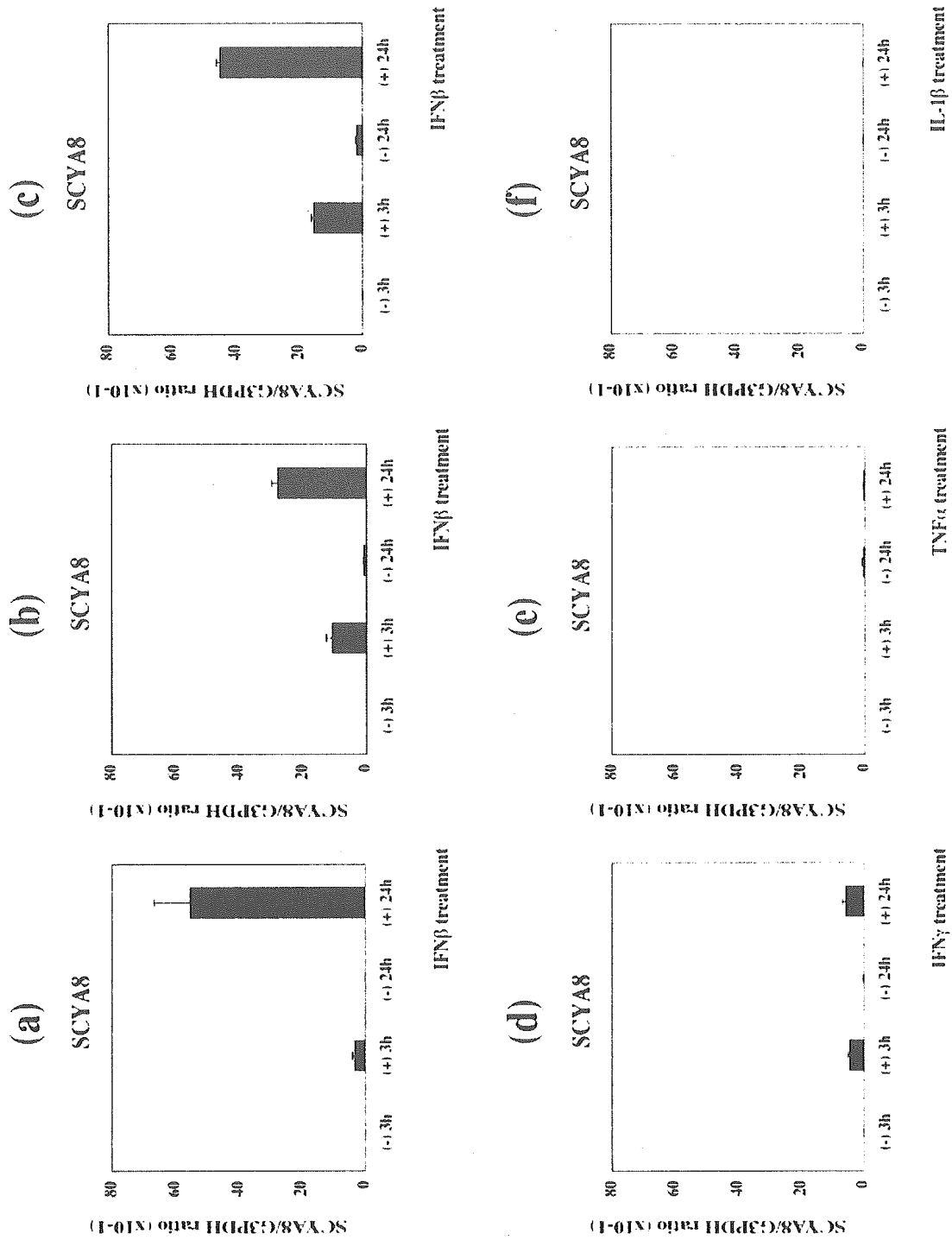


**Figure 1. Real-time RT-PCR analysis of SCYB10 expression in PBMC.** PBMC derived from three distinct healthy subjects (#1, #2, and #3) were incubated for 3 or 24 hours in the culture medium with (+) or without (-) inclusion of recombinant human IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  or IL-1 $\beta$  at a concentration of 50 ng/ml each. cDNA was processed for real-time PCR analysis, and the results are standardized against those of the G3PDH gene detected in identical cDNA samples. The panels represent the expression of SCYB10 in (a) #1, IFN $\beta$ ; (b) #2, IFN $\beta$ ; (c) #3, IFN $\beta$ ; (d) #1, IFN $\gamma$ ; (e) #1, TNF $\alpha$ ; and (f) #1, IL-1 $\beta$ .



**Figure 2. Real-time RT-PCR analysis of SCYA8 expression in PBMC.** See the footnote of Fig. 1. The panels represent the expression of SCYA8 in (a) #1, IFN $\beta$ ; (b) #2, IFN $\beta$ ; (c) #3, IFN $\beta$ ; (d) #1, IFN $\gamma$ ; (e) #1, TNF $\alpha$ ; and (f) #1, IL-1 $\beta$ .

## 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

南里 悠介、佐藤 準一、土居 芳充、山村 隆

国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部

**研究要旨** 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)再発抑制効果が立証された。Clinically isolated syndrome (CIS)では早期の IFN $\beta$ 治療開始が definite MS への移行を抑制するとの報告もある。しかし IFN $\beta$ が無効な症例や副作用で治療継続出来ない症例も多い。さらに MS の早期診断は困難であり、有効な補助診断法の樹立が急務である。最近我々は末梢血 T 細胞マイクロアレイ解析により、MS におけるアポトーシス制御遺伝子群の発現異常を報告した。本研究では神経内科専門医施設を対象に、MS のマイクロアレイによる診断法開発に対する期待感および IFN $\beta$ 治療に関する現況を把握するためアンケート調査を行った。その結果、MS の診断は専門医のレベルでも腫瘍や血管障害との鑑別が容易ではなく、大多数の施設でマイクロアレイによる MS 補助診断法樹立・IFN $\beta$ 治療効果・副作用予測法開発に期待感があることが判明した。

### A. 研究目的

最近、多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)前駆病態と考えられる clinically isolated syndrome(CIS)で、早期にインターフェロンベータ(interferon-beta; IFN $\beta$ )治療を開始すると definite MS への移行を抑制可能と報告されている(Jacobs et al. N Engl J Med 343: 898-904, 2000).

しかし本邦では視神経脊髄型 MS(opticospinal MS; OSMS)が比較的多いので、早期診断は McDonald 診断基準では困難であり、有効な補

助診断法の樹立が急務である。また IFN $\beta$ が無効な症例や副作用で使用出来ない症例も存在し、治療反応性予知法の確立が重要な課題である(Waubant et al. Neurology 61: 184-189, 2003)。現在ゲノムプロジェクト完了によりヒト全遺伝子塩基配列が解明され、遺伝子アレイ(DNA マイクロアレイまたは Gene Chip と呼ばれる)を用いて個々の細胞における数万遺伝子(ヒト全遺伝子約 30,000)の発現情報を包括的・系統的に解析可能になっている。このような網羅的発現解析により、従来の研究方法では予期

しなかった遺伝子の MS 病態における役割が次々明らかにされ、薬物反応性個人差を予知可能になりつつある。最近我々は末梢血 T 細胞マイクロアレイ解析により、MS におけるアポトーシス制御遺伝子群の発現異常を報告した(Satoh et al. Neurobiol Dis 18: 537-550, 2005)。本研究では神経内科専門医施設を対象に、MS の DNA マイクロアレイによる診断法開発に対する期待感および IFN $\beta$ 治療に関する現況を把握するためアンケート調査を行った。

## B. 研究方法

神経内科専門医 1709 施設に 18 項目から構成される質問表(Yes/No 形式とコメント記入)を郵送し FAX で回答を受信した。[Q1]MS と脳腫瘍・脊髄腫瘍の鑑別が問題になった症例の経験がある。[Q2]Yes の確定診断法。[Q3]MS と脳血管障害の鑑別が問題になった症例の経験がある。[Q4]Yes の確定診断法。[Q5]MS か否か鑑別に苦慮する症例を診療している。[Q6]Yes の診断を確定できない理由。[Q7]血液 T 細胞マイクロアレイ解析による MS の診断確定に興味がある。[Q8]外来で診療中の MS 患者数。[Q9]これまでの IFN $\beta$ 使用患者数。[Q10]そのうち治療結果に満足している患者数。[Q11]IFN $\beta$ 治療中に問題がおき治療中止となったことがある。[Q12]Yes の IFN $\beta$ 治療中に生じた問題。[Q13]IFN $\beta$ を MS に積極的に使いたいと考えている。[Q14]No の理由。[Q15]IFN $\beta$ の有効性や副作用を予測できる方法の開発を期待する。[Q16]現在患者から IFN $\beta$ 使用の相談を受けているが判断を保留している。[Q17]Yes

の決断できない理由。[Q18]血液 T 細胞マイクロアレイ解析による予測に興味がある。

(倫理面への配慮)

本研究では全個人情報をも匿名化し、個人情報保護に細心の注意を払って行っている。

## C. 研究結果

#1. 回答率 19%(319/1709 施設)。

#2. MS 鑑別診断について。腫瘍 Q1: yes 54%(Q2 生検 70, 画像 64, 経過観察 95 施設)。CVD Q3: yes 56%(Q4 生検 4, 画像 98, 経過観察 141 施設)。診断困難例 Q5: yes 32%。9 施設が Sjögren 症候群との鑑別に言及。MS のマイクロアレイ診断に興味 Q7: yes 80%。

#3. MS IFN $\beta$ 治療について。外来 MS 患者数 Q8(0: 24%; 1-10: 64%; 11-20: 7%; >20: 5%)。IFN $\beta$ 使用患者数と満足患者数 Q9/10(total 1052 人中 46%満足)。IFN $\beta$ 治療中止 Q11/12(total 1052 人中 25%中止; 皮膚反応・肝機能障害・うつ・白血球減少)。IFN $\beta$ 治療積極的 Q13/14: yes 72%(no: 有効性に疑問・副作用・使用法煩雑・効果判定困難・家族の負担など)。IFN $\beta$ 有効性・副作用予測法期待感 Q15: yes 97%。IFN $\beta$ 治療躊躇 Q16/17: 7%(有効性に疑問・副作用や合併症・使用法煩雑・妊娠希望など)。マイクロアレイによる IFN $\beta$ 治療効果予測法に興味 Q18: yes 86%。

## D. 考察

神経内科専門医施設を対象とした MS 診断・治療に関するアンケート調査(1 次調査)で比較的高回答率を得た。専門医のレベルでも MS

と腫瘍や脳血管障害の鑑別診断は神経学的所見や MRI(図 1)のみでは困難なことが明らかになった。また IFN $\beta$ 投与を受けた MS 患者で nonresponder や poor responder が半数を占めることも重要である。そのため少なからぬ専門医が有効性に疑問を抱いているのも事実である。大多数の施設でマイクロアレイによる MS 診断・IFN $\beta$ 効果・副作用予測法開発に期待感があることが判明した。

## E. 結論

アンケート調査の結果から MS の診断は容易ではなく、大多数の神経内科専門医施設でマイクロアレイによる MS 診断・IFN $\beta$ 効果・副作用予測法開発に期待感があることが判明した(南里ら. 神経内科 投稿中)。

## F. 健康危険情報

## 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(2): 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(10): 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*. 27-Oct Epub ahead of print, 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(2): 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*, 14(2):205-216, 2006
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. *神経研究の進歩*, 2006, 印刷中.
1. 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

2. Satoh J. Protein Microarray Analysis for Rapid Identification of 14-3-3 Protein Binding Partners. 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, Arimak K, Yamamura T: Nogo-A and Nogo receptor expression is enhanced in demyelinating lesions of multiple sclerosis. 57th Annual Meeting of American Academy of Neurology. Miami Beach, 2005. 4.12. (Neurology 64, Suppl 1: A138, 2005).
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：多発性硬化症脱髄巣における 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).
- 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) 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).

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

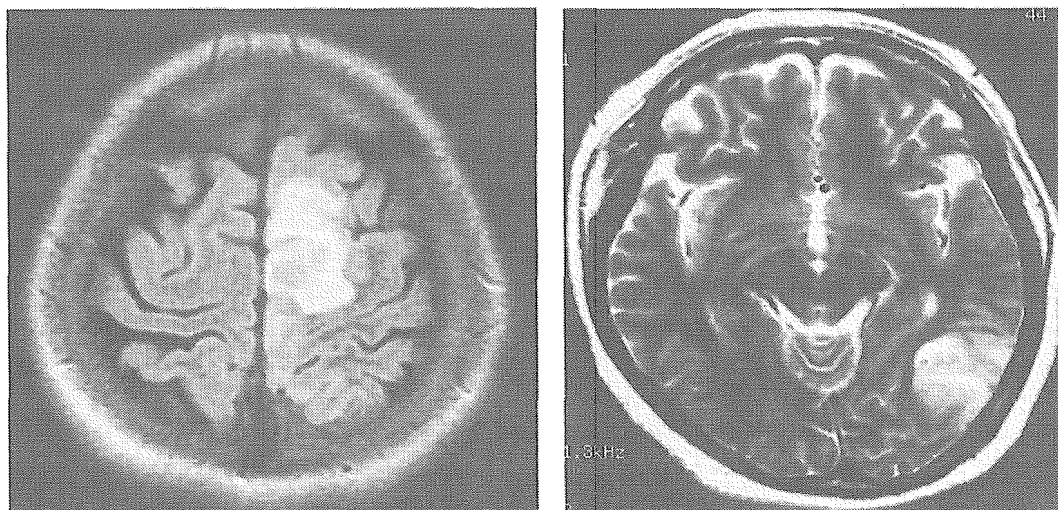


図 1. 腫瘍や脳梗塞との鑑別が困難だった MS 症例. 腫瘍様脱髄病変(左)と OSMS 症例の静脈洞血栓症(右).

## 多発性硬化症インターフェロン・ベータ療法中止例の予後の検討

分担研究者 小川 雅文 国立精神・神経センター武蔵病院神経内科医長

共同研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部長

**研究要旨** 多発性硬化症（MS）のインターフェロン・ベータ 1b (IFN- $\beta$ -1b)療法中止例の予後を検討した。当院でIFN- $\beta$ -1bを導入しその後6ヶ月以上経過観察しえたMS患者51例（男性18例、女性33例、導入時年齢40.6 $\pm$ 12.1歳）について後ろ向きに病歴調査をおこないIFN- $\beta$ -1b療法が中止された例を抽出した。中止後の経過観察は6-36ヶ月（平均18.5ヶ月）であった。51例中10例が副作用のためIFN- $\beta$ -1b療法を中止されていた。中止理由の内訳は、導入後の再発部位の変化2例、導入直後の比較的重度の再発2例、痙性の増悪1例、網膜静脈閉塞症1例、肝機能障害1例。皮膚症状2例、全身の倦怠感1例。さらに副作用はなかったが、挙児希望で2例が中止していた。全ての例で、IFN- $\beta$ -1bは漸減・中止されていた。再発部位の変化をみた症例はいずれもIFN- $\beta$ -1b中止によりほぼ元の病型に戻り日常生活能力に大きな障害を残した例はなかった。導入後比較的重度の再発をみた例はいずれも脊髄型の症例で中止後は比較的落ち着いていた。それ以外の副作用で中止した例や挙児希望で中止した例では特に中止後に病状、経過に大きな変化を認めた例はなかった。IFN- $\beta$ -1bにより少数例ではあるが再発部位や病型が変化するMSが存在し、症例によっては早期に中止する必要がある。今回の検討では中止によりMSの病状が変化あるいは悪化した例はなかった。

### A. 研究目的

インターフェロン・ベータ 1b (IFN- $\beta$ -1b)療法は多発性硬化症（MS）の再発予防に対する治療として確立しているが、ノンレスポonderの存在などいくつかの問題点もある。われわれは、昨年MSのIFN- $\beta$ -1b療法の副作用、特に導入により再発部位や病型が変化する例について報告しその問題点について考察した。今回はIFN- $\beta$ -1b療法を中止した後に何らかの問題や障害が存在しないかをみるため中止例の予後について検討した。

### B. 研究方法

当院でIFN- $\beta$ -1b療法を導入しその後6ヶ月以上経過を観察しえたMS患者51例（男性18例、女性33例、導入時年齢40.6 $\pm$ 12.1歳）について後ろ向きに病歴調査をおこないIFN- $\beta$ -1b療法が中止された例を抽出した。それらの例については、中止した理由と中止後の経過を調査した。中止後の経過観察

期間は6-36ヶ月（平均18.5ヶ月）で、全例経過を追うことができた。

今回の調査はすべて後ろ向きの調査のみで個人情報には十分注意し調査の統計結果のみを検討した。調査項目は病歴や症状のみであり発表に関しても個人情報には一切ふれていない。従って今回の調査では個人ごとにインフォームドコンセントを取る必要はないと判断した。

### C. 研究結果

51例中10例が副作用のためIFN- $\beta$ -1b療法を中止されていた。中止理由の内訳は、導入後の再発部位の変化2例、導入直後の比較的重度の再発2例、痙性の増悪1例、網膜静脈閉塞症1例、肝機能障害1例。皮膚症状2例、全身の倦怠感1例。さらに副作用はなかったが、挙児希望で2例中止していた。全ての例で、IFN- $\beta$ -1bは漸減・中止されていた。

再発部位の変化をみた症例は導入後1ヶ月後に脊髄型から視神経-脊髄型になった1例と導入2ヶ月後にこれまでなかった大脳半球の非常に大きな病変出現した1例だった。いずれもIFN- $\beta$ -1b中止によりほぼ元の病型に戻り日常生活能力に大きな障害を残した例はなかった。また、特に前者は導入前の再発が頻回であったが、IFN- $\beta$ -1b中止後は特にほかの治療は変えておらず、理由不明だが著明に再発回数が減少した。

導入後比較的重度の再発をみた例はいずれも脊髄型の症例でIFN- $\beta$ -1b継続中は再発が頻発する傾向にあり2例ともに重症化した。中止後は比較的症状は落ち着いている。

それ以外の副作用で中止した例や挙児希望で中止した例では特に中止後に病状や経過に大きな変化を認めた例はなかった。

#### D. 考察

IFN- $\beta$ -1b療法は再発予防に有効な治療であることは間違いない。しかし副作用や挙児希望などで中止する場合に中止によりなにか病状に変化がありうるのかは問題になる。また問題なく治療している例でもいつごろまでIFN- $\beta$ -1b療法を継続するのか、またIFN- $\beta$ -1bを問題なく中止できるのかは今後のひとつの課題でもある。

今回の検討では、一部にIFN- $\beta$ -1b導入によりMSの再発部位や病型が変化したと考えられる例が存在した。症状が悪化する例ではIFN- $\beta$ -1bを継続している間は症状悪化が進行する印象があり、現時点ではIFN- $\beta$ -1bを中止するしか対策がないと考えられる。このような症例が存在することを啓蒙することも重要である。

今回の検討では中止によりMSの再発回数の著増や、重症化した症例は認めなかった。IFN- $\beta$ -1bを導入するとき、あるいは中止するときには漸増あるいは漸減するのも安全な手段である可能性がある。

#### E. 結論

IFN- $\beta$ -1bにより少数例ではあるが再発部位や病型が変化するMSが存在し、症例によっては早期に中止する必要がある。今回の検討では中止により病状が変化したり、悪化した例はなかった。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究者 ○横山 和正 順天堂大学医学部脳神経内科

研究協力者 福田 もも

## 研究要旨

高齢発症多発性硬化症患者の発症の特徴、髄液組成、MRI 所見について順天堂医院における症例の解析を行った。少数ながら高齢発症多発性硬化症患者に対してインターフェロン療法投与例を経験した。高齢者においては特に脳血管障害の危険因子を持った患者も多く、多発性硬化症との鑑別が困難な場合も少なくない。欧米文献との比較から順天堂症例では症状の再発は多いが進行度は緩徐であることが多く、個々の症例について十分鑑別をした上でインターフェロン治療を前向きに考慮する必要がある。

### A. 研究目的

高齢発症多発性硬化症は欧米において再発頻度が高く、運動能力の低下が著明であり予後はあまり良くないと考えられており、インターフェロン治療の効果についても検討されることもなく適応がすくないと考えられている。日本においては人口構成の高齢化に伴い高齢者の急速な増加が著明であり、今後も高齢者発症の多発性硬化症患者の増加が予想される。今回我々の研究では当院受診中の高齢発症の多発性硬化症患者の特徴に関して検討し、その臨床像、治療反応性について若年発症例との比較を行うことを初年度の目的とした。

### B. 研究方法

高齢発症を 50 歳以上と定義した。多発性硬化症の診断は Poser's の診断基準を利用した。1986 年から 2005 年の間に、総計 184 名の患者の中から

50 歳以上の発症者 20 例について検討した。既往歴、性別及び初発症状、病変の広がり、進行度、MRI、血液、髄液検査、治療に対する反応性について解析した。

### 倫理面への配慮

髄液検査に関しては入院時一般検査として提出された検体の残った部分を遠心し測定することで、データ収集目的の検査では無いことを説明し同意を得た。

### C. 研究結果

発症年齢別による患者数の変化からは(表 1)、明らかな発症の年齢格差は 50 歳代ではなく、むしろ 60 歳にあると考えた。

高齢者発症群における女性の割合は約 70%であり若年発症群と有意な差は認めなかった。初発症状は視力障害及び感覚障害が多く運動機能の障害

された症例は少なかった。MRI 病変の特徴としては大脳、脊髄であることが多かったが、非高齢発症多発性硬化症群間との比較では有意差は認めなかった。髄液データ解析では IgG index, MBP とともに高齢発症群でやや低いながらも有意差を認めなかった。既往歴に関しては、高齢発症群で有意に高血圧、高脂血症、白内障の合併が多かった。子宮筋腫などの女性器疾患は年齢にかかわらず頻度が高かった。初発から3回目までの再発頻度に関しては高齢発症群の方が有意に高かったが、治療としてのステロイドの反応性は良好で、重症度に関しては再発時も軽度であった。インターフェロン使用例において再発予防可能であった。

#### D. 考察

高齢発症多発性硬化症の診断に関しては、脳血管障害の危険因子を合併していることが多く、鑑別困難な症例も存在する。世界で広く使用されているマクドナルドの診断基準は適応困難である。最終的診断はステロイドの効果、症状の改善度、画像所見より鑑別可能であると考えた。有意差はないが髄液所見では IgG index, MBP とともに若年発症例よりも低値を示しており脳内破壊性病変が少ないことを反映しているのかもしれない。臨床経過も含め欧米の高齢発症多発性硬化症症例とはかなりパターンが異なっており、インターフェロン療法の効果も期待できると考えた。インターフェロン治療の症例を増やし高齢者使用例に関する解析を今後行っていく。

#### E. 結論

日本における高齢発症多発性硬化症は欧米とは異なり重篤な症状を呈する症例は少なく、インターフェロンの効果が期待され導入を考慮する必要がある。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

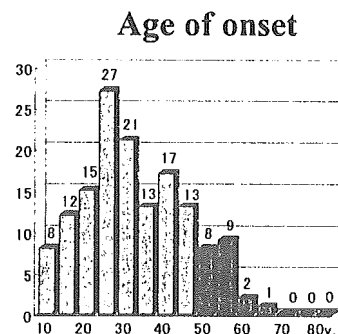
1. 論文発表 なし
2. 学会発表 第 47 回神経学会総会 東京 2006 予定

#### H.

知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案特許 なし
3. その他 なし

表 1. 順天堂医院における多発性硬化症発症年齢分布



# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 温度感受性 SV40 ラージ T 抗原トランスジェニックラット脳微小血管由来内皮細胞株を用いた IFN- $\beta$ によるトランスポーター発現に関する検討

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

#### 研究要旨

【目的】多発性硬化症の治療薬として用いられる mitoxantrone は脳微小血管内皮細胞 (brain microvascular endothelial cells: BMECs) に存在する transporter である ABCG2 により脳実質側から血管腔側へ汲み出されていると考えられている。Type I-interferon によって ABCG2 などの efflux transporter の BMECs での発現が増減するか否かを検討することが本研究の目的である。【方法】温度感受性 SV40T 抗原(tsA58)transgenic rat から BMECs を単離する。BBB としての性質を保持していることを確認したのち, type I interferon を作用させている BMECs 群と control BMECs 群の両群から mRNA を抽出し, real-time PCR を用いて各種 transporter の発現量を比較する。【結果】tsA58 ラットから BMECs を単離した。得られた BMECs 群は spindle-fiber 状の形態を呈しており, DiI-Ac LDL の取り込みも確認した。【結論】tsA58 ラットから BMECs を単離し, 得られた BMECs 群は in vitro BBB モデル候補であると考えられた。今後 characterization を施行し, BBB としての性質をよく保持したモデルを用いて解析をすすめていく予定である。

#### A. 研究目的

多発性硬化症では IFN- $\beta$  に対するいわゆる responder と non-responder が存在する。不幸にして後者であると判明した場合, 次なる再発予防手段として候補に挙がるのが mitoxantrone などの免疫抑制剤である。これらの薬剤は心毒性などの副作用により drop

out せざるを得なくなる症例も多く, 循環血液中の薬物の濃度を下げ, 脳内の濃度を選択的に上げることができれば全身的な副作用を軽減し, かつ, 治療効果を上げることができると推測される。

近年, 血液脳関門 (BBB, blood-brain barrier) の優れた in vitro model として温度感受性

SV40 ラージ T 抗原トランスジェニックラット由来脳毛細血管由来内皮細胞株が確立された。このモデルは BBB の特性をよく保持しており、BBB で発現している tight junction protein や ABCG2 などの transporter の発現が確認されている。一方で、mitoxantrone を脳実質から血液側へ汲み出す働きをする transporter である rABCG-2 も発現していることも最近報告され、これが in vitro の実験系で siRNA によってその機能が抑制されることが示されている (Hori et al, J Neurochem,2005)。

type I interferon は osteosarcoma cell line にて p-gp の発現を低下させ、抗がん剤の抗腫瘍効果を高める働きがあることが報告されている (Manara MC et al, Int J Oncol, 2004)。BBB においても、p-gp や rABCG-2 などの transporter の発現を変化させる可能性があり、今回我々は type I interferon の BBB 上の transporter 発現に対する影響を明らかにする目的で、新規に脳毛細血管由来内皮細胞株を分離し、検討を行うこととした。尚、すでに報告されている内皮細胞株は tight junction protein である claudin-5 の発現が in vivo に比べるとごくわずかであり、claudin-1, claudin-12 の発現は確認されていないため、新規に内皮細胞株を樹立することとした。

## 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  $\mu$ m 径のナイロンメッシュに通して BBB と関連しない大きな血管を除去する。その他は既報告 (Kanda T et al. J Cell Biol, 1994) の method に準ずる。

< BMECs の characterization および解析 >

脳毛細血管を分離後、33°C で cloning を行う。バリアー構成内皮細胞の特徴である spindle-fiber 状の形態を呈した内皮細胞群を分離し、Von Willbrand factor の発現および DiI-Ac-LDL のとりこみ確認を行う。電気抵抗 (Transendothelial electrical resistance (TEER)) や <sup>14</sup>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 in vitro BBB モデルとして樹立する。

IFN- $\beta$  や IFN- $\gamma$  を作用させた BMECs 群とさせていない BMECs 群から mRNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて rABCG-2, p-gp などの transporter の発現解析を行う。また、occludin や claudin-family などのバリアー関連蛋白の発現が変動するか否かもあわせて検証する。

(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

現在脳毛細血管由来内皮細胞の分離に成功

し, BBB の in vitro model としての characterization を進めている.

#### 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 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 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, それらを用いて本研究を進め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 抗原トランスジェニックラットから, BMECs の単離を行った. 今後, in vitro BBB モデルとしての characterization を施行し, 解析を進めていく.

#### 【参考文献】

1) Hori S et al.: 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(1):63-71, 2005

2) Manara MC et al.: Effectiveness of Type I interferons in the treatment of multidrug resistant osteosarcoma cells.

Int J Oncol 24(2):365-72, 2004

3) Kanda T et al.: Glycosphingolipid antigens in cultured bovine brain microvascular endothelial cells: sulfoglucuronosyl paragloboside as a target of monoclonal IgM in demyelinating neuropathy.

J Cell Biol 26(1):235-46, 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

#### 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 $\beta$ 導入後の多発性硬化症の再発に関する臨床的検討. 第 17 回日本神経免疫学会. 福岡, 2005. 3.

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

川井元晴, 能村友紀子, 前田敏彦, 清水文崇, 中山寛人, 木村正道, 尾本雅俊, 坂田尚広, 木山真紀子, 小笠原淳一, 佐野泰照, 根来 清, 神田 隆: 筋萎縮性側索硬化症患者における延命処置の受け入れに関する検討. 第 46 回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005. 5.

田中信一郎, 石丸孝則, 山下勝弘, 神田 隆: 外頸動脈内に留置されたカテーテルからの逆行性塞栓症の 1 例. 第 78 回神経学会中四国地方会, 岡山, 2005. 6

小笠原淳一, 根来 清, 川井元晴, 神田 隆, 森松光紀: 大脳皮質基底核変性症と進行性核上性麻痺はルーチン MRI で鑑別できるか. 第 46 回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005.5.

佐野泰照, 川井元晴, 小笠原淳一, 多田由紀子, 根来 清, 神田 隆: 吸気性喘鳴で発症

した多系統萎縮症の臨床的検討，第 46 回日本神経学会総会，鹿児島，2005.5.

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

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

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

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

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

坂田尚広，川井元晴，神田 隆：一過性の回転性めまいを呈した椎骨動脈解離症例における凝固系検査の有用性．第 30 回日本脳卒中学会，盛岡，2005.4.

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

第46回日本神経学会総会，鹿児島，2005.5.

木山真紀子，星井嘉信，崔 丹，河野裕夫，神田 隆，石原得博：免疫グロブリンλ鎖部

位特異抗体を用いたAλ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 Aλ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

I 型 IFN の標的細胞としての肥満細胞の検討

藤田伴子<sup>1</sup>、神戸直智<sup>2</sup>、内山 卓<sup>1</sup>、堀 利行<sup>1</sup>

京都大学大学院医学研究科 <sup>1</sup>血液・腫瘍内科学、<sup>2</sup>皮膚生命科学

## 研究要旨

臍帯血 CD34<sup>+</sup> 造血幹細胞より *in vitro* で分化させて調整した肥満細胞 (MC) を用いて、FcεRI クロスリンク後の TNF-α、IL-10 の産生、OX40L 発現および T 細胞増殖促進活性に対する IFN-α の影響について検討した。サイトカイン産生は、RT-PCR および ELISA により、また OX40L 発現はフローサイトメトリーにより測定した。その結果、IFN-α の添加は、MC の生存や増殖には影響しなかったが、TNF-α 産生、OX40L 発現を抑制し、逆に IL-10 産生を増加させることが判明した。このような変化に一致して IFN-α で処理された MC は抗 CD3 抗体刺激 CD4<sup>+</sup> T 細胞に対する増殖促進活性が低下していた。最近、肥満細胞 (MC) が多発性硬化症 (MS) の動物モデルである experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) の発症、増悪に重要な役割を果たすことが報告されている。IFN-β 療法が Th1 型臓器特異的自己免疫疾患と考えられる多発性硬化症 (MS) に対して効果を示す免疫学的メカニズムは不明であるが、今回、I 型 IFN が MC のサイトカイン産生パターンを変化させ、CD4<sup>+</sup> T 細胞増殖促進活性に対して抑制的に作用することが明らかになったことから、IFN-β を含む I 型 IFN が MC を介して MS の病態を緩和する方向に働く可能性が示唆された。

## A. 研究目的

MC は I 型アレルギー反応におけるエフェクター細胞であるが、近年、T 細胞との相互作用の存在が明らかにされ、獲得免疫における役割が注目されている。MC を欠損した W/W<sup>0</sup> マウスでは EAE の発症が起りにくく、発症しても軽症にとどまり、そこに同系マウスの MC を移入することによって野生型マウスのレベルまで重症

化することが報告されている (J. Exp. Med. 191:813, 2000)。したがって、MC の制御機構の解明は MS の病態の理解にとって重要であるといえる。MC の治療に用いられる I 型 IFN は様々な免疫制御能を有するが、MC に対する作用は殆ど調べられていない。そこで今回、我々は MC のサイトカイン産生、表面形質、および

T 細胞増殖促進活性に対する IFN- $\alpha$ の影響について検討した。

## B. 方法

臍帯血単核球より分離した CD34+ 細胞を SCF および IL-6 を添加して 8 週間以上培養し、ほぼ 100% c-kit 陽性となった細胞を臍帯血由来ナイーブ MC とし、これに IL-3 と IL-6 を加えて 5 日間培養して成熟させたものを用いた。MC の活性化はヒト IgE とヤギ抗ヒト IgE 抗体で Fc $\epsilon$ RI をクロスリンクすることによって行った。サイトカイン産生については、IgE と同時に IFN- $\alpha$ を添加し、Fc $\epsilon$ RI クロスリンク後の TNF- $\alpha$ 、IL-10、TGF- $\beta$ の産生への影響を RT-PCR と ELISA によって解析した。また、共刺激分子として重要な OX40L の発現をフローサイトメトリーにて比較検討した。最後に、IFN- $\alpha$ 処理または非処理後 MC を洗浄し、抗 CD3 抗体刺激正常 CD4+ T 細胞と共培養し、5 日後の T 細胞の増殖を Cell Count Reagent SF (ナカライテスク)を用いた改変 MTT アッセイ法にて測定した。

(倫理面への配慮)

臍帯血および健常人末梢血は、学内倫理委員会のガイドラインに従って、提供者のインフォームドコンセントを得て採取し使用したものであり、倫理面の問題は無い。

## C. 研究結果

まず初めに IFN- $\alpha$ が MC の生存率や細胞

数には影響を及ぼさないことを生細胞数および改変 MTT アッセイで確認した。サイトカイン産生では、RT-PCR および ELISA いずれにおいても IFN- $\alpha$ により Fc $\epsilon$ RI クロスリンク後の TNF- $\alpha$ 産生が著明に抑制され、逆に IL-10 産生が増加していた。フローサイトメトリー解析の結果、IFN- $\alpha$ 処理 MC で OX40L の発現低下が認められた。これらの所見に一致して、抗 CD3 抗体刺激正常 CD4+ T 細胞に対する MC の増殖促進活性が IFN- $\alpha$ 処理により有意に抑制された。以上のことから、IFN- $\alpha$ は MC に作用してサイトカイン産生パターンと共刺激分子発現を変化させることによって T 細胞に対する共刺激活性を低下させることが示された。

## D. 考察

I 型 IFN は抗ウイルス作用、細胞増殖抑制作用以外に様々な免疫調節作用を示すが、MC に対する作用は殆ど知られていない。今回、われわれは、I 型 IFN が MC に作用し TNF- $\alpha$ 産生と OX40L 発現を抑制し、逆に IL-10 産生を増加させることを見いだした。最近、MC の獲得免疫への関与が注目され、そこでは MC 由来の TNF- $\alpha$ が極めて重要な役割を果たすことが報告されている。また、OX40L 発現は MC の T 細胞共刺激活性に寄与していると考えられている。したがって、I 型 IFN は上記の作用を介して MC を免疫制御型形質に分化させると考えられる。マウスの EAE と同様に MC がヒトの MS の発症、重症化に関