

産生され、天然型 IFN β の N 末端のメチオニンを欠き、17 位システインがセリンに置換され糖鎖修飾はなく、皮下注射で使用される。一方、IFN β 1a は Chinese hamster ovary (CHO) 細胞で産生され糖鎖修飾を有し、筋肉内・皮下注射で使用される。

現時点での MS における IFN β 治療の問題点は、①治療効果の発現機序が十分解明されていない、②至適投与量・投与方法・投与期間が決まっていない、③治療効果の乏しい nonresponder が存在する^{5,6)}、④免疫原性 (immunogenicity) があり中和抗体 (neutralizing antibody: NAb) が出現すると治療効果が減弱する、⑤副作用 (adverse effects) により治療継続を断念せざるを得ない症例が存在することである。IFN β は高用量頻回投与が低用量間欠的投与より効果が大きいとの報告¹¹⁾があるが、長期的効果 (long-term effects) は証明されておらず、治療終了の判断基準がない。poor responder や nonresponder に対しては他の DMA (GA, cyclophosphamide, azathioprine, mitoxantrone, 抗 CD25 抗体) の併用 (add-on rescue therapy) が必要である^{12,13)}。ただし抗 integrin α 4 (VLA-4) 抗体との併用では進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy: PML) の発症が報告されており注意を要する¹⁴⁾。また神経変性・軸索傷害・脳萎縮の進行に対する抑制効果は明らかではなく、PPMS には無効である。NAb は IFN β 1a に比較して IFN β 1b で出現頻度が高く、治療効果を減弱させるが、自然経過で消失することも多い¹⁵⁾。副作用としては感冒様症状、注射部位皮膚潰瘍形成、白血球減少、肝機能障害、抑うつ症状、潜在性自己免疫疾患の増悪などが報告^{4,16)}されており、多くは治療開始後早期に出現する。

3. MS における IFN β 治療効果の発現機序

a. 免疫調節作用 (immunomodulatory effects)

MS における IFN β の治療効果の発現機序の全容は解明されていないが、種々のステップで

炎症の鎮静化 (antiinflammatory) に働くと考えられる (図 1)。第一に IFN β は樹状細胞 (dendritic cells: DC) や macrophages/microglia など抗原提示細胞 (antigen-presenting cells: APC) の抗原提示能を抑制する。CD4⁺ T 細胞は APC 細胞膜表面上の class II 主要組織適合性抗原 (major histocompatibility complex antigen: MHC) に結合したペプチド抗原を認識する。IFN γ は APC 上の class II MHC 分子の発現レベルを、class II transactivator (CIITA) の発現誘導を介して顕著に増強する。一方 IFN β は CIITA 抑制因子の発現を誘導して IFN γ による class II MHC 発現増強に拮抗する¹⁷⁾。著者らはヒトアストロサイト (astrocytes) 純培養を用いて、IFN β が IFN γ による class II MHC 発現誘導を選択的に抑制し、IFN γ による増殖促進作用に対して拮抗することを報告した^{18,19)}。IFN α/β と IFN γ の拮抗的相互作用 (antagonism) は種々の実験系で観察されている²⁰⁾。

第二に IFN β は APC による IL-12 産生を抑制することにより Th1 shift を是正する²¹⁾。IL-12 は Th1 細胞の分化誘導に必須なサイトカインで、MS 急性期病巣では発現が上昇している。しかし IFN β が単純に Th1/Th2 バランスを変えるとの見解には異論もある²²⁾。例えば IFN β は DC の分化成熟を促進して、CD4⁺ T 細胞による IFN γ と IL-10 の産生を誘導する²³⁾。

第三に IFN β は活性化自己反応性 T 細胞の BBB 通過を抑制する。IFN β 投与中の MS 患者では MRI のガドリニウム (gadolinium: Gd) 造影病巣数が著減する²⁴⁾。IFN β は T 細胞の血管内皮細胞 (endothelial cells: EC) への接着因子 very late antigen-4 (VLA-4) の発現レベルを低下させ、EC 表面上の vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) を分離遊出させて、T 細胞の EC への接着を抑制する²⁵⁾。IFN β は EC の物質輸送・通過能を低下させる²⁶⁾。IFN β は活性化 T 細胞による BBB 基底膜細胞外基質分解酵素 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) の産生を抑制する²⁷⁾。

第四に全身投与した IFN β は、MS 活動性病巣では破綻した BBB を通過して、グリア細胞

(astrocytes, oligodendrocytes, microglia)や神経細胞に直接的に作用し得る。IFN β は培養astrocytesではIFN γ 誘導性iNOSの産生を抑制し、神経栄養因子nerve growth factor(NGF)やpleiotrophinの発現レベルを上昇させる^{28,29}。IFN β は培養microgliaではIL-1産生を低下させ、IL-1 receptor antagonistの発現レベルを上昇させる³⁰。

b. IFN 応答遺伝子を介する

細胞生物学的作用

近年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 microarray/GeneChip)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)の発現情報が包括的・網羅的・系統的に解析可能になった。遺伝子アレイはスライドガラス基盤上に数万のcDNAまたはオリゴヌクレオチドが固定されているチップである。2色法では遺伝子発現レベルの異なる2種類の細胞・組織、例えばIFN β 投与前後の細胞などからmRNAを抽出し、別々の蛍光色素(Cy3赤, Cy5緑)でラベルしたcDNA, cRNAを作成して、チップ上で競合的ハイブリダイゼーションを行う。スキャナーで蛍光シグナルを検出し、データを正規化(normalization)して、遺伝子発現プロフィールを比較解析する。

このような網羅的発現解析(global expression analysis)の手法により、従来の研究方法では予期しなかった遺伝子群のMS病態形成における役割が次々と明らかにされた³¹。Whitneyらは初めてcDNA microarrayを用いてMS急性期炎症性病巣と正常様白質(normal-appearing white matter: NAWM)を比較し、前者におけるinterferon-regulatory factor IRF-2と5-lipoxygenaseの発現上昇を報告した³²。ChabasらはcDNAライブラリー網羅的シークエンス解析により、MS脳におけるosteopontin(OPN)発現上昇を発見した³³。彼らはラットEAE脊髄のmicroarray解析でOPNの上昇を確認した。OPNはTh1 cytokineであり、遺伝子欠損マウスはEAE惹起に対して抵抗性を示す。LockらはMS急性炎症性病巣と慢性非活動性病巣を比

較し、前者におけるG-CSFの上昇と後者におけるIgG Fc receptor, IgE receptor, histamine receptor type 1の上昇を認めた³⁴。またG-CSF投与でEAEが軽症化し、Ig FcR γ -chain 遺伝子欠損マウスではEAE慢性化が抑制されることを証明した³⁴。

遺伝子アレイはMSにおけるIFN β 治療効果発現機序を解析するうえでも有用である。著者らはヒトastrocytes純培養の遺伝子発現プロフィールを解析し、IFN β によるinterferon-regulatory factor IRF-7とpleiotrophinの上昇、IFN γ によるIRF-1とICAM-1の上昇を認めた²⁹。WandingerらはRRMSと健常者のPBMCをIFN β 存在下で培養し、Th1関連遺伝子CCR5, IP-10(CXCL10)の発現誘導を認めた²²。著者らは13例のRRMSでIFN β 治療開始前・開始後3カ月・6カ月に採血して、末梢血リンパ球(peripheral blood mononuclear cells: PBMC)からCD3陽性T細胞とCD3陰性non-T細胞を分離した。明確な遺伝子機能(annotation)付き1,259遺伝子を含むcDNA microarray(Hitachi Life Science)を用いて、IFN β 治療により発現変動した遺伝子群(IFN応答遺伝子群IFN-responsive genes: IRG)を同定した³⁵。T細胞で8遺伝子(IRF-7, ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI60, IFI30, ATF3, TLR5)の上昇とIL-3, MIGの低下、non-T細胞で12遺伝子(IRF-7, ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI27, IFI17, TAP1, TNFAIP6, TSC22, SULT1C1, RPC39, RAB11A)の上昇、IL-3の低下を認めた。ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI27, TSC22, SULT1C1は治療開始後3-6カ月で持続的な上昇を認めた。一方統計学的有意差はなかったが、治療後にTh1関連遺伝子CCR5(T), IFN γ (T), TNF α (non-T)の上昇傾向を認めた。この所見はIFN β は必ずしも明確なTh2 shiftを誘導しないという見解²²を支持する。上記のうち9遺伝子(IRF-7, ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI60, IFI17, TAP1, TNFAIP6, MIG)はプロモータ領域にIFN-stimulated response element(ISRE)やIRF element(IRF-E)が存在する既知IRGで、IFN β に直接反応し誘導され、治療効果に深く関与していると考えられる。

表 2 末梢血リンパ球における IFN 応答遺伝子 (IRG) の機能分類

カテゴリー	遺伝子数	遺伝子名(別名)
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

末梢血リンパ球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) において IFN β (50 ng/ml) 刺激 3-24 時間で発現誘導される遺伝子群を機能別に分類した。

IRF-7 はウイルス感染に反応して IFN α/β 産生を増幅する制御因子である³⁶⁾。IFI30 は class II MHC 拘束性抗原提示の際働くチオール還元酵素で、遺伝子欠損マウスでは抗原呈示能低下を来す³⁷⁾。TAP1 は class I MHC 拘束性抗原提示の際働くペプチド輸送因子で、遺伝子欠損マウスでは CD8⁺T 細胞による結核菌抵抗力が減弱する³⁸⁾。TNFAIP6 は TNF α , IL-1 β により誘導される分泌蛋白質で抗炎症作用を呈する³⁹⁾。すなわち IFN β は抗ウイルス・抗炎症・免疫調節因子として働く多彩な IRG を誘導することが明らかになった。興味深いことに、SLE では治療にかかわらず PBMC における IRG 発現レベルが高い⁴⁰⁾。

最近著者らは PBMC を IFN β (50 ng/ml) で 3, 24 時間培養して早期に発現誘導される *in vitro* IRG を cDNA microarray を用いて包括的に解析

し、結果を real-time RT-PCR 法で検証した (Sato, et al, Submitted. 表 2)。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 3, 24 時間でオーバーラップし、このなかには前述の *in vivo* IRG11 遺伝子 (IRF7, IFI6-16, IFI17, ISG15, IFI27, IFI56, IFI60, TAP1, ATF3, SULT1C1, TNFAIP6) が含まれていた。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 3, 24 時間でオーバーラップしていた。また IRG は主要カテゴリー: (i) conventional IFN-response markers, (ii) components of classical and Toll-like receptor (TLR)-dependent IFN-signaling pathways, (iii) chemokines and their receptors, (iv) cytokines, growth factors and their receptors, (v) apoptosis, DNA damage, and cell cycle regulators, (vi) heat shock proteins, (vii) costimulatory

and adhesion molecules に分類された(表 2)。多数の IRG がアポトーシスやストレス応答の制御因子に分類されることは、IFN β の多様な生物学的活性を支持する。ケモカイン関連 IRG のうち、主として effector Th1 細胞に働き、MS 活動性病巣や脳脊髄液で検出されている CXCR3 リガンドケモカイン(SCYB11, SCYB10, SCYB9)と、主として単球(monocytes)に働く CCR2 リガンドケモカイン(SCYA10, SCYA2)は、3, 24 時間の上位 20 遺伝子に含まれていた。一方、主として好中球(neutrophils)に働く CXCR2 リガンドケモカイン(SCYB2, SCYB1, IL8)および regulator of G-protein signaling 14(RGS14)は 3 時間における発現低下遺伝子に含まれていた。ケモカイン受容体は G-protein coupled receptor(GPCR)であり、RGS14 は GPCR シグナル伝達抑制因子である。更に IFN β は一連の炎症性サイトカイン(IL-6, IL-15, OPN, TNF α , IFN γ)の発現を誘導した。SCYB10 と IL-6 は感冒様症状、SCYB10 と SCYA2 は注射部位皮膚症状との因果関係が指摘されている^{41,42}。著者らの結果は、早期 IRG として誘導される炎症性ケモカイン・サイトカインが IFN β 副作用発現で中心的役割を果たしている可能性を示唆する。Weinstock-Guttman らは IFN β 治療前後の 8 例の RRMS の PBMC を経時的に解析して *in vivo* IRG を同定した⁴³。多くは著者らの同定した *in vivo* IRG³⁵ とオーバーラップしている。Liang らは Weinstock-Guttman らのデータを再解析し、IRG は early-onset(within 8 hours), intermediate-onset(24 hours), late-onset(48 hours) の 3 群に分類されることを見いだした⁴⁴。

4. 遺伝子アレイによる MS の IFN β 治療反応性予測の試み

近年、薬物応答遺伝子の発現変動を遺伝子アレイで経時的に解析することにより、個々人における薬物反応性や副作用を事前に予測する試みがなされている(薬理ゲノミクス pharmacogenomics)。Stürzebecher らは IFN β 治療前後 10 例の RRMS で PBMC の遺伝子発現プロフィールを *ex vivo* 解析した⁴⁵。治療前 6 カ月

から開始後 12 カ月まで毎月 Gd 造影 MRI を行い活動性病巣数を算出し、治療後病巣数が 60 % 以上減少した症例を responder と定義した。また nonresponder を開始当初から効果のない nonresponder from initiation of therapy(INR) と、開始後一定期間は効果を認めたが、NAb 出現により効果が減弱した nonresponder with development of NAb(NAbNR) の 2 群に分けた。更に PBMC を IFN β 存在下で培養して *in vitro* 解析も行った。*ex vivo* 解析では responder で 25 遺伝子(IFI17, OAS, Stat1 上昇と IL-8, CD69, c-Fos, TSC22 低下など)が 2 倍以上変動した。特に IL-8 の発現低下は responder 識別の指標となる可能性が示唆された。一方 *in vitro* IRG は 87 遺伝子で、responder と nonresponder 間で発現差異を認めなかった。著者らは Stürzebecher らの結果と反して、IFN β 治療後に TGF β -stimulated protein TSC22 の発現上昇を認めた³⁵。彼らの研究は症例数も少なく凍結保存した PBMC を解凍しており、実験操作が遺伝子発現に影響し得る。また 1 例の responder では治療前に約 90 個の造影病巣を呈しているが、これほど多数の造影病巣を示す症例は我が国では異例である。Hong らは MS 患者の PBMC を IFN β または GA 治療後に免疫応答遺伝子アレイを用いて解析し、治療反応性遺伝子群の相違を調べた⁴⁶。MMP-9 は IFN β で低下し、GA では上昇した。

van Boxel-Dezaire らは 26 例の IFN β 治療を受けた RRMS の PBMC で、サイトカイン遺伝子発現レベルを半定量的 RT-PCR 法により解析した⁴⁷。治療前後 2 年間の再発回数・IVMP 回数・Extended Disability Status Scale(EDSS) スコアを集計して 16 例の responder と 10 例の nonresponder に分けると、responder は治療前に IL-12p35 発現レベルが低い傾向を呈した。Wandinger らは RRMS で IFN β 治療後 1 年間再発がなく EDSS スコア悪化のみられない症例を responder、再発した症例を nonresponder と定義した⁴⁸。20 例の responder と 19 例の nonresponder を real-time RT-PCR 法と ELISA 法で解析し、responder では TNF-related apoptosis

-inducing ligand (TRAIL; TNFSF10) が持続的高値を示すことを見いだした。TRAIL は IRG の一つであり、遺伝子欠損マウスは胸腺細胞アポトーシス異常を来し、コラーゲン関節炎に高感受性になる⁴⁹⁾。著者らは MS の T 細胞における TRAIL 発現低下を報告している⁵⁰⁾。Baranzini らは IFN β 治療中 52 例の RRMS で PBMC における 70 遺伝子の発現レベルを real-time RT-PCR 法で経時的に解析した⁵¹⁾。治療後 2 年間再発がなく EDSS スコア悪化のない症例を responder, 2 回以上再発した症例を nonresponder と定義した。両者は 3 遺伝子 (caspase2, caspase10, FLICE inhibitory protein: FLIP) の発現レベルの 3 次元マッピングで 86% 識別可能と報告した。

最近、著者らは 72 例の IFN β 未治療活動性 MS (65 RRMS, 7 SPMS) と 22 人の健常者の末梢血 CD3 陽性 T 細胞と CD3 陰性 non-T 細胞の遺伝子発現プロフィールを、1,259 cDNA microarray (Hitachi Life Science) を用いて解析した⁵⁰⁾。両群間で発現差異を認めた上位 30 遺伝子を選択すると、T 細胞 25 遺伝子 (NR4A2, TCF8 上昇と MAPK1, SMARCA3, HSPA1A, TRAIL, TOP1, CCR5, BAG1, DAXX, TSC22, PARP 低下など)、non-T 細胞 27 遺伝子 (ICAM1, CDC42, RIPK2, SODD, TOP2A 上昇と BCL2, RPA1, NFATC3, HSPA1L, RBBP4, PRKDC 低下など) がアポトーシス制御遺伝子群に分類された。すなわち MS でアポトーシス促進遺伝子 (proapoptotic genes) と抑制遺伝子 (antiapoptotic genes) の発現上昇および低下の拮抗的バランス (counterbalance) を認めた。また MS 72 例中 46 例は初回採血後 2 年間の IFN β 治療を開始した。未治療 MS と健常者間で発現差異を示す 286 遺伝子を指標遺伝子 (discriminator genes) にした階層的クラスター解析 (hierarchical clustering analysis) で、286 遺伝子は 5 クラス (class #1-#5) に分類され、MS 群は健常者群から分離さ

れ、更に 4 グループ・クラスター (A, B, C, D) に細分類された⁵²⁾。A 群は遺伝子発現プロフィールが最も健常者に類似し、B 群は最も臨床的活動性が高く、ケモカイン遺伝子の多い class #5 の発現レベルが高く、C 群は脳限局病変を呈する患者が多く、D 群は最も EDSS スコアが高値であった。治療前後 2 年間の再発回数・IVMP 日数・入院日数・EDSS スコア・MRI T2 強調画像病巣数と患者満足度から治療評価スコアを算出すると、responder は A 群と B 群に集積していた。responder では nonresponder に比較して、治療開始後 6 カ月の時点で、IRG (ISG15, IFI27, SCYA2, TNFRp75) 発現レベルが高く維持されていた。すなわち T 細胞の遺伝子発現プロフィール解析は IFN β 治療効果の予測に有用であると考えられた。

おわりに

IFN β の生物学的活性は多彩であり、MS における治療効果の発現機序は十分解明されていない。DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析は、MS における IFN β 治療効果や副作用の予測に基づく個別化治療 (individualized therapy) の樹立に役立つと思われる。

謝辞 本稿で紹介した研究は、国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部山村隆部長、古池史子先生、中西恵美先生、尾上祐行先生、土居芳充先生、南里悠介先生、佐藤和貴郎先生、荒浪利昌先生、および難治性疾患の画期的診断・治療法等に関する研究班の班員諸氏との共同研究でなされ、平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金こころの健康科学 (遺伝子アレイによる多発性硬化症再発予測法樹立に関する研究: H17-こころ-020) および平成 17 年度創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業 (DNA マイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究: KH21101) の補助を受けた。

■ 文 献

- 1) The IFN β Multiple Sclerosis Study Group: Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-

- controlled trial. *Neurology* 43: 655-661, 1993.
- 2) Jacobs LD, et al: Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 39: 285-294, 1996.
 - 3) Saida T, et al: Interferon beta-1b is effective in Japanese RRMS patients. A randomized, multicenter study. *Neurology* 64: 621-630, 2005.
 - 4) Walther EU, Hohlfeld R: Multiple sclerosis: side effects of interferon beta therapy and their management. *Neurology* 53: 1622-1627, 1999.
 - 5) Waubant E, et al: Clinical characteristics of responders to interferon therapy for relapsing MS. *Neurology* 61: 184-189, 2003.
 - 6) Rudick RA, et al: Defining interferon β response status in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 56: 548-555, 2004.
 - 7) Sospedra M, Martin R: Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23: 683-747, 2005.
 - 8) Jacobs L, et al: Intrathecal interferon reduces exacerbations of multiple sclerosis. *Science* 214: 1026-1028, 1981.
 - 9) Panitch HS, et al: Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 37: 1097-1102, 1987.
 - 10) 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* 343: 898-904, 2000.
 - 11) Schwid SR, et al: Enhanced benefit of increasing interferon beta-1a dose and frequency in relapsing multiple sclerosis. *Arch Neurol* 62: 785-792, 2005.
 - 12) Bielekova B, et al: Humanized anti-CD25 (daclizumab) inhibits disease activity in multiple sclerosis patients failing to respond to interferon β . *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8705-8709, 2004.
 - 13) Smith DR, et al: A randomized blinded trial of combination therapy with cyclophosphamide in patients with active multiple sclerosis on interferon beta. *Multiple Sclerosis* 11: 573-582, 2005.
 - 14) Kleinschmidt-DeMasters BK, Tyler KL: Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. *N Engl J Med* 353: 369-374, 2005.
 - 15) Arnason BG: Long-term experience with interferon beta-1b (Betaferon) in multiple sclerosis. *J Neurol* 252 (Suppl 3): III/28-III/33, 2005.
 - 16) Ekstein D, et al: Polyneuropathy associated with interferon beta treatment in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 65: 456-458, 2005.
 - 17) Lu HT, et al: Interferon (IFN) β acts downstream of IFN $-\gamma$ -induced class II transactivator messenger RNA accumulation to block major histocompatibility complex class II gene expression and requires the 48-kD DNA-binding protein ISGF3- γ . *J Exp Med* 182: 1517-1525, 1995.
 - 18) Satoh J, et al: Differential effects of beta and gamma interferons on expression of major histocompatibility complex antigens and intercellular adhesion molecule-1 in cultured fetal human astrocytes. *Neurology* 45: 367-373, 1995.
 - 19) Satoh J, et al: Counteracting effect of IFN $-\beta$ on IFN $-\gamma$ -induced proliferation of fetal human astrocytes in culture. *Multiple Sclerosis* 1: 279-287, 1996.
 - 20) Inaba K, et al: Contrasting effects of α/β and γ -interferons on expression of macrophage Ia antigens. *J Exp Med* 163: 1030-1035, 1986.
 - 21) McRae BL, et al: Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development. *J Immunol* 160: 4298-4304, 1998.
 - 22) Wandinger KP, et al: Complex immunomodulatory effects of interferon- β in multiple sclerosis include the upregulation of T helper 1-associated marker genes. *Ann Neurol* 50: 349-357, 2001.
 - 23) Kadowaki N, et al: Natural interferon α/β -producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 192: 219-225, 2000.
 - 24) Stone LA, et al: The effect of interferon- β on blood-brain barrier disruption demonstrated by

- contrast-enhanced magnetic resonance imaging in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol* **37**: 611-619, 1995.
- 25) Calabresi PA, et al: VLA-4 expression on peripheral blood lymphocytes is downregulated after treatment of multiple sclerosis with interferon beta. *Neurology* **49**: 1111-1116, 1997.
 - 26) Kraus J, et al: Interferon- β stabilizes barrier characteristics of brain endothelial cells in vitro. *Ann Neurol* **56**: 192-205, 2005.
 - 27) Stüve O, et al: Interferon β -1b decreases the migration of T lymphocytes in vitro: effects on matrix metalloproteinase-9. *Ann Neurol* **40**: 853-863, 1996.
 - 28) Boutros T, et al: Interferon- β is a potent promoter of nerve growth factor production by astrocytes. *J Neurochem* **69**: 939-946, 1997.
 - 29) Satoh J, Kuroda Y: Differing effects of IFN β vs IFN γ in MS. Gene expression in cultured astrocytes. *Neurology* **57**: 681-685, 2001.
 - 30) Liu JS, et al: IFNs are critical regulators of IL-1 receptor antagonist and IL-1 expression in human microglia. *J Immunol* **161**: 1989-1996, 1998.
 - 31) Steinman L, Zamvil S: Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nature Rev Immunol* **3**: 483-492, 2003.
 - 32) Whitney LW, et al: Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Ann Neurol* **46**: 425-428, 1999.
 - 33) Chabas D, et al: The influence of the proinflammatory cytokine osteopontin on autoimmune demyelinating disease. *Science* **294**: 1731-1735, 2001.
 - 34) Lock C, et al: Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* **8**: 500-508, 2002.
 - 35) Koike F, et al: Microarray analysis identifies interferon β -regulated genes in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **139**: 109-118, 2003.
 - 36) Honda K, et al: IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**: 772-777, 2005.
 - 37) Maric M, et al: Defective antigen processing on GILT-free mice. *Science* **294**: 1361-1365, 2001.
 - 38) Behar SM, et al: Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* **189**: 1973-1980, 1999.
 - 39) Bárdos T, et al: Anti-inflammatory and chondroprotective effect of TSG-6 (tumor necrosis factor- α -stimulated gene-6) in murine models of experimental arthritis. *Am J Pathol* **159**: 1711-1721, 2001.
 - 40) Baechler EC, et al: Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 2610-2615, 2003.
 - 41) 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* **44**: 682-685, 1998.
 - 42) Buttmann M, et al: Subcutaneous interferon- β injections in patients with multiple sclerosis initiate inflammatory skin reactions by local chemokine induction. *J Neuroimmunol* **168**: 175-182, 2005.
 - 43) Weinstock-Guttman B, et al: Genomic effects of IFN- β in multiple sclerosis patients. *J Immunol* **171**: 2694-2702, 2003.
 - 44) Liang Y, et al: Differential and trajectory methods for time course gene expression data. *Bioinformatics* **21**: 3009-3016, 2005.
 - 45) Stürzebecher S, et al: Expression profiling identifies responder and non-responder phenotypes to interferon- β in multiple sclerosis. *Brain* **126**: 1419-1429, 2003.
 - 46) Hong J, et al: Gene expression profiling of relevant biomarkers for treatment evaluation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **152**: 126-139, 2004.
 - 47) van Boxel-Dezaire AH, et al: Contrasting response to interferon β -1b treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis: does baseline interleukin-12p35 messenger RNA predict the efficacy of

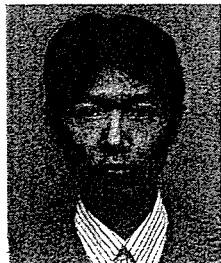
treatment? *Ann Neurol* 48: 313-322, 2000.

- 48) Wandinger KP, et al: TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet* 361: 2036-2043, 2003.
- 49) Lamhamedi-Cherradi SE, et al: Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL^{-/-} mice. *Nat Immunol* 4: 256-260, 2003.
- 50) Satoh J, et al: Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 18: 537-550, 2005.
- 51) Baranzini SE, et al: Transcription-based prediction of response to IFN β using supervised computational methods. *PLoS Biol* 3: e2, 2005.
- 52) Satoh J, et al: T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*, 2006. (in press)

多発性硬化症の病態

——免疫調節機構の破綻

The pathology of multiple sclerosis——Breakdown of immune regulatory mechanisms



荒浪利昌(写真) 山村 隆

Toshimasa ARANAMI and Takashi YAMAMURA

国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

◎多発性硬化症(MS)は中枢神経系の慢性炎症性脱髄性疾患であるが、その病態は中枢神経のミエリン蛋白に対する Th1 細胞による自己免疫反応であると考えられている。これに対して自己反応性 T 細胞に対して抑制的に働く免疫系細胞が存在し、免疫調節細胞とよばれる。MS への関与が示唆されている免疫調節細胞としては、CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞などがあるが、MS の病態は自己反応性 T 細胞とこれら免疫調節細胞のバランスによって決定されると考えられる。本稿では、MS の病因・病態と治療を考えるうえで重要な免疫調節細胞に関する最近の知見を概説するとともに、これら拮抗する免疫系細胞のバランスという観点から MS の病態を論じる。

Key Word : 多発性硬化症(MS), 免疫調節細胞, 自己反応性T細胞, CD25陽性 CD4陽性T細胞, NK細胞, NKT細胞

多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)は中枢神経系に炎症性脱髄性病巣が時間的・空間的に多発する疾患で、若年成人に好発する。多彩な神経症状を示し、多くの例で再発と寛解を繰り返すが、その病因は中枢神経のミエリン蛋白に対する自己免疫反応であると考えられている。自己免疫反応は、CD4 陽性ヘルパー T 細胞、CD8 陽性キラー T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージなどの免疫系細胞によって惹起されるが、中心的役割を果たしているのが CD4 陽性ヘルパー T 細胞である。末梢リンパ組織において活性化された自己反応性 CD4 陽性 T 細胞は中枢神経系に浸潤し、ミエリン塩基性蛋白(MBP)などのミエリン蛋白に特異的に反応して活性化され、IFN- γ 、TNF- α などさまざまな炎症性サイトカインやケモカインを産生する。炎症性ケモカインによって樹状細胞、マクロファージなどが末梢血より動員され、さらに炎症が持続、拡大する¹⁾。

これに対して、自己反応性 T 細胞や病的な免疫

系の活性化に対して抑制的に働く免疫系細胞の存在が知られており、免疫調節細胞とよばれる。免疫調節細胞は炎症性サイトカインに拮抗的に働く、IL-4、IL-10、TGF- β 1 などの調節性サイトカインを産生し、直接的に、あるいは樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞の抑制を介して間接的に、自己反応性 CD4 陽性 T 細胞の反応を抑制すると考えられる。したがって、MS の病態は自己反応性 T 細胞と免疫調節細胞のバランスによって決定されると考えられる。

本稿では、MS に関与する病原性自己反応性 T 細胞と免疫調節細胞に関する最近の知見を紹介するとともに、再発と寛解という臨床経過がこれら拮抗する免疫系細胞のバランスという観点から理解できることを論じる。

自己反応性T細胞——Th1細胞とTh17細胞

免疫反応を統括する CD4 陽性 T 細胞のもっとも重要な機能のひとつはサイトカイン産生能であ

る。CD4 陽性 T 細胞は産生するサイトカインの種類によって、IFN- γ 、TNF- α などを産生する Th1 細胞と、IL-4、IL-5、IL-13などを産生する Th2 細胞に大別される。Th1 と Th2 細胞はそれぞれが産生するサイトカイン自体によりたがいに拮抗的に働くという制御機構をもつ。MS およびそのマウス実験モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) においてはこれまで、Th1 細胞が病原性 T 細胞であると考えられてきた。しかし最近、あらたな系列の T 細胞として、IL-17 を産生する Th17 細胞が同定された。この T 細胞は EAE においては Th1 細胞よりも強力な自己免疫惹起能をもつと報告されており、また視神経脊髄型 MS 患者脳脊髄液中での IL-17 濃度上昇が報告され²⁾、MS においても Th17 細胞が病原性 T 細胞のひとつとして注目されつつある。

さまざまな免疫調節細胞

これまで EAE あるいは MS においてさまざまな免疫調節細胞が報告されている。CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞、IL-10 産生性 T regulatory type 1 (Tr1) 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、NKT 細胞、B 細胞などである。EAE、MS に関与するさまざまな免疫調節細胞について概説する。

1. CD25陽性CD4陽性T細胞

ヒト末梢血 CD4 陽性 T 細胞の数 \sim 10%を占め、末梢性免疫寛容における重要な役割を果たしている。マウスにおいては抗 CD25 抗体によりこの細胞を除去すると、さまざまな臓器特異的自己免疫疾患を発症する³⁾。さらに、この細胞の生成および機能に必須である Foxp3 蛋白の遺伝子に変異を持つヒトおよびマウスでは、自己免疫疾患を自然発症する。すなわち、この調節細胞はつねにさまざまな臓器に対する自己反応性 T 細胞を抑制していると考えられる。EAE においてもこの細胞の除去により EAE が重症化することから⁴⁾、免疫調節細胞として重要な役割を果たしていることが示唆される。さらに MS においては、CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞の機能異常⁵⁾、および Foxp3 発現の減少⁶⁾が報告されており、MS の病因のひとつとしての可能性も示唆されている。

2. NK細胞

NK 細胞はウイルス感染細胞、腫瘍細胞などを殺す免疫細胞として知られているが、そのほかサイトカイン産生を介してさまざまな免疫反応に関与している。T 細胞の分化と同様に NK 細胞においても、NK1 および NK2 細胞という分化経路が知られている⁷⁾。NK1 細胞は IFN- γ 、IL-10 など、NK2 細胞は IL-5、IL-13などを産生する。著者らは、NK 細胞除去により EAE が重症化すること⁸⁾、MS 寛解期の NK 細胞が高い IL-5 産生能をもち (NK2 偏倚)、自己反応性 Th1 細胞に対して抑制的に働きうることから^{9,10)}、NK 細胞が免疫調節細胞として機能していることを提唱している。

3. NKT細胞

マウスにおいて、NK 細胞表面マーカーと T 細胞抗原受容体 (TCR) を共に発現するユニークな細胞群として同定され、TCR α 鎖に多様性のほとんどないインバリエント鎖をもつことから、NKT 細胞、とくに invariant NKT 細胞 (iNKT 細胞) とよばれる。iNKT 細胞はペプチド抗原ではなく、糖脂質抗原により活性化され、迅速に IFN- γ と IL-4 を産生する。当研究室では OCH という糖脂質を合成し、この新規合成糖脂質が iNKT 細胞を活性化させ、選択的に IL-4 のみを産生させることを報告した。EAE においては OCH の投与により生体内で iNKT 細胞より選択的に IL-4 が産生され、症状が改善されることを示した¹¹⁾。ヒト末梢血中にも iNKT 細胞は存在し、MS 寛解期においては、この細胞は IL-4 を優位に産生する¹²⁾。このことは iNKT 細胞が IL-4 産生を介して寛解期の維持に関与している可能性を示唆する。

4. V α 19i T細胞

第 2 のインバリエント鎖を発現する NKT 細胞であり、ヒトおよびマウスの腸管粘膜固有層に存在することから、mucosal-associated invariant T (MAIT) cells とよばれる¹³⁾。当研究室では V α 19i TCR トランスジェニックマウスでは、V α 19i T 細胞が多量の IL-10 産生誘導を介して、EAE を抑制し、逆に V α 19i T 細胞を欠損するマウスにおいては EAE が増悪することを示し、この細胞が EAE における重要な免疫調節細胞であることを証明した¹⁴⁾。

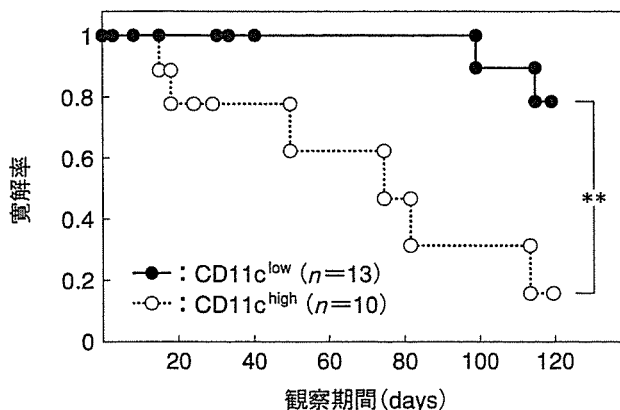


図 1 調節性NK細胞の表現型とMSの疾患活動性の相関

免疫抑制剤未投与寛解期 MS 患者 23 名の末梢血 NK 細胞上の CD11c の発現量をフローサイトメトリーで解析した。個々の患者は CD11c の発現量に従い、CD11c^{high}MS と CD11c^{low}MS に分けられる。末梢血サンプリング後 120 日間の再発の有無を追跡し、Kaplan-Mayer の生存分析に従い、寛解率を算出した。また、寛解率の有意差検定にはログランクテストを用いた。その結果、本図に示すとおり、CD11c^{high}MS 群は、CD11c^{low}MS 群に比べ有意に寛解率が低いことが分かった。**p*<0.01。

免疫調節細胞と自己反応性T細胞のバランスの破綻

MBP などミエリン蛋白に対する試験管内での T 細胞の反応性は健常人においても認められる。しかし、これが MS を惹起しないのは、生体内では免疫調節細胞によって抑制されているからであると考えられる。つまり MS の生体内では自己反応性 T 細胞とさまざまな免疫調節細胞がつねに拮抗しており、それぞれの細胞群がさまざまな外的要因による影響を受け、その機能が変化するために、再発と寛解という病態が形成されると考えられる。自己反応性 T 細胞の増強、あるいは免疫調節細胞の減弱のいずれもがバランス破綻(再発)の契機となりうる。外傷、過労、感染、精神的ストレスなどが MS の増悪因子となりうると思われているが、感染などを契機に産生される IFN- γ などの Th1 サイトカインが、NK2 細胞、Th2 細胞などの免疫調節細胞の生成に抑制的に働くことが考えられる。また、精神的ストレスなどは免疫系細胞に対して抑制的に働くことが報告されており、免疫調節細胞の機能低下の引き金になる可能性がある。MS 患者における CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞の機能低下は容易なバランス破綻の一因となりう

る。このような免疫調節細胞の機能的変化と再発の関連を示すデータとして著者らは最近、MS の NK 細胞表面分子のひとつである CD11c 発現が MS の NK 細胞の調節能低下と相関し、早期の再発率の上昇と関連することを見出した¹⁵⁾。MS 患者は末梢血 NK 細胞上の CD11c の発現に従い、CD11c^{high}MS と CD11c^{low}MS に分けられる(図 1)。CD11c^{high}MS においては、MS の調節性 NK 細胞の特徴である NK2 偏倚が消失していた。重要なことに、CD11c^{high}MS は CD11c^{low}MS に比べ、その後の 4 カ月間での有意な再発率の上昇が認められた。このことは、調節性 NK 細胞をはじめとする、免疫調節細胞の機能減弱が再発の誘因となることを示唆すると考えている。

おわりに

MS は自己反応性 T 細胞によって惹起される自己免疫疾患であるが、生体内には免疫調節細胞も存在し、この両者がバランスを保ちつつ、つねに拮抗していると考えられる。このバランスは自己反応性 T 細胞の増強あるいは免疫調節細胞の減弱によって破綻すると考えられ、ストレス、感染などがその契機となりうると思われるが、そのメカニズムの詳細はいまだ不明である。このメカニズムの解明と、免疫調節細胞の機能を強化する治療法の開発が重要であると考えられる。

文献

- 1) Sospedra, M. and Martin, R. : Immunology of multiple sclerosis. *Ann. Rev. Immunol.*, **23** : 683-747, 2005.
- 2) Ishizu, T. et al. : Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. *Brain*, **128** : 988-1002, 2005.
- 3) Sakaguchi, S. : Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.*, **6** : 345-352, 2005.
- 4) Montero, E. et al. : Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4⁺, CD25⁺ and CD8⁺ T cells : analysis using depleting antibodies. *J. Autoimmun.*, **23** : 1-7, 2004.
- 5) Vigihtta, V. et al. : Loss of functional suppression by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.*, **199** : 971-979, 2004.
- 6) Huan, J. et al. : Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J. Neurosci. Res.*, **81** : 45-52,

- 2005.
- 7) Peritt, D. et al. : Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J. Immunol.*, **161** : 5821-5824, 1998.
 - 8) Zhang, B. et al. : Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer(NK) cells. *J. Exp. Med.*, **186** : 1677-1687, 1997.
 - 9) Takahashi, K. et al. : The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain*, **127** : 1917-1927, 2004.
 - 10) Takahashi, K. et al. : Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.*, **107** : R23-R29, 2001.
 - 11) Miyamoto, K. et al. : A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature*, **413** : 531-534, 2001.
 - 12) Araki, M. et al. : Th2 bias of CD4⁺ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int. Immunol.*, **15** : 279-288, 2003.
 - 13) Treiner, E. et al. : Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature*, **422** : 164-169, 2003.
 - 14) Croxford, J. L. et al. : Invariant V(α)19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat. Immunol.*, **7** : 987-994, 2006.
 - 15) Aranami, T. et al. : Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal disease activity of multiple sclerosis. *J. Immunol.*, 2006. (in press)

●お知らせ●

■真菌症フォーラム第8回学術集会

日 時 : 2007年2月10日(土曜日)11:00~18:00

場 所 : ニューオータニ神戸ハーバーランド
〒650-0044 神戸市中央区東川崎町 1-3-5
TEL. 078-360-1111

会 長 : 竹末芳生(兵庫医科大学感染制御学)

テーマ : 改訂 深在性真菌症ガイドライン

内 容 :

1. 招待講演

「Fungal Infections : Pre-emptive Therapy and Prophylaxis in Surgical Patients」

座長 : 竹末芳生(兵庫医科大学感染制御学)

演者 : Pamela, A. Lipsett, MD, FACS, FCCM (Johns Hopkins University)

2. シンポジウム「深在性真菌症改訂ガイドライン」

座長 : 河野 茂(長崎大学大学院感染免疫学)

山口英世(帝京大学医真菌研究センター)

①「血液系の立場から」

田村和夫(福岡大学医学部内科学第一)

②「外科系の立場から」

木内哲也(名古屋大学医学部移植外科)

③「内科系の立場から」

宮崎義継(長崎大学医学部・歯学部附属病院第二内科)

④「基礎の立場から」

渋谷和俊(東邦大学医学部病院病理学講座)

3. ランチョンセミナー「ICDが知りたい真菌感染症の画像診断」

座長 : 二木芳人(倉敷第一病院呼吸器センター)

演者 : 酒井文和(東京都立駒込病院放射線科)

4. 一般演題(口演発表・ポスター発表)

※講演会終了後、情報交換会を予定しております。

事務局 : 真菌症フォーラム第8回学術集会事務局 株式会社協和企画 コンベンション事務局内(〒105-0004 東京都港区新橋 2-20 新橋駅前ビル 1号館 5階, TEL. 03-3573-2060, FAX. 03-3573-2064, E-mail : t_tanabe@kk-kyowa.co.jp)



ELSEVIER

Journal of the Neurological Sciences 252 (2007) 88–91

Journal of the
**Neurological
Sciences**

www.elsevier.com/locate/jns

Short communication

A novel compound heterozygous mutation in the *DAPI2* gene in a patient with Nasu-Hakola disease

Ryo Kuroda ^{a,*}, Junichi Satoh ^{b,c}, Takashi Yamamura ^b, Toshiharu Anezaki ^d, Tatsuhiro Terada ^a,
Kinya Yamazaki ^a, Tomokazu Obi ^a, Kouichi Mizoguchi ^a

^a Department of Neurology, Shizuoka Institute of Epilepsy and Neurological Disorders, 886 Urushiyama, Aoi-ku, Shizuoka 420-8688, Japan

^b Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

^c Department of Bioinformatics and Neuroinformatics, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan

^d Department of Neurology, Numazu City Hospital, 550 Harunoki, Higashishiinoji, Numazu, Shizuoka 410-0302, Japan

Received 24 March 2006; received in revised form 21 August 2006; accepted 22 September 2006

Available online 27 November 2006

Abstract

A 34-year-old woman showed clinical features characteristic of Nasu-Hakola disease (NHD), also designated polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy (PLOS). The genetic analysis of the *DAPI2* gene (*TYROBP*) identified two heterozygous mutations composed of a previously reported single base deletion of 141G (141delG) in exon 3 and a novel single base substitution of G262T in exon 4, both of which are located on separate alleles. The protein sequence motif search indicated that both mutations encode truncated nonfunctional *DAPI2* polypeptides. This is the first case of NHD caused by compound heterozygosity for loss-of-function mutations in *DAPI2*.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Compound heterozygote; *DAPI2*; Loss of function mutations; *TYROBP*; Nasu-Hakola disease

1. Introduction

Nasu-Hakola disease (NHD; OMIM 221770), also designated polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy (PLOS), is a rare autosomal recessive disorder characterized by a combination of progressive presenile dementia and formation of multifocal bone cysts filled with thickened adipocyte membranes [1]. The clinical course of NHD is divided into four stages: (i) the latent stage with normal early development, (ii) the osseous stage beginning at the third decade of life, characterized by pain and swelling in ankles and feet followed by frequent bone fractures, (iii) the early neuropsychiatric stage

occurring at the fourth decade of life, presenting with a frontal lobe syndrome such as euphoria and loss of social inhibitions, and (iv) the late neuropsychiatric stage, characterized by profound dementia, loss of mobility, and death usually by age 50 years [2].

NHD is caused by a structural defect in one of the two genes, *DAPI2* on chromosome 19q13.1, alternatively named TYRO protein tyrosine kinase-binding protein (*TYROBP*), and *TREM2* on chromosome 6p21.1 [2–5]. The *DAPI2* gene encodes DNAX-activation protein 12 (DAP12), a transmembrane adaptor protein that associates with several cell surface receptors, including triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2). Because DAP12 is widely expressed in lymphoid and myeloid lineage cells, including natural killer (NK) cells, monocytes/macrophages, dendritic cells (DC), osteoclasts, and brain microglia, DAP12 signaling regulates a broad range of immune responses, along with differentiation of osteoclasts [6]. At present, 16 different NHD-causing

* Corresponding author. Department of Neurology, Yaizu City Hospital, 1000 Dohara, Yaizu, Shizuoka 425-8505, Japan. Tel.: +81 54 623 3111; fax: +81 54 624 9103.

E-mail address: ryou.kuroda@hospital.yaizu.shizuoka.jp (R. Kuroda).

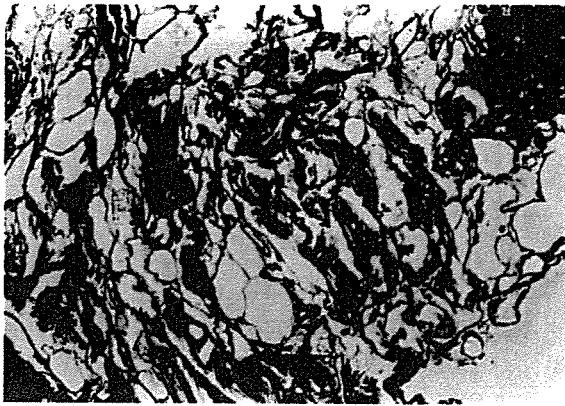


Fig. 1. Biopsy specimen of bone cyst. Dystrophic bone tissues characterized by the presence of alveolar membranous structures (HE, magnification $\times 200$).

mutations are identified in *DAP12* or *TREM2* [2]. They include a large deletion of exons 1 to 4 of *DAP12* identified in all Finnish patients and a population of Swedish and Norwegian patients [3], and one base deletion of 141G (141delG) in exon 3 of *DAP12* in several Japanese patients [4], and a single base substitution of G233A in exon 2 of *TREM2* in two Swedish families [5]. All affected individuals are homozygous for the disease-causing mutations.

In the present report, we describe the first case of NHD caused by compound heterozygosity for two different loss-of-function mutations, 141delG and G262T, in the *DAP12* gene.

2. Materials and methods

High molecular weight genomic DNA was extracted from 300 μ l of whole peripheral blood samples using the GenomicPreP blood DNA isolation kit (Amersham Bioscience). All five exons and 5' and 3' flanking regions of the *DAP12* gene (*TYROBP*; GenBank accession No. AF019563) were amplified by PCR using the primer sets specific for individual exons [3]. The purified PCR products were processed for direct sequencing by the dideoxynucleotide chain termination method on ABI PRIZM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). To verify the heterozygosity of the mutations, genomic DNA amplified by PCR using exon 3 sense and exon 4 antisense primers were cloned into pcDNA4/HisMax-TOPO vector (Invitrogen), followed by processing for sequencing analysis. Specific protein sequence motifs were surveyed by the database search on the Scansite Motif Scanner under the high stringent condition [7].

3. Case report and results of genetic analysis

3.1. Case report

A 34-year-old woman was admitted to the hospital because of progressive mental disturbance. She has no family history of recurrent bone fractures. Her parents were not consanguine-

ous. Her parents are in good health over age 70, while her paternal grandmother died of dementia at age 80. Until age 30, she experienced bone fractures of distal extremities 3 times following trivial accidents. At age 30, her husband noticed her memory disturbance and personality change characterized by emotional lability and irritability. At age 32, an X-ray examination showed multicystic lesions distributed bilaterally in distal ends of tibia and fibula. The bone biopsy specimen was compatible with lipomembranous osteodysplasia (Fig. 1).

On neurological examination, she was almost normal except for mild spastic gait and hyperactive deep-tendon reflexes in both upper and lower extremities. The Wechsler Adult Intelligence Scale-revisited (WAIS-R) score was 76 in total intelligence quotient (IQ). The Rivermead Behavioural Memory test (RBMT) suggested the presence of mild cognitive impairment. Brain MRI showed high intensity lesions in the bilateral periventricular white matter and internal capsule on T2-weighted and fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) images (Fig. 2a), while low intensity lesions indicative of ferritin storage were found in the bilateral basal ganglia and thalamus on T2-weighted and FLAIR images (Fig. 2b). An electroencephalogram (EEG) and somatosensory evoked potential (SEP) were interpreted as normal. The routine laboratory examination of blood was normal. The plasma very long chain fatty acid (VLFA) C26:0/C22:0 ratio (0.005) was normal. All of neurological and radiological observations described above supported a clinical diagnosis of NHD.

3.2. Identification of a novel heterozygous mutation in the *DAP12* gene

After written informed consent was obtained, peripheral blood was processed for genetic analysis. PCR and direct sequencing analysis of five exons and exon-intron boundaries of the *DAP12* gene identified two different mutations composed of a single base deletion of 141G (141delG) in exon 3 (Fig. 3a) and a single base substitution of G262T in exon 4

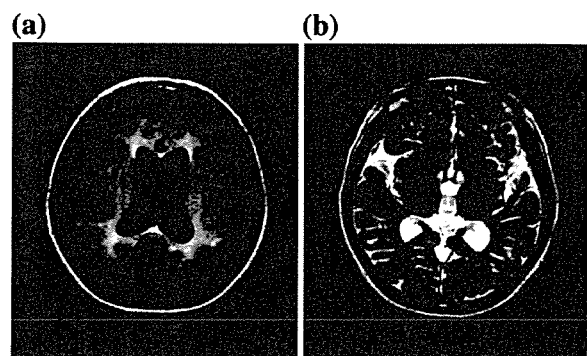


Fig. 2. Brain MRI. (a) High intensity lesions in the bilateral periventricular white matter on an axial FLAIR image (TR: 8000 ms, TE: 120 ms). (b) Low intensity lesions in the bilateral basal ganglia on an axial T2-weighted image (TR: 4000 ms, TE: 102 ms).

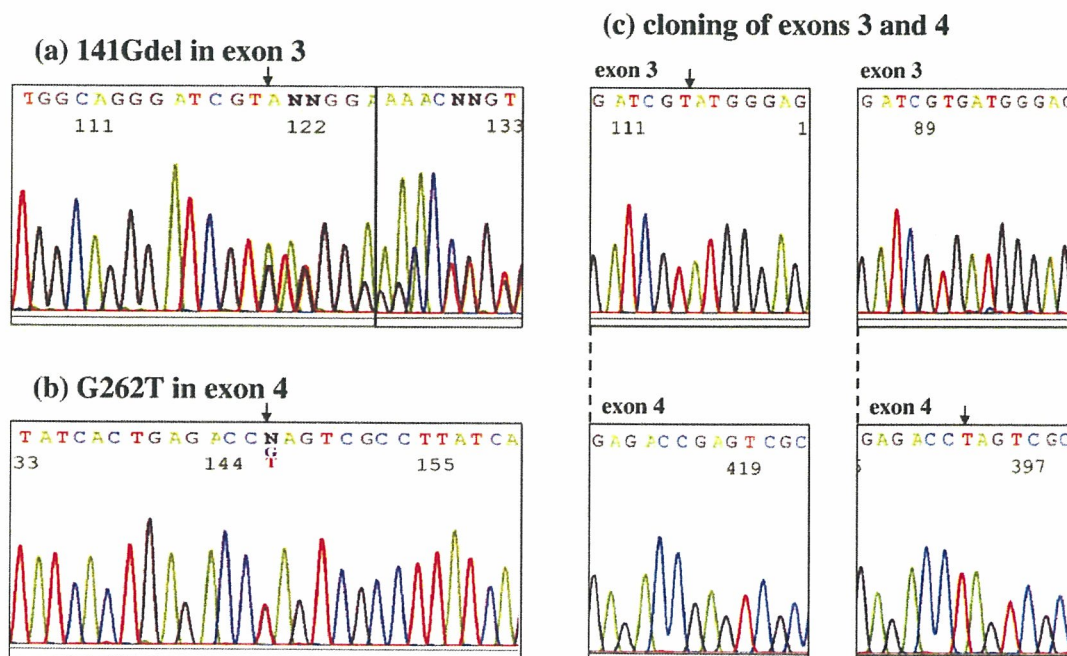


Fig. 3. Sequencing analysis of the *DAPI2* gene. All five exons and exon–intron boundaries of the *DAPI2* gene were amplified from genomic DNA by PCR. PCR products were processed for direct sequencing analysis (a, b) or were cloned in a vector, followed by processing for sequencing analysis (c). The panels represent (a) a single base deletion of 141G (141delG) in exon 3, (b) a single base substitution of G262T in exon 4, and (c) the heterozygosity of 141delG and G262T mutations verified by cloning of the segment spanning exons 3 and 4.

(Fig. 3b). The former caused a frameshift in the open reading frame (ORF), thereby causing premature termination of the polypeptide chain at amino acid residue 52 (Fig. 4c) [3,4]. The latter is a novel mutation which replaced glutamic acid (GAG) by a termination codon (TAG), resulting in premature termination of the polypeptide chain at amino acid residue 87 (Fig. 4b). The heterozygosity of two distinct mutations was verified by cloning and sequencing of PCR products of the segment spanning exons 3 and 4 (Fig. 3c). Protein sequence motif search on the Scansite Motif Scanner [7] showed that the G262T allele encodes a truncated DAPI2 protein which contains a DAPI10 membrane domain but no intracellular tyrosine-based activation motif (ITAM), while the 141delG

allele codes for a shorter polypeptide that has no structural domains (Fig. 4a–c). These results indicate that the patient is a compound heterozygote having two distinct mutations in separate alleles of the *DAPI2* ORF, both of which are nonfunctional.

4. Discussion

Here we reported a clinically typical NHD case caused by compound heterozygosity for two different mutations, 141delG and G262T, in the *DAPI2* gene (*TYROBP*). Our previous study identified two mutations 141delG and T2C in Japanese NHD patients [4]. The G262T mutation we

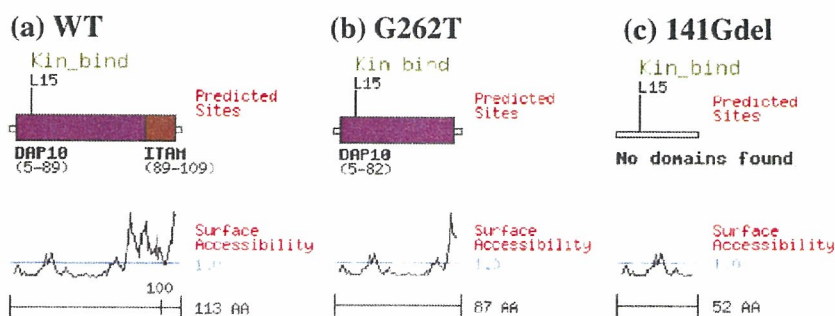


Fig. 4. Protein sequence motif analysis of two distinct *DAPI2* mutants. Protein sequence motifs were analyzed by the Scansite Motif Scanner. (a) the wild-type *DAPI2* protein, (b) the G262T mutant protein, and (c) the 141delG mutant protein. DAP10, ITAM, and “Kin_bind” represent a DAP10 membrane domain, an immunoreceptor tyrosine-based activation motif, and a consensus sequence for the mitogen-activated kinase (MAPK1) binding site, respectively. A plot of the surface accessibility shows residues that are likely to be near the protein surface and thus potentially bind to interacting proteins.

identified in the present study is the third one found in Japanese NHD patients.

Although various loss-of-function mutations were identified in NHD patients in the *DAP12* gene or the *TREM2* gene [2–5], the precise molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of NHD remain unknown. *DAP12*-deficient (*DAP12*^{-/-}) mice developed an increased bone mass (osteopetrosis), a reduction of myelin (hypomyelination) accentuated in the thalamus, and synaptic degeneration, suggesting that *DAP12* signaling is essential for development of osteoclasts and oligodendrocytes and synaptogenesis [8]. NK cell and DC function is impaired in knock-in mice having a nonfunctional *DAP12* ITAM motif (KΔY75) [9,10]. Differentiation of microglial cells is markedly inhibited and their function is altered in KΔY75 mice [11,12], suggesting a role of persistent microglial dysfunction in hypomyelination and aberrant synaptic plasticity in *DAP12*-deficient mice [13]. Importantly, differentiation of osteoclasts *in vitro* is delayed also in NHD patients, associated with a reduced bone resorption capability [14]. All of these observations suggest that the ITAM motif of *DAP12*, which is deleted in our patient with heterozygous mutations of 141delG and G262T, plays a pivotal role in signal transduction for development and differentiation of osteoclasts, oligodendrocytes, and microglia.

In addition to a great range of genetic heterogeneity, NHD clinically shows some phenotypic variability [1,2]. Bone fractures are diagnosed at the mean age of 27 years with a range of 18 to 33 years, while the mean age at onset of personality change is 33 years with a range of 25 to 40 years in NHD patients with homozygous mutations of the *DAP12* gene [1]. However, there exists no obvious difference in the clinical course between Japanese NHD patients homozygous for 141delG in *DAP12* [4] and a case of compound heterozygote we reported here, suggesting less importance of genetic variation but an involvement of as yet undefined nongenetic factors in development of phenotypic variability of NHD [2].

Acknowledgements

This work was in part supported by grants to J.-I.S and T.Y. from Research on Psychiatric and Neurological Diseases and Mental Health, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (H17-020), Research on Health Sciences Focusing on Drug Innovation, the Japan Health Sciences Foundation (KH21101), the Grant-in-Aid for Scientific Research, the Ministry of Education, Culture,

Sports, Science and Technology (B18300118), and the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), Japan.

References

- [1] Paloneva J, Autti T, Raininko R, Partanen J, Salonen O, Puranen M, et al. CNS manifestations of Nasu-Hakola disease. A frontal dementia with bone cysts. *Neurology* 2001;56:1552–8.
- [2] Klünemann HH, Ridha BH, Magy L, Wherrett JR, Hemelsoet DM, Keen RW, et al. The genetic causes of basal ganglia calcification, dementia, and bone cysts. *DAP12* and *TREM2*. *Neurology* 2005;64:1502–7.
- [3] Paloneva J, Kestilä M, Wu J, Salminen A, Böhring T, Ruotsalainen V, et al. Loss-of-function mutations in *TYROBP* (*DAP12*) result in a presenile dementia with bone cysts. *Nat Genet* 2000;25:357–61.
- [4] Kondo T, Takahashi K, Kohara N, Takahashi Y, Hayashi S, Takahashi H, et al. Heterogeneity of presenile dementia with bone cysts (Nasu-Hakola disease). Three genetic forms. *Neurology* 2002;59:1105–7.
- [5] Paloneva J, Manninen T, Christman G, Hovanec K, Mandelin J, Adolfsson R, et al. Mutations in two genes encoding different subunits of a receptor signaling complex result in an identical disease phenotype. *Am J Hum Genet* 2002;71:656–62.
- [6] Tomasello E, Vivier E. *KARAP/DAP12/TYROBP*: three names and a multiplicity of biological functions. *Eur J Immunol* 2005;35:1670–7.
- [7] Obenaus JC, Cantley LC, Yaffe MB. Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3635–41.
- [8] Kaifu T, Nakahara J, Inui M, Mishima K, Momiyama T, Kaji M, et al. Osteopetrosis and thalamic hypomyelination with synaptic degeneration in *DAP12*-deficient mice. *J Clin Invest* 2003;111:323–32.
- [9] Tomasello E, Desmoulin P-O, Chemin K, Guia S, Cremer H, Ortaldo J, et al. Combined natural killer cell and dendritic cell functional deficiency in *KARAP/DAP12* loss-of-function mutant mice. *Immunity* 2000;13:355–64.
- [10] Sjölin H, Tomasello E, Mousavi-Jazi M, Bartolazzi A, Kärre K, Vivier E, et al. Pivotal role of *KARAP/DAP12* adaptor molecule in the natural killer cell-mediated resistance to murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med* 2002;195:825–34.
- [11] Roumier A, Béchade C, Poncer J-C, Smalla K-H, Tomasello E, Vivier E, et al. Impaired synaptic function in the microglial *KARAP/DAP12*-deficient mouse. *J Neurosci* 2004;24:11421–8.
- [12] Nataf S, Anginot A, Vuillat C, Malaval L, Fodil N, Chereul E, et al. Brain and bone damage in *KARAP/DAP12* loss-of-function mice correlate with alterations in microglia and osteoclast lineages. *Am J Pathol* 2005;166:275–86.
- [13] Takahashi K, Rochford CD, Neumann H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J Exp Med* 2005;201:647–57.
- [14] Paloneva J, Mandelin J, Kiiäläinen A, Böhring T, Prudlo J, Hakola P, et al. *DAP12/TREM2* deficiency results in impaired osteoclast differentiation and osteoporotic features. *J Exp Med* 2003;198:669–75.

Search for

[Limits](#)
[Preview/Index](#)
[History](#)
[Clipboard](#)
[Details](#)

 Display Show Send to Hide: Sequence Lesser features

 Range: from to Reverse complemented strand Features:
[1: AB280795](#). [Reports](#) ...[gi:117307340]

[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS AB280795 47 bp DNA linear PRI 02-NOV-2006
 DEFINITION Homo sapiens TYROBP gene for TYRO protein tyrosine kinase binding protein, exon 4, partial sequence.
 ACCESSION AB280795
 VERSION AB280795.1 GI:117307340
 KEYWORDS .
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1
 AUTHORS Kuroda,R., Satoh,J., Yamamura,T., Anezaki,T., Terada,T., Yamazaki,K., Obi,T. and Mizoguchi,K.
 TITLE A novel compound heterozygous mutation in the DAP12 gene in a patient with Nasu-Hakola disease
 JOURNAL J. Neurol. Sci. (2006) In press
 REFERENCE 2 (bases 1 to 47)
 AUTHORS Satoh,J., Kuroda,R., Yamamura,T., Anezaki,T., Terada,T., Yamazaki,K., Obi,T. and Mizoguchi,K.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (31-OCT-2006) Jun-ichi Satoh, Meiji Pharmaceutical University, Department of Bioinformatics; 2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan (E-mail:satoj@my-pharm.ac.jp, Tel:81-42-495-8678, Fax:81-42-495-8678)
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..47
 /organism="Homo sapiens"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:9606"
 /chromosome="19"
 /map="19q13.1"
 gene <1..>47
 /gene="TYROBP"
 exon <1..>47
 /gene="TYROBP"
 /product="TYRO protein tyrosine kinase binding protein"
 /note="A 34-year-old Japanese woman showed clinical features characteristic of Nasu-Hakola disease (NHD), also designated polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy (PLOS). The genetic analysis of the DAP12 gene (TYROBP) identified two heterozygous mutations composed of a previously reported single base deletion of 141G (141delG) in exon 3 and a novel single base substitution of G262T in exon 4 which replaced glutamic acid (GAG) by a termination codon (TAG), resulting in premature termination of the polypeptide

chain at amino acid residue 87. Both mutations are located on separate alleles. This is the first case of NHD caused by compound heterozygosity for loss-of-function mutations in DAP12."

/number=4

variation

33

/gene="TYROBP"

/note="a novel single base substitution of G262T in exon 4"

/compare=AF019563.1

/replace="g"

ORIGIN

1 cagcgacccg gaaacagcgt atcactgaga cctagtcgcc ttatcag

//

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

Sep 27 2006 15:22:06

Search for

[Limits](#) [Preview/Index](#) [History](#) [Clipboard](#) [Details](#)

Display Show Send to Hide: Sequence Lesser features

Range: from to Reverse complemented strand Features:

[1: AB280796](#). [Reports ...\[gi:117307341\]](#)

[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS AB280796 134 bp DNA linear PRI 02-NOV-2006
 DEFINITION Homo sapiens TYROBP gene for TYRO protein tyrosine kinase binding protein, exon 3, partial sequence.

ACCESSION AB280796
 VERSION AB280796.1 GI:117307341

KEYWORDS .
 SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM [Homo sapiens](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1
 AUTHORS Kuroda,R., Satoh,J., Yamamura,T., Anezaki,T., Terada,T., Yamazaki,K., Obi,T. and Mizoguchi,K.
 TITLE A novel compound heterozygous mutation in the DAP12 gene in a patient with Nasu-Hakola disease

JOURNAL J. Neurol. Sci. (2006) In press
 REFERENCE 2 (bases 1 to 134)
 AUTHORS Satoh,J., Kuroda,R., Yamamura,T., Anezaki,T., Terada,T., Yamazaki,K., Obi,T. and Mizoguchi,K.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (31-OCT-2006) Jun-ichi Satoh, Meiji Pharmaceutical University, Department of Bioinformatics; 2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan (E-mail:satoj@my-pharm.ac.jp, Tel:81-42-495-8678, Fax:81-42-495-8678)

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..134
 /organism="Homo sapiens"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:9606"
 /chromosome="19"
 /map="19q13.1"
 gene <1..>134
 /gene="TYROBP"
 exon <1..>134
 /gene="TYROBP"
 /product="TYRO protein tyrosine kinase binding protein"
 /note="A 34-year-old woman showed clinical features characteristic of Nasu-Hakola disease (NHD), also designated polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy (PLOS). The genetic analysis of the DAP12 gene (TYROBP) identified two heterozygous mutations composed of a previously reported single base deletion of 141G (141delG) in exon 3 which caused a frameshift in the open reading frame (ORF), thereby causing premature termination of the polypeptide chain at amino acid residue 52, and a novel single base

substitution of G262T in exon 4. Both mutations are located on separate alleles. This is the first case of NHD caused by compound heterozygosity for loss-of-function mutations in DAP12."

/number=3

variation

46^47

/gene="TYROBP"

/note="single base deletion of 141G (141delG) in exon which caused a frameshift in the open reading frame (ORF), thereby causing premature termination of the polypeptide chain at amino acid residue 52"

/compare=AF019563.1

/replace="g"

ORIGIN

```
1 attgcagttg ctctacggtg agcccgggcg tgctggcagg gatcgtatgg gagacctggt
61 gctgacagtg ctcattgcc tggccgtgta cttcctgggc cggctggtcc ctcgggggcg
121 aggggctgcg gagg
```

//

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

Sep 27 2006 15:22:06