

# MRI 拡散テンソルトレースヒストグラムによる 多発性硬化症患者の経時的解析

分担研究者 田中恵子<sup>1)</sup>

共同研究者 寺島健史<sup>1)</sup>、西澤正豊<sup>1)</sup>、田中正美<sup>2)</sup>、松澤等<sup>3)</sup>、中田力<sup>3)</sup>

## 研究要旨

再発寛解型 MS (RRMS) 患者 3 名 (インターフェロン[IFN] $\beta$ -1b 未使用 1 名, 使用 2 名) を対象に MRI 拡散テンソルトレースヒストグラム解析による normal-appearing gray/white matter (NAGM/NAWM) 障害の経時的変化について検討を行った。エコープラナー法による拡散テンソル画像を撮像し, 各ピクセルの拡散テンソル解析を行い, ラムダ・チャート解析法により NAGM/NAWM のピクセル群を分離したのち, 各群について平均拡散係数 (トレース) のヒストグラムを作成した。同一対象者において 1.0 年後~2.3 年後に再検査を行い, ヒストグラムの経時的変化を観察した。その結果, IFN $\beta$ -1b 未使用の RRMS 患者ではヒストグラムの右方移動を認めしたが, IFN $\beta$ -1b 使用を開始した 2 名ではヒストグラムの右方移動は認められなかった。今回の結果は, 拡散テンソルトレースヒストグラムの経時的解析により, MS での通常の画像ではとらえにくい緩徐な NAGM/NAWM の障害進行が同定可能であり, IFN $\beta$ -1b 使用によりこの障害進行が抑制される可能性があることを示唆している。

## 研究目的

われわれは, 平成 15 年度班会議にて MRI 拡散テンソルトレースヒストグラムを用い, 多発性硬化症 (MS) 患者の normal-appearing gray/white matter (NAGM/NAWM) の障害を定量的に評価する手法を発表した。

今回は, その手法を同一対象者に経時的に行うことにより, MS の自然経過による NAGM/NAWM の障害進行が同定できるか, インターフェロン (IFN)  $\beta$ -1b の投与によりこの障害進行に変化が認められるかどうかについて検討を行った。

- 1) 新潟大学脳研究所神経内科
- 2) 国立病院機構宇多野病院神経内科
- 3) 新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター

## 研究方法

[対象] 再発寛解型 MS (RRMS) 患者 3 名のうち, 再発寛解型多発性硬化症患者 3 名のうち, IFN $\beta$ -1b (ベタフェロン®) 800 万単位隔日皮下注を行っている患者 2 名と未導入の患者 1 名。その他疾患対照として, ステロイド依存性慢性進行性神経ベーチェット病患者 1 名。

### [方法]

1. MRI 撮像: 当センター 3 テスラ機によりスピンエコーエコープラナー法による拡散テンソル画像を撮像した。
2. データ解析: 側脳室体部および放線冠を含む 1 スライスにおいて, すべてのピクセルの拡散テンソル解析を行い, ラムダ・チャート法に

より、NAGM/NAWM を分離し、分離された NAGM/NAWM 各ピクセル群のトレース (3つの固有値の和で平均拡散係数の3倍) のヒストグラムを作成した。同一対象者において1.0年後～2.3年後に再度撮像・解析を行い、ヒストグラムの経時的変化を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究は、新潟大学の倫理規定を遵守して行った。患者さんからはインフォームド・コンセントを得、同意を得られた場合にのみ研究をおこなった。

### 研究結果

1. IFN $\beta$ -1b 未使用 MS 患者：1年後のトレースヒストグラムはわずかながら全体に右方移動しており、通常の MRI 画像においては変化を認めないものの、NAGM/NAWM における障害が進行している可能性が高いと考えた (図1)。

2. IFN $\beta$ -1b 使用 MS 患者：2名患者ともそれぞれ1.2年、2.3年後のトレースヒストグラムでは右方移動は認められなかった (図2)。

3. 慢性進行性ベーチェット病患者：1.3年後のトレースヒストグラムでは、NAGM/NAWM ともに右への移動が認められ、緩徐進行性の臨床経過と合致していた。

### 結論

今回の結果は、IFN $\beta$ -1b により MS 患者 NAGM/NAWM の自然経過による障害進行が抑制される可能性を示唆している。MS における IFN $\beta$ -1b の治療効果判定において拡散テンソルトレースヒストグラムの経時的解析が有用である可能性が示された。

健康危険情報：なし

知的財産権の出願・登録状況：特許取得/実用新案登録：なし

図1 IFN  $\beta$ -1b 未使用 RRMS 患者の1.0年後の経時的変化 (25歳女)

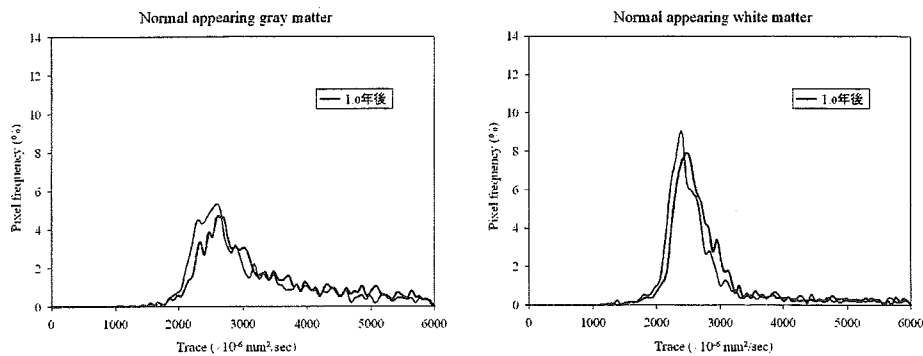
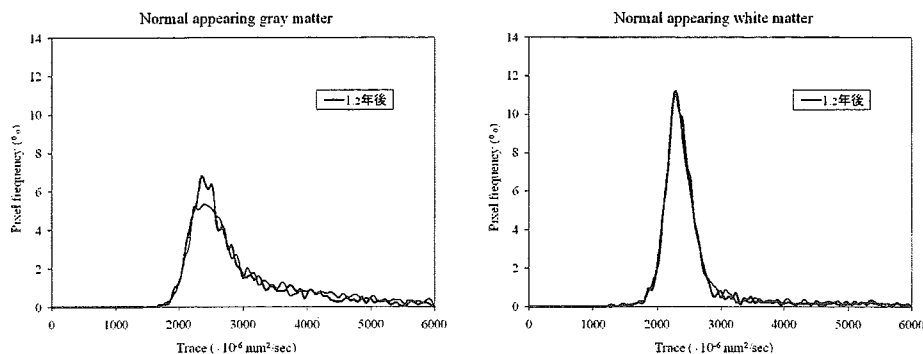


図2 IFN  $\beta$ -1b 使用 RRMS 患者の経時的変化 (26歳男, ベタフェロン開始直前と1.2年後の)



## 神経症状が先行する神経ベーチェット病と多発性硬化症の鑑別-脳幹、視床、基底核、大脳白質病変を呈した HLA-B51 陽性症例の検討-

分担研究者 郡山達男<sup>1)</sup>

共同研究者 池田順子<sup>2)</sup>、今村栄次<sup>2)</sup>、時信 弘<sup>2)</sup>、原田 暁<sup>3)</sup>、檜垣雅裕<sup>1)</sup>、  
松本昌泰<sup>1)</sup>

### 研究要旨

神経症状が先行する神経ベーチェット病 (NBD) の診断は非常に難しく、多発性硬化症 (MS) との鑑別が最も問題になるが、臨床の場では迅速な診断、治療が求められる。本研究はこれらの症例の臨床、検査所見、治療反応性の特徴を明らかにすることを目的とした。対象は多発性硬化症類似の臨床経過をとり画像所見等から NBD が疑われるが、ベーチェット病とは診断されていない 4 例 (男性 3 例、女性 1 例; 発症年齢 17 歳、26 歳、54 歳、68 歳) である。全例で口腔粘膜の再発性アフタの既往があるが、その他の BD に特徴的な粘膜、皮膚、眼症状を発現していなかった。神経学的には脳幹・小脳症状、中枢性運動麻痺、精神症状の頻度が高かった。HLA-B51 は全例で陽性であった。髄液 IL-6 は 4 例中 3 例で血清基準値より上昇していた。MRI の T2 強調画像と FLAIR 画像で大脳白質、脳幹、視床、基底核、大脳皮質に高信号域を認めた。若年発症例はステロイド治療では短期間に再発を繰り返したが、メトトレキサート (MTX) 少量パルス療法にて再発が抑制された。1 例で髄液 IL-6 を経時的に測定したところ、MTX 投与で再発が抑制されるとともに髄液 IL-6 の低下を認めた。MS 類似の経過をとり MS として典型的でない所見がある HLA-B51 陽性例は NBD の可能性があり、髄液 IL-6 測定が治療効果判定に有用である。

### 研究目的

神経ベーチェット病 (NB) の診断はベーチェット病 (BD) の発現よりも神経症状が先行する場合は苦慮する。さらに NB は多発性硬化症 (MS) との鑑別が最も問題になる。そこで、本研究では、神経症状が先行する NB 症例を迅速に診断し治療するために、これらの症例

の臨床、検査所見の特徴を明らかにすることを企図した。

### 研究方法

対象は県立広島病院神経内科で経験した、MS 類似の臨床経過をとり画像所見等から NB が疑われるが、BD とは診断されていない 4 例である。これらの症例の臨床症状、画像所見、血液、髄液検査所見、治療反応性について検討した。

- 
- 1) 広島大学大学院脳神経内科学
  - 2) 県立広島病院神経内科
  - 3) 国立病院機構柳井病院神経内科

(倫理面への配慮) 本研究は厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針を遵守して行った。患者さんからはインフォームド・コンセントを得て、同意を得られた場合にのみ研究をおこなった。個人の情報は決して表に出ることがないように細心の注意を払い、プライバシーの保護には十分に配慮した。

## 研究結果

4例の性別は男性3例、女性1例、発症年齢は17歳、26歳、54歳、68歳であった。全例で口腔粘膜の再発性アフタの既往があるが、その他にはBDに特徴的な粘膜、皮膚、眼症状を発現していなかった。3例は増悪・寛解の経過、1例は2回の増悪があり明らかな寛解はなかった。神経学的には脳幹・小脳症状、中枢性運動麻痺、精神症状の頻度が高く、2例は発熱とともに症状が悪化していた。

血液学的検査では1例に白血球増多を認めた以外に炎症反応はなく、2例に抗核抗体陽性(1例はRA合併例)を認めた。4例ともにHLA-B51が陽性であった。髄液細胞数は4例とも上昇し、1例は好中球増多を認めた。4例で髄液IL-6を測定し、3例で高値であった。画像検査では、全例に大脳白質、脳幹、視床にMRIのT2強調画像とFLAIR画像で高信号域を認め、3例で基底核、2例で大脳皮質、1例で脊髄に病変を認めた(表1)。

若年発症の2例は短期間に再発を繰り返した。これらの症例は、ステロイド治療に反応するが後遺症が残り歩行不能になった。症例2(発症年齢26歳)で定期的なステロイドパ

ルス療法とメトトレキサート(MTX)少量パルス療法を併用したところ再発が抑制された。この症例で髄液IL-6を経時的に測定したところ、約2年後に血清の基準値以下に低下した(図1)。症例3(54歳発症例)は再発発作時にステロイド療法に反応があり、引き続きインターフェロン-β投与にて再発が抑制された。

## 考察

今回の4症例の検討では、MSとして非典型的な画像所見として視床や基底核、大脳皮質病変の出現を認め、さらに全例がHLA-B51陽性であり、臨床的にNBが強く疑われた。HLA-B51遺伝子とBDの関連性はよく知られており、BDの約半数がB51陽性といわれる。NBについてもB51陽性率は他の病型と同等であるが、興味深いことに慢性進行型のNBについてはB51陽性率が非常に高いとされる<sup>(1)</sup>。このような症例では慢性進行性の痴呆様の精神神経症状がみられステロイド治療に抵抗し、MTX少量パルス療法が有効である。そして髄液細胞数や蛋白の上昇がなくても髄液IL-6の持続的な上昇がみられ、中枢神経系の慢性炎症を反映していると考えられている<sup>(2)</sup>。

我々の症例は、臨床像はNBの慢性進行型とは異なるが、若年例は短期間に再発を繰り返すことで精神症状、運動麻痺、失調が後遺症として強く残った。そのうち1例は髄液IL-6が著明に高く、MTX少量パルス療法と定期的なステロイドパルス療法を継続することにより臨床的な再発が抑制され、IL-6も低下した。このことからBDの症状が発現してい

なくとも、臨床的に NB が疑われ、髄液 IL-6 の上昇がみられる症例において、ステロイド治療では症状の悪化が抑制できない症例については、早期に MTX 少量パルス療法等の考慮が必要と考えられる。

表 1. 4 症例の臨床的特徴のまとめ

	症例 1	症例 2	症例 3	症例 4
発症年齢 (歳)	17	26	54	69
臨床病型	再発寛解型	再発寛解型	再発寛解型	進行型
神経所見	中枢性運動麻痺、 脳幹・小脳症状、 精神症状、膀胱障害	中枢性運動麻痺、 脳幹・小脳症状、 精神症状、頭痛	中枢性運動麻痺、 脳幹・小脳症状、 精神症状	脳幹・小脳症状、 知覚障害
HLA-B51	陽性	陽性	陽性	陽性
髄液 IL-6 (pg/ml)	2.1	282	10.6	16.1
MRI 病変部位	大脳皮質、白質、 基底核、視床、脳幹、 脊髄	大脳皮質、白質、 基底核、視床、脳幹、	大脳白質、視床、 脳幹、	大脳白質、 基底核、視床、 脳幹、
再発や進行予防 に有効な治療	MTX 少量パルス療法	MTX 少量パルス療法 + 定期的ステロイド パルス療法	インターフェロン-β	不明

MTX : メトトレキサート

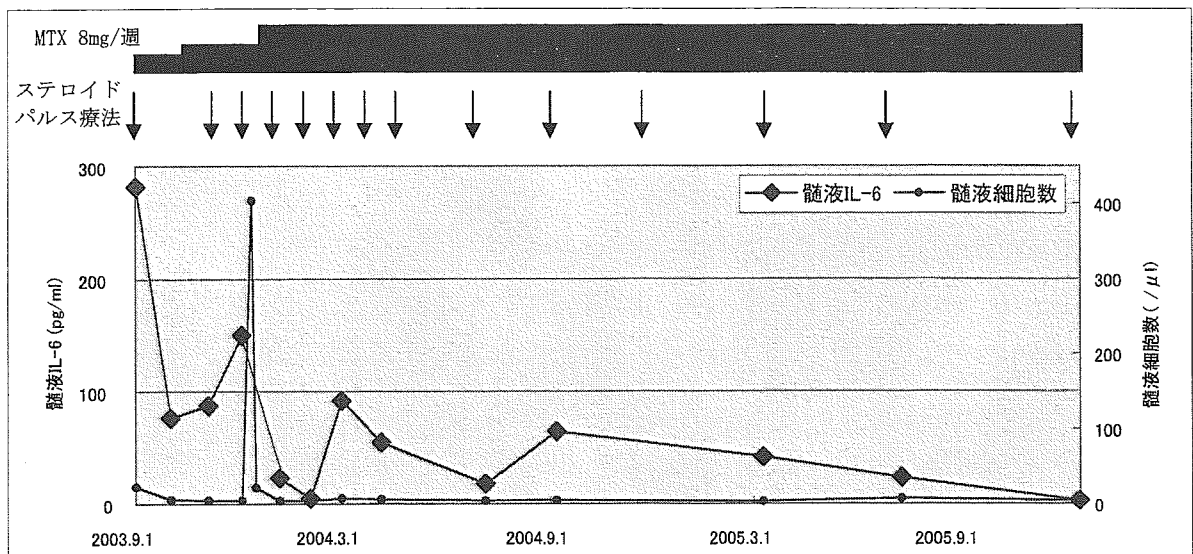


図 1. 症例 2 (発症年齢 26 歳) の髄液 IL-6 と髄液細胞数の推移

MTX: メトトレキサート

結論

MS 類似の経過をとり MS として典型的でない所見がある HLA-B51 陽性例は NB の可能性がある。若年では短期に再発を繰り返す予後不良例があり、髄液 IL-6 測定が診断や治療効果の判断に有用である。

Low-dose weekly methotrexate for progressive neuropsychiatric manifestations in Behçet's disease. J Neurol Sci 159: 181-185, 1998.

健康危険情報

なし

文献

- (1) 広畑俊成. 膠原病類縁疾患: 病態解明と治療の進歩、1. 病態解明の進歩、3. Behçet 病. 日内会誌 88: 1904-1909, 1999.
- (2) Hirohata S, Suda H and Hashimoto T.

知的財産権の出願・登録状況

特許取得: なし  
 実用新案登録: なし

# Central memory T 細胞および Effector memory T 細胞と多発性硬化症患者の免疫動態の関連について

分担研究者 松井 真<sup>1)</sup>

共同研究者 王会雲<sup>2)</sup>、荒谷信一<sup>2)</sup>、齋田孝彦<sup>2)</sup>、松井大<sup>1)</sup>

## 研究要旨

Central memory T 細胞 (TCM) および Effector memory T 細胞 (TEM) は、MS の活動性、あるいは再発寛解型 MS (RRMS)・一次性進行型 MS (PPMS)・二次性進行型 MS (SPMS) といった病型を規定する要因となっている可能性がある。末梢血と髄液中の TCM および TEM の存在率を各病型で比較検討するとともに、末梢血サンプルについては、細胞内サイトカイン検索の結果との関連についても解析した。その結果、末梢血中および髄液中の CD4 陽性 TCM・TEM とともに検索対象グループ間では異ならなかった。活動性 MS 患者では、CD4 陽性 TEM は末梢血中に 18.7%、髄液中に 53.2%と明らかに後者に多く存在した。一方、健常および疾患対照群において、CD4 陽性 TEM と炎症性サイトカイン産生の相関が認められたのは対照的に、MS ではこのような相関は存在しなかった。したがって、MS では TEM 以外の炎症性サイトカイン産生細胞 (Mφ など) の関与が大きい可能性が示唆された。

## 研究目的

多発性硬化症 (MS) はミエリン抗原に対する自己免疫応答に起因すると推定されているが、ADEM とは異なり、異常免疫応答の記憶が持続するという点に問題の根幹がある。T 細胞が末梢血循環からリンパ節へと誘導される際に重要な役割を担う CCR7 の発現の有無により分類される CCR7+CD45RA- central memory T 細胞 (TCM) と CCR7-CD45RA- effector memory T 細胞 (TEM) は、MS 末梢血よりも髄液中に多く存在することが 2002 年三須らにより報告された。ヘルパー T 細胞機能を備えた TCM および TEM は、再発寛解型 (RR) MS の活動性、あるいは一次性進行型 (PP) MS や二次性進行型 (SP) MS といった病型を規定する要因となっている可能性がある。上記について、細胞内サイトカイン検索の結果と対比しながら解析した。

## 研究方法

### 1) 対象

対象は IFN-β などの免疫修飾薬治療を受けていない MS 患者 35 名 (RRMS27 名、SPMS3 名、PPMS5 名) で、RRMS については 16 名を活動期に、4 名を急性増悪からの回復期に、そして 7 名は安定期に検査を行った。21 名の MS 患者では、末梢血と髄液を同日に採取し解析するとともに、健康成人 20 名を健常対照群として、また、ヒステリーや不安神経症の 5 名を疾患対照群として、末梢血サンプルの検索を行った。

### 2) TCM および TEM の解析

末梢血リンパ球は比重遠沈法で、髄液細胞は低速遠沈により分離して得た後、TCM および TEM について下記の抗体を用いて三重染色を 4℃で 30 分間行い、フローサイトメトリーにより蛍光陽性細胞を算定した。その際、CD4+CCR7+CD45RA+ naive T 細胞存在率も測定した。

1) 金沢医科大学脳脊髄神経治療学神経内科

2) 国立病院機構宇多野病院臨床研究部・神経内科

使用抗体

抗 CD4 . . . . . CD4-PC5 (13B8.2)

抗 CCR7 . . . . . Anti-CCR7-PE (3D12)

抗 CD45RA . . . . . 2H4-FITC

3) 細胞内サイトカイン 12 名の MS 患者および 6 名の健常人と 5 名の疾患対照群では、既報の方法 1) で末梢血中の細胞内サイトカイン (IFN- $\gamma$ ・IL-2・IL-4・TNF- $\alpha$ ) 陽性 CD4 および CD8 細胞を検索した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立療養所宇多野病院で主として行われ、宇多野病院の倫理委員会において承認を受けた。患者さんからはインフォームド・コンセントを得、同意を得られた場合にのみ研究をおこなうとともに、プライバシーの保護には十分に配慮した。

### 研究結果

1) 末梢血 nave T 細胞は、PPMS+SPMS+活動期 RRMS をまとめて活動性 MS とした場合、平均 13% で健常対照群や疾患対照群と変わらず、むしろ安定期 RRMS では平均 7.3% と有意の低下を示した。

2) 末梢血中 CD4 陽性の TCM (平均 5-6%) と TEM (平均 16-18%) は、活動性 MS・回復期 MS・安定期 MS・健常人・疾患対照群の 5 群間で有意差はなかった。一方、髄液中の同分画は上記 MS 3 群で各々平均 3-4%、49-55% の値を示し有意差は認められなかった。

3) 活動性 MS 患者の末梢血と髄液サンプルを比較検討したところ、CD4 陽性 TCM は 6.5% 対 4.4% で末梢血側に有意に多く存在し、CD4 陽性 TEM は 18.7% 対 53.2% と明らかに髄液中に多く存在した。

4) 健常および疾患対照群において CD4 陽性 TEM と炎症性サイトカイン産生の相関が認められたのとは対照的に (図)、MS ではこのような相関は存在しなかった。

### 考察

1) 今回得られた CCR7 の陽性率は既報とは異なるが、末梢血や髄液中の TCM や TEM の測定により疾患活動性の有無や RR・PP などの病型との関連を追究することは不可能であると判断した。むしろ炎症局所での cytokine microenvironment が重要であり、病理あるいは生検標本を用いた解析を行わなければ、TCM や TEM の MS 病態への関与を追究することは困難であると考えられた。

2) 細胞内サイトカインプロファイル解析結果からは、MS では TEM 以外の炎症性サイトカイン産生細胞 (M $\phi$  など) の関与が重要である可能性が示唆された。

### 文献

1) Matsui M et al. J Neuroimmunol 148:192-199, 2004.

健康危険情報 なし

知的財産権の出願・登録状況 該当せず



IL-2 を介したヒト CD4 陽性 NKT 細胞クローンにおける  
Th2 サイトカインの選択的産生

分担研究者 山村 隆  
研究協力者 作石 かおり、三宅 幸子

国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部

**研究要旨:** CD1d 拘束性 NKT 細胞は Th1 サイトカインおよび Th2 サイトカインのいずれをも産生する能力をもち、自己免疫を含め多くの免疫調節に関与する。我々はこれまで多発性硬化症の寛解期において CD4 陽性 NKT 細胞が Th2 サイトカインを産生しやすくなっていることを見出し、寛解維持に関与している可能性を報告してきた。近年、NKT 細胞の Th1 サイトカイン産生については IL-12 存在下で選択的に行われることが報告されたが、Th2 サイトカインを選択的に産生させる因子については OCH などの合成糖脂質による刺激が知られているのみである。今回我々は、ヒト NKT 細胞クローンを樹立し、IL-2 存在下において、IL-5 を主とした Th2 サイトカイン産生を選択的に産生する一群を見だし、NKT 細胞による免疫調節機構に新たな側面を示唆すると考え、報告する。

## A. 研究目的

CD1d 拘束性 NKT 細胞は、CD1d 分子に結合した糖脂質を認識し、速やかに Th1 サイトカインおよび Th2 サイトカインのいずれをも大量に産生する能力をもつ特異的なリンパ球である。この特異的な性質を持つがゆえに、自然免疫と受動免疫を結ぶ調節性細胞として働く可能性が注目されつつある。実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE) や I 型糖尿病、関節リウマチなど自己免疫動物モデルなどにおいては、NKT 細胞と病態と

の関与が報告されてきている。また、ヒトの自己免疫疾患においても、我々はこれまで多発性硬化症の寛解期において CD4 陽性 NKT 細胞が Th2 サイトカインを産生しやすくなっていることを見出し、寛解維持に関与している可能性を報告してきた。しかし、NKT 細胞の機能が生理学的に体内で実際にどのように調整されているかは、ほとんど明らかになっていない。近年、NKT 細胞の Th1 サイトカイン産生については IL-12 存在下で選択的に行われることが報告されたが、Th2 サイトカインを選択的に産生させる因子については OCH などの合成糖脂質による刺激が知られているのみ

である。今回、我々はヒト NKT 細胞クローンを樹立し、T 細胞増殖因子として知られる IL-2 が NKT 細胞から Th2 サイトカイン産生を促進することを見出したので報告する。

## B. 研究方法

健常者 7 人、多発性硬化症患者 13 人より分離した末梢血単核球細胞に、NKT 細胞のリガンドである  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ GC)、もしくは合成糖脂質である OCH を添加した。14 日後 NKT 細胞、Vo24 陽性 V $\beta$ II 陽性 CD4 陽性 CD8 陰性細胞を cell sorting にて分離し、PHA を加えて刺激増殖させた。以後、定期的に cell sorting と PHA 刺激を行い、ほぼ 98% 以上の純度のクローンが得られた。この、CD4 陽性 NKT 細胞を用いて、健常者の CD14 陽性単球に IL-4 40ng/ml および GM-CSF 20ng/ml で誘導した未熟樹状細胞を抗原提示細胞 (antigen presenting cell: APC) として、10U/ml の IL-2 存在下および非存在下にて 48 時間培養した。上清中のサイトカインを Cytometric Beads Array にて測定した。

(倫理面への配慮) 検体採取に際し細胞解析を行うことについて十分な説明を行い、文書による同意を得て行った。

## C. 研究結果

健常者より 9 クローン、多発性硬化症患者より 15 クローンが得られた。そのうち各々約 30% のクローンに、IL-2 存在下で、外来抗原の添加なく著明な IL-5 産生を認めた。 $\alpha$ GC 刺激時とは異なり、

いずれも IFN $\gamma$  の産生量は、IL-5 に比して低く、明らかな Th2 に偏倚したサイトカインプロファイルを呈していた。健常者と多発性硬化症患者において、このようなクローンが得られる頻度、およびそのサイトカインパターンに明らかな差は認められなかった。なお、IFN $\beta$  もしくはステロイド治療中の多発性硬化症患者において IL-2 添加にて IL-5 を産生するクローンが得られる確率が高い傾向を認めた。

APC 非存在下にはこのような反応は認められなかった。また、CD4 陰性 CD8 陰性 NKT 細胞クローンには、このような著明な IL-5 を産生するものは認められなかった。また、IL-5 の産生は CD1d transfected- Hela 細胞を APC として用いた場合のみに認められ、mock transfected-Hela 細胞を APC とした際には認められなかった。IL-2 を介した NKT 細胞による IL-5 の産生は、抗 CD3 モノクローナル抗体にて固層化刺激をおこなったところ suboptimal dose にて再現された。興味深いことに、抗 CD3 抗体の optimal dose 刺激では、IL-5 優位の反応は消失し、IFN $\gamma$  優位の反応が見られた。

IL-2 以外にも受容体として  $\beta$  鎖を共有する IL-15 の添加にても同様の IL-5 の産生が認められたが、IL-2 受容体の  $\gamma$  鎖を共有する IL-4, IL-7, IL-9 では認められなかった。

これが、クローン細胞に限った現象であるか検討するため、BALB/c マウスの肝臓および脾臓より  $\alpha$ GC loaded CD1d-Dimer X を用いて NKT 細胞を cell sorting にて分離し、脾臓から分離した CD11c 陽性細胞を APC として in vitro で同様の実験をおこなった。抗原を加えることなく、IL-2 添加のみで同様な IL-5 の産生誘導が確認された。

## D. 考察

IL-2を介して、IL-5を主としたTh2偏倚のサイトカイン産生を呈するCD4陽性NKT細胞クローンの一群が存在することが示された。IL-5の産生はNKT細胞に対するIL-2刺激だけではほとんど認められず、T細胞受容体-CD1d間の認識、すなわち何らかの内因性抗原を介したNKT細胞のsuboptimal stimulationが必要であることが明らかになった。また、この反応はIL-2受容体のβ鎖を介したシグナルを必要とすることが判明した。

また、同様の反応がBALB/c由来のNKT細胞で認められたことから、クローンに限られた反応ではないと言える。

炎症など、IL-2の過剰な産生が引き起こされる状況の下では、CD4陽性NKT細胞はIL-5などTh2サイトカインを優位に産生する可能性が示された。EAEなどTh1偏倚がその病態に深く関わっていると考えられる自己免疫疾患において、Th1偏倚を是正する調節細胞として働き得ることが示唆された。

## E. 結論

CD4陽性NKT細胞クローンのうち、IL-2の刺激下にて、IL-5を主としたTh2優位のサイトカインの産生が誘導される一群が明らかになった。体内のNKT細胞においても、IL-2を介してIL-5が産生される可能性が示された。NKT細胞がTh2偏倚を誘導する生理学的機序の一端を担い得ると考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Ueno, Y., S. Tanaka, M. Sumii, S. Miyake, S. Tazuma, M. Taniguchi, T. Yamamura and K. Chayama: Single dose of OCH improves mucosal Th1/Th2 cytokine balance and prevents experimental colitis in the presence of V $\alpha$ 14 NKT cells in mice. *Inflamm. Bowel Disease* 11(1): 35-41, 2005
2. Hashimoto D, Asakura S, Miyake S, Yamamura T, van Kaer L, Liu C, Tanimoto M and Teshima T. Stimulation of host natural killer T cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducing Th2 polarization of donor T cells. *J. Immunol.* 174(1): 551-6, 2005
3. Murata K, Toba T, Nakanishi K, Takahashi B, Yamamura T, Miyake S and Annoura H. Total synthesis of an immunosuppressive glycolipid, (2S, 3S, 4R) -1-O-(alpha-d-galactosyl) -2 -tetracosanoyl -amino-1,3,4-nonanetriol. *J. Org. Chem.* 70(6): 2398-401, 2005
4. Yu KO, Im JS, Molano A, Dutronc Y, Illarionov PA, Forestier C, Fjiwara N, Arias I, Miyake S, Yamamura T, Chang YT, Besra GS, and Porcellini SA. Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acylvariants of  $\alpha$ -galactosylceramides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102(9): 3383-8, 2005

5. Ota T, Takeda K, Akiba H, Hayakawa Y, Ogasawara K, Ikarashi Y, Miyake S, Wakasugi H, Yamamura T, Kronenberg M, Raulet DH, Kinoshita K, Yagita H, Smyth MJ, Okumura K. IFN- $\gamma$ -mediated negative feedback regulation of NKT cell function by CD94/NKG2. *Blood*, 106(1): 184-92, 2005
6. Chiba A, Kaieda S, Oki S, Yamamura T and Miyake S. The involvement of V $\alpha$ 14 NKT cells in the pathogenesis of arthritis in murine models. *Arthritis Rheum.* 52:1941-8, 2005
7. Toba T, Murata K, Yamamura T, Miyake S and Annoura H. A concise synthesis of (3S,4S,5R) -1- ( $\alpha$ -D-galactopyranosyl) -3-tetracosanoylamino- 4,5-decanediol, a C-glycoside analogue of immuno modulating  $\alpha$ - galactosylceramide OCH. *Tetrahedron Letters* 46: 5043-7, 2005
8. Ronet C, Darche S, de Moraes ML, Miyake S, Yamamura T, Louis JA, Kasper LH, Buzoni-Gatel D. NKT Cells Are Critical for the Initiation of an Inflammatory Bowel Response against *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 175(2): 899-908, 2005
9. Oki S, Tomi C, Yamamura T and Miyake S. Preferential Th2 polarization by OCH is supported by incompetent NKT cell induction of CD40L and following production inflammatory cytokines by bystander cells in vivo. *Int. Immunol.* 17(12):1619-29, 2005
10. Miyake S and Yamamura T. Therapeutic potential of glycolipid ligands for natural killer (NK) T cells in the suppression of autoimmune diseases. *Curr Drug Targets*

*Immune Endocr Metabol Disord.* 5 (3): 315-22, 2005

#### 学会発表

1. Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T: Exogenous IL-2 promotes IL-5 production by human CD4+ NKT cell clones: The role of IL-2 in the immune regulation. 5<sup>th</sup> Annual Meeting of Federation of Clinical Immunology Societies. Boston, 2005.5.13 (Clinical Immunology, Suppl 1: S16, 2005)
2. Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T: Exogenous IL-2 promotes IL-5 production by human CD4+ NKT cell clones: The role of IL-2 in the immune regulation. International Symposium on Autoimmunity in Intractable Diseases-From Bench to Clinic. Hakone, 2005.10.27. (Abstract PV-18, 2005)
3. Kaieda S, Chiba A, Oki S, Yamamura T, Miyake S. The involvement of CD1-restricted NKT cells in the pathogenesis of collagen-induced and antibody-induced arthritis. 5<sup>th</sup> Annual Conference of FOCIS, Boston, May 13, 2005
4. Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. A new synthetic glycolipid suppresses murine models of arthritis by blocking of natural killer T cell activation. American College of Rheumatology 69<sup>th</sup> Annual Scientific

- Meeting, Orlando, Florida. October 25, 2004  
(Arthritis Rheum. 52:S445, 2005)
5. 中原とも子、阿部香織、千葉麻子、山村隆、橋本博史、三宅幸子：膠原病患者における CD1d 拘束性 NKT 細胞の糖脂質抗原に対する反応性の検討、第 49 回日本リウマチ学会、横浜、4 月 20 日、2005
  6. 海江田信二郎、千葉麻子、Ludovic Croxford, 大木伸司、山村隆、三宅幸子：マウス関節炎モデルにおける  $V\alpha 14$ NKT 細胞ならびに  $V\alpha 19$ NKT 細胞の機能解析第 49 回日本リウマチ学会、横浜、4 月 19 日、2005
  7. 水野美歩、大木伸司、海江田信二郎、任海千春、山村隆、三宅幸子：新規糖脂質リガンドによる NKT 細胞を介した病態制御。第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005
  8. 塚本和行、林青順、大辻季樹、鶴井博三、三宅幸子、山村隆、広瀬幸子：SLE における NKT 細胞の役割。第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005
  9. 任海千春、大木伸司、山村隆、三宅幸子：OCH による NKT 細胞依存性 Th2 誘導における免疫ネットワークの関与、第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005
  10. 作石かおり、荒波利昌、大木伸司、三宅幸子、山村隆：Exogenous IL-2 promotes IL-5 production by human CD4+ NKT cell clones: The role of IL-2 in the immune regulation. 第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005
  11. Croxford Ludovic, Miyake Sachiko, Shimamura Michio, Yamamura Takashi :  $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$  invariant NKT cells regulate experimental autoimmune encephalomyelitis. 第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005
  12. 大木伸司、海江田信二郎、山村隆、三宅幸子：新規糖脂質リガンドによる NKT 細胞を介した病態制御-マウス気道アレルギーモデルにおける抑制効果：第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005
  13. 海江田信二郎、大木伸司、山村隆、三宅幸子：NKT 細胞活性制御作用を介した新規合成糖脂質によるマウスモデル関節炎の抑制：第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

# 多発性硬化症患者末梢血における制御性 T 細胞と FOXP3mRNA 発現の検討

分担研究者 太田宏平<sup>1)</sup>

共同研究者 清水優子<sup>2)</sup>, 川畑仁人<sup>3)</sup>, 大原久仁子<sup>2)</sup>, 大橋高志<sup>2)</sup>, 岩田 誠<sup>2)</sup>

## 研究要旨

CD4+CD25<sup>high</sup>制御性 T 細胞 (CD4+CD25<sup>high</sup>Tr 細胞) は自己反応性 T 細胞を抑制する機能があり、Foxp3 遺伝子は内在性制御性 T 細胞の特異性の高いマーカーと考えられている。今回我々は、健常者と、免疫調整治療薬である Interferon-β 1b (IFN-β 1b) を投与した多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) 患者、および投与中に再発した患者群において検討を行った。CD4+CD25<sup>high</sup>Treg 細胞のこれまでの報告は、寛解期 MS と健常者で差はなく、FOXP3mRNA の発現は MS では健常者と比べ減少しているというものであった。我々の結果では、両者とも IFN-β 1b 投与後に増加しており、特に、FOXP3mRNA 発現は治療早期に有意に増加し、投与中の再発群では(症例数は少ないが)、非再発群と比べ、有意差はないが低下していた。以上の結果から IFN-β は調節性 T 細胞の増加を介し、自己反応性 T 細胞を抑制している可能性が示唆された。

## 研究目的

CD4+CD25<sup>high</sup>制御性 T 細胞 (CD4+CD25<sup>high</sup>Tr 細胞) は自己反応性 T 細胞を抑制する機能があり、種々の自己免疫性疾患で注目されている。CD4+CD25+Tr 細胞に特異的に発現している、Foxp3 遺伝子は、制御性 T 細胞のマーカーで Treg 細胞の胸腺での分化と機能発現のマスター遺伝子である。Foxp3 を発現する Treg 細胞は自己免疫疾患、アレルギーを引き起こす effector T 細胞の活性化と増殖を抑制する。今回我々は、MS の免疫調整治療薬である Interferon-β 1b (IFN-β 1b) を投与した患者および、IFN-β 1b 投与中に再発した患者群において、検討を加えたので報告する

## 研究方法と対象

対象は IFN-β 1b 投与を行った MS 患者 17 名 (男女比 5:12、平均年齢 36.3 歳) と健常者 10 名 (男女比 2:8、平均年齢 30.9 歳)。方法は、①健常者、② IFN-β 1b 投与前、投与後 3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月、24 ヶ月、③ IFN-β 1b 投与中に再発した患者 (n=5) から末梢血を採取し、PBMC を分離、フローサイトメーターを用い CD4+CD25<sup>high</sup>Treg 細胞を測定した。FOXP3mRNA の発現量は同対象の PBMC より RNA を抽出、cDNA 合成後、real-time PCR を用い、G3PDH を内在コントロールとして標準化し、IFN-β 1b 投与前を基準とし、比較定量法により検討した。(統計解析は Friedman 検定をおこない、p 値 0.05 未満を有意水準とした。IFN-β 1b 投与前と各治療期間の比較は Wilcoxon 符号付順位検定を行った。)

<sup>1)</sup>東京理科大学理学部

<sup>2)</sup>東京女子医科大学神経内科

<sup>3)</sup>東京大学アレルギーリウマチ科

(倫理面への配慮)

本研究を行うに当たり患者からインフォームド・コンセントを得て検体を採取し、また、患者の個人情報の守秘に配慮し研究を遂行した。

## 研究結果

末梢血の CD4+CD25<sup>high</sup>Treg 細胞の割合は、健常者は 2.00% で、IFN-β 1b 投与前の患者では 2.44% で有意差はなかった。また IFN-β 1b 投与後 3 ヶ月～投与後 24 ヶ月で 2.55%～4.10% と軽度増加した。再発群では 1.85% で非再発群よりわずかに低下していたが、投与前と投与後、

また再発群において有意差は無かった。

FOXP3mRNA の発現量は、IFN-β 投与前を基準 1.0 とすると、健常者では 0.71、投与後は 1.41～3.22 とやや増加した。

特

に投与後 3 ヶ月は 3.22 と、有意な発現の増加が認められた ( $p < 0.05$ )。再発群では 1.26 で若干低下していた。

## 考察

CD4+CD25<sup>high</sup>Treg 細胞についてのこれまでの報告では、寛解期 MS と健常者に差はなく、FOXP3mRNA の発現は、MS では健常者と比べ減少しているということであった。しかし IFN-β 治療に関して、両者を検討したものはない。我々の結果では、CD4+CD25<sup>high</sup>Treg 細胞と FOXP3mRNA の発現は、IFN-β 1b 投与後

に増加していた。特に、FOXP3mRNA 発現が治療 3 ヶ月後に有意に増加しており、投与中の再発群では (症例数は少ないが)、非再発群と比べ、有意差はなかったが減少していた。以上から、IFN-β は調節性 T 細胞の増加を介し、自己反応性 T 細胞を抑制している可能性が示唆された。

## 結語

MS 患者における IFN-β 1b 治療による Treg 細胞と、そのマスター遺伝子である FOXP3mRNA の発現について検討をおこなった。その結果、治療によって Treg 細胞と FoxP3mRNA の発現は増加し、再発群では非再発群と比較し低下していた。IFN-β 1b は調節性 T 細胞を介して治療効果を発現する可能性があり、その機序について、今後さらに検討が必要である。

## 健康危険情報

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

## 多発性硬化症末梢血 Foxp3+制御性 T 細胞の動態と CD25 発現

分担研究者 松尾秀徳<sup>1)</sup>

共同研究者 溝田貴光<sup>1)</sup>、近藤誉之<sup>1)</sup>、澁谷統壽<sup>1)</sup>、齋田孝彦<sup>2)</sup>、松井 真<sup>3)</sup>

### 研究要旨

CD4+ Foxp3+ 制御性 T 細胞は自己免疫疾患における動態が注目されている。CD25 を強く発現するヒト CD4+ T 細胞 (CD4+ CD25high) がマウス制御性 T 細胞と同様の性格を持つことが明らかにされ、多発性硬化症 (MS) 末梢血では CD4+ CD25high は量的に健常人と変わらないが共存する CD4+ T 細胞の活性化を抑制できないことが報告されている。しかし、CD4+ T 細胞が病態に関与する MS では CD4+ CD25high のなかに活性化 T 細胞が混じている可能性がある。われわれは制御性 T 細胞の分化、機能発現に必須である Foxp3 を用いて制御性 T 細胞を同定した。健常人では CD4+ T 細胞のなかで制御性 T 細胞は平均 5.51% であったが、インターフェロン β 非使用 MS では 2.83% と有意に減少していた。インターフェロン β 使用者では 4.40% であり、治療により制御性 T 細胞が増加することが示唆された。また CD25high は必ずしも Foxp3 陽性ではなく活性化 T が混じていることが判明した。

### 研究目的

多発性硬化症 (MS) はミエリン抗原特異的 CD4+ T 細胞が発症に関与すると考えられている。自己抗原に対する免疫寛容は胸腺での負の選択による自己反応性 T 細胞の除去が重要である。しかし、負の選択は完全ではないため、ミエリン抗原特異的 T 細胞の活性化を抑制する末梢性免疫寛容も同時に重要である。CD4+ T 細胞のなかに自己免疫を制御する細胞が含まれており、この細胞集団が CD25 抗原を発現していることが知られていた。ヒト研究においてはほかに良いマーカーがなかったために CD4+CD25high T 細胞が制御性 T 細胞として解析されてきた。しかし、IL-2 受容体 α 鎖である CD25 は活性化マーカーでもあることと MS が CD4+ T 細胞の活性化を伴う自己免疫性疾患であることを考えあわせると、CD4+CD25high T 細胞を制御性 T 細胞そのものとして解析してきた従来の報告の解釈には慎重でなければならない。

今回我々は、制御性 T 細胞の分化と機能発現に必須とされる Foxp3 を制御性 CD4+ T 細胞のマーカーとして制御性 T 細胞における CD25 抗原の発現を解析し、MS 末梢血制御性 T 細胞の頻度を解析した。

### 研究方法

健常人 13 人、MS 患者 22 人 (インターフェロン β 使用 ; 11 人、不使用 8 人、再発 3 人を含む。) の末梢血単核球細胞を検体として CD4、CD25、Foxp3 の発現を Flow\_cytometry にて検討した。Foxp3 の検出のために e-Bioscience PCH101 を用いて細胞内染色を行い、Foxp3 陽性 T 細胞の CD25 発現強度についても解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は国立病院機構長崎神経医療センターの倫理委員会において承認を受けた。研究については患者本人へ十分に説明を行い、文書で同意を得ている。個人の情報は決して表に出ることがないように細心の注意を払い、プライバシーの保護には十分に配慮した。

1) 長崎神経医療センター臨床研究部

2) 国立病院機構宇多野病院

3) 金沢医科大学神経内科



研究結果

制御性 T 細胞の頻度 (図 1)

図 1 に CD4+ T 細胞中に占める Foxp3 陽性細胞陽性率を示した。健常人では CD4 陽性 T 細胞のなかで Foxp3 陽性の制御性 T 細胞が占める頻度は平均 5.51%であったが、ベタフェロン非使用で寛解期にある患者では平均 2.83%であった。寛解期 MS で制御性 T 細胞は減少していた ( $p < 0.05$ )。インターフェロンβ使用患者では平均 4.40%であり、治療により有意に制御性 T 細胞が増加した ( $p > 0.05$ )。

インターフェロンβ治療者のうち 4 名は制御性 T 細胞の頻度は 5%を超えていたが、非治療例では 5%を超える例はなかった。しかし、制御性 T 細胞の頻度が 5%を超えた例では CD25 の MFI は 39.1、32.7、54.1、58.7 と低下しており、CD25 の発現強度が正常人と異なっていた。

多発性硬化症再発例 3 例では CD4+ T 細胞中に占める Foxp3 陽性細胞は平均 1.41%であった。寛解期における最小の Foxp3 陽性率が 1.87%であったのとは対して、再発期では 3 人中 2 人が 0.75%、1.24%という低値を示した。少数例での解析ではあるが、再発時に制御性 T 細胞が減少していることが示唆された。

制御性 T 細胞の CD25 発現強度 (図 2)

健常人の制御性 T 細胞の CD25 の発現の平均蛍光強度 (MFI) は 92.00 (41-160) であったが、MS 患者ではインターフェロンβ治療群では 53.5 (30.5-80.2)、非治療群では 55.5 (31.8-74.8) であった。再発 3 例では 2 例は 107.6、103.5 と MS のなかでもっとも CD25 を強く発現していたが、1 例では 34.3 と低かった。

考察

図 2 の CD25 発現強度で示されるように CD4+CD25high T 細胞は健常人では大多数が制御性 T 細胞であることが再確認できた。MS では制御性 T 細胞の CD25 発現は低下しており、CD25high の細胞集団は制御性 T 細胞だけではなく活性化 T 細胞が混入していることが示唆された。また、MS 患者で制御性 T

細胞の CD25 発現の変化があったことは IL-2 を介したシグナル系を含む機能的な異常の可能性を示唆する。

インターフェロンβ治療により制御性 T 細胞が増加することが示されたが、CD25 の発現量は健常者とは異なっていた。正常な機能を持つ制御性 T 細胞が増加しているかは不明である。今後、インターフェロンβの治療効果と制御性 T 細胞の頻度と CD25 発現の変化の関連を検討する予定である。

再発例では制御性 T 細胞の減少があった。制御性 T 細胞の減少が自己反応性 T 細胞の活性化を招来するなど再発の直接的要因の一つになっているか、再発のプロセスのなかで 2 次的に減少したものであるのか検討する必要がある。

図 1 CD4 陽性 T 細胞中の Foxp3 陽性細胞数頻度 (%)

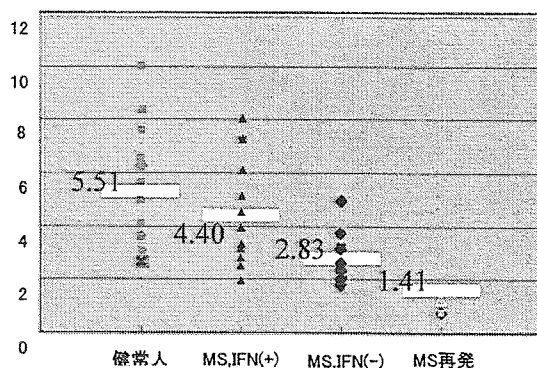
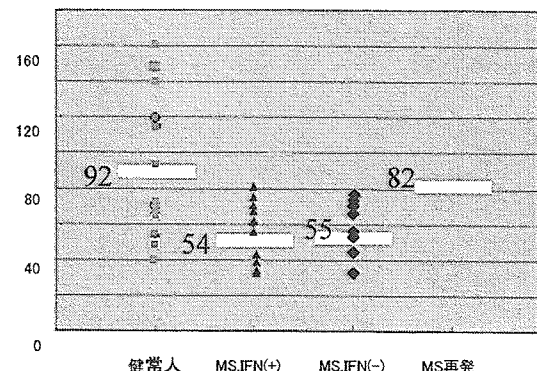


図 2 CD4+Foxp3+T 細胞中の CD25 平均蛍光強度



健康危険情報 なし

知的財産の出願・登録状況

特許取得なし、実用新案登録なし

# 多発性硬化症の病態における natural interferon-producing cell の関与について

分担研究者 松井 真<sup>1)</sup>

共同研究者 王会雲<sup>2)</sup>、齋田孝彦<sup>2)</sup>、中西恵美<sup>1)</sup>、松井大<sup>1)</sup>

## 研究要旨

多発性硬化症 (MS) 患者の病型や再発・寛解型 (RR) MS 患者の疾患活動性を規定する可能性のある要因として、樹状細胞が重要な役割を担う可能性がある。この点を明らかにするため、Th2 細胞の誘導を行うとされる II 型樹状細胞の前駆細胞である natural interferon-producing cell (IPC) の末梢血中での存在率をフローサイトメトリーを用いて測定した。また同時に、末梢血の細胞内サイトカインのプロフィールを検索し、IPC 測定結果との関連を解析した。その結果、IPC はサイトグラム上、大型リンパ球程度のサイズで、円形よりはやや複雑な核の構造を備えた細胞画分に多く存在することが判明した (IPC-enriched compartment)。本分画における IPC 存在率は、RRMS では活動期・非活動期ともに健常人よりも低く、対照的に一次性進行型 (PP) MS では健常人と同様の結果を示した。一方、IPC は IL-4 産生細胞ではなく IFN- $\gamma$  産生細胞存在率と相関した。したがって、MS では樹状細胞レベルの機能障害を解明することが病因解明に繋がることが示唆された。

## 研究目的

多発性硬化症 (MS) 患者の病型を規定する要因は何かという疑問に対する答えは提出されていない。われわれは平成 15 年の班会議において、一次性進行型 (PP) MS では IL-4 産生性の Th2 細胞とともに炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  を産生する CD4 細胞の両者が増加しており、再発・寛解型 (RR) MS や二次性進行型 (SP) MS とは異なる免疫病態に基づく疾患である可能性を指摘した。今回、II 型樹状細胞の前駆細胞とされる natural interferon (IFN)-producing cell (IPC) について、各病型や RRMS における疾患活動性との関連を解析すると共に、本細胞が細胞内サイトカインプロフィールに与える影響の有無を検討した。

## 研究方法

### 1) 対象

患者対象は RRMS 患者 16 名 (男女比 2:14, うち 11 名は活動期, 5 名は非活動期) と PPMS 患者 3 名で、いずれも免疫修飾薬による治療を受けていない者である。さらに 20 名の健常成人 (男女比 8:12) を対照群として解析した。

### 2) IPC の解析

末梢血より Ficoll-Paque 比重遠沈法を用いて単核球を分離し、一部を 50  $\mu$ l の 2.5% FCS 添加 PBS に浮遊させ、以下に示すような抗体の組み合わせを用いて 4°C で 45 分間染色し、フローサイトメトリー (EPICS XL, Beckman Coulter 社) で単核球分画全体および小型単球画分 (IPC-enriched zone) にゲートをかけて、CD4+CD3-CD11c-CD14-CD16-CD20- の表面抗原を備えた IPC の存在率を測定した。

使用抗体は、抗 CD3 $\cdots$ UCHT-1-FITC

抗 CD4 $\cdots$   $\cdots$  Leu3a-PE

抗 CD11c $\cdots$  Anti-Human CD11c-FITC

抗 CD14 $\cdots$  CD14-FITC (RM052)

抗 CD16 $\cdots$  CD16-FITC (3G8)

抗 CD20 $\cdots$  CD20-FITC (B9E9)

### 3) 細胞内サイトカイン検索

既報の方法に従い<sup>1)</sup>、末梢血単核球を PMA/ionomycin で刺激し、IFN- $\gamma$ ・IL-2・IL-4・TNF- $\alpha$  を産生する細胞を算定した。

1) 金沢医科大学脳脊髄神経治療学神経内科

2) 国立病院機構宇多野病院臨床研究部・神経内科

### (倫理面への配慮)

本研究は、国立療養所宇多野病院で主として行われ、宇多野病院の倫理委員会において承認を受けた。患者さんからはインフォームド・コンセントを得、同意を得られた場合にのみ研究をおこなうとともに、プライバシーの保護には十分に配慮した。

### 研究結果

1) IPC はサイトグラム上の純粹のリンパ球画分や大形の単球画分には極めて稀にしか存在せず、大型リンパ球程度のサイズで、円形よりはやや複雑な核の構造を備えた細胞画分に多く存在することが判明した。この細胞画分を IPC-enriched compartment と呼称することとした。(図)。

2) IPC-enriched 分画における IPC 存在率は、活動期 RRMS・非活動期 RRMS・対照群の3群間比較で有意差が得られた( $p=0.0223$ , Kruskal-Wallis 解析)。すなわち、各群  $1.58 \pm 1.22\%$ 、 $1.74 \pm 1.32\%$ 、 $3.40 \pm 2.08\%$  であり、このうち活動期 RRMS では有意に健常対照群よりも減少していた。また、活動期と非活動期に相違はなかった。

3) そこで活動期と非活動期の RRMS をまとめ、IPC-enriched 分画において、全 RRMS と PPMS および健常対照群で検討したところ、PPMS 患者で得られた結果( $3.27 \pm 0.70\%$ ) は健常対象群とほぼ同レベルの値を示し、全 RRMS の  $1.63 \pm 1.21\%$  に比して有意に高値であった。

4) MS 患者全体を対象に、IPC-enriched 分画の IPC 存在率と各サイトカイン産生細胞の関連を解析したところ、IFN- $\gamma$  産生細胞存在率と相関していた( $r=0.76$ )。

### 考察

1) RRMS では、病期に関わらず IPC は常に少数しか存在しなかったが、同細胞が II 型樹状細胞と関連が深いことから、RRMS の Th1 病としての側面を支持する結果であると考えられた。対照的に、PPMS では IPC は健常人と同レベルを維持していた。われわれが以前に得た、PPMS では Th2 細胞が増加しているという知見を合わせ考えると、両病型は樹状細胞の関与する別個の病態機序に起因する可能性が示唆された。

2) IPC 存在率が IL-4 ではなく IFN- $\gamma$  産生細胞と相関していたことから、MS では樹状細胞レベルの機能障害を解明することが、病因解明の糸口になると推定された。

### 文献

1) Matsui M et al. J Neuroimmunol 148:192-199, 2004.

健康危険情報 なし

知的財産権の出願・登録状況 該当せず

厚生労働科学研究費補助金(免疫性神経疾患に関する調査研究班)

分担研究報告書

## マイクロアレイによるインターフェロン応答遺伝子の網羅的解析

分担研究者 山村 隆

研究協力者 佐藤 準一、南里 悠介、土居 芳充

国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部

**研究要旨** 近年欧米・本邦における大規模臨床試験により、インターフェロンベータ(interferon-beta; IFN $\beta$ )の多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)再発抑制効果が class I evidence で立証され、現在では急性増悪期に副腎皮質ステロイド短期間大量静脈内投与(intravenous methylprednisolone pulse; IVMP)を行い、寛解・回復期に IFN $\beta$ の継続的皮内・筋肉内投与を行う方法が、最も一般的な治療法として選択されている。しかし IFN $\beta$ が十分効果を示さない症例や副作用で治療継続を断念せざるを得ない症例も多い。現在まで MS における IFN $\beta$ 治療効果・副作用を予知する biomarker は同定されていない。本研究では IFN $\beta$  biological effect-related molecular markers を同定するため、DNA microarray を用いて末梢血リンパ球における IFN $\beta$ 反応性遺伝子(IFN $\beta$ -responsive genes; IRG)を網羅的に解析した。その結果 IFN $\beta$ は IFN response/signaling 関連遺伝子群の他に、apoptosis regulators, heat shock proteins など多彩な遺伝子を迅速に誘導することが判明した。すなわち effector Th1 cells に働く CXCR3 ligand chemokines (SCYB11, SCYB10, SCYB9)や monocytes に働く CCR2 ligand chemokines (SCYA8, SCYA2)の顕著な上昇、neutrophils に働く CXCR2 ligand chemokines (SCYB2, SCYB1, IL8)の低下、proinflammatory cytokines (IL-6, IL-15, osteopontin, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ )の上昇を認めた。DNA microarray 解析の結果から IRG としての proinflammatory chemokines/cytokines が MS における IFN $\beta$ -related early adverse effects の中心的役割を果たしている可能性が示唆された。

### A. 研究目的

近年欧米・本邦における大規模臨床試験により、インターフェロンベータ(interferon-beta; IFN $\beta$ )の多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)再発抑制効果が class I evidence で立証され、現在では急性増悪期に副腎皮質ステロイド短期間大量静脈内投与(intravenous methylprednisolone pulse; IVMP)を行い、回復期に IFN $\beta$ の継続的皮内・筋肉内投与を行う方法が、最も一般的な治療法として選択されている。しかし IFN $\beta$ が十分効果を

性増悪期に副腎皮質ステロイド短期間大量静脈内投与(intravenous methylprednisolone pulse; IVMP)を行い、回復期に IFN $\beta$ の継続的皮内・筋肉内投与を行う方法が、最も一般的な治療法として選択されている。しかし IFN $\beta$ が十分効果を