

図1 a) 野生型 B6 マウス, b) IL-4 KO, c) IFN- γ KO の各々のマウスに MOG ペプチドで EAE を感作し, α -GC (100 μ g/kg) を感作当日に腹腔内投与した。野生型マウスでは α -GC は対照群と差は認めなかった(a)。しかし IL-4 KO では α -GC 投与により EAE の増悪が見られ(b), IFN- γ KO では逆に EAE が抑制された(c)。

我々は NKT 細胞のリガンドとして α -GC が発見されてから、その MS 治療薬としての可能性に興味を持ち、まず α -GC を用いて EAE に及ぼす影響を検討した。

α -GC の単回投与により野生型 B6 マウスでは、早期に血清中 IL-4 および IFN- γ 濃度の著しい上昇がみられた。NKT ノックアウトマウス(NKT KO)では、これらの上昇は観察されないことから、急速なサイトカイン上昇は NKT 細胞の α -GC による活性化を反映していることが示唆された。そこで、B6 マウスに MOG₃₃₋₅₅ ペプチドにて EAE を誘導し、 α -GC 100 μ g/kg を MOG 感作直後に腹腔内投与した。しかし、EAE の臨床症状については対照群と治療群で有意差を認めなかった(図 1a)。つまり、 α -GC で NKT 細胞を活性化しても、EAE 修飾効果は確認されなかったわけである。この結果に対する一つの解釈として、 α -GC 刺激により NKT 細胞が Th1 サイトカイン(IFN- γ)と Th2 サイトカイン(IL-4)の双方を機能的に等価になるように産生するため両者の効果が相殺し、EAE の病態に正、負いずれの効果も及ぼさないのではないかと考えた⁹⁾。

■ サイトカインノックアウトマウスによる解析

前述の仮説を検証するために、IFN- γ を産生出来ない IFN- γ ノックアウトマウス(IFN- γ KO)と IL-4 産生が出来ない IL-4 ノックアウトマウス(IL-4 KO)を用いて解析した。

これらのマウスに同様に EAE を誘導し、 α -GC を投与

したところ、IL-4 KO では EAE の増悪が見られ、IFN- γ KO では逆に EAE が軽減した(図 1b, 1c)⁹⁾。IL-4 KO の NKT 細胞は IFN- γ 産生能を保ち、IFN- γ KO では IL-4 産生能が保たれているので、NKT 細胞活性化に伴う IFN- γ または IL-4 産生が EAE を修飾していることが推測された。

すなわち、野生型マウスの NKT 細胞は、 α -GC 刺激により互いに拮抗する IFN- γ と IL-4 の両方を産生するため治療効果が得られないが、KO では拮抗するサイトカインが産生されないために、増悪または抑制

効果が得られるものと考えた。

糖脂質リガンドによる新たな治療の試み

■ α -GC による治療の試み

I 型糖尿病のモデルである NOD マウスでは、 α -GC 投与によって症状が有意に軽減することが明らかになっている^{10,11)}。しかし EAE においては、前述したように通常の α -GC 投与では病状を抑制することはできない。そこで α -GC の投与方法を工夫した。我々は、TCR の副刺激経路の 1 つである B7.2(CD 86) を選択的に阻害する抗体の存在下で α -GC を与えると、NKT 細胞の IL-4 産生は誘導されるが IFN- γ 産生が誘導されず、免疫バランスは Th2 にシフトすることを発見していた。そこで、この抗体と α -GC を組み合わせてパルスした抗原提示細胞を投与したところ、EAE は抑制され治療効果を認めた^{9,12)}。しかし、この方法を臨床に応用するには困難な点が多く、現実的な治療法ではないと考えた。

別のグループは、EAE の感作時にアジュバントに α -GC を混ぜ、数回にわたって注射したところ、対象群に対して EAE 症状が有意に軽減したと報告している^{13,14)}。しかし、この方法も臨床応用は困難である。

■ 新しい合成糖脂質の開発

以上の結果を踏まえると、NKT 細胞に対して選択的に IL-4 を産生させるような糖脂質リガンドがあれば、EAE を抑制することが可能であると考えられる。我々は臨床応

用を考えた場合、 α -GCとは全く異なる新規の糖脂質リガンドを見出すことがより現実的であると判断し、その開発に着手した。まず α -GCの構造をベースに数多くのアナログ糖脂質を合成した。そして各々の機能を解析した結果、 α -GCのスフィンゴシン鎖を短くしたOCH(図2a)が我々の求めるような性質を持つことが明らかになった¹⁵⁾。

B6マウスに α -GCを投与した場合は血清中のIL-4だけでなくIFN- γ も上昇するが、OCHを投与するとIL-4がより選択的に上昇する(図2b)。血清サイトカインの上昇はNKT KOではみられないことから、OCHの作用はNKT細胞を介するものであることがわかった。つぎに、EAEへの治療効果を調べた。その結果、感作時にOCHを1回経口投与するだけでEAEは強く抑制され(図3a)、EAE症状の発症直後から投与を開始しても、有効であることがわかった。また、OCH投与群では抗MOG₃₅₋₅₅ IgG1が選択的に上昇していた。IgG1抗体の上昇はTh2細胞活性優位を反映することから、OCH投与によって自己免疫応答がTh2にシフトしていることがわかった。さらに、IL-4 KOを使った実験ではOCHによるEAEの効果は見られないことから(図3c)、OCHのEAE抑制にはIL-4が重要な役割を果たしていることが明らかになった。OCHが選択的なIL-4産生を誘導する機序については現段階では明らかではないが、抗原提示細胞にコンタクトするスフィンゴシン鎖が短くなっているため結合が不安定となり、シグナルの伝達に何らかの影響を及ぼしている可能性を考えている。

今後の展望、臨床応用に向けて

このようにOCHは α -GCと質的に異なる活性を示す新しい合成糖脂質である。マウスとヒトのNKT細胞は同

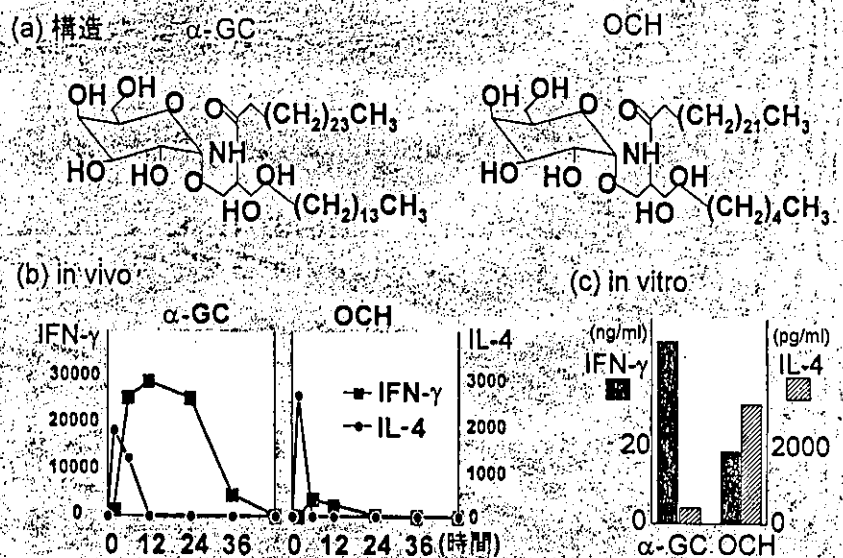


図2 新規合成糖脂質 OCH

a) 構造: OCHは α -GCのスフィンゴシン鎖を短縮した合成糖脂質である。
 b) in vivoでの評価: B6マウスに α -GCまたはOCHを100 μ g/kg投与した後、血液を経時的に採取し、血清中サイトカインをELISA法にて定量した。 α -GCはIFN- γ とIL-4をともに上昇させるが、OCHはIL-4上昇を選択的に誘導する。
 c) in vitroでの評価: 脾細胞を糖脂質リガンドと共培養したところ、 α -GCはIFN- γ 優位にサイトカイン産生を促したのに対し、OCHのサイトカイン産生パターンはIFN- γ よりもIL-4が優位であった。

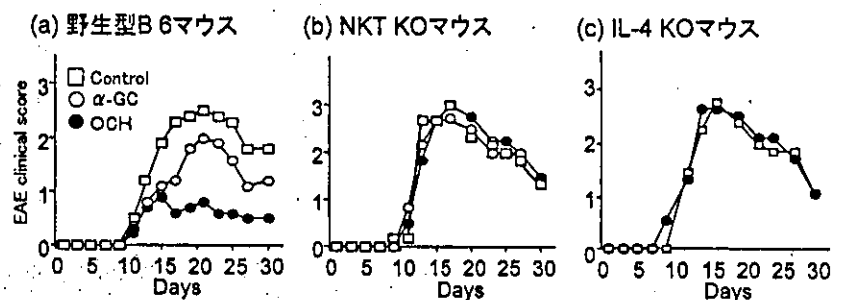


図3 OCH投与によるEAE抑制効果

B6マウスにMOG₃₅₋₅₅ペプチド(100 μ g)を用いてEAEを誘導し、EAE感作当日に α -GCおよびOCH(400 μ g/kg)を経口投与した。臨床症状は次のスケールに基づいた(0:正常, 1:尾のトーンス低下, 2:尾の完全下垂, 3:歩行異常, 4:後肢完全脱力, 5:前肢脱力を含む後肢完全脱力, 6:死亡)。OCHはEAE症状を有意に抑制した(a)。しかしNKT KOマウスでは効果が解除された(b)。またIL-4 KOマウスを用いた場合にもOCHの効果は解除された(c)。この結果からOCHはNKT細胞を介して作用しており、EAEの抑制にはIL-4が必須であることが明らかになった。

じ糖脂質リガンドに反応するため、OCHはヒトのNKT細胞にも同様に反応する可能性が高い。実際in vitro実験において、OCHはヒトのNKT細胞に対してもマウスと同様のTh2シフトを誘導する結果が得られている(投稿準備中)。糖脂質はペプチド治療の際に問題となる抗原提示

分子の多型性を考慮する必要がない。よって1種類の糖脂質がすべての患者に同様の治療効果を発揮するものと考えられる。さらにOCHは経口投与が有効である点も評価される。副作用面でも、マウスを用いた検証では目立ったものは認められず、OCHと構造が類似した α -GCが臨床試験で大きな問題を生じていないことなどからも、臨床応用

が十分可能と考えられる。以上より、OCHはMSの新たな治療薬として大変有望である。またOCHは慢性関節リウマチのモデル動物でも明らかな治療効果があり¹⁶⁾、MSのみならずTh1自己免疫病全般の新しい治療薬となることが期待される。

文 献

- 1) Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 297-329.
- 2) Lehuen A, Lantz O, Beaudoin L, et al. Overexpression on natural killer T cells protects $V\alpha$ 14- $J\alpha$ 281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J Exp Med* 1998; 188: 1831-9.
- 3) Illes Zs, Kondo T, Newcombe J, et al. Differential expression of natural killer T cell $V\alpha$ 24 $J\alpha$ Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol* 2000; 164: 4375-81.
- 4) Wilson SB, Kent SC, Patton KT, et al. Extreme Th1 bias of invariant $V\alpha$ 24 $J\alpha$ Q T-cells in type 1 diabetes. *Nature* 1998; 391: 177-81.
- 5) Zhang B, Yamamura T, Kondo T, et al. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer(NK) cells. *J Exp Med* 1997; 186: 1677-87.
- 6) 山村 隆, 張 本寧. NK, NKT細胞による自己免疫性脳炎の制御. *Annual Review 免疫* 1999. 中外医学社; 1998. p.300-6.
- 7) Kawano T, Cui J, Koezuka Y, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of $V\alpha$ 14 NKT cells by glycosyl ceramides. *Science* 1997; 278: 1626-9.
- 8) Araki M, Kondo T, Gumperz JE, et al. Th2 bias of CD4⁺NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol* 2003; 15: 279-88.
- 9) Pal E, Tabira T, Kawano T, et al. Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of $V\alpha$ 14 NK T cells. *J Immunol* 2001; 166: 662-8.
- 10) Hong S, Wilson MT, Serizawa I, et al. Natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* 2001; 7: 1052-6.
- 11) Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, et al. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat Med* 2001; 7: 1057-62.
- 12) 宮本勝一, 山村 隆. 糖脂質によるNKT細胞活性化を介した実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の治療. *医学のあゆみ 別冊 21世紀の神経免疫学*. 2001. p. 63-6.
- 13) Singh AK, Wilson MT, Hong S, et al. Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2001; 194: 1801-11.
- 14) Jahng AW, Maricic I, Pedersen B, et al. Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2001; 194: 1789-99.
- 15) Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 bias of natural killer T cells. *Nature* 2001; 413: 531-4.
- 16) Chiba A, Oki S, Miyamoto K, et al. Suppression of collagen-induced arthritis by natural killer T cell activation with OCH, a sphingosine-truncated analog of alpha-galactosylceramide. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 305-13.

多発性硬化症のDNAマイクロアレイ解析

山村 隆 (国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部長)

● はじめに

多発性硬化症(multiple sclerosis:MS)は、遺伝因子と外来因子(ウイルス感染など)が複雑にからみあって発症する自己免疫疾患である。MSの病像は極めて多彩であるが、その本態に迫るような分子レベルの解析はなかなか進まなかった。その理由の1つとして、従来技術的な制限からMSに関係のありそうな分子だけを個別に解析してきたことが挙げられる。1つのプロジェクトで解析するのは、多くても10~20種類の免疫関連分子というのが一般的であり、これではMSの部分的な断面は明らかにできても、その全体像に迫るのは困難であったと言えよう。しかし近年、ヒトの全遺伝子配列が決定され、多数の遺伝子の発現情報を短時間で解析するDNAマイクロアレイの技術が確立した¹⁾。DNAマイクロアレイ(遺伝子アレイ)は、数千から数万種類に及ぶ遺伝子を、それぞれ極小のスポットとしてスライドガラスに貼り付けたものである(図)。患者検体から分離・調製したRNAを蛍光標識し、これをアレイに反応させることにより、それぞれのサンプルにおける遺伝子発現情報プロファイルを明らかにできる。個々のサンプルあたり膨大な情報が得られるが、それを処理するコンピュータソフトが開発されており、複雑な統計解析やクラスタ解析が可能になった。

このような技術革新を背景に、MSの研究にも変化がみられる

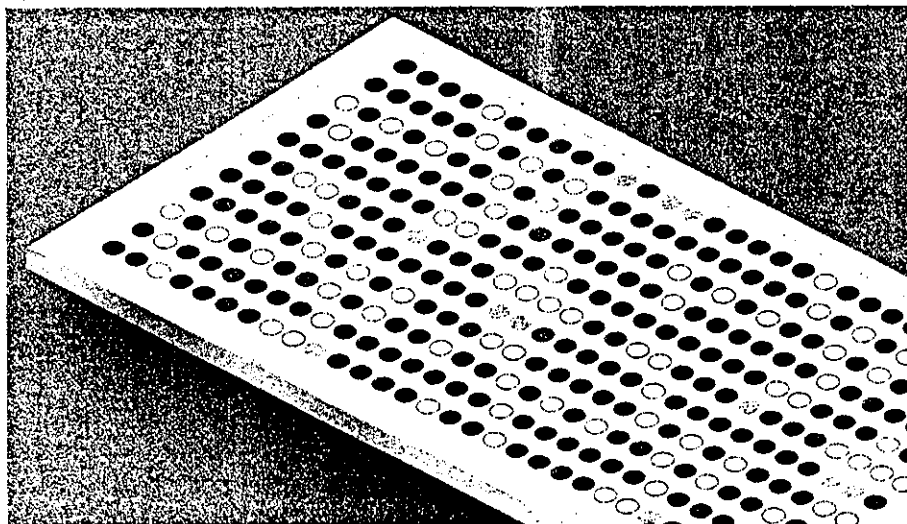
ようになった。すなわち、従来のように作業仮説を立てて、それを検証するというアプローチではなく、先入観なく個々のサンプルの遺伝子発現パターンをDNAマイクロアレイで解析し、そのデータを基に何か新しい事実を発見しようという方法論が徐々に広がりつつある^{2,3)}。

マイクロアレイに搭載する遺伝子の種類に応じて、cDNAを搭載したマイクロアレイ(cDNAアレイ)とオリゴヌクレオチドを使ったマイクロアレイ(オリゴチップ)があるが、技術改良が進んでおり、今後低価格でさらに高品質のアレイが利用できるようになると期待される。そうすれば、研究室だけでなく臨床の現場にも広く普及するであろう。

● DNAマイクロアレイを利用したMS研究

これまでに発表された論文では、MSの脳病変を解析した研究と末梢血を解析した研究がある。Lockら⁴⁾は、4例のMS患者剖検脳と対照の剖検脳の組織をマイクロアレイで比較し、MSで発現が亢進または低下している遺伝子を同定した。発現が亢進している遺伝子には、細胞間接着分子、MHCクラスII分子など、炎症病態に関係している分子が含まれていた。この結果はMSが炎症性免疫疾患であることを裏付ける。また、glial fibrillary acidic protein(GFAP)のようなグリオシス関連分子も亢進していた

図 DNAマイクロアレイのイメージ



遺伝子チップとも呼ばれることからわかるように、個々のマイクロアレイには、膨大な種類の遺伝子(千~3万種類)が高密度でスポットされている。サンプルから分離したRNAを蛍光標識してアレイに反応させると、サンプルにおける発現量に応じて異なる蛍光を発するようになる。この情報をコンピュータで解析することにより遺伝子発現プロファイルが明らかになる。

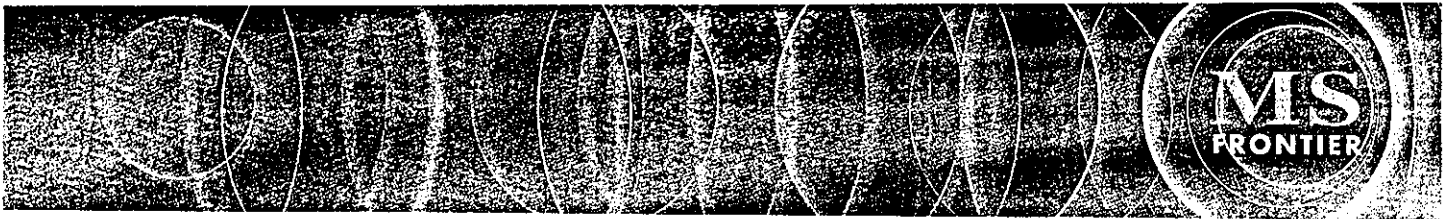


表1 インターフェロン治療によって誘導されるインターフェロン反応性遺伝子⁵⁾

インターフェロン反応性遺伝子	T細胞	非T細胞
IFN regulatory factor 7A (IRF7)	亢進	亢進
IFN-induced 15-kDa protein (ISG15)	亢進	亢進
IFN α -inducible cDNA 6-16 (IFI6-16)	亢進	亢進
IFN-induced 56-kDa protein (IFI56)	亢進	亢進
IFN-induced protein 60 (IFI60)	亢進	
IFN-induced protein 17 (IFI17)		亢進
ATP-binding cassette transporter TAP1 (TAP1)		亢進
TNF α -induced protein 6 (TNFAIP6)		亢進
monokine induced by IFN- γ (MIG)	低下	

インターフェロン治療開始前に比べて、治療開始3カ月後、または6カ月後に有意な変動を示した遺伝子の一部を示す。いずれもプロモーター領域に、特徴的な配列(interferon responsive element)を有する遺伝子であった。

が、ミエリンの構成蛋白や神経細胞に特徴的な分子は低下していた。これはMSに特徴的な病理像(グリオーシス、脱髄、軸索変性)に対応していると思われる。また、MSの急性炎症病変と慢性病変を比較し、granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)の発現が急性病変において亢進していることを示した。彼らはさらに、G-CSFをMSの動物モデルである実験的自己免疫性脳炎(experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE)を発症しているマウスに投与し、この治療が症状を軽快させることを確認した。したがって、G-CSFは炎症を制御するために発現が亢進しているものと推測している。このスタンフォード大学グループの研究成果は、DNAマイクロアレイで病変の遺伝子発現を調べることによって、新しい治療薬(治療物質)を発見できる可能性を示唆し、広く注目されることとなった。

われわれの研究グループは患者末梢血のリンパ球をT細胞と非T細胞に分離し、それぞれの遺伝子発現を解析している。まず手始めにインターフェロン(IFN)- β 治療開始前、開始後3カ月、6カ月のMS患者サンプルを解析し⁵⁾、IFN- β の薬効に関係する遺伝子の同定を試みた。その結果、解析した遺伝子の約2%で治療開始後にT細胞または非T細胞で有意な変化がみられた。注目されるのは、IFN治療によって発現の変化した遺伝子の多くが、プロモーター領域にIFNに対する反応性を裏付ける特徴的な配列

表2 MS研究におけるDNAマイクロアレイの貢献

●分子病態の解明 MS病変で起こっている分子変化の解明 MSの本態の解明
●新しい治療標的の発見 ⁴⁾ MS病変の解析結果に基づき有効分子または治療標的分子の同定
●治療薬の作用機構の解明 ³⁾ 治療薬投与後の遺伝子解析による作用機構解明
●MSの病型分類 T細胞クラスター解析によるMS亜分類
●治療薬に対する反応性予測システムの確立 治療開始前の遺伝子発現と治療効果の対比による治療法決定システムの開発

(interferon responsive element)を有していたことである(表1)。この結果は、DNAマイクロアレイ解析の信頼性を支持するとともに、機能の明らかでないIFN反応性遺伝子のなかに、薬効に関連するものが含まれている可能性を示唆する。

● DNAマイクロアレイ解析の応用分野と今後の発展

誌面の関係で要点のみを表2にまとめるが、マイクロアレイによる遺伝子発現情報をコンピュータ解析することによって、類似したサンプル(症例)をグループ分けすることが可能である。この方法(クラスター解析)によれば、MSをT細胞の分子発現によって細分類できる(論文投稿中)。また治療開始前の遺伝子発現情報と治療開始後の有効性を解析することによって、治療薬に対する反応性をあらかじめ予測するシステムを開発できる可能性がある。もし開発に成功すれば、MSの診断や最適の治療法を選ぶための一次検査として発展するものと期待され、われわれはその目標に向かって研究を進めている。

〈文献〉

- 1) Schena M et al : *Science* 270 : 467-470, 1995
- 2) Dymont DA et al : *N Engl J Med* 347 : 1445-1447, 2002
- 3) Lock C et al : *Trends Mol Med* 9 : 535-541, 2003
- 4) Lock C et al : *Nat Med* 8 : 500-508, 2002
- 5) Koike F et al : *J Neuroimmunol* 139 : 109-118, 2003

<特集Ⅱ 疾患モデルにおける最新の知見>

自己免疫性脳脊髄炎

佐藤 準一

Recent Advances in EAE Research

Jun-ichi Satoh

Abstract

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a unique animal model of the human inflammatory demyelinating disease, multiple sclerosis (MS). EAE has been regarded as a prototype Th1 lymphocyte-mediated disease. However, recent evidence showed that EAE is mediated not simply by a Th1-biased immune mechanism, but involves more complex mechanisms, including a Th2-induced allergic response for exacerbation, a counterbalance between autoreactive Th1 cells and regulatory cells for remission and induction of tolerance, and neurodegeneration for axonal damage. Regulatory cells are composed of a wide range of cell types such as Th2, Th3, Tr1, CD4⁺CD25⁺ T, NK, and NKT cells, most of which produce substantial amounts of IL-4, IL-10, and TGFβ at the site of inflammatory lesions and mediate bystander suppression. However, recent studies on cytokine-knockout mice do not always support antiinflammatory roles of these cytokines. Epitope spreading observed in both T and B cells represents the central mechanism responsible for relapse. Recently, various approaches have been taken for treatment of EAE, including DNA vaccination, neurotrophic factors, transplantation of neural stem cells, neuroendocrine hormones, statins, and sodium channel blockers. Since these approaches are designed to reduce inflammation and enhance remyelination and axonal regeneration, they are also invaluable for development of a multidisciplinary intervention in MS.

Key words : epitope spreading; knockout mouse; neural stem cells; regulatory cells; Th1/Th2 cytokines

1. はじめに

実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) は中枢神経系 (central nervous system; CNS) 髄鞘に含まれる脳炎惹起性抗原を特異的に認識する class II MHC 拘束性 CD4 陽性 I 型ヘルパー T (Th1) 細胞により誘導される。例外的には class I MHC 拘束性 CD8 陽性 T 細胞¹⁾ や II 型ヘルパー T (Th2) 細胞による誘導²⁾ も報告されている。EAE は病理学的には炎症性脱髄 (inflammatory demyelination) を主徴とし、多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) の病態解明・治療法開発の上で重要な動物モデルとなる³⁾。Th1 細胞は炎症性サイトカイン IFNγ, TNFα を産生して炎症増幅に働くと考えられている。近年 EAE の寛解や寛容誘導のメカニズムに関して、自己反応性 Th1 細胞を制御する調節性細

胞 (regulatory cells) の存在が注目されている。調節性細胞には IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 を産生する Th2 細胞の他に、III 型ヘルパー T (Th3) 細胞, I 型調節性 T (Tr1) 細胞, CD4⁺CD25⁺ T 細胞⁴⁾, natural killer (NK) 細胞, NKT 細胞, Qa-1-restricted CD8⁺ T 細胞⁵⁾ が知られており, CD4⁺CD25⁺ T, Th3, Tr1 は IL-10 や TGFβ を, NK は IL-5 を, NKT は IL-4 を産生して Th1 細胞の機能を抑制する。また各種免疫応答制御分子の knockout (KO) マウスの解析やマイクロアレイによる遺伝子発現の包括的解析が進み, EAE 発症機構に関する新知見が集積されている。さらに新しい治療として再生医学的アプローチもなされている。本稿では EAE 研究における最近の話題をできる限り幅広く取り上げて解説する。

2. 脳炎惹起性自己抗原に関する話題:

胸腺内発現・分子相同性・TCR トランスジェニック マウス・エピトープ拡散

EAEはMHC class II遺伝子に連鎖した特定の遺伝的背景を有する動物を脳炎惹起性抗原エピトープを含むペプチドとアジュバントで感作した時に発症を惹起できる。CFA などのアジュバントは抗原提示細胞 (antigen-presenting cells; APC) のIL-12産生を増強する。APC上のToll-like receptor TLR9を刺激するCpG oligonucleotideもアジュバント様作用を示す⁶⁾。抗原感作時には blood-brain barrier (BBB) 透過性を高める百日咳毒素 (pertussis toxin; PT) の投与を併用する。マウスではMHC class II抗原 H-2u,s,q,kの系統がMBP, PLPに高感受性で、H-2b,dの系統は抵抗性を示す。SJL/J (H-2s) マウスはMBP 89-101とPLP 139-151, PL/J (H-2u) マウスとB10.PL (H-2u) マウスはMBP Ac1-11, C57BL/6 (H-2b) マウスはMOG 35-55の感作でEAEを惹起できる。SJL/J マウスでは再発性経過を呈し C57BL/6 マウスでは慢性進行性経過を示す。最近マイクロアレイ解析により、EAE発症によりマウス脊髄で発現変動を呈した51遺伝子が既知のEAE感受性遺伝子座に連鎖していることが示された⁷⁾。

近年MOG, MBP, S100 β などの脳炎惹起性自己抗原は胸腺(上皮細胞)で発現していることが明らかになった⁸⁾。しかしEAEにおける胸腺の自己反応性T細胞選択機構、すなわち中枢性寛容 (central tolerance) の意義は十分解明されていない。SJL/J マウスでは脊髄ホモジネートで感作時にはPLP 139-151特異的T細胞の出現頻度が高い (dominant epitope と呼ぶ)。SJL/J マウスの胸腺ではDM20 (PLPの116-150部分を欠くPLPバリエーション) が高発現しており、PLP 139-151反応性T細胞は陰性選択 (negative selection) を受けない⁹⁾。Lewis ラットはMBP 68-88がdominant epitopeであるが、アストロサイトの細胞質に豊富に含まれるカルシウム結合蛋白質S100 β に特異的なT細胞によりpanencephalitis型EAEを発症する¹⁰⁾。このラットではS100 β に対する中枢性寛容は成立していない。Dark Agouti (DA) ラットはMOG 74-90 (ESIGEGKVALRIQNVRFSD~~EG~~)による感作でEAEを発症する。ミルク蛋白質 butyrophilin (BTN) のIg domainはMOGの細胞外Ig-like domainと分子相同性 (molecular mimicry) を示す。DAラットをBTN 74-90 (DHIAEGSVAVRIQEYKASDDG)で感作するとEAEを惹起できる¹¹⁾。一方C57BL/6マウスにBTN 1-115を投与

するとMOGによるEAEの惹起を抑制できる¹²⁾。SJL/JマウスをMBPと分子相同性を示すミルク蛋白質BSA 193-204で感作するとEAEを惹起できる¹³⁾。MS患者髄液中にBTN 76-100特異的抗体が検出されている¹⁴⁾。

また近年数種類の自然発症EAEモデルが開発された。GovermanらはB10.PLバックグラウンドでMBP 1-11特異的T細胞のT cell receptor (TCR) トランスジェニック (transgenic; Tg) マウスを樹立した¹⁵⁾。このマウスはPT投与単独でEAEを発症し、specific pathogen-free (SPF) 外の環境下で飼育時にEAEを自然発症し、感染をトリガーとする自己反応性T細胞の活性化が考えられた。Lafailleらはrecombination-activating gene(RAG)-1 KOバックグラウンドでMBP 1-9特異的T細胞のTCR Tgマウスを作成したところ全例EAEを自然発症し、RAG-1 KOバックグラウンドを導入しないマウスではMBP特異的CD4⁺CD25⁺ regulatory T細胞を介して発症が抑制された^{16,17)}。MadsenらはMS感受性遺伝子HLA-DR2とMS患者由来MBP 84-102特異的T細胞のTCRを組み込んだヒト化double Tgマウスを作成し、RAG-2 KOバックグラウンドを導入したところ全例EAEを自然発症した¹⁸⁾。WalderらはSJL/JバックグラウンドでPLP 139-151特異的脳炎惹起性および非惹起性T細胞クローンのTCR Tgマウスを樹立した¹⁹⁾。このマウスはSPF下の飼育で高頻度EAEを自然発症したが、脳炎非惹起性T細胞から樹立したTgマウスの方が発症率が高かった。BettelliらはC56BL/6バックグラウンドでMOG 35-55特異的T細胞のTCR Tgマウスを作成したが、このマウスはSPF下の飼育で視神経炎を自然発症し²⁰⁾、アジアに多い視神経脊髄炎型MSの病態解明に役立つ可能性がある。さらに最近PerchelletらはC3HバックグラウンドでMBP 79-87特異的脳炎惹起性CD8陽性T細胞のTCR Tgマウスを作成し、MBP KOバックグラウンドを導入して解析した。TCRにhigh affinityを示すCD8陽性T細胞がlow affinityを示すT細胞とAPCに提示されたMHC-MBP 79-87 complexを競合して、免疫寛容誘導を阻止することが示された²¹⁾。

EAEでは再発を繰り返す毎に、T細胞が反応する脳炎惹起性抗原のエピトープの種類が増加し、エピトープ拡散 (epitope spreading) と呼ばれている²²⁾。SJL/JマウスをPLP 139-151で感作すると初回のattackはPLP 139-151特異的T細胞により誘導されるが、2回目以降のattackではPLP 178-191 (intramolecular epitope spreading) やMBP 84-101 (intermolecular epitope spreading) に反応す

るT細胞が出現する。これらをナイーブマウスに受身移入するとEAEを惹起できる。Epitope spreadingは初回のattack以降に、CNSまたは末梢でAPCにより髄鞘崩壊産物の提示を受けて、T細胞が新規エピトープで感作されるためと考えられる。ミエリンプロテオームアレイによる解析では、epitope spreadingはB細胞による抗体産生レベルでも観察されており、再発毎に脳炎惹起性抗原に対する抗体の認識するエピトープが拡散する²³⁾。MBP, MOG, PLP, MAGのfull-length cDNAを全て含有するカクテルワクチンはepitope spreadingを抑制して再発頻度を低下させる²³⁾。T細胞のepitope spreadingはCD28-B7系の共刺激依存性で、初回のattack以降に抗B7-1 Fab抗体を投与してCD28-B7 interactionをブロックすると、epitope spreadingを阻止して再発を抑制できる²⁴⁾。また拡散するエピトープに対応する可溶性ペプチドを投与するとTh1細胞を介する免疫寛容を誘導できる²⁵⁾。このようにEAE再発においてepitope spreadingは重要なメカニズムであるが、再発機序の全てを説明できるわけではない。T細胞でのepitope spreadingが起こらないB10.PLバックグラウンドMBP 1-11特異的TCR TgマウスとSCIDマウスのF1でも再発が起こる²⁶⁾。

3. Th1/Th2 サイトカインに関する話題：

ノックアウトマウス・アレルギー・CD28/B7共刺激分子
EAEにおけるTh1, Th2 サイトカインの役割に関しては、全身投与・中和抗体投与・遺伝子導入T細胞移入・KOマウス・Tgマウスで解析されているが、投与時期・遺伝的背景・バッククロス回数の相違により必ずしも一致した結果が得られていない。またMSとEAEで効果発現が異なるサイトカインも存在する。Th1 サイトカインIFN γ はMSの臨床試験では再発を惹起したが、EAEでは抑制効果を示した。EAEはIFN γ 中和抗体投与で悪化し、IFN γ -receptor KOマウスでは重症化した²⁷⁾。MBPによるEAEに抵抗性のBALB/cバックグラウンドでもIFN γ KOマウスはEAEに感受性になる²⁸⁾。以上よりIFN γ はEAEでは発症抑制性(善玉)サイトカインと言える。一方Th1 サイトカインTNF α に関しては、TNF α 中和抗体はEAEを抑制し、TNF α Tgマウスでは炎症性脱髄を認め²⁹⁾、発症促進性(悪玉)サイトカインとされて来たが、期待に反してTNF α KOマウスではEAEが重症化した³⁰⁾。これに一致してMSにおけるsoluble TNFR-IgG fusion protein (Lenercept)投与の臨床試験でも再発増加を認め

た。一方lymphotoxin (LT α) KOマウスはEAEに対し感受性と抵抗性の両者の報告がある^{31,32)}。TGF β は全身投与でEAEを抑制し、中和抗体投与はEAEを悪化させるので、善玉サイトカインと見なされていた。しかしGFAPプロモーター制御によるTGF β TgマウスではEAEは重症化した³³⁾。

IL-12はTh1細胞の分化に必須のサイトカインで、p35, p40ヘテロダイマーで構成され、受容体IL-12R β 1/IL-12R β 2ヘテロダイマーに結合する。IL-12全身投与はEAE重症化を引き起こし、IL-12中和抗体やIL-18中和抗体³⁴⁾の投与はEAEを抑制するので、悪玉サイトカインと見なされていた。しかしIL-12 p35 KOマウスはEAEに感受性で³⁵⁾、IL-12R β 2 KOマウスではEAEは重症化した³⁶⁾。一方IL-12 p40 KOマウスはEAEに抵抗性を示す³⁵⁾。IL-23はp19, p40ヘテロダイマーで構成され、受容体IL-12R β 1/IL-23Rヘテロダイマーに結合する。IL-23 p19 KOマウスもEAEに抵抗性を示す³⁵⁾。IL-23はマクロファージ・ミクログリアや樹状細胞から産生され、マクロファージ上のIL-23レセプターを刺激してその活性化を持続させるので、EAEの炎症の場ではIL-23が主役を果すという見解もある³⁵⁾。EAE脳ではマクロファージ・ミクログリアはTh1サイトカインIL-16を産生するが、その役割は明らかではない³⁷⁾。

Th2サイトカインIL-4とIL-10に関しては、全身投与でEAE抑制に有効と無効^{38,39)}の両者の報告がある。病巣に集積するIL-4, IL-10遺伝子導入T細胞の移入では治療効果を認めている^{40,41)}。IL-4 KOマウスやIL-4 TgマウスではEAEは野生型(wild-type; WT)マウスと差異がなく^{42,43)}、EAEにおけるIL-4の役割は確立していない。さらにTh2サイトカインIL-5のKOマウスでもWTマウスと同等のEAEを発症する⁴⁴⁾。一方IL-10 KOマウスではEAEが重症化し、IL-10 TgマウスはEAEに抵抗性になるので、IL-10は善玉サイトカインであるとの見解ではほぼ一致している⁴³⁾。Osteopontin (OPN)は免疫系では主としてT細胞が産生分泌する糖蛋白質で、マクロファージのIL-12産生を促進しIL-10産生を抑制するTh1サイトカインである。OPNは活動性MS患者の血清中で増加している。OPN KOマウスではEAEは軽症化する^{45,46)}。また炎症性サイトカインIL-6のKOマウスもEAEに抵抗性を示す⁴⁷⁾。

ケモカイン(chemokine)は単球・リンパ球・好中球などの遊走を制御するサイトカインファミリーである。

CCL2 (monocyte chemoattractant protein 1; MCP-1) は CNS では主としてアストロサイトが産生する。MCP1 KO マウスとそのレセプター CCR2 の KO マウスでは、脳炎惹起性 T 細胞は誘導可能だが、単球やマクロファージの CNS への移行が抑制されており、EAE に抵抗性を示す^{48,49}。最近、脳炎惹起性 T 細胞の脳への移行を green fluorescent protein (GFP) 発現ベクターを導入して蛍光を追跡したり⁵⁰、superparamagnetic iron oxide nanoparticle でラベルして MRI を用いて生体で real time で観察可能になった⁵¹。受身移入された脳炎惹起性 T 細胞は傍胸腺リンパ節に集積し脾臓に移動後に、複数のケモカインレセプターの発現が上昇し BBB を通過して CNS へ侵入後に再活性化されることがわかった^{50,52}。マクロファージ活性化作用のある GM-CSF の KO マウスも EAE に抵抗性を示す⁵³。抗 CCL3 (macrophage inflammatory protein-1 α ; MIP-1 α) 抗体や MIP-1 α DNA ワクチン投与は EAE を抑制するので、MIP-1 α は Th1 ケモカインと考えられて来た。しかし MIP-1 α KO マウスとそのレセプター CCR5 の KO マウスでは WT と同等の EAE を発症した⁵⁴。

MS における IFN β 治療効果の発現機序は十分解明されていない。IFN β は IFN γ による class II MHC 抗原発現誘導に拮抗して APC の抗原提示能を抑制し、APC の IL-12 産生を抑制して Th1 shift を是正し、活性化自己反応性 T 細胞の BBB 通過を抑制し、抗炎症 IFN-responsive genes の発現を誘導するなど多面的作用を呈する⁵⁵。興味深いことに IFN β KO マウスでは EAE が重症化し脱髓病変が増強された⁵⁶。このマウスでは effector T 細胞の機能や Th1/Th2 サイトカインプロファイルには影響がなく、一方マクロファージ・ミクログリアが著明に活性化されて TNF α 産生が亢進していた⁵⁶。つまり肉因性 IFN β はミクログリア活性化に対して抑制作用があると考えられる。

従来 EAE は典型的 Th1 疾患と考えられて来たが、寛解期に可溶性ペプチド抗原を投与すると、Th2 response であるアナフィラキシーショックを認めることがわかった⁵⁷。Lock らは MS 急性期と慢性期の病巣における遺伝子発現プロファイルを Affimetrix GeneChip を用いて比較解析し、慢性期病巣における immunoglobulin Fc receptor γ (FcR γ) 発現レベルの上昇を認めたが、これを裏付けるように FcR γ KO マウス (Fc γ RIII と Fc ϵ RI を欠損) では EAE は軽症化した^{58,59}。このような網羅的遺伝子解析により、EAE と MS の発症機構におけるアレルギー機序

の関与が明らかになった。Th1 細胞に高発現しているヒスタミンレセプター (histamine receptor 1; H1R) の KO マウスは EAE に抵抗性を示し、H1R antagonist は EAE を抑制し、血管透過性亢進作用のある platelet activating factor (PAF) のレセプターの antagonist も EAE を抑制する^{59,60}。肥満細胞を欠損する c-kit ミュータントマウスは EAE に抵抗性を示す⁶¹。

T 細胞活性化には TCR を介するシグナル 1 と CD28 などの共刺激分子を介するシグナル 2 が必要で、シグナル 1 単独の入力では T 細胞は anergy に陥る。CD28 や活性化 T 細胞上に一過性に発現する CTLA-4 は APC 上の B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) と結合し、CD28 は活性化シグナルを CTLA-4 は抑制性シグナルを伝達する。抗 B7-1 抗体や CTLA-4-Ig の投与は EAE 発症を抑制し、抗 B7-2 抗体投与は重症化させる⁶²。一方 B7-2 KO マウスでは EAE は軽症化するので、APC に構成的に発現している B7-2 が EAE 惹起に重要との報告もある⁶³。Inducible costimulatory molecule (ICOS) は活性化 T 細胞に発現する CD28 ファミリー分子で APC 上の B7RP-1 と結合する。ICOS KO マウスは EAE に感受性が高い。一方 ICOS 結合阻止抗体を EAE 誘導期 (induction phase) に投与すると悪化し、発症期 (effector phase) に投与すると症状を軽減できる⁶⁴。また活性化 T 細胞に発現している 4-1BB (TNFRSF9/CDw137) は APC 上の 4-1BBL に結合する共刺激分子である。4-1BB 刺激抗体は活性化 T 細胞の activation-induced cell death (AICD) を誘導して EAE を抑制する⁶⁵。CD28 分子の Ig domain C'D loop を認識するモノクローナル抗体 JJ316 は superagonistic 抗体と呼ばれ⁶⁶、シグナル 1 を必要とせず CD4⁺CD25⁺ regulatory T 細胞を活性化して IL-10 産生を促し、EAE を抑制する。CD4⁺CD25⁺ regulatory T 細胞は自己反応性 T 細胞の末梢性トレランス (peripheral tolerance) を誘導する調節性 T 細胞である⁴。抗 CD25 抗体投与で EAE は重症化し、CD4⁺CD25⁺ regulatory T 細胞の受身移入は EAE を抑制するが⁶⁷、IL-10 KO マウスの CD4⁺CD25⁺ T 細胞の移入では抑制能が見られない⁶⁸。

T cell immunoglobulin mucin 3 (Tim-3) は Th1 クローンに対して作成されたモノクローナル抗体の認識する分子としてクローニングされ、Ig V-like domain と mucin-like domain を有し TIM 蛋白質ファミリーに属し、脾臓の特定の Th1 細胞に局限して発現している⁶⁹。EAE 病巣に浸潤している CD4⁺, CD8⁺ T 細胞は Tim-3 を高発現してい

る⁶⁹⁾。抗 Tim-3 抗体投与によってマクロファージ活性化が誘導され EAE は悪化するが、その機序は解明されていない⁶⁹⁾。最近 Tim-3 は抗原特異的 CD4⁺CD25⁺ regulatory T 細胞の誘導に重要であるとの報告がある⁷⁰⁾。

4. 新しい治療法に関する話題：

遺伝子治療・神経栄養因子・再生医学・

神経内分泌免疫相関・糖脂質リガンド・経口トレランス

EAE に対する主要な治療戦略を図に示す (Fig. 1)。現在まで EAE に対する遺伝子治療に関しては多数の研究が蓄積されている⁷¹⁾。最近 SJL/J マウスで PLP 139-151 plasmid DNA と IL-4 plasmid DNA の同時投与による Th2 シフトの誘導^{22,72)} や PLP 101-157 を恒常的に分泌する線維芽細胞の移植による T 細胞の anergy 誘導が報告され

た⁷³⁾。また MBP 89-101, class II MHC, TCR zeta chain cytoplasmic domain の三者を共発現する Tg マウスの T 細胞 (receptor-modified T cells; RMTc) を受身移入すると、ペプチド特異的に自己反応性 T 細胞を killing して EAE を抑制できる⁷⁴⁾。

EAE における神経栄養因子 (neurotrophic factors) の治療効果は十分検討されていない。CNTF KO マウスでは EAE が重症化し、オリゴデンドロサイト前駆細胞のアポトーシスは増加する⁷⁵⁾。CNTF 遺伝子を欠損する MS 患者では発症が早期化するとの報告もある。CNTF は全身投与では強い副作用が出現するので、髄腔内投与法が確立されれば髄鞘再生促進薬と成り得る。サル (*C. jacchus marmoset*) の MOG 誘導 EAE は最も MS に近いモデルであり、ヒト NGF を脳室内投与すると、T 細胞の

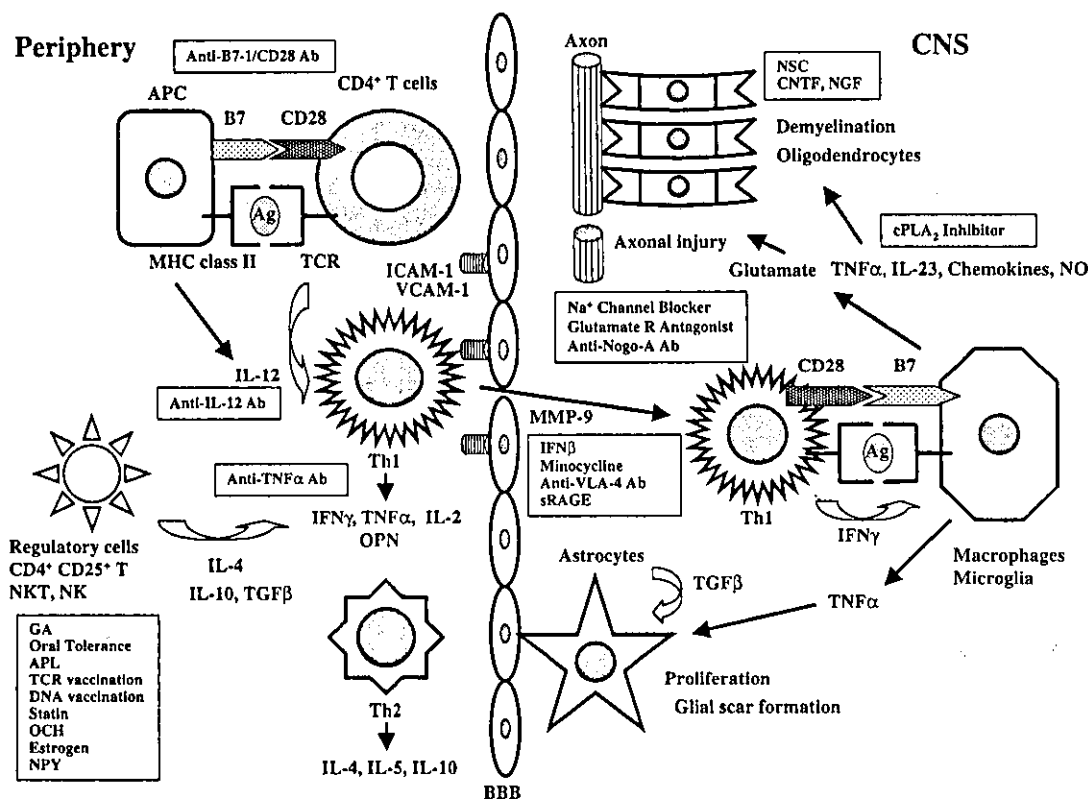


Fig. 1 Therapeutic strategy for EAE.

EAE is an autoimmune disease mediated by CD4⁺ autoreactive Th1 lymphocytes that enter the CNS passing across the BBB and produce proinflammatory cytokines such as IFN γ and TNF α . Recently, novel approaches have been taken for treatment of EAE. They are shown in the box, including DNA vaccination, neurotrophic factors, transplantation of neural stem cells, neuroendocrine hormones, statins, and sodium channel blockers, all of which are designed to reduce inflammation and enhance remyelination and axonal regeneration. Abbreviations: Ag, encephalitogenic antigen; Ab, antibody; GA, glatiramer acetate; APL, altered peptide ligands; NPY, neuropeptide Y; sRAGE, soluble form of the receptor for advanced glycation end products; NSC, neural stem cells; cPLA₂, cytosolic phospholipase A₂; NO, nitric oxide.

IFN γ 産生抑制とアストロサイトの IL-10 産生促進を介する EAE 抑制効果を認める⁷⁶⁾。またラット視神経損傷モデルでは、MBP 特異的 T 細胞を受身移入すると損傷部に移行して何らかの栄養因子を分泌し、網膜神経節細胞の生存が促進される⁷⁷⁾。つまり自己反応性 T 細胞自身が神経細胞保護 (neuroprotection) に働いている。神経幹細胞 (neural stem cells; NSC) は培養系で EGF, bFGF などの栄養因子依存性に増殖能を有し、培養条件依存性に神経細胞・グリア細胞への分化能を呈する未分化神経系細胞である。NSC は胎生・成体マウス・ラット・ヒト CNS に広く分布している。EAE 極期に NSC を脳室内・大槽内・静脈内に投与すると病巣に移動して生着し、一部はオリゴデンドロサイト前駆細胞やオリゴデンドロサイトに分化して髄鞘再生を促進し、CNTF を産生して TNF α による脱髄を防御することにより、EAE の症状軽減を認める⁷⁸⁾。NSC は VCAM-1 ligand VLA-4 を高発現しており、静脈内投与でも BBB を通過して脳内に移行し得る。肺・肝・脾・腎にも移行するが、脳外では長期的生存は見られない。EAE 発症マウス脳では subventricular zone (SVZ) の内在性 NSC が増殖して病巣へ移動し、オリゴデンドロサイトやアストロサイトに分化する⁷⁹⁾。甲状腺ホルモン T4 は NSC のオリゴデンドロサイト系への分化を促進する⁸⁰⁾。

髄鞘は Nogo-A などの軸索伸長阻害因子 (myelin-associated neurite outgrowth inhibitors) を含有しており、脱髄巣の髄鞘崩壊産物から放出されたこれらの因子は軸索再生を妨げる。ラット脊髄損傷モデルでは抗 Nogo-A 中和抗体 (IN-1) を投与すると軸索再生を顕著に促進できる。Nogo-A の細胞外ドメイン Nogo-66, myelin-associated glycoprotein (MAG), oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) の 3 者は、神経細胞上の Nogo 受容体 (Nogo receptor; NgR) に結合し、co-receptor である低親和性ニューロトロフィン受容体 p75 を介して神経突起伸長抑制のシグナルを伝達する。Nogo-A KO マウスでは EAE は軽症化し、抗 Nogo-A 抗体は EAE の発症を抑制する⁸¹⁾。

神経内分泌免疫相関 (neuro-endocrine-immune interaction) に注目した治療法も開発されている。視床下部ホルモン corticotropin-releasing factor (CRF) と urocortin は視床下部・下垂体・副腎系 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis) を介して血中グルココルチコイドレベルを上昇させ、また直接脳炎惹起性 T 細胞に作用して EAE を抑制する⁸²⁾。代謝調節ホルモンレプチン (leptin) は

Th1 サイトカインとして働き、leptin KO マウス (*ob/ob*) は EAE に抵抗性を示す⁸³⁾。EAE 発症前に血清 leptin レベルは上昇する⁸⁴⁾。飢餓は leptin レベルを低下させ、CRF を上昇させることにより EAE を抑制する⁸⁴⁾。また女性ホルモンエストロジェンは Th2 シフトを誘導して EAE を抑制する⁸⁵⁾。MS は妊娠中は軽症化すると言われている。神経系に広く高発現している neuropeptide Y (NPY) は T 細胞上の Y1 receptor に作用して Th2 シフトを誘導し EAE を抑制する⁸⁶⁾。高脂血症治療薬 HMG-CoA reductase 阻害剤 statin は MHC class II transactivator (CIITA) 発現を抑制し、Th2 シフトを誘導して EAE を抑制する⁸⁷⁾。現在 statin は MS における臨床試験が進行中で MRI 造影病巣減少を認めている⁸⁸⁾。

病巣に浸潤するリンパ球やマクロファージは興奮性アミノ酸グルタミン酸を放出して、AMPA/kainate 型受容体を発現する神経細胞やオリゴデンドロサイトに対して細胞傷害性 (glutamate excitotoxicity) を示す。グルタミン酸受容体拮抗薬は軸索傷害を軽減し、オリゴデンドロサイトの生存を促進する⁸⁹⁾。また NO などの炎症増悪因子は軸索内 Na⁺, Ca²⁺ の蓄積をもたらす。Na⁺ チャンネルブロッカー phenytoin, flecainide acetate は EAE における軸索傷害を軽減する⁹⁰⁾。また炎症性サイトカイン・ケモカインは T 細胞・マクロファージ・血管内皮細胞における cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) の発現を誘導する⁹¹⁾。cPLA₂ の選択的インヒビターであるアラキドン酸アナログ arachidonyl trifluoromethyl ketone (AACOCF₃) は、cyclooxygenase (COX) や 5-lipoxygenase (5-LO) を介する炎症増幅系を上流で遮断して EAE 発症を抑制する⁹¹⁾。Kallikrein-6 (K6) は神経細胞・オリゴデンドロサイト・リンパ球が産生するセリンプロテアーゼで神経組織破壊や BBB 透過に関与している。K6 阻止抗体は EAE 発症を抑制する⁹²⁾。また EAE, MS 病巣では receptor for advanced glycation end products (RAGE) と RAGE ligand S100 蛋白質は CD4⁺ T 細胞・マクロファージに発現しており、soluble form of RAGE (sRAGE) は RAGE-ligand interaction を阻止して NF- κ B 活性化を抑制する⁹³⁾。sRAGE は脳炎惹起性 T 細胞における VLA-4, MMP-9 の発現を抑制し、BBB 通過能を低下させ EAE 発症を抑制する⁹³⁾。テトラサイクリン系抗生物質 minocycline は T 細胞の MMP-9 産生を抑制して、BBB 通過能を低下させ EAE を抑制する⁹⁴⁾。現在 minocycline は MS における臨床試験が進行中である。

NKT 細胞は TCR と NK 細胞マーカーの両者を発現するユニークなリンパ球集団である。NKT 細胞は APC 上の CD1d 分子に結合した糖脂質を認識して、IFN γ 、IL-4 などのサイトカインを即時大量に産生し、調節性細胞として働く。NKT の認識する糖脂質抗原としては海綿由来の α -galactosylceramide (α -GalCer) が知られているが、ナチュラルリガンドは発見されていない。 α -GalCer は疎水性脂肪酸のアシル鎖とスフィンゴシン鎖を介して CD1d に結合し、親水性糖部分が TCR と結合することにより NKT 細胞の増殖とサイトカイン産生を誘導する。MS や種々の膠原病では NKT 細胞数減少を認めるので、NKT 細胞は自己免疫疾患抑制能を有すると考えられている。マウス EAE に α -GalCer を投与すると NKT 細胞を介して IFN γ と IL-4 の両者の産生を認めるため EAE は抑制できないが、 α -GalCer のスフィンゴシン鎖を短縮した変換型糖脂質リガンドの OCH を投与すると、NKT 細胞が IL-4 のみを選択的に大量に産生するようになり、EAE を抑制できる⁹⁵⁾。

経口・経気道的に投与された抗原は粘膜付属リンパ組織で認識されて、経口トレランス (oral tolerance) と呼ばれる免疫寛容を誘導する⁹⁶⁾。抗原が少量の場合は active suppression、すなわち抗原特異的に TGF β を産生する Th3 細胞や IL-10、TGF β を産生する CD4⁺CD25⁺ regulatory T 細胞を誘導し、最終的には抗原非特異的に活性化 T 細胞を抑制する (bystander suppression)。抗原が大量の場合は、抗原特異的 T 細胞クローンの無応答や CD95 (Fas) を介するアポトーシスによる除去を誘導する (clonal anergy and deletion)。経口 MBP 投与は成体マウスでは EAE を抑制するが、新生児マウスでは抗原感作に働き免疫応答を増強する⁹⁷⁾。MS における経口ウシ髄鞘抗原 300 mg 連日 1 年間投与による臨床試験では治療効果を認めなかった。本邦未承認の MS 治療薬 glatiramer acetate (GA; copolymer-1, Copaxone) はアラニン・グルタミン酸・リジン・チロシンの合成ランダムポリマー (モル比 4.2:1.4:3.4:1.0; 平均分子量 4.7~13-kDa) で構成され、APC 上の class II MHC 結合部位を MBP と競合する。GA 投与により誘導された GA 特異的 Th2 細胞は BBB を通過して CNS に入り、病巣で IL-4、IL-10 を産生して bystander suppression を呈する。また GA 経口投与により MBP に対する免疫寛容を誘導できる⁹⁸⁾。

5. おわりに

今日まで約 70 年の EAE 研究を通じて数多くの発見がなされ、自己免疫や免疫寛容の機序が解明されつつある。最近の研究の動向としては、免疫応答制御分子の KO マウスにおける EAE の解析、包括的な遺伝子発現解析や再生医学的治療法の開発である。特にゲノムの全貌が明らかにされた今日、マイクロアレイ解析やプロテオーム解析は非常に有力な研究方法であり、予期せぬ発見につながることも多い。今後も EAE 研究が進み新知見が蓄積され、新規 MS 治療薬開発につながることを切望する。

参考文献

- 1) Sun D, Whitaker JN, Huang Z, et al. Myelin antigen-specific CD8⁺ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol* 166: 7579-7587, 2001.
- 2) Lafaille JJ, Van de Keere F, Hsu AL, et al. Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease. *J Exp Med* 186: 307-312, 1997.
- 3) Steinman L: Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy. *Neuron* 24: 511-514, 1999.
- 4) Shevach EM: CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answer. *Nature Rev Immunol* 2: 389-400 2002.
- 5) Hu D, Ikizawa K, Lu L, et al. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nature Immunol* 5: 516-523, 2004.
- 6) Segal BM, Chang JT, Shevach EM: CpG oligonucleotides are potent adjuvants for the activation of autoreactive encephalitogenic T cells in vivo. *J Immunol* 164: 5683-5688, 2000.
- 7) Ibrahim SM, Mix E, Böttcher T, et al. Gene expression profiling of the nervous system in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 124: 1927-1938, 2001.
- 8) Kyewski B, Derbinski J, Gotter J, et al. Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye. *Trends Immunol* 23: 364-371, 2002.
- 9) Anderson AC, Nicholson LB, Legge KL, et al. High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naive mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire. *J Exp Med* 191: 761-770, 2000.
- 10) Kojima K, Berger T, Lassmann H, et al. Experimental autoimmune panencephalitis and uveoretinitis transferred to the Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 β molecule, a calcium binding protein of astroglia. *J Exp Med* 180: 817-829, 1994.
- 11) Stefferl A, Schubart A, Schaubart A, et al. Butyrophilin, a milk protein, modulates the encephalitogenic T cell response to my-

- elin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 165: 2859–2865, 2000.
- 12) Mañá P, Goodyear M, Bernard C, et al. Tolerance induction by molecular mimicry: prevention and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis with the milk protein butyrophilin. *Int Immunol* 16: 489–499, 2004.
 - 13) Winer S, Astsaturov I, Cheung RK, et al. T cells of multiple sclerosis patients target a common environmental peptide that causes encephalitis in mice. *J Immunol* 166: 4751–4756, 2001.
 - 14) Guggenmos J, Schubart AS, Ogg S, et al. Antibody cross-reactivity between myelin oligodendrocyte glycoprotein and the milk protein butyrophilin in multiple sclerosis. *J Immunol* 172: 661–668, 2004.
 - 15) Goverman J, Woods A, Larson L, et al. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell* 72: 551–560, 1993.
 - 16) Lafaille JJ, Nagashima K, Katsuki M, et al. High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell* 78: 399–408, 1994.
 - 17) Hori S, Haury M, Coutinho A, et al. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25⁺4⁺ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8213–8218, 2002.
 - 18) Madsen LS, Andersson EC, Jansson L, et al. A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nature Genet* 23: 343–347, 1999.
 - 19) Waldner H, Whitters MJ, Sobel RA, et al. Fulminant spontaneous autoimmunity of the central nervous system in mice transgenic for the myelin proteolipid protein-specific T cell receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3412–3417, 2000.
 - 20) Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med* 197: 1073–1081, 2003.
 - 21) Perchellet A, Stromnes I, Pang JM, et al. CD8⁺ T cells maintain tolerance to myelin basic protein by 'epitope theft'. *Nature Immunol* 5: 606–614, 2004.
 - 22) Vanderlugt CL, Miller SD. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nature Rev Immunol* 2: 85–95, 2002.
 - 23) Robinson WH, Fontoura P, Lee BJ, et al. Protein microarrays guide tolerizing DNA vaccine treatment of autoimmune encephalomyelitis. *Nature Biotech* 21: 1033–1039, 2003.
 - 24) Miller SD, Vanderlugt CL, Lenschow DJ, et al. Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE. *Immunity* 3: 739–745, 1995.
 - 25) Wildbaum G, Netzer N, Karin N. Tr1 cell-dependent active tolerance blunts the pathogenic effects of determinant spreading. *J Clin Invest* 110: 701–710, 2002.
 - 26) Jones RE, Bourdette D, Moes N, et al. Epitope spreading is not required for relapses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 170: 1690–1698, 2003.
 - 27) Willenborg DO, Fordham S, Bernard CCA, et al. IFN- γ plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 175: 3223–3227, 1996.
 - 28) Tran EH, Prince EN, Owens T. IFN- γ shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol* 164: 2759–2768, 2000.
 - 29) Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, et al. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor α . *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11294–11298, 1995.
 - 30) Liu J, Marino MW, Wong G, et al. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nature Med* 4: 78–83, 1998.
 - 31) Riminton DS, Körner H, Strickland DH, et al. Challenging cytokine redundancy: inflammatory cell movement and clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis are normal in lymphotoxin-deficient, but not tumor necrosis factor-deficient mice. *J Exp Med* 187: 1517–1528, 1998.
 - 32) Suen WE, Bergman CM, Hjelmsström P, et al. A critical role for lymphotoxin in experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 186: 1233–1240, 1997.
 - 33) Wyss-Coray T, Borrow P, Brooker MJ, et al. Astroglial overproduction of TGF- β 1 enhances inflammatory central nervous system disease in transgenic mice. *J Neuroimmunol* 77: 45–50, 1997.
 - 34) Wildbaum G, Youssef S, Grabie N, et al. Neutralizing antibodies to IFN- γ -inducing factor prevent experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 161: 6368–6374, 1998.
 - 35) Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421: 744–748, 2003.
 - 36) Zhang G-X, Gran B, Yu S, et al. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor- β 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *J Immunol* 170: 2153–2160, 2003.
 - 37) Guo L-H, Mittelborn M, Brabeck C, et al. Expression of interleukin-16 by microglial cells in inflammatory, autoimmune, and degenerative lesions of the rat brain. *J Neuroimmunol* 146: 39–45, 2004.
 - 38) Negelkerken L, Blauw B, Tielemans M. IL-4 abrogates the inhibitory effect of IL-10 on the development of experimental al-

- lergic encephalomyelitis in SJL mice. *Int Immunol* 9: 1243–1251, 1997.
- 39) Cannella B, Gao YL, Brosnan C, et al. IL-10 fails to abrogate experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 45: 735–746, 1996.
 - 40) Mathisen PM, Yu M, Johnson JM, et al. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis with genetically modified memory T cells. *J Exp Med* 186: 159–164, 1997.
 - 41) Shaw MK, Lorens JB, Dhawan A, et al. Local delivery of interleukin 4 by retrovirus-transduced T lymphocytes ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 185: 1711–1714, 1997.
 - 42) Liblau R, Steinman L, Brocke S. Experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-4-deficient mice. *Int Immunol* 9: 799–803, 1997.
 - 43) Bettelli E, Das MP, Howard ED, et al. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol* 161: 3299–3306, 1998.
 - 44) Weir C, Bernard CCA, Bäckström BT. IL-5-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunol* 15: 1283–1289, 2003.
 - 45) Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, et al. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 294: 1731–1735, 2001.
 - 46) Jansson M, Panoutsakopoulou V, Baker J, et al. Attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in *Eta-1*/osteopontin-deficient mice. *J Immunol* 168: 2096–2099, 2002.
 - 47) Samoilova EB, Horton JL, Hilliard B, et al. IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol* 161: 6480–6486, 1998.
 - 48) Huang D, Wang J, Kivisakk P, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 193: 713–725, 2001.
 - 49) Fife BY, Huffnagle GB, Kuziel WA, et al. CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 192: 899–905, 2000.
 - 50) Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, et al. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 14: 547–560, 2001.
 - 51) Anderson SA, Shukaliak-Quandt J, Jordan EK, et al. Magnetic resonance imaging of labeled T-cells in a mouse model of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 55: 654–659, 2004.
 - 52) Kawakami N, Lassmann S, Li Z, et al. The activation status of neuroantigen-specific T cells in the target organ determines the clinical outcome of autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 199: 185–197, 2004.
 - 53) McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J Exp Med* 194: 873–881, 2001.
 - 54) Tran EH, Kuziel WA, Owens T. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice deficient in either the chemokine macrophage inflammatory protein-1 α or its receptor. *Eur J Immunol* 30: 1410–1415, 2000.
 - 55) Koike F, Satoh J, Miyake S, et al. Microarray analysis identifies interferon β -regulated genes in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 139: 109–118, 2003.
 - 56) Teige I, Treschow A, Teige A, et al. IFN- β gene deletion leads to augmented and chronic demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 170: 4776–4784, 2003.
 - 57) Pedotti R, Mitchell D, Wedemeyer J, et al. An unexpected version of horror autotoxicus: anaphylactic shock to a self-peptide. *Nature Immunol* 2: 216–222, 2001.
 - 58) Lock C, Hermans G, Pedotti R, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature Med* 8: 500–508, 2002.
 - 59) Pedotti R, DeVoss JJ, Youssef S, et al. Multiple elements of the allergic arm of the immune response modulate autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1867–1872, 2003.
 - 60) Ma RZ, Gao J, Meeker ND, et al. Identification of *Bphys*, an autoimmune disease locus as histamine receptor H₁. *Science* 297: 620–623, 2002.
 - 61) Secor VH, Secor WE, Gutekunst C-A, et al. Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. *J Exp Med* 191: 813–821, 2000.
 - 62) Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 80: 707–718, 1995.
 - 63) Girvin AM, Dal Canto MC, Rhee L, et al. A critical role for B7/CD28 costimulation in experimental autoimmune encephalomyelitis: a comparative study using costimulatory molecule-deficient mice and monoclonal antibody blockade. *J Immunol* 164: 136–143, 2000.
 - 64) Rottman JB, Smith T, Tonra JR, et al. The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nature Immunol* 2: 605–611, 2001.
 - 65) Sun Y, Lin X, Chen HM, et al. Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 168: 1457–1465, 2002.
 - 66) Lühder F, Huang Y, Dennehy KM, et al. Topological require-

- ments and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *J Exp Med* 197: 955–966, 2003.
- 67) Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 169: 4712–4716, 2002.
 - 68) Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, et al. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int Immunol* 16: 249–256, 2004.
 - 69) Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 415: 536–541, 2002.
 - 70) Sánchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nature Immunol* 4: 1093–1101, 2003.
 - 71) Baker D, Hankey DJR. Gene therapy in autoimmune, demyelinating disease of the central nervous system. *Gene Ther* 10: 844–853, 2003.
 - 72) Garren H, Ruiz PJ, Watkins TA, et al. Combination of gene delivery and DNA vaccination to protect from and reverse Th1 autoimmune disease via deviation to the Th2 pathway. *Immunity* 15: 15–22, 2001.
 - 73) Weiner LP, Louie KA, Atalla LR, et al. Gene therapy in a murine model for clinical application to multiple sclerosis. *Ann Neurol* 55: 390–399, 2004.
 - 74) Jyothi MD, Flavell RA, Geiger TL. Targeting autoantigen-specific T cells and suppression of autoimmune encephalomyelitis with receptor-modified T lymphocytes. *Nature Biotech* 20: 1215–1220, 2002.
 - 75) Linker RA, Mäurer M, Gaupp S, et al. CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nature Med* 8: 620–624, 2002.
 - 76) Villoslada P, Hauser SL, Bartke I, et al. Human nerve growth factor protects common marmosets against autoimmune encephalomyelitis by switching the balance of T helper type 1 and type 2 cytokines within the central nervous system. *J Exp Med* 191: 1799–1806, 2000.
 - 77) Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, et al. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nature Med* 5: 49–55, 1999.
 - 78) Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E, et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 422: 688–694, 2003.
 - 79) Picard-Riera N, Decker L, Delarasse C, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13211–13216, 2002.
 - 80) Calza L, Fernandez M, Giuliani A, et al. Thyroid hormone activates oligodendrocyte precursors and increases a myelin-forming protein and NGF content in the spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3258–3263, 2002.
 - 81) Karnezis T, Mandemakers W, McQualter JL et al. The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination. *Nature Neurosci* 7: 736–744, 2004.
 - 82) Poliak S, Mor F, Conlon P, et al. The neuropeptides corticotropin-releasing factor and urocortin suppress encephalomyelitis via effects on both the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the immune system. *J Immunol* 158: 5751–5756, 1997.
 - 83) Matarese G, Di Giacomo A, Sanna V, et al. Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 166: 5909–5916, 2001.
 - 84) Sanna V, Di Giacomo A, La Cava A, et al. Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. *J Clin Invest* 111: 241–250, 2003.
 - 85) Kim S, Liva SM, Dalal MA, et al. Estriol ameliorates autoimmune demyelinating disease. Implications for multiple sclerosis. *Neurology* 52: 1230–1238, 1999.
 - 86) Bedoui S, Miyake S, Lin Y, et al. Neuropeptide Y (NPY) suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: NPY₁ receptor-specific inhibition of autoreactive Th1 responses in vivo. *J Immunol* 171: 3451–3458, 2003.
 - 87) Youssef S, Stüve O, Patarroyo JC, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 420: 78–84, 2002.
 - 88) Vollmer T, Key L, Durkalski V, et al. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 363: 1607–1608, 2004.
 - 89) Pitt D, Werner P, Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nature Med* 6: 67–70, 2000.
 - 90) Bechtold DA, Kapoor R, Smith KJ. Axonal protection using flecainide in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* 55: 607–616, 2004.
 - 91) Kalyvas A, David S. Cytosolic phospholipase A₂ plays a key role in the pathogenesis of multiple sclerosis-like disease. *Neuron* 41: 323–335, 2004.
 - 92) Blaber SI, Ciric B, Christophi GP, et al. Targeting kallikrein 6 proteolysis attenuates CNS inflammatory disease. *FASEB J* 18: 920–922, 2004.
 - 93) Yan SS, Wu Z-Y, Zhang HP, et al. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by selective blockade of en-

- cephalitogenic T-cell infiltration of the central nervous system. *Nature Med* 9: 287-293, 2003.
- 94) Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM, et al. Targeting leukocyte MMPs and transmigration. Minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain* 125: 1297-1308, 2002.
- 95) Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 bias of natural killer T cells. *Nature* 413: 531-534, 2001.
- 96) Mayer L, Shao L. Therapeutic potential of oral tolerance. *Nature Rev Immunol* 4: 1-13, 2004.
- 97) Miller A, Lider O, Abramsky O, et al. Orally administered myelin basic protein in neonates primes for immune responses and enhances experimental autoimmune encephalomyelitis in adult animals. *Eur J Immunol* 24: 1026-1032, 1994.
- 98) Teitelbaum D, Arnon R, Sela M. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of copolymer 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3842-3847, 1999.

要 旨

EAE は中枢神経系髄鞘の自己抗原を特異的に認識する class II MHC 拘束性 CD4 陽性 Th1 細胞により誘導され、MS の病態解明・治療法開発の上で重要なモデルである。EAE 研究の最近の進歩としては、TCR トランスジェニックマウスによる自然発症 EAE モデルの樹立が挙げられる。また再発のメカニズムとしてエピトープ拡散が提唱され、寛解や寛容誘導のメカニズムとして、胸腺における自己抗原の発現や自己反応性 Th1 細胞を抑制的に制御する調節性細胞の役割が注目されている。調節性細胞として IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 を産生する Th2 細胞, IL-10 や TGFβ を産生する Th3 細胞・Tr1 細胞・CD4⁺CD25⁺ T 細胞, IL-5 を産生する NK 細胞, IL-4 を産生する NKT 細胞が発見された。さらにサイトカイン KO マウスにおける EAE の解析により、Th1 サイトカイン IFNγ, TNFα, IL-12 の意義や Th2 サイトカイン IL-4 の役割が再考されている。またマイクロアレイによる包括的遺伝子発現解析により、自己免疫発症機構におけるアレルギー機序の関与が明らかになった。EAE の新しい治療法として神経幹細胞移植や高脂血症治療薬 statin が導入された。

キーワード：エピトープ拡散, ノックアウトマウス, 神経幹細胞, 調節性細胞, Th1/Th2 サイトカイン

原 著

日本語版 Multiple Sclerosis Quality of Life-54 の信頼性の検討

山本 敏之 尾方 克久 片岸 美帆 清水 宏
小川 雅文 山村 隆* 川井 充

要旨：多発性硬化症 (MS) 患者の生活の質 (QOL) の評価を目的に、日本語版 MSQOL-54 (MSQOL-54J) を作成した。日本人の MS 患者 62 人に記名自己記入調査を実施し、MSQOL-54J の各尺度の回答率、内的整合性、再現性、最終評価得点を評価し、妥当であることを示した。SF-36 と共通の質問で構成される尺度は、MS 患者ではすべてにおいて日本人の国民標準値より低下していた。総合障害度 (EDSS) と MSQOL-54J の身体機能に関する尺度は有意に逆相関したが、他の尺度は相関が低かった。MS に特異的な MSQOL-54J は、MS 患者の自覚的な QOL 評価尺度として有用であると考えた。

(臨床神経, 44: 417-421, 2004)

Key words: 多発性硬化症, 日本語版 MSQOL-54, 生活の質, SF-36, EDSS

はじめに

多発性硬化症 (MS) 患者の総合障害度の評価として、しばしば expanded disability status scale (EDSS)¹⁾ が使われる。しかし、EDSS は「錐体路機能」、「小脳機能」、「脳幹機能」、「感覚機能」、「膀胱直腸機能」、「視覚機能」、「精神機能」の障害度や歩行機能によって評価される尺度であり、生活の質 (QOL) を評価することは難しいとされる²⁾。一般に QOL の評価尺度として、The 36-item short form health survey (SF-36) が使われる^{3,4)} が、MS 患者で障害されうる気分の変動、疲労感、性功能、認知機能など、必ずしも SF-36 だけでは評価しきれないと考えられている⁵⁾。すでに外国では MS に特化した QOL の評価尺度が使われており、Multiple Sclerosis Quality of Life-54 instrument (MSQOL-54) はその一つである^{6,7)}。MSQOL-54 は、SF-36 の 36 問の質問に 18 問を加えた 54 問の質問からなる。質問から算出される尺度のうち、「1. 身体機能」、「2. 日常役割機能 (身体)」、「3. 日常役割機能 (精神)」、「5. 心の健康」、「7. 健康感」は SF-36 と共通で、「4. 身体の痛み」、「6. 活力」、「8. 社会的役割」は SF-36 の尺度に 1 問ずつ質問が追加され、「9. 認知機能」、「10. 健康の悩み」、「11. 性機能」、「12. 健康の変動」、「13. 性機能に関する満足度」、「14. 生活の質全般」は、MSQOL-54 で新たに作られたものである。これらの 14 個の尺度の総合尺度として「15. 身体複合健康度」と「16. 精神複合健康度」を算出する⁸⁾。われわれは、MSQOL-54 を翻訳し、日本語版 MSQOL-54 (MSQOL-54J) を作成した。その信頼性と妥当性を評価し、本邦の MS 患者の QOL について検討した。

対 象

国立精神・神経センター武蔵病院で、McDonald の診断基準から clinically definite MS と診断⁹⁾ し、2003 年 9 月から 2003 年 12 月の間に来院した日本人 MS 患者 63 人のうち、調査の同意をえられた 62 人 (男性 17 人、女性 46 人) を対象とした。平均年齢は 42.8 ± 12.1 歳 (18 歳~68 歳) であった。全例、MRI で脳、脊髄のいずれかの部位に病変があることを確認し、神経内科専門医が EDSS を評価した。EDSS の中央値は 3.0、四分位範囲は 3.5 であった。対象のうち再発寛解型 MS 患者 (RRMS) は 52 人 (男性 14 人、女性 38 人) で、平均年齢 42.4 ± 12.5 歳、EDSS の中央値 2.25、四分位範囲 2.0 であった。二次性進行型 MS 患者 (SPMS) は 8 人で、平均 46.5 ± 9.0 歳、EDSS の中央値 6.25、四分位範囲 1.25 であった。RRMS と SPMS の EDSS は、Mann-Whitney 検定で有意差があった ($p = 0.0005$)。Interferon- β -1b (IFN β) 治療を受けていた患者 (IFN β 治療 MS 群) は 20 人 (男性 7 人、女性 13 人) で、平均年齢 36.4 ± 10.6 歳、EDSS は中央値 3.25 で四分位範囲 3.5 であった。IFN β の治療を受けていない患者 (IFN β 未治療 MS 群) は 42 人 (男性 10 人、女性 32 人) で、平均年齢 45.8 ± 11.7 歳、EDSS は中央値 3.0、四分位範囲 2.0 であった。IFN β 治療 MS 群と IFN β 未治療 MS 群の EDSS は、Mann-Whitney 検定で有意差がなかった ($p = 0.56$)。

方 法

MSQOL-54J の作成は以下のようにした。英語版 MSQOL-54

国立精神・神経センター武蔵病院神経内科 [〒187-8551 東京都小平市小川東町 4-1-1]

*同 神経研究所免疫研究部

(受付日: 2004 年 2 月 5 日)

にふくまれる SF-36 と共通の質問は、日本語版 SF-36 (ver. 1.2)⁹⁾を参考にし、他の質問は2人の日本人が翻訳し、一つにまとめた。そして、日本語に翻訳したすべての質問を、英語を母国語とする者が英語に逆翻訳し、意味の相同性を原著者に確認した。MSQOL-54J は、外来で配布し、記名自己記入形式で調査した。全例にプライバシーの保護をふくむ調査の説明を文書で説明し、同意をえられた MS 患者にのみ実施した。検者から回答者に MSQOL-54J の質問内容についての説明はおこなわなかった。また、回答していない質問があっても、検者から回答者に回答をうながしたり、回答を強要したりしなかった。

英語版 MSQOL-54 に準拠して質問を集計し、質問から構成される尺度の最終評価点を算出した。質問の回答が半数以上欠損した尺度のデータは使用しなかった。最終評価点の最高点は100点、最低点は0点で、点数が高いほど QOL は良好である。尺度別に回答率をしらべ、尺度内の質問の内的整合性をみる目的で、Cronbach α 係数を求めた。また、最初に調査してから再発していない62人中20人は1カ月後に再調査し、test-retest 再現性を、Pearson の積率相関係数からしらべた。MSQOL-54J で算出された尺度の平均値、標準偏差、変動係数、最高得点を獲得した患者の割合、最低得点を獲得した患者の割合を求めた。また、MSQOL-54J の各尺度と EDSS の相関を、Spearman の順位相関をもちいてしらべた。QOL の評価は MSQOL-54J から SF-36 と共通質問を抽出し、日本人の国民標準値⁹⁾と比較した。

結 果

MSQOL-54J の尺度別の回答率、Cronbach α 係数、test-retest 再現性を Table 1 に示す。「11. 性機能」と「13. 性機能に対する満足度」の尺度については無回答が多く、回答率はそれぞれ 79.0%、77.4% であった。各尺度の内的整合性は、Cron-

bach α 係数 0.65 から 0.93 であった。「1. 身体的機能」が 0.93 でもっとも高く、「8. 社会的役割」が 0.65 でもっとも低かった。Test-retest 再現性は、相関係数が 0.61 から 0.95 であった。「1. 身体的機能」が 0.95 でもっとも高く、「7. 健康感」のカテゴリーが 0.61 でもっとも低かった。

MSQOL-54J の尺度別の最終評価点の平均、標準偏差、変動係数、最高得点を獲得した患者の割合、最低得点を獲得した患者の割合を Table 2 に示す。「11. 性機能」では最低得点の獲得患者が 14.3% にたいし、最高得点を獲得した患者が 30.6% であったが、変動係数は 64.6% でばらつきはあった。また、「13. 性機能にたいする満足度」では最高得点を獲得した患者が 14.6% にたいし、最低得点を獲得した患者が 31.3% であったが、変動係数は 52.5% でばらつきはあった。

MSQOL-54J から SF-36 を抽出した結果を Table 3 に示す。MS 患者では、日本人の国民標準値と比較してすべてのカテゴリーで QOL スコアが低かった。

MSQOL-54J でえられたカテゴリー別の QOL と EDSS の相関を Table 4 に示す。Spearman ρ は、「1. 身体的機能」が -0.60、「15. 複合身体健康度」が -0.43 で、EDSS と負の相関があり、統計的に有意であった ($p < 0.01$)。他の尺度は Spearman ρ の絶対値が 0.4 以下で、EDSS との相関は低かった。

考 察

QOL 尺度として広くもちいられている SF-36 が一般集団をふくめた多様な健康状態の評価にもちいられているのにならして、MSQOL-54 は MS に特化した QOL 尺度として開発された。MSQOL-54 の原著では、MS 患者の 179 回答を、Pro-max 回転による因子分析をおこない、質問から尺度を算出した⁹⁾。本研究は MS の QOL を評価するために MSQOL-54 の質問を日本語に翻訳し、英語版に準拠して質問から構成される尺度を算出した。性に関する尺度は、無回答の質問が多かっ

Table 1 Descriptive reliabilities for Multiple Sclerosis Quality of Life in Japanese Instrument in 62 patients with MS.

* n = 20. (): Original study (English version).

Scales	The number of items	The ratio of respondents	Cronbach's alpha	Test-retest reliability*
1. Physical function	10	100	0.93 (0.96)	0.95 (0.96)
2. Role limitations- physical	4	96.8	0.85 (0.86)	0.70 (0.67)
3. Role limitations- emotional	3	96.8	0.79 (0.84)	0.89 (0.73)
4. Pain	3	98.4	0.87 (0.92)	0.74 (0.86)
5. Emotional well-being	5	100	0.74 (0.87)	0.72 (0.85)
6. Energy	5	100	0.77 (0.84)	0.77 (0.85)
7. Health perceptions	5	100	0.74 (0.80)	0.61 (0.69)
8. Social function	3	98.4	0.65 (0.75)	0.87 (0.77)
9. Cognitive function	4	100	0.88 (0.90)	0.73 (0.86)
10. Health distress	4	100	0.85 (0.91)	0.68 (0.78)
11. Sexual function	4	79.0	0.92 (0.85)	0.70 (0.94)
12. Change in health	1	96.8	—	0.72 (0.90)
13. Satisfaction with sexual function	1	77.4	—	0.76 (0.75)
14. Overall quality of life	2	100	—	0.78 (0.87)

Table 2 Descriptive statistics for Multiple Sclerosis Quality of Life in Japanese Instrument in 62 patients with MS. ^a Means were transformed linearly to 0 to 100 scales, where 0 is worse quality of life and 100 is better quality of life. ^b Percent of sample having the lowest (floor) and highest (ceiling) possible scores. SD: standard deviation and CV: coefficient of variation. (): Original study (English version).

Scale	Mean ^a	SD	CV (%)	Floor (%) ^b	Ceil (%) ^b
1. Physical function	57.2 (36.7)	28.1 (32.5)	49.1	1.6 (13.5)	4.8 (3.9)
2. Role limitations- physical	39.4 (32.9)	40.4 (39.0)	102.5	38.3 (48.6)	21.7 (17.9)
3. Role limitations- emotional	42.2 (60.0)	42.0 (42.3)	99.5	40.0 (26.0)	28.3 (46.2)
4. Pain	52.1 (74.2)	29.2 (25.5)	56.0	3.3 (1.1)	11.5 (28.5)
5. Emotional well-being	50.6 (65.6)	18.3 (20.4)	36.2	0 (1.1)	1.6 (1.7)
6. Energy	38.6 (42.2)	18.7 (20.9)	50.0	3.2 (1.1)	0 (0.6)
7. Health perceptions	39.0 (53.3)	15.9 (25.3)	40.8	0 (1.2)	0 (2.4)
8. Social function	64.9 (61.7)	21.9 (25.0)	33.7	0 (1.1)	6.6 (11.2)
9. Cognitive function	61.0 (73.0)	27.3 (24.2)	44.8	1.6 (1.7)	9.7 (23.2)
10. Health distress	44.3 (54.4)	22.9 (26.9)	51.7	4.8 (2.8)	0 (2.8)
11. Sexual function	58.4 (61.7)	37.7 (35.4)	64.6	14.3 (11.9)	30.6 (26.3)
12. Change in health	33.0 (46.1)	20.4 (25.7)	61.8	3.3 (7.8)	0 (8.4)
13. Satisfaction with sexual function	39.6 (50.5)	20.8 (38.3)	52.5	31.3 (26.0)	14.6 (25.3)
14. Overall quality of life	45.8 (60.1)	16.1 (20.1)	35.2	1.6 (0.6)	0 (2.8)
15. Physical health composite	49.2 (48.6)	17.7 (20.3)	36.0	0 (0)	0 (0)
16. Mental health composite	48.8 (62.9)	18.9 (20.7)	38.7	0 (0)	0 (0)

Table 3 A comparison of the mean scores of the Short Form 36-Item Health Survey (generic scales) of 62 patients with multiple sclerosis (MS) from general population in Japan. MS: the mean scores of patients with MS in the present study and General: the mean scores of general Japanese population in previous study.

Scale	The number of items	MS	General
1. Physical function	10	57.2	87.9
2. Role limitations-physical	4	39.4	85.3
3. Role limitations-emotional	3	42.2	83.8
4. Pain	2	50.0	76.2
5. Emotional well-being	5	50.6	72.7
6. Energy	4	38.7	65.8
7. Health perceptions	5	39.0	65.0
8. Social function	2	58.6	86.2

たため回答率が低かったが、他の尺度の回答率は95%以上であった。MSQOL-54での性に関する質問の回答率の低さは、本研究に限らず英語版MSQOL-54でも指摘されており¹⁰⁾、日本語版と英語版の内容の不適合によるものではないと考えた。原著のMSQOL-54のCronbach α 係数とtest-retest再現性をTable 1に示す。MSQOL-54Jの各尺度のCronbach α 係数は、原著にくらべて数値が低く、とくに「8. 社会的役割」はCronbach α 係数0.65で低いが、原著でも0.75であった。他の尺度は、Cronbach α 係数0.74以上であり、質問数が少ないことを考慮すれば内的整合性は保たれていると考えた。Test-retest再現性は相関係数が0.61以上であり、対象が少な

Table 4 Correlation between neurologic disabilities measured with Expanded Disability Status Scale and quality of life, with the Multiple Sclerosis Quality of Life in Japanese Instrument. P values were determined using the Spearman rank correlation test.

Scale	ρ	p
1. Physical function	-0.60	< 0.01
2. Role limitations due to physical problems	-0.24	0.07
3. Role limitations due to emotional problems	-0.12	0.35
4. Pain	-0.30	0.02
5. Emotional well-being	-0.05	0.69
6. Energy/Fatigue	-0.13	0.29
7. Health perceptions	-0.20	0.11
8. Social function	-0.32	0.01
9. Cognitive function	-0.33	0.01
10. Health distress	-0.02	0.87
11. Sexual function	-0.20	0.16
12. Change in health	-0.18	0.16
13. Satisfaction with sexual function	0.05	0.72
14. Overall quality of life	-0.14	0.29
15. Physical health composite	-0.43	< 0.01
16. Mental health composite	-0.20	0.12

いことを考慮すれば再現性はあった。原著のMSQOL-54の尺度別の最終評価点の評価をTable 2に示す。回答率の低かった性に関する尺度において、最高得点者の割合、最低得点者の割合が多く、回答に天井効果、床効果がでていた可能性が示唆された。英語版MSQOL-54でも、性に関する質問で床効果、天井効果が強く出るといって指摘があり¹⁰⁾、日本語訳の意味の

不明確さが原因であったり、日本人特有の現象ではないと考えた。われわれが作成したMSQOL-54JはQOLスコアとして妥当であり、信頼性があると考えた。

MSQOL-54Jから抽出したSF-36について、MS患者と日本人の国民標準値⁹⁾を比較した(Table 3)。MS患者では、すべての尺度で国民標準値よりも低得点であった。MSQOL-54JはSF-36を含んでいるために、対象のQOLと国民標準値を比較できる利点がある。しかし、現在、日本語版SF-36はver. 2.0が作成され、回答の選択肢数などの変更があった。英語版MSQOL-54は変更がないため、本研究で参考にしたSF-36 ver. 1.2と新しいSF-36 ver. 2.0は整合性がないことに注意したい。

MSQOL-54JとEDSSは、「1. 身体的機能」と「15. 複合身体健康度」以外の尺度では、相関が低かった。これまでにEDSSと英語版MSQOL-54の各尺度には、相関があるという報告¹¹⁾と相関が低いとする報告とがある¹⁰⁾。また、イタリア語版MSQOL-54の報告では、EDSSは「複合身体健康度」と相関があり、「複合精神健康度」は相関がなかったと報告している⁶⁾¹²⁾。EDSSは身体の総合障害度であるため、本研究の結果のように身体に関するQOL尺度が相関するのは矛盾しないと考えた。しかし、MSQOL-54は自己記入調査であり、客観的に評価するEDSSのように患者間での比較は難しいとも考えられる。また、個々の患者においても、調査時の社会的な背景によって最終評価点が影響されうる¹³⁾。EDSSとMSQOL-54Jの各尺度の相関は、さらに検討する必要があるであろう。

神経疾患においてQOLから患者を評価することは重要であり、今後、ますます医療側に求められていくと考えられている¹³⁾。近年、MSではIFN β 自己注射治療が標準的な治療になっているが、IFN β 治療は再発予防を目的とした治療であるため、再発が予防されている期間にはEDSSの変化から治療効果を評価することは難しいと予想される。MSQOL-54Jを時系列の調査として適応することが妥当であるかはさらに検討を要するが、QOL評価を治療効果の判定に導入することで、EDSSでは評価できないMS患者の臨床的な効果を評価できる可能性があると考えた。本研究では、MSに特異的なQOL評価尺度MSQOL-54Jの信頼性を示した。

本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業(13-特疾-08)からの研究助成によっておこなわれた。MSQOL-54Jを利用のばあいは、下記にお問い合わせいただきたい。

〒187-8551 東京都小平市小川東町4-1-1

国立精神・神経センター武蔵病院 神経内科 川井充

Tel. 042-341-2711/Fax. 042-344-6745

文 献 .

- 1) Kurtzke JF: Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33: 1444-1452
- 2) Vickrey BG, Hay RD, Harooni R, et al: A health-related quality of life measure for multiple sclerosis. *Quality of Life* 1995; 4: 187-206
- 3) Fukuhara S, Bito S, Green J, et al: Translation, adaptation, and validation of the SF-36 Health Survey for use in Japan. *J Clin Epidemiol* 1998; 51: 1037-1044
- 4) Fukuhara S, Ware JE, Kosinski M, et al: Psychometric and clinical tests of validity of the Japanese SF-36 Health Survey. *J Clin Epidemiol* 1998; 51: 1045-1053
- 5) 藤原一男: QOLを重視した多発性硬化症患者の治療。 *神経治療* 2003; 20: 131-137
- 6) Solari A, Filippini G, Mendozzi L, et al: Validation of Italian multiple sclerosis quality of life 54 questionnaire. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 67: 158-162
- 7) Acquadro C, Lafortune L, Mear I: Quality of Life in Multiple Sclerosis: Translation in French Canadian of the MSQoL-54. *Health Qual Life Outcomes* 2003; 1: 70
- 8) McDonald WI, Compston A, Edan G, et al: Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50: 121-127
- 9) 福原俊一, 鈴嶋よしみ, 尾藤誠司ら: SF-36日本語版マニュアル (ver. 1.2), (財)パブリックヘルスリサーチセンター, 東京, 2001
- 10) Freeman JA, Hobart JC, Thompson AJ: Does adding MS-specific items to a generic measure (the SF-36) improve measurement? *Neurology* 2001; 57: 68-74
- 11) Janardhan V, Bakshi R: Quality of life and its relationship to brain lesions and atrophy on magnetic resonance images in 60 patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2000; 57: 1485-1491
- 12) Solari A, Radice D: Health status of people with multiple sclerosis: a community mail survey. *Neurol Sci* 2001; 22: 307-315
- 13) 若山吉弘: 神経疾患の治療におけるQOLの重要性について。 *神経治療* 2003; 20: 103-105