で有意な発現差異を認めた遺伝子(significant genes)を同定した。さらに抽出した遺伝子群を指標に、standard x standard algorithmに基づきクラスター解析を行い、特異なgene expression signatureを呈するMS subgroupを同定した。またsubgroupと臨床的パラメーター(病型・罹病期間・MRI病巣分布・IFN β 治療前後2年間の再発回数・IVMP日数・通院日数・EDSS・MRI-T2病巣数・IFN β 治療に対する患者満足度・副作用)との対応を試みた。さらに上記の臨床的パラメーターをスコア化(R/NR score)し、IFN β 治療群を反応性に基づいてresponder R: (+6)-(+3), undetermined U: (-2)-(0), nonresponder NR: (-1)-(-6)に分類し、R特異的gene expression patternを探索した。

C. 研究結果

#1. MS と CN の両群間で T 細胞の 173 遺伝子が有意な発現差異を示し、MS で 25 遺伝子が発現上昇、148 遺伝子が発現低下を呈した。両群間で発現差異を認めた遺伝子のうち、統計学的有意差 p value 上位 30 遺伝子を抽出すると、25 遺伝子が apoptosis 関連遺伝子であった (apoptosis signaling-related genes)。MS における proapoptotic genes (TRAIL, DAXX) と antiapoptotic gene (BAG1) の発現低下を認め、両者の拮抗的バランス状態 (counterbalance) と考えられた。また 4 遺伝子が DNA integrity すなわち DNA repair, replication, recombination, chromatin remodeling 制御関連遺伝子であり、これらは MS で発現低下しており、DNA and chromatin instability の存在が示唆された。

#2. 両群間で有意な発現差異を認めた遺伝子群 (significant genes) を指標にしたクラスター解析で、MS 群は CN 群から独立したクラスターを形成した。さらに MS 群は NC に最も近い gene expression signature を呈する A 群、NC から最も遠い gene expression signature を呈する D 群、および A と D の中間に位置する B 群、C 群の 4 subgroups に区分された。C 群は病巣が脳だけに限局する (CBR only) 症例が最も多く、B 群はエントリー前の再発回数・IVMP 日数・通算入院日数が最も多く、臨床的に活動性が非常に高い (most active MS) と考えられた。

#3. MS IFN β 治療群では 19 例が R (4.2 ± 0.9)、13 例が U (0.6 ± 0.9)、7 例が NR (-1.9 ± 1.5) に分類された。R/NR score 平均値は A 群が最も高く (2.5 ± 2.3)、D 群が最も低かった (-0.3 ± 4.0)。また D 群は最も罹病期間が長く EDSS も高値で、治療開始前 MRI T2 病巣数も多く、患者の IFN β 治療に対する満足度も低かった。A 群では IFN β

治療後に MRI T2 病巣数増加が抑制されていた。

エントリー後の 2 年間の途中で MS IFN β 治療群 8 例、未治療群 2 例が脱落 (dropout) した。IFN β 治療群 3 例は skin lesion, 1 例は depression, 1 例は amenorrhea, 1 例は severe relapse で治療継続不能となった。IFN β 治療群では 29 例 (61.7%) で treatment-related side effects を認め、そのうち 6 例は skin lesion, 4 例は depression を呈した。

IFN β 治療 3 ヶ月、6 ヶ月後に R と NR において ISG15, IFI27, IRF7, MX1 などの interferon-responsive genes (IRG) の発現上昇を認めたが、R, NR 間で経時的発現レベルの変化に差異が見られた。

D. 考察

遺伝子アレイの臨床医学における応用は多岐にわたり、特に乳癌や悪性リンパ腫などの予後の予見に有用なことが報告されている。また MS 病理組織を用いて病巣活動性に関連した特徴的な遺伝子発現プロファイルが観察されている。さらに最近欧米の研究グループにより MS IFN β 治療効果関連遺伝子の同定が試みられている。しかしほとんどの研究では症例数が極めて少なく、T 細胞を分離せずに PBMC 全体から RNA を抽出しており、結果の解釈が難しく、再現性が疑わしい。

本研究では DNA microarray を用いて、多数の MS および NC の末梢血 T 細胞における遺伝子発現プロファイルを比較解析し、両者で発現差異を認める遺伝子群 (significant genes) を明らかにし、MS における apoptosis, DNA integrity 関連遺伝子の発現異常を見出した。すなわち MS では常時 exogenous or endogenous DNA damaging stresses に暴露されている可能性がある。次に significant genes を指標にクラスター解析を行い、特異的遺伝子

発現パターンを示す MS subgroup A, B, C, D を同定した。A 群は NC に最も近い gene expression signature を呈し、IFN β 治療の有効性が高く、治療後 MRI 病巣数増加の抑制を認めた。B 群は clinically most active MS であるが、A 群に次ぐ IFN β 治療有効性を示した。一方 C 群には MRI 病巣分布が脳に限局する(CBR only)症例が集積しており、D 群は病期が長く病巣数が多く EDSS も高値であり、IFN β 治療反応性が低く、治療後に十分な患者満足度を得られなかった。すなわち D 群においては軸索障害や神経変性による不可逆的神経学的後遺症の存在が示唆される。

E. 結論

DNA microarray による末梢血 T 細胞遺伝子発現プロファイル解析およびクラスター解析により、MS は gene expression signature に基づく 4 subgroup A, B, C, D に分類され、各グループでは MRI 病巣分布や IFN β 治療反応性などの臨床的パラメーターとの対応が見られた。本研究の結果から治療前に A, B 群の gene expression signature を呈する患者において、IFN β 治療を開始することが推奨される。今後は症例数を増やしてサブグループ分類の再現性を確認し、各群に分類された患者の追跡調査(prospective study)、および副作用関連遺伝子発現プロファイルの同定が重要な課題となる。

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.