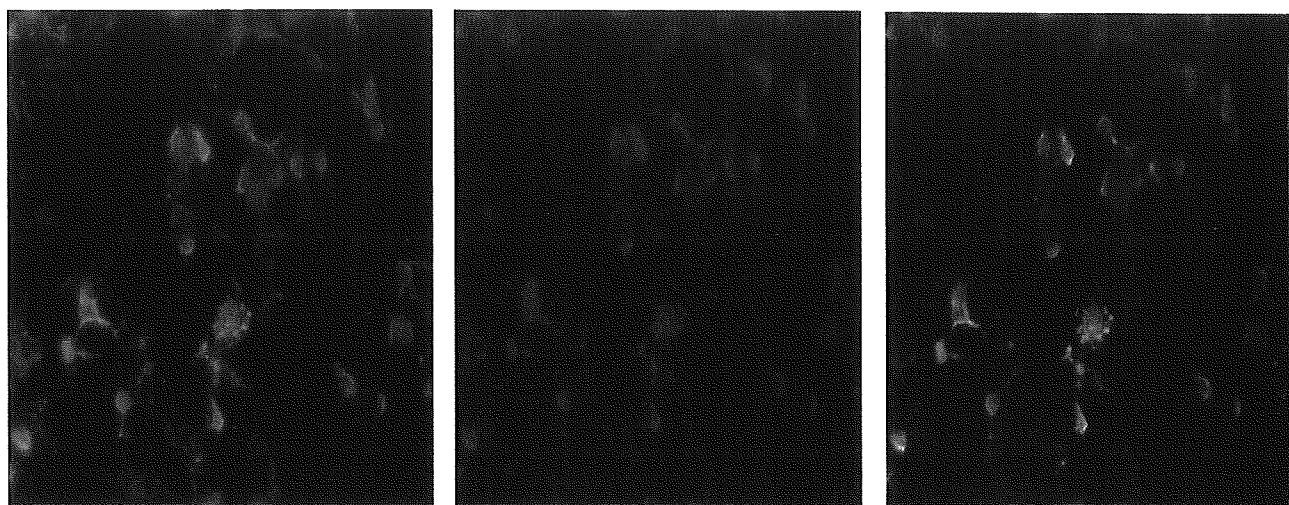


視神経脊髄型多発性硬化症での 抗 Aquaporin-4 抗体の解析



L-OSMS

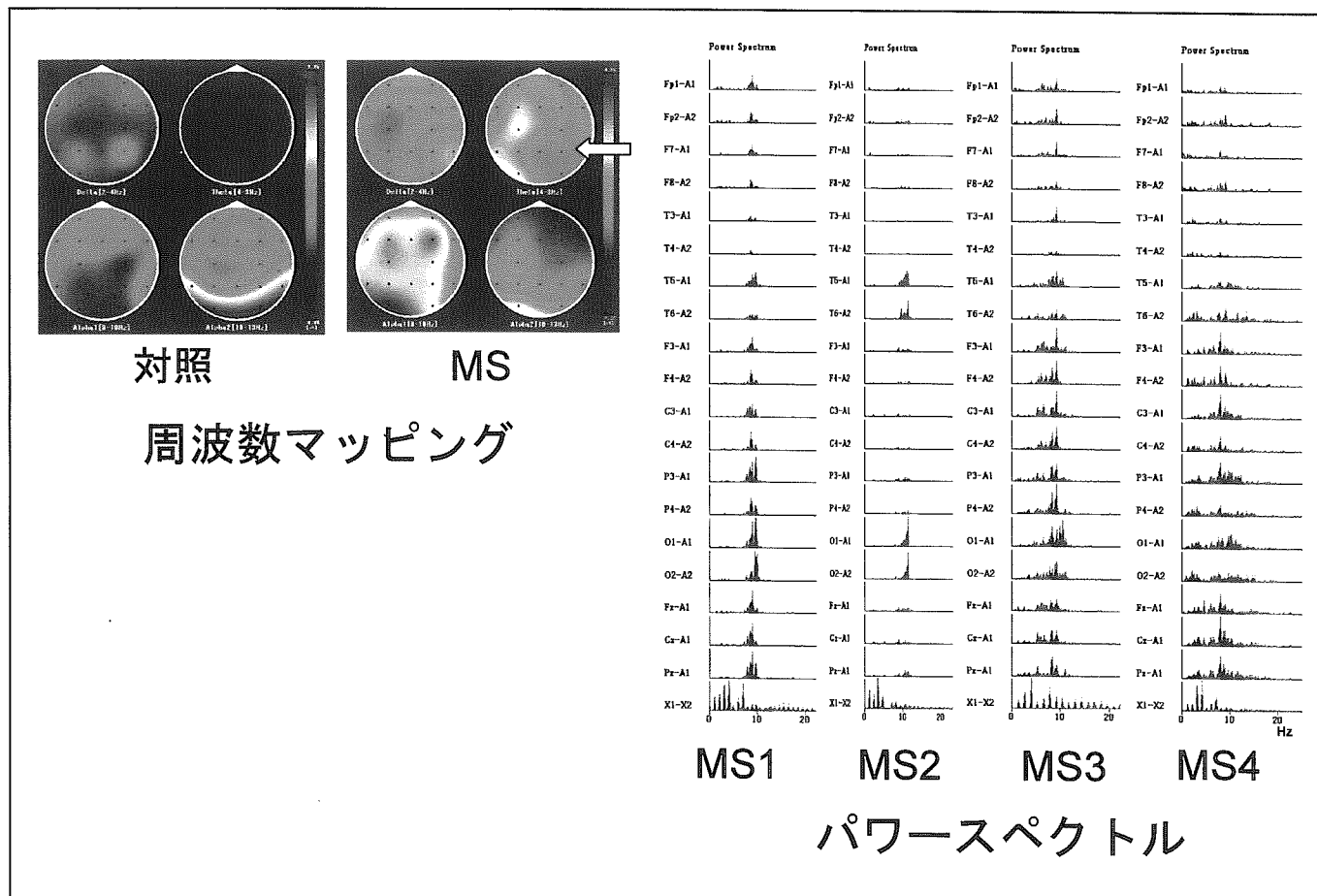
AQP4抗体

Merge画像

解 説

1. Human AQP4-transfected HEK-293細胞を用いて本邦のOSMS血清について、抗AQP4抗体の有無を検討した。
2. 脊髄に3椎体以上の長病変を有するOSMS(L-OSMS)では、10例中6例で抗AQP4抗体が陽性であった。
3. 1椎体前後の短脊髄病変を有するOSMS 2例、CMS 4例ではすべて陰性であった。
4. 本邦のOSMSには、NMO-IgG (抗AQP4抗体) 陽性群、陰性群と、病態が異なる群が混在している可能性が考えられた。

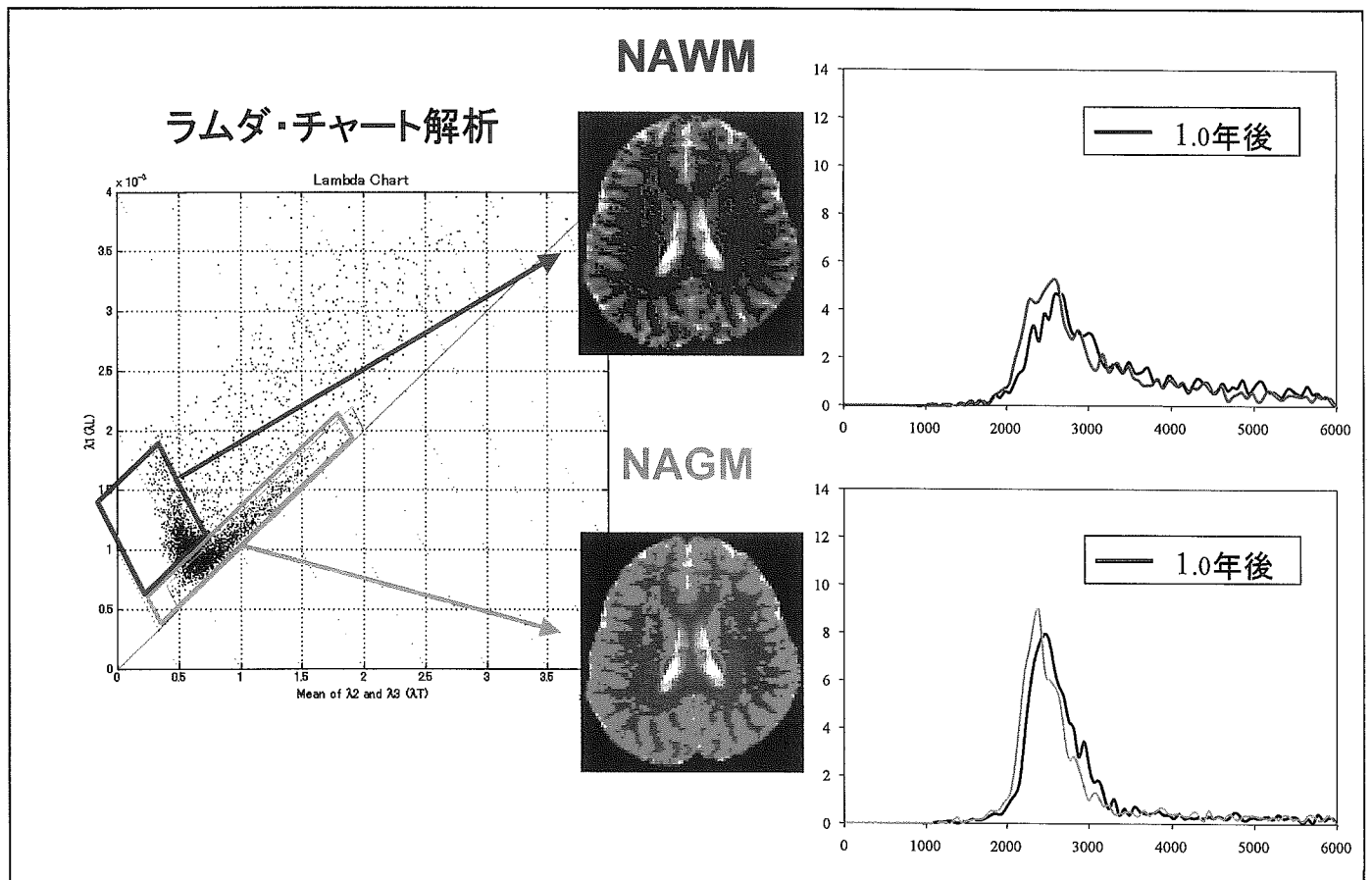
多発性硬化症 (MS) の定量的脳波解析



解説

1. 周波数マッピングを作成すると徐波の増加(矢印で示す緑色と一部、黄色の部分)はMSで容易に確認される
2. 各誘導のパワースペクトルはMS患者(MS3、MS4)の δ 波(2-4Hz: 黒色)、 θ 波(4-8Hz: 緑色)の増加を認める.
3. このような定量的脳波解析はMSの客観的な脳機能評価の一助になると考えられる.

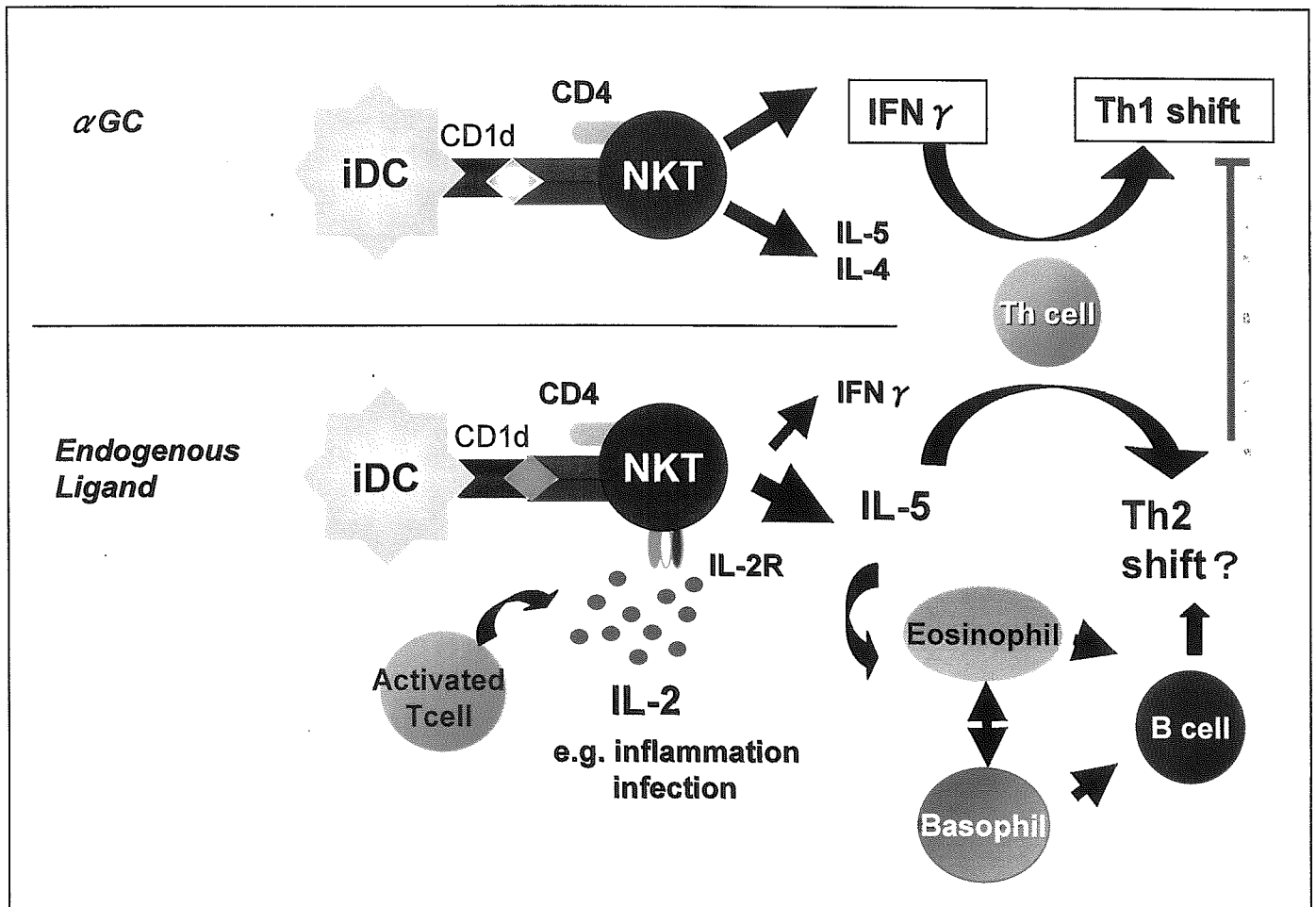
MRI拡散テンソルトレースヒストグラムによる 多発性硬化症患者の経時的解析



解説

1. われわれは、平成15年度にMRI拡散テンソルトレースヒストグラムにより、normal appearing gray/white matter(NAGM/NAWM)の機能評価を行う手法を報告した。
2. 今回、この手法をもちいて多発性硬化症患者のNAGM/NAWM機能障害の経時的変化を評価した。
3. インターフェロン(IFN)β-1b未使用の患者で認められたヒストグラムの右方移動が、IFN β-1b使用中の患者では認められないことがわかった。
4. 今回の結果は、IFN β-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。

IL-2を介したCD4陽性NKT細胞による IL-5 Th2サイトカインの選択的産生



解説

1. IL-2を介して、IL-5を主としたTh2優位のサイトカインを産生するCD4陽性NKT細胞クローンの一群を見出した。
2. IL-5の産生には、T細胞受容体-CD1d分子間認識による、内因性抗原を介したsuboptimalな刺激が必要である。
3. 生理学的環境下で、Th1偏倚を是正する調節細胞として働きうる可能性が示された。

多発性硬化症と制御性T細胞、Foxp3遺伝子 -IFN-β 1bによる治療効果について-

図1: CD4+CD25^{high}制御性T細胞について:
IFN-β 1b投与後増加。再発群では低下。

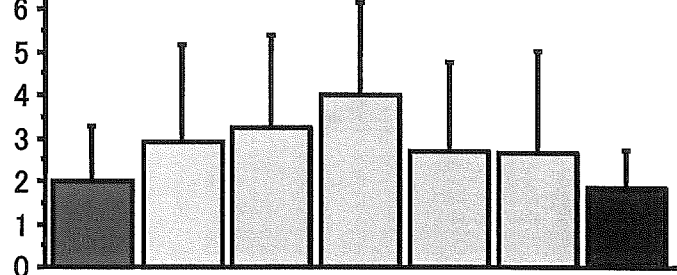
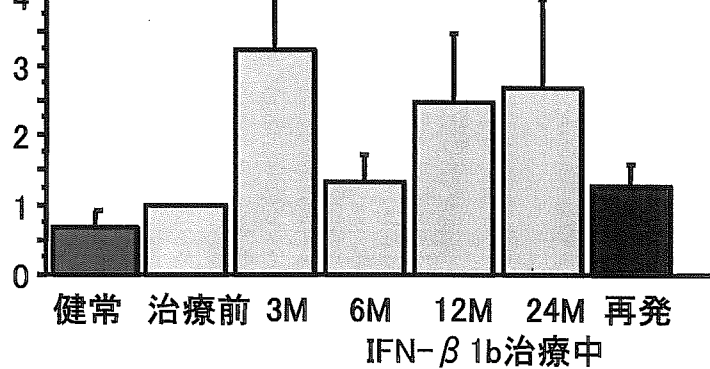
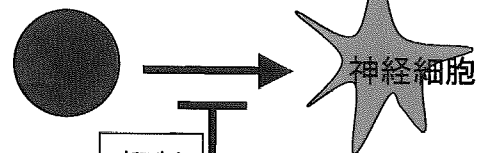


図2: FOXP3(制御性T細胞のマーカ-遺伝子)mRNA発現がIFN-β 1b投与後増加。再発群では低下。



神経細胞にダメージを与える
自己反応性T細胞



抑制

FoxP3を発現している
CD4+CD25+制御性細胞

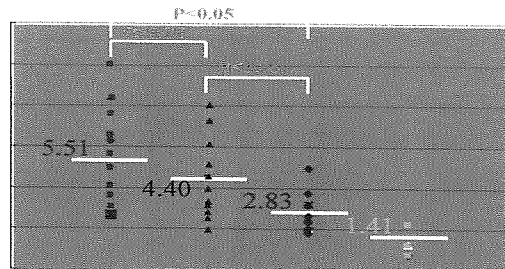
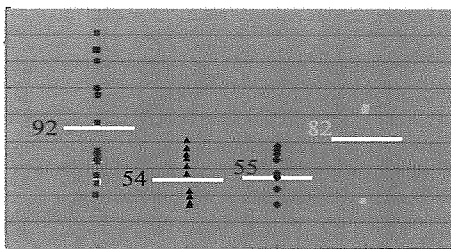
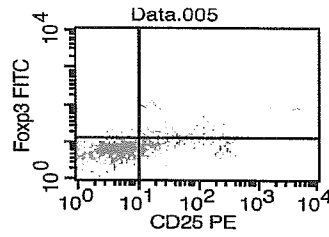
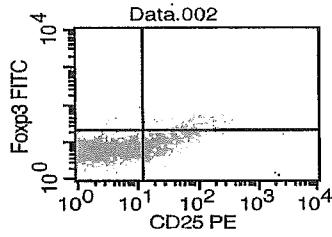
IFN-β 1bは制御性T細胞を介して
自己免疫性T細胞を抑制する可能
性がある。これは、MSに対する治
療効果のひとつかもしれない。

分担研究者: 東京理科大 太田宏平
共同研究者: 東京女子医科大 清水優子

解 説

1. CD4+CD25^{high}制御性T細胞 (CD4+CD25^{high}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。
2. 多発性硬化症ではCD4+CD25^{high}Treg細胞、Foxp3遺伝子発現ともIFN-β 1b投与後に増加しており、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。

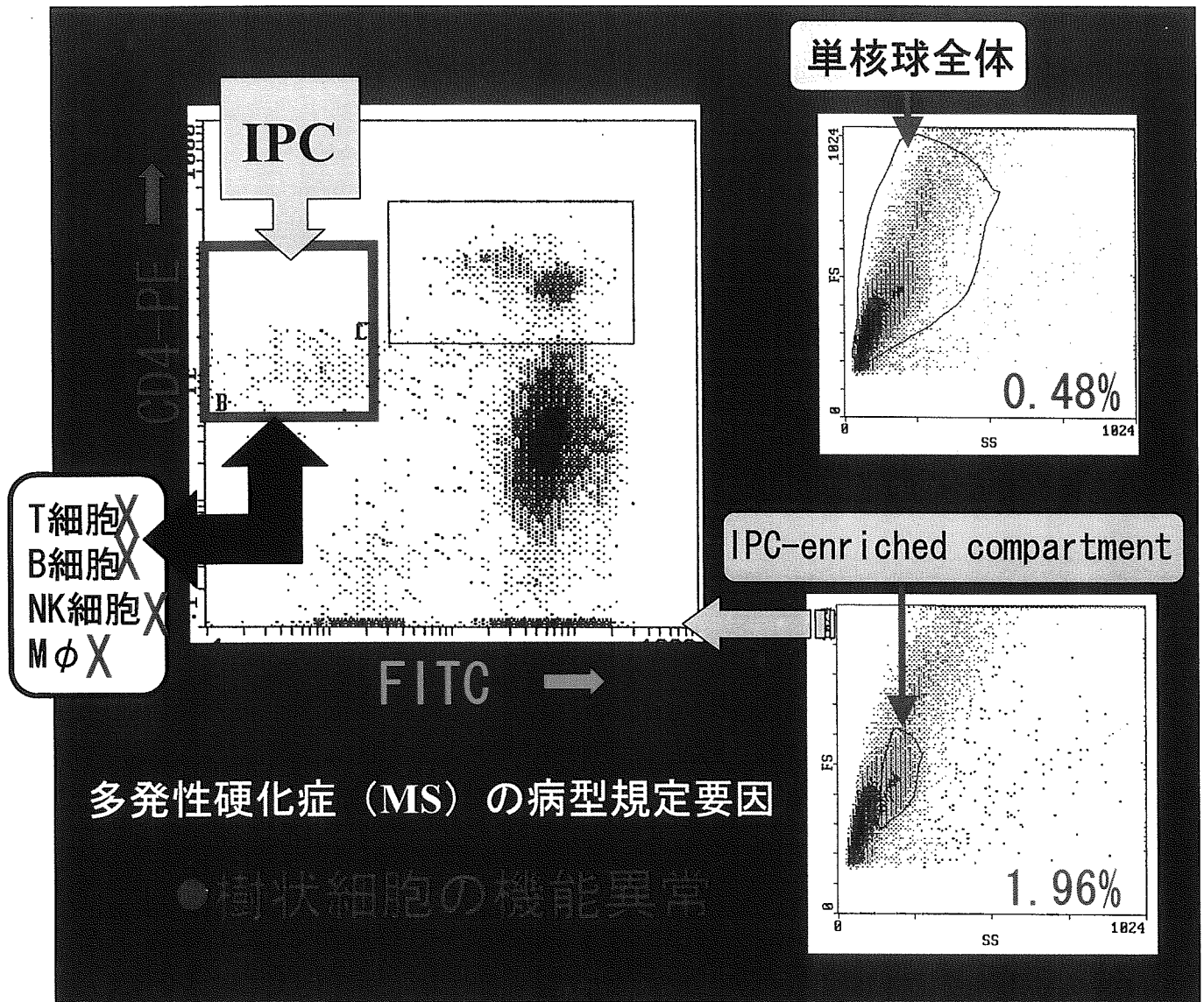
多発性硬化症末梢血 Foxp3+制御性T細胞の動態とCD25発現



解 説

1. CD25の発現強度を指標とした同定法とは異なり、Foxp3を指標としたより正確な同定法では制御性T細胞はMS患者で減少していた。
2. IFN- β 使用患者では、有意に制御性T細胞が増加していた。
3. MSでは制御性T細胞のCD25発現は低下しており、CD25high細胞はFoxp3-細胞 (おそらく活性化T細胞) が主体である場合があった。

多発性硬化症の病型規定要因の解析



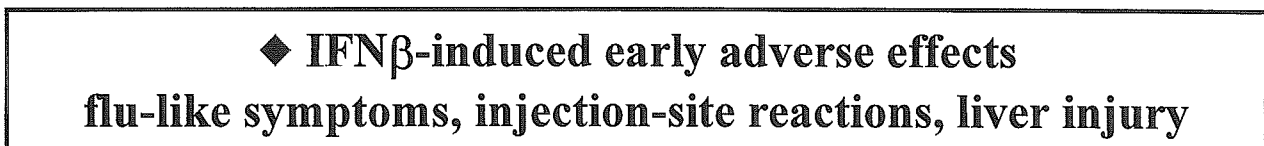
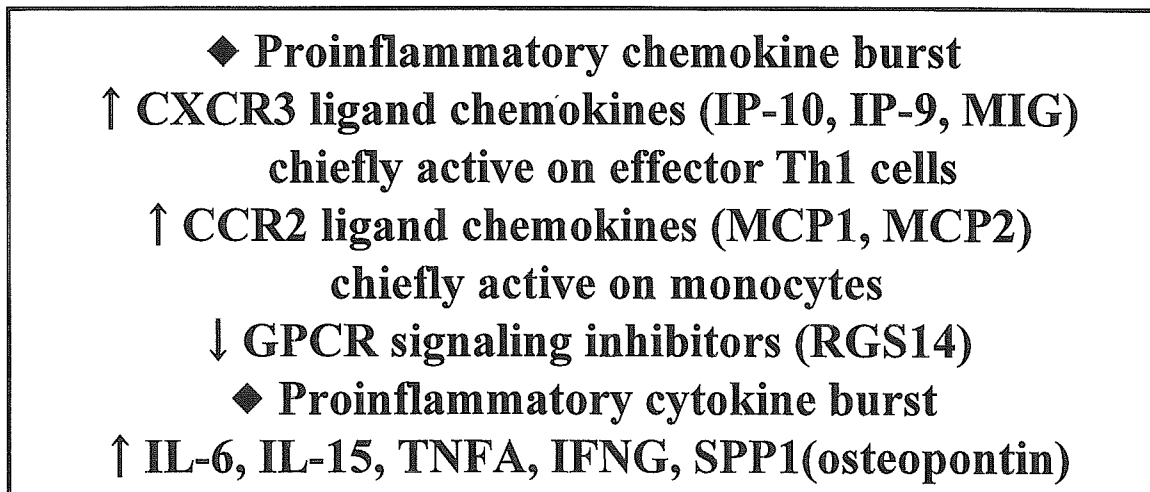
解説

- 1) Natural interferon-producing cell (IPC) はII型樹状細胞の前駆細胞とされる。IPCの存在率は、フローサイトメトリーにより比較的簡便にしかも再現性よく測定することができた。
- 2) IPC-enriched compartmentにおけるIPC存在率は、再発寛解型MSと一次性進行型MSで明らかに異なっていた。したがって、MSの病型を規定する要因として、樹状細胞が重要な役割を担っていると推定された。

IFN応答遺伝子群とIFNβ副作用

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 (IFISG20), 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, IRF3
#3 Chemokines and receptors	11	SCYB11 (CXCL11, I-TAC), SCYB10 (CXCL10, IP-10), SCYA8 (CCL8, MCP2), SCYA9 (CXCL9, MIG), SCYA2 (CCL2, MCP1), CCR5, SCYA4 (CCL4, MIP1B), IL8RB (CXCL8), 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), CCL12, IL12RB2, TNF (TNFA), IL2RB, IFNG, NTRK1 (TRKA), PDGFRL, TNFAIP6, KITLG (KIT), IL10, IL3RA
#5 Apoptosis, DNA damage, and cell cycle regulators	29	TNFSF10 (TRAIL), CASP10, BAG1, TNFRSF6 (FAS), CASP4, TRADD, GZMA, CASP8, RIPK2, MAD, RIPK1, CFLAR (FLIP), RELA, STK3, CASP1, TNFSF6 (FASL), PARP1, I-TRAF, POLE2, LMNB1, E2F2, CCNA1 (cyclin A1), CDKN1A (p21), PPP1R15A (PPP1R15), CASP3, CDKN1C (p57), CDK5R2 (p39), TERF1, NBS1 (nibrin)
#6 Heat shock proteins	9	HSPA6 (HSP70B'), HSP70, HSPJ2 (HSPF4), HSPA1A (HSP70-1), HSPA1B (HSP70-2), HSPA1C (HSP70-3), HSPA1D (HSP70-4), HSPA9A (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, HLA-DQA1

1. IFN応答遺伝子群(IRG)のリスト

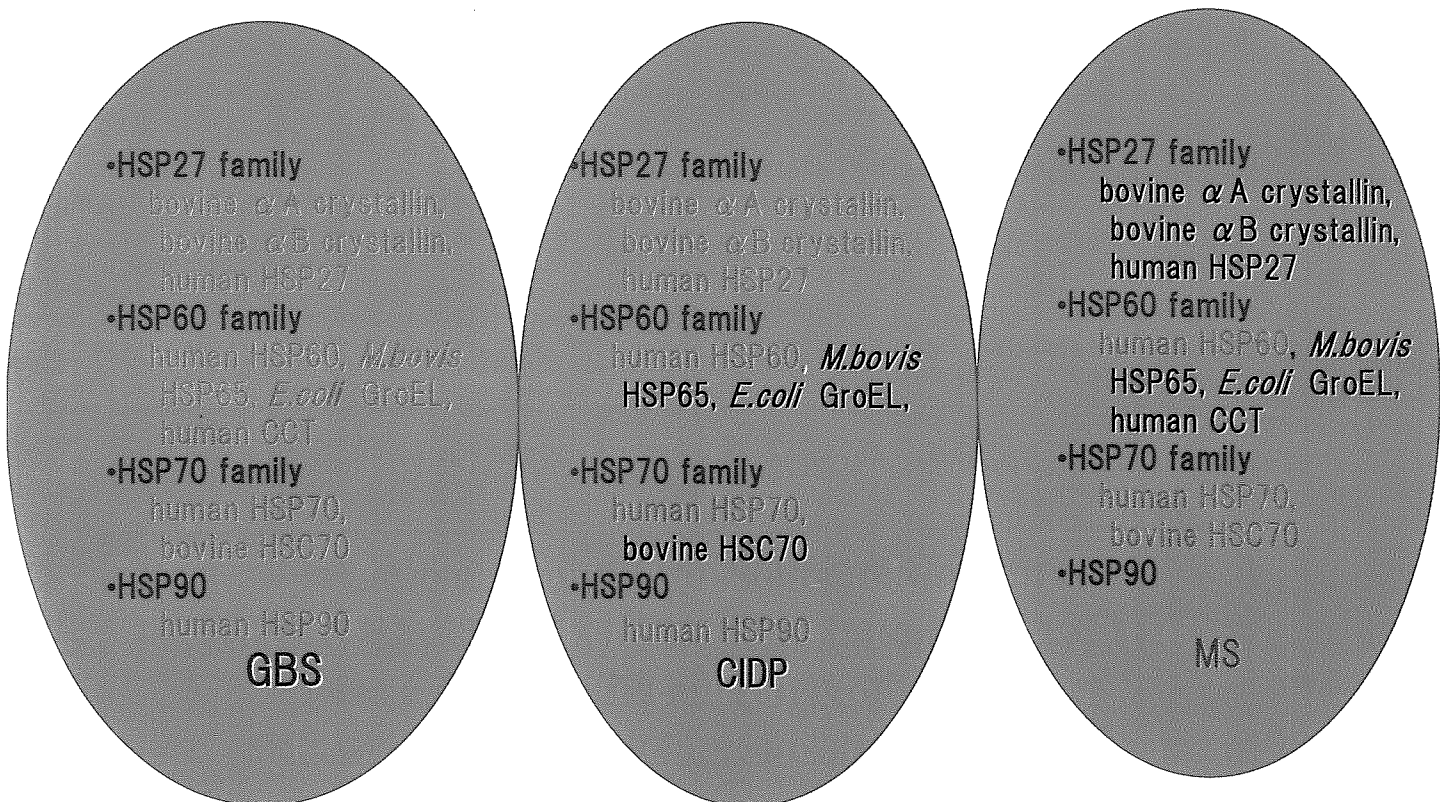


2. IRGとしてのchemokine/cytokine burstがIFNβ副作用の原因となる

ギラン-バレー症候群(GBS)、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)、多発性硬化症(MS)の髄液中では複数のHSPに対する抗体が検出される

- ・分子シャペロンの代表的な蛋白である熱ショック蛋白(HSP)は種々の自己免疫疾患の標的分子として病態に関わる可能性も指摘されている
- ・自然免疫と獲得免疫をlinkさせる分子としてHSPの役割が注目されている

GBS 36例、probable CIDP 9例、clinically definite MS 19例、疾病対照として運動ニューロン疾患(MND) 18例の髄液、GBS 28例、CIDP 7例、健常者14名の血清を用い、種々HSPに対する抗体を測定した

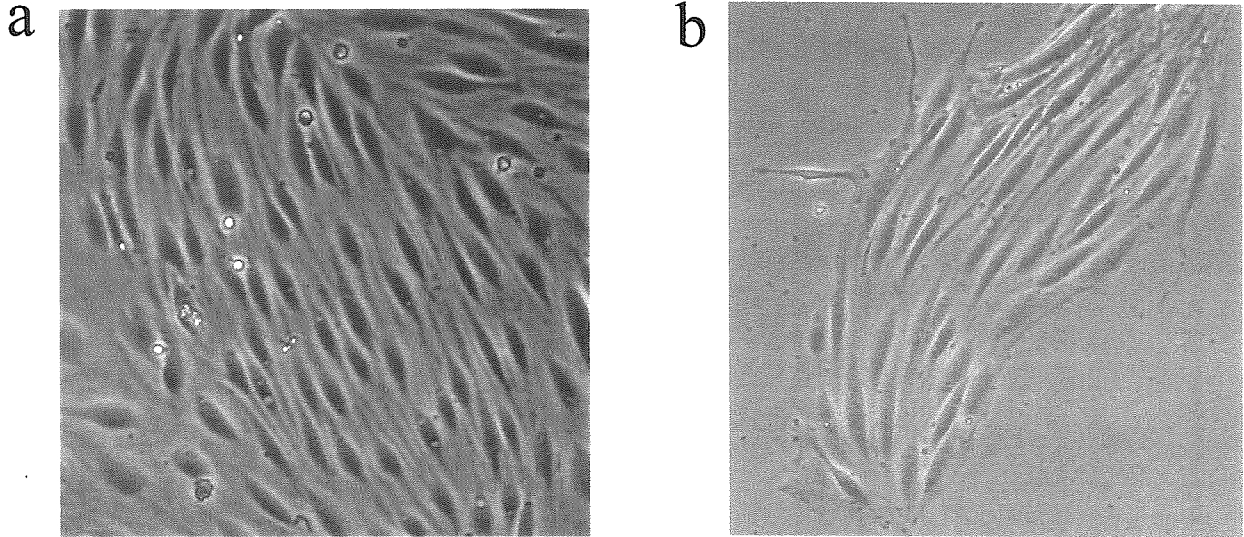


橙色が陽性抗体

対象3疾患のまとめと解説

1. GBS,CIDPともに血清中ではHSPに対する抗体価の上昇はみられなかった
2. しかしながら、GBS,CIDP、MSいずれの病態でも髄液中には数種のHSPに対する抗体が検出され、対応抗原のパターンが異なる点が注目された
3. HSP、抗HSP抗体の生理活性、今回の成績を考慮すると、特定の髄液中抗HSP抗体が血液-神経関門の中で、分子シャペロンの機能、免疫応答を修飾し、GBS、CIDP、MSの病態に関与している可能性が推測された。

In vitro BBB and BNB model



A spindle-fiber shaped morphology of BMECs(a) and PnMECs(b)

解 説

1. 温度感受性ラージT抗原トランスジェニックラットからbrain microvascular endothelial cells (BMECs)およびperipheral nerve microvascular endothelial cells (PnMECs)を単離した.
2. BMECs, PnMECsともspindle-fiber shaped morphologyを呈して細胞間の重なり合いは示さず, primary cultureのバリアー由来内皮細胞と同等の形態学的特徴を保持していた.
3. これらのin vitro BBB, BNB modelを用いてBNBの首座であるPnMECsの細胞学的特性を明らかにし, CIDPなどの難治性自己免疫性末梢神経疾患の新たな治療法開発を行う予定である.

IFN β の脳毛細血管内皮細胞 chemokines, chemokine receptors への作用

Result I Chemokine expression with IFN-beta (TNF-alpha -)

- CXC chemokine**
 - Gro/MGSA- α (CXCL1), Gro/MGSA- β (CXCL2), PF-1 (CXCL4), NAP-2 (CXCL7), IL-8 (CXCL8), Mig (CXCL9), IP-10 (CXCL10), SDF-1 (CXCL12), BLG (CXCL13)
- CC chemokine**
 - MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5), MCP-3 (CCL7), Eotaxin (CCL11), MCP-4 (CCL13), HCC-1 (CCL14), HCC-4 (CCL16), PARC (CCL18), SLC (CCL21), TECK (CCL25)
- CX3C chemokine**
 - Fractalkine (CX3CL1)
- Chemokine receptor**
 - CCR1, CCR2, CCR4, CX3CR1, CXCR4

ピンク:発現亢進, 青:発現低下

Result II Chemokine expression with IFN-beta (TNF-alpha +)

- CXC chemokine**
 - Gro/MGSA- α (CXCL1), Gro/MGSA- β (CXCL2), PF-1 (CXCL4), NAP-2 (CXCL7), IL-8 (CXCL8), Mig (CXCL9), IP-10 (CXCL10), SDF-1 (CXCL12), BLG (CXCL13)
- CC chemokine**
 - MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5), MCP-3 (CCL7), Eotaxin (CCL11), MCP-4 (CCL13), HCC-1 (CCL14), HCC-4 (CCL16), PARC (CCL18), SLC (CCL21), TECK (CCL25)
- CX3C chemokine**
 - Fractalkine (CX3CL1)
- Chemokine receptor**
 - CCR1, CCR2, CCR4, CX3CR1, CXCR4

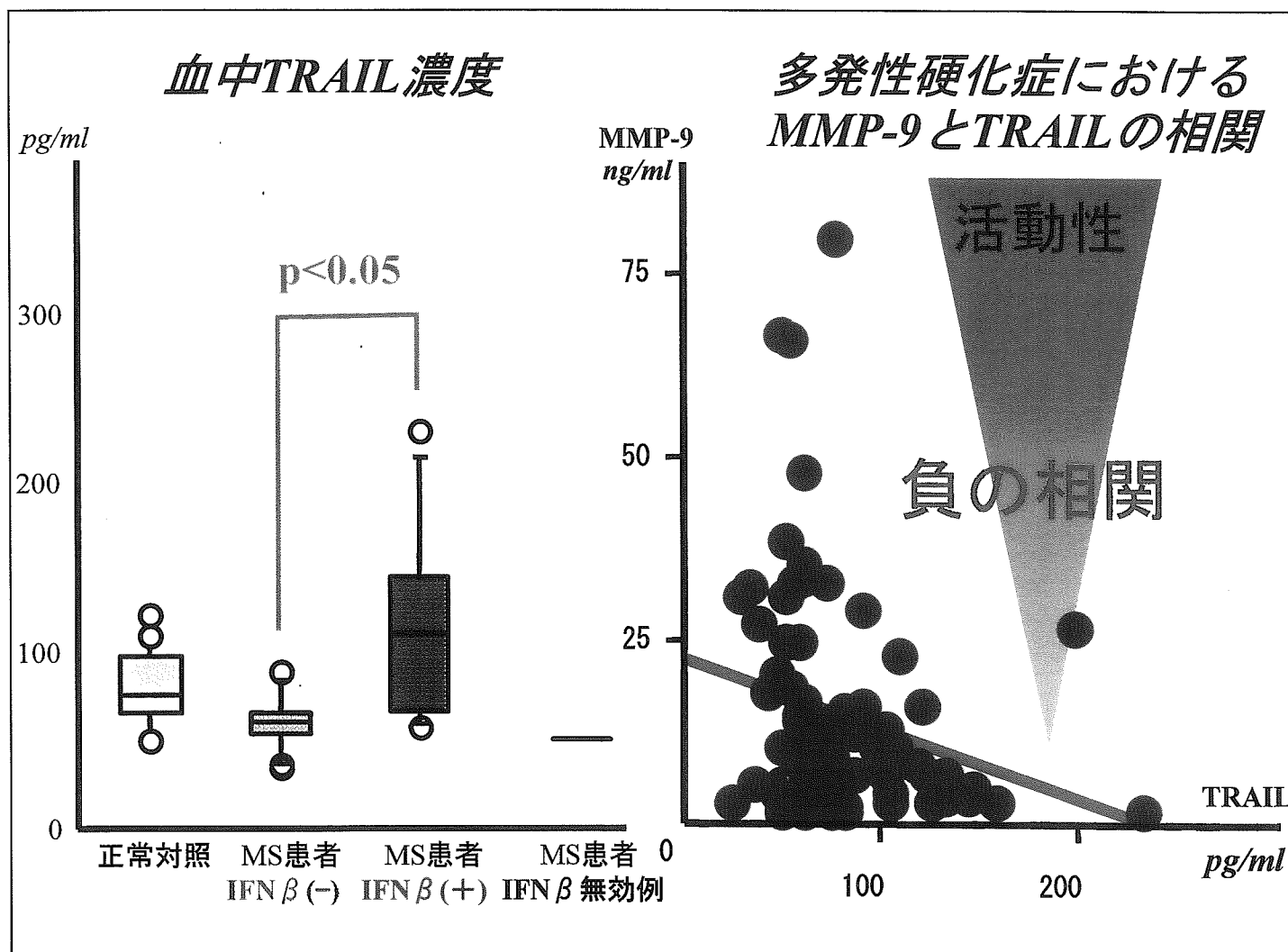
ピンク:発現亢進, 青:発現低下

Chemokine Receptors																			
Constitutive						Inflammatory													
CXCR5	CXCR4	CCR10	CCR9	CCR7	CX3CR1	CCR8	CXCR6	CXCR3	CXCR2	CXCR1	CCR6				CCR5	CCR3	CCR2	CCR1	
																	MIP-1a		
																		MIP-1b	
																		RANTES	
																		MCP-1	
																		MCP-4	
																		Eotaxin	
																		LARC	
																		IL-8	
																		GRO	
																		IP-10	
																		Mig	
																		HCC-1	
																		Fractalkin	
																		ELC	
																		TECK	
																		SDF-1a	
																		BCA-1	

Chemokine Receptors																			
Constitutive						Inflammatory													
CXCR5	CXCR4	CCR10	CCR9	CCR7	CX3CR1	CCR8	CXCR6	CXCR3	CXCR2	CXCR1	CCR6				CCR5	CCR3	CCR2	CCR1	
																		MIP-1a	
																		MIP-1b	
																		RANTES	
																		MCP-1	
																		MCP-4	
																		Eotaxin	
																		LARC	
																		IL-8	
																		GRO	
																		IP-10	
																		Mig	
																		HCC-1	
																		Fractalkin	
																		ELC	
																		TECK	
																		SDF-1a	
																		BCA-1	

1. 着色したセルは対応するchemokine, chemokine receptorを示す。赤は発現亢進、青は発現低下、黄色は変化なしを示す。
2. 炎症条件の有無によりIFN- β は異なる作用を有する。
3. IFN- β はTh1, Th2に対し抑制的に作用する。

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

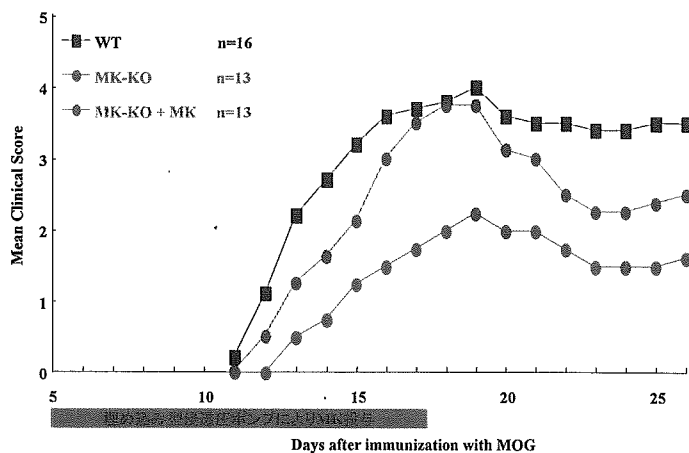


解説

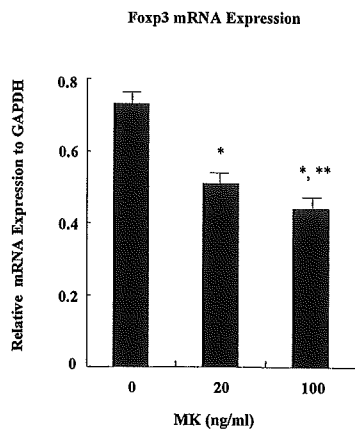
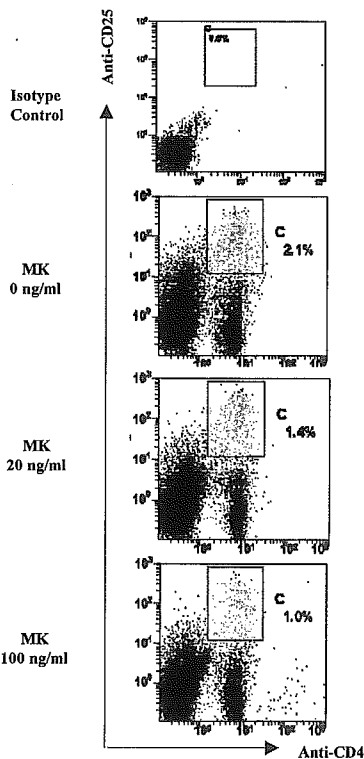
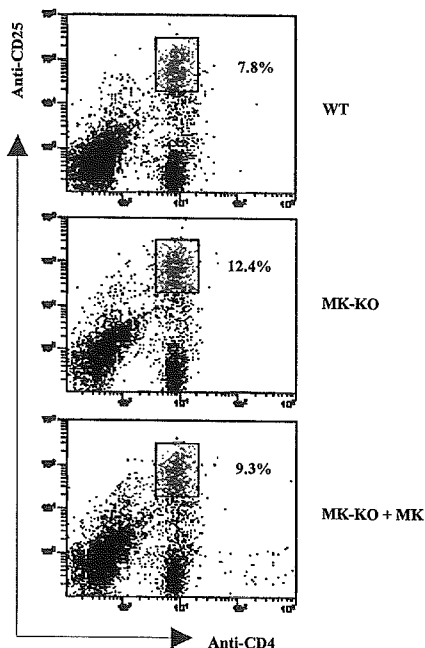
- TRAILは多発性硬化症 (MS) におけるインターフェロン-β (IFNβ) の効果予測のマーカーとしての有効性が指摘されている。IFNβ療法におけるTRAILの意義を、MSの活動性と相関するMMP-9と修復に関与するTIMP-1とを用いて検討した。
- TRAIL濃度は、IFNβ投与中の患者で有意に高値であった。TRAILはMSの活動性と相関するMMP-9と負の相関を示した。
- IFNβ投与によるTRAIL濃度の上昇は、MSの病変形成が抑制され、相対的に病変修復が優位の方向にシフトしていることを示している可能性がある。

MK欠損マウスではCD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺制御性T細胞の活性化を介してEAE発症を抑制する

MK欠損マウスではEAE発症が抑制され、MK投与で解消される



MK欠損マウスでは末梢リンパ節の制御性T細胞が活性化される

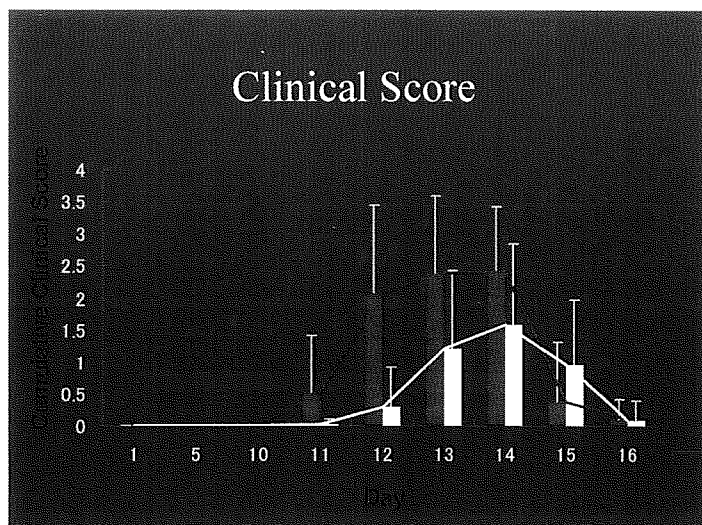


MKは容量依存的に制御性T細胞の活性化を抑制する

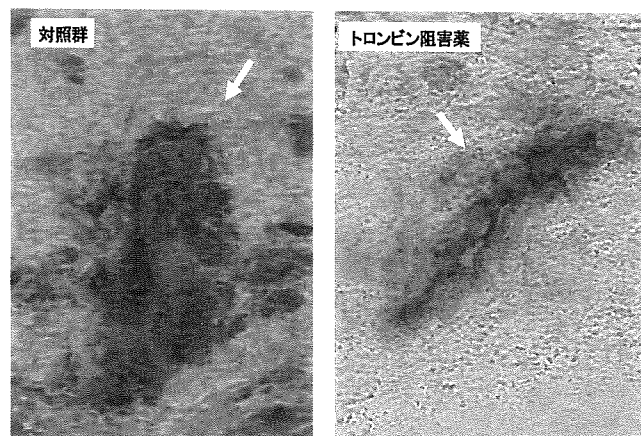
解説

1. MK抑制は、制御性T細胞の活性化による自己免疫反応の低下の結果、EAE発症を抑制させる。
2. MK抑制を標的とした治療法は、制御性T細胞の活性化を介した、多発性硬化症を始めとする自己免疫疾患の新たな治療法となりうる。

実験的自己免疫性脳脊髄炎における トロンビン阻害薬の効果



Fibrin deposition of EAE



Treatment	No. with EAE/Total	Mean Day of Onset	Mean Cumulative Clinical Score	Mean Length of Disease
Argatroban	17/19	12.8±0.9	5.0±2.8	2.9±0.8
Control	17/18	11.6±0.9	9.1±0.8	3.9±0.5

解説

1. EAEでは発症に先行して凝固系が亢進しており、トロンビン阻害薬を投与することにより、EAEの症状が抑制されることを明らかにした。
2. トロンビン阻害薬はトロンビンを選択的に阻害するため、出血の副作用が少なく、多発性硬化症急性期の新たな治療薬として有用である可能性がある。

慢性進行型・再発寛解型EAEに対する Arundic acid (ONO-2506)の予防効果

図1. 慢性進行型・再発寛解型EAEモデル (● : ONO-2506投与群、▲ : EAE群)

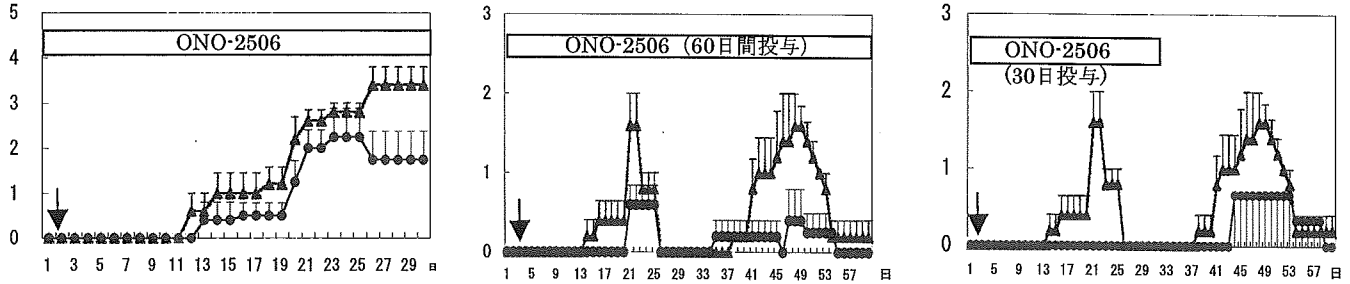


図2. 慢性進行型・再発寛解型EAEモデルの病理学的検討

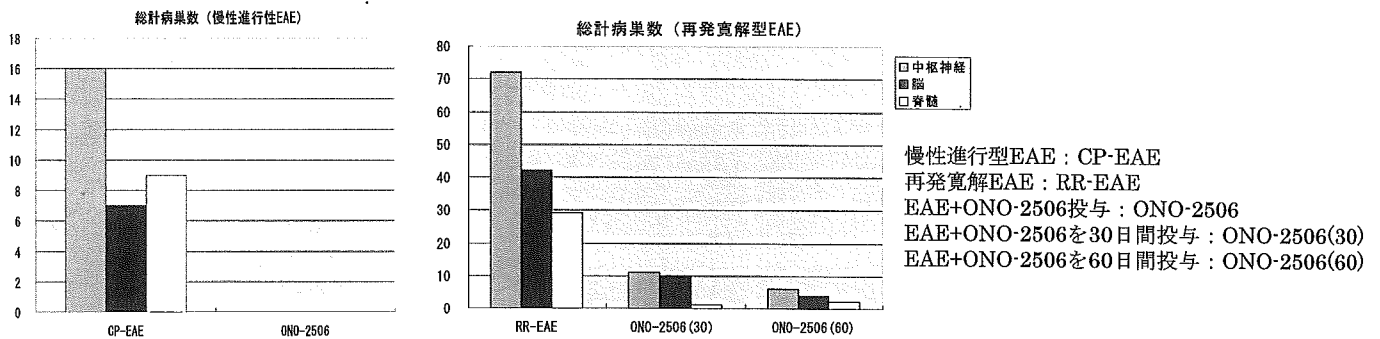
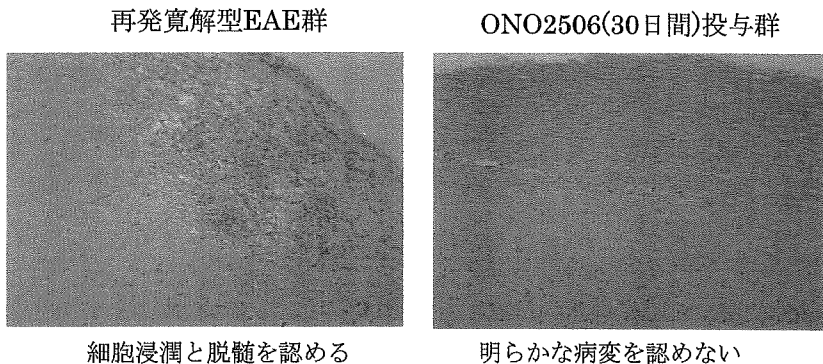


図3. 再発寛解型EAEモデルの病理組織像 頸髄縦断面HE染色100倍像

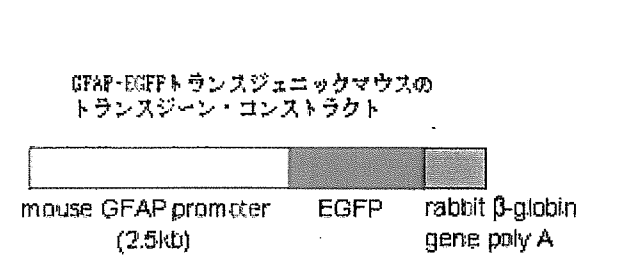


Arundic acid(ONO-2506)投与群では、EAEの神経症候ならびに再発が抑制され、病理組織学的に病巣の減少を認めた。Arundic acid(ONO-2506)は多発性硬化症の再発・進行を抑制する経口予防薬となる可能性が示唆された。

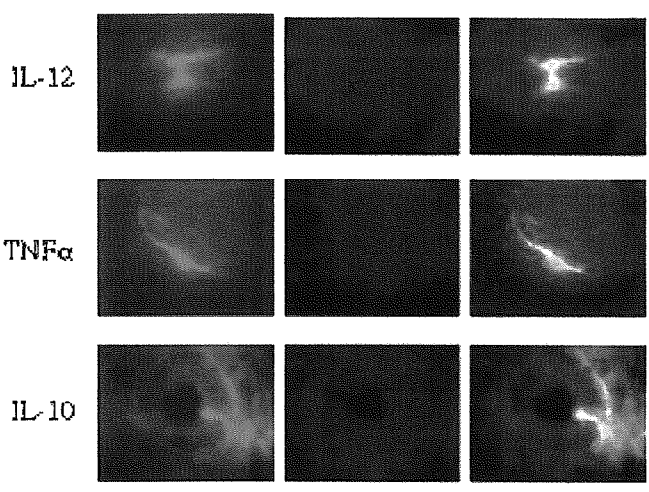
解説

1. Arundic acid (ONO-2506)を経口投与して慢性進行型・再発寛解型EAEモデルに対する効果を検討した。
2. 投与群では慢性進行型・再発寛解型EAE共に臨床症候を抑制し、再発の予防効果を認めた。
3. 投与群では慢性進行型・再発寛解型EAE共に神経組織に認められる細胞浸潤を抑制した。
4. Arundic acid (ONO-2506)は多発性硬化症の再発・進行を抑制する経口予防薬となる可能性が示唆された。

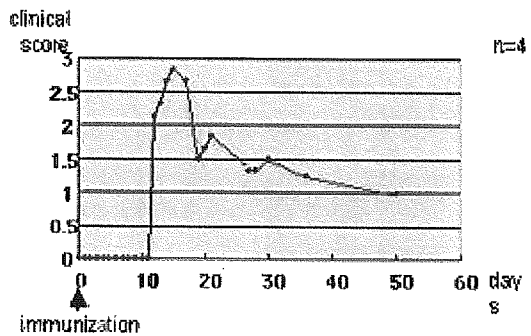
GFAPプロモーター制御下にEGFPを強発現するトランスジェニックマウス (GFAP-EGFPマウス) を用いた慢性型EAEにおける活性化アストロサイト由来因子の解析



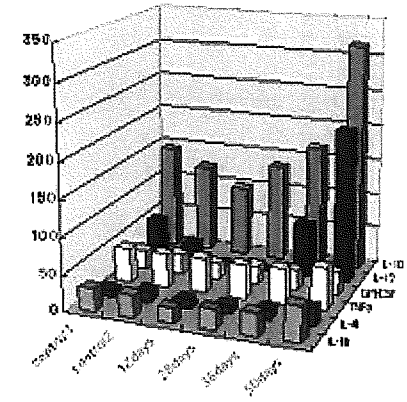
慢性期EAE脊髄におけるEGFP陽性活性化アストロサイトとサイトカインの発現



MOG/CFAを用いた感作によりGFAP-EGFPトランスジェニックマウスに誘導された慢性型EAE



EAE慢性期脊髄におけるIL-10、IL-12の上昇



解 説

1. GFAP-EGFPマウスは活性化アストロサイトの解析に有用である。
2. Luminexを用いた解析では、EAEの慢性期脊髄にIL-10、IL-12の上昇がみられた。
3. GFAP-EGFPマウスに誘導したEAEの慢性期脊髄の病理組織で、EGFP陽性の活性化アストロサイトにIL-10、IL-12の発現がみられた。
4. 活性化アストロサイト由来のIL-12がEAE慢性化に関与している可能性が推察された。

ウイルス性脱髄モデルを用いた 免疫性脱髄関連分子の探索

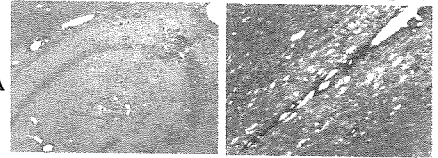
● チロシンモチーフを破壊した変異ウイルス

	1.....7.....25.....76
Wild-type DA	M...YPDV....YLLL....Q
Mutant virus	M...HPDV....HLLL....Q

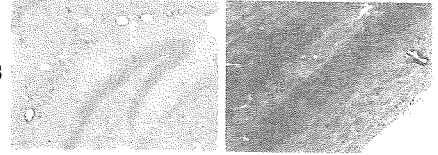
● 中枢神経系における炎症細胞浸潤

大脳(3 days p.i.) 脊髄(45 days p.i.)

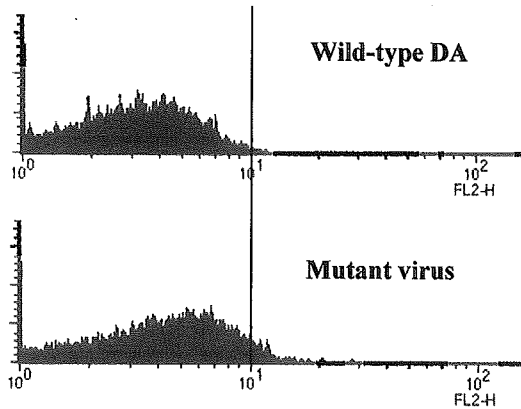
Wild-type DA



Mutant virus



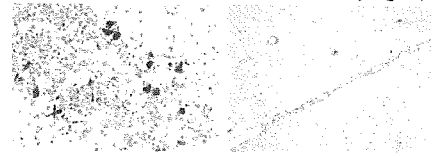
● 脳内浸潤リンパ球表面CTLA-4の発現



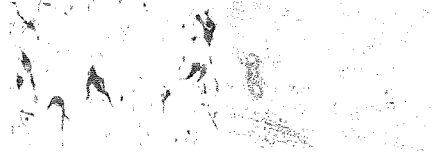
● 中枢神経系におけるウイルス抗原の発現

大脳(3 days p.i.) 脊髄(45 days p.i.)

Wild-type DA



Mutant virus

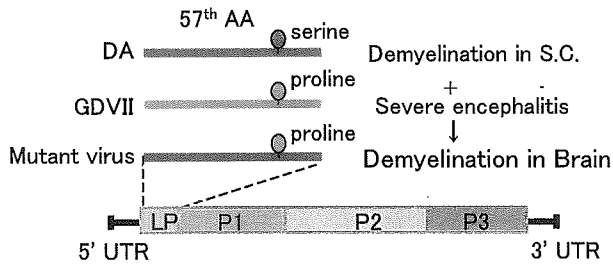


解 説

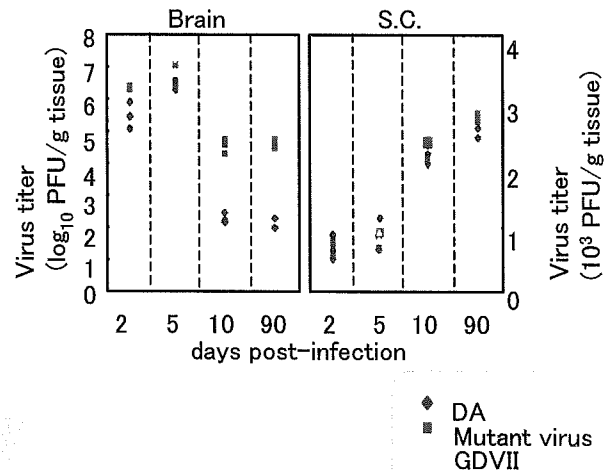
1. ウイルス性脱髄モデルにおいて脱髄発症の重要なウイルス由来のL蛋白は、エンドサイトーシスに関与するAP50にチロシンモチーフを介して会合する。
2. チロシンモチーフを持たない組み換えウイルスを作製し、AP50とL蛋白の会合により、免疫系の重要なnegative regulatorである細胞表面CTLA-4のturnoverが阻害され、その結果としてCTL反応が低下している可能性が示唆された。

ウイルス性脱髄におけるウイルス非構成蛋白質の役割

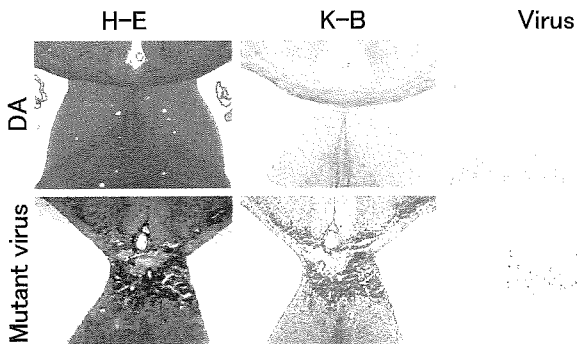
組換えウイルスの作製



組換えウイルスは脳で持続感染する



組換えウイルスは脳で脱髄を引き起こす



脳で脱髄が生じる 新規MSモデルの作製

解説

1. 脳において脱髄が生じる、すなわちヒトの病態に近い、新規多発性硬化症動物モデルの作製に成功した。
2. 本動物モデルを用いた脱髄発症機構の解析は、多発性硬化症発症機序の解明および治療法開発に有用であり、今後の重要課題である。

灰白質病変を中心とする急性散在性脳脊髄炎の検討

多発性の灰白質病変を主体とする急性脳炎

典型的ADEMの臨床像、画像と類似している

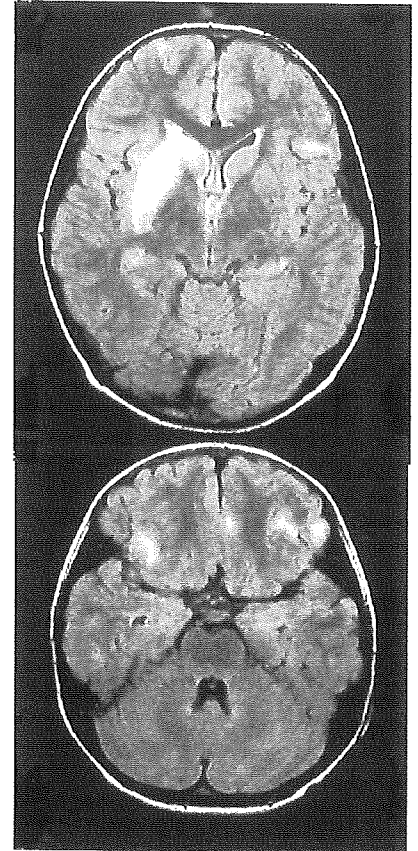
ADEMの特殊型(灰白質ADEM)

灰白質ADEMと通常型ADEMとの比較

	灰白質病変例*		疫学調査例
	皮質病変(+)	皮質病変(-)	
症例数	4例	4例	26例
発症年齢	9.7歳	7.2歳	6.2歳(予防接種例を除く)
男女比	男性のみ	1:3	2.3:1
先行感染	50%	25%	73%
臨床所見			
発熱	25%	75%	73%
意識障害	75%	25%	50%
けいれん	75%	0%	38%
検査所見			
白血球増多	50%	50%	62%
髄液細胞増多	50%	100%	81%
髄液蛋白増加	25%	50%	35%
ステロイド治療(有効率)	75%(100%)	100%(100%)	84%(100%)
後遺症	0%	0%	22%

*文献例を含む

灰白質ADEMの一例



解 説

1. 多発性の灰白質病変を中心とする急性脳炎を4施設で調査し、4例を集積した。
2. 今回の調査群はその臨床像の特徴、画像の特徴の類似性からADEMの特殊型と考えられる。
3. ADEMの病態解明のために他施設共同研究による患者集積が必要である。