

ほぼコンフルエントの状態 (2.6×10^6 cells / dish) またはセミコンフルエント (60-70%) の状態で回収した。クロロホルム-メタノール混液で総脂質を抽出し、DEAE-Sephadex A-25 カラムにて中性糖脂質および酸性糖脂質画分に分離した。各画分は Sephadex LH-20 カラムで脱塩した。

(3) 糖脂質の構造解析

精製した中性糖脂質をシリカゲルの High-performance 薄層クロマトグラフィ (HPTLC) にスポットして、クロロホルム:メタノール:水 = 60:35:5 の溶液で展開した。酸性糖脂質は、クロロホルム:メタノール:0.2% CaCl_2 = 55:45:10 の溶液で展開した。各展開後のプレートは Far-Eastern blot / mass spectrometry を用いて糖脂質の構造解析を行った。

(4) HPTLC-免疫染色法

展開後のプレートを polyisobutyl methacrylate でコーティング後、一次抗体、続いて HRP 標識二次抗体で反応させ、コニカ イムノステインキットで検出した。

2. (1) 免疫組織化学

26 名の末梢神経障害患者から得られた生検腓腹神経 (CIDP 10 例、Churg-Strauss 症候群 6 例、遺伝性ニューロパチー 6 例、ビタミン B1 欠乏性ニューロパチー 4 例) の連続凍結切片 ($10 \mu\text{m}$ 厚) を用いた。アセトン固定 (4°C 、5 分) の後 0.03% H_2O_2 / メタノール処理し、免疫染色に供した。一次抗体としてウサギポリクロナル抗 claudin-1, claudin-5, occludin, ZO-1 抗体 (Zymed, California, USA; 1:400 - 1:800) を用いた。

(2) 定量的検討

i) Claudin-5 陽性微小血管パーセンテ

ジの算定: 同一検体から作成されたエポン包埋トルイジンブルー染色標本を用いて神経内膜内微小血管 (直径 $30 \mu\text{m}$ 以下) 密度を算定し、これを分母として抗 claudin-5 抗体陽性神経内膜内微小血管 (直径 $30 \mu\text{m}$ 以下) 密度を除することで claudin-5 陽性微小血管のパーセンテージを各症例について求めた。前者が後者を下回る場合は 100% として算定した。

ii) 抗 ZO-1 染色パターンの解析: 正常神経内膜内微小血管を抗 ZO-1 抗体で染色すると、隣接する内皮細胞間の点状あるいは線状の immunoreactivity が 1 血管あたり 2 個以上観察される。この局在が不明瞭化し、内皮細胞全体に薄く染色されるものを異常パターンと解釈するが、全抗 ZO-1 抗体陽性微小血管密度を分母として正常染色パターンを示す微小血管の密度を除いたパーセンテージを各症例について算定した。

3. <retrovirus vector の作成>

pSVtsA58ori(-)-2 より制限酵素を用いて温度感受性 SV40 large T 抗原 cDNA を含む fragment を切り出し、pDONAI (TaKaRa) へ組み込んだ。293 改変細胞および Retrovirus Packaging Kit Amphi (TaKaRa) を用いてパッケージングを施行し、組み換え retrovirus を調製した。

<BMECs の単離>

材料として側頭葉てんかん患者の手術摘出脳組織を用いた。大脳皮質を中心に径 10mm 程度の block として大脳の一部を摘出。BBB と直接関係のない脳軟膜血管の混入を避ける目的で、実体顕微鏡下に丁寧に軟膜を剥離・除去する。酵素 (dispase) により BBB を構成する微小血管を遊離させ、遠沈により得られた血管画分を $190 \mu\text{m}$ 径のナイロンメッシュに

通して BBB と関連しない大きな血管を除去する。その他は既報告の method¹⁾に準ずる。

<HBMECs の characterization および解析>

脳毛細血管を分離後、33°Cで cloning を行う。バリアー構成内皮細胞の特徴である spindle-fiber 状の形態を呈した内皮細胞群を分離し、Von Willbrand factor の発現および DiI-Ac-LDL のとりこみ確認を行う。電気抵抗 (Transendothelial electrical resistance(TEER)) や ¹⁴C-labeled inulin を用いた透過性の検定を行うとともに、occludin や claudin-5 などの分子の発現を確認し、バリアー機能を検証する。これらの要件を満たしたものを in vitro BBB モデルとして樹立する。

(倫理面への配慮)

山口大学医学部倫理委員会に本研究の研究計画書を提出し、承認を得ている。また、患者に対しインフォームドコンセントを実施している。

C. 研究結果

1. (1) HBMEC、HUVEC の主要な中性糖脂質として Gb4、Gb3、LacCer が検出された。Gb3 の含量は HBMEC が HUVEC の約 2 倍であった。中性糖脂質の量は細胞の密集度と関連がなかった。

(2) HBMEC、HUVEC の主要な酸性糖脂質は GM3 と LM1 であった。中性糖脂質とは反対に、HBMEC での酸性糖脂質含有量は HUVEC と比較して低値で、とくに HBMEC セミコンフルエント時の GM3、LM1 はコンフルエントの HUVEC、HBMEC と比較して有意に低値であった。コレラトキシンを用いて微量の糖脂質を解析したところ 4 種の ganglio-N-tetraose 系 ganglioside (GM1, GD1a, GD1b, GT1b) が

検出された。

(3) HUVEC では抗 SGPG 抗体による HPTLC 免疫染色法により、HUVEC の酸性糖脂質画分に SGPG の存在が認められた。またセミコンフルエントの状態では、コンフルエントものよりも約 10 倍の発現が認められた。HBMEC ではセミコンフルエントの状態に置いても SGPG の発現は HUVEC と比較して明らかに少なく、コンフルエントの状態では検出限界以下であった。

2. (1) Claudin-1 の染色性は perineurial layer 全層に認められ、内層と外層の染色性の差は観察されなかった。CIDP とその他の非炎症性末梢神経疾患との染色性の差も認められなかった。

(2) 抗 occludin 抗体は perineurial layer の他、一部の神経外膜血管の管腔側、神経周膜に隣接した神経内膜内微小血管などを染色した。抗 claudin-1 抗体と同じく、CIDP とその他の非炎症性末梢神経疾患との染色性の差は認められなかった。

(3) ZO-1, claudin-5 の immunoreactivity は CIDP と非炎症性末梢神経疾患との間で顕著な差異を認めた。

(4) 抗 ZO-1 抗体は、対照例では神経内膜内微小血管内皮細胞の他、一部の神経外膜血管の内皮細胞面および perineurial layer を染色した。対照例では抗 ZO-1 抗体による染色性は内皮細胞間に限局するが、この局在パターンが不明瞭になる微小血管が CIDP 症例で有意に増加した。

(5) Claudin-5 の染色性は、対照例では神経内・外膜を問わずすべての内皮細胞に観察されたが、CIDP 症例では神経内膜内微小血管における immunoreactivity が有意に低下し

ていた。

3. 温度感受性 SV40 ラージ T 抗原 cDNA を有する組み換えレトロウイルスを作成した。また、側頭葉てんかん患者の摘出脳から BMECs の単離に成功した。得られた BMECs は BBB を構成する内皮細胞の特徴である spindle-fiber typed morphology を呈していた。また、DiI-Ac-LDL の取り込みも確認し、得られた BMECs は *in vitro* BBB モデルの候補になりうることを確認した。現在、ウイルスの transfection を施行し 33°Cにて培養を施行中である。

D. 考察

ガングリオシドをはじめとする糖脂質は、細胞膜に局在して細胞間接着や細胞間の情報伝達、細胞内シグナリングなどに関与する重要な物質であるが、最近では各種神経疾患において自己抗体のターゲットとなりうることで、免疫性神経疾患の病理・生理を考える上で欠くことのできない地位を占めている。

今回の我々の検索では、まずヒト BMEC のウシ BMEC との相違点明らかとなった。ウシ BMEC の主要中性糖脂質は であり、ヒト BMEC とは明らかに異なっていた。また、ウシ BMEC でも主要な酸性糖脂質は GM3 と LM1 であったが、前者はヒト BMEC と比べて 2 倍の含有量があり、その下流に位置する GM1, GD1a などのガングリオシドもヒト BMEC でははるかに低値であった。この相違が種差によるものか、あるいは培養液を含む培養条件の違いによる差であるのかは今後の検討課題であるが、*in vitro* のバリアーモデル³⁾⁴⁾を構成する際に比較的に純粋な mass を得やすいウシ細胞

を用いることの妥当性は、今後論議を要する問題であろう。我々の施設でも、培養条件の改善によってヒト BMEC の純粋に近い培養が可能となっており、これからは BBB の細胞学的研究はヒト細胞を用いたものが主流になっていくものと考えられる。

もう一点注目すべきは、全身一般臓器の代表としての HUVEC との構成糖脂質の違いである。HBMEC では明らかにガングリオシドの含有量が HUVEC と比べて少ないことが明らかになった。内皮細胞の膜表面に表現されているガングリオシドは、外界からの刺激の伝達をつかさどる interface であり、また、自己免疫のターゲットともなりうることを考慮すると、HBMEC におけるガングリオシドの発現低下は、BBB での外界からの侵襲を避ける protective な意味合いを持つ可能性が考えられる。HBMEC での SGPG 発現低下も同様のメカニズムが考えられるが、増殖中の細胞では SGPG 量が増えることも確認できた。岡ら⁶⁾は HNK-1 糖鎖を発現させた COS 細胞では細胞接着性が低下することを報告しており、細胞移動における HNK-1 抗原の重要性を指摘している。増殖中の内皮細胞は管腔形成にあたって至適な位置へ migrate する必要があり、増殖期の SGPG 発現はこの意味では合目的的であるが、これは同時に、BBB 破壊から修復の過程で内皮細胞の増殖が起こると HNK-1 抗原がより強く内皮細胞表面に発現することを示唆する。SGPG がリンパ球表面に発現する L-selectin のリガンドとして作用することを我々は報告しており⁷⁾、BBB の破壊がさらなる免疫現象を惹起して炎症の増悪に関与する可能性を示しているものと考えられる。

CIDP、ギラン・バレー症候群をはじめとする自己免疫性炎症性ニューロパチーでは、各

種の炎症性サイトカインが BNB の透過性を亢進させることで疾患活動性に関与していることが想定されているが、中でも最も強いバリアー透過性亢進作用を持つのは vascular endothelial growth factor (VEGF) である。VEGF は内皮細胞膜上のチロシンキナーゼ型レセプターである flt-1、flt-k に結合することによって occludin その他のタイトジャンクション関連蛋白の発現を低下させ、BNB 機能低下を招来させると考えられており⁸⁾、われわれは BNB の本体である神経内膜内微小血管において各種タイトジャンクション蛋白が実際に炎症性ニューロパチーで変化しているか否かを免疫組織化学的に検証する目的で本研究に着手し、ZO-1、claudin-5 の 2 種のタイトジャンクション関連蛋白が CIDP で有意に変化していることを見いだした。

Claudin-5 は隣接内皮細胞間に局在する蛋白で、血管透過性のコントロールに重要な役割を持っているものと考えられているが、バリアー機能を有する内皮細胞に特異的に発現する蛋白ではないため、今回我々の検索で見られた神経内膜微小血管での選択的な発現低下はむしろ意外な結果であった。しかし、最近新田ら⁹⁾は claudin-5 ノックアウトマウスにおいて比較的小さな物質(800Da 以下)の BBB 透過性が亢進していることを見いだしており、彼らの研究では BNB に関しては言及していないものの、CIDP 症例での claudin-5 発現低下は微小物質の BNB 透過性亢進を惹起して疾患活動性に関連していることが示唆された。

ZO-1 は claudin や occludin などの各種タイトジャンクション蛋白をつないで一つの unit とする“足場”としての機能を有する蛋白で、BNB においてもキーとなる役割を演

じている可能性が考えられているが¹⁰⁾、これまでの研究では一定の見解は得られていなかった。ウシ培養脳毛細血管内皮細胞において VEGF が ZO-1 の総量を変えずにその局在を細胞間から細胞周辺へと変化させることが最近報告されており、今回の我々の結果も、CIDP において VEGF をはじめとする各種炎症性サイトカインが BNB 担当内皮細胞に作用して、ZO-1 の局在変化をきたしたものと考えられる。

tsA58 遺伝子を用いた BMECs の条件的不死亡細胞株は transgenic rat を用いたケースがすでに報告されており、33°Cにて、不死亡の引き金が引かれ、増殖を示すが、37°Cでは増殖が停止し、より生理的な状態に近づき、BBB の性質をよく保持しているとされている¹¹⁾¹²⁾。

同報告によれば、得られた BMECs のクローン間で発育速度や tight junction protein の発現量などに差異があり、今回われわれが作成する条件的不死亡 BMECs 株でもコロニー(クローン)間でその性質が異なることが想定されるため、できるだけ多くの細胞株を樹立し、Characterization を行い、優れたヒト in vitro BBB モデルを確立する予定である。

E. 結論

1. HBMEC の糖脂質パターンを分析し、HUVEC との比較検討を試みた。両細胞とも主要中性糖脂質は Gb3、Gb4、LacCer の 3 者で、酸性糖脂質は GM3 と LM1 が主体であった。HBMEC は HUVEC と比較して中性糖脂質の含有量が多く、酸性糖脂質が少なかった。SGPG は HBMEC、HUVEC のいずれでも確認可能であったが、HBMEC での含有量は HUVEC と比較して遙かに少なく、また、両者とも増殖期に発現が強い

傾向が明らかであった。本研究で明らかとなった中枢神経由来内皮細胞の糖脂質パターンの特異性は、MSをはじめとする中枢神経系自己免疫疾患の発症・進展に関与している可能性がある。

2. CIDP の生検腓腹神経神経内膜微小血管において、claudin-5 の発現低下と ZO-1 の局在変化を見いだした。同血管は BNB の本体であり、これらのタイトジャンクション関連蛋白の変化は CIDP における BNB 破綻を反映しているものと考えた。

3. 温度感受性 SV40 ラージ T 抗原を用いたヒト BMECs の条件的不死化細胞株の作成をこころみた。組み換えウイルスの作成およびヒト BMECs の単離を行った。

【参考文献】

- 1) Kanda T et al.: Glycosphingolipid antigens in cultured microvascular bovine brain endothelial cells: sulfo-glucuronosyl paragloboside as a target of monoclonal IgM in demyelinating neuropathy. *J Cell Biol* 126: 235-246, 1994.
- 2) Duvar S et al.: Glycosphingolipid composition of a new immortalized human cerebromicrovascular endothelial cell line. *J Neurochem* 75: 1970-1976.
- 3) Kanda T et al.: Anti-GM1 antibody facilitates leakage in an in vitro blood-nerve barrier model. *Neurology* 55: 585-587, 2000.
- 4) Kanda T et al.: Sera from Guillain-Barre patients enhance leakage in blood-nerve barrier model. *Neurology* 60: 301-306, 2003.
- 5) Kanda T et al.: Chronic inflammatory

demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75: 765-769, 2004.

6) 岡昌吾ほか: 神経系における糖鎖の役割. 糖鎖リモデリングによる HNK-1 糖鎖の解析を中心に. *細胞工学* 20: 187-192, 2001.

7) Kanda T et al.: Interleukin-1beta up-regulates the expression of sulfoglucuronosyl paragloboside, a ligand for L-selectin, in brain microvascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7897-7901, 1995.

8) Gale NW et al.: Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 13: 1055-1066, 1999.

9) Nitta T et al.: Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5 deficient mice. *J Cell Biol* 161: 653-660, 2003.

10) Zahraoui A et al.: Tight junction, a platform for trafficking and signaling protein complexes. *J Cell Biol* 151: F31-36, 2000.

11) Obinata et al.: Conditionally immortalized cell lines with differentiated functions established from temperature-sensitive T-antigen transgenic mice. *Genes to Cells* 2, 235-244, 1997.

12) Hosoya KI et al.: mRNA expression and transport characterization of conditionally immortalized rat brain capillary endothelial cell lines; a new in vitro BBB model for drug targeting.

J Drug Target 8:357-70, 2000.

F.研究発表

1. 論文発表

- Takashi Kanda, Masanaga Yamawaki, Hidehiro Mizusawa. Sera from Guillain-Barre patients enhance leakage in blood-nerve barrier model. *Neurology* 60: 301-306, 2003.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 神田 隆：単一病変の多発性硬化症。 *Current Insights in Neurological Sciences* 11: 10-11, 2003.
- 神田 隆：病巣部位診断の原則。 *末梢神経。 Clinical Neuroscience* 21: 336-337, 2003.
- Takashi Kanda: Editorial: Chronic hepatitis C infection and peripheral neuropathy; is mixed cryoglobulinemia really important? *Intern Med* 42: 377-378, 2003.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 神田 隆：シャルコー・マリー・トゥース病。 *脳と神経* 55: 576-586, 2003.
- 神田 隆：バリアー破綻と液性因子。 *神経免疫学* 11: 237-241, 2003.
- 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.
- 神田 隆：免疫系と神経系を隔てるバリアー。 *Brain Medical* 15: 353-359, 2003.
- Takashi Kanda, Yukiyo Numata, Hidehiro Mizusawa: Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1. *J Neurol*

- Neurosurg Psychiatry 75: 765 - 769, 2004.
- Fumiaki Saito, Hiroyuki Tomimitsu, K Arai, S Nakai, Takashi Kanda, Teruo Shimizu, Hidehiro Mizusawa, Kiichiro Matsumura: A Japanese patient with distal myopathy with rimmed vacuoles: missense mutation in the epimerase domain of the UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) gene accompanied by hyposialylation of skeletal muscle glycoproteins. Neuromusc Disord 14: 158-161, 2004.
- Takashi Kanda, Toshio Ariga, Hisako Kubodera, Hong Lian Jin, Kiyoshi Owada, Takeshi Kasama, Masanaga Yamawaki, Hidehiro Mizusawa: Glycosphingolipid composition of primary cultured human brain microvascular endothelial cells. J Neurosci Res 78: 141-150, 2004.
- 神田 隆: 血液脳関門の機能. 日本医事新報 4164: 107-108, 2004.
- 神田 隆: 脳血管性痴呆の特殊型. Sneddon 症候群. 日本臨床 62: Suppl.4, 192-195, 2004.
- 神田 隆: アルコール性ニューロパチー. Brain Medical 16: 249-253, 2004.
- 石橋 哲、神田 隆: 多発性硬化症の鑑別診断. モダン フィジシャン 24: 1856-1859, 2004.
- Kazuyuki Ishida, Yoshiaki Wada, Taiji Tsunemi, Takashi Kanda, Hidehiro Mizusawa: Marked hypertrophy of the cauda equina in a patient with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy presenting lumbar stenosis. J Neurology 252: 239-240, 2005.
- Satoko Hori, Sumio Ohtsuki, Masashi Ichinowatari, Takanori Yokota, Takashi Kanda, Tetsuya Terasaki: Selective gene silencing of rat ATP-binding cassette G2 transporter in an in vitro blood-brain barrier model by short interfering RNA. J Neurochem 93: 63-71, 2005.
- Jun-ichi Satoh, Megumi Nakanishi, Fumiko Koike, Sachiko Miyake, Toshiyuki Yamamoto, Mitsuru Kawai, Seiji Kikuchi, kyuoichi Nomura, Kazumasa Yokoyama, Kohei Ota, Takashi Kanda, Toshiyuki Fukazawa, Takashi Yamamura: Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. Neurobiol Dis 18: 537-550, 2005.
- Taro Hino, Takanori Yokota, Shingo Ito, Kazutaka Nishina, Young-Soo Kang, Shinobu Mori, Satoko Hori, Takashi Kanda, Tetsuya Terasaki, Hidehiro Mizusawa: In vivo delivery of small interfering RNA targeting brain capillary endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 340: 263-267, 2006.
- 神田 隆: 糖尿病性神経障害の病理. 日本臨床別冊 糖尿病性最小血管症. pp482-487, 2005.
- 神田 隆: 神経系のバリアーシステム. 山口医学 54: 5-11, 2005.
- 神田 隆: 膠原病に伴う末梢性ニューロパチー. 矢崎義雄、菅野健太郎監修、疾患別最新処方改訂第4版. メジカルビュー社、pp636-637, 2005.
- 神田 隆: 神経領域. 奈良信雄編、基本医学略語事典. 中外医学社、2005.
- 神田 隆: シャルコー・マリー・トゥース病. 七川歆次監修、リウマチ病セミナーXVI. 永井書店、pp98-108, 2005.

2. 学会発表

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

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、2003 名古屋

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、2003 名古屋

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、2003 名古屋

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、2003 名古屋

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、2003 長崎

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、2003 長崎

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、2003 長崎

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、2003 長崎

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、2003 長崎

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、2003 長崎

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、2003 長崎

石橋賢士、斉藤和幸、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、2003 宇部

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、2003 横浜

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、2003 横浜

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、2003 横浜
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 セレクチンの発現を抑制
した. 第 44 回日本神経学会総会、2003
横浜

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、
2003 横浜

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、2003 横浜
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、
2003 横浜

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、2003
横浜

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、2003 横浜

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、2003 東京

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、2003 東京

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、2003 東京

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、2003 東京

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、2003 東京

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、2003 東京

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、2003 東
京

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、
2003 東京

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、2003 名古屋

山脇正永、神田 隆、大和田 潔、岡本尚子、水澤英洋：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. 第 16 回日本神経免疫学会学術集会、2004 東京

神田 隆：シンポジウム：免疫性神経疾患の画像診断—類縁疾患との鑑別のポイント：多発性筋炎. 第 16 回日本神経免疫学会学術集会、2004 東京

神田 隆、石橋 哲、山脇正永、沼田幸代、金 紅蓮、水澤英洋：免疫性神経疾患における BBB 浸潤細胞の解析. 第 45 回日本神経学会総会、2004 東京

松本 卓、沼田幸代、神田 隆、水澤英洋、清水潤：抗 HLA class I antigen 抗体への IBM と RVDM の免疫反応性の検討. 第 45 回日本神経学会総会、2004 東京

石橋賢士、山南文香、石川欽也、松永高志、神田 隆、水澤英洋：非ケトン性高浸透圧性糖尿病昏睡における片麻痺の神経放射線学的検討. 第 45 回日本神経学会総会、2004 東京

服部 亮、袖山信幸、神田 隆、水澤英洋：CK 上昇を認めない非典型的炎症性筋疾患における筋 MRI の有用性. 第 45 回日本神経学会総会、2004 東京

竹尾一寿、藤ヶ崎浩人、日野太郎、神田 隆、水澤英洋：腫瘍様病変を呈した多発性硬化症 5 例の検討. 第 45 回日本神経学会総会、2004 東京

山脇正永、神田 隆、大和田潔、水澤英洋：脳毛細血管内皮細胞に対するインターフェロン β の作用：DNA microarray を用いた解析. 第 45 回日本神経学会総会、2004 東京

木村正道、前田敏彦、川井元晴、根来 清、

神田 隆：グリチルリチン過剰投与による偽性アルドステロン症に伴う低カリウム性ミオパチーの一例. 第 16 回日本老年医学会中国地方会、2004 米子

前田敏彦、小笠原淳一、能村友紀子、川井元晴、根来 清、神田 隆：経過中に明かな左右差を呈した多発性筋炎の 74 歳女性例. 第 77 回日本神経学会中国・四国地方会、2004 広島

能村友紀子、木村正道、川井元晴、根来 清、神田 隆、足立秀光、加藤祥一、鈴木倫保：右内頸動脈領域の脳動静脈奇形を合併した高位頸髄硬膜動静脈瘻の 77 歳男性例. 第 77 回日本神経学会中国・四国地方会、2004 広島

安部真彰、小笠原淳一、川井元晴、根来 清、神田 隆：エンテロウイルスの関与が考えられた非ヘルペス性辺縁系脳炎の 1 例. 第 9 回日本神経感染症学会、2004 弘前

安部真彰、小笠原淳一、川井元晴、根来 清、神田 隆：嚥下障害、拘束性換気障害を呈した DISH (Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis) の 1 例. 第 91 回日本内科学会中国地方会、2004 米子

清水文崇、小笠原淳一、川井元晴、根来 清、神田 隆：特発性硬膜下血腫後に出現した低髄液圧による頭痛の 1 例. 第 32 回日本頭痛学会総会、2004 鹿児島

Kiyoshi Negoro, Yukiko Tada, Takashi Kanda : Investifation of headache management of general practitioners in Yamaguchi, Japan. 18th World congress of Neurology (Sydney), 2005, J Neurol Sci 238:S488, 2005.

Kiyoshi Negoro, Yukiko Tada , Yukiko Nomura, Takashi Kanda : Investifation of headache management of general practitioners in Yamaguchi, Japan. 12th International Headache

Congress (Kyoto), 2005, Cephalalgia 25 : 950, 2005.

Yukiko Tada , Kiyoshi Negoro, Yukiko Nomura, Takashi Kanda : Changes in the number of the patients with migraine consulting our department after the opening of the headache clinic. 12th International Headache Congress (Kyoto), 2005, Cephalalgia 25 : 949, 2005.

Yukiko Nomura, Yukiko Tada, Kiyoshi Negoro, Takashi Kanda : Clinical efficacy of eletriptan in the acute treatment of migraine. 12th International Headache Congress (Kyoto), 2005, Cephalalgia 25 : 920, 2005.

根来 清, 多田由紀子, 能村友紀子, 小笠原淳一, 川井元春, 神田 隆 : 一般医の頭痛診療に対する意識調査. 第 46 回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005.5.

川井元晴, 清水文崇, 能村友紀子, 木山真紀子, 尾本雅俊, 小笠原淳一, 根来 清, 森松光紀, 神田 隆 : インターフェロンβ導入後の多発性硬化症の再発に関する臨床的検討. 第 17 回日本神経免疫学会. 福岡, 2005.3.

川井元晴, 清水文崇, 根来 清, 神田 隆, 福迫俊弘 : Mollaret 細胞が確認された単純ヘルペスウイルス 2 型再発性髄膜炎の 29 歳男性例. 第 10 回日本神経感染症学会. 東京, 2005.10.

川井元晴, 能村友紀子, 前田敏彦, 清水文崇, 中山寛人, 木村正道, 尾本雅俊, 坂田尚広, 木山真紀子, 小笠原淳一, 佐野泰照, 根来 清, 神田 隆 : 筋萎縮性側索硬化症患者における延命処置の受け入れに関する検討. 第 46 回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005.5.

田中信一郎, 石丸孝則, 山下勝弘, 神田 隆 : 外頸動脈内に留置されたカテーテルからの逆行性塞栓症の 1 例. 第 78 回神経学会中四国

地方会, 岡山, 2005.6

小笠原淳一, 根来 清, 川井元晴, 神田 隆, 森松光紀 : 大脳皮質基底核変性症と進行性核上性麻痺はルーチン MRI で鑑別できるか. 第 46 回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005.5.
佐野泰照, 川井元晴, 小笠原淳一, 多田由紀子, 根来 清, 神田 隆 : 吸気性喘鳴で発症した多系統萎縮症の臨床的検討, 第 46 回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005.5.

尾本雅俊, 川井元晴, 福迫俊弘, 根来 清, 神田 隆, 木村成志, 宮田 元, 大浜栄作 : Alzheimer 病の経過中に Creutzfeldt-Jakob 病を併発した一剖検例. 第 46 回日本神経病理学会総会, 宇都宮, 2005.5.

尾本雅俊, 小笠原淳一, 川井元晴, 福迫俊弘, 根来 清, 神田 隆 : 当科外来におけるボツリヌス毒素治療内容の経時的変化についての検討. 第 46 回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005.5.

尾本雅俊, 崔 丹, 河野裕夫, 石原得博, 神田 隆 : Negative stain を用いたヒトおよび各種哺乳類における Amyloid 線維の検討. 第 47 回日本顕微鏡学会九州支部学術講演会, 宇部, 2005.12.

三隅俊吾, 小笠原淳一, 川井元晴, 根来 清, 神田 隆 : 急速に増悪した呼吸不全を呈した cytoplasmic body myopathy の 27 歳男性例. 第 79 回日本神経学会中国四国地方会, 松山, 2005.12.

坂田尚広, 川井元晴, 神田 隆 : 一過性の回転性めまいを呈した椎骨動脈解離症例における凝固系検査の有用性. 第 46 回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005.6.

坂田尚広, 川井元晴, 神田 隆 : 一過性の回転性めまいを呈した椎骨動脈解離症例における凝固系検査の有用性. 第 30 回日本脳卒

中学会，盛岡，2005.4.

木山真紀子，星井嘉信，神田 隆，石原得博：
ATTR アミロイド特異的モノクローナル抗体
作製.

第46回日本神経学会総会，鹿児島，2005.5.

木山真紀子，星井嘉信，崔 丹，河野裕夫，
神田 隆，石原得博：免疫グロブリン鎖位
特異抗体を用いたA λ アミロイドーシスの
免疫組織学的検討．第104回山口大学医学会
学術講演会，宇部，2005.7.

木山真紀子，星井嘉信，崔 丹，河野裕夫，
神田 隆，石原得博：免疫グロブリン鎖位
特異抗体を用いた A λ アミロイドー
シスの免疫組織学的検討．日本病理学会総会，
横浜，2005.4.

安部真彰，木山真紀子，坂田尚広，尾本雅俊，

小笠原淳一，川井元晴，根来 清，神田 隆：

非ヘルペス性辺縁系脳炎 3 例の臨床的検討．

第 46 回日本神経学会総会，鹿児島，2005. 5.

安部真彰，小笠原淳一，川井元晴，根来 清，

神田 隆：交感神経節後線維の選択的障害を

来した脳炎後急性自律神経障害の 24 歳女性

例．第 78 回日本神経学会中国四国地方会，

岡山，2005. 6.

安部真彰，清水文崇，川井元晴，小笠原淳一，

根来 清，神田 隆：首下がりを呈した頸椎

症の 60 歳女性例．第 17 回日本老年学会中国

地方会，宇部，2005.10.

安部真彰，川井元晴，小笠原淳一，根来 清，

神田 隆，能村友紀子：体位により増悪軽

快する fasciculation を右上肢と前胸部に呈し

た頸椎症の 64 歳男性例．第 79 回日本神経学

会中国四国地方会，松山，2005.12.

清水文崇，小笠原淳一，川井元晴，根来 清，

神田 隆：Duchenne 型筋ジストロフィー

manifesting carrier の臨床的検討．第 46 回日

本神経学会総会，鹿児島，2005. 5.

清水文崇，川井元晴，佐野泰照，小笠原淳一，

根来 清，神田 隆：頻発する発作に verapamil

が奏効した家族歴が明らかでない片麻痺性片

頭痛の 36 歳男性例．第 23 回神経治療学会総

会，2005. 6

清水文崇，川井元晴，小笠原淳一，根来 清，

神田 隆，森松光紀：フェンタニル貼布後に

急性および遅発性意識障害を呈した 84 歳女

性例．第 93 回日本内科学会中国地方会，宇

部，2005.10.

清水文崇，川井元晴，小笠原淳一，根来 清，

神田 隆：位置覚の入力により誘発され三重

屈曲様の肢位を伴う左下肢筋痙攣に対し腰部

神経根及び交感神経節ブロックが奏効した 70

歳男性例．第 79 回日本神経学会中国四国地

方会，松山，2005.12.

中山寛人，福迫俊弘，能村友紀子，川井元晴，

佐野泰照，根来 清，神田 隆，森松光紀：

脊髄硬膜動静脈瘻の臨床的検討．第 46 回日

本神経学会総会，鹿児島，2005. 5.

中山寛人，小笠原淳一，川井元晴，根来 清，

神田 隆：腰椎穿刺を契機に起立性頭痛が出

現し，MR myelography にて胸腔背側に髄液

漏出が明らかとなった低髄液圧症候群の 36

歳男性例．

第 78 回神経学会中四国地方会，岡山，2005. 6.

中山寛人，木村正道，佐野泰照，小笠原淳一，

川井元晴，根来 清，神田 隆，能村友紀子，

森松光紀：高齢者における treatable myelopathy

としての脊髄硬膜動静脈瘻．

第 17 回日本老年医学会中国地方会，宇部，

2005.10.

中山寛人，川井元晴，尾本雅俊，小笠原淳一，

根来 清，神田 隆：左下退部屈筋群を病変

の主座とした封入体筋炎の 68 歳男性例．第

79 回日本神経学会中国四国地方会，松山，2005.12.

能村友紀子，多田由紀子，尾本雅俊，佐野泰照，小笠原淳一，川井元晴，根来 清，神田 隆，森松光紀：頭痛外来開設後の頭痛患者受診状況に関する検討. 第46回日本神経学会総会，鹿児島，2005.5.

能村友紀子，根来 清，多田由紀子，小笠原淳一，川井元晴，神田 隆：入院治療により薬剤離脱できたエルゴタミン乱用頭痛の2例. 第23回日本神経治療学会総会，鳥羽，2005.6.

能村友紀子，川井元晴，小笠原淳一，安部真彰，根来 清，神田 隆：ベーチェット病による多発根神経障害が疑われた55歳女性例. 第92回日本内科学会中国地方会，岡山，2005.6.

前田敏彦，小笠原淳一，川井元晴，根来 清，神田 隆：幻覚を有するパーキンソン病患者の脳血流量変化. 第46回日本神経学会総会，鹿児島，2005.5.

前田敏彦，小笠原淳一，川井元晴，根来 清，神田 隆：急速に進行する四肢の筋萎縮・筋力低下をきたし，タイプ2B線維の欠損を認めた60歳女性例. 第92回日本内科学会中国地方会，岡山，2005.6.

前田敏彦，小笠原淳一，川井元晴，根来 清，

神田 隆：腓腹神経のSchwann細胞・神経周膜細胞胞体内に脂肪沈着を認める軸索障害型感覚ニューロパチーの30歳女性例. 第79回日本神経学会中国四国地方会，松山，2005.12.

木村明代，能村友紀子，田中信一郎，安部真彰，尾本雅俊，根来 清，神田 隆：精神症状が先行したMELASの23歳男性例. 第79回日本神経学会中国四国地方会，松山，2005.12.

高木崇衣，清水文崇，川井元晴，小笠原淳一，根来 清，神田 隆：腸壁嚢胞状気腫を来たした多系統萎縮症の60歳男性例. 第93回日本内科学会中国地方会．宇部，2005.10.

G.知的財産権の出願・登録情報

- 1.特許取得：なし
- 2.実用新案登録：なし
- 3.その他：なし

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)

総合研究報告書

多発性硬化症における軸索伸長阻害因子 Nogo の役割

佐藤 準一、尾上 祐行、南里 悠介、有馬 邦正、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(oligodendrocytes; OL)の細胞死と脱髄を認める。回復期には髄鞘再生も見られるが、炎症が遷延化すると軸索傷害(axonal injury)を来して不可逆的な後遺症を残す。Nogo は神経突起伸長抑制活性を呈する新しい蛋白質 family で 3 種類の isoform A, B, C が存在する。Nogo-A は oligodendrocytes (OL), myelin 特異的に発現し、endoplasmic reticulum, Golgi complex, plasma membrane に局在している。Nogo-A の C 末端 Nogo-66 は神経細胞・軸索上の受容体 NgR と結合し、NgR coreceptor LINGO-1/p75^{NTR} or TROY-RhoA 系を介して神経突起伸長抑制シグナルを伝達する。脊髄損傷モデル動物に Nogo-A 中和抗体 IN-1 を投与すると、軸索再生・機能的回復が飛躍的に促進される。MS は軸索傷害により進行すると考えられているので、軸索再生を標的とする治療法開発が重要である。最近 myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG)などの中枢神経系髄鞘抗原に対する抗体が MS 血清・脳組織で検出され、脱髄・軸索傷害の誘導に関与している可能性が報告されている。本研究では MS 軸索傷害時の Nogo の役割を調べるため、(1) MS 脱髄巣における Nogo-A, NgR の発現を免疫組織化学的に解析し、(2)MS 患者血清中の抗 Nogo, NgR 抗体を Western blot 法で検出した。その結果、(1)Nogo-A は MS 慢性活動性脱髄巣に残存している surviving OL で高発現を認め、NgR は反応性アストロサイト(astrocytes; AS)やミクログリア(microglia; MCG)で高発現を認めた。(2)血清抗 Nogo-66 抗体や抗 NgR 抗体は MS のみならず対照神経疾患や健常者でも高頻度検出された。以上の結果は Nogo を標的とする軸索再生促進治療法は、軸索以外の部位に作用して予期せぬ副作用を引き起こす可能性もあり得ることを示唆する。

A. 研究目的

Nogo は神経突起伸長抑制活性を呈する蛋白質 family で isoform A, B, C が存在する。Nogo-

A は oligodendrocytes (OL), myelin 特異的に発現し、endoplasmic reticulum, Golgi complex, plasma membrane に局在している。Nogo-A の C 末端

Nogo-66 は神経細胞・軸索上の受容体 NgR と結合し、NgR coreceptor LINGO-1/p75^{NTR} or TROY-RhoA 系を介して神経突起伸長抑制シグナルを伝達する。ラット脊髄切断モデルに Nogo-A 中和抗体 IN-1, NgR 阻害ペプチド NEP1-40, または soluble NgR(310) ecto を投与すると、軸索再生・機能的回復が飛躍的に促進される。多発性硬化症(multiple sclerosis; MS) は軸索傷害により進行すると考えられているので、軸索再生を標的とする治療法開発が重要である。最近 myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG)などの中枢神経系髄鞘抗原に対する抗体が MS 血清・脳組織で検出され、脱髄・軸索傷害の誘導に関与している可能性が報告されている(Berger et al. N Engl J Med 349: 139-145, 2003; Lennon et al. Lancet 364: 2106-2112, 2004)。本研究では MS 軸索傷害における Nogo の役割を調べるため、(1) MS 脱髄巣における Nogo-A, NgR の発現を免疫組織化学的に解析し、(2)MS 患者血清中の抗 Nogo, NgR 抗体を Western blot 法で検出した。

B. 研究方法

#1. 剖検脳: MS 4 例と神経疾患対照脳 6 例、非神経疾患対照脳 6 例のホルマリン固定大脳・脳幹・脊髄・視神経の組織切片を脱パラフィンおよび microwave 処理後に免疫組織化学的に解析した。

#2. 血清: MS(n= 30; RR 26 vs SP/PP 4), non-MS 神経疾患(OND; n = 22), 健常者(healthy control HC; n = 22)の血清(1:1000 in all except for 1:10,000 in NgR-Fc)を用いた。

#3. 標準リコンビナント蛋白質をブロットしたミニアレイを用いた Western blot 解析: 対応す

る遺伝子を pTrcHis-TOPO にクローニングし *E. coli* をトランスフォームした。IPTG を添加し強制発現させた lysates を SDS-PAGE で泳動分離後に、Xpress tag fusion protein をゲルから切り出し濃縮した。精製したリコンビナント蛋白質を SDS-PAGE で泳動、nitrocellulose 膜に転写してミニアレイを作成し、希釈血清とオーバーナイト・室温で反応させた。

(倫理面への配慮)

剖検脳使用に際して国立精神・神経センター倫理委員会の承認を得た。また血清は本人の同意を受けて提供された。

C. 研究結果

1) 免疫組織化学的解析: Nogo-A は MS 慢性活動性脱髄巣および脳梗塞巣辺縁に残存している surviving OL で高発現を認め、NgR は MS 脱髄巣や脳梗塞巣に集積している reactive AS, MCG で高発現を認めた。

2) Western blot で、培養ヒト AS における NgR 蛋白質の発現を認め、PI-PLC 処理培養上清中に NgR 蛋白質を確認した。

3) 30% of MS, 23% of OND, 32% of HC で抗 N66 IgG 抗体を検出した。

4) 33% of MS, 14% of OND, 0% of HC で抗 non-glycosylated NgR IgG 抗体を検出した。60% of MS, 18% of OND, 14% of HC で抗 NgR-Fc IgG 抗体を検出したが、抗 NgR-Fc IgM 抗体は検出されなかった。

D. 考察

脊髄損傷動物に Nogo-A 中和抗体 IN-1 など投与して Nogo-NgR interaction を block すると、軸索再生・機能的回復が飛躍的に促進さ

れる。従って Nogo-NgR interaction の存在が成体における神経再生不全の主要因と考えられる。我々は Nogo-A は MS 慢性活動性脱髄巢に残存している surviving OL で高発現を認め、NgR は反応性アストロサイト(astrocytes; AS)やミクログリア(microglia; MCG)で高発現を認めることを見出した(Satoh et al. J Neuropathol Exp Neurol 64: 129-138, 2005)。また MS, non-MS, HC で比較的高頻度に、抗 Nogo-66 抗体や抗 NgR 抗体を検出した(Onoue et al. Multiple Sclerosis, submitted for publication)。以上の所見は Nogo-NgR 系の発現が中枢神経系の髄鞘や軸索に限局的ではなく、低レベルの構成的発現が免疫系を含む非神経系組織でも広く分布し、外傷・炎症などを契機に自己抗原と認識され、潜在的に抗体が産生される可能性が考えられる。従って Nogo を標的とする軸索再生促進治療法は、軸索以外の部位に作用して予期せぬ副作用を引き起こす可能性もあり得る。

E. 結論

Nogo-A は MS 慢性活動性脱髄巢に残存している surviving OL で高発現を認め、NgR は反応性アストロサイトやミクログリアで高発現を認める。血清抗 Nogo-66 抗体や抗 NgR 抗体は MS と対照両者で高頻度検出され、MS 診断特異的のマーカールとはならない。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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 β -

regulated genes in multiple sclerosis. Journal of Neuroimmunology 139: 109-118, 2003.

2. Satoh J, Yukitake M, Kurohara K, Takashima H, Kuroda Y: Detection of the 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid of Japanese multiple sclerosis patients presenting with severe myelitis. Journal of the Neurological Sciences 212: 11-20, 2003.
3. Satoh J, Yamamura T, Arima K: The 14-3-3 protein epsilon isoform expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis binds to vimentin and glial fibrillary acidic protein in cultured human astrocytes. American Journal of Pathology 165(2): 577-592, 2004.
4. Satoh J, Nakanishi M, Yamamura T: Dysregulation of apoptosis-regulatory genes in multiple sclerosis. Immunology 2004 1: 501-504, 2004.
5. Satoh J, Yamamura T: Gene expression profile following stable expression of the cellular prion protein. Cellular and Molecular Neurobiology 24: 793-814, 2004.
6. Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin M-C, Gasser T, Krüger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J, Toda T, Wang J, Ioannidis JPA, de Andrade M, Rocca WA, the UCHL1 Global Genetics Consortium: UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. Annals of Neurology 55: 512-521, 2004.
7. Yakushiji Y, Satoh J, Yukitake M, Yamamuchi K, Nakamura I, Nishino I, Kuroda Y: Interferon beta-responsive inclusion body

- myositis in a hepatitis C virus carrier. *Neurology* 63: 587-588, 2004.
8. Satoh J, 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. *Neurobiology of Disease* 18: 537-550, 2005.
 9. Satoh J, Onoue H, Arima K, Yamamura T: Nogo-A and Nogo receptor expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64: 129-138, 2005.
 10. Satoh J, Onoue H, Arima K, Yamamura T: The 14-3-3 protein forms a molecular complex with heat shock protein Hsp60 and cellular prion protein. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64: 858-868, 2005.
 11. Satoh J, Nanri Y, Yamamura T: Rapid identification of 14-3-3-binding proteins by protein microarray analysis. *Journal of Neuroscience Methods* in press, 2005.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 佐藤 準一：脳の炎症とグリア細胞の役割. *BRAIN MEDICAL* 15(4): 15-20, 2003.
 15. 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* 4026: 1-11, 2004.
 16. 佐藤準一、山村隆：神経系 1. オーバービュー. 別冊・医学のあゆみ サイトカイン state of arts 119-122, 2004.
 17. 佐藤準一：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. *Neuroimmunology* 12: 151-161, 2004.
 18. 佐藤準一：DNA マイクロアレイによる多発性硬化症の免疫病態の解析. 特集 I サイトカイン・ケモカインからみた多発性硬化症の病型と病態. *Neuroimmunology* 13: 167-178, 2005.
 19. 佐藤準一：網羅的遺伝子発現解析による多発性硬化症の病態・薬物反応性. 特集 II 遺伝子チップ解析の現状とその将来に期待される展開. 炎症と免疫, 2005, 印刷中.
 20. 佐藤準一：多発性硬化症のマイクロアレイ診断. 特集 II 多発性硬化症研究・治療の現状 2006. *神経進歩*, 2006, 印刷中.
 21. 佐藤準一：多発性硬化症. *インターフェロン治療学. 最新の基礎・臨床. 日本臨床*, 2006, 印刷中.
- 書籍
1. Satoh J. Protein Microarray Analysis for Rapid Identification of 14-3-3 Protein Binding Partners. In *Functional Protein Microarrays in Drug Discovery*. Edited by Predki PF. CRC Press, Boca Raton, FL, 2006, In press.
 2. 学会発表
- 国際学会
1. Satoh J, Koike F, Fukazawa T, Kawai M, Yamamura T: Interferon- β -responsive genes in multiple sclerosis. 55th Annual Meeting of the

American Academy of Neurology, Honolulu, Hawaii, April 2, 2003.

2. Satoh J, Kurohara K, Yukitake M, Takashima H, Kuroda Y, Yamamura T: Detection of the 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis. 55th Annual Meeting of American Academy of Neurology. Honolulu, Hawaii, April 2, 2003.
3. Satoh J, Yamamura T, Kawai M, Arima K: The 14-3-3 protein is expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis. 15th International Congress of Neuropathology. Torino, September 16, 2003.
4. Satoh J, Yamamura T: Microarray analysis identifies an aberrant expression of DNA damage and apoptosis-regulatory genes in multiple sclerosis. The First International Symposium. Cellular Responses to Genome Damage and Chromatin Dynamics. Hiroshima, 2004. 2. 13.
5. Satoh J, Yamamura T, Kawai M, Arima K: The 14-3-3 protein epsilon isoform is expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis. Gordon Research Conference. Biology of 14-3-3 Proteins. Ventura, 2004. 2.25.
6. Satoh J: The 14-3-3 protein epsilon isoform expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis: Its binding to vimentin and GFAP in cultured human astrocytes. Special Symposium. Recent Progress in Neuroimmunology and NKT Cell Research. Tokyo, 2004. 3. 9.
7. Satoh J, Nakanishi M, Yamamura T: Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis-regulatory genes in multiple sclerosis. 56th Annual Meeting of American Academy of Neurology. San Francisco, 2004. 4.27.
8. Nakanishi M, Satoh J, Aranami T, Yamamura T: Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in apolipoprotein-E knockout mice. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS. Montréal, 2004. 7.21.
9. Satoh J, Nakanishi M, Yamamura T: Dysregulation of apoptosis-regulatory genes in multiple sclerosis. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS. Montréal, 2004. 7.21.
10. Satoh J, Onoue H, Yamamura T: Gene expression profile of human cells following stable expression of the cellular prion protein. The Awaji international forum on Infection and Immunity. Awaji, 2004. 9.1
11. Satoh J, Nakanishi M, Onoue H, Aranami T, Yamamura T: T cell gene expression profiling identifies molecularly and clinically distinct subgroups of multiple sclerosis. 7th International Congress of Neuroimmunology. Workshop I. Genetics of neuroinflammatory diseases. Venice, 2004. 9.29.
12. Nakanishi M, Satoh J, Aranami T, Hirose G, Yamamura T: Lack of apolipoprotein E (ApoE) exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. 7th International Congress of Neuroimmunology. Venice, 2004. 9.30.
13. Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Onoue H,

- Yamamura T: T cell gene expression profiling identifies molecularly and clinically distinct subgroups of multiple sclerosis. The 13th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience. Genome Analysis and Medicine. Tokyo, 2004. 12.7.
14. Satoh J, Onoue H, Arimak K, Yamamura T: Nogo-A and Nogo receptor expression is enhanced in demyelinating lesions of multiple sclerosis. 57th Annual Meeting of American Academy of Neurology. Miami Beach, 2005. 4.12. (Neurology 64, Suppl 1: A138, 2005).
 15. Satoh J, Onoue H, Nanri Y, Arima K, Yamamura T: The 14-3-3 Protein Forms a Molecular Complex with Heat Shock Protein Hsp60 and Cellular Prion Protein: A Possible Implication for Detection of 14-3-3 in the CSF of Prion Diseases. The Fifth Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, 2005. 9.7. (Abstract P-084, p. 102, 2005).
 16. Satoh J, Doi Y, Aranami T, Yamamura T: T cell gene expression profiling identifies four distinct subgroups of multiple sclerosis. International Symposium on Autoimmunity in Intractable Diseases-Novel Molecules and Emerging Paradigms. Hakone, 2005. 10.27. (Abstract 27S-2, 2005).
 17. Doi Y, Satoh J, Aranami T, Yamamura T: NR4A2 (Nurr1), an orphan nuclear receptor, is overexpressed in peripheral blood T lymphocytes of multiple sclerosis. International Symposium on Autoimmunity in Intractable Diseases-Novel Molecules and Emerging Paradigms. Hakone, 2005. 10.27. (Abstract PV-17, 2005).
- 国内学会
1. 佐藤 準一、古池 史子、中西 恵美、三枝 隆博、山村 隆：多発性硬化症特異的遺伝子発現プロファイル. 第 44 回日本神経学会総会. 東京、2003.5.17.
 2. 佐藤 準一、三枝 隆博、山村 隆、小川 雅文、川井 充、：多発性硬化症脱髄巢における 14-3-3 蛋白質の発現. 第 44 回日本神経病理学会総会学術研究会. 名古屋、2003.5.29.
 3. 佐藤 準一：多発性硬化症患者と健常者の末梢血リンパ球遺伝子発現プロファイルの比較解析. 第 2 回東京 MS 研究会. 東京、2003.9.5.
 4. 佐藤 準一、中西 恵美、尾上 祐行、古池 史子、山村 隆：多発性硬化症患者と健常者の末梢血リンパ球遺伝子発現プロファイルの比較解析. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会. 福岡、2003.12.9.
 5. 中西 恵美、佐藤 準一、荒浪 利昌、山村 隆：ApoE 欠損マウスにおける実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の重症化. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会. 福岡、2003.12.9.
 6. 佐藤 準一、川井充、有馬邦正、山村 隆：多発性硬化症脱髄巢反応性アストロサイトにおける 14-3-3 蛋白質各アイソフォームの発現. 厚生労働省特定疾患対策研究事業免疫性神経疾患に関する調査研究班. 平成 15 年度班会議. 東京、2004. 1.28.
 7. 佐藤 準一、中西恵美、尾上祐行、古池史子、

- 山村隆：MS 患者と健常者の末梢血リンパ球遺伝子発現プロフィールの差異：MS におけるアポトーシス関連遺伝子群の発現異常. 第 16 回日本神経免疫学会学術集会. 東京、2004. 1.30.
8. 中西恵美、佐藤準一、荒浪利昌、広瀬源二郎、山村隆：MS 患者と健常者の末梢血リンパ球遺伝子発現プロフィールの差異：ApoE 欠損マウスにおける実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の重症化. 第 16 回日本神経免疫学会学術集会. 東京、2004. 1.31.
 9. 佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、古池史子、山村隆：MS におけるアポトーシス関連遺伝子群の発現異常. 第 45 回日本神経学会総会. 東京、2004. 5.12.
 10. 中西恵美、佐藤準一、荒浪利昌、広瀬源二郎、山村隆：ApoE 欠損マウスにおける EAE の重症化. 第 45 回日本神経免疫学会学術集会. 東京、2004. 5.12
 11. 佐藤準一、尾上祐行、山村隆：培養ヒトアストロサイトにおいて 14-3-3 蛋白質は vimentin および GFAP と結合する. 第 45 回日本神経病理学会総会学術研究会. 前橋、2004. 5.26
 12. 佐藤準一、山村隆、有馬邦正：多発性硬化症脱髄巣反応性アストロサイトに発現する 14-3-3 蛋白質のアストログリオーシスにおける役割. 第 21 回神経組織培養研究会 東京、2004. 9.11.
 13. Satoh J, Onoue H, Yamamura T: Upregulation of cerebellar degeneration-related genes in HEK293 cells following stable expression of the cellular prion protein. 第 47 回日本神経化学学会大会(第 27 回日本神経科学大会合同大会). Neuro2004. 大阪、2004. 9.22.
 14. 佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、古池史子、山村隆：末梢血 T 細胞の DNA マイクロアレイ解析による多発性硬化症の病型分類. 第 32 回日本臨床免疫学会総会 東京、2004. 10.8.
 15. 佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、古池史子、山村隆：末梢血 T 細胞遺伝子発現プロフィールに基づく多発性硬化症病型分類. 第 34 回日本免疫学会総会学術集会 札幌、2004. 12.1.
 16. 佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、古池史子、山村隆：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. 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. 平成 16 年度班会議. 東京、2004. 12.13.
 17. 佐藤準一：多発性硬化症テラーメイド医療に向けて. DNA マイクロアレイの可能性. こころの健康科学研究推進事業. 多発性硬化症フォーラム. 医療講演会・研究成果発表会. 東京、2004. 12.25.
 18. 佐藤準一：The 14-3-3 zeta isoform binds to heat shock protein HSP60 in human neural cells: a possible implication in prion diseases. 科学研究費補助金特定領域研究・感染の成立と宿主応答の分子基盤. 平成 16 年度 2 回全体班会議. 東京、2005. 1. 8
 19. 佐藤準一、山村隆、尾上祐行、有馬邦正：多発性硬化症脱髄巣反応性アストロサイトにおける Nogo 受容体の発現. 厚生労働省特定疾患対策研究事業 免疫性神経疾患に