

disease. *Journal of the Neurological Sciences* 252: 88-91, 2007.

7. Onoue H, Satoh J, Ogawa M, Tabunoki H, Yamamura T: Detection of anti-Nogo receptor autoantibody in the serum of multiple sclerosis and controls. *Acta Neurologica Scandinavica* in press, 2007.
8. Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T, Arima K, Konno H. Human astrocytes express aquaporin-1 and aquaporin-4 in vitro and in vivo. *Neuropathology* in press, 2007.
9. 南里悠介、佐藤準一、佐藤和貴郎、山村隆：DNA マイクロアレイによる多発性硬化症の診断とインターフェロンベータ治療反応性予測に関するアンケート調査. *神経内科* 64: 319-320, 2006.
10. 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: 205-216, 2006
11. 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* 50: 582-599, 2006.
12. 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* 64: 1297-1309, 2006.

#### 書籍

13. Satoh J. Protein Microarray Analysis for Rapid Identification of 14-3-3 Protein Binding Partners. In *Functional Protein Microarrays in Drug Discovery*. Edited by Predki PF. CRC Press, Boca Raton, FL, 2007 (ISBN:

0849398096).

#### 2. 学会発表

##### 国際学会

1. Satoh J, Nanri Y, Doi Y, Yamamura T: Microarray analysis identifies CXCR3 and CCR2 ligand chemokines as immediate early IFNbeta-responsive genes in peripheral blood lymphocytes. 58th Annual Meeting of American Academy of Neurology. San Diego, 2006. 4.5. (*Neurology* 66, Suppl 2: A175, 2006).
2. Satoh J, Nanri Y, Yamamura T: Protein microarray analysis for rapid and systematic identification of 14-3-3 protein binding partners. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, 2006. 6.23. (Abstract 5P-B-224, 2006).
3. Satoh J: Human astrocytes express 14-3-3 sigma in response to oxidative and DNA-damaging stresses. Gordon Research Conference. Biology of 14-3-3 Proteins. Oxford, 2006. 8.28.
4. Satoh J, Tabunoki H: Microarray Analysis Characterizes Gene Regulation in Human Astrocytes Following DNA Damage. 7th International Conference on Systems Biology. Yokohama, 2006. 10.9. (MI03).
5. Satoh J: Nogo, Nogo receptor, and TROY expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. 8th International Congress of Neuroimmunology. International Symposium:

Alzheimer's disease, neurodegeneration and immunity. Nagoya, 2006.10.17. (Journal of Neuroimmunology 178: 21 IS03-05, 2006).

6. Satoh J: Microarray analysis clarifies the immunopathogenesis and therapeutic rationale for IFNB in MS. 8th International Congress of Neuroimmunology. Concurrent Symposium: Proteomics, transcriptomes and disease markers in MS. Nagoya, 2006.10.17.
7. Doi Y, Oki S, Satoh J, Aranami T, Miyake S, Yamamura T: NR4A2 (Nurr1), an orphan nuclear receptor, is overexpressed in peripheral blood T lymphocytes of multiple sclerosis. Workshop 14: Pathogenesis of MS. Nagoya, 2006.10.18. (Journal of Neuroimmunology 178: 78 WS14-02, 2006).
8. Satoh J, Tabunoki H, Nanri Y, Yamamura T, Arima K, Konno H: Both aquaporin-1 (AQP1) and aquaporin-4 (AQP4) are expressed in cultured human astrocytes and non-hypertrophic astrocytes in brains of multiple sclerosis. 8th International Congress of Neuroimmunology. Poster Session 11: MS-pathology and experimental models. Nagoya, 2006.10.17. (Journal of Neuroimmunology 178: 188 PP11-03, 2006).
9. Onoue H, Satoh J, Ogawa M, Yamamura T: Anti-Nogo receptor autoantibody in the serum of multiple sclerosis. 8th International Congress of Neuroimmunology. Poster Session 12: MS-immunological studies. Nagoya, 2006.10.17. (Journal of Neuroimmunology 178: 199 PP12-23, 2006).
10. Satoh J, Nanri Y, Sato W, Yamamura T: DNA microarray analysis identifies CXCR3 and CCR2 ligand chemokines as early

IFN-responsive genes in peripheral blood lymphocytes. 8th International Congress of Neuroimmunology. Poster Session 14: MS-therapy. Nagoya, 2006.10.17. (Journal of Neuroimmunology 178: 205 PP14-01, 2006).

11. Nanri Y, Satoh J, Sato W, Yamamura T: Questionnaire on the expediency of DNA microarray analysis for differential diagnosis of multiple sclerosis and prediction of therapeutic response to interferon-beta. 8th International Congress of Neuroimmunology. Poster Session 15: MS-clinical studies. Nagoya, 2006.10.17. (Journal of Neuroimmunology 178: 215 PP15-03, 2006).

#### 国内学会

1. 佐藤準一、南里悠介、土居芳充、山村隆：マイクロアレイによるインターフェロン応答遺伝子の網羅的解析。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 17 年度班会議。東京、2006. 1.25 (抄録集 p.40-41)。
2. 佐藤準一：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。厚生労働省こころの健康科学研究事業 研究成果発表会。東京、2006. 2.1 (抄録集 p.50-51)。
3. 佐藤準一：Proteomic approach for identification of 14-3-3 interacting proteins in the human CNS。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 17 年度全体班会議。東京、2006. 2. 3 (抄録集 p.156-157)。
4. 佐藤準一、南里悠介、土居芳充、山村隆：IFN $\beta$ 応答遺伝子群の網羅的解析：副作用との関連性。第 18 回日本神経免疫学会学術集

- 会. 名古屋, 2006. 3.2. (神経免疫学 14: 73, 2006).
5. 山村隆、佐藤準一、三宅幸子：多発性硬化症研究の最前線と治療戦略. 第79回日本薬理学会年会. シンポジウム S3B1 進行性神経疾患の研究の最前線および治療の現状と創薬への展望. 横浜, 2006. 3.10.
  6. 佐藤準一、南里悠介、土居芳充、山村隆：Protein microarray による 14-3-3 結合タンパク質の網羅的解析. 第47回日本神経学会総会. 東京, 2006. 5.12. (抄録集 199, 2006).
  7. 南里悠介、佐藤準一、土居芳充、山村隆：DNA microarray による MS 診断法・IFN $\beta$ 治療効果予測法開発に関するアンケート調査. 第47回日本神経学会総会. 東京, 2006. 5.13. (抄録集 285, 2006).
  8. 佐藤準一、南里悠介、山村隆、有馬邦正：ヒト中枢神経系における 14-3-3, Hsp60, PrPC 複合体形成. 第47回日本神経病理学会総会学術研究会. 岡山, 2006. 5.26. (Neuropathology 26: A43, 2006).
  9. 天竺桂弘子、佐藤準一、佐藤令一：カイコによる RNA 医薬の評価系の確立. 第7回 Pharmacology-Hematology Symposium. 東京, 2006. 6.30. (抄録集 23, 2006).
  10. 佐藤準一：T 細胞の DNA マイクロアレイ解析による多発性硬化症の病型分類とインターフェロンベータ治療反応性. 第15回明治薬科大学オープンリサーチセンターセミナー. 東京, 2006. 7.13.
  11. 佐藤準一：プリオン：その不思議な世界. 明治薬科大学オープンキャンパス 2006. 薬学ミニ講義. 東京, 2006. 7.29.
  12. 佐藤準一：ヒトアストロサイトの DNA 傷害に対する応答. 第4回明治薬科大学オープンカレッジ. 網羅的解析で得られた生体情報を読みこなす. 東京, 2006. 8.7.
  13. 佐藤準一：神経疾患病態形成における 14-3-3 の役割：多発性硬化症とプリオン病. 東京大学老年病科抗加齢医学教室第5回がんと神経セミナー. 東京, 2006. 11.14.
  14. 天竺桂弘子、陸玲玲、三澤多真子、佐藤準一：DNA マイクロアレイによる培養ヒトミクログリアにおけるインターフェロン応答遺伝子群の網羅的解析. 第5回ファーマ・バイオフォーラム. 東京, 2006. 12.9. (抄録集 p15, 2006).
  15. 三澤多真子、陸玲玲、庄司麻衣子、天竺桂弘子、佐藤準一：神経幹細胞でオーファン核内受容体 Nurr1 により発現誘導される遺伝子群のネットワーク解析. 第5回ファーマ・バイオフォーラム. 東京, 2006. 12.9. (抄録集 p16, 2006).
  16. 工藤晃太、三澤多真子、陸玲玲、天竺桂弘子、佐藤準一：KeyMolnet による統合失調症とうつ病の分子機序の比較解析. 第5回ファーマ・バイオフォーラム. 東京, 2006. 12.9. (抄録集 p16, 2006).
  17. Satoh J, Kawai M, Tabunoki H, Kanda T, Yamamura T：Microarray analysis identifies CXCR3 ligand chemokines as immediate early IFN-responsive genes in peripheral blood lymphocytes in vitro and in vivo. 第36回日本免疫学会総会学術集会 大阪, 2006. 12.11. (Proceedings of the Japanese Society for Immunology 36: 188, 2006).
  18. 佐藤準一、天竺桂弘子、三澤多真子：MS 再発寛解期の末梢血 T リンパ球で発現差異を呈する遺伝子群の分子ネットワーク解析. 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 18 年度班会議. 東京, 2006.12.15.

19. 佐藤準一：DNA マイクロアレイ診断. 厚生労働科学こころの健康科学研究推進事業. 第3回多発性硬化症フォーラム. 医療講演会・研究成果発表会. 東京、2006.12.16.

なし

3. その他：GenBank 登録

## 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).
- 3) 多発性硬化症再発予測法(特許申請中).

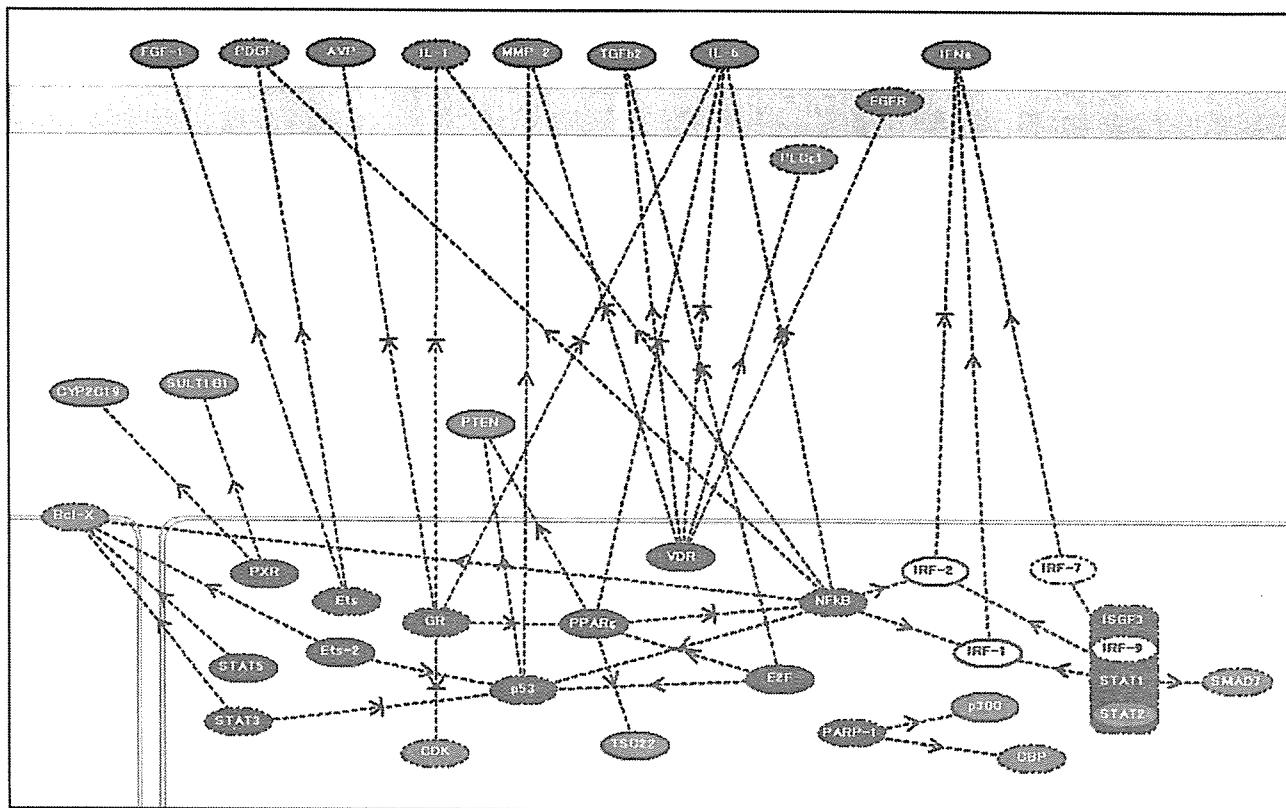
1) Satoh J, Kuroda R, Yamamura T, Anezaki T, Terada T, Yamazaki K, Obi T, Mizoguchi K: Homo sapiens TYROBP gene for TYRO protein tyrosine kinase binding protein, exon 3, partial sequence, DNA Data Bank of Japan, AB280796, 2006.

2) Satoh J, Kuroda R, Yamamura T, Anezaki T, Terada T, Yamazaki K, Obi T, Mizoguchi K: Homo sapiens TYROBP gene for TYRO protein tyrosine kinase binding protein, exon 4, partial sequence, DNA Data Bank of Japan, AB280795, 2006.

### 2. 実用新案登録

**Table 1. Forty-Three Differentially Expressed Genes in T Cells  
between Relapse and Remission of MS.**

Rank	Symbol	GenBank	P-value	Regulation	22	SULT1B1	NM_014465	0.0279	down
1	PPARG	NM_005037	0.000978	up	23	EP300	NM_001429	0.0286	down
2	RND3	NM_005168	0.00126	down	24	GJA4	NM_002060	0.0287	down
3	IL6	NM_000600	0.00197	down	25	PDGFB	NM_002608	0.0292	up
4	AKT2	NM_001626	0.00273	up	26	ARID4A	NM_002892	0.0305	down
5	DCC	NM_005215	0.0038	up	27	CYP2C19	NM_000769	0.0307	down
6	CREBBP	NM_004380	0.00605	down	28	FGF1	NM_000800	0.0317	down
7	ATF5	NM_012068	0.00699	down	29	MMP2	NM_004530	0.0327	up
8	PLCG1	NM_002660	0.00936	up	30	ARHGAP1	NM_004308	0.0335	down
9	CDK3	NM_001258	0.0101	up	31	TOP3B	NM_003935	0.0397	up
10	RIPK1	NM_003804	0.0115	up	32	SUB1	NM_006713	0.0433	down
11	TNFRSF4	NM_003326	0.0121	down	33	PRKCBP1	NM_183047	0.0434	down
12	ABCC9	NM_005691	0.014	down	34	TGFB2	NM_003238	0.0436	up
13	STAT2	NM_005419	0.0149	up	35	SMAD7	NM_005904	0.0437	down
14	PTEN	NM_000314	0.018	down	36	TCF4	NM_003199	0.044	down
15	AVP	NM_000490	0.0182	up	37	NOS1	NM_000620	0.0442	down
16	FADD	NM_003824	0.0193	up	38	TSC22D1	NM_183422	0.0454	down
17	ELF2	NM_006874	0.021	down	39	GNB1L	NM_053004	0.0457	down
18	NFKB2	NM_002502	0.0211	up	40	IFNA8	NM_002170	0.046	down
19	ERBB4	NM_005235	0.0218	down	41	IL1A	NM_000575	0.0477	up
20	BCL2L1	NM_001191	0.0253	up	42	CD3D	NM_000732	0.0492	up
21	BTRC	NM_003939	0.0265	up	43	IL1R1	NM_000877	0.0495	down



**Fig. 1.** Subcellular location of the molecules linked to differentially expressed genes in T cells between relapse and remission of MS. The molecular network generated by the “common upstream” search of 43 MS relapse-specific genes (RSGs; Table 1) was arranged by using the editing function of KeyMolnet with respect to subcellular location of molecules. Red nodes represent starting point molecules, whereas blue nodes represent common upstream molecules. Purple nodes express characteristics of both starting point and common upstream molecules. The direction of molecular relation is indicated by dash line with arrow (transcriptional activation) or dash line with arrow and stop (transcriptional repression).

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

「多発性硬化症における Nurr1 の関与」に関する研究

分担研究者 三宅 幸子 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部室長

**研究要旨**

これまで、多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)患者末梢血中の T 細胞において健常人と比較して上昇している分子群を DNA マイクロアレイを用いて同定し報告してきた。今回は、その中で健常人との差における p 値が最も低い分子 Nurr1 に注目し、その機能を解析した。MS 患者末梢血での上昇がみられた Nurr1 は、EAE においては CNS 浸潤 T 細胞に特異的に発現が誘導されていた。T 細胞株を用いてリポーターアッセイを行うと、Nurr1 を過剰発現させると IL-17,IFN- $\gamma$ ,IL-2 いずれのサイトカインの産生も増強した。ヒト CD4 T 細胞に、Nurr1 の siRNA を導入してその機能を抑制すると、抗 CD3 抗体刺激により産生される IL-17,IFN- $\gamma$ ,IL-2 いずれのサイトカインの産生も低下した。

**A. 研究目的**

これまで、多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)患者末梢血中の T 細胞において健常人と比較して上昇している分子群を DNA マイクロアレイを用いて同定し、報告してきた。今回は、その中で健常人との差における p 値が最も低い分子 Nurr1 に注目した。Nurr1 は、Steroid thyroid receptor superfamily に属するオーファンリセプターで、T 細胞受容体刺激や炎症性サイトカインなどによって発現が誘導される。今回我々は、T細胞における Nurr1 の機能解析を行った。

**B. 研究方法**

DNA マイクロアレイの結果を検証するため、MS 末梢血 T 細胞と健常人末梢血 T 細胞における Nurr1 の発現を real-time PCR 法を用いて検討した。実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE) は、C57/BL6 マウスに MOG<sub>35-55</sub> ペプチドを用いてを誘導した。

脳脊髄(CNS)浸潤細胞、リンパ節細胞、脾臓細胞を採取し、それぞれから T 細胞を分離し real-time PCR を用いて Nurr1 の発現レベルを比較した。CNS 浸潤 T 細胞からのサイトカイン産生を ELISA 法ならびに細胞内 IL-17 染色法を用いて調べた。Nurr1 を過剰発現させ、T 細胞株を用いて IL-17,IFN- $\gamma$ ,IL-2 のリポーターアッセイを行った。ヒト CD4 T 細胞に、Nurr1 の siRNA を導入し、抗 CD3 抗体刺激により産生されるサイトカインを ELISA 法にて測定した。

(倫理面への配慮)

採血に当たっては、ドナーに対して十分な説明を行った後、書面により同意を確認して行った。また個人情報保護についても十分な配慮を払った。動物実験に関しては、当研究所の動物実験規定に従い、実験計画書の承認を受けて行った。

**C. 研究結果**

まず、DNA マイクロアレイの結果を検証するた

め、MS 末梢血 T 細胞と健常人末梢血 T 細胞における Nurr1 の発現を real-time PCR 法を用いて検討し、MS で有意に上昇していることを確認した。次に、C57/BL6 マウスに MOG<sub>35-55</sub> ペプチドを用いて EAE を誘導し、脳脊髄(CNS)浸潤細胞、リンパ節細胞、脾臓細胞を採取し、それぞれから T 細胞を分離し real-time PCR を用いて Nurr1 の発現レベルを比較すると、CNS 浸潤 T 細胞において特異的に上昇していた。CNS 浸潤 T 細胞からのサイトカイン産生を調べると、細胞内染色法による検討では、IL-17 産生細胞が優位であった。IL-17 は EAE 発症に重要なサイトカインであることから、Nurr1 の IL-17 産生に与える影響について検討した。T 細胞株を用いてリポーターアッセイを行うと、Nurr1 を過剰発現させると IL-17,IFN- $\gamma$ ,IL-2 いずれのサイトカインの産生も増強した。マウス CD4 T 細胞に、Nurr1 の siRNA を導入してその機能を抑制すると、抗 CD3 抗体刺激により産生される IL-17,IFN- $\gamma$ ,IL-2 いずれのサイトカインの産生も低下した。TNF- $\alpha$ の産生は影響を受けなかった。

#### D. 考察

MS 患者末梢血での上昇がみられた Nurr1 は、EAE においては CNS 浸潤 T 細胞に特異的に発現が誘導されていた。Nurr1 発現細胞が CNS に特異的に浸潤するのか、CNS 局所において Nurr1 の発現が誘導されるかについては、今後の検討が必要である。また、Nurr1 の EAE への病態に与える影響は、今後 siRNA などを用いて検討していく予定である。

#### E. 結論

MS 患者における選択的な Nurr1 発現亢進と、T 細

胞の IL-17 産生制御能から、Nurr1 が MS をはじめとする種々の自己免疫疾患の新規治療標的分子となりうる可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### I 論文発表

原著

- 1) Pyz E, Naidenko O, Miyake S, Yamamura T, Berberich I, Cardell S, Kronenberg M, Herrmann T. The complementarity determining region 2 of BV8S2 (V beta 8.2) contributes to antigen recognition by rat invariant NKT cell TCR. **J.Immunol.** 176(12): 7447-55, 2006
- 2) Miyamoto K, Miyake S, Mizuno M, Oka N, Kusunoki S and Yamamura T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2 independent pathway. **Brain** 129: 1984-92, 2006
- 3) Croxford JL, Miyake S, Huang Y-Y, Shimamura M and Yamamura T. Invariant V $\alpha$ 19J $\alpha$ 33 T cells inhibit autoimmune inflammation. **Nat.Immunol.** 7(9):987-94, 2006
- 4) Aranami T, Miyake S and Yamamura T. Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. **J.Immunol.** 177(8): 5659-67, 2006
- 5) Satoh J-i, Nakanishi M, Koike F, Onoue H,



Aranami T, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura k, Yokoyama K, Ota K, Saito T, Ohta M, Miyake S, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T. **J.Neuroimmunol.** 174(1): 108-18, 2006

#### 総説

- 1) 三宅幸子 : iNKT 細胞 : 多彩な機能と病態への関与について **臨床免疫** 29 (1) : 27-36, 2006
- 2) 三宅幸子 : NKT 細胞 **分子リウマチ** 3 (3) : 26-33, 2006
- 3) 三宅幸子 : 多発性硬化症における免疫制御細胞の役割とその賦活法 **多発性硬化症研究・治療の現状 2006** 50 (4) : 636-643, 2006

#### II 学会発表

##### 国際学会

- 1) Sakuishi K, Aranami S, Miyake S, Yamamura T. IL-2 costimulates IL-5 production by CD1d-reactive human CD4+ NKT cells: a novel pathway controlling NKT cell-mediated Th2 response. . Annual meeting of the American association of immunologists, Boston, May 14, 2006
- 2) Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. New synthetic glycolipid ligands for NKT-cells suppresses antibody-induced arthritis. 6<sup>th</sup> Annual Conference of FOCIS, San Francisco, June 2, 2006
- 3) Doi Y, Oki S, Satoh J-I, Aranami T, Miyake S, Yamamura T. NR4A2(Nurr1), an orphan nuclear receptor, is overexpressed in peripheral blood T lymphocytes of multiple sclerosis. The 8<sup>th</sup> International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 178 S1,p78, 2006)
- 4) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T. Invariant V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulated inflammation in a model of multiple sclerosis. The 8<sup>th</sup> International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 85 S1,p85, 2006)
- 5) Aranami T, Miyake S, Yamamura T. CD11c on NK cells mirrors the disease activity of multiple sclerosis. The 8<sup>th</sup> International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 178 S1,p102, 2006)
- 6) Miyamoto K, Miyake S, Kusunoki S, Yamamura T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2 independent pathway. The 8<sup>th</sup> International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 117 S1,p117, 2006)
- 7) Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T. Control of IL-5 production in CD1d-reactive human CD4+ NKT cell clones from MS patients following exogenous IL-2 co-stimulation. The 8<sup>th</sup> International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 147 S1,p102, 2006)
- 8) Oki S, Yamamura T, Miyake S. Natural killer T cell ligand OCH as a potential therapeutics for multiple sclerosis: Mechanism for OCH-induced TH2 polarization in vivo. The 8<sup>th</sup> International

Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 148 S1,p102, 2006)

9) Lin Y, Miyake S, Yamamura T. Induction of adaptive regulatory T cells during recovery of EAE sensitized with PLP136-150 in SJL/J mice: The presence of suppressor epitope within PLP. The 8<sup>th</sup> International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 151 S1,p102, 2006)

10) Nagayama S, Miyake S, Yamamura T. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of lymphokine-activated natural killer (NK) cells. The 8<sup>th</sup> International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 169 S1,p102, 2006)

11) Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. Activation of natural killer T cells with synthetic glycolipid suppresses antibody-induced arthritis. American College of Rheumatology 70<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, Washington, DC, November 13, 2006 (Arthritis Rheum. 54:S358, 2006)

#### 国内学会

1) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T: Invariant V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulate inflammation in a model of multiple sclerosis. 第 18 回日本神経免疫学会学術集会、名古屋、3 月 2 日、2006

2) 海江田信二郎、大木伸司、山村隆、三宅幸子 :

NKT 細胞活性制御作用を介した新規合成等脂質によるマウスモデル関節炎の抑制 第 50 回日本リウマチ学会、長崎、4 月 24 日、2006

3) 大塚敬男、三宅幸子、林幼偉、山村隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における Neuropeptide Y (NPY) の役割 第 47 回日本神経学会、東京、5 月 13 日、2006

4) 作石かおり、三宅幸子、山村隆：IL-2 を介した CD4 陽性 NKT 細胞クローンにおける Th2 サイトカインの選択的産生 第 36 回日本免疫学会、大阪、12 月 11-13 日、2006

5) Lin Y, Croxford L, Miyake S, Yamamura T. Induction of adaptive regulatory T cells expressing CD103 besides CD25 and Foxp3 during recovery of EAE. The presence of suppressor epitope within encephalitogenic peptide. 第 36 回日本免疫学会、大阪、12 月 11-13 日、2006

6) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T. Invariant V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulated inflammation in a model of multiple sclerosis. 第 36 回日本免疫学会、大阪、12 月 11-13 日、2006

7) Doi Y, Oki S, Miyake S, Yamamura T. Functional analysis of NR4A2, an orphan nuclear receptor, on the development of autoimmune encephalomyelitis. 第 36 回日本免疫学会、大阪、12 月 11-13 日、2006

8) Fujita M, Ootsuka T, Oki S, Mizuno M, Tomi C, Kaieda S, Miyake S, Yamamura T. Role of carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 in experimental autoimmune

encephalomyelitis. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006

9) Tsukamoto K, Lin Q, Ohtsuji M, Nakamura K, Tsurui H, Miyake S, Yamamura T, Hirose S. Role of NKT cells in systemic lupus erythematosus. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006

10) 海江田信二郎、水野美歩、大木伸司、坂口志文、坂口敦子、山村隆、三宅幸子：SSKGマウスにおける結核死菌投与による関節炎の誘導：第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

#### 1) 発明の名称

IL-17産生抑制物質およびそのスクリーニング方法

発明者：大木伸司、三宅幸子、山村 隆 他一名  
出願予定日：2007年2月28日

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団  
出願番号または公開番号：出願準備中のためなし

#### 2) 発明の名称

IL-17に起因する炎症を改善するための医薬組成物

発明者：大木伸司、三宅幸子、山村 隆 他一名  
出願予定日：2007年2月28日

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団  
出願番号または公開番号：出願準備中のためなし

### 2. 実用新案登録 なし

### 3. その他 なし

インターフェロン・ベータ 1b 療法中止後の多発性硬化症治療について

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疾病研究第六部部长

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) 療法をなんらかの理由で中止した例にその後どのような治療がおこなわれているか検討した。当院受診中の MS 患者のうち IFN- $\beta$ -1b 療法を導入された 72 例から、その後中止された 15 例を抽出し後ろ向きに調査をおこなった。中止理由は、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あるいは再発回数の増加 4 例、瘻性の増悪 1 例、網膜静脈閉塞症 1 例、肝機能障害 1 例、皮膚潰瘍 2 例、全身の倦怠感 1 例、精神症状 2 例、無効と主治医が判断して中止した 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。IFN- $\beta$ -1b 中止に再発部位の変化をみた症例はいずれも中止によりほぼ元の病型に戻り、導入後比較的重度の再発あるいは再発回数の増加をみた例は中止後比較的落ち着いた。精神症状により中止した例も改善をみた。中止後、5 例は再発時のステロイドパルス療法のみで加療された。他の例では重複を含み免疫抑制剤 6 例、血漿吸着・交換 3 例、少量経口ステロイド継続投与 4 例、定期的ステロイドパルス 1 例、免疫グロブリン大量静注療法 2 例で加療されていた。経口ステロイドが再発頻度の低下に著効を示したと思われる 2 例があった。血症吸着・交換は症状の一定の症状改善をみたが再発予防の効果は判断困難であった。IFN- $\beta$ -1b が使用できない例についてどのような再発予防治療をすべきか何らかの指標をたてる必要があると思われた。

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。これまでに我々は IFN- $\beta$ -1b 療法による副作用、特に導入により再発回数が増加する例や再発部位が変化する例を報告した。さらに中止例の予後についても検討してきた。今回は、IFN- $\beta$ -1b 療法をなんらかの理由で中止された例がその後どのような治療をうけ、どのように経過しているかを検討した。

B. 研究方法

当院で受診中の MS 患者のうち IFN- $\beta$ -1b 療法を一度でも導入されたことのある 72 例について後ろ向きに病歴調査をおこない IFN- $\beta$ -1b 療法を導入後中止された例を抽出した。それらの中止例について、IFN- $\beta$ -1b 療法中止後にうけた治療内容と経過を調

査し検討した。

C. 研究結果

IFN- $\beta$ -1b 療法導入された MS 72 例中、15 例で中止されていた。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あるいは再発回数の増加 4 例、瘻性の増悪 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、精神症状さらに副作用はなかったが、挙児希望で 2 例中止して 2 例、無効と主治医が判断して中止 1 例。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や重度の再発、再発回数の増加をみた例では IFN- $\beta$ -1b 療法中止後、症状は改善あるいはもとの病型に戻っていた。精神症状悪化例でも中止により改善した。

IFN- $\beta$ -1b 療法中止後に再発をした例もみられたが明らかに中止前より再発頻度が増えたと思われる

例はなかった。ただし今回の検討対象ではないが、自己判断で一時的に中止した2週間後に右上肢の麻痺を来たした例がありこの例については中止と再発の因果関係を否定できない。

IFN- $\beta$ -1b療法中止後の治療は、5例で再発時のステロイドパルス療法のみで新たな治療は追加されていないなかった。残りの例では重複を含み、経口免疫抑制剤6例、血漿吸着・交換療法3例、ステロイド少量経口継続投与4例、再発の有無に関わらない定期的なステロイドパルス療法1例、免疫グロブリン大量静注療法2例の治療を受けていた。このなかで、ステロイド少量経口投与が再発抑制に著効を示したと思われる症例が2名あった。血漿吸着・交換療法は一定の症状の改善は認めたが再発予防についての有効性は判断が困難であった。経口免疫抑制剤、定期的なステロイドパルス療法、免疫グロブリン大量静注療法は少なくとも著効を示した例はなかった。

なおIFN- $\beta$ -1b注射部位の難治性皮膚潰瘍には血漿交換・吸着療法が著効を示した。

#### D. 考察

IFN- $\beta$ -1b療法は再発予防に有効な治療であるが副作用や無効例があることも間違いなく一部の症例ではIFN- $\beta$ -1b療法を中止せざるをえない。中止によりMSの症状そのものの悪化や再発回数の増加がありえるのか、また中止後にどのような治療を選択すべきかが大きな問題になる。

今回の検討では、自己判断で中止した1例でのみ中止2週後に右上肢麻痺を来たしたがそれ以外では中止後に特に再発頻度の増加や症状が悪化した例は認めなかった。自己判断中止例は突然に中止されており、その他の例では漸減・中止されていることと関連があるかもしれない。IFN- $\beta$ -1b療法導入によりさらに症状が悪化した例では一般に中止により症状の改善を認めており症例によっては早期に中止の判断をすることが肝要である。

IFN- $\beta$ -1b中止後の治療では症例により様々な治療法が選択されていた。保険適応のある再発抑制治

療はわが国では現在、IFN- $\beta$ -1b及びIFN- $\beta$ -1aしかないため決定的な手段はないともいえる。このなかで従来あまり効果をみとめられてなかった経口少量のステロイド投与があきらかに効果を示した例が2例あった。症例の蓄積により少量ステロイド投与が本当に有効であるのか？あるいはどのような症例に有効性があるのかを検討する必要がある。

現時点ではIFN- $\beta$ -1b中止後の治療に確立した手段はなくカットアンドトライにより選択していくしかないと思われる。

#### E. 結論

IFN- $\beta$ -1bが使用できない症例、中止した症例に対してどのような治療法を選択すべきかなんらかの指標をたてる必要があると思われる。

#### 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

分担研究報告書

温度感受性 SV40 ラージ T 抗原を用いた新たな

ヒト *in vitro* BBB model の確立

分担研究者 神田 隆 山口大学大学院医学研究科脳神経病態学神経内科学分野  
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,  
鈴木倫保 同脳神経病態学脳神経外科学分野  
寺崎哲也 東北大学大学院薬学研究科薬物送達学分野

研究要旨

【目的】多発性硬化症では血液脳関門(BBB)の破綻が認められる。BBB 破綻の修復という新たな治療法を開発するためには、BBB の首座である脳微小血管内皮細胞を用いた細胞学的かつ分子生物学的なアプローチは欠かせない。in vivo の性質を保持した優れたヒト *in vitro* BBB モデルを樹立することが本研究の目的である。【方法】定法にてヒト脳微小血管内皮細胞(HBMECs)の一次培養を行い、温度感受性 SV40 ラージ T 抗原をレトロウイルスにて導入した。内皮細胞群を cloning し、characterization を行った。【結果】得られた内皮細胞群はほぼ 100%の純度であり、occludin, claudin-5, ZO-1, ZO-2 などの密着結合分子や GLUT-1, p-gp などの transporter を発現していた。電気抵抗および透過性の検証ではバリアー機能を有することが示された。33℃では 37℃に比し増殖が有意に速かった。【結論】ヒト脳微小血管内皮細胞由来条件的不死化細胞株の樹立に成功した。樹立した内皮細胞群は温度感受性を示すと同時にバリアー構成内皮としての性質をよく保持していた。

A. 研究目的

難治性自己免疫性脳疾患である多発性硬化症 (MS)においては、末梢血に存在する活性化 T リンパ球や monocyte が血液脳関門(BBB)を乗り越えて脳内へ侵入することが病態における重要なステップであると考えられている。逆に、このステップを阻止できれば、MS の発症や病態の増悪を阻止でき、有用な治療法とな

る可能性がある。この目的達成のためには、末梢血白血球と BBB 構成内皮細胞との相互作用の解明が必要であるが、すぐれた *in vitro* BBB モデルが存在すれば、この目標への近道となりうる。近年、*in vitro* BBB model のひとつとして温度感受性 SV40 ラージ T 抗原トランスジェニックラット由来の脳毛細血管由来内皮細胞株(TR-BBB)が確立された (Hosoya

et al. 2000). この TR-BBB では *in vivo* の BBB で発現している GLUT-1 や CRT といった influx transporter や p-gp, ABCG2 などの efflux transporter の発現が確認されている。ところが、BBB における tight junction において重要な働きを担っていると考えられている claudin-5 の発現が不十分であり、十分なバリアー機能を持たないと最近報告された (Ohtsuki S et al. 2007)。一方、これまでヒトの脳毛細血管内皮細胞株を用いた *in vitro* の実験系の報告は散見されるが、これらの内皮細胞はその characterization や purity の検証が十分とは言えず、*in vivo* の BBB の性質を保持したヒト *in vitro* BBB モデルの樹立が待たれていた。

今回、われわれは、上記の諸問題を克服すべく、ヒト脳毛細血管内皮細胞由来の新たな *in vitro* BBB モデル作成を試みた。

## B. 研究方法

材料としてインフォームドコンセントが得られた脳腫瘍患者から摘出された正常大脳皮質の一部を用いた。定法 (Kanda et al. 1994) にて脳微小血管を分離し、酵素処理ののち、type I-collagen coated dish に播種した。播種して一週間後、増殖中の細胞群に温度感受性 SV40 ラージ T 抗原を組み込んだレトロウイルスを感染させた。

以後、内皮細胞の増殖とともに、ペリサイトや線維芽細胞などの非内皮細胞も次第に増殖してきたため、物理的に剥離除去した。その一方で、cloning cup を用いて純粋な内皮細胞のみが存在すると考えられる箇所を pick up し、継代を行った。3 回の継代により、ほぼ 100% の内皮細胞群を得た。分離された内皮細胞クローンが BBB モデルとして適切かど

うかの characterization と、実際に温度感受性を有する株であるかどうかの検証を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は山口大学の倫理委員会において承認を受けた。研究については患者本人へ十分に説明を行い、文書で同意を得ている。個人の情報は決して表に出ることがないように細心の注意を払い、プライバシーの保護には十分に配慮した。

## C. 研究結果

得られた内皮細胞群はバリアー構成内皮の特徴である spindle fiber shaped morphology を呈していた。位相差顕微鏡像および DiI-Ac-LDL の取り込み確認実験から、ほぼ 100% の内皮細胞集団であることが示された。得られた内皮細胞クローンはバリアー構成遺伝子である occludin, claudin-5, ZO-1, ZO-2 を発現していた。また GLUT-1, p-gp をはじめとする transporter も発現していた。加えて、Transendothelial resistance (TEER) の測定および、<sup>14</sup>C-inulin を用いた内皮細胞 monolayer における透過性の検証にてバリアー機能を有することが示された。さらに 33°C の培養温度条件下では 37°C に比し増殖が有意に速く、かつ数回の継代後も同様の増殖を示し、条件的不死化株の性質を有する細胞株であることが示された。

## D. 考察

従来 of ヒト *in vitro* BBB model を構成する不死化脳毛細血管内皮細胞は、形態学的にも生物学的にも腫瘍としての属性が大きく残存するものであった。今回われわれが樹立した *in vitro* BBB モデルは条件的不死化細胞としての特性を示し、37°C の培養下では増殖が数

日で停止し、腫瘍としての性質が失われ生理的な内皮細胞にもどることが示唆された。TR-BBB 細胞では極度に抑制されていた claudin-5 の発現も本細胞では保持されており、機能的にも高いバリアー機構を有していた。さらに transporter も発現していることより、非常に生理的条件化の BBB 構成血管内皮細胞に近い細胞群であると考えられた。このあらたなヒト *in vitro* BBB model は、多発性硬化症などの難治性神経疾患の新たな治療法開発に大いに役立つツールになると思われた。

#### E. 結論

ヒト脳微小血管内皮細胞由来条件的不死化細胞株の樹立に成功した。樹立した内皮細胞群は温度感受性を示すと同時にバリアー構成内皮としての性質をよく保持していた。この *in vitro* BBB model は BBB の生理機能の解明のみならず、MS をはじめとする難治性脳疾患の病態解明・治療法開発に有用なツールとなりうると考えられた。

#### 【参考文献】

- 1) 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
- 2) Exogenous expression of claudin-5 induces barrier properties in cultured rat brain capillary endothelial cells. Ohtsuki S, Sato S, Yamaguchi H, Kamoi M, Asashima T, Terasaki T. *J Cell Physiol*. 2006 Sep 22;210(1):81-86

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

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

Jun-ichi Sato, Megumi Nakanishi, Fumiko Koike, Hiroyuki Onoue, Toshimasa Aranami, Toshiyuki Yamamoto, Mitsuru Kawai, Seiji Kikuchi, Kyouichi Nomura, Kazumasa Yokoyama, Kohei Ota, Toshiro Saito, Masayuki Ohta, Sachiko Miyake, Takashi Kanda, Toshiyuki Fukazawa, Takashi Yamamura: T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 174: 108-118, 2006.

Hiroaki Yokote, Yuki Saitou, Takashi Kanda, Hidehiro Mizusawa: Pure pandysautonomia associated with interferon-alpha therapy. *J Neurol* in press.



小笠原淳一、神田 隆：悪性腫瘍に関連した神経障害：末梢神経障害。Clinical Neuroscience 24: 76-78, 2006.

神田 隆：神経生検の取り扱い。病理と臨床 24: 1156-1159, 2006.

神田 隆：末梢性ニューロパチー、軸索再生、血液神経関門。末梢神経 17: 153-159, 2006.

神田 隆：悪性腫瘍の遠隔効果による神経障害。山口 徹、北原光夫、福井次矢総編集、今日の治療指針 2006、pp676-677, 2006.

神田 隆：膠原病に伴うニューロパチーの治療法は皆同じか。岡本幸市、棚橋紀夫、水澤英洋編集、EBM 神経疾患の治療、pp376-379, 2006, 中外医学社.

神田 隆：神経筋疾患の血液浄化療法。山口 徹、北原光夫、福井次矢総編集、今日の治療指針 2007、pp612-613, 2007.

## 2. 学会発表

中山寛人、川井元晴、根来 清、神田 隆、中山尚登、加藤祥一、鈴木倫保：有痛性眼筋麻痺にて発症し典型的 3 主徴の存在しない内頸動脈海綿静脈洞瘻の 61 歳女性例。第 23 回山口県脳血管障害研究会、宇部、2006. 2

清水文崇、川井元晴、根来 清、神田 隆、原 浩貴、宮内裕爾、山下裕司：発症初期より睡眠時無呼吸症候群を合併し、睡眠時行動異常が疑われた多系統萎縮症 (MSA-C) の 56 歳男性例。第 5 回山口県睡眠障害研究会。山口、2006. 2.

安部真彰、小笠原淳一、根来 清、神田 隆：肋間神経障害が疑われたサルコイドーシスの 25 歳女性例。第 38 回山口県神経内科医会。山口、2006. 2.

石井文彩、中山寛人、川井元晴、根来 清、神田 隆：関節リウマチと診断されていた関節症

合併 HTLV-I 関連脊髄症の 48 歳女性例。第 9 回山口臨床ウイルス研究会。宇部、2006. 3.

安部真彰、小笠原淳一、川井元晴、根来 清、神田 隆：臨床的に肋間神経障害が疑われ MRI にて上位胸髄病変が描出されたサルコイドーシスの 25 歳女性例。第 3 回山口県臨床神経フォーラム。宇部、2006. 3.

前田敏彦、安部真彰、小笠原淳一、川井元晴、根来 清、神田 隆：MRI T2 強調画像にて側頭葉・脳幹部・脊髄全般に高信号域がみられ、髄液 IgG 高値であった脳脊髄症の 55 歳男性例。第 3 回山口県臨床神経フォーラム。宇部、2006. 3.

中山寛人、前田敏彦、佐野泰照、小笠原淳一、川井元晴、根来 清、神田 隆：MRA で異常血管の存在が疑われ血管造影では確認できなかった AVF 疑いの 2 症例。第 3 回山口県臨床神経フォーラム。宇部、2006. 3.

平田加寿子、山下裕司、川井元晴、神田 隆、小早川達、斉藤幸子、出口雄一：スティック型嗅覚検査による認知症の評価について。第 7 回山口県認知症研究会。山口、2006. 3.

尾本雅俊、小笠原淳一、川井元晴、根来 清、神田 隆：第 47 回日本神経学会総会。東京、2006. 5.

木山真紀子、川井元晴、根来 清、生田尚美、神田 隆：筋萎縮性側索硬化症の宇部、山陽小野田市における近年の動向。第 47 回日本神経学会総会。東京、2006. 5.

中山寛人、根来 清、小笠原淳一、川井元晴、神田 隆：当科における脳深部刺激療法非適応患者の特徴について。第 47 回日本神経学会総会。東京、2006. 5.

安部真彰、小笠原淳一、根来 清、神田 隆：silent period を指標としたミラーセラピーの訓練効果発現機序に関する検討。第 47 回日

- 本神経学会総会. 東京, 2006. 5.
- 前田敏彦, 小笠原淳一, 川井元晴, 根来 清, 神田 隆: 筋萎縮性側索硬化症における傍脊柱筋萎縮と呼吸機能との関係. 第 47 回日本神経学会総会. 東京, 2006. 5.
- 清水文崇, 川井元晴, 小笠原淳一, 根来 清, 神田 隆: 痴呆を伴う運動ニューロン疾患 9 例の臨床的検討. 第 47 回日本神経学会総会. 東京, 2006. 5.
- 中山寛人, 川井元晴, 佐野泰照, 根来 清, 神田 隆: 下肢痙性及び凹足を呈したドーパ反応性パーキンソニズムの 53 歳 男性例. 第 2 回山口県錐体外路疾患研究会. 山口, 2006. 4.
- 藤井正美, 野村貞宏, 井本浩哉, 田中信宏, 末廣栄一, 梶原浩司, 藤澤博亮, 加藤祥一, 鈴木倫保, 三隅俊吾, 小笠原淳一, 川井元晴, 根来 清, 神田 隆: 不随意運動に対する大脳深部刺激療法. 第 2 回山口県錐体外路疾患研究会. 山口, 2006. 4.
- 中山寛人, 川井元晴, 根来清, 神田隆: 有痛性筋筋麻痺にて発症し典型的 3 主徴の存在しない内頸動脈海綿静脈洞瘻の 61 歳女性例. 第 94 回日本内科学会中国地方会. 島根. 2006. 6.
- 根来 清, 川井元晴, 多田由紀子, 小笠原淳一, 神田 隆, 藤井正美, 森松光紀: パーキンソン病に対する定位的両側視床下核電極留置刺激術 24 ヶ月経過例の検討. 第 48 回日本老年医学会学術集会. 金沢. 2006. 6.
- 柏村陽子, 中山寛人, 川井元晴, 佐野泰照, 根来 清, 神田 隆: 下肢痙性及び凹足を呈し瀨川病が疑われたドーパ反応性パーキンソニズムの 53 歳男性例. 第 80 回日本神経学会中国・四国地方会. 岡山, 2006. 6.
- 安部真彰, 小笠原淳一, 木村明代, 川井元晴, 根来 清, 神田 隆: 1 年半の経過で症状の変動がみられステロイド治療に反応性があった放射線性脊髄症の 53 歳男性例. 第 80 回日本神経学会中国・四国地方会. 岡山, 2006. 6.
- 前田敏彦, 安部真彰, 尾本雅俊, 小笠原淳一, 川井元晴, 根来 清, 神田 隆: 無症候性の心機能異常を認めた顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) の 25 歳男性例. 第 80 回日本神経学会中国・四国地方会. 岡山, 2006. 6.
- 清水文崇, 川井元晴, 安部真彰, 小笠原淳一, 根来 清, 神田 隆: 山口県出身の遺伝性脊髄小脳失調症 (SCA2) の一家系. 第 39 回山口県神経内科医会. 山口, 2006. 7.
- 中山寛人, 川井元晴, 根来 清, 神田 隆, 重本典子, 永田真由, 渡辺義文: MRI にて側頭葉および視床に高信号域がみられたてんかん重積の 23 歳女性例. 第 18 回山口てんかん研究会. 宇部, 2006. 7.
- 根来清, 川井元晴, 多田由紀子, 小笠原淳一, 神田隆, 藤井正美, 森松光紀: パーキンソン病に対する両側視床下核脳深部刺激療法. 24 ヶ月経過例についての検討. 第 24 回日本神経治療学会総会. 横浜, 2006. 7.
- 古賀道明, 神田 隆: ギラン・バレー症候群の発症に関わるカンピロバクター遺伝子. 第 6 回山陽神経フォーラム. 山口, 2006. 10.
- 佐野泰照, 清水文崇, 前田敏彦, 安部真彰, 中山寛人, 神田 隆, 寺崎哲也, 帯刀益夫: 血液神経関門を構成する微小血管内皮細胞の機能解析. 第 6 回山陽神経フォーラム. 山口, 2006. 10.
- 川井元晴, 根来 清, 多田由紀子, 小笠原淳一, 能村友紀子, 木村正道, 神田 隆: 脳脊髄減少症に伴う頭痛の臨床的検討. 第 34 回日本頭痛学会総会. 米子. 2006. 11.
- 安部真彰, 小笠原淳一, 木村明代, 川井元晴, 根来 清, 神田 隆: 低血糖発作と手の鏡面運動を呈した 22 歳女性例. 第 81 回日本神経学

会中国・四国地方会．岡山，2006.12.

前田敏彦，古賀道明，樋口文宏，尾本雅俊，川井元晴，根来 清，神田 隆：脳外科手術後に急速に進行した腫瘍様多発性硬化症の65歳男性例．第81回日本神経学会中国・四国地方会．岡山，2006.12.

清水文崇，木村明代，小笠原淳一，川井元晴，古賀道明，根来 清，神田 隆：広範な大脳病変を呈し脳生検標本を用いた multivirus real time PCR により確定診断に至った単純ヘルペス脳炎の61歳女性例．第81回日本神経学会中国・四国地方会．岡山，2006.12.

木村明代，小笠原淳一，尾本雅俊，川井元晴，根来 清，神田 隆：四肢遠位部の疼痛発作を契機としてFabry病と早期診断した19歳男性例．第81回日本神経学会中国・四国地方会．岡山，2006.12.

釜谷志織，古賀道明，尾本雅俊，小笠原淳一，川井元晴，根来 清，神田 隆：拡張型心筋症・心室性不整脈を認め，Lamin A/C 遺伝子変異

が確認された Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー (EDMD) の15歳男性例．第81回日本神経学会中国・四国地方会．岡山，2006.12.

#### 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

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

「実験的自己免疫性脳脊髄炎の中樞神経におけるaquaporin-4の検討」に関する研究

分担研究者 楠 進 近畿大学医学部神経内科教授

研究要旨

視神経脊髄型多発性硬化症の多くの例で NMO-IgG が陽性であり、その対応抗原が aquaporin-4 (AQP4) であることが確認されている。AQP4 は水輸送に関連する水チャネル分子である。本研究では多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における AQP4 の動態を解析した。MOG 誘導 EAE マウスの脳や脊髄の AQP4-mRNA を定量 PCR にて経時的に測定したところ、脊髄では EAE 誘導後 14 日目に、大脳では 21 日目に上昇のピークがみられた。急性脳虚血では AQP4 が脳浮腫に関与しているとされているが、EAE の病態においても AQP4 が炎症巣での浮腫を増長させている可能性がある。今後、さらなる検討が必要である。

A. 研究目的

視神経脊髄型多発性硬化症の多くの例で NMO-IgG が陽性であり、その対応抗原が AQP4 であることが確認されている。AQP4 は中枢神経だけではなく腎や胃粘膜にも存在する水輸送に関連する水チャネル分子である。脳では脳内水調節に関与し脳浮腫病態との関連が推定されている。脳損傷モデルマウスでは、損傷部での組織浸透圧上昇に伴い、アストロサイトの AQP4 発現が増加し、水分子移動を加速させ脳浮腫病態を悪化させることが明らかになっている。本研究では、多発性硬化症の動物モデルである EAE における AQP4 の動態を解析する。

B. 研究方法

C57/B6 マウスに MOG<sub>35-55</sub> ペプチドを用いて EAE を誘導し、脳や脊髄における AQP4-mRNA を定量 PCR にて測定した。EAE 誘導前、誘導後 7、14、21、28、35 日目に各 5 匹から脳、脊髄を採取した。各組織から cDNA を合成し、Realtime-PCR 法 (Lightcycler) を用いて定量した。

(倫理面の配慮)

実験動物の取り扱い、大学内「実験動物取り扱い指針」を遵守した。

C. 研究結果

結果

脊髄では EAE 誘導後 14 日目に、大脳では 21 日

目に AQP4-mRNA 上昇のピークがみられた。病理組織上は脳、脊髄とも炎症所見が EAE 誘導後 21 日目で最も著しかった。

D. 考察

EAE の脳、脊髄において AQP4-mRNA の増加が見られた。急性脳虚血では AQP4 欠損により脳浮腫が著減すると報告されている。EAE の病態においても AQP4 が炎症巣での浮腫を増長させている可能性がある。その反面、AQP4 が炎症巣の修復過程に働いている可能性もあり、今後のさらなる検討が必要である。

E. 結論

EAE の病態に AQP4 が関与している可能性がある。

F. 健康危険情報：

G. 研究発表

I 論文発表：なし

II 学会発表

宮本勝一、片岡和夫、楠 進. 実験的自己免疫性脳脊髄炎の中樞神経における aquaporin-4. 第 48 回日本神経学会総会 (平成 19 年 5 月 名古屋：発表予定)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他：すべてなし