

4系T細胞とCD8系T細胞に分け、さらに、PE標識ケモカインレセプター抗体(CCR5、CCR3)を用いて測定した。なお、ケモカインレセプターの解析には、RR-MS 20例(男女比 3:17、平均年齢 39.3歳)とHC 20例(男女比 8:12、平均年齢 37.3歳)を対象とした。

さらに、臨床症候として、①性、②年齢、③家族内発生、④初発症状、⑤罹病期間、⑥再発回数、⑦主な病巣部位、⑧重症度(EDSS)、⑨ステロイド服用の有無を用いた。

なお、統計学的検討は Mann-Whitney's U-test を用いた。

研究結果

1) リンパ球サブセットの解析

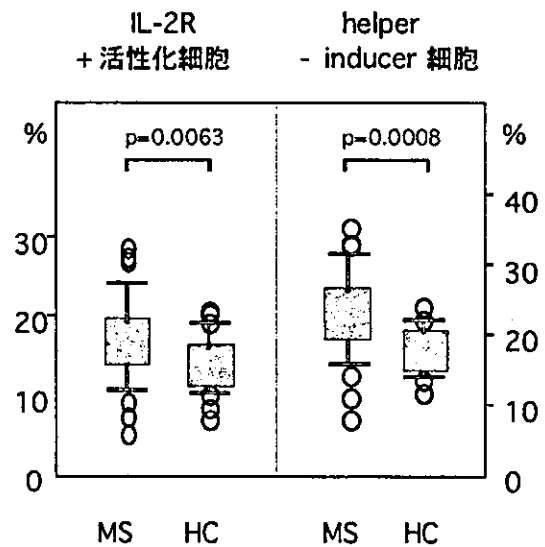
RR-MS と HC との比較では、CD4系T細胞において RR-MS の CD25⁺、HLA-DR⁺ 活性化 CD4 細胞は $17.1 \pm 5.4\%$ 、 $7.7 \pm 3.3\%$ であり、HC の $13.6 \pm 3.5\%$ 、 $5.6 \pm 1.9\%$ と比べ有意の高値を示した(各々、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.01$)。さらに、CD29⁺ (helper-inducer) 細胞は RR-MS で $22.8 \pm 6.0\%$ 、HC の $17.7 \pm 3.2\%$ と比べ有意の高値を示した($p < 0.0005$)。一方、CD45RA⁺ (suppressor-inducer) 細胞は RR-MS $21.3 \pm 9.1\%$ で HC と比べ有意差を示さなかった。

CD8系T細胞において、CD25⁺、HLA-DR⁺ の活性化 CD8 細胞は RR-MS で $1.6 \pm 0.8\%$ 、 $13.1 \pm 8.3\%$ であり HC と比較して有意差を示さなかった。さらに、CD11b dull⁺ (suppressor-effector) 細胞は RR-MS で $3.1 \pm 2.7\%$ であり、HC の $5.6 \pm 1.8\%$ と比べ有意の低値を示し($p < 0.0005$)、CD11b bright⁺ (cytotoxic or NK) 細胞は RR-MS で $5.4 \pm 3.0\%$ 、HC の $6.3 \pm 2.2\%$ と比べ有意の低値を示した($p < 0.05$)。

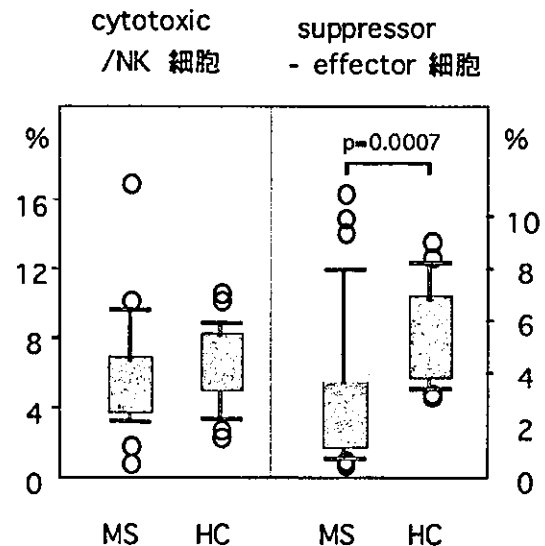
さらに、CD3⁺CD16⁺/CD56⁺ (CTL) 細胞および CD3⁺CD16⁺/CD56⁺ (NK) 細胞

図1 非活動期 RR-MS 患者の末梢血リンパ球サブセット CD4、CD8細胞

CD4系T細胞



CD8系T細胞



は、RR-MS で $3.9 \pm 2.3\%$ 、 $13.3 \pm 7.9\%$ であり HC と比較して有意差を示さなかった。

2) リンパ球ケモカインレセプターの解析

CCR5⁺細胞において、CD4⁺ (Th1) 細胞は RR-MS で $1.7 \pm 0.8\%$ であり HC の $1.0 \pm 0.6\%$ と比較し有意の高値を示した

($p=0.001$)。さらに、CD8+ (effector/memory) 細胞はRR-MSで $3.0\pm 1.8\%$ でありHCの $1.4\pm 0.8\%$ と比べ有意の高値を示した($p=0.0016$)。CCR5+細胞のCD4+/CD8+比は、RR-MSで 0.7 ± 0.4 に比較しHCで 0.8 ± 0.5 であり有意差を認めなかった。CCR5+細胞でのCD4+細胞とCD8+細胞の和は、RR-MSで $4.7\pm 1.1\%$ であり、HCの $2.4\pm 1.1\%$ と比べ有意の高値を示した($P=0.001$)。

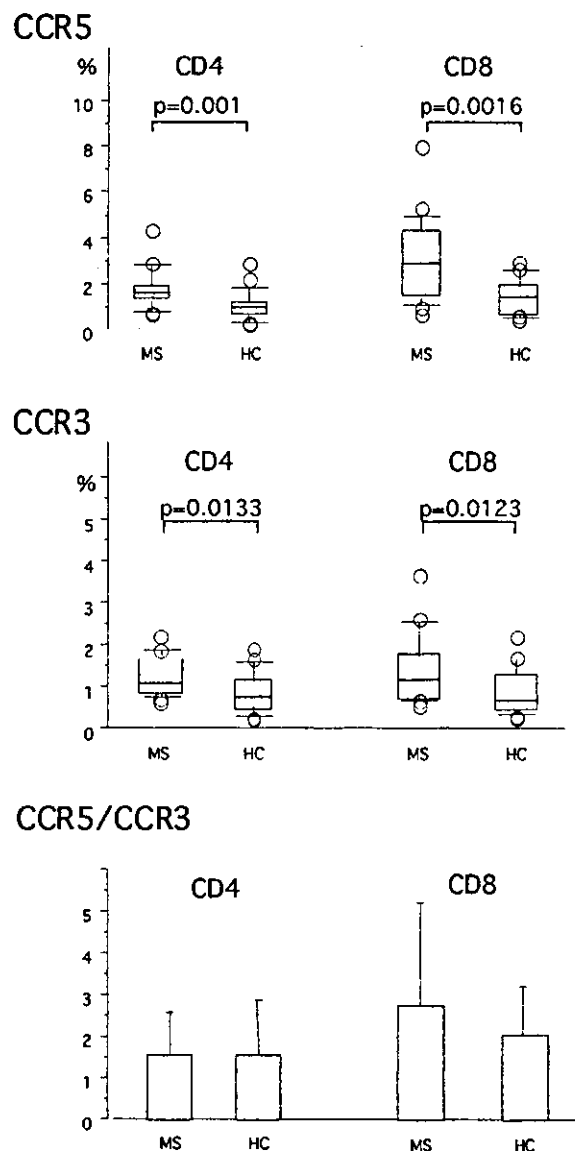
CCR3+細胞において、CD4+ (Th2) 細胞はRR-MSで $1.3\pm 0.5\%$ でありHCの $0.9\pm 0.5\%$ と比較し有意の高値を示した($p=0.013$)。さらに、CD8+細胞はRR-MSで $1.4\pm 0.8\%$ でありHCの $0.9\pm 0.5\%$ と比べ有意の高値を示した($p=0.012$)。CCR3+細胞のCD4+/CD8+比は、RR-MSで 1.1 ± 0.5 に比較しHCで 1.2 ± 0.8 であり有意差を認めなかった。CCR3+細胞でのCD4+細胞とCD8+細胞の和は、RR-MSで $2.7\pm 1.1\%$ であり、HCの $1.7\pm 0.8\%$ と比べて有意の高値を示した($P=0.001$)。

CCR5+/CCR3+比では、RR-MSでCD4+細胞のTh1/Th2比は 1.5 ± 1.0 であり、HCの 1.6 ± 1.3 と比較し有意差を示さなかった。同様にCD8+細胞のCCR5+/CCR3+比(Tc1/Tc2比)はRR-MSで 2.7 ± 2.5 であり、HCの 2.0 ± 1.2 と比較し有意差を示さなかった。

3) リンパ球ケモカインレセプターCCR5+、CCR3+細胞と臨床症候との比較

MSの主な病巣部位ならびに重症度(EDSS)とケモカインレセプターとの関連について表2に示した。Tc1(CD8+CCR5+)細胞の陽性率と脊髄病巣を有するMS(脊髄のみ、脊髄と他病巣の混合病変を有するMS)でHCに比較し高値傾向を示したが、有意な相関ではなかった。また、重症度(EDSS)との比較では、いずれも有意な相関はなかつ

図2 非活動期RR-MS患者の末梢血リンパ球ケモカインレセプターの解析



た。しかし、EDSS 4以上の重症群ではTc1(CD8+CCR5+)細胞の陽性率は高値を示したが、有意な相関ではなかった。その他、性差、年齢、家族内発生、初発症状、罹病期間、再発回数、ステロイド治療の有無についてそれぞれ検討したが、いずれの症候においても有意差を認めなかった。

表1. RR-MS非活動期における末梢血リンパ球ケモカインレセプターと臨床症候

		Th1	Th2	Tc1	Tc2	(%)
病巣部位		(健常対照) 1.00	0.86	1.43	0.86	
大 脳	(n=1)	1.05	0.72	0.63	1.63	
視神経脊髄	(n=1)	1.85	1.74	2.88	1.85	
脊 髄	(n=4)	2.20	1.15	3.68	1.81	P<0.1
混合型	(n=14)	1.48	1.34	2.65	1.35	
EDSS		Th1	Th2	Tc1	Tc2	(%)
3.5以下	(n=12)	1.62	1.20	2.60	1.37	
4.0以上	(n=8)	1.80	1.35	3.53	1.44	

考 案

RR-MS 非活動期の末梢血リンパ球サブセットの解析により、CD 4系の活性化T細胞、helper-inducer 細胞は高値を示し、CD 8系の suppressor-effector 細胞、cytotoxic or NK 細胞は低値を認めた 1)。既に、MS 活動期においては活性化 CD 4細胞、Helper-inducer 細胞が高値を示し 2)、CD 8系 T細胞ならびに NK 細胞は低値を示すことが知られている 3)。今回の検討では、非活動期においても既に免疫状態の異常を認め、CD 4系のみならず CD 8系抑制 T細胞の異常が示された 1)。

さらに、ケモカインレセプターの解析では、CD 4系細胞の Th 1 / Th 2 比、CD 8系細胞の effector / memor 比はともに高値を示したが、CD 4系細胞の CCR 5 + / CCR 3 比である Th 1 / Th 2 バランス、CD 8系細胞の CCR 5 + / CCR 3 比である Tc 1 / Tc 2 バランスにはいずれも異常がなかった。従来末梢血ケモカインレセプター解析の報告では、CCR 5 +、CXCR 3 +細胞の上昇、CCR 3 +細胞に変化のないことから、MS 活動期では Th 1 優位とされている 4)、5)。

我々の検討では、非活動期では Th 1 / Th 2 バランスには異常がなく、CCR 5 ・ CCR

3のケモカインレセプターの表出はともに HC に比べ高値を認めており、既に RR-MS の非活動期においてケモカインに対しても免疫応答が過剰に反応しやすい状態にあることが示唆された。

また、ケモカインレセプターの表出と各種の臨床症候との検討では、いずれの症候とに有意な相関を認めなかった。脊髄のみに病巣を認める MS では、他の部位に病巣を有する MS に比較して Tc 1 細胞が高値を示す傾向を認めたが、明らかな相関はなかった。

今後、さらにケモカイン、ケモカインレセプターの両面から MS 患者のリンパ球解析を試みる必要がある。

結 語

MS 非活動期において末梢血リンパ球の Th 1 / Th 2 バランスは HC と比較し有意差をみとめなかったが、ケモカインレセプター (CCR 5、CCR 3) の表出は CD 4細胞、CD 8細胞のいずれも高値を示した。MS の活動期のみならず非活動期においても、MS 患者の末梢血リンパ球は既に免疫賦活状態にあることが示唆された。

文献

- 1) 木下俊介ら：多発性硬化症の非活動期におけるCD8系抑制T細胞. 神経免疫学 7: 62-63, 1999
- 2) Calopa M et al. : T cell subsets in multiple sclerosis : a serial study. Acta Neurol Scand 92: 361-368, 1995
- 3) Oksaranta O et al. : T-cell subpopulations in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with multiple sclerosis. a follow-up study. Neurology 47: 1542-1545, 1996
- 4) Strunk T et al. : Increased numbers of CCR5+ interferon- γ and tumor necrosis factor- α -secreting T lymphocytes in multiple sclerosis. Ann Neurol 47: 269-273, 2000
- 5) Misu T et al. : Chemokine receptor expression on T cells in blood and cerebrospinal fluid at relapse and remission of multiple sclerosis: imbalance of Th1/Th2-associated chemokine signaling. J Neuroimmunol 114: 207-212, 2001

健康危険情報

なし

研究発表

I 論文発表

原著

1. 野村恭一、高砂子由佳子、木下俊介、三井隆男、富岳 亮、島津邦男：慢性期ラクナ梗塞患者のリンパ球接着分子（LFA-1・VLA-4）、血管内皮細胞接着分子（ICAM-1・VCAM-1）の発現および血清サイトカインに対するIbuprofenの作用、脳卒中（印刷中）2004
2. Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Miyake S,

Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T and Yamamura T: Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. Neurobiology of Disease 2004 (in press)

3. 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. Journal of Neuroimmunology 2004 (in press)

4. Murakami S, Misumi M, Sakata H, Hirayama R, Kubojima Y, Nomura K and Ban S: Churg-Strauss syndrome manifesting as perforation of the small intestine, Surg Today 34:788-792 2004

5. 長島陽子、飯高 誠、野村恭一、土田哲也：高プロラクチン血症および高サイロトロピン血症を有する患者に生じた全身に及ぶ網状皮斑、足指潰瘍と多発性単神経炎、皮膚科の臨床 45 (13) 1713-1718, 2003

総説

1. 野村恭一：多発性硬化症とアフェレシス 日本アフェレシス学会雑誌 23 (3) : 227-233, 2004
2. 野村恭一：血液浄化療法、多発性硬化症-最新の基礎、臨床研究-、日本臨床 61 (8) : 1388-1395, 2003
3. 野村恭一：多発性硬化症とインフォームド・コンセント、Modern Physician 24 (12) : 1875-1881, 2004
4. 富岳 亮、野村恭一：多発性硬化症、臨床看護 30 (6) : 835-839, 2004
5. 野村恭一、島津邦男：神経疾患とステロ

イド、実地医家のためのステロイドの上手な使い方、編集 川井眞一、永井書店、p172-181、2004

II 学会発表 国際学会

1. Nomura K, Tomioka R, Kizawa H, Takahama M, Ohnuki M, Takasago Y, Mitui T and Maegawa H: Preventive and therapeutic effects of arundic acid (ONO2506) for EAN. 第7回国際神経免疫学会（ベニス）Sep 30、2004

2. Takizawa K, Tomioka R, Kinoshita S, Maegawa H and Nomura K: Arundic acid (ONO2506) prevents chronic progressive and relapsing remitting EA. 第7回国際神経免疫学会（ベニス）Oct 1、2004

国内学会

1. 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年 東京

2. 野村恭一、富岳 亮、木下俊介、高砂子由佳子、大島裕紀、滝沢功一、島津邦男：多発性硬化症の非活動期における Th1/Th2 バランス -ケモカインレセプターおよび各種サイトカインからみたバランス調節-、第16回日本神経免疫学会 2004年 東京

3. 大島裕紀、野村恭一、富岳 亮、木下俊介、滝沢功一、井口貴子、高濱美里、大貫 学、島津邦男：タクロリムス治療による重症筋無力症のサイトカインの変動、第22回日本神経治療学会総会、6月 北海道、札幌、2004

4. 三井隆男、野村恭一、大熊 彩、滝沢功一、島津邦男：ステロイドパルス療法が著効したNK細胞増多症に伴う多発根神経炎の1例、6月 北海道、札幌、2004

5. 木下俊介、富岳 亮、野村恭一、高砂子由佳子、高濱美里、滝沢功一、大島裕紀、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CCR5・CCR3陽性細胞と臨床症候。第45回日本神経学会総会、5月 東京、2004

6. 高砂子由佳子、野村恭一、木下俊介、三井隆男、富岳 亮、島津邦男：慢性期ラクナ梗塞患者のIbudilast（ケタス）による血管内皮・リンパ球接着分子の変動、第45回日本神経学会総会、5月 東京、2004

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

インターフェロン使用による多発性硬化症患者髄液組成、
アミノ酸変化の検討続報

分担研究者 横山 和正 順天堂大学医学部脳神経内科

研究要旨

インターフェロン使用による多発性硬化症患者髄液組成、アミノ酸組成、NO代謝産物濃度について、多発性硬化症の病型ごとの比較を行い、また副作用等によるインターフェロン療法中止後の再発時の変化について少数例ながら検討した。インターフェロン使用により再発時のIgG indexの低下、glutamic acidを含めたアミノ酸の変動を認めた。病的にも多発性硬化症は4タイプに分類されることから単独のマーカーの追求ではなく各種パラメーターのパターンによる効果、予後因子の判定が今後重要であると考えた。

A. 研究目的

多発性硬化症患者では中枢神経組織での免疫的な変化が髄液組成の変化を反映すると考えられている。疾患活動性、薬剤効果のマーカーとして、従来行われてきた臨床症状の把握、近年普及がめざましいMRI以外のリアルタイムに病態を反映可能となるものが望まれている。今回我々はインターフェロン使用による髄液組成の変化を多発性硬化症の様々な病型で解析し、さらにはインターフェロン中止後の再発例から髄液を得、有効な活動性、効果判定のマーカーとしての髄液成分の臨床利用について検討した。

B. 研究方法

神経系の炎症性疾患もしくは原因不明で神経症状を呈する患者に対し我々の病院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ている。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(OND: other neurological diseases)の髄液中の41種のアミノ酸分析、NO代謝産物の測定を行った。それぞれの患者の髄液細胞数、タンパク、糖、IgG index また多発性硬化症患者においてはMBP(myelin basic protein)、オリゴクローナルバンドの測定も併せて行った。順天堂大学医学部脳神経内科を受診した多発性硬化症26症例(通常型24例、視神経脊髄型2例)は説明と同意を得たのち診断確定目的もしくは重篤度の評価目的に髄液検査を行った。McDonaldの診断基準に準拠して、1次性進行型多発性硬化症患者も1名検討した。多発性硬化症の再発時の症状機能障害はKurtzkeの拡大障害状態尺度(Kurtzke Expanded Disability Status Scale: EDSS)(スコアの範囲は0-10で、スコアが高いほど機能障害が重度であることを示す)を用いて測定した。また併せ

て造影 MRI、髄液中の IgG index によって評価した。

髄液は採取したのち直ちに 1500rpm 5 分で遠心を行った。上清を採取し、直ちに氷点下-80 度にて凍結しその後一括して測定を行った。髄液におけるアミノ酸 41 種、亜硝酸、硝酸イオンの測定は過去の報告のように 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ぱ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

昨年度までに報告したように OND との比較において本年度は症例数を増やしても IgG index は多発性硬化症患者群と有意差を認めなかった。臨床型による差に関しては optico-spinal 型症例が少なく今回の報告では統計解析が不可能であった。しかしインターフェロン使用前の再発時多発性硬化症患者髄液細胞数、IgG index,

MBP は寛解期と比較して統計的に有意ではないが症例により高値を示した (fig. 1)。次にインターフェロン使用群に関して再発時髄液組成に注目すると細胞数、IgG index、MBP は、寛解時に比べて高値であるもインターフェロン未使用群に比べ低値を示していた。興味深いことに glutamic acid はインターフェロン使用後再発症例にて上昇していた。再発時 EDSS の変化はインターフェロン使用群で低下していた。また臨床病型別解析では 3 例の Classical type の慢性進行型においては IgG index は上昇しており統計的に寛解期の多発性硬化症患者と比較して有意であった (fig. 2)。副作用によるインターフェロン中止例における再発患者の髄液変化は一様ではなかった。

D. 考察

髄液内での炎症を反映するマーカーとして細胞数増多、サイトカイン増加、ベータ 2 ミクログロブリン、IgG 増加が利用されている。特に多発性硬化症での再発時の IgG index の上昇は中枢神経系内での液性免疫の亢進状態、もしくは細胞性免疫の賦化を一部反映しているためと考えられてきた。本研究におけるインターフェロン開始前後での再発時の同一患者間での IgG index の低下はインターフェロンの影響が示唆された。一方インターフェロン未使用群での再発時 MBP 上昇は視神経脊髄型のみならず通常型の症例でも認められて

おりこれは壊死性変化が視神経脊髄型のみならず通常型でも起こっていることの表れであると考え。さらにはインターフェロンを開始後再発した患者における髄液 MBP が低下する傾向があることはインターフェロンのもつ抗壊死作用も含めた pleiotrophic effect の表れであると考え。興味深いことに IgG index 上昇例に於いては、一概に MBP の上昇は認めておらずこのような症例は発生機序として oligodendrocyte の急速な壊死ではなく apoptosis が主に起こっていることが予想された。来年度は保存されている同検体を用いたサイトカインをはじめとする液性因子および apoptosis 関連蛋白の測定が重要であると思われた。今回目立った変化を見せた Glutamic acid は脳内においてカリウムの移動、アンモニアの解毒や神経伝達物質の一つとして重要な役割を示していることが明らかとなっており今回の変化の病態との直接的な意味づけは明らかではないが来年度の解明事項の一つである。今回の臨床研究においては、インターフェロン中止例では理由として鬱および高頻度の再発によるものが多かった。再発時の特徴として今までに生じたことの無かった視神経病変、劇症型となったことが明らかとなった。症例数がまだ少ないため統計的解析は困難であるが中止による中枢神経内の変化を比較するため症例の蓄積が望まれる。最後にインターフェロン効果群(responder) に関

しては再発することなく髄液検査が困難であるが、倫理的に可能であれば今後寛解期の髄液を比較することで臨床応用可能な活動性および薬剤効果マーカーの探索に役立つ可能性がある。

E. 結論

髄液検査は簡単にどこの施設でも、さらには外来でも施行可能である。しかし単独のデータそれのみではその意味するところが判定困難であり、様々な因子を経時的にパターン解析することで、活動性マーカーとしてさらには疾患、病態との関係、インターフェロン効果の指標となりうると考えられた。個々人の基礎データを長期的に比較することがその個人個人に適した治療（オーダーメイド医療）を行うための指標となることが示唆された。今後も経時的な症例の蓄積が重要である。

F. 健康危険情報

とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 第7回世界神経免疫学会 於ベニス 9/28-10/2, 2004

H.

知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案特許 なし
3. その他 なし

Fig. 1
IgG index in different type or phase of MS

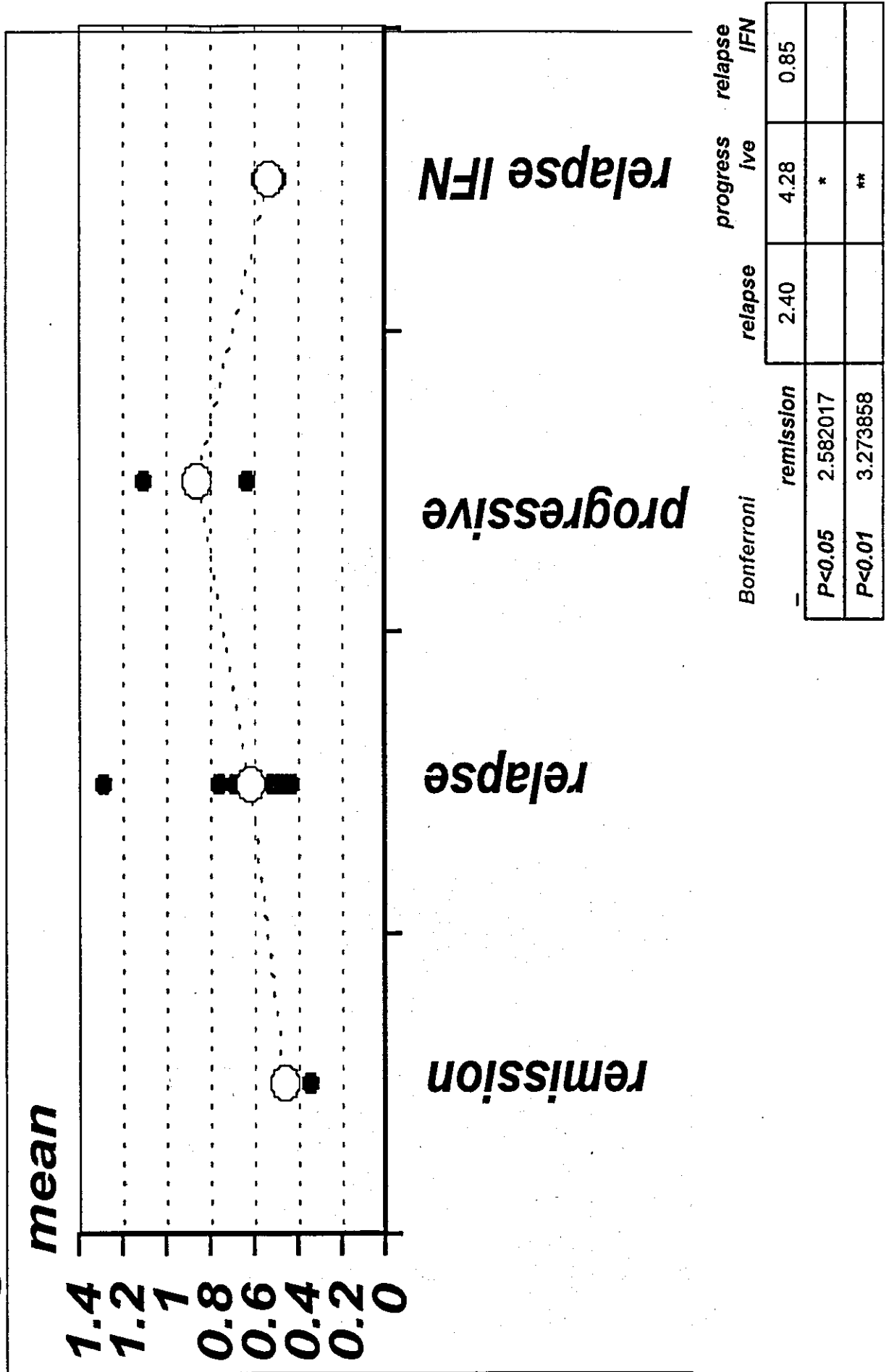
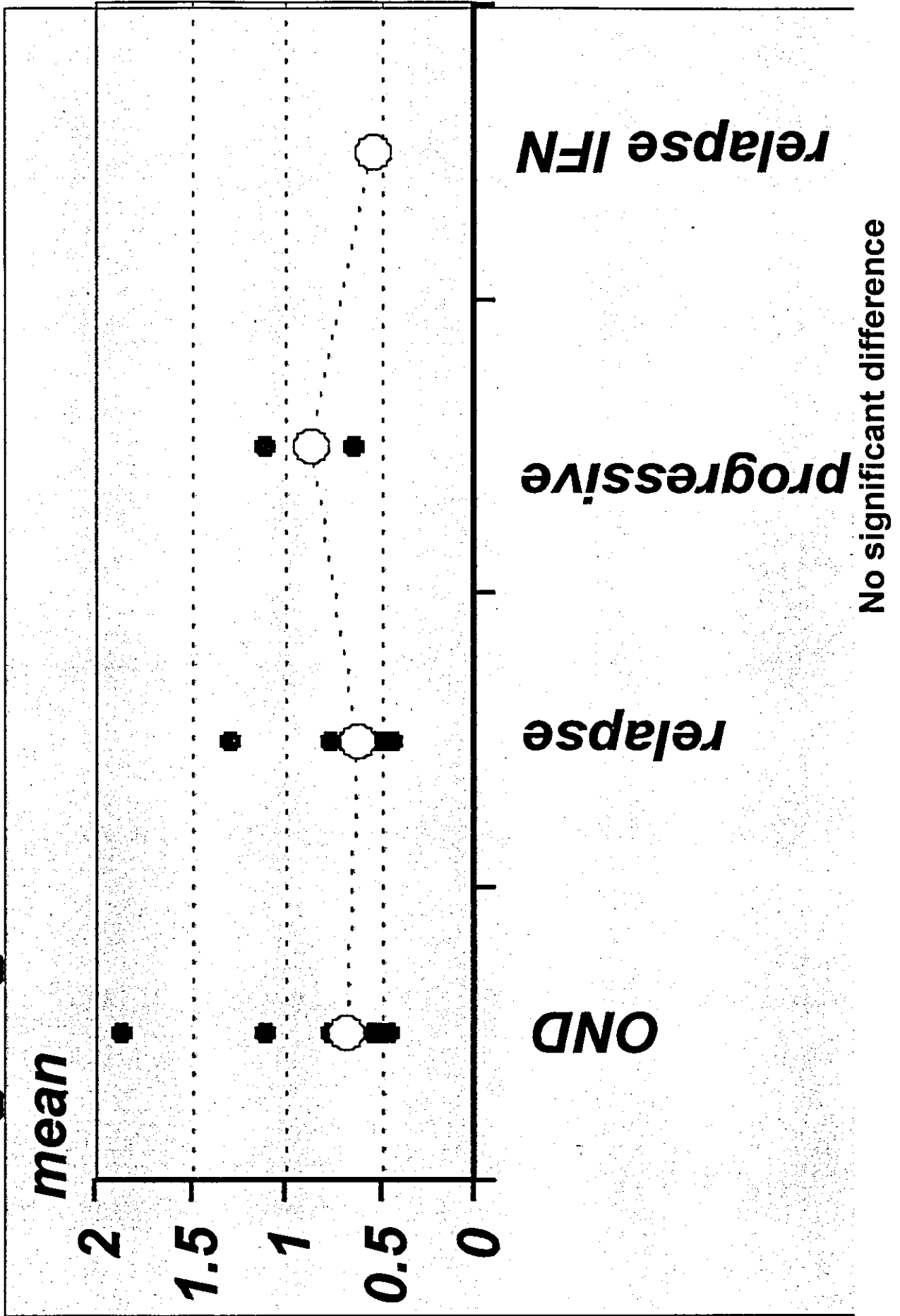


Fig.2 IgG index in OND and MS



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

「多発性硬化症の血清及び髄液中の神経髄鞘成分に対する抗体」
に関する研究

分担研究者 楠 進 近畿大学医学部神経内科教授

研究要旨

多発性硬化症（MS）の病態は、主に自己抗原特異的T細胞による中枢神経髄鞘の傷害と考えられているが、その標的抗原については明らかにされていない。また、欧米から中枢神経髄鞘蛋白に対する抗体価が上昇する症例が報告され、病態との関係について論じられているが、明確な結論には達していない。MSの臨床像や疫学は、欧米人と日本人との間には大きな差があることが知られている。本研究では、日本人のMS症例において、神経髄鞘に対する抗体を検討し、抗体の種類や抗体価と病型との相関を検証して、病態解明および診断に役立てることを目的とした。我々は2003年以降にMSと診断された30名の血清および髄液を用いて、ELISA法にてMBP、PLP、MOGの各ペプチドを抗原とした抗体価を測定した。その結果、2例のみが陽性であった。脊髄病変の再発寛解を繰り返す43歳女性例がMBP、PLP、MOGの全てに対してIgG抗体陽性であり、外転神経麻痺で発症した23歳女性例が全てに対してIgM抗体陽性であった。髄液ではすべての症例で陰性であった。現時点では、症例数が少なく病型と抗体価についての相関関係を述べるのは困難である。測定法の改良も含めて、症例数を積み重ねて解析する予定である。

A. 研究目的

多発性硬化症（MS）の病態は、主に自己抗原特異的T細胞による中枢神経髄鞘の傷害と考えられている。その標的抗原については不明の点が多いが、Myelin basic protein (MBP)、proteolipid protein (PLP)、myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)などの中枢神経髄鞘蛋白がその候補として挙げられている。一方、これらの蛋白に対する血液中、あるいは髄液中の抗体価の上昇する症例も報告されており、抗体価と病態との関係については従来から検討されているが、明確な結論には達していない。また、これらは欧米からの報告がほとんどである。MSの臨床像や疫学については、人種間で大きな差があることが知られており、欧米人と日本人では特徴は異なる。本研究では、日本人のMS症例において、神経髄鞘に対する抗体を検討し、抗体の種類や抗体価と病型との相関を検証して、病態解明および診断に役立てることを目的とする。

B. 研究方法

近畿大学医学部神経内科にて、2003年以降にMSと診断された患者30名を対象とした（病型は古典型15例、視神経脊髄型15例）。検体（血清あるいは髄液）採取は発症直後、あるいは再燃時に行った。MBP 83-99、PLP 183-199、MOG 35-55の各ペプチドを抗原とし、ELISA法を用いてIgG、およびIgM抗体価を測定した。異常値の判定は、正常コントロールのOD値の平均値+3SD以上を陽性と判定した。

C. 研究結果

2症例で血清抗体価が陽性であった。1例はMBP、PLP、MOGの全てに対してIgG抗体が陽性。他の1例は全てに対してIgM抗体が陽性であった。髄液ではすべての症例で陰性であった。

D. 考察

抗体陽性2症例のうちの1例は、脊髄病変の再発寛解を繰り返す43歳女性であった。他方は外転神経麻痺で発症した23歳女性であった。現時点では、症例数が少なく病型と抗体価についての相関関係を述べることは困難である。

E. 結論

研究目的を達成するために、測定法をさらに検討し、症例数を積み重ねて解析する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

なし

II 学会発表

なし

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

Ⅲ. 平成16年度班会議プログラム

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業

「難治性疾患の画期的診断・治療法等に関する研究」班－1

主任研究者 山村 隆

平成16年度班会議
抄 録 集

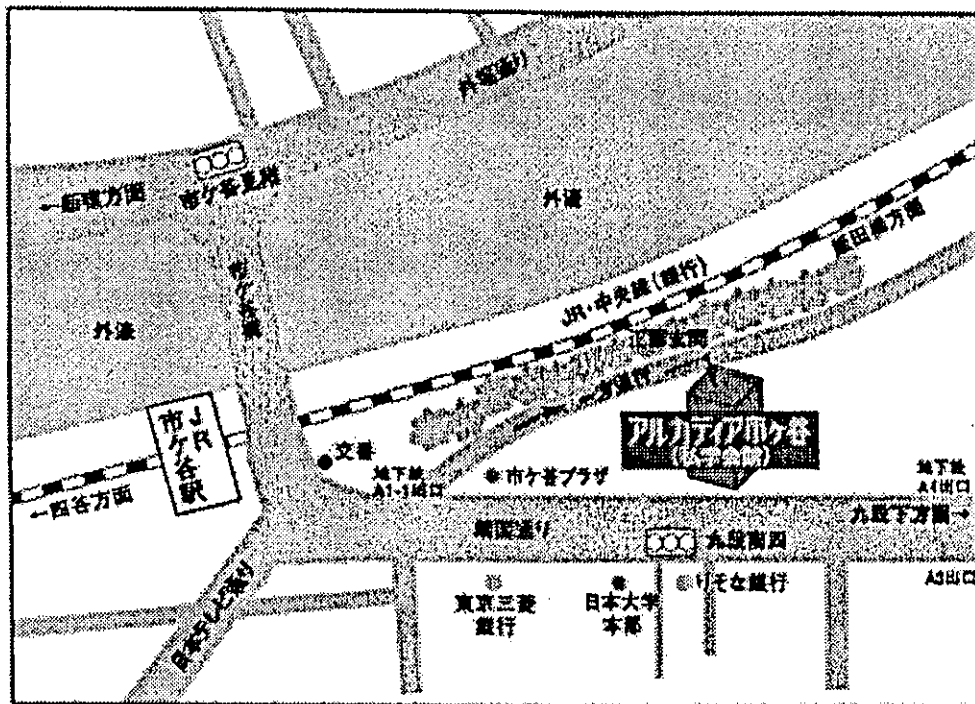
日程：平成16年12月13日（月）

13:00～16:30

場所：アルカディア市ヶ谷

住所：東京都千代田区九段北4-2-25

電話：03-3261-9921



■交通のご案内

- ☑ 地下鉄有楽町線・南北線 市ヶ谷駅A1-1出口
- ⚡ 地下鉄新宿線 市ヶ谷駅A1-1 A4出口
- JR JR中央線(緩行) 市ヶ谷駅 *各出口から徒歩約2分

■所在地

〒102-0073 東京都千代田区九段北4-2-25
 TEL:03-3261-9921 FAX:03-3261-9931

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業

「難治性疾患の画期的診断・治療法に関する研究」班

主任研究者 山村 隆

平成 16 年 12 月 13 日 (月)

アルカディア市ヶ谷 4F 鳳凰 (東) 13:00~16:30

電話 : 03-3261-9921

プログラム

13:00-13:05 開会の辞

国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第六部 山村 隆

13:05-14:00 特別講演 : Scientific basis of MS therapy

Harvard 大学医学部准教授

Samia Khoury 博士

14 : 00-15 : 00 MS 関連病態の DNA マイクロアレイ解析 座長 : 三宅 幸子

1. 末梢血 T 細胞の DNA microarray 解析による多発性硬化症の病型分類と
インターフェロンベータ治療反応性

国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 佐藤 準一 他 (24 分)

2. IFN β による培養脳毛細血管由来内皮細胞の MMPs 及び MMP 関連遺伝子
発現変化の検討

山口大学医学部脳神経病態学神経内科 神田 隆 他 (12 分)

3. 自己免疫疾患早期診断アレイに関する研究

国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 三宅幸子 (12 分)

14 : 48-15 : 00 コーヒーブレイク

15:00-15:40 MS 病態の基礎研究

座長 : 佐藤 準一

1. 多発性硬化症患者における TRAIL および TRAIL レセプター遺伝子多型の検討
北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野 菊地誠志 他 (16分)
 2. インターフェロン使用による多発性硬化症髄液組成、アミノ酸変化の検討続報
順天堂大学医学部脳神経内科 横山和正 (12分)
 3. 多発性硬化症の血清及び髄液中の神経髄鞘成分に対する抗体の検討
近畿大学医学部神経内科 楠 進 他 (12分)
-

15:40-16:25 MSの臨床とインターフェロン療法 座長：野村 恭一

1. インターフェロン β -1b療法の外來導入に関する検討
東京理科大学理学部教養 太田 宏平 他 (15分)
2. 多発性硬化症インターフェロン・ベータ療法ドロップアウト例の検討
国立病院機構東埼玉病院 神経内科 川井 充 他 (15分)
3. アジアにおける多発性硬化症(以下MS)の特徴と疾患分類・診断の問題点—新たな診断基準(McDonald 2001)における「除外基準」の妥当性を中心に—
北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野 菊地誠志 他 (15分)

16:25 閉会の辞

末梢血 T 細胞の DNA microarray 解析による多発性硬化症の病型分類とインターフェロンベータ治療反応性

○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

目的

多発性硬化症(multiple sclerosis; 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。MS は臨床経過から relapsing-remitting (RR), secondary progressive (SP), primary progressive (PP), 病巣分布から conventional (CMS), opticospinal (OSMS), 治療反応性から interferon-beta (IFN β) responder, nonresponder に分類され、病理学的に T 細胞浸潤、抗体・補体沈着、oligodendrocyte apoptosis, axonal degeneration など多様な病理所見を呈する。このように多彩な MS の病態の全てを Th1 bias に基づき説明するのは困難であり、non-Th1/Th2 遺伝子群の発現制御異常が MS 病態を修飾している可能性がある。本研究では MS 多様性 (variability, heterogeneity) の分子遺伝学的基盤を解明するため、MS 患者末梢血 T リンパ球の遺伝子発現プロファイルを DNA microarray を用いて包括的・網羅的・系統的に解析する。

方法

Informed consent を得た IFN β 未治療 clinically active MS72名(65 RRMS, 7 SPMS; 55 women, 17 men; the mean age 36.1 \pm 10.3)と健常者 22 名 (healthy controls; CN, 16 women, 6 men; the mean age 38.6 \pm 12.3)の末梢血リンパ球より、autoMACS で CD3⁺ T 細胞を精製、RNA を抽出・増幅して cDNA 作成時に Cy5 で標識した[1]。別の健常者 3 名の pooled cDNA を Cy3 で標識し universal reference とし、1,258 cDNA microarray (Hitachi Life Science)上で競合的 hybridization を行い蛍光強度を測定、global normalization 後に Bayesian t test により MS vs CN で有意な発現差異を認めた遺伝子群を同定した。これを指標遺伝子(discriminator genes)として GeneSpring 上で standard x standard algorithm に従いクラスター解析と主成分解析(principal component analysis; PCA)を行った。また MS46 名では 2 年間の IFN β -1b 治療を開始し、3 ヶ月後と 6 ヶ月後に採血し(26 名は IFN β 治療を行わずに 2 年間追跡した)、IFN β 治療導入前後 2 年間の再発回数・ステロイドパルス日数・入院日数・Expanded Disability Status Scale (EDSS) score・MRI 病巣数・患者満足度を 3 ランクに分け点数化し、合計点が+6 から+3 を responder, -1 から-6 を nonresponder, 中間を undetermined と定義した。

結果

IFN β 未治療 MS72 名と CN22 名の間で発現差異を呈した 286 遺伝子を指標とするクラスター解析で、MS 患者は CN から独立した A, B, C, D 4 群に分類され、また 286 遺伝子は 1-5 群(class #1-#5)に分類された。一方 CD3⁺ non-T 細胞におけるクラスター解析では明確な MS subgroup 化は認めなかった。MS では class #1-#4 の 203 遺伝子は発現低下し、class #5 の 78 遺伝子が発現上昇していた。A 群が最も CN に近い遺伝子発現プロファイルを呈し、D 群が最も EDSS score が高値で、C 群には大脳限局病変(cerebrum only)を示す患者が集中していた。また B 群は CCL3, CXCL9 など chemokine 遺伝子を多く含む class #5 遺伝子の発現レベルが最も高く、再発回数・入院日数・ステロイドパルス日数の点で、最も活動性が高い患者が集積していた。また IFN β responder は A, B 群各 57.1%, C 群 18.2%, D 群 0%と、A, B 群に集積

し、治療3-6ヶ月の時点でIFN 応答遺伝子群(IFN-responsive genes, IRGs: ISG15, IFI27, MCP-1, TNFRp75)の高発現が保持される傾向(persistent induction)を示したが、nonresponder では3ヶ月で上昇していたレベルが6ヶ月に低下する seesaw pattern を呈した(Fig. 1)。

考察

遺伝子アレイは臨床所見や画像のみでは鑑別困難な疾患の補助診断のツールとして、また腫瘍の悪性度など予後の予測、種々の疾患の薬物反応性の予測による治療計画の適正化、治療効果の判定、副作用の予測などに幅広い臨床応用が可能である。今回我々はDNA microarrayを用いて、IFNβ未治療MS 72名とCN 22名のCD3⁺ T細胞の遺伝子発現プロファイルを比較解析し、両群で286遺伝子の有意な発現差異を認めた。そのtop 30遺伝子はapoptosis 関連遺伝子群であった(a counterbalance between proapoptotic and antiapoptotic genes)[2]。T細胞の286遺伝子を指標とするクラスター解析で、MSが4群に分類されたことは、MS発症における自己反応性CD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞の中心的な役割を支持する。

結論

DNA microarrayによるT細胞の遺伝子発現プロファイル解析は、多様な病態を呈するMSを4群に分類し、それぞれ疾患活動性・病巣分布・IFNβ治療反応性との密接な関連を認めた。

文献

- (1) Koike F et al. J Neuroimmunol 139: 109-118, 2003.
- (2) Satoh J-I et al. Neurobiol Dis 2004, in press.

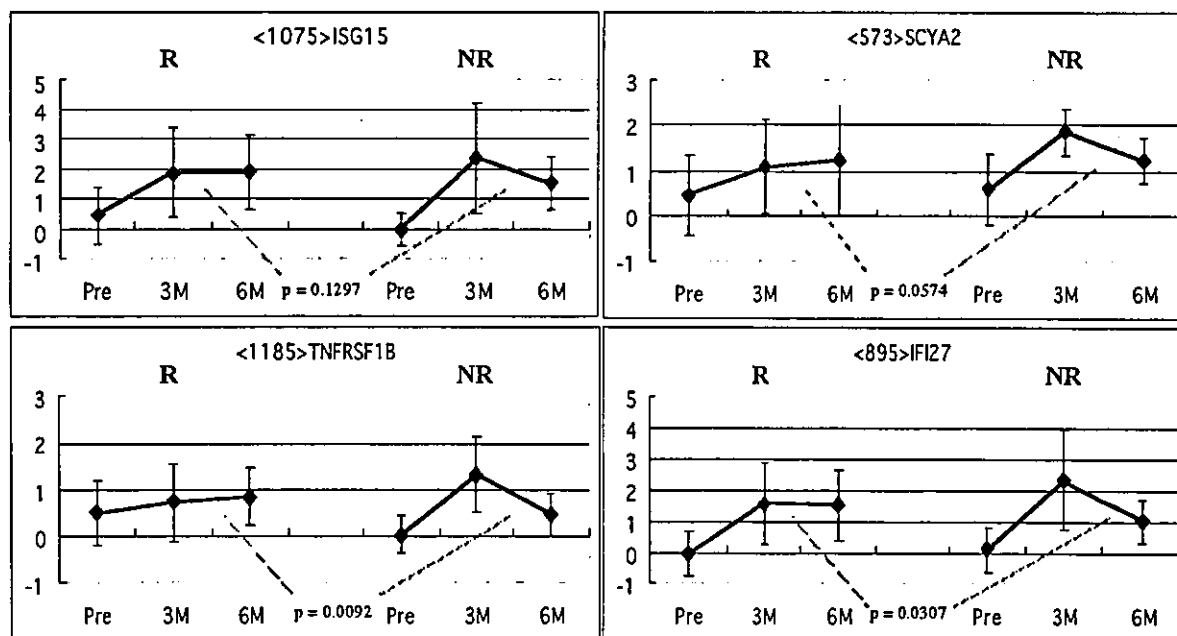


Fig. 1. The temporal profile of induction of IFN-responsive genes in IFNβ responders (R) and nonresponders (NR) during IFNβ treatment.

IFN β による培養脳毛細血管由来内皮細胞の MMPs 及び MMP 関連遺伝子発現変化の検討

分担研究者 山口大学医学部脳神経病態学神経内科 神田 隆

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

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細胞接着因子(CAM, cell adhesion molecule)、chemokine, chemokine receptor が重要な役割を果たすが、近年これらの調節因子として matrix metalloproteinases (MMPs)およびその関連分子が注目されている。

今回の検討では BBB における、MMPs, chemokine, chemokine receptor, CAMs 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。

方法

1) 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。内皮細胞の同定は抗 von Willebrand 因子と DiI-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。

2) 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 $^{\circ}$ C、14 時間でハイブリダイゼーションを行った。測定は Affimetrix 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 MMPs、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。

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、MMP-1,