

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(Walther EU and Hohlfeld R. Neurology 1999; 53: 1622-1627; Waubant E et al. Neurology 2003; 61: 184-89; Rudick RA et al. Ann Neurol 2004; 56: 548-55)。現在まで MS における IFN β 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 β 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 β 反応性遺伝子 (IFN β -responsive genes; IRG) を網羅的に解析することを目的とする。

B. 研究方法

末梢血リンパ球(peripheral blood mononuclear cells; PBMC)を recombinant human IFN β , IFN γ , TNF α or IL-1 β (50 ng/ml each)存在下で 3 時間または 24 時間培養し RNA を抽出・増幅、1,259 cDNA microarray (Hitachi Life Science)を用いて遺伝子発現プロファイルを解析し、2-fold change を cut-off として IFN β -induced (upregulated) or repressed (downregulated) genes を同定した。また LightCycler ST300 (Roche)で real-time RT-PCR を行い、遺伝子アレイの発現レベルを検証(validation)した。

(倫理面への配慮)

血液は被験者の同意を得て提供された。

C. 研究結果

#1. IFN β で発現上昇は 3 時間 107 遺伝子、24 時間 87 遺伝子で、69 遺伝子は両時間でオーバ

ーラップし、この中には既報(Koike F et al. J Neuroimmunol 2003; 139: 109-118)の RRMS *in vivo* 11 IRG [IFIT1 (IFI56), ISG15 (G1P2), IFIT4 (IFI60), IFI27, G1P3 (IFI6-16), IRF7, ABCB2 (TAP1), ATF3, IFITM1 (IFI17), SULT1C1, TNFAIP6]が含まれていた。IFN β で発現低下は 3 時間 22 遺伝子、24 時間 23 遺伝子で、2 遺伝子 (FOS, IL1A)は両時間でオーバーラップしていた。

#2. IRG は主要カテゴリー: (i) conventional IFN-response markers (n = 12), (ii) components of classical and Toll-like receptor (TLR)-dependent IFN-signaling pathways (n = 12), (iii) chemokines and their receptors (n = 11), (iv) cytokines, growth factors and their receptors (n = 17), (v) apoptosis, DNA damage, and cell cycle regulators (n = 29), (vi) heat shock proteins (n = 9), (vii) costimulatory and adhesion molecules (n = 7)(表 1)とその他に分類された。

#3. Chemokine 関連 IRG には SCYB11 (CXCL11, I-TAC), SCYB10 (CXCL10, IP-10), SCYA8 (CCL8, MCP2), SCYB9 (CXCL9, MIG), SCYA2 (CCL2, MCP1), CCR5, SCYA4 (CCL4, MIP1B), IL8RB (CXCR2), SCYA3 (CCL3, MIP1A), SCYA19 (CCL19, MIP3B), SCYA13 (CCL13, MCP4)が含まれ、特に CXCR3 ligand chemokines (SCYB11, SCYB10, SCYB9), CCR2 ligand chemokines (SCYA10, SCYA2)は両時間 top 20 遺伝子に含まれていた。

#4. CXCR2 ligand chemokines SCYB2 (CXCL2, GRO2), SCYB1 (CXCL1, GRO1), IL8 (SCYB8,

CXCL8)および RGS14 は 3 時間 IFN β -repressed genes に含まれていた。

#5. Real-time RT-PCR で IFN β による ISG15, SCYB10, SCYA8, SCYA2 upregulation, FOS, RGS14, SCYB2 downregulation を確認した。IFN γ は SCYB10, SCYA2, ISG15, SCYA8 upregulation, SCYB2 downregulation を誘導したが、TNF α と IL-1 β は SCYB10, ISG15, SCYA8 発現に影響せず、SCYB2 upregulation を誘導した。

D. 考察

IFN β は IFN response/signaling 関連遺伝子群の他に、apoptosis regulators, heat shock proteins など広範囲な遺伝子を迅速(3-24 時間)に誘導することが判明した。また MS 活動性病巣や CSF での検出が報告されている proinflammatory chemokines で、主として 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 (top 20) な upregulation を認め、neutrophils に働く CXCR2 ligand chemokines (SCYB2, SCYB1, IL8) の downregulation を認めた。RGS14 は regulator of G-protein signaling family member で、GPCR である chemokine receptor の signaling を抑制する。また IFN β は proinflammatory cytokines (IL-6, IL-15, osteopontin, TNF α , IFN γ)の発現も誘導した。SCYB10, IL-6 は flu-like symptoms との関連が、SCYB10, SCYA2 は injection-site reactions との関連が指摘されている(Martínez-Cáceres EM et al. Ann Neurol 1998; 44: 682-685; Buttman M

et al. J Neuroimmunol 2005; 168: 175-182)。

E. 結論

DNA microarray解析の結果から IRG としての proinflammatory chemokines/cytokines が MS における IFN β -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。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.

5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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

9. 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, Onoue H, Arimaki 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).

2. 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).
3. 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).
4. 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: 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 (抄録集 p.156-157).
2. 佐藤準一、山村隆、尾上祐行、有馬邦正：多発性硬化症脱髄巢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 免疫性神経疾患に関する調査研究班. 平成 16 年度班会議. 東京、2005. 1.26 (抄録集 p.20-21).
 3. 佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、古池史子、山村隆：T 細胞の DNA microarray 解析による多発性硬化症の病型分類. 第 17 回日本神経免疫学会学術集会. 福岡、2005. 3.3. (神経免疫学 13: 44, 2005). 第 17 回日本神経免疫学会会長賞受賞.
 4. 尾上祐行、佐藤準一、山村隆：多発性硬化症患者血清中の抗 Nogo Receptor 抗体の検出. 第 17 回日本神経免疫学会学術集会. 福岡、2005. 3.3. (神経免疫学 13: 72, 2005). 第 17 回日本神経免疫学会奨励賞受賞.
 5. 土居芳充、佐藤準一、山村隆：多発性硬化症の末梢血 T 細胞における NR4A2 発現上昇. 第 17 回日本神経免疫学会学術集会. 福岡、2005. 3.4. (神経免疫学 13: 104, 2005).
 6. 佐藤準一、尾上祐行、有馬邦正、山村隆：多発性硬化症脱髄巢における Nogo-A・Nogo 受容体の発現. 第 46 回日本神経病理学会総会学術研究会. 宇都宮、2005. 5.13. (Neuropathology 25: A32, 2005).
 7. 佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、土居芳充、古池史子、山村隆：DNA microarray 解析による多発性硬化症の病型分類. 第 46 回日本神経学会総会. 鹿児島、2005. 5.25. (抄録集 102, 2005).
 8. 土居芳充、佐藤準一、山村隆：多発性硬化症(MS)末梢血 T 細胞における NR4A2 発現上昇. 第 46 回日本神経学会総会. 鹿児島、2005. 5.27. (抄録集 272, 2005).
 9. 尾上祐行、佐藤準一、山村隆：多発性硬化症(MS)患者血清中の抗 Nogo 抗体の検出. 第 46 回日本神経学会総会. 鹿児島、2005. 5.27. (抄録集 272, 2005).
 10. 山村隆、佐藤準一：cDNA マイクロアレイを用いた多発性硬化症の病態解析. 第 26 回日本炎症・再生医学会. ワークショップ 3. 網羅的遺伝子発現解析による炎症性疾患の病態解析と治療効果の予測. 東京、2005. 7.13. (炎症・再生 25: 289, 2005).
 11. 佐藤準一、野村恭一、山村隆：CIDP 診断における DNA マイクロアレイ有用性に関する研究. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 難治性ニューロパチーの病態に基づく新規治療法の開発班. 平成 17 年度班会議. 東京、2005. 12.7.
 12. 佐藤準一、南里悠介、土居芳充、山村隆：末梢血リンパ球におけるインターフェロン応答遺伝子の網羅的解析. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患の画期的診断・治療法に関する研究事業. 平成 17 年度班会議. 東京、2005.12.9.
 13. 南里悠介、佐藤準一、土居芳充、山村隆：MS のマイクロアレイ診断およびインターフェロンベータ治療に関するアンケート調査の集計. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患の画期的診断・治療法に関する研究事

業. 平成 17 年度班会議. 東京、2005.12.9.

14. Satoh J, Onoue H, Doi Y, Yamamura T :
Detection of anti-Nogo-66 and anti-Nogo
receptor autoantibodies in the serum of
multiple sclerosis. 第 35 回日本免疫学会総
会学術集会 横浜、2005. 12.13. (Proceedings
of the Japanese Society for Immunology 35: 37,
2005).

2) 多発性硬化症に関連する遺伝子の発現測定
方法、多発性硬化症関連遺伝子の発現を測定す
るためのチップ、多発性硬化症の罹患を判断す
るための遺伝子群、多発性硬化症の評価方法。
(特開 2005-160440)。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- 1) 多発性硬化症に対するインターフェロン・ベ
ータ薬物治療の有効性予測法(特開 2004-28926)。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1. Functional Classification of IRGs in PBMC.

Categories	Number of genes	Gene symbols (alternative symbols or names)
1 Conventional IFN-response markers	12	IFIT1 (IFI56), ISG15 (G1P2), IFIT4 (IFI60), MX1 (MXA), MX2 (MXB), IFI27, G1P3 (IFI6-16), ISG20, IFI16, IFITM1 (IFI17), IFITM3 (1-8U), ABCB2 (TAP1)
2 Components of IFN-signaling pathways	12	STAT1, IRF7, STAT2, JAK2, IRF2, ISGF3G (IRF9), MYD88, IRF8, STAT3, JAK3, IRF1, TLR3
3 Chemokines and receptors	11	SCYB11 (CXCL11, I-TAC), SCYB10 (CXCL10, IP-10), SCYA8 (CCL8, MCP2), SCYB9 (CXCL9, MIG), SCYA2 (CCL2, MCP1), CCR5, SCYA4 (CCL4, MIP1B), IL8RB (CXCR2), SCYA3 (CCL3, MIP1A), SCYA19 (CCL19, MIP3B), SCYA13 (CCL13, MCP4)
4 Cytokines, growth factors, and receptors	17	IL6, ILRN (IL-1 receptor antagonist), IL1R2, IL15RA, IL15, SPP1 (osteopontin), CSF1, IL12RB2, TNF (TNFA), IL2RB, IFNG, NTRK1 (TRKA), PDGFRL, TNFAIP6, KITLG (SCF), IL10, IL3RA
5 Apoptosis, DNA damage, and cell cycle regulators	29	TNFSF10 (TRAIL), CASP10, BAG1, TNFRSF6 (FAS), CASP4, TRADD, GZMA, CASP7, RIPK2, MAD, RIPK1, CFLAR (FLIP), RELA, STK3, CASP1, TNFSF6 (FASL), PARP4, TANK (I-TRAF), POLE2, LMNB1, E2F2, CCNA1 (cyclin A1), CDKN1A (p21), PPP1R15A (GADD34), CASP3, CDKN1C (p57), CDK5R2 (p39), TERF1, NBS1 (nibrin)
6 Heat shock proteins	9	HSPA6 (HSP70B'), HSJ2 (HSPF4), HSPA1A (HSP70-1), HSPA1B (HSP70-2), HSPCA (HSP90A), HSPA5 (GRP78), HSPA1L (HSP70-HOM), HSPA8 (HSC70), HSPB1 (HSP27)
7 Costimulatory and adhesion molecules	7	CD80 (B7-1), SELL (selectin L), TNFRSF5 (CD40), CD163, CD86 (B7-2), HLA-DRA, FCER1G

多発性硬化症における *MxA* 遺伝子調節領域の SNP 頻度および機能解析

分担研究者 千葉 進¹⁾
共同研究者 古山裕康¹⁾、松下隆司¹⁾、岡林環樹²⁾、横田伸一²⁾、野中道夫¹⁾、
今井富裕¹⁾、藤井暢弘²⁾、松本博之¹⁾

研究要旨

MxA 蛋白は多発性硬化症(MS)においてインターフェロン(IFN)に対する中和抗体(NAB)の間接指標として利用されている。一方で、*MxA* はアポトーシスを含めた細胞機能を修飾することでウイルスの増殖を阻害していると推測されている。今回、63名の多発性硬化症患者における*MxA* 調節領域の SNP 頻度を検討したところ、nt-88T アレルが高頻度に見いだされた。更に、この SNP によって *MxA* の発現量が増加することがルシフェラーゼアッセイによって確認された。MS における *MxA* の意義はいまだ不明瞭であるが、MS 患者において *MxA* 調節領域のハプロタイプを考慮した上で *MxA* 発現の程度 (NAB の間接指標とする場合も含め)、あるいは IFN 治療への反応性を検討していく必要があると思われる。

目的

Myxovirus resistance protein A (*MxA*)はI型IFN (IFN- α / β)によって誘導される、ダイナミンスーパーファミリーに属する GTPase であり、インフルエンザウイルス等一本鎖 RNA ウイルスの増殖を抑制すると考えられている。最近の研究では、*MxA* 遺伝子あるいは *MxA* 蛋白の発現量が、多発性硬化症(MS)に対する IFN- β 治療の効果を減弱せしめる NAB の間接指標として有用であることが示されている。一方、*MxA* 遺伝子の調節領域には IFN stimulated response elements (ISRE)があるが、この近傍には SNP が存在しその変異によって IFN- α への反応性が異なることが示されている。更に、*MxA* はアポトーシスを含めたシグナル伝達に影響を及ぼしている可能性も示されている。今回我々は MS の遺伝子学的要因としての *MxA* の関与を明らかにするため、MS 患者における *MxA* 調節領域の SNP 頻度を検討し、更に *in vitro* における機能解析を試みた。

方法

●患者および対照

寛解増悪型 MS (RR-MS)患者 63名 (♀44、♂19、平均 47.7±14.4 歳)、対照 101名 (♀68、♂33、平均 47.9±20.1 歳)。患者群は McDonald 基準を満たしていた。対照群は正常成人、心身症患者、および脱髄性または炎症性以外の神経疾患患者からなる。

●PCR およびシーケンシング

ゲノム DNA は全血から分離し、*MxA* の調節領域から exon1 に至る-352 から+128 の範囲を下記のプライマーペアと条件によって PCR で増幅した。PCR 産物はゲル精製の後、PCR と同じプライマーペアを用いて塩基配列を直接解析した。

◆Primer pair of *MxA* (nt-352 to +128)

Forward: 5'-GGAACTGAAGACCCCAATTA-3'

Reverse: 5'-GCTAGTCTCCGCCACGAAC-3'

◆PCR condition

95°C × 15 min.	} 40 cycles
95°C × 30 sec.	
63°C × 30 sec.	
72°C × 30 sec.	
72°C × 7 min.	
4°C hold	

●統計解析

2×2 カイ二乗試験で MS 群と対照群のアレル頻度の差異を検討したが、後述のように 3 点の SNP についてハプロタイプとアレル頻度を検討したため、Bonferroni 補正を適用した (p 値を 6 倍した)。また、適宜 Yates 補正も適用した。ハプロタイプ頻度は eh.exe を用いて計算した。

●ルシフェラーゼアッセイによる調節領域の機能解析

88T/123C、88T/123A、88G/123C をもつ調節

1) 札幌医科大学医学部神経内科
2) 札幌医科大学医学部微生物学講座

領域のフラグメント(-532から+4)をPCRで増幅し、これらをpGL3-Basicベクターに挿入した。これらをpRL-SV40プラスミドと共にHela細胞に導入した後IFN- α と β をそれぞれ添加し、24時間インキュベートしルシフェラーゼ活性を測定した。

倫理面への配慮

本研究は札幌医科大学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。

結果

●MxA調節領域多型

Nt-123 (A or C)、nt-88 (G or T)およびnt+20 (A or C)の3ヶ所に既報告のSNPを見いだした観察された3カ所のSNP全てにおいてMS群と対照群で有意なアレル頻度の差が見られた(表)。観察された3つのSNPは物理的距離から予想されるように明らかに連鎖しており(MSにおける Δ^2 : -88-123 / -88+20 / -123+20 = 0.518 / 0.574 / 0.359)、主要なハプロタイプは限定されていた。MS群と対照群双方においてCGC (+20/-88/-123)ハプロタイプが最も多く観察されたが、MS群における頻度は対照群に比べ有意に低かった。一方で、MS群におけるATAおよびATCハプロタイプは対照群よりも高頻度であった。

●MxA調節領域の機能解析

I型インターフェロンによる調節領域の活性化を図に示す。全てのハプロタイプでIFNによりfirefly luciferaseの活性化が見られた。-88Tのものは-88Gよりも活性が高く、-123Aのものも-123Cより

活性が高かった。IFN- α と β では明らかな差異は認められなかった。

考察

本研究はMSにおけるMxAの調節領域のSNP頻度について検討した最初の報告である。ルシフェラーゼアッセイの結果を併せて考えると、-123A/-88TのMS患者においてはIFN投与下でより強くMxAを発現している可能性が示唆される。最近、in vitroで強発現したMxAはウイルス感染細胞にアポトーシスを引き起こし、ウイルス増殖を抑制していることがMibayashiらによって示されている。MSにおいては、MxAが強発現しアポトーシスが誘導された場合、それが免疫担当細胞であれば病態を軽減する事が期待できる一方、BBBの血管内細胞や膠細胞において生ずれば病態を悪化させる可能性もある。今後、MS患者においてMxA調節領域のハプロタイプを考慮した上でMxA発現の程度(NABの間接指標とする場合も含め)あるいはIFN治療への反応性を検討していくなかで、その病的意義を検討すべきと考えられる。

結論

MSにおいては、IFN治療に対するNABの間接指標としてのMxAの意義が既にコンセンサスを得ているが、本研究の結果はMxA調節領域のSNPがMSの遺伝的一要素である可能性を示唆している。

健康危険情報

なし

知的財産の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録：なし

図 MxA調節領域のルシフェラーゼアッセイ

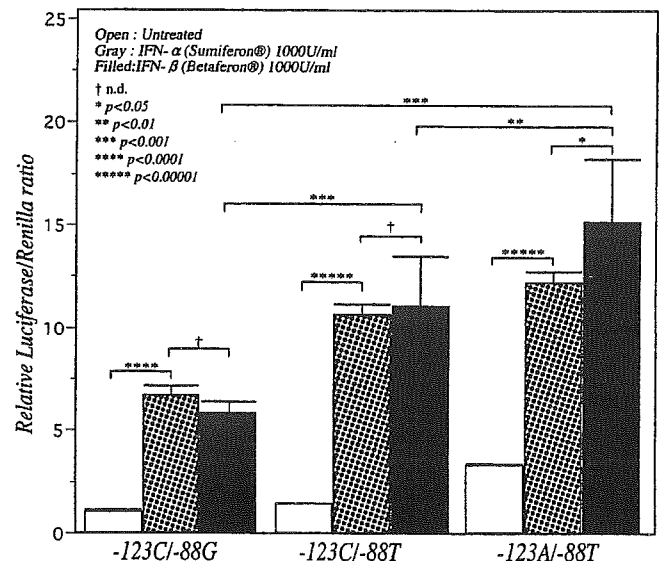


表 MxA調節領域およびExon1のgenotypeおよびAllele頻度

		MS n(%)	Control n(%)	p value
Genotype frequencies				
nt-123	C/C	37 (59)	79 (78)	0.04580 *
	C/A,A/A	26 (41)	22 (22)	
nt-88	G/G	25 (40)	65 (64)	0.01207 *
	G/T,T/T	38 (60)	36 (36)	
nt+20	A/A	15 (24)	9 (9)	0.17768 **
	C/A,C/C	48 (76)	92 (91)	
Allele frequencies				
nt-123	C	97 (77)	178 (88)	0.04621 *
	A	29 (23)	24 (12)	
nt-88	G	80 (63)	161 (80)	0.00731 *
	T	46 (37)	41 (20)	
nt+20	C	69 (55)	140 (69)	0.04622 *
	A	57 (46)	62 (31)	

*by 2x2 χ^2 test with Bonferroni's correction

**by 2x2 χ^2 test with Yates' correction and Bonferroni's correction

血液脳関門と血液神経関門を構成する内皮細胞の 細胞学的特徴の検討

班員 山口大学医学部神経内科 神田 隆
共同研究者 山口大学医学部神経内科 佐野泰照, 清水文崇, 前田敏彦,
安部真彰, 中山寛人
東北大学未来科学技術共同研究センター 寺崎哲也,
東北大学加齢医学研究所高橋利一 帯刀益夫
YS 研究所 上田正次, 高橋利一

研究要旨

ヒト自己免疫性末梢神経障害において、血液神経関門 (Blood-Nerve Barrier, BNB) の破綻は病勢の進行の鍵となる病的プロセスである。中枢神経系に存在する血液脳関門 (Blood-Brain Barrier, BBB) では tight junction 構成蛋白や transporter の解析を通じてその生物学的な特徴が解明されつつあるが、BNB の生物学的特徴は未だ明らかにされていない。今回我々は、BNB を構成する神経内膜内微小血管内皮細胞の初代培養を行い、BNB in vitro model を確立し、BBB in vitro model との比較を行うことにより BNB の性質を明らかにする。以上の目的を達成するための first step として、温度感受性ラージ T 抗原 transgenic rat を用い、BBB および BNB を構成する内皮細胞の初代培養法を確立した。

A. 研究目的

ギラン・バレー症候群や慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチーなどの難治性自己免疫性末梢神経疾患においては、末梢神経実質と循環血液との間に存在するバリアシステムである血液神経関門 (blood-nerve barrier: BNB) の破綻が認められる。血液神経関門の性質を解明することはこれらの免疫性神経疾患の病態解明並びにあらたな治療法開発においては必要不可欠である。

本研究では BNB の首座である末梢神経神経内膜内微小血管内皮細胞由来の in vitro model を樹立し、その細胞生物学的特性を解析することを目的とする。とくに血液脳関門

(blood-brain barrier: BBB) 由来微小血管内皮細胞との性質の相違を中心に解析を行う。

B. 研究方法

材料として温度感受性 SV40 ラージ T 抗原 (tsA58) transgenic rat を用いた。

< brain microvascular endothelial cells (BMECs) の単離 >

大脳皮質を中心に径 5mm 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

μm 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 (Kanda T et al. J Neurosci Res, 1997) の method に準ずる。

< *peripheral nerve microvascular endothelial cells (PnMECs) の単離* >

坐骨神経を摘出。坐骨神経の神経上膜、神経周膜を実体顕微鏡下にて剥離除去し、collagenase にて消化を行う。その他詳細は既報告 (Kanda T et al. J Neurosci Res, 1997) に準ずる。神経上膜の除去は比較的容易である。残った神経周膜およびその内部にある神経内膜を引き裂く要領で神経内膜を取り出す。得られた PnMECs のクローンの BNB 構成細胞としての characterization をしっかり行う。

< BMECs, PnMECs の characterization および解析 >

脳毛細血管および神経内膜内微小血管を分離後、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 ^{14}C -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 BBB および BNB モデルとして解析を行う。Tight junction protein である occludin, claudin-1, 5, 12 や transporter である GLUT-1, mdrla の BNB での発現を検証するとともに BBB 構成内皮細胞との発現量の差異を RT-PCR を用いて解析する。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を使用する研究であり、動物愛護上の配慮を必要とする。これに関しては山口大学医学部動物実験施設倫理委員会へ実験計画書を提出し、承認を得ている。

C. 研究結果

温度感受性 SV40 ラージ T 抗原 transgenic rat からの脳毛細血管内皮細胞および神経内膜内微小血管内皮細胞の一次培養法を確立した。33°C の温度条件下における培養では、BMECs および PnMECs とともに得られた内皮細胞群のコロニー間で発育速度に差異が見られ、生物学的特性のコロニー間で若干の相違が予想される。

D. 考察

このラットを用いた in vitro BBB モデルはすでに報告されており、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ることがわかっている。今回われわれが初代培養に成功した BMECs および PnMECs 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、極力多くの内皮細胞群を樹立し、BBB, BNB のバリアーとしての性質を最も保持した内皮細胞株を選定した上で、それらの解析を行っていくことが重要であると考えている。

E. 結論

温度感受性 SV40 ラージ T 抗原 transgenic rat からの BMECs および PnMECs の一次培養法を確立した。現在、BMECs, PnMECs の解析を進めている。

【参考文献】

1) Poduslo JF et al.: Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers.

Proc Natl Acad Sci USA 91(12):5705-9, 1994

2) Kanda T et al.: Isolation and culture of bovine endothelial cells of endoneurial origin.

J Neurosci Res 49(6):769-77, 1997

3) Argall KG et al.: A method for the isolation and culture of rat peripheral nerve vascular endothelial cells.

Mol Cell Neurosci 5(5):413-7, 1994

4) 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(6):357-70, 2000

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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・トウス病. 七川敏次監修、リウマチ病セミナーXVI. 永井書店、pp98-108, 2005.

2. 学会発表

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: 一過性の回轉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: 一過性の回轉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 λ 鎖部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 λ 鎖部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.

H. 知的財産権の出願・登録情報

特許取得：なし

実用新案登録：なし

脳毛細血管内皮細胞における Homing 関連分子の発現と IFN β の作用

分担研究者 水澤英洋¹⁾

共同研究者 山脇正永¹⁾、大和田潔¹⁾、岡本尚子¹⁾、神田 隆²⁾

研究要旨

血液脳関門(BBB, blood-brain barrier)は多発性硬化症をはじめとする自己免疫性神経疾患において自己感作性細胞の homing に関与し、中枢神経系への炎症の第一段階を惹起する場である。BBB の血管側の脳血管内皮細胞 chemokine、及びその受容体である chemokine receptor、matrix metalloproteinases (MMPs)がこのカスケードに関与している。また、近年シグナル調節因子として TLR(Toll-like receptor)が注目されてきている。

本研究では中枢神経系炎症の第一の場である血液脳関門における炎症関連分子、特に 1) chemokine, chemokine receptor 及びその関連分子、2) MMPs とその関連分子、3) TLR/IL-1R ファミリー及びその関連分子、の動態について、培養ヒト脳毛細血管内皮細胞 (HBMECs) を用いた我々の研究結果のうち IFN β の HBMECs への作用を中心に解析した。

目的

脳毛細血管内皮細胞 (brain microvascular endothelial cells: BMECs) は多発性硬化症をはじめとする自己免疫性神経疾患において、自己感作性細胞の homing に関与し、中枢神経系への炎症の第一段階を惹起する場である¹⁾。本研究の目的は BMECs を用いて IFN β の homing 関連分子への作用、特に 1) chemokine, chemokine receptor 及びその関連分子、2) MMPs とその関連分子、3) TLR/IL-1R ファミリー及びその関連分子、の動態を明らかにすることである。

方法

1) 細胞培養及びサイトカイン刺激

BMECs は女性剖検脳から採取した。定法により毛細血管内皮細胞を分離・継代培養を行った。内皮細胞の同定は抗 von Willebrand 因子と DiI-acetylated LDL にて行い、純度 98%以上の培養細胞を用いた。

IFN β による遺伝子発現調節を確認するために、IFN β にて刺激した BMECs と非刺激の BMECs による比較を行った。また、炎症性サイトカイン存在下における IFN

β による遺伝子発現調節を確認するために、TNF α を添加した BMECs を用いて IFN β にて刺激した HBMEC と非刺激の BMECs による比較をおこなった。各条件の HBMEC はスクレイパーにて収集後、直ちに mRNA 抽出を開始した。

2) DNA microarray

DNA チップは Human 3K Chip (Takara) を用いた。PolyA RNA を鋳型とし、reverse transcriptase により逆転写反応で Cy3, Cy5-dUTP を取り込ませた。Cy3 及び Cy5 標識プローブを混合して 65°C、14 時間でハイブリダイゼーションを行った。測定は Affimetrix 428 Array Scanner にて Cy3, Cy5 各検出波長において、シグナル強度に応じた 3 段階で測定した。データ解析は BioDiscovery ImaGene Ver. 4.2 を用いた。

今回の検討では chemokine, chemokine receptor 及びその関連分子、MMPs とその関連分子、TLR/IL-1R ファミリー及びその関連分子に関して解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京医科歯科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。

1) 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学

2) 山口大学医学部脳神経病態学神経内科

結果

IFN β 刺激後及び非刺激 BMECs の比較の結果、chemokine では CXCL1, CXCL2, IL-8, Mig, MCP-1, MCP-3, TECK, fractalkine の上昇、MIP-1 α , CCL11, CCL13, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21 の低下を認めたが、MIP-1 β , RANTES, SDF-1 については変動を認めなかった。

Chemokine receptor の解析では CCR1, CCR2, CCR4, CXCR4 の発現低下を認めた。

MMPs については、MMP-1, MMP-15, TACE (TNF α converting enzyme), ADAM-9 (a disintegrin and metalloproteinase domain-9) の上昇、MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-19, TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) の低下を認めた。

また、TLRs に関しては、TNF α 刺激により IL-1R ファミリーでは IL-18R の亢進を認めたが、IL-1R type I 及び type II については変動を認めなかった。TLR ファミリーでは TLR2 の亢進と TLR2 関連遺伝子として MyD88, TRAF ファミリーの発現亢進を認めた。さらに下流の NF κ B に関しても発現の亢進を認めた。また、TRL4 関連遺伝子の発現は変動がなく、TLR5 については発現の低下が見られた。

考察

脳毛細血管由来血管内皮細胞は IFN β によって、CCR1, CCR2, CCR4, CXCR4 などの chemokine receptor については主として down-regulation され、IFN β はリンパ球の接着に関して抑制的に作用することが示唆された²⁾。一方、これまでの単球を用いた報告と異なり、IFN β の血管内皮細胞に対する作用として、IL-8, MCP-1, MCP-3, fractalkine などの chemokine 遺伝子が誘導され、炎症を促進性に誘導することも示唆された。MMPs については、IFN β によって BBB の内皮細胞

側でも MMP-9 をはじめとする MMPs の減少、TACE の上昇がみられており、内皮細胞のレベルで MMPs の発現抑制が認められた。この結果から IFN β は MS の炎症細胞の transmigration に MMPs の発現低下を介して抑制性に働くことが考察された³⁾。TLRs に関しては、TLR2 の亢進と TLR2 関連遺伝子として MyD88, TRAF ファミリーの発現亢進を認めた。TRL4 関連遺伝子の発現は変動がなく、TLR5 については発現の低下が見られた。我々の解析結果の解釈としては、血管内皮細胞で炎症がある場合に、TLR 及びその関連遺伝子が誘導されることが明らかとなったが、TLR を介したメカニズムが脳血管内皮細胞の炎症を増悪することも示唆される。

結論

IFN β は脳微小血管内皮細胞の、MMP9 \rightarrow IL-8 の刺激経路、MMP9 による MCP3, eotaxin, CCL17 の gradient 形成経路、を抑制することによって、炎症反応を修飾しているものと推定される。

文献

- 1) Prat A, Biernacki K, Antel JP. Th1 and Th2 lymphocyte migration across the human BBB is specifically regulated by interferon beta and copolymer-1. *J Autoimmunity*. 24:119-24, 2005
- 2) Kraus J, Ling AK, Hamm S, Voigt K, Oschmann P, Engelhardt B. Interferon-beta stabilizes barrier characteristics of brain endothelial cells in vitro. *Ann Neurol* 56:192-205, 2004
- 3) Nelissen I, Martens E, Van den Steen PE, Proost P, Ronsse I, Opdenakker G. Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 cleaves interferon-beta and is a target for immunotherapy. *Brain* 126:1371-1381, 2003

多発性硬化症における TRAIL および MMP-9 と TIMP-1 の血中動態に関する検討

分担研究者 郡山達男¹⁾

共同研究者 檜垣雅裕²⁾、越智一秀³⁾、池田順子⁴⁾、松本昌泰¹⁾

研究要旨

本研究では、多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) の interferon- β (IFN β) 療法における TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) の意義を、MMP-9 (matrix metalloproteinase-9) と TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1) を用いて解析する目的で、これらの血中動態について検討した。血清 TRAIL 濃度は、IFN β 投与中の MS 患者では、IFN β 非投与の MS 患者に比較して有意の高値が認められた。一方、IFN β 無効群は例数が少なかったが血清 TRAIL 濃度は低値であった。このことは、MS において、血清 TRAIL 濃度の上昇は IFN β の効果の予測因子になりうるという従来の報告を支持する結果であった。また、TRAIL 濃度と MS の活動性の指標といわれる血漿 MMP-9 濃度の間には負の相関を認めた。TRAIL 濃度が高値の例では、MS の病態において、病変の形成が抑制され、相対的に病変の修復が優位の方向にシフトしている可能性があると考えられた。

研究目的

多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) の再発抑制療法として interferon- β (IFN β) が導入され、TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) がその効果の予測因子となりうる¹⁾という報告がなされている。MS の病態として血液脳関門の破綻、マクロファージと T リンパ球の病変部位への浸潤が特徴とされる。

以前、我々は MS の病変形成における細胞外基質プロテアーゼの matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) とその組織阻害因子の tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) の関与を検討した。本研究では、MS の IFN β 療法における TRAIL の意義を MMP-9 と TIMP-1 を用いて解析する目的で、これらの血中動態を検討した。

研究方法

対象は増悪・寛解型の MS 患者 57 例 (年齢中央値 48 歳) を用いた。MS 患者において、活動期は初発あるいは再発から 3 カ月未満とし、回復期は 3 カ月以降とした。IFN β 投与中

1) 広島大学大学院脳神経内科学

2) 広島大学病院脳神経内科

3) 国立病院機構呉医療センター神経内科

4) 県立広島病院神経内科

の患者は、投与開始後 6 ヶ月以上経過した症例を対象とし採血を行った。対照として年齢を一致させた健常者 22 名 (年齢中央値 44 歳) を用いた (表 1)。採血後直ちに遠心分離し、血清および血漿を -80℃ にて保存したものを測定に用いた。血清 TRAIL 濃度は ELISA 法 (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) で測定し、血漿 MMP-9 濃度と血清 TIMP-1 濃度は ELISA 法 (Amersham Bioscience UK Limited., Buckinghamshire, England) で測定した。統計学的解析には t 検定を用いて検討し、 $p < 0.05$ を有意とした。

表 1 対象患者

	IFN β 非投与	IFN β 投与中
活動期 MS	24 例	4 例
回復期 MS	18 例	11 例
健常者	22 例	

(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

対象とした増悪・寛解型 MS 患者 57 例のうち、活動期は 28 例で、4 例で IFN β を投与していた。回復期は 29 例で 11 例が IFN β を投与していた。そのうち明らかに IFN β 無効と思われた例は活動期 1 例と回復期 1 例であった。

IFN β 非投与の活動期 MS 患者における血清 TRAIL 濃度 (平均値 \pm 標準誤差) は 70.3 ± 30.6 pg/ml、IFN β 非投与の回復期 MS 患者では 58.4 ± 15.8 pg/ml、IFN β 投与中の活動期 MS 患者では 119.1 ± 45.2 pg/ml、IFN β 投与中の回復期 MS 患者では 119.8 ± 58.2 pg/ml、正常対照では 78.6 ± 21.0 pg/ml であった。

また、IFN β 無効例の TRAIL 濃度は低値 (回復期と活動期のそれぞれ 51.43 pg/ml と 48.151 pg/ml) であった。

IFN β 非投与の活動期 MS 患者における血清 TIMP-1 濃度 (平均値 \pm 標準誤差) は 6274.1 ± 1191.4 ng/ml、IFN β 非投与の回復期 MS 患者では 6558.7 ± 1435.7 ng/ml、IFN β 投与中の活動期 MS 患者では 5382.5 ± 436.2 ng/ml、IFN β 投与中の回復期 MS 患者では 6044.6 ± 839.5 ng/ml、正常対照では 5105.5 ± 1298.0 ng/ml であった。

IFN β 非投与の活動期 MS 患者における血漿 MMP-9 濃度 (平均値 \pm 標準誤差) は 13.72 ± 13.0 ng/ml、IFN β 非投与の回復期 MS 患者では 18.80 ± 16.39 ng/ml、IFN β 投与中の活動期 MS 患者では 4.46 ± 1.96 ng/ml、IFN β 投与中の回復期 MS 患者では 9.66 ± 8.27 ng/ml、正常対照では 17.04 ± 19.95 ng/ml であった (表 2)。

IFN β 非投与の MS 患者では、回復期で正常対照と比較して有意に TRAIL 濃度が低下しており ($p=0.002$)、活動期では統計学的有意差は無いものの正常対照と比較して TRAIL 濃度が低下傾向を認めた。IFN β 投与中の MS 患者では、回復期と活動期の双方で正常対照と比較して有意に TRAIL 濃度が上昇しており (それぞれ、 $p=0.006$ と $p=0.012$)、回復期と活動期ともに IFN β 投与中の MS 患者は IFN β 非投与

の患者と比較して有意に TRAIL 濃度が上昇していた(それぞれ、 $p=0.002$ と $p=0.020$) (図 1)。

IFN β 非投与の患者では、回復期と活動期の双方で正常対照と比較して有意に TIMP-1 濃度が上昇していた(それぞれ、 $p=0.002$ と $p=0.003$)。IFN β 投与中の患者において、回復期では正常対照と比較して有意に TIMP-1 濃度が上昇していた ($p=0.045$)。活動期では正常対照と比較して有意な差は認めなかった (図 2)。

血漿 MMP-9 濃度および MMP-9/TIMP-1 の

比についても検討したが、IFN β 投与中の患者は IFN β 非投与の患者に比較して低値傾向が認められたが、統計学的有意差は認めなかった (図 3 と 4)。

血清 TRAIL 濃度と血漿 MMP-9 濃度の相関について検討したところ、血清 TRAIL 濃度と血漿 MMP-9 濃度の間に負の相関を認めた ($p=0.048$) (図 5)。

血清 TRAIL 濃度と血清 TIMP-1 濃度との間および血漿 MMP-9 濃度と血清 TIMP-1 濃度の間には有意な相関を認めなかった。

表 2 TRAIL、MMP-9 および TIMP-1 の血中濃度

	TRAIL 濃度 (pg/ml)		MMP-9 濃度 (ng/ml)		TIMP-1 濃度 (ng/ml)	
	IFN β (-)	IFN β (+) (IFN β 無効例)	IFN β (-)	IFN β (+) (IFN β 無効例)	IFN β (-)	IFN β (+) (IFN β 無効例)
活動期 MS	70.3 \pm 30.6	119.1 \pm 45.2 (51.43)	13.72 \pm 13.0	4.46 \pm 1.96 (24.70)	6274.1 \pm 1191.4	5382.5 \pm 436.2 (51.43)
回復期 MS	58.4 \pm 15.8	119.8 \pm 58.2 (48.15)	18.80 \pm 16.39	9.66 \pm 8.27 (2.04)	6558.7 \pm 1435.7	6044.6 \pm 839.5 (48.15)
健常者	78.6 \pm 21.0		17.04 \pm 19.95		5105.5 \pm 1298.0	

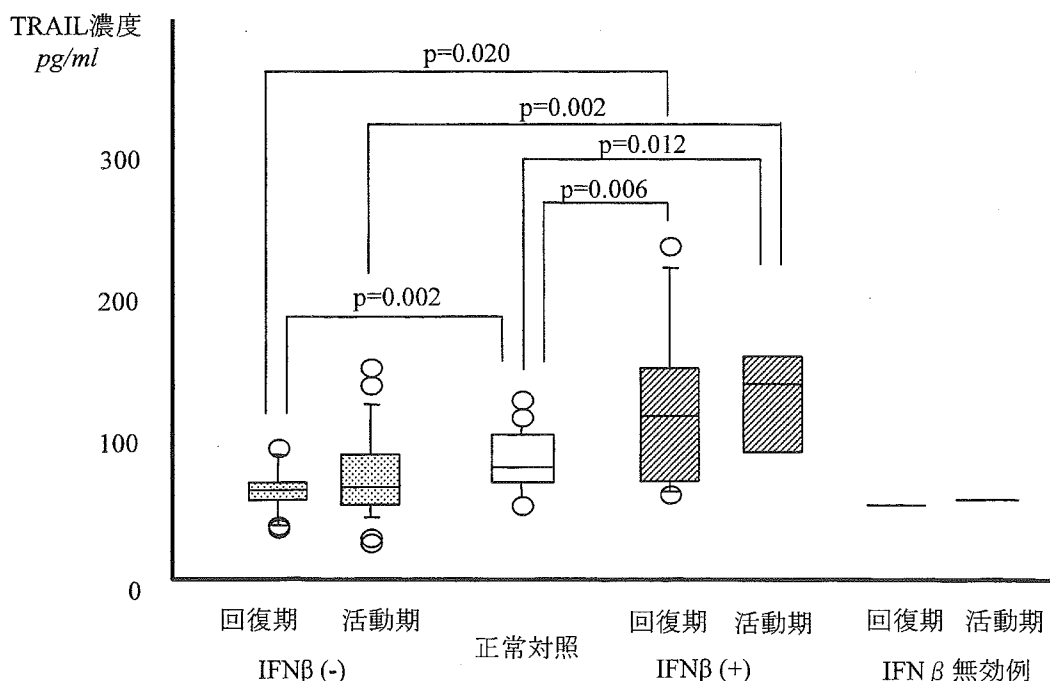


圖 1 血清 TRAIL 濃度

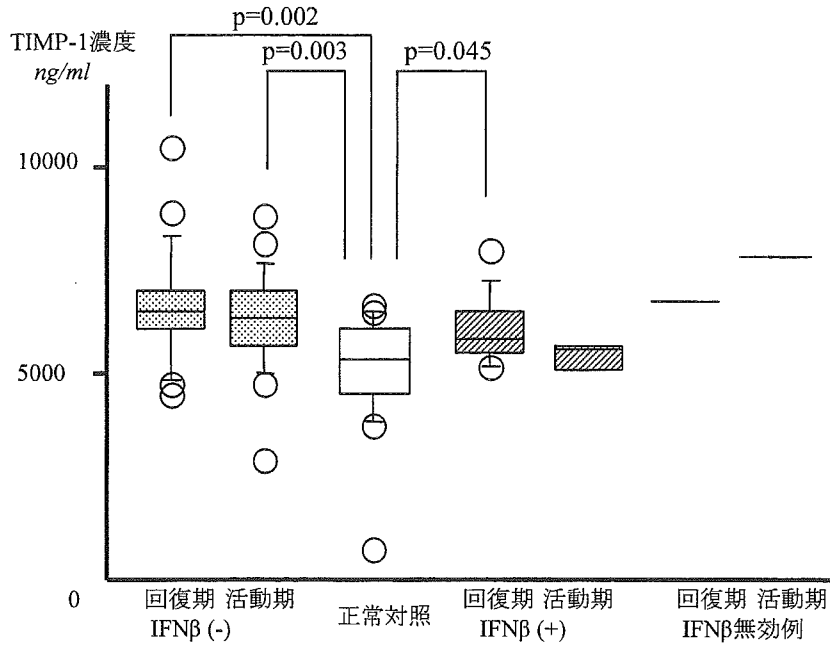


圖 2 血清 TIMP-1 濃度

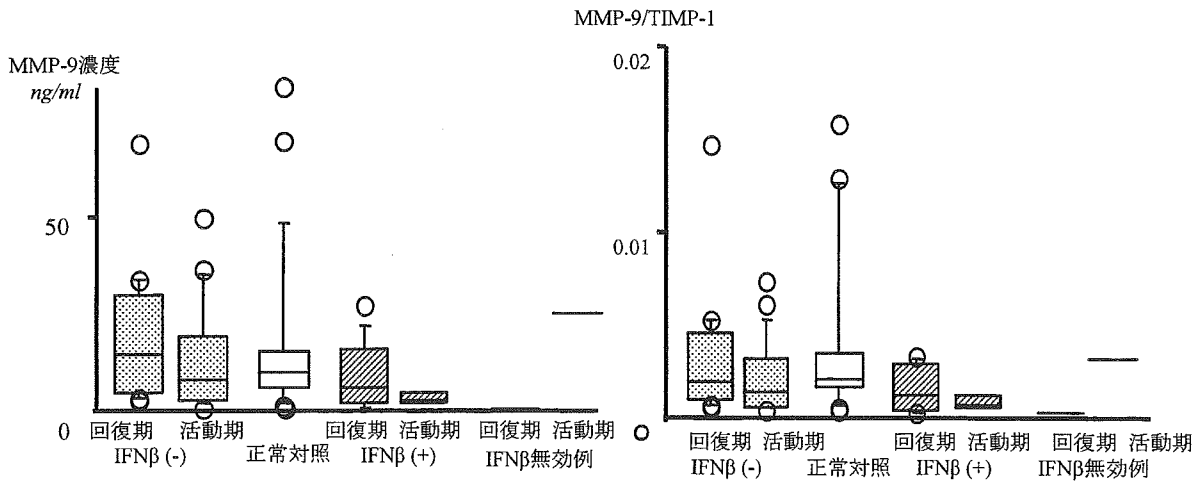


圖 3 血漿 MMP-9 濃度

圖 4 MMP-9/TIMP-1

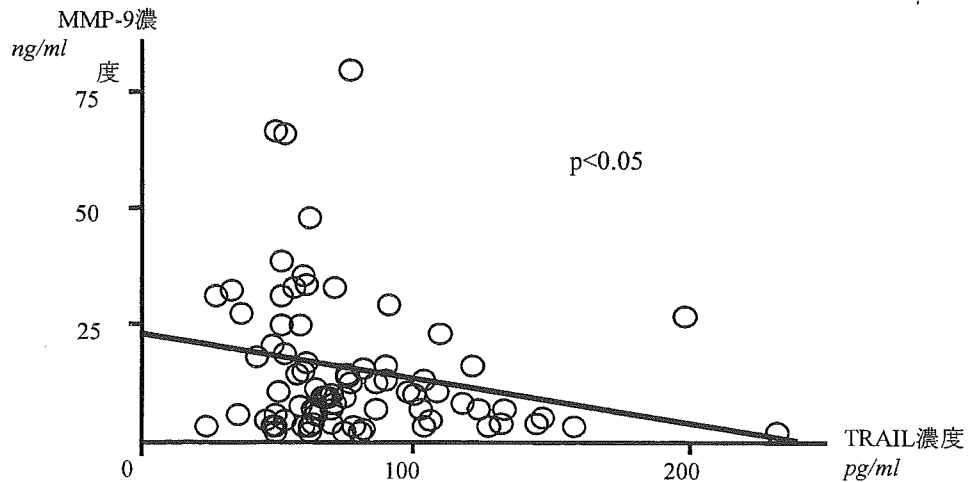


図5 多発性硬化症における MMP-9 と TRAIL の相関

考察

TRAIL は自己免疫性疾患の発症機序への関与が示唆され、また MS における IFN β の効果予測のマーカーとしての有効性が指摘されている¹⁾。MMP-9 は、MS の病変形成の特徴である血液脳関門の破綻、炎症細胞の浸潤、そして髄鞘の破壊に関与し、疾患活動性との相関が示唆されている²⁾。一方、TIMP-1 は MMP-9 の活性を調節する内因性の阻害因子であり、組織損傷において修復に関与することが示唆されている^{3,4)}。

本研究において、MS 患者では、血清 TRAIL 濃度は IFN β 投与群では IFN β 非投与群と比較して有意の高値が認められ、一方、IFN β 無効群は例数が少なかったが血清 TRAIL 濃度は低値であった。このことは、MS において、血清 TRAIL 濃度の上昇は IFN β の効果の予測因子になりうるという従来の報告を支持する結果であった。

IFN β 投与群では、血清 TRAIL 濃度が IFN β 非投与群と比較して有意に高値であり、TRAIL 濃度と MS の活動性の指標といわれる MMP-9 濃度の間には負の相関を認めた。このことから、TRAIL 濃度が高値の例では、MS の病態において、病変の形成が抑制され、相対的に病変の修復が優位の方向にシフトしている可能性があると考えられる。

結論

MS において IFN β 投与により、MMP-9/TIMP-1 のバランスが TIMP-1 優位の方向にシフトすることにより、病変形成より

病変の修復の方向にシフトしている可能性がある。IFN β の投与により血清 TRAIL 濃度が高値の例では、MMP-9/TIMP-1 のバランスが相対的に TIMP-1 優位であったことから、血清 TRAIL 濃度の上昇は、MMP-9/TIMP-1 のバランスを反映して、IFN β の効果を予測している可能性がある。

文献

- 1) Wandinger KP, et al. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet* 361: 9374, 2003
- 2) Leppert D, et al. Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. *Brain* 121: 2327-34, 1998
- 3) Lee MA, et al. Serum gelatinase B, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis. A longitudinal clinical and MRI study. *Brain* 122: 191-7, 1999
- 4) Waubant E, et al. Serum MMP-9 and TIMP-1 levels are related to MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 53: 1397-401, 1999

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