

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

軸索傷害型ギラン・バレー症候群の抗神経毒素療法
の開発に関する研究

平成 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 吉良 潤一

平成 18 年 (2006) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
軸索傷害型ギラン・バレー症候群の抗神経毒素療法に関する研究	----- 1
吉良潤一	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 13
III. 研究成果の刊行物・別冊	----- 16

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書
軸索傷害型ギラン・バレー症候群の抗神経毒素療法の開発に関する研究

主任研究者 吉良 潤一 九州大学医学研究院・神経内科・教授

研究要旨

ギラン・バレー症候群(GBS)は末梢神経の脱髄性疾患では最も頻度が高い神経難病の一つである。我が国では *Campylobacter jejuni*(*C. jejuni*)感染後に起こる軸索傷害型 GBS の比率が高く、重篤な後遺症を残す例もある。近年、我々の研究グループでは、*C. jejuni*より産生されるストレス蛋白の一つである DNA-binding protein from starved cells(C-Dps 蛋白)を初めてクローニングした。これまでの GBS 病態と C-Dps 蛋白との関連の検討では、1)本蛋白に対する抗体は、*C. jejuni* 感染後 GBS 患者でのみ 62.5%の陽性率であり、呼吸器感染後 GBS 患者では認められない、2)C-Dps 蛋白はラットの脊髄前角の運動ニューロンと末梢神経の髄鞘に結合する、3)C-Dps 蛋白は sulfatide と特異的に結合する、4)C-Dps 蛋白は、NGF によりニューロンに分化誘導した PC12 細胞株に対し、濃度依存性に細胞膜を障害する、5)in vivo において、ラット坐骨神経に C-Dps 蛋白を注入した場合、伝導障害が誘導される。これらの結果は、C-Dps 蛋白が sulfatide を介して神経細胞に結合し、直接的に神経細胞を傷害しうるとを示しており、*C. jejuni*感染後 GBS の病態への C-Dps 蛋白の関与が示唆された。

本年度は、C-Dps 蛋白の末梢神経傷害のメカニズムを解明するため、シュワン細胞株に対する作用、並びに Na チャンネルに対する作用を検討した。シュワン細胞株である S16 に対して C-Dps 蛋白は結合するものの、傷害活性は認められなかった。ラット坐骨神経への神経内注入により C-Dps 蛋白は髄鞘の最外層、並びにランビエ絞輪部への沈着が認められた。通常ランビエ絞輪部に高密度に発現する Na チャンネルは、C-Dps 蛋白によりその染色性が低下し、局在変化が認められた。しかしながら、末梢神経のランビエ絞輪に局在する Nav1.6 を発現する海馬 CA1 錐体細胞での活動電位の検討では、C-Dps 蛋白を加えても変化はなく、Na チャンネルへの直接的な作用は認められなかった。C-Dps 蛋白は sulfatide と結合し、神経系への結合のパターンは抗 sulfatide 抗体での染色パターンと類似する。Sulfatide は laminin と結合することで、髄鞘と基底膜との間でアンカーとしての機能を有している。髄鞘と基底膜との相互作用の欠落は、Na チャンネルの発現低下や伝導障害を来すことが報告されており、C-Dps 蛋白による末梢神経傷害のメカニズムとしての可能性が考えられ、今後更に検討を行っていく。

分担研究者

西村泰治 熊本大学大学院医学研究科・免疫識別学・教授

鍋倉淳一 岡崎国立共同研究機構生理学研究所・発達生理学研究室・生体恒常機能発達機構部門・教授

水之江義充 九州大学大学院医学研究院・細菌学・助教授

平田和穂 九州大学大学院医学研究院・形態解析学・講師

三野原元澄 九州大学病院・神経内科学・共同研究員

A. 研究目的

近年、我々の研究グループでは *C. jejuni* の産生する DNA-binding protein from starved cells (C-Dps 蛋白) を初めてクローニングした。Dps 蛋白は、大腸菌などの微生物の産生するストレス蛋白の一つであり、微生物が酸化的ストレスや飢餓ストレスに曝された時に多量に産生される。10数 kDa の蛋白質が12量体を形成しており、鉄結合能、DNA 結合能を持ち、ストレス条件下で DNA を保護する作用を持っている。*C. jejuni* と近縁の菌種である *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) の Dps 蛋白は、好中球を活性化することが知られており、Neutrophil activation protein (HP-NAP) と呼ばれている。HP-NAP は鉄結合能はもつが、他の Dps 蛋白とは異なり DNA 結合能は無い。また、ガングリオシドと結合することが報告されている。C-Dps 蛋白は、この NAP と41% のアミノ酸一致(大腸菌の Dps 蛋白とは 24%)があり、鉄結合能はあるが DNA 結合能は無く、より NAP に性質が類似している。

ギラン・バレー症候群 (GBS) は末梢神経の脱髄性疾患では最も頻度の高い神経難病である。

なかでも、我が国や中国では *C. jejuni* 感染後に起こる軸索傷害型 GBS の頻度が高く、重篤な後遺症を残すことが知られている。本症の軸索傷害は、*C. jejuni* の lipopolysaccharide (LPS) との交差反応性により抗 GM1 抗体が誘導され軸索を傷害するという立場での研究が主流であるが、抗 GM1 抗体は、*C. jejuni* 感染後 GBS 患者全例で認められるわけではなく、また、抗 GM1 抗体は末梢神経障害のない患者でも認められる。また、抗 GM1 抗体は In vitro において、伝導ブロックを誘導しないことが報告されている。これらのことは、*C. jejuni* 感染後 GBS の病態形成が抗 GM1 抗体のみで説明することが不可能であることを示しており、他の因子の関与が考えられる。

我々はこれまでに C-Dps 蛋白と GBS 病態との関連を検討し、以下の結果を報告してきた。

- 1) 本蛋白に対する抗体は、*C. jejuni* 感染後 GBS 患者においては 62.5% の陽性率で認められるが、呼吸器感染後 GBS 患者や他の炎症性神経疾患では認められず、また、*C. jejuni* 腸炎患者においては 約 10% の陽性率で、*C. jejuni* 感染後 GBS では、有意に陽性率が高い。
- 2) C-Dps 蛋白はラット神経系に対し、中枢神経系では神経細胞の胞体、末梢神経では髄鞘に結合する。
- 3) C-Dps 蛋白は sulfatide と結合する。
- 4) NGF によりニューロンに分化誘導した PC12 細胞株に対し、膜障害を誘導する。
- 5) C-Dps をラット坐骨神経に注入することにより、伝導ブロックが誘導される。

以上のことは C-Dps 蛋白が GBS 病態と関連すること、In vitro、in vivo において直接的な神経傷害活性を持つこと示している。このことから、本年度は C-Dps 蛋白の末梢神経傷害のメカニズムを解明するため、シュワン細胞株に対する作用、並びに Na チャンネルに対する作用を検討した。

B. 研究方法

1) C-Dps 蛋白の S16 細胞株への

作用の検討:

medium 1: in DMEM

10% FCS

Penicillin-Streptomycin

N₂-medium: in DMEM/F12 (1:1) media

Insulin 5 μg/ml

Human transferrin 100 μg/ml

Progesterone 6.3ng/ml

Putrescine 16.11 μg/ml

Selenite 5.2ng/ml

Penicillin-Streptomycin

N₂-10 medium: in N₂-medium

10% FCS

シュワン細胞株である S16 を medium 1 で培養した。コラーゲンコートされた 96 穴プレートに細胞をまき、N₂-10 medium で 24 時間培養、その後 N₂-medium でさらに 72 時間培養した。各 well を PBS で洗浄し、endotoxin-free C-Dps 蛋白を 0、0.04、0.2、1、5、25 μg/ml、positive control として 1% Triton X-100 を加え、1 時間、あるいは 5 時間後に上清を採取し、LDH cytotoxicity detection kit にて遊離 LDH の測定を行った。

S16 への C-Dps 蛋白の結合を検討するため、チャンバー付きスライドグラスに S16 をまき、N₂-medium で 72 時間培養後、PBS で洗浄し、アセトンを加え(4℃、20 分)固定した。5%スキムミルク in TBS-T でブロッキング(室温、15 分)後、0.5 μg/ml の C-Dps 蛋白を加えた(室温、1 時間)。洗浄後、抗 C-Dps 抗体(25G)で incubate (室温、1 時間)し、2 次抗体として Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG を使用し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

2) C-Dps 蛋白の末梢神経への作

用の検討:

7-8 週齢のメスの Lewis rat を深麻酔下で台座に固定し、背側より両側の坐骨神経を露出した。坐骨神経へ C-Dps 蛋白を 30 μl(0.5mg/ml) 注入し、創部を閉じ、4 時間後に 2%PFA in PBS で灌流固定し坐骨神経を摘出した。コントロールとして同量の PBS 注入を行った。摘出した坐骨神経を 2%PFA in PBS で後固定(4℃、30 分)し、コラゲナーゼ type4 in PBS(1mg/ml、室温、20 分)で処理し、洗浄後解きほぐし標本を作製した。一次抗体として抗 C-Dps モノクローナル抗体(25G)、抗 Na チャンネル抗体(Sigma)、抗 Caspr 抗体(Dr. Peles, Weizmann Institute より供与)、抗 NF 抗体(Chemicon)、抗 MBP 抗体(Acris)、あるいは Biotin 標識 PNA(Vector laboratories)を用いた。二次抗体として Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG antibody、Alexa Fluor 594 anti-rabbit IgG antibody、あるいは FITC 標識 streptavidin(Immunotech)を使用し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

3) C-Dps 蛋白の Na チャンネル

への作用の検討:

出生後 12-14 日目の Wistar rat の海馬 CA1 錐体細胞を単離し、external solution (140mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM HEPES, 2mM CaCl₂, 10mM glucose: pH 7.4)内で whole-cell 法で検討を行った。ピペット溶液として、5mM KCl, 130M D-gluconate, 10mM NaCl, 10mM HEPES, 0.5 EGTA, 4mM Mg-ATP, 0.4mM Na-GTP: pH 7.4 を使用した。神経細胞を-60mV に電圧固定して、C-Dps 蛋白(0.5 μg/ml)投与による内向き電流、並びに後過分極(外向き電流)を観察した。

(倫理面への配慮)

実験に使用するラットなどの動物は、苦痛の軽減・排除の方法として十分な麻酔をしたうえで処置を行った。この実験は、九州大学医学部動物実験倫理委員会の審査を受け、「九州大学医学部における動物実験に関する指針」、「動物保護及び保管に関する法律」(法律第 105 号)及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(総理府告示第 6 号)の規制に基づいて行った。

C. 研究結果

1) C-Dps 蛋白の S16 細胞株への

作用の検討:

C-Dps 蛋白の S16 への結合の有無を検討では、C-Dps 蛋白の S16 への結合が認められた。これは PC12 細胞株と同様であり、C-Dps 蛋白が sulfatide を介して細胞膜に結合しているものと考えられた。しかしながら、C-Dps 蛋白は、前回ニューロンに分化誘導した PC12 細胞株に対しては膜を傷害し LDH の遊離を促進させたが、同濃度での S16 細胞株への傷害作用は認められなかった(図 1)。さらに C-Dps 濃度を 5 倍に、反応時間も 1 時間から 5 時間に延長した場合においても C-Dps 蛋白の S16 に対する傷害作用は認められなかった(図 1)。

2) C-Dps 蛋白の末梢神経への作

用の検討:

C-Dps を注入した坐骨神経の解きほぐし標本を、抗 C-Dps 抗体を用いて免疫染色し、その結合部位の同定を行った。C-Dps はミエリンの最外層に結合しており、PNA による染色パターンと類似し、抗 MBP 抗体により染色される compact myelin の外側に結合していた。さらに nodal gap へも C-Dps の沈着が認められた(図 2)。

ランビエ絞輪に局在する Na チャンネルの評価

を行うため、Na チャンネル、Caspr の免疫染色を行った。コントロールの標本においては、Na チャンネルはランビエ絞輪の軸索上に高密度に発現し、paranode の Caspr に挟まれて局在していた。C-Dps 注入坐骨神経において、C-Dps の沈着部位では Na チャンネルの染色性が低下していた。Na チャンネルと Caspr の二重染色では、Na チャンネルの染色性の低下に比べ、Caspr の染色性は保たれていた(図 3)。

3) C-Dps 蛋白の Na チャンネル への作用の検討;

ラット海馬 CA1 錐体細胞のパッチクランプ法を用いた活動電位と後過分極の検討では、C-Dps 蛋白を 5 μ g/ml で加えた前後において、活動電位、並びに後過分極に差は認められなかった。

D. 考察

これまでの検討では、C-Dps 蛋白はニューロンに分化誘導した PC12 細胞に対して、細胞膜に結合し傷害することが示されている。この反応は、熱により変性させた C-Dps 蛋白では認めないこと、抗 C-Dps 抗体を同時に反応させることにより抑制されることから、C-Dps 蛋白自体の持つ作用と考えられる。しかしながら、ラットの中枢や末梢の神経組織への C-Dps 蛋白の結合は、sulfatide の局在と類似し、神経細胞のみならず髄鞘へ結合が認められるため、今回シュワン細胞株である S16 に対する作用を検討した。C-Dps 蛋白は PC12 と同様に S16 への結合が認められた。しかしながら、培養上清中への遊離 LDH には影響を及ぼさず、細胞傷害活性を示さなかった。この C-Dps 蛋白の神経細胞特異的な

傷害作用は *C. jejuni* 感染後 GBS での軸索傷害に関与するのかもしれない。

In vivo でラット坐骨神経に C-Dps 蛋白を注入した場合、電気生理学的に伝導速度の遅延は認めないが、P/D 比(近位側刺激での振幅/遠位側刺激での振幅の比)の低下が認められる。今回、解きほぐし標本を作製し詳細に検討した結果、C-Dps 蛋白は髄鞘の最外層、並びにランビエ絞輪への沈着が認められた。末梢神経における Na チャンネルの発現は、ランビエ絞輪に高密度に認められる。ミエリンループと軸索との接着には Caspr が関与しており、免疫染色では Na チャンネルを挟むように Caspr が検出される。コントロールとして PBS を神経内に注入したラット坐骨神経においては、ランビエ絞輪部において、Caspr に挟まれた Na チャンネルの集簇が認められる。これに対し、C-Dps 蛋白を注入した坐骨神経においては、Na チャンネルの染色性が低下し、その輪郭も不明瞭となった(図 3)。一方、ランビエ絞輪に存在する Na チャンネルの障害は伝導障害を来すことから、パッチクランプ法を用いて検討を行った。しかしながら、末梢神経で発現する Nav1.6 を発現する海馬 CA1 錐体細胞(Nav1.1, 1.2, 1.3, 1.6 を発現)に対して C-Dps 蛋白を作用させても、電位依存性の活動電位に影響は認められなかった。他の Na チャンネルにより代償された可能性は残るものの、C-Dps 蛋白は直接的には Na チャンネルの機能を阻害しないと考えられた。

C-Dps 蛋白は sulfatide と結合し、神経系への結合のパターンは抗 sulfatide 抗体での染色パターンと類似する。Sulfatide は laminin と結合することで、髄鞘と基底膜との間でアンカーとしての機能も有する。髄鞘と基底膜との相互作用の欠落は、Na チャンネルの発現低下や伝導障害を来すことが報告されており、C-Dps 蛋白による末梢

神経障害のメカニズムとしての可能性が考えられ、更に検討を進めている。

E. 結論

C-Dps 蛋白は、in vitro において、シュワン細胞株である S16 に対し細胞傷害活性を示さない。C-Dps 蛋白は直接的な Na チャンネルへの作用は認めないものの、神経内において、ランビエ絞輪での Na チャンネルの発現を低下させた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Osoegawa M, Ochi H, Mei F-J, Minohara M, Murai H, Taniwaki T, Kira J. Th2 shift in juvenile muscular atrophy of distal upper extremity: a combined allergological and flow cytometric analysis. J Neurol Sci 228: 87-92, 2005.
- 2) Mei F-J, Ishizu T, Murai H, Osoegawa M, Minohara M, Zhang K-N, Kira J. Th1 shift in CIDP versus Th2 shift in vasculitic neuropathy in CSF. J Neurol Sci 228: 75-85, 2005.
- 3) Ishizu T, Osoegawa M, Mei F-J, Kikuchi H, Tanaka M, Takakura Y, Minohara M, Murai H, Mihara F, Taniwaki T, Kira J. Intrathecal activation of the IL-7/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. Brain 128: 988-1002, 2005.
- 4) Osoegawa M, Miyagishi R, Ochi H,

- Nakamura I, Niino M, Kikuchi S, Murai H, Fukazawa T, Minohara M, Tashiro K, Kira J. Platelet-activating factor receptor gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 161: 195-198, 2005.
- 5) Osoegawa M, Niino M, Tanaka M, Kikuchi S, Murai H, Fukazawa T, Minohara M, Miyagishi R, Taniwaki T, Tashiro K, Kira J. Comparison of the clinical course of opticospinal and conventional forms of multiple sclerosis in Japan. *Intern Med* 44: 934-938, 2005.
- 6) Matsuse D, Ochi H, Tashiro K, Nomura T, Murai H, Taniwaki T, Kira J. Exacerbation of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy during interferon β -1b therapy in a patient with childhood-onset multiple sclerosis. *Intern Med* 44: 68-72, 2005.
- 7) Yano T, Yamada K, Kimura A, Takeshita T, Minohara M, Kira J, Senju S, Nishimura Y, Tanihara H. Autoimmunity against neurofilament protein and its possible association with HLA-DRB1*1502 allele in glaucoma. *Immunol Lett* 100: 164-169, 2005.
- 8) Su J-J, Osoegawa M, Minohara M, Tanaka M, Ishizu T, Mihara F, Taniwaki T, Kira J. Upregulation of vascular growth factors in multiple sclerosis: correlation with MRI findings. *J Neurol Sci* 243: 21-30, 2006.
- 9) Mei F-J, Osoegawa M, Ochi H, Minohara M, Shi N, Murai H, Ishizu T, Taniwaki T, Kira J. Long-term favorable response to interferon beta-1b is linked to cytokine deviation toward the Th2 and Tc2 sides in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* (in press).
- 10) Yokomine K, Nakatsura T, Minohara M, Kira J, Kubo T, Sasaki Y, Nishimura Y. Immunization with heat shock protein 105-pulsed dendritic cells leads to tumor rejection in mice. *Biochem Biophys Res Comm* 28:269-278. 2006.
- 11) Ishizu T, Minohara M, Ichiyama T, Kira R, Tanaka M, Osoegawa M, Hara T, Furukawa S, Kira J. CSF cytokine and chemokine profiles in acute disseminated encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* (in press).
- 12) Hirata S, Senju S, Matsuyoshi H, Fukuma D, Uemura Y, Nishimura Y. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing MOG peptide along with TRAIL or PD-L1. *J Immunol* 174: 1888-1897, 2005.
- 13) Tosukhowong A, Nakayama J, Mizunoe Y, Sugimoto S, Fukuda D, Sonomoto K. Reconstitution and function of *Tetragenococcus halophilus* chaperonin 60 tetradecamer. *J Biosci Bioeng* 99: 30-37, 2005.
- 14) Mizunoe Y, Wai SN. Survival and Death in Bacteria: Biofilm formation and entry into viable but nonculturable (VBNC) state - Survival strategy under stress conditions. Yamada M. (eds.) pp225-246 *Research Signpost, Kerala* 2005.
- 15) Maeyama R, Kwon K, Mizunoe Y, Anderson JM, Tanaka M, Matsuda T. Novel

- bactericidal surface: catechin-loaded surface-erodable polymer prevents biofilm formation. *J Biomed Mater Res* 75: 146-155, 2005.
- 16) Kikuchi T, Mizunoe Y, Takade A, Naito S, and Yoshida S. Curli Fibers Are Required for Development of Biofilm Architecture in *Escherichia coli* K-12 and Enhance Bacterial Adherence to Human Uroepithelial Cells. *Microbiol Immunol* 49:875-884, 2005.
- 17) Balsalobre C, Silván JM, Berglund S, Mizunoe Y, Uhlin BE, and Wai SN. Release of the type I secreted α -haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 59: 99-112, 2006.
- 18) Kanamaru S, Kurazono H, Mizunoe Y, Terai A, Monden K, Kumon H, Ogawa O, Yamamoto S. Increased biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from acute prostatitis. *Int J Antimicrob Agent* (in press)
- 19) Koga H, Ishibashi H, Shimada Y, Nishitani T, Nabekura J. Activation of presynaptic GABAA receptors increases spontaneous glutamate release on to noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus. *Brain Res* 1046: 24-31, 2005.
- 20) Nakamura T, Jeromin A, Smith G, Kurushima H, Koga H, Nakapeppu Y, Wakabayashi S, Nabekura J. Novel role of neuronal Ca^{2+} sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons. *J Cell Biol* 172: 1081-1091, 2006.
- 21) Matsumoto N, Noda E, Nabekura J. Run down of GABAergic depolarization during metabolic inhibition of rat hippocampal CA1 neurons. *Life Science* (in press).
- 22) Matsumoto K, Morisaki T, Kuroki H, Kubo M, Onishi H, Nakamura K, Nakahara C, Kuga H, Baba E, Nakamura M, Hirata K, Tanaka M, Katano M. Exosomes secreted from monocyte-derived dendritic cells support in vitro naive $CD4^{+}$ T cell survival through NF- κ B activation. *Cellular Immunol* 231: 20-29, 2005.
- 23) Hirata M, Hirata K, Hara T, Kawabuchi M, Fukuma T. Expression of TGF- β -like molecules in the life cycle of *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Res* 95: 1432-1955, 2005.
- 24) Liu W, Hirata K, Kawabuchi K. Occurrence of nitric oxide synthase-containing axonal baskets surrounding large neurons in rat dorsal root ganglia after sciatic nerve ligation. *Arch Histol Cytol* 68: 29-40, 2005.
- 25) Miyazaki M, Nakatsura T, Yomine K, Senju S, Monji M, Hosaka S, Komori H, Yoshitake Y, Motomura Y, Minohara M, Kubo T, Ishihara K, Hatayama T, Ogawa M, Nishimura Y. DNA vaccination of HSP105 leads to tumor rejection of colorectal cancer and melanoma in mice through activation of both $CD4^{+}$ T cells and $CD8^{+}$ T cells. *Cancer Sci* 96: 695-705, 2005.

2. 学会発表

- 1) 李巍、三野原元澄、小副川学、石津尚明、

- 村井弘之、吉良潤一; 日本人多発性硬化症における *Helicobacter pylori* 感染の意義: 第17回 日本神経免疫学会・学術集会 (東京) 2005, 3月
- 2) 小副川学、宮岸隆司、越智博文、新野正明、中村一太、菊地誠志、村井弘之、深澤俊行、三野原元澄、田代邦雄、吉良潤一; 多発性硬化症の病型と血漿型 PAF-AH/PAF 受容体遺伝子多型についての検討: 第17回 日本神経免疫学会・学術集会 (東京) 2005, 3月
- 3) 朴華、三野原元澄、石津尚明、小副川学、村井弘之、水之江義充、吉良潤一; *Campylobacter jejuni* 由来 Dps 蛋白による末梢神経伝導傷害: 第17回 日本神経免疫学会・学術集会 (東京) 2005, 3月
- 4) 孫曉嘉、三野原元澄、田中正人、石津尚明、小副川学、村井弘之、下川博明、吉良潤一; Rho kinase inhibitor による実験的自己免疫性脳脊髄炎の治療: 第17回 日本神経免疫学会・学術集会 (東京) 2005, 3月
- 5) 蘇真真、小副川学、田中正人、三野原元澄、石津尚明、村井弘之、吉良潤一; 多発性硬化症における血管関連因子の関与: VEGF は脊髄病巣の大きさと精巣関する: 第17回 日本神経免疫学会・学術集会 (東京) 2005, 3月
- 6) 三野原元澄、石津尚明、市山高志、吉良龍太郎、田中正人、小副川学、原寿郎、古川漸、吉良潤一; 急性散在性脳脊髄炎の髄液サイトカイン・ケモカインプロファイル: 第17回 日本神経免疫学会・学術集会 (東京) 2005, 3月
- 7) 梅風君、小副川学、越智博文、三野原元澄、村井弘之、吉良潤一; 多発性硬化症における長期間 IFN β -1b 投与に伴う末梢血 T 細胞内サイトカインの変動の意義: 第17回 日本神経免疫学会・学術集会 (東京) 2005, 3月
- 8) 水之江義充、高出明美; 大腸菌の新溶血素 ClyA (pore-forming cytolysin) の分泌とアセンブリの機構: 第78回 日本細菌学会 (東京) 2005, 4月
- 9) 高屋明子、水之江義充 (他5名); サルモネラの OMV を介したマクロファージ内増殖機構: 第78回 日本細菌学会 (東京) 2005, 4月
- 10) 田中正人、石津尚明、小副川学、三野原元澄、菊池仁志、吉良潤一; 運動ニューロン疾患患者髄液中のサイトカイン/ケモカインの多項目同時測定による解析: 第46回 日本神経学会総会 (鹿児島) 2005, 5月
- 11) 朴華、三野原元澄、後藤純信、水之江義充、吉良潤一; *Campylobacter jejuni* 由来 Dps 蛋白による末梢神経障害の検討: 第46回 日本神経学会総会 (鹿児島) 2005, 5月
- 12) 三野原元澄、石津尚明、小副川学、田中正人、梅風君、吉良潤一; 多発性硬化症における髄液 IL-17, IL-8 と総合障害度・MRI 脊髄病巣の相関: 第46回 日本神経学会総会 (鹿児島) 2005, 5月
- 13) 蘇真真、小副川学、三野原元澄、田中正人、石津尚明、村井弘之、吉良潤一; 多発性硬化症における血管関連因子の検討: 第46回 日本神経学会総会 (鹿児島) 2005, 5月
- 14) 李巍、三野原元澄、小副川学、吉良潤一; 日本人多発性硬化症における *Helicobacter pylori* に対する免疫応答の検討: 第46回 日本神経学会総会 (鹿児島) 2005, 5月
- 15) 孫曉嘉、三野原元澄、下川宏明、吉良潤一; Rho-kinase 阻害薬による実験的自己免

- 疫性脳脊髄炎の治療効果:第 46 回 日本神経学会総会(鹿児島)2005. 5 月
- 16) 石津尚明、三野原元澄、市山高志、吉良龍太郎、田中正人、小副川学、吉良潤一; 急性散在性脳脊髄炎での髄液サイトカイン・ケモカイン多項目測定による免疫病対の検討:第 46 回 日本神経学会総会(鹿児島)2005. 5 月
- 17) 和気弘明、渡部美穂、鍋倉淳一; 神経特異的 KCC2(K⁺-Cl⁻ cotransporter)のリン酸化と神経細胞酸化ストレス時における GABA 作用の経時的変化:第 52 回 中部日本生理学会(名古屋)2005, 9 月
- 18) Mizunoe Y; Bio-safety and microorganisms. Second International Conference of Bio-terrorism (Moscow) 2005, October
- 19) Minohara M, Sun X, Tanaka M, Ishizu T, Shimokawa H, Kira J; Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by Rho kinase inhibitor. 18th World Congress of Neurology (Sydney, Australia) 2005, November
- 20) Pineda A, Kira J, Tobimatsu S, Ogata K, Osoegawa M; The role of evoked potentials in detecting subclinical CNS involvement in CIDP. 18th World Congress of Neurology (Sydney, Australia) 2005, November
- 21) Pineda A, Kira J, Minohara M; The effect of Rho-kinase inhibitor Fasudil in the clinical course of EAN (experimental autoimmune neuritis). 18th World Congress of Neurology (Sydney, Australia) 2005, November
- 22) Watanabe M, Wake H, Nabekura J; Phosphorylation by tyrosine kinase regulates the functional expression of neuron-specific K⁺-Cl⁻ cotransporter, KCC2. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting (Washington, DC, USA) 2005, November
- 23) Wake H, Watanabe M, Nabekura J; Time course of the functional loss of KCC2 in neuronal damage. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting (Washington, DC, USA) 2005, November
- 24) Yamada K, Wake H, Watanabe M, Takada K, Matsukawa N, Yamawaki T, Nabekura J, Ojika K; Neuronal expressions of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein follow hippocampal neuronal damage in vitro. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting (Washington, DC, USA) 2005, November
- 25) 朴華、三野原元澄、石津尚明、小副川学、村井弘之、水之江義充、吉良潤一; *Campylobacter jejuni* 由来 Dps 蛋白による Na⁺ チャンネルの障害:第 18 回 日本神経免疫学会・学術集会(名古屋)2006, 3 月
- 26) 三野原元澄、李巍、松岡健、石津尚明、小副川学、村井弘之、吉良潤一; 日本人多発性硬化症における血清 myeloperoxidase 値の上昇:第 18 回 日本神経免疫学会・学術集会(名古屋)2006, 3 月
- 27) 孫曉嘉、三野原元澄、菊池仁志、田中正人、石津尚明、下川宏明、吉良潤一; Rho kinase 阻害剤による実験的自己免疫性脳脊髄炎の再発抑制:第 18 回 日本神経免疫学会・学術集会(名古屋)2006, 3 月
- 28) Arnold Pineda、三野原元澄、孫曉嘉、石津尚明、下川宏明、吉良潤一; 実験的自己免疫性神経炎に対する Rho kinase inhibitor の作用:第 18 回 日本神経免疫学会・学術

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

图1

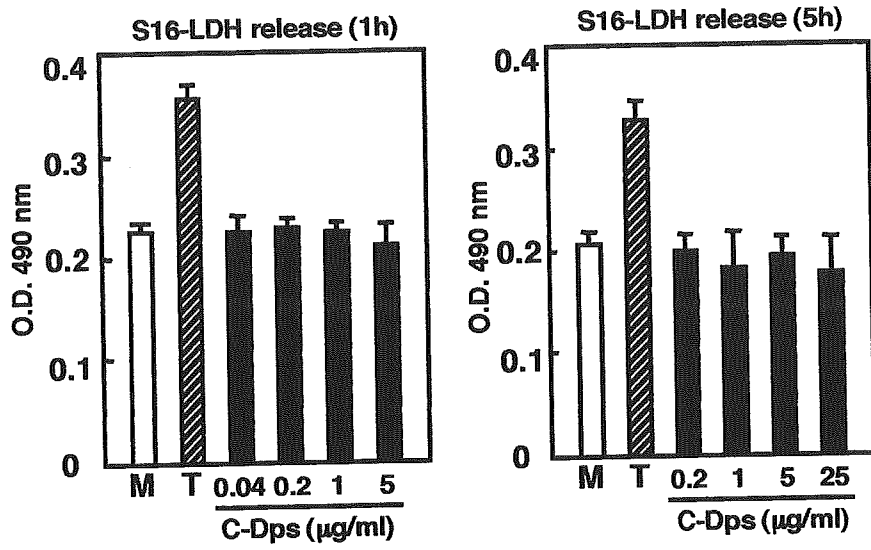
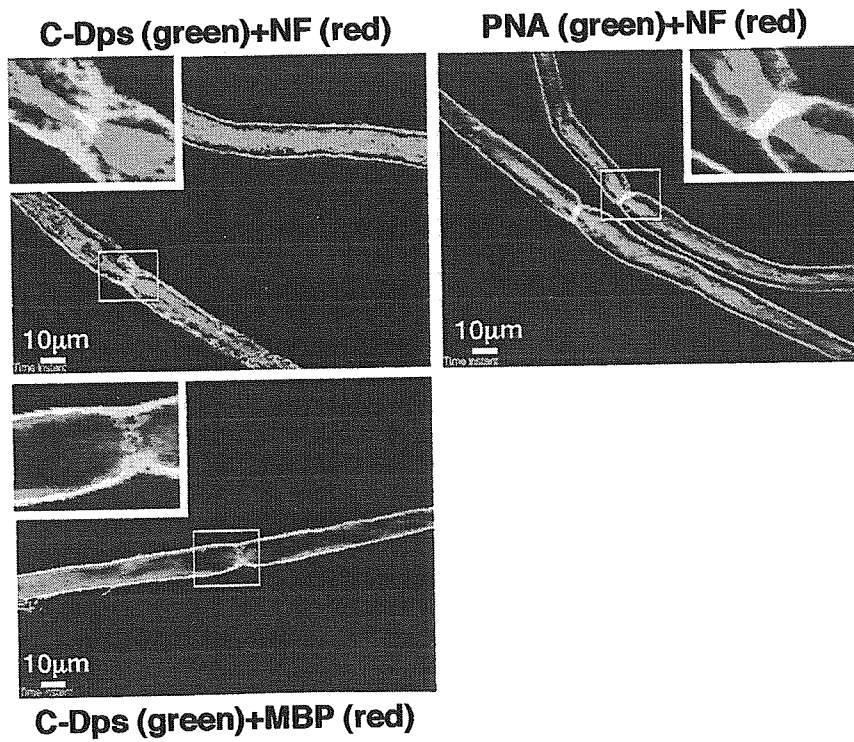
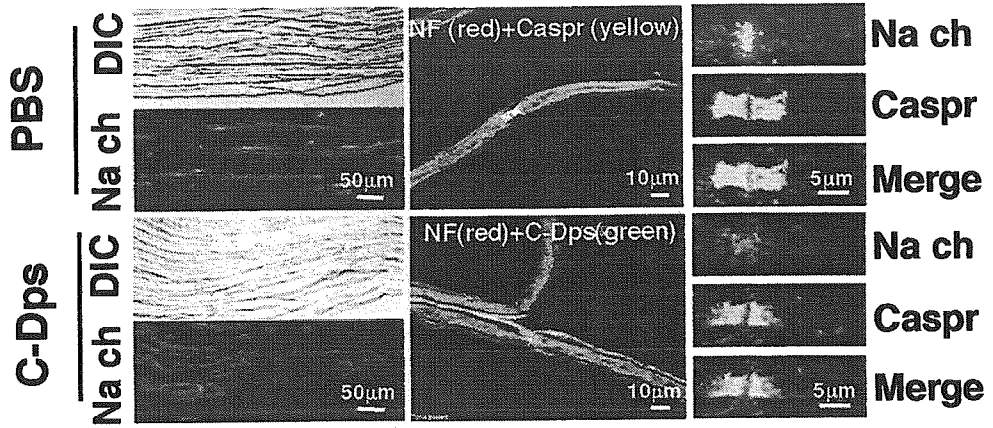


图2



3



研究成果の刊行に関する一覧表

発作者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Osoegawa M, Ochi H, Mei F-J, <u>Minohara M</u> , Murai H, Taniwaki T, <u>Kira J</u>	Th2 shift in juvenile muscular atrophy of distal upper extremity: a combined allergological and flow cytometric analysis.	J Neurol Sci	228	87-92	2005
Mei F-J, Ishizu T, Murai H, Osoegawa M, <u>Minohara M</u> , Zhang K-N, <u>Kira J</u> .	Th1 shift in CIDP versus Th2 shift in vasculitic neuropathy in CSF.	J Neurol Sci	228	75-85	2005
Hirata S, Senju S, Matsuyoshi H, Fukuma D, Uemura Y, <u>Nishimura Y</u>	Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing MOG peptide along with TRAIL or PD-L1.	J Immunol	174	1888-1897	2005
Hirata M, <u>Hirata K</u> , Hara T, Kawabuchi M, Fukuma T	Expression of TGF-beta-like molecules in the life cycle of Schistosoma japonicum.	Parasitology Research	online	1432-1955	2005
Liu W, <u>Hirata K</u> , Kawabuchi K	Occurrence of nitric oxide synthase-containing axonal baskets surrounding large neurons in rat dorsal root ganglia after sciatic nerve ligation.	Arch Histol Cytol	68	29-40	2005
Ishizu T, Osoegawa M, Mei F-J, Kikuchi H, Tanaka M, Takakura Y, <u>Minohara M</u> , Murai H, Mihara F, Taniwaki T, <u>Kira J</u>	Intrathecal activation of the IL-7/IL-8 axis in optico-spinal multiple sclerosis.	Brain	128	988-1002	2005
Osoegawa M, Miyagishi R, Ochi H, Nakamura I, Niino M, Kikuchi S, Murai H, Fukazawa T, <u>Minohara M</u> , Tashiro K, <u>Kira J</u> .	Platelet-activating factor receptor gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis.	J Neuroimmunol	161	195-198	2005
Osoegawa M, Niino M, Tanaka M, Kikuchi S, Murai H, Fukazawa T, <u>Minohara M</u> , Miyagishi R, Taniwaki T, Tashiro K, <u>Kira J</u>	Comparison of the clinical course of optico-spinal and conventional forms of multiple sclerosis in Japan.	Intern Med	44	934-938	2005

Matsuse D, Ochi H, Tashiro K, Nomura T, Murai H, Taniwaki T, <u>Kira J</u>	Exacerbation of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy during interferon β -1b therapy in a patient with childhood-onset multiple sclerosis.	Intern Med	44	68-72	2005
Yano T, Yamada K, Kimura A, Takeshita T, Minohara M, <u>Kira J</u> , Senju S, <u>Nishimura Y</u> , Tanihara H	Autoimmunity against neurofilament protein and its possible association with HLA-DRB1*1502 allele in glaucoma.	Immunol Lett	100	164-169	2005
Tosukh Wong A, Nakayama J, <u>Mizunoe Y</u> , Sugimoto S, Fukuda D, Sonomoto K	Reconstitution and function of <i>Tetragenococcus halophilus</i> chaperonin 60 tetradecamer.	J Biosci Bioeng	99	30-37	2005
<u>Mizunoe Y</u> , Wai SN	Survival and Death in Bacteria: Biofilm formation and entry into viable but nonculturable (VBNC) state, In Yamada M. (eds.) Survival strategy under stress conditions.	Research Signpost, Kerala		225-246	2005
Maeyama R, Kwon K, <u>Mizunoe Y</u> , Anderson JM, Tanaka M, Matsuda T	Novel bactericidal surface: catechin-loaded surface-erodable polymer prevents biofilm formation.	J Biomed Mater Res	75	146-155	2005
Kikuchi T, <u>Mizunoe Y</u> , Takade A, Naito S, and Yoshida S	Curli Fibers Are Required for Development of Biofilm Architecture in <i>Escherichia coli</i> K-12 and Enhance Bacterial Adherence to Human Uroepithelial Cells.	Microbiol Immunol	49	875-884	2005
Koga H, Ishibashi H, Shimada Y, Nishitani T, <u>Nabekura J</u>	Activation of presynaptic GABAA receptors increases spontaneous glutamate release on to noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus.	Brain Res	1046	24-31	2005
Matsumoto K, Morisaki T, Kuroki H, Kubo M, Onishi H, Nakamura K, Nakahara C, Kuga H, Baba E, Nakamura M, <u>Hirata K</u> , Tanaka M, Katano M	Exosomes secreted from monocyte-derived dendritic cells support in vitro naive CD4+ T cell survival through NF-kB activation.	Cellular Immunol	231	20-29	2005
Miyazaki M, Nakatsura T, Yomine K, Senju S, Monji M, Hosaka S, Komori H, Yoshitake Y, Motomura Y, <u>Minohara M</u> , Kubo T, Ishihara K, Hatayama T, Ogawa M, <u>Nishimura Y</u>	DNA vaccination of HSP105 leads to tumor rejection of colorectal cancer and melanoma in mice through activation of both CD4 T cells and CD8 T cells.	Cancer Sci	96	695-705	2005
Su J-J, Osoegawa M, <u>Minohara M</u> , Tanaka M, Ishizu T, Mihara F, Taniwaki T, <u>Kira J</u>	Upregulation of vascular growth factors in multiple sclerosis: correlation with MRI findings.	J Neurol Sci	243	21-30	2006
Mei F-J, Osoegawa M, Ochi H, <u>Minohara M</u> , Shi N, Murai H, Ishizu T, Taniwaki T, <u>Kira J</u>	Long-term favorable response to interferon beta-1b is linked to cytokine deviation toward the Th2 and Tc2 sides in Japanese	J Neurol Sci		In press	

	patients with multiple sclerosis.					
Yokomine K, Nakatsura T, Minohara M, Kira J, Kubo T, Sasaki Y, Nishimura Y	Immunization with heat shock protein 105-pulsed dendritic cells leads to tumor rejection in mice.	Biochem Res Comm	28	269-278	2006	
Ishizu T, Minohara M, Ichiyama T, Kira R, Tanaka M, Osoegawa M, Hara T, Furukawa S, Kira J	CSF cytokine and chemokine profiles in acute disseminated encephalomyelitis.	J Neuroimmunol		In press		
Balsalobre C, Silván JM, Berglund S, Mizunoe Y, Uhlin BE, and Wai SN	Release of the type I secreted α -haemolysin via outer membrane vesicles from <i>Escherichia coli</i> .	Mol Microbiol	59	99-112	2006	
Kanamaru S, Kurazono H, Mizunoe Y, Terai A, Monden K, Kumon H, Ogawa O, Yamamoto S	Increased biofilm formation in <i>Escherichia coli</i> isolated from acute prostatitis.	Int J Antimicrob Agent		In press		
Nakamura T, Jeromin A, Smith G, Kurushima H, Koga H, Nakapeppu Y, Wakabayashi S, Nabekura J	Novel role of neuronal Ca ²⁺ sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons.	J Cell Biol	172	1081-1091	2006	
Matsumoto N, Noda E, Nabekura J	Run down of GABAergic depolarization during metabolic inhibition of rat hippocampal CA1 neurons.	Life Science		In press		

研究成果の刊行物

Th2 shift in juvenile muscular atrophy of distal upper extremity: a combined allergological and flow cytometric analysis

Manabu Osoegawa, Hirofumi Ochi, Feng-Jun Mei, Motozumi Minohara, Hiroyuki Murai,
Takayuki Taniwaki, Jun-ichi Kira*

Department of Neurology, Neurological Institute, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

Received 26 March 2004; received in revised form 1 October 2004; accepted 14 October 2004
Available online 24 November 2004

Abstract

Juvenile muscular atrophy of the distal upper extremity (JMADUE) is considered to be a type of flexion myelopathy; however, we recently reported cases of JMADUE associated with airway allergy successfully treated by plasma exchange. To further characterize the allerge-immunological features of JMADUE, 11 consecutive JMADUE patients in the neurology clinic at Kyushu University Hospital were studied. Past and present together with family histories of common allergic disorders were investigated. Total serum IgE was measured by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and allergen-specific IgE by a liquid phase enzyme immunoassay. Intracellular interferon (IFN) γ -, interleukin (IL)-4-, IL-5- and IL-13-producing T cells in peripheral blood were analyzed by flow cytometry. Data from 42 healthy subjects were used as controls for allergological studies. Flow cytometric data from 21 healthy subjects were also used for comparison. The patients exhibited significantly higher frequencies of coexisting airway allergies such as allergic rhinitis ($p=0.0057$) and pollinosis ($p=0.0064$), family histories of allergic disorders ($p=0.0075$), and mite antigen specific IgE ($p=0.0361$) compared with the healthy subjects. Patients with JMADUE had a significantly higher percentage of IFN γ ⁻IL-4⁺CD4⁺T cells ($p=0.0017$), but not IL-5- or IL-13-producing CD4⁺T cells, and a reduced intracellular IFN γ /IL-4 ratio in CD4⁺T cells ($p=0.002$) compared to the controls. These findings suggest that JMADUE has a significant T helper 2 (Th2) shift, which may in part contribute to the development of spinal cord damage.
© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Flow cytometry; Hirayama disease; Atopy; IgE

1. Introduction

Juvenile muscular atrophy of the distal upper extremity (JMADUE), or Hirayama disease, is a rare disease that affects adolescents and is characterized by unilateral or asymmetric muscular atrophy and weakness in the hand and forearm [1,2]. The disease initially develops progressively, but is followed by spontaneous arrest several years after onset. The precise mechanism of this condition remains unclear, although contributing factors include a mechanical force pressing on the lower cervical cord and some microcirculatory deficiencies [1,3]. We have recently shown that this condition is closely associated with airway

allergies, such as allergic rhinitis and bronchial asthma [4], and reported two cases associated with an airway allergy that were successfully treated by plasma exchange [5]. These reports indicate that atopy and its related immune aberration may contribute to the development of this condition.

In immune mediated diseases, the T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cytokine balance plays a critical role [6]. The cytokine balance in JMADUE has not been reported. Therefore, in the present study, we aimed to determine the Th1/Th2 balance by flow cytometrically measuring the percentage of intracellular interferon (IFN) γ -, interleukin (IL)-4-, IL-5- and IL-13-producing T cells in peripheral blood CD4⁺T cells and CD8⁺T cells, and to clarify coexistent allergic conditions in 11 consecutive patients with JMADUE.

* Corresponding author. Tel.: +81 92 642 5340; fax: +81 92 642 5352.
E-mail address: kira@neuro.med.kyushu-u.ac.jp (J. Kira).

2. Subjects and methods

2.1. Subjects

Eleven consecutive patients exhibiting JMADUE (two women and nine men, mean age 18 (range 13–22) years at the time of examination in the neurology clinic at Kyushu University Hospital) were enrolled in this study. Patients one through five were the same as those in a previous report [4].

2.2. Methods

Cervical MRI was performed in a neutral, and fully flexed position to examine the forward displacement of the dural sac and flattening of the lower cervical cord. All patients were questioned about their history of allergic disorders, such as bronchial asthma, allergic rhinitis, pollinosis, atopic dermatitis, allergic conjunctivitis, urticaria, and allergies to food, metals and drugs. Total serum IgE levels were measured by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and specific IgE to antigens such as *Dermatophagoides (D.) farinae*, *D. pteronyssinus*, cedar pollen, *Candida*, egg white, milk, wheat, rice, and soya bean were measured by a liquid phase enzyme immunoassay (Ala-STAT, Sankoujyaku, Tokyo, Japan). A serum IgE concentration higher than 250 U/ml was considered to be hyperIgEaemia, and a cut off value for allergen specific IgE was set at 0.34 IU/ml in accordance with the manufacturer's instruction. The frequency of coexisting allergic disorders, hyperIgEaemia and allergen specific IgE, was determined by comparison with neurologically normal control data of 42 co-workers in the neurology clinic at Kyushu University Hospital, after obtaining their informed consent (mean age \pm S.D. = 34.0 ± 8.3 years, 22 male and 20 females).

Intracellular IFN γ , IL-4, IL-5 and IL-13 production from peripheral blood CD4⁺ and CD8⁺T cells were analyzed as described previously [7,8]. Briefly, peripheral blood-derived mononuclear cells were treated for 4 h with 25 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 1 μ g/ml of ionomycin (Sigma) in the presence of 10 μ g/ml brefeldin A (Sigma). After washes with phosphate-buffered saline containing 0.1% bovine serum albumin (0.1% BSA-PBS), the cells were stained with PerCP-conjugated anti-CD4 (13B8.2, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) or anti-CD8 (1B9.2, Becton Dickinson) monoclonal antibody in the dark for 15 min at room temperature. Cells were washed twice, permeabilized with FACS permeabilizing solution (Becton Dickinson) and incubated with FITC-conjugated anti-IFN γ (clone 25723.11, Becton Dickinson) and PE-conjugated anti-IL-4 (clone 3010.211, Becton Dickinson), or either anti-IL-5 (JES1-39D10, PharMingen, San Diego, CA) or anti-IL-13 (JES10-5A2, PharMingen) monoclonal antibody in the dark at room temperature for 30 min. Correspond-

ing isotype-matched antibodies were used as negative controls. As the last step, cells were washed with 0.1% BSA-PBS and resuspended in 1% paraformaldehyde for subsequent two-color flow cytometric analysis using an Epics XL System II (Coulter, Hialeah, FL, USA). Ten thousand events per lymphocyte were acquired and analyzed. Analysis gates were set on lymphocytes according to the forward and side scatter properties and then further gated on CD4⁺ and CD8⁺ cells, respectively. CD8⁺ cells were divided into CD8^{high} and CD8^{low} [7]. Many CD8^{low} cells expressed both CD16 and CD56 and, therefore, were considered to be natural killer cells. In contrast, virtually all CD8^{high} cells expressed CD3 but not CD16 (data not shown). We therefore defined CD8^{high} cells as CD8⁺T cells. Flow cytometric data from patients with JMADUE was compared with data of 21 neurologically normal control subjects (30.5 ± 6.2 years, 13 males and 9 females).

Statistical analysis for cell percentage comparison was performed using the Bonferroni/Dunn test with one-way factorial ANOVA. Either the chi-square test or Fisher's exact test (when the criteria of the chi-square test was not fulfilled) was used for the analysis of the frequency of atopic disorders, hyperIgEaemia and allergen-specific IgE.

3. Results

3.1. Clinical findings

During the 6-year analysis period, 11 consecutive patients (2 women and 9 men) exhibiting JMADUE were seen at our Institute (Table 1). The age of onset ranged from 12 to 18 years old (15.8 ± 1.9), and the duration of the disease was 3 months to 7 years (2.5 ± 1.9 years) at the time of examination. All showed gradual onset of unilateral or asymmetrical muscular atrophy and weakness in the distal parts of their upper extremities. Needle electromyogram revealed either on-going or chronic denervation potentials in the affected muscles of all patients. Cerebrospinal fluid examinations were all normal in the six patients who underwent lumbar puncture in our clinic. Cervical MRIs in a neutral position were normal, except for patient 6 who exhibited a high intense lesion in the left anterior horn on T2-weighted images at the C5-6 spine level not enhanced by gadolinium-DTPA. Cervical MRI in a fully flexed position of the neck showed 10 patients with a flattening of the lower cervical cord, but of these only six exhibited forward displacement of the dural sac together with an intense crescent-shaped signal behind the cord. One patient (patient 11) showed neither cord flattening nor a crescent-shaped signal. Two patients (patients 6 and 9) responded to plasma exchange and have been reported elsewhere [5].