

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

食事性脂質と NKT, T 細胞機能に関する研究

分担研究者 菊地誠志 国立病院機構札幌南病院神経内科

研究要旨

C57BL/6 マウスに高脂肪食を摂取させたところ、 α -GalCer 投与による血中 IFN- γ 産生の低下や NKT 細胞数の減少が見られた。OVA に対する Th1 免疫反応は高脂肪食摂取により減弱していたが、この変化は CD1d^{-/-} マウスでは見られなかった。高脂肪食摂取により NKT 細胞機能が変化したことが、Th1 反応の減弱につながったものと考えられた。

A. 研究目的

食事性脂質と多発性硬化症 (MS) を初めとした自己免疫性疾患との関係は古くから疫学的検討や動物実験が行われているが、そのメカニズムの詳細は明らかにされていない。われわれは以前に、動脈硬化食 (脂肪 15%, コレステロール 1.25%, コール酸 0.5%) 摂取が natural killer T (NKT) 細胞からの Th1 系サイトカイン産生増強を介してマウス動脈硬化促進的に働くことを見いだしている。今回は高脂肪食が NKT 細胞, T 細胞免疫系に与える影響につき検討した。

B. 研究方法

5-8 週齢 C57BL/6 (WT B6) に通常食 (脂肪 4.3%, コレステロール 0.03%) および高脂肪食 (脂肪 21.2%, コレステロール 0.2%) を 3 週間摂取させ、 α -galactosylceramide (α -GalCer) 投与による血中 interferon (IFN)- γ , Interleukin

(IL)-4 産生を測定した。また肝臓, 脾臓における NKT 細胞, 樹上細胞の表面抗原をフローサイトメトリーで解析した。次に WT B6 および, CD1d^{-/-} マウスに通常食, 高脂肪食を摂取させ, ovalbumin (OVA) 323-339 ペプチドに対する T 細胞反応や遅延型過敏反応を解析した。また高脂肪食が human interphotoreceptor retinoid binding protein (hIRBP) 1-20 ペプチドにより誘導した experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) へおよぼす影響を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学遺伝子病制御研究所動物実験施設の倫理規定を遵守した。

C. 研究結果

高脂肪食摂取により, α -GalCer 投与による血中 IFN- γ 産生が低下した。血中 IL-4 産生には変化がなかった。高脂

肪食摂取により肝臓、脾臓の NKT 細胞の割合は減少しており、NKT 細胞上の NK 受容体発現変化や樹上細胞上の CD1d 発現低下などを伴っていた。組織学的に、肝臓は脂肪肝を呈していたものの炎症細胞浸潤は認めなかった。OVA 323-339 ペプチドに対する T 細胞増殖反応と IFN- γ 産生は高脂肪食摂取により減弱していたが、CD1d^{-/-} マウスでは明確な変化は見られなかった。同様に OVA に対する遅延型過敏反応は高脂肪食を摂取させた WTB6 でのみ低下していた。高脂肪食摂取は EAU の臨床経過には影響を与えなかった。

D. 考察, E. 結論

今回の研究では高脂肪食摂取により NKT 細胞機能に変化が生じ、その結果 OVA に対する Th1 反応が減弱したことが考えられた。このことは MS の有病率が増加していることとは必ずしも一致はしないが、食事性脂質が NKT 細胞を介して獲得免疫系に影響をおよぼすということは非常に興味深いと考えている。EAU の結果で見られたように、すべてのモデルで同様の結果が得られるわけではないようであり、食事の種類や実験モデルによっては Th1 反応の増強が見られる可能性も考えられる。今後は NKT 細胞に作用している食事性脂質の成分および NKT 細胞機能や T 細胞免疫系の変

化に関与している分子の同定が必要である。

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

ヒト肥満細胞と樹状細胞に対する I 型 IFN の免疫制御的作用

藤田伴子¹、神戸直智²、内山 卓¹、堀 利行¹

京都大学大学院医学研究科 ¹血液・腫瘍内科学、²皮膚生命科学

研究要旨

昨年度に引き続いて、臍帯血 CD34+ 造血幹細胞より *in vitro* で分化させて調整した肥満細胞 (MC) を用いて、FcεRI クロスリンク後の TNF-α、IL-10 の産生、OX40L 発現および T 細胞増殖促進活性に対する IFN-α の影響について検討した。その結果、IFN-α の添加は、MC の生存や増殖には影響せず、TNF-α 産生、OX40L 発現を抑制し、逆に IL-10 産生を増加させることを再現性よく証明できた。また、IFN-α は樹状細胞 (DC) に作用して、OX40L の発現を亢進させることを見いだした。さらに、IFN-α は純化した T 細胞の活性化には大きな影響を与えないが、DC の存在下では間接的に DC 依存性の T 細胞の増殖を抑制した。これはおそらく IFN-α が DC の IL-12 産生を抑制するためと考えられる。これらのことから、IFN-β を含む I 型 IFN が MC と DC を介して MS の病態を緩和する方向に働くことが示された。

A. 研究目的

多発性硬化症 (MS) に対して IFN-β 療法がなぜ有効であるのか、そのメカニズムの詳細は依然として明らかでない。I 型 IFN (α, β, ω など) および II 型 IFN (γ) はいずれも免疫賦活作用があり、T 細胞応答を増強すると考えられてきた。しかし、最近、I 型 IFN には、単純に免疫を賦活するだけでなく、標的細胞や作用の時期によって免疫制御性の活性を合わせもつことが明らかになりつつある。

肥満細胞 (MC) は I 型アレルギー反応におけるエフェクター細胞であるが、近年、T

細胞との相互作用の存在が明らかにされ、獲得免疫における役割が注目されている。MC を欠損した W/W^m マウスでは EAE の発症が起りにくく、発症しても軽症にとどまり、そこに同系マウスの MC を移入することによって野生型マウスのレベルまで重症化することが報告されている (J. Exp. Med. 191:813, 2000)。また、樹状細胞 (DC) が免疫応答の方向性の決定に重要な役割を果たすことは広く知られており、MS の病態への関与の可能性も指摘されている。そこで、本研究では、I 型 IFN がマスト細胞 (MC) と樹状細胞 (DC) という 2 つの ア

クセサリー細胞への作用を介して免疫応答を制御する可能性について検討した。

B. 方法

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

健常人末梢血より MACS 磁気ビーズカラムを用いて CD11⁺ myeloid DC (mDC) および CD11c⁻ plasmacytoid DC (pDC) を精製し、IFN-α 存在下、非存在下に LPS または CpG オリゴ DNA で刺激し、OX40L の発現をフローサイトメトリーにて比較検討した。また、CD4⁺ T 細胞単独および DC の存在下に抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激し、1 日後の CD25、HLA-DR、OX40 などの活性化抗原の発現させる系で IFN-α 添加の影響を比較した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

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

一方、DC に対しては、IFN-α は mDC および pDC に対していずれも OX40L の発現を増強することが判明した。また、IFN-α は精製した CD4⁺ T 細胞の活性化に対しては影響を与えなかったが、DC の共存化では活性化抗原である CD25、HLA-DR、OX40

の発現を低下させた。

D. 考察

I 型 IFN は抗ウイルス作用、細胞増殖抑制作用以外に様々な免疫調節作用を示すが、MC に対する作用は殆ど知られていない。本研究により、I 型 IFN が MC に作用し TNF- α 産生と OX40L 発現を抑制し、逆に IL-10 産生を増加させることが明らかとなった。今年度から新たに行った DC を用いた実験で、I 型 IFN が活性化 DC の OX40L 発現を増強することを見いだした。IFN と DC との関係については、2001 年に Ito らが I 型 IFN が mDC に作用して、IL-12 産生を低下させ、逆に IL-10 産生を亢進させること、そしてこのことに対応して T 細胞を制御性 T 細胞 Tr に分化させると報告している。われわれは、この結果を再現するとともに、I 型 IFN が DC の共存下に T 細胞の活性化を抑制することを観察した。IL-12 のない環境下での OX40 シグナルはナイーブ CD4+ T 細胞を Th2 に分化させる方向に働くことが知られている。したがって、IFN- α により IL-12 産生を抑制された mDC に OX40L が発現した場合には、免疫応答を Th1 から Tr または Th2 にシフトさせる方向に働くと推測される。以上の結果から、I 型 IFN は MC および DC を介して Th1 免疫応答を制御する方向に作用することが示唆された。

E. 結論

I 型 IFN は MC の TNF- α 産生と OX40L 発現

を抑制し、IL-10 産生を増加させ、また、mDC の IL-12 産生を抑制することにより、間接的に Th1 免疫応答を制御すると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Toshiyuki Hori. Roles of OX40 in the pathogenesis and control of diseases. *Int. J. Hematol.* 83:17-22, 2006.
2. Tomoko Fujita, Naoya Ukyo, Toshiyuki Hori, and Takashi Uchiyama. Functional characterization of OX40 expressed on human CD8+ T cells. *Immunol. Lett.* 106:27-33.2006.
3. Yasushi Matsubara, Toshiyuki Hori, Rimpei Morita, Shimon Sakaguchi, and Takashi Uchiyama. Delineation of immunoregulatory properties of adult T cell leukemia cells. *Int. J. Hematol.* 84:63-69, 2006.
4. Masahiro Kawahara, Toshiyuki Hori, Yasushi Matsubara, Katsuya Okawa, and Takashi Uchiyama. Identification of HLA class I-restricted tumor-associated antigens in adult T cell leukemia cells by mass spectrometric analysis. *Exp. Hematol.*

34:1496-1504, 2006.

5. Tomoko Fujita, Naotomo Kambe, and Takashi Uchiyama and Toshiyuki Hori. Type I interferons attenuate T cell activating functions of human mast cells by decreasing TNF- α production and OX40 ligand expression while increasing IL-10 production. *J. Clin. Immunol.* 26:512-518, 2006.

6. Toshio Kitawaki, Norimitsu Kadowaki, Naoshi Sugimoto, Naotomo Kambe, Toshiyuki Hori, Yoshiki Miyachi, Tatsutoshi Nakahata, Takashi Uchiyama. IgE-activated mast cells in combination with pro-inflammatory factors induce Th2-promoting dendritic cells. *Int. Immunol.* 18:1789-1799, 2006.

7. Ai Kotani, Toshiyuki Hori, Tomoko Fujita, Naotomo Kambe, Yumi Matsumura., Takayuki Ishikawa., Yoshiki Miyachi, Kenichi Nagai, Yuetsu Tanaka, and Takashi Uchiyama. Involvement of OX40 ligand+ mast cells in chronic GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl.* in press.

2. 学会発表

1. Tomoko Fujita, Naotomo Kambe, Takashi Uchiyama, and Toshiyuki Hori.

Interferon- α suppresses cytokine production and OX40L expression in human cord blood-derived mast cells: implication for the involvement of type I interferons in the mast cell-mediated immune regulation. Keystone Symposia, Breckenridge, Colorado, April 6-11, 2006.

2. 河原真大, 堀 利行, 大川克也, 内山卓. 成人 T 細胞白血病(ATL)に発現する HLA 拘束性腫瘍関連抗原の網羅的解析. 口演発表, 第 65 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2006 年 9 月 28-30 日.

3. 河原真大, 内山 卓, 堀 利行. Kpm/LATS2 は AML 細胞の抗癌剤耐性に関与する. ポスター発表, 第 68 回日本血液学会総会, 第 48 回日本臨床血液学会総会, 福岡, 2006 年 10 月 6-8 日.

4. Tomoko Fujita, Naotomo Kambe, Takashi Uchiyama and Toshiyuki Hori. Interferon-alpha suppresses TNF-alpha production and OX40 ligand expression while it increases IL-10 production in human cord blood-derived mast cells. ワークショップ口演発表, 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 2006 年 12 月 11-13 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

外傷をきっかけにした白質病変

分担研究者：太田 宏平^{1,2}

研究協力者：大橋 高志¹、丸山 恵子¹、清水 優子¹、大原 久仁子¹、竹内 千仙¹、岩田 誠¹

¹ 東京女子医科大学脳神経センター神経内科、² 東京理科大学理学部

研究要旨

【目的】外傷を契機に多発性硬化症 (MS) が発症することが知られているが、外傷と MS の発症の関連についてはまだ十分な結論が出ていない。我々は頭部外傷後に大脳白質に脱髄と考えられる巨大病変が出現した症例を経験したので報告する。

【症例】患者は 59 歳の男性。酩酊状態で自転車に乗り転倒、右顔面を強打した。第 37 病日から右下肢の感覚障害、脱力が緩徐進行、左頭頂葉の巨大病変を認めた。病変は 3 ヶ月以上かけて拡大・進展し、ステロイドパルス療法に抵抗性であった。

【考察】外傷と MS の発症の関連についてはまだ十分な結論が出ていない。本症例のようにリング状の増強効果を示す tumefactive lesion の形成には抗体や補体が強く関与している可能性があり、外傷後の脱髄病巣の形成機序を考える上で興味深い。

【結語】頭部外傷後に大脳白質に脱髄と考えられる巨大病変が出現した 59 歳男性例を経験した。症状は外傷後 1 ヶ月以上経過してから出現、病巣は 3 ヶ月以上かけて拡大・進展し、ステロイドパルス療法に抵抗性であった。脱髄巣の形成には抗体や補体が強く関与している可能性があり、MS の発症機序を考える上で興味深いと考えた。

A. 研究目的

外傷を契機に多発性硬化症 (MS) が発症することは以前から知られているが、外傷と MS の発症の関連についてはまだ十分な結論が出ていない。我々は頭部外傷後に大脳白質に脱髄と考えられる巨大病変が出現した症例を経験した。病変の形成には抗体や補体が強く関与している可能性があり、多発性硬化症の発症機序を考える上でたいへん興味深い。

B. 研究方法

白質病変の精査・加療のために当科に入院した患者について、その経過と画像所見を詳細に検討した。MR スペクトロスコピーを施行し病変の性質を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は過去の日常診療で実施された治

療や検査結果に基づく研究であり、その遂行に当たり患者個人情報への守秘に配慮した。

C. 研究結果

患者は 59 歳の男性。大酒家ではほぼ毎日泥酔するまで飲酒して帰宅していた。2005 年 4 月、飲酒後に酩酊状態で自転車に乗り転倒、右顔面を強打した。明らかな意識障害はなかった。第 37 病日から右下肢の感覚障害、第 47 病日からは右下肢の脱力が出現した。第 51 病日の頭部 CT で右慢性硬膜下血腫と左頭頂葉の巨大病変を認めたため、同日入院したが、入院後に右片麻痺が急速に増強した。頭部 MRI では、左頭頂葉の病変はリング状の増強効果を示した。ステロイドパルス療法を 5 クール施行したが、症状に明らかな改善はなかった。さらに、95 病日頃から急速に失語が進行病巣も拡大した。その後は、少しずつではあるが、症状は改善

傾向になり、頭部 MRI では病巣は縮小傾向となった。

D. 考察

外傷を契機に MS が発症することは Charcot の時代から知られている。1901 年に Klausner は MS 症例 126 例のうち、24 例に外傷歴があることを報告している。その後、MS の発症の直前〜1 年以内に外傷歴がある患者が 10%前後いることが報告されている。1952 年に McAlpin は、外傷と MS に関して初めての case-controlled study を行い、MS 患者と正常者、各々 250 名を調査したところ、MS 患者は対象に比べて発症 3 カ月前までの外傷の頻度が優位に多かったと報告している。その後の報告では相関がなかったとする報告がほとんどである。Retrospective study では recall bias がかかることや、統計学的な手法の問題点の指摘されており、外傷と MS の発症の関連についてはまだ十分な結論が出ていない。Lucchinetti らは、MS が病理学的に 4 型に分類できることを示し、そのうち第 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。このタイプでは特に病巣の辺縁にマクロファージの集積があり、MRI ではリング状に造影されることも示されている。従って、本症例のようにリング状の増強効果を示す tumefactive lesion の形成には抗体や補体が強く関与している可能性があり、外傷後の脱髄病巣の形成機序を考える上で興味深いと考える。本症例は発症後、1 年以上経過するが、その間には臨床的な再発や、MRI 上の新たな病巣の出現はなく、MS の診断には至っていない。今後、引き続き、経過を観察していく必要がある。

E. 結論

頭部外傷後に大脳白質に脱髄と考えられる巨大病変が出現した 59 歳男性例を経験した。症状は外傷後 1 ヶ月以上経過してから出現、病巣は 3 ヶ月以上かけて拡大・進展し、ステロイドパルス療法に抵抗性であ

った。脱髄巣の形成には抗体や補体が強く関与している可能性があり、MS の発症機序を考える上で興味深いと考えた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大橋高志、太田宏平、清水優子、大原久仁子、竹内千仙、岩田誠：多発性硬化症におけるインターフェロン β -1b 療法の外来導入の実際。東京女子医科大学雑誌 76, 205-211, 2006.
- 2) 清水優子、太田宏平、川畑仁人、大原久仁子、大橋高志、岩田誠：多発性硬化症における調節性 T 細胞と FOXP3 mRNA 発現の検討 (第 2 報)。神経免疫学 14: 49, 2006.
- 3) 大橋高志、太田宏平、清水優子、大原久仁子、竹内千仙、岩田誠：多発性硬化症における免疫吸着療法の実例。神経免疫学 14: 52, 2006.

2. 学会発表

- 1) 清水優子、太田宏平、川畑仁人、大原久仁子、大橋高志、岩田誠：多発性硬化症における調節性 T 細胞と FOXP3 mRNA 発現の検討 (第 2 報)。第 18 回日本神経免疫学会学術集会。名古屋。3. 2, 2006.
- 2) 大橋高志、太田宏平、清水優子、大原久仁子、竹内千仙、岩田誠：多発性硬化症における免疫吸着療法の実例。第 18 回日本神経免疫学会学術集会。名古屋。3. 2, 2006.
- 3) 大橋高志、太田宏平、丸山恵子、大原久仁子、竹内千仙、岩田誠：頭部外傷後に大脳白質に巨大病変が出現した 1 例。第 8 回 Neuroimmunology Conference。東京, 4. 18, 2006.
- 4) 中島一郎、深澤俊之、太田宏平、野原千洋子、蕨陽子、大橋高志、宮沢イザ

ベル、藤原一男、糸山泰人：視神経脊髄型多発性硬化症の多様性と変化. 第47回日本神経学会総会, 東京. 5.13, 2006.

- 5) Ohashi T, Ota K, Shimizu Y, Ohara K, Takeuchi C, Iwata M: Immunoabsorption plasma pheresis therapy for the treatment of refractory attacks of multiple sclerosis. The 8th International Congress of Neuroimmunology, Nagoya. 10. 16, 2006.
- 6) Shimizu Y, Ota K, Kawahata K, Ohara K, Ohashi T, Iwata M: Modification of Interferon- β on CD4+CD25+high regulatory T cells and expression of FOXP3 mRNA in multiple sclerosis. The 8th International Congress of Neuroimmunology, Nagoya. 10. 16, 2006.
- 7) Ohara K, Ota K, Shimizu Y, Ohashi T, Iwata M: Depression score in multiple sclerosis patients. The 8th International Congress of Neuro-immunology, Nagoya. 10. 16, 2006.
- 8) Takeuchi M, Ota K, Ohashi T, Shimizu Y, Mochizuki A, Kimura Y, Iijima M, Masuda Y, Ubano M, Iwata M: Peripheral neuropathy in patients with multiple sclerosis. The 8th International Congress of Neuroimmunology, Nagoya. 10. 18, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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）
平成 18 年度分担研究報告書

arundic acid (ONO-2506) による慢性進行型・再発寛解型 EAE の抑制
臨床経過および病理組織学的検討

分担研究者 野村恭一 埼玉医科大学総合医療センター 教授
共同研究者 富岳 亮、滝沢功一、大貫 学、三井隆男
木下俊介、高濱美里、井口貴子

研究要旨

再発寛解型の多発性硬化症 (RR-MS) の再発抑制薬としてインターフェロン (INF) 療法が行われているが、INF 治療抵抗性の症例を多く経験し、このような症例では新たな治療法が求められている。今回、我々は astrocyte の機能改善薬である arundic acid (ONO-2506) に注目し、ONO-2506 が MS の再発抑制薬になり得るか否かについて検討した。

抗原として MOG35-55 を用い、慢性進行型 EAE (C5BL6 マウス)、再発寛解型 EAE (NODLT マウス) モデルを作製した。抗原接種時より ONO-2506、30mg/kg/日を 30 日、60 日間、連日に胃ゾンデを用いて経口投与し、神経症候ならびに病理組織学的所見を検討した。

その結果、ONO-2506 の経口投与により慢性進行型、再発寛解型 EAE の神経症候は明らかに抑制効果された。また、病理組織学的検討では、ONO-2506 を投与した慢性進行型 EAE 群ならびに再発寛解型 EAE 群は EAE 対照群に比較し脳、脊髄の総計病巣数の明かな減少を認めた。

以上より、ONO-2506 は MS の再発抑制薬になりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

再発寛解型の多発性硬化症 (RR-MS) の再発予防として、現在、インターフェロン (INF) 治療が行われているが、全症例に有効ではなく、一部の症例においては十分な再発を抑制しえないことを経験する。このような INF 治療抵抗性の症例においては新たな再発予防薬の開発が求められている。

Arundic acid (ONO-2506) は astrocyte の機能改善薬として近年開発され、現在、急性期脳血管障害の治療薬として注目されている。今回我々は、ONO-2506 が多発性硬化症の治療薬としての可能性について検討するため、慢性進行型 EAE および再発寛解型 EAE モデルに ONO-2506 を経口投与し、神経症候ならびに病理学的検討を行った。

B. 研究方法

動物：① 慢性進行型 EAE モデル作製には C57BL6 マウス 15 匹、② 再発寛解型 EAE モデル作製には NODLT マウス 15 匹を使用した。

EAE モデルの作製：抗原として myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) のアミノ酸配列 35-55 残基に相当する合成ペプチド (MOG35-55) を用い、EAE を誘導した。100 μ g/マウスを両側の鼠径部皮下に分注、接種した。神経症候の発現を確実に安定化させるために pertussis toxin を尾静脈から注入した。神経症候は臨床スコア (0：臨床所見なし、1：尾のたれ、2：よちよち歩き、3：両下肢麻痺、4：四肢麻痺、5：死亡) を用い、抗原接種当日より 60 日間、2 名の研究者により連続観察した。

ONO-2506 の経口投与：マウスの口腔から胃ゾンデを挿入し、ONO-2506 を経口投与した。ONO-2506 投与量は当教室における既知の実験結果から 30mg/kg/日とした。

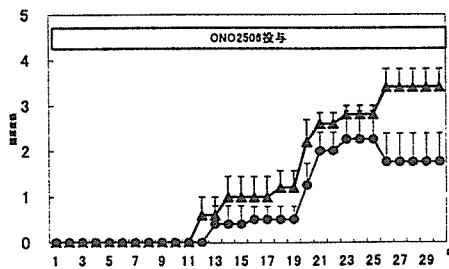
①慢性進行型 EAE モデルは、ONO-2506 30mg/kg/日を抗原接種当日から 30 日間連日に投与した。

②再発寛解型 EAE モデルは、ONO-2506 30mg/kg/日を抗原接種当日から 30 日間（初回の寛解まで）あるいは 60 日間（再発の寛解まで）連日に投与した。

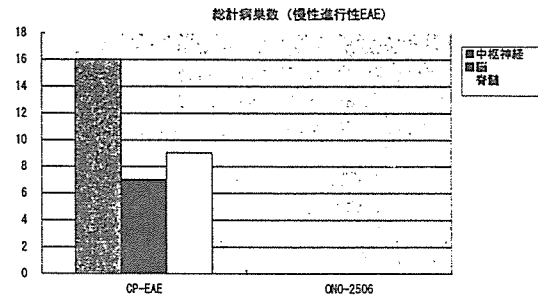
病理学的検討：臨床徴候の観察終了後（慢性進行性 EAE は 30 日後、再発寛解型 EAE では 60 日後）に大脳、小脳、全脊髄を摘出し、直ちに 10%ホルマリンで固定した。各中枢神経組織の 3 μ 切片を作製し H-E 染色した。各々の大脳、小脳、全脊髄を二重盲検法で無作為に、5 スライスおきに 3 スライスを観察し、細胞浸潤の有無を光学顕微鏡で観察した。また H-E 染色で脱髄が示唆された切片は髄鞘染色 (K-B 染色) を行い脱髄の有無を確認した。なお、実験に使用した動物は、実験用に認められた動物であり、実験終了に伴い一酸化炭素による安楽死とし、病理組織学的検討のための組織標本を作製した。

C. 研究結果

①慢性進行型 EAE モデルの検討 (C57BL6 マウス)：神経症候の検討では、ONO-2506 投与群 (●) は EAE 対照群 (▲) に比べ抗原接種後の神経症候の発現が遅延し、平均臨床スコアの低下を認めた (図 1.)。

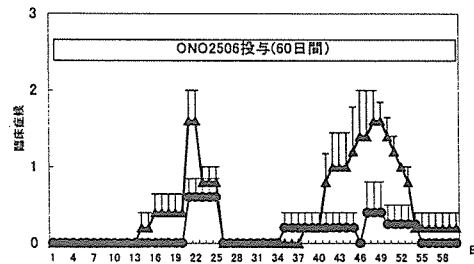


また、病理学的検討では ONO-2506 投与群は EAE 対照群に比べ脳・脊髄ともに総計病巣数の減少を認めた (図 2.)。



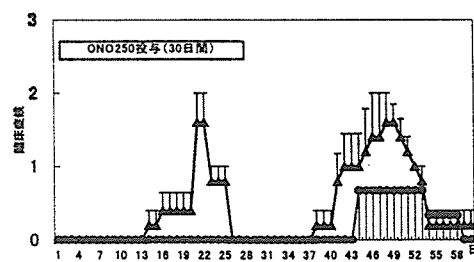
②再発寛解型 EAE モデルの検討 (NODLT マウス)：

1) ONO-2506 の 60 日間投与群：神経症候の検討では、ONO-2506 投与群は (●) EAE 対照群 (▲) に比べ抗原接種後の神経症候の発現が遅延し、初回および再発時における平均臨床スコアの低下を認めた (図 3.)。

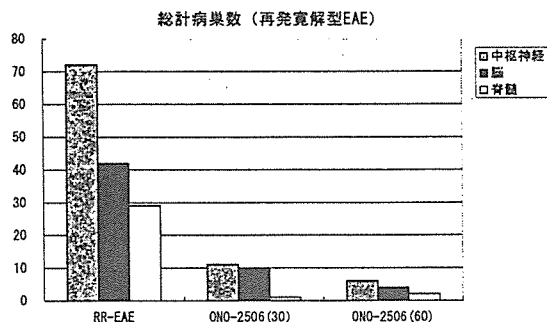


また、病理学的検討では ONO-2506 投与群は EAE 対照群と比べ脳・脊髄ともに総計病巣数の減少を認めた。

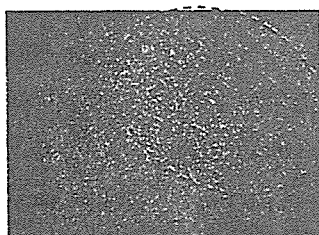
2) ONO-2506 の 30 日間投与群：神経症候の検討では、ONO-2506 投与群は EAE 対照群に比べ初回の神経症候の発症を完全に抑制し、再発の発症を遅延した。また、再発時における平均臨床スコアの低下も認めた (図 4.)。



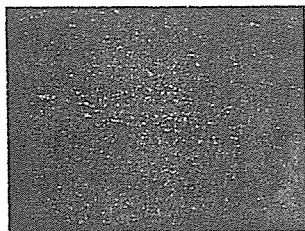
また、病理学的検討では、ONO-2506 投与群 (30 日間) は EAE 対照群に比べ総計病巣数は低下したが、60 日投与群よりも病巣数は多かった (図 5.)。



再発寛解型 EAE 対照群の H-E 染色では、細胞浸潤に加え脱髄を示唆する所見を認め、K-B 染色で細胞浸潤とその部位の脱髄を確認した。



再発寛解型 EAE 群
細胞浸潤と脱髄を認め



ONO2506(30 日間)
投与群
明らかな病変を認めない

D. 考案

ONO-2506 ((R)-2-プロピルオクタン酸、分子式: $C_{11}H_{22}O_2$ 、分子量: 186.29) は急性期脳梗塞の新治療薬として注目されている (1-6)。薬理作用は、ラットの中大脳動脈閉塞モデルにおいて、①脳梗塞形成の抑制 (2, 3, 6)、②脳浮腫の抑制 (2)、③神経症候の改善作用 (4, 6) などが認められ、また astrocyte 培養系において、④神経成長因子放出の抑制 (7)、

⑤GABA 受容体の発現作用、⑥誘導型 NO 合成酵素 (iNOS)、cyclooxygenase-2 の発現抑制 (5)、⑦グルタミン酸トランスポーター発現亢進抑制 (7) などが報告されている。

さらに最近、ONO-2506 には S-100 β 蛋白の増加抑制による astrocyte 異常活性化の抑制 (2) が報告されている。脳梗塞を含め脳内の炎症性変化などにより astrocyte は異常活性化をきたし、S-100 β 蛋白、iNOS、COX-2、CINS-1 は産生亢進し、一方、GABA $_A$ 、GSH、GLT-1/GLAST は抑制される。ONO-2506 はこの astrocyte の異常活性化を抑制作用し、神経細胞障害やアポトーシスを抑制することが明らかとなっている。

我々は、この ONO-2506 による astrocyte の活性化抑制作用に着目し、免疫性神経疾患における治療および予防効果について検討した。既に免疫性末梢神経疾患であるギラン・バレー症候群 (GBS) の動物モデルである実験的アレルギー性神経炎に対して ONO-2506 は予防および治療効果を持つことが解明されている (8)。今回は、免疫性中枢神経疾患である多発性硬化症 (MS) に対して ONO-2506 が再発抑制薬になりうるか否かについて検討した。

MS の動物モデルである慢性進行型 EAE、再発寛解型 EAE に ONO-2506 を連日、経口投与し、30~60 日間の神経症候の推移を観察、さらに、病理組織学的検討を行った。その結果、ONO-2506 の経口投与により、慢性進行型 EAE では神経症候の抑制効果を認め、また、再発寛解型 EAE では神経症候の抑制のみならず再発抑制効果をも示した。さらに、慢性進行型・再発寛解型 EAE のいずれにおいても ONO-2506 投与群では病理組織学的に細胞浸潤、脱髄病巣数の減少を認めた。

MS は中枢神経系の脱髄疾患であり、再発

と寛解を繰り返すことを特徴とする疾患である。MS再発のメカニズムは不明であるが、再発時において自己免疫性の活性化 T 細胞が大きな役割を果たし、これが血液脳関門 (BBB) を通過し中枢神経系内に侵入することが再発の誘因と考えられている。BBB は毛細血管の内皮細胞と astrocyte から構成されている。内皮細胞は tight junction により密に結合され、周囲は基底膜をはさみ astrocyte の足突起がロゼットを形成し、内皮細胞に密着した構造を呈している。ONO-2506 はこの astrocyte の異常活性化を制御することにより BBB の破壊を抑制し、慢性進行型・再発寛解型 EAE の神経症候ならびに再発を抑制したものと推測した。

以上より、ONO-2506 は多発性硬化症の再発・進行を抑制する経口薬剤となる可能性が示された。

E. 研究結論

慢性進行型ならびに再発寛解型 EAE モデルでは、ONO-2506 の 30mg/kg/日の経口投与により EAE の神経症候ならびに再発が抑制され、病理組織学的にも総計病巣数の減少を認めた。以上の結果より、ONO-2506 は多発性硬化症の再発・進行を抑制する経口薬となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

I. 論文発表

1. 野村恭一：多発性硬化症に対する血液浄化療法；日本医事新報. 2005.11. (4255号):89
2. Sato J, Nakanishi F, Koike F, Onoue H,

Aranami T, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Saaito T, Ohta M, Miyakawa S, Kanda T, Fukuzawa T, Yamamura T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis. J of Neuroimmunol.2005.04. 174:108-118,2006

3. 王子 聡, 三井隆男, 吉田典史, 山里将瑞, 大熊 彩, 高濱美里, 島津智一, 大貫学, 富岳 亮, 松村 治, 野村恭一. 多発性硬化症に対する免疫吸着療法の治療メカニズム. 神経免疫学. 2006.03. 14 卷(1号):53,2006
4. 野村恭一, 富岳 亮, 滝沢功一, 井口貴子, 三井隆男, 高濱美里, 大貫学, 高 昌星. aroudic acid (ONO-2506)による再発性 EAE の抑制. 平成 17 年度 厚労省班会議報告書. 2006.03
5. 野村恭一, 三井隆男, 高濱美里, 高砂子由佳子, 富岳 亮, 井口貴子, 大貫学. 再発寛解型多発性硬化症に対する免疫吸着療法. 平成 17 年度 厚労省班会議報告書. 2006.03.
6. 王子 聡, 島津智一, 大原 瞳, 大貫学, 野村恭一. 全外眼筋麻痺を呈した原発性 Sjogren 症候群の 1 例. 臨床神経学. 2006.01. 46 卷(1号):75
7. 吉田典史, 高濱美里, 大熊 彩, 王子聡, 三井隆男, 大貫学, 野村恭一. 脳死様状態を呈した後, 順調に回復した Guillain-Barre 症候群の 1 例. 末梢神経. 2005.12. 16 卷(2号):102-105
8. 大貫学, 王子 聡, 高濱美里, 大熊 彩, 三井隆男, 野村恭一. 喫煙習慣・受動喫煙環境がラクナ梗塞・アテローム血栓性脳梗塞に及ぼす影響. 臨床神経学. 2005.12. 45 卷(12号):1155

9. 大貫 学, 高濱美里, 王子 聡, 吉田典史, 大熊 彩, 山里将穂, 島津智一, 三井隆男, 野村恭一: 脳ドックにおける頭部 MRI・MRA 画像所見の分析. 日本健康医学学会雑誌, 14: 66-67, 2005
 10. Nomura K, Mitsui T, Iguchi T, Tomioka R, shimadu K. Periodic immunoadsorption plasmaheresis modulates immunological abnormality and reduces relapses in relapsing-remitting multiple sclerosis *Neurology* (2006 in press)
- II. 学会発表
1. Iguchi T, Mitui T, Takasago Y, Tomioka R, Nomura K: Periodical immunoadsorption plasmapheresis modulates immunological abnormality and reduces relapses in relapsing-remitting multiple sclerosis ECTRIMS (スペイン 2006 9)
 2. Takizawa K, Tomioka R, Kinoshita S, Shimadu K, Nomura K: Arundic acid (ONO-2506) prevents chronic progressive and relapsing remitting EAE. ECTRIMS (スペイン 2006 9)
 3. 王子 聡, 三井隆男, 大熊 彩, 高濱美里, 大貫 学, 野村恭一ほか. 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. 第 26 回日本アフェレシス学会学術大会 (大津, 2006, 7)
 4. Ohji S, Tomioka R, Mitui T, Yoshida, Iguchi T, Takahama M, Ohnuki M, Nomura k. Serum cytokines and the treatment of IAPP for multiple sclerosis. 第 8 回世界神経免疫学会 (名古屋, 2006 10)
 5. 野村恭一, 富岳 亮, 滝沢功一, 井口貴子, 三井隆男, 木下俊介, 高濱美里, 大貫 学, 高 昌星. Arundic acid (ONO-2506)による再発性 EAE の抑制臨床経過ならびに病理組織学的検討. 第 17 年度厚生労働省班会議 (東京 2006 1)
 6. 王子 聡, 三井隆男, 大熊 彩, 高濱美里, 大貫 学, 野村恭一ほか. 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. 第 17 年度厚生労働省班会議 (東京 2006 1)
 7. 王子 聡, 三井隆男, 吉田典史, 山里将瑞, 高濱美里, 島津智一, 大貫 学, 富岳 亮, 松村 治, 野村恭一. 多発性硬化症に対する免疫吸着療法の治療メカニズム第 18 回日本神経免疫学会 (名古屋, 2006 3)
 8. 王子 聡, 島津智一, 吉田典史, 三井隆男, 野村恭一 延髄外側症候群の経過中に中枢性呼吸障害を呈した 63 歳男性例 第 179 回神経学会関東地方会 (東京, 2006 11)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

分担研究報告書

日本における随意運動障害(movement disorder)を呈する多発性硬化症の特徴及び
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 順天堂大学医学部脳神経内科神経免疫部門講師

研究要旨 多発性硬化症において随意運動障害としての不随意運動、パーキンソンニズムはまれとされてきたが不随意運動に関しては欧米の報告より多いことが判明した。インターフェロンβは直接の随意運動障害予防効果はなくパーキンソンニズムの進展予防には間接的效果を認めた。

A. 研究目的

多発性硬化症 (MS) における随意運動障害として不随意運動とパーキンソンニズムが報告されている。不随意運動の多くは急性期の障害である action tremor, paroxysmal dystonia (tonic spasm) であり、多くの神経変性疾患などで認められる chorea, ballism, myoclonus, athetosis, sustained dystonia はまれである。また進行例では白質の変化よりパーキンソンニズムは lower body Parkinsonism を呈することが多いが、近年多発性硬化症において髄鞘のみならず神経細胞の障害も引き起こすことが報告され、炎症だけではなく神経変性の立場からの研究も進められてきている。現在まで movement disorder を呈した MS 症例に対するインターフェロンβ使用効果に関しては検討された報告はない。今回の我々の研究では順天堂医院に外来受診している MS 患者の神経障害部位、不随意運動のパターン、運動障害とその出現期間、治療に対する反応性について検討し少数ながらインターフェロン

使用経験例を報告する。

B. 方法

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 2006 年の間に、総計 203 名の患者の中から 13 例について検討した。既往歴、性別及び初発症状、病変の広がり、進行度、MRI、血液、髄液検査、治療に対する反応性について解析した。倫理面の配慮として不必要な検査は行わず retrospective に情報の収集を行った。個人情報管理も完全である。

C. 結果

初発症状として不随意運動を呈したケースは認めなかった。また平均 EDSS は不随意運動を呈したグループで高値であり(表 1)、脊髄に Long cord lesion を持った症例が多かった。安静時振戦は認めなかったが姿勢時振戦に関し病巣との対応を MRI 上決定することはできなかった。パーキンソンニズムの症例はインターフェロンβの使用により再発が少なくなり歩行障害の改善を認めた。

D. 考察

振戦は持続することが多く ADL の障

害となることが多いが、パーキンソン病の振戦と異なり下肢に認めることはまれであった。企図振戦は小脳症状が日本人には少ないためか一例も認めなかった。Long cord lesion をもった多発性硬化症患者ではほぼ半数が不随意運動の出現を認めたことは今後MSとneuromyelitis optica (NMO)との鑑別診断のための一助となる可能性がある。

E. 結論

不随意運動に対する直接のインターフェロン効果は期待できないがパーキンソニズムの進展に関しては間接的効果が期待できる。

今後不随意運動陽性症例に対するインターフェロン使用例を蓄積検討し神経変性予防、鑑別診断の観点から研究を進める必要がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

Kazumasa Yokoyama

MDS 10th International Congress

Movement disorder in multiple sclerosis

10/28-11/2 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Patient profile

Among the total of 203 MS patients we enrolled 183 patients in this study.

Twelve patients have abnormal involuntary movement (AIM). (6.5%)

| | |
|--------------------|-----------|
| Male /female ratio | 1:2 |
| Age | 48.2±12.6 |
| Age at onset | 35.2±14.7 |
| Disease duration | 13.2±10 |
| Mean EDSS | 4.8±2.2 |

Type all the patients were RR type

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

平成 18 年度研究報告書

研究課題：難治性疾患の画期的診断・治療法等に関する研究

分担課題：インターフェロンとNK細胞

分担研究者：小笠原康悦 国立国際医療センター研究所、難治性疾患研究部、臨床免疫研究室

研究要旨

多発性硬化症の治療にインターフェロンが使われているが、インターフェロンはサイトカインであり免疫系をはじめとして様々な細胞に影響を及ぼす。NK細胞は自然免疫系で働く細胞群でありインターフェロンにより活性化されることが知られているがその分子機構は不明のままである。我々は、インターフェロンによるNK細胞の活性化には、転写因子Interferon regulatory Factor(IRF)-9が必須であることを明らかにした。さらにインターフェロンは活性化レセプターNKG2Dの発現増強を誘導し、NK細胞の認識機構も増強させていることが判明した。

A. 研究目的

インターフェロンベータ(IFN- β)は多発性硬化症に対する治療薬として使われているが、IFN- β はサイトカインであり、免疫細胞をはじめとする種々の細胞に影響を及ぼす。生体防御の最前線にあたるNK細胞は以前からIFN- β により活性が増強することが知られている。NK細胞はウイルス感染細胞や腫瘍の排除、異系骨髄の排除などに関与することが知られているが、特にウイルス感染において産生されるIFNがNK細胞を活性化し、ウイルス感染防御に働いているものと考えられている^{1,2}。NK細胞の生体内における役割は、ウイルス感染細胞や腫瘍の排除、異系骨髄の排除が代表的であるが¹、最近、NK細胞およびNKレセプターが自己免疫疾患などの難治性疾患にも関与することが報告されている^{3,4}。また、NK細胞は活性化レセプターと抑制性レセプターからのシグナルのバランスのよって標的細胞を認識し傷害することが知られており、我々はNK活性化レセプターの1つNKG2Dが、NK細胞の主たる活性化レセプターであることを報告してきた^{5,6}。このようにNK細胞の機能に関して研究が進んできたもののIFN- β によるNK細胞の活性化のその分子メカ

ニズムに関しては不明な点が多い。したがって我々は、インターフェロンによるNK細胞の活性化の分子機構を明らかにすることを目的に、

- ① インターフェロンによるシグナルの活性化、
- ② インターフェロンによるNK細胞認識機構の増強、特にNK活性化レセプターNKG2Dの発現増強について研究を行った。

B. 方法

1) Interferon Regulatory Factor (IRF)欠損NK細胞の作製

インターフェロンのシグナルの下流ではIRFと呼ばれる1群の転写因子が機能している²。IRF-1はその転写因子群の1つであるが、IRF-1遺伝子欠損マウスは、IL-15の産生の異常によりNK細胞の分化が障害されているためNK細胞が存在せず、そのままではNK細胞におけるIRF-1の機能を追究することはできない⁷。我々は、IRF-1欠損マウス骨髄細胞を野生型マウスに移植することによってできる、骨髄移植キメラマウスを作製しIRF-1欠損NK細胞を樹立した。致死量である9Gyの放射線を照射した129Svマウスをレシピエントとして、IRF-1欠損マウスより単離した 1×10^7 個の骨髄細胞をレシ

ピエントマウス尾静脈より移入した。8週間後、キメラマウスより脾臓を摘出しNK細胞活性を測定した。

2) IFN-βによるNK細胞の活性化

NK細胞を活性化させるため、IFN-β (1000U/ml)またはIL-12 (10ng/ml)を培養液中に加え24時間後、細胞を回収して、NK細胞傷害活性を検討した。NK細胞傷害活性の検討には、標的細胞としてYAC-1細胞を用い、Na₂Cr⁵¹O₄により標識し、Crリリース法により細胞傷害活性を測定した。

3) NKG2Dリガンド、RAE-1の遺伝子構造解析

RAE-1 alpha, beta, gamma, delta, epsilonそれぞれのtotal RNAをマウス組織より抽出した。RAE-1 mRNAの先頭を決定するために、これらRNAをもとに5'-RACE法をおこないRAE-1 mRNAの先頭を決定した。NCBI databaseを参考にmRNA情報を比較検討し、RAE-1の遺伝子構造解析をおこなった。

4) NKG2Dの発現

NKG2Dの発現を調べるため、NK細胞よりtotal RNAを抽出し、通法によりcDNAを合成した。このcDNAをもとに定量的PCR法 (Taqman PCR)によりNK細胞におけるNKG2DのmRNA量を測定し、これをHPRTの発現により標準化してインターフェロンによるNKG2Dの発現増強の有無を検討した。Taqman PCRにもちいたプライマー、プローブの配列は以下の通りである。プライマー: VIC-CTT GCC ATT TTC AAA GAG ACG TTT CAG CC-TAMRA (NKG2D), FAM-CAA ACT TTG CTT TCC CTG GTT AAG CAG TAC AGC-TAMRA (HPRT)。プローブ: NKG2D; sense CGA TTC ACC CTT AAC ACA TTG ATG, antisense GGG ACT T CC TTG TTG CAC AAT AC, HPRT; sense TGG AAA GAA TGT CTT GAT TGT TGA A, antisense AGC TTG CAA CCT TAA CCA TTT TG。

C. 結果

1) インターフェロンによるシグナルの活性化
IFN-βのシグナルの下流で働くと考えられてい

るInterferon Regulatory Factor (IRF)に着目し (図1)、IRF欠損マウスを用いて、NK細胞の細胞傷害活性を検討した。IRF-1遺伝子欠損NK細胞を得るために、IRF-1遺伝子欠損骨髄細胞を野生型マウス(WT)に骨髄移植しキメラマウスを作成した。これらキメラマウスや遺伝子欠損マウスより脾臓細胞を分離し、インターフェロンあるいは陽性対照としてNK細胞を活性化するサイトカインであるIL-12を加え培養後、細胞障害活性を測定し評価した。

IRF-1遺伝子欠損マウス骨髄細胞は、WTマウスに移植しキメラマウスを作成するとNK細胞が分化した。このNK細胞はIRF-1遺伝子欠損造血幹細胞由来であった。このキメラマウスから脾臓細胞を分離し、*in vitro*でインターフェロン刺激した後細胞障害活性を検討したところ、IRF-1欠損NK細胞は細胞傷害活性が増強した。それに対し、IRF-9遺伝子欠損NK細胞では、インターフェロン刺激においても細胞傷害活性は増強しなかった。このことから、インターフェロンにおけるNK細胞活性増強はIRF-9を介したシグナルが重要であることが判明した (図2)。さらに興味深いことにIRF-1欠損NK細胞はIL-12刺激しても細胞傷害活性が増強しないことも判明し (図2)、IL-12シグナルの下流でIRF-1が機能していることも明らかとなった。

IFN and IL-12 signaling in NK cell activation

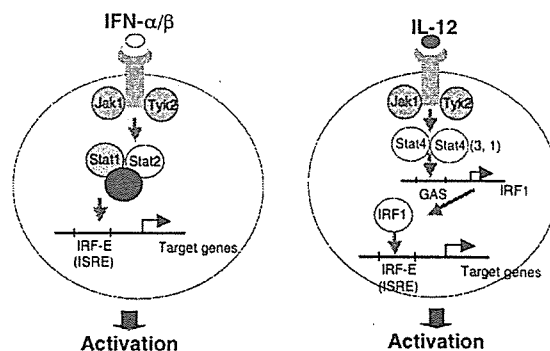


図1 インターフェロンとIL-12のシグナル伝達機構