

◆地下鉄

有楽町線・半蔵門線・南北線 永田町駅下車 7 4 出口 徒歩 2 分
 銀座線・丸の内線 赤坂見附駅下車 D 出口 徒歩 7 分

班会議

11:20-12:00

特別講演

座長：山村 隆

東海大学医学部教授 猪子 英俊 先生

「3万個マイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析による多因子性疾患の感受性遺伝子の網羅的な同定」

12:30-13:00

班員連絡会議

山村 隆

13:00-14:00

セッション1) インターフェロン療法の効果発現に関する基盤研究

座長：三宅 幸子

- 1) 佐藤 準一、南里 悠介、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
「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」
(15分)
- 2) 山脇 正永、大和田 潔、岡本 尚子、水澤 英洋、神田 隆*
東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学
*山口大学医学部脳神経病態学神経内科
「培養脳毛細血管由来内皮細胞を用いた解析：Homing関連分子の発現とIFN β の作用」
(15分)
- 3) 神田 隆、佐野 泰照、清水 文嵩、前田 敏彦、中山 寛人、安部 真彰、寺崎 哲也*、高橋 利一**、上田 正次**
山口大学医学部脳神経病態学神経内科
*東北大学 未来科学技術共同研究センター未来バイオ創製分野
**YS研究所
「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- β によるトランスポーター発現に関する検討」
(15分)

- 4) 藤田 伴子、森田 林平、堀 利行
京都大学大学院 医学研究科 血液・腫瘍内科学
「IFN-β療法の標的細胞としての肥満細胞の検討」
(15分)

14:00-14:36

セッション2) インターフェロン療法の実際と問題点
座長：佐藤 準一

- 5) 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
「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」
(12分)

- 6) 小川 雅文、山村 隆*
国立精神・神経センター武蔵病院 神経内科
*国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部
「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」
(12分)

- 7) 横山 和正、福田 もも
順天堂大学医学部脳神経内科
「日本におけるLate onset MSの特徴及びインターフェロンの効果に関する研究」
(12分)

14:36-14:50

コーヒーブレイク

14:50-15:05

班長ご挨拶

15:05-15:41

セッション3) 免疫性神経疾患の治療法
座長：神田 隆

- 8) 太田 宏平、大橋 高志*、清水 優子*、大原 久仁子*、竹内 千仙*、岩田 誠*
東京理科大学 理学部
*東京女子医科大学神経内科
「多発性硬化症における免疫吸着療法」
(12分)

- 9) 王子 聡、三井 隆男、大熊 彩、高濱 美里、大貫 学、野村 恭一
埼玉医科大学総合医療センター 神経内科
「Crow Fukase症候群における血液浄化療法
～血清VEGF値、サイトカイン値の変動と臨床症候～」
(12分)

- 10) 楠 進、宮本 勝一、三宅 幸子*、山村 隆*
近畿大学医学部・神経内科
*国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部
「COX-2阻害剤を用いた実験的自己免疫性脳脊髄炎への治療」
(12分)

15:41-16:11

セッション4) 免疫性神経疾患の解明に向けて
座長：太田 宏平

- 11) 三宅 幸子
国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部
「CECAM-1分子を介した実験的自己免疫性脳脊髄炎病態の調節に関する研究」
(15分)

- 12) 菊地 誠志、宮崎 雄生、宮岸 隆司、深澤 俊行、佐々木 秀直、岩渕 和也*、小野江 和則*、賀佐 伸省**
北海道大学神経内科
*北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野
**札幌医科大学化学
「ウニ小腸由来 sulfonoquinovosyl diacylglycerolの免疫抑制活性に関する検討」
(15分)

16:11 閉会の挨拶

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

佐藤準一、南里悠介、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

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 β)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 β 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 β 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(1,2)。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。

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、1,258 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。

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(3)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)は両時間で 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。

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 (SCYA10, SCYA2)の顕著な(top 20)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(4,5)。

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。

文献

1. Waubant E, *et al.* Clinical characteristics of responders to interferon therapy for relapsing MS. *Neurology* 2003; **61**: 184-89.
2. Rudick RA, *et al.* Defining interferon β response status in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2004; **56**: 548-55.
3. Koike F, *et al.* Microarray analysis identifies interferon β -regulated genes in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003; **139**: 109-18.
4. Martínez-Cáceres EM, *et al.* Amelioration of flulike symptoms at the onset of interferon β -1b therapy in multiple sclerosis by low-dose oral steroids is related to a decrease in interleukin-6 induction. *Ann Neurol* 1998; **44**: 682-85.
5. Buttman M, *et al.* Subcutaneous interferon- β injections in patients with multiple sclerosis initiate inflammatory skin reactions by local chemokine induction. *J Neuroimmunol* 2005; **168**: 175-82.

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 (IFI66), 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

培養脳毛細血管由来内皮細胞を用いた解析：

Homing 関連分子の発現と IFN β の作用

研究協力者 東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学 ○山脇正永

共同研究者 東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学

大和田潔、岡本尚子、水澤英洋

山口大学医学部脳神経病態学神経内科 神田 隆

目的

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。今回の検討では血液脳関門における Homing 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、の動態について解析したので報告する。

方法

1) 細胞培養及びサイトカイン刺激

HBMEC 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 HBMEC と非刺激の HBMEC 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 HBMEC を用いて IFN β にて刺激した HBMEC と非刺激の HBMEC 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。

結果

IFN β にて刺激した HBMEC と非刺激の HBMEC による比較の結果、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の亢進を認めしたが、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。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 遺伝子が誘導されることも明らかとなった。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、IFN β はMSの炎症細胞の transmigrationに MMPsの発現低下を介して抑制的に働くことが示唆された。TLRsに関しては、TNF α 刺激による 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。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。

実際の治療戦略の側面から考えると、このカスケード中でどの分子をターゲットとすると最も効率よく炎症を抑制しうるかという点が重要である。カスケードに関与する分子を網羅的に解析する必要があり、今後本研究にて microarray 上挙動が注目された分子についてさらに RT-PCR 等で Quantitative に解析すると同時に、治療ターゲットを網羅的に解析する必要がある。

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- β 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¹⁾

研究協力者 ○佐野泰照¹⁾, 清水文嵩¹⁾, 前田敏彦¹⁾, 中山寛人¹⁾, 安部真彰¹⁾, 寺崎哲也²⁾, 高橋利一³⁾, 上田正次³⁾

1) 山口大学医学部脳神経病態学神経内科, 2) 東北大学 未来科学技術共同研究センター未来バイオ創製分野 3) YS 研究所

背景・目的

多発性硬化症では IFN- β 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。また、新たな transporter の発見など BBB 研究において非常に重要なモデルとなっている。最近 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 1-IFN 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 IFN- β および各種サイトカインが BBB に特異的に存在する transporter や BBB 特異蛋白の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、すでに分離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.

方法

定法にて脳毛細血管由来内皮細胞膜を分離し, 株化を行う. 分離された内皮細胞クローンにつき, バリアー構成遺伝子 (occludin, claudin-1, 5, 12, mdr-1a, 1b, 2) の発現をチェックし, これらの遺伝子発現が確認されたものを一次候補とする. Boyden chamber を使用して, 血液脳関門の *in vitro* モデルを構成し FITC-dextran の透過性と電気抵抗をチェック, 樹立した細胞株がバリアーとしての生理的機能を保持しているか否かをチェックする. これらをすべて満たしたものをバリアー由来内皮細胞株として確立する.

IFN- β や IFN- γ を作用させた細胞群とさせていない細胞群から 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.

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.

IFN-β療法の標的細胞としての肥満細胞の検討

藤田伴子、森田林平、○堀 利行

京都大学大学院 医学研究科 血液・腫瘍内科学

多発性硬化症(MS)は一般的には Th1 免疫反応優位の臓器特異的自己免疫疾患と理解されているが、MS の病態のすべてが Th1 型免疫反応によって説明できるということではない。例えば、MS の発症や増悪には T 細胞以外のアクセサリー細胞の関与が指摘されている。最近、免疫応答における肥満細胞(MC)の重要性が認識されるとともに、EAE の発症にも MC が深く関わっていることが示唆されている。MC は機能的にはヒスタミンなど Th2 免疫反応を助長する因子を放出するが、MC を欠損した W/W^v マウスでは逆に 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との報告がある(J. Exp. Med. 191:813, 2000)。また、IFN-β療法は本研究班の主要なテーマであるが、Th1 型免疫応答に協調的なサイトカインである IFN-βが何故に少なくとも一部の MS 症例に有効であるのか、そのメカニズムは殆ど解明されていない。そこで、われわれは IFN-β療法の免疫学的理解を目的として、MC が IFN の標的細胞になりうるかどうかを検討した。まず、臍帯血の造血幹細胞より *in vitro* で分化させた MC のサイトカン産生に対する IFN (今回は同じ I 型の IFN-αを用いた) の影響を RT-PCR および ELISA で調べた。その結果、IFN-αは MC の生存率や細胞数には影響を及ぼさなかったが、FcεRI クロスリンク後の TNF-α、IL-10、TGF-βの産生を著明に抑制することを見いだした。それと同時に、活性化 MC に発現する共刺激分子である OX40L の発現量の低下も認められた。さらに、これらの所見に一致して、抗 CD3 抗体刺激 CD4+ T 細胞の MC による増殖促進作用が IFN-α処理により有意に抑制された。以上の結果から、MC が I 型 IFN の標的細胞の一つであり、IFN-βは MC の機能抑制を介して MS の病態を制御している可能性が示唆された。

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

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 β)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 β 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。初発例(clinically isolated syndrome; CIS)では早期の IFN β 治療開始が definite MS への転換を抑制するとの報告もある(1)。しかし MS の早期診断は神経学的所見と MRI のみでは困難であり、迅速・正確・有効な診断法・補助診断法の樹立が必要である。また MS の病態は多様であり、IFN β が十分治療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(2-4)。本研究では神経内科専門医施設を対象に、MS の DNA microarray による診断法開発に対する期待感および IFN β 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。

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 question plus description of comments) を郵送し FAX で回答を受信した。[Q 1]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。[Q 2]Yes の確定診断法。[Q 3]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。[Q 4]Yes の確定診断法。[Q 5]MS か否か鑑別に苦慮する症例を診療している。[Q 6]Yes の診断を確定できない理由。[Q 7]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。[Q 8]外来で診療中の MS 患者数。[Q9]これまでの IFN β 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 β 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 β 治療中に生じた問題。[Q13]IFN β を MS に積極的に使いたいと考えている。[Q14]No の理由。[Q15]IFN β 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 β 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。

結果

#1. 回答率 19%(319/1709 施設)。

#2. MS 鑑別診断。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%. MS microarray 診断興味 Q7: yes 80%

- #3. MS IFN β 治療。外来 MS 患者数 Q8(0: 24%; 1-10: 64%; 11-20: 7%; >20: 5%)
 IFN β 使用患者数と満足患者数 Q9/10(total 1052 人中 46%満足)
 IFN β 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 β 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 β 有効性・副作用予測法期待感 Q15: yes 97%
 IFN β 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)
 IFN β 効果 microarray 予測興味 Q18: yes 86%

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。専門医の診断レベルでも MS と腫瘍や脳血管障害の鑑別は神経学的所見や MRI のみでは困難なことが明らかになった。また IFN β 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 microarray による MS 診断・IFN β 効果・副作用予測法開発に期待感があることが判明した。

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 microarray による MS 診断・IFN β 効果・副作用予測法開発に期待感があることが判明した。

文献

1. Jacobs LD, *et al.* Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS study group. *N Engl J Med* 2000; **343**: 898-904.
2. Walther EU, Hohlfeld R. Multiple sclerosis: side effects of interferon beta therapy and their management. *Neurology* 1999; **53**: 1622-1627.
3. Waubant E, *et al.* Clinical characteristics of responders to interferon therapy for relapsing MS. *Neurology* 2003; **61**: 184-89.
4. Rudick RA, *et al.* Defining interferon β response status in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2004; **56**: 548-55.

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)
研究協力者 山村 隆 (国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部)

「はじめに」 昨年は、多発性硬化症 (MS) へのインターフェロン・ベータ (IFN - β) 療法の副作用、特に導入により再発部位、病型が変化する例について報告した。今回は IFN - β 療法をなんらかの理由で中止した例の予後について検討した。

「患者と方法」 当院で IFN - β 療法を導入しその後 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 ± 12.1 歳) について後ろ向きに病歴調査をおこない IFN - β 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。

「結果」 51 例中 10 例が副作用のため IFN - β 療法を中止されていた。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、拳児希望で 2 例が中止していた。全ての例で、IFN - β 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。いずれも IFN - β 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 - β 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 - β を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。中止後は比較的落ち着いている。

それ以外の副作用で中止した例や拳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。

「考察」 IFN - β 療法は再発予防に有効な治療であることは間違いないが、一部には IFN - β 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現時点では IFN - β を中止するしか対策がないと考えられこのような症例があることを啓蒙することが重要である。今回の検討では中止により再発回数の著増や、重症化した症例は認めなかった。

「結論」 IFN - β 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悪化した例はなかった。

日本における Late onset MS の特徴及びインターフェロンの効果に関する研究

分担研究者 ○横山 和正

研究協力者 福田 もも

順天堂大学医学部脳神経内科

目的

高齢発症多発性硬化症は欧米においては再発、運動能力の低下が著明であり、インターフェロンの効果に関しては検討されていないが、治療の適応があまりないと考えられている。日本においては急速な高齢者の増加に伴い今後高齢者発症の多発性硬化症患者の増加が予想される。今回の我々の研究では当院に受診している高齢発症の多発性硬化症患者の特徴を検討し、その治療反応性について若年発症例との比較を行い診断治療について考察することを初年度の目的とする。

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。

結果

明らかな発病の年齢格差は 50 代ではなく、むしろ 60 歳にあると考えた。女性の割合は約 70% であり若年発症群と差は認めなかった。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 病変は大脳、脊髄であることが多いが年齢で分けた場合の群間の有意差は認めなかった。髄液に関しては IgG index, MBP とともにやや低いながらも差を認めなかった。既往歴に関しては高齢発症例で有意に高血圧、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 回目までの再発に関しては高齢発症の方が有意に高かったが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。

考察及び結語

高齢者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。マクドナルドの診断基準は適応困難である。最終的に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示しているのかもしれない。経過も含め欧米の症例とはかなり異なっておりインターフェロンの効果も期待できると考えた。インターフェロン療法の使用例に関する検索を今後行っていく。

多発性硬化症における免疫吸着療法

分担研究者：太田 宏平¹⁾

研究協力者：○ 大橋 高志²⁾、清水 優子²⁾、大原 久仁子²⁾、竹内 千仙²⁾、岩田 誠²⁾

1) 東京理科大学 理学部

2) 東京女子医科大学 神経内科

【目的】多発性硬化症 (MS) の急性期の治療としては、ステロイドパルス療法 (IVMP) が行われるが、IVMP が無効ないし治療抵抗性と考えられる症例も少なからずみられる。本邦では血漿交換療法 (PE) や免疫吸着療法 (IAPP) などの血液浄化療法が保険適応となっているが、その効果については評価が定まっておらず、症例の蓄積が重要である。さらに、IAPP の再発予防効果を示唆する報告もあり、治療法の確立が望まれる。まだ少数例での検討ではあるが、合併症などの施行上の問題点を含めて我々の経験した症例について若干の考察を加えて報告する。

【対象および方法】IVMP および免疫グロブリン静注療法が無効であった症例 2 例を含む急性～亜急性期 MS 症例 4 例に対し、IAPP を施行した。カラムにはトリプトファンカラム (イソムバ TR-350[®]) を用い、処理量は 2000～3000 ml とした。さらに、インターフェロンβ-1b 療法の導入にもかかわらず再発を繰り返す MS 症例 3 例 (重複例を含む) に対して、予防的に IAPP を施行し、その有効性を評価した。

【結果】急性～亜急性期の MS 症例 4 例では、いずれも中等度以上の症状改善が得られた。再発予防効果についても有効性を示唆する良好な結果が得られた。合併症として、1 例で深部静脈血栓症を、1 例でカテーテル感染症、1 例でアナフィラキシー様症状を起こした。

【考察】多発性硬化症 (MS) は中枢神経系の炎症性脱髄性疾患であり、T 細胞性免疫による自己免疫疾患と考えられている。しかし、オリゴクローナル IgG バンドが存在することや、抗 MOG 抗体によって実験的自己免疫性脳脊髄炎が誘導・増強されるなど、液性因子が少なからず関与していることも明らかである。

近年、MS に対して PE や IAPP などの血液浄化療法が施行され、その有用性が報告されるようになった。Weinshenker らは、重症 MS を含む中枢神経系の炎症性脱髄疾患に対して PE 群と sham PE 群との二重盲検 RCT を行い、PE 施行群の 44.1% で中等度以上の改善がみられたことを報告した。Lucchinetti らは、MS が病理学的に 4 型に分類できることを示し、2 型では脱髄巣における抗体、補体の沈着が特徴的であることを示した。さらに、彼らは 2 型の患者における劇症型の再発に対して PE が有効であることを報告し、病的な液性因子を除去することによって改善が期待できることを示した。

MS に対する IAPP の少数例での有効例の報告も多数あり、PE と同等の効果を示すとされている。置換液を用いず副作用も少ないことから、本邦では急性期の治療法として IAPP が好んで用いられている。とりわけ劇症型の再発や視神経脊髄型 MS には IAPP が有効である可能性があり、ステロイドパルス療法が無効な治療抵抗例には IAPP を考慮するべきであると考えられる。さらに、再発の予防的治療の選択肢としても今後検討すべきものである。

Crow Fukase 症候群における血液浄化療法

～血清 VEGF 値、サイトカイン値の変動と臨床症候～

埼玉医科大学総合医療センター 神経内科

○王子 聡、三井隆男、大熊 彩、高濱美里、大貫 学、野村恭一

【はじめに】

Crow Fukase 症候群 (CFS) は、まれな疾患であるが、血液浄化療法が有効であるという報告がある。今回我々は、Crow Fukase 症候群の 1 例において血液浄化療法 (on line HDF : on line Hemodiafiltration、IAPP : Immunoabsorption plasmapheresis) を行い臨床的有効性を検討し、血清 VEGF (vascular endothelial growth factor)、および各種血清サイトカインの変動を検討した。

【対象および方法】

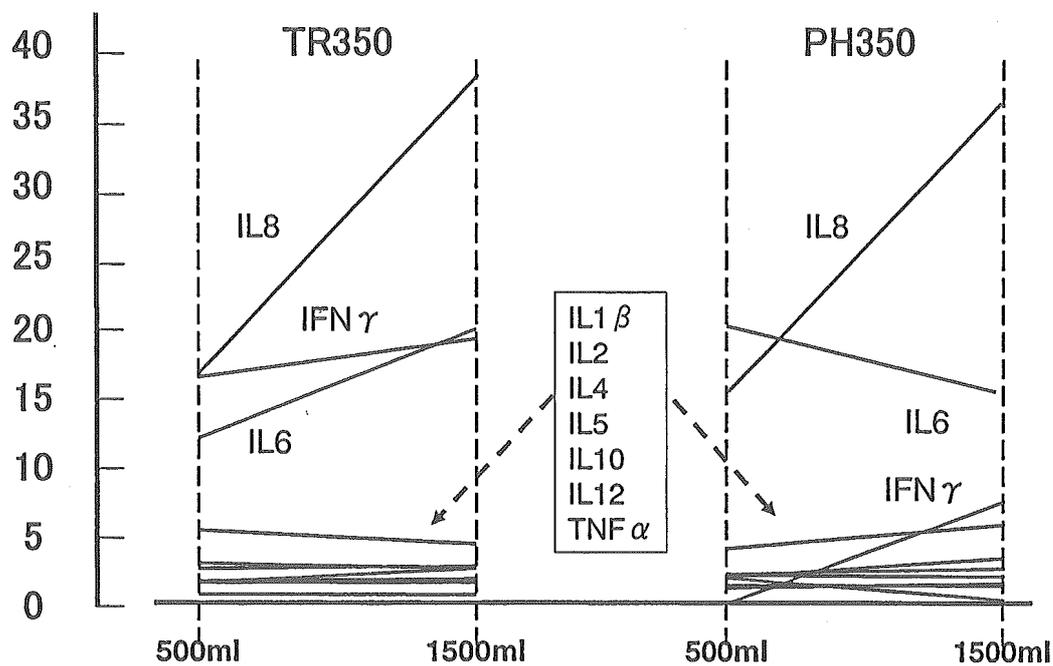
症例は 45 歳の男性。両下肢の筋力低下で発症した IgA λ 型の Crow Fukase 症候群で、血清 VEGF 値は 2000 pg/ml 以上であった。on line HDF と IAPP を施行し、on line HDF、IAPP において脱血直後と各カラム前後、返血直前にて血清 VEGF、各種の血清サイトカイン (IL1 β 、IL2、IL4、IL5、IL6、IL8、IL10、IL12、IFN γ 、TNF α) を測定し、臨床症候と比較検討した。なお、VEGF は ELISA 法、各種サイトカインはビーズアレイ法を用いて測定した。吸着カラムは Phenylalanine (PH350) と Tryptophan (TR350) を用いた。

【結果および結語】

on line HDF、IAPP (PH350、TR350) 療法により明らかな臨床症候の改善はなかった。血清 VEGF の検討では、on line HDF で血清 VEGF 値は 3 時間以上の処理で低下した。IAPP に使用した二種類の吸着カラム (PH350、TR350) 前後での VEGF 値に有意な差はなかった。IAPP カラム (TR350、PH350) 前後で、一部のサイトカインが吸着された。

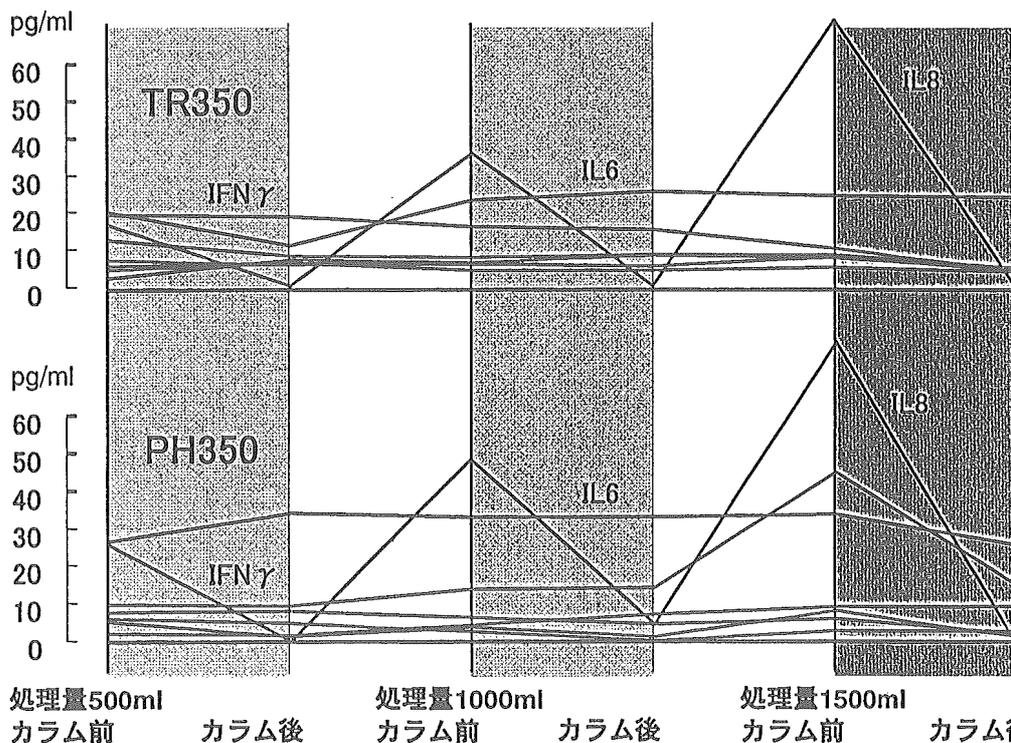
IAPP脱血側における血清サイトカイン値の変動

血清サイトカイン値 (pg/ml)



Saitama Medical Center, department of neurology

カラム前後におけるサイトカイン値の変動



Saitama Medical Center, department of neurology

COX-2 阻害剤を用いた実験的自己免疫性脳脊髄炎への治療

班員 楠 進^{*1}、共同研究者 ○宮本 勝一^{*1}、三宅幸子^{*2}、山村 隆^{*2}

* 1 近畿大学医学部・神経内科

* 2 国立精神神経センター・神経研究所・免疫研究部

目的

多発性硬化症 (MS) は中枢神経に炎症性脱髄を引き起こす難治性自己免疫疾患である。

以前からインドメタシン、ステロイドなど抗炎症剤による治療が試みられているが長期使用による副作用が問題となる。近年、副作用が少ないとされる cyclooxygenase (COX)-2 阻害剤が登場し、関節リウマチなどに使用されている。COX-2 阻害剤の MS への臨床応用の可能性について検証する。

方法

MS のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) に対して nimesulid、celecoxib (CEL)、meloxicam など種々の COX-2 阻害剤と従来からの抗炎症剤を用いて治療効果を比較検証した。

結果

CEL は他の薬剤と比べて著明に EAE を抑制し、発症後の投与でも有効であった。免疫学的バランスのみを考えた場合、COX-2 阻害剤は通常 Th1 に偏倚させるため、Th1 病モデルである EAE を悪化させる方向に働く。ところが CEL は抗 MOG 抗体のアイソタイプを Th2 にシフトさせていた。そして、これらの CEL の効果は COX-2 を介さない経路で働いていた。CEL は抗原特異的 T 細胞の中枢神経への侵入を阻止し、脳血液関門 (BBB) 通過を促進する接着因子 (ICAM-1、P-selectin) やケモカイン (MCP-1) 発現を抑制していた。

総括

CEL は他の COX-2 阻害剤と同様の PG 産生抑制による抗炎症効果だけではなく、COX-2 を介さない経路で免疫学的バランスを Th2 に偏倚させ、抗原特異的 T 細胞の BBB 通過を阻止することによって、他の抗炎症剤には無い強力な EAE 治療効果を示したと考えられる。今後、MS の治療に応用されることが期待される。

平成 17 年度

厚労省難治性疾患克服研究事業

「難治性疾患の画期的診断・治療等に関する研究」班

演題名：CECAM-1 分子を介した実験的自己免疫性脳脊髄炎病態の調節に関する研究

三宅幸子

国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

A. 研究目的:多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の病態抑制に CECAM-1 分子が関与していることを見い出したので報告する。

B. 方法: C57BL/6 マウス、もしくは J α 18 欠損(NKT 欠損)マウスに MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを免疫し EAE を誘導した。Agonistic な抗 CECAM-1 抗体(AgB10)または、抑制性 CECAM-1-Ig キメラ蛋白を腹腔内投与した。MOG 特異的抗体を ELISA 法で測定した。MOG 特異的リンパ節細胞の増殖反応を ³H サイミジンの取込み法、培養上清中のサイトカインを ELISA 法にて測定した。

C. 結果: EAE は AgB10 の投与により増悪した。AgB10 投与群で、MOG₃₅₋₅₅ による再刺激反応において、IFN- γ 産生の亢進があった。一方、CECAM-1-Ig キメラ蛋白投与群では、MOG₃₅₋₅₅ の再刺激反応において、細胞増殖、IFN- γ 産生が抑制されていた。NKT 細胞欠損マウスでは、AgB10 の投与により EAE は増悪せず、MOG₃₅₋₅₅ による再刺激反応において、IFN- γ 産生の亢進もみられなかった。また AgB10 の前投与により、NKT 細胞刺激による IFN- γ 産生が亢進した。

結論: CECAM-1 は NKT 細胞を介して自己抗原反応性 T 細胞の Th1 反応を抑制することにより、EAE を抑制する。