

**Abstract**

## Microarray analysis classifies multiple sclerosis subgroups

Jun-ichi Satoh<sup>1,2)</sup>

from

<sup>1)</sup> *Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan.*

<sup>2)</sup> *Department of Bioinformatics and Neuroinformatics, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan.*

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) white matter mediated by an autoimmune process, whose development is triggered by a complex interplay of multiple genetic and environmental factors. MS shows a great range of heterogeneity in terms of the disease course, lesion distribution, therapeutic response to IFN $\beta$ , and pathological aspects such as inflammation, antibody deposition, oligodendrocyte apoptosis, and axonal degeneration. These observations suggest that MS is a kind of neurological syndrome caused by different immunological mechanisms leading to the final common pathway that provokes inflammatory demyelination. DNA microarray technology is a novel approach to systematically monitoring the global expression of a large number of genes. It gives us new insights into the complexity of molecular interactions promoting the autoimmune process in MS. By microarray analysis followed by hierarchical clustering, we recently found that gene expression profiling of peripheral blood T lymphocytes discriminates four molecularly distinct subgroups of MS, associated with differential disease activity and therapeutic response to IFN $\beta$ . These observations suggest that microarray analysis is valuable for designing and optimizing personalized treatment for heterogeneous populations of MS.

(Received : November 21, 2005)

---

Shinkei Kenkyu no Shinpo (Advances in Neurological Sciences), Vol. 50, No. 4, pp582-599, 2006.  
IGAKU-SHOIN Ltd., Tokyo, Japan.

治療法の進歩—効果, 成績—

## 多発性硬化症

佐藤 準一

### Interferon-beta therapy in multiple sclerosis

Jun-ichi Satoh

Department of Bioinformatics and Neuroinformatics, Meiji Pharmaceutical University

#### Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) white matter mediated by an autoimmune process, whose development is triggered by a complex interplay of multiple genetic and environmental factors. Interferon-beta ( $IFN\beta$ ) substantially reduces clinical exacerbation and MRI disease activity in MS, possibly by inhibiting the antigen-presenting capacity, by reversing a Th1 shift of the immune response, and by suppressing the transmigration of autoreactive T cells into the CNS. However, it has become evident that a significant number of MS patients do not well respond to  $IFN\beta$  and experience adverse effects. Using a DNA microarray, we have recently identified a battery of  $IFN$ -responsive genes (IRG) in peripheral blood lymphocytes, which play a key role in biological effects of  $IFN\beta$  in MS. They include IRF-7, a positive feedback regulator of  $IFN\beta$  production, IFI30 and TAP1, a key component of the antigen-presentation machinery, and TNFAIP6, a secreted protein with antiinflammatory activities. Furthermore,  $IFN\beta$  promptly induces proinflammatory chemokines and cytokines responsible for adverse effects in MS. Hierarchical clustering analysis of T cell gene expression profile discriminates four molecularly distinct subgroups of MS, associated with differential disease activity and therapeutic response to  $IFN\beta$ . A panel of IRG are upregulated persistently in  $IFN\beta$  responders but not in nonresponders after treatment. These observations suggest that DNA microarray analysis is valuable for designing and optimizing personalized treatment of MS.

**Key words:** DNA microarray, hierarchical clustering analysis, interferon-responsive genes, multiple sclerosis, personalized medicine

#### はじめに

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) は若年成人に好発する原因不明の中樞神経系炎症性脱

髓疾患で、視神経・大脳・脊髄など白質に脱髓巣が多発し、様々な神経症状が再発を繰り返して進行する難病である。1990年代以降に欧米・日本で実施された大規模臨床試験により、イン

明治薬科大学薬学部生命創薬科学科バイオインフォマティクス

0047-1852/06/¥40/頁/JCLS

ターフェロンベータ (interferon-beta: IFN $\beta$ ) の MS 再発抑制効果が立証された<sup>1-3)</sup>。現在では MS 急性増悪期には副腎皮質ステロイド短期間大量静脈内投与 (intravenous methylprednisolone pulse: IVMP), 寛解・回復期には IFN $\beta$  の継続的皮下・筋肉内投与, または国内未承認薬アミノ酸ランダムポリマー copolymer-1 (glatiramer acetate: GA) の継続的皮下投与が, 最も一般的治療法 (first-line treatment) として選択されている。しかし IFN $\beta$  が無効な症例 (nonresponder) や副作用のため治療を継続できない症例も多い<sup>4-6)</sup>。現在まで responder と nonresponder の分子遺伝学的差異は解明されていない。nonresponder の存在は MS における個別化治療 (individualized therapy) 樹立の必要性を示唆する。

本稿では MS における IFN $\beta$  治療の経緯, 効果発現機序, および遺伝子アレイを用いた個別化治療への試みに関して解説する。

## 1. MS の免疫病態

MS 病巣では急性期に CD4<sup>+</sup>T 細胞とマクロファージ (macrophages) を主体とするリンパ球浸潤と髄鞘形成細胞オリゴデンドロサイト (oligodendrocytes) の細胞死および脱髄 (demyelination) を認める。回復期には髄鞘再生 (remyelination) もみられるが, 炎症が遷延化すると軸索変性 (axonal degeneration) を来して不可逆的な後遺症を残す。MS の発症機序は解明されていないが, 動物モデルの実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) からの類推で, MS では脳炎惹起性自己抗原に分子相同性 (molecular mimicry) を示す外来抗原 (ウイルスなど) を認識し活性化した CD4<sup>+</sup>T helper type 1 (Th1) 細胞が, 血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) を通過し, 中枢神経系に浸潤して発症が惹起されると推測されている (図 1)。自己反応性 Th1 細胞は中枢神経系組織内で macrophages やミクログリア (microglia) により再度抗原提示を受けて再活性化され, Th1 サイトカイン (IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\beta$ ) を産生する。その結果 macrophages/

microglia が活性化され, 炎症増強因子 (TNF $\alpha$ , nitric oxide (NO), oxygen radicals) を大量に産生し, oligodendrocytes のアポトーシス (apoptosis) やネクローシス (necrosis) を誘導して脱髄が惹起される<sup>7)</sup>。一方, T helper type 2 (Th2) 細胞は Th2 サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) を産生して Th1 細胞の機能を抑制するが, MS 急性増悪期には Th1/Th2 バランスが Th1 優勢に偏倚している (Th1 shift)。自己反応性 Th1 細胞を制御する調節性細胞 (regulatory cells) には Th2 細胞のほかに, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞, T helper type 3 (Th3) 細胞, T regulatory type 1 (Tr1) 細胞, natural killer (NK) 細胞, NKT 細胞があり, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, Th3, Tr1 は IL-10 や TGF $\beta$  を, NK は IL-5 を, NKT は IL-4 を産生して Th1 細胞の機能を抑制する。

MS は多様な病態を呈する。臨床経過から再発寛解型 (relapsing-remitting MS: RRMS), 2 次進行型 (secondary progressive MS: SPMS), 1 次進行型 (primary progressive MS: PPMS) に分類される。SPMS と PPMS では軸索傷害・神経変性機序が病態進行に関与している。病巣分布からは中枢神経系全般に分布する脳型 (conventional form: CMS) と視神経・脊髄に限局する視神経脊髄型 (opticospinal MS: OSMS) に分類される。MS 有病率は欧米人は 50-200 人/10 万人, 日本人は 5-10 人/10 万人で, 我が国では欧米に比較して OSMS の頻度が高い。

## 2. MS における IFN $\beta$ 治療の経緯

MS ではウイルス感染を契機に再発が惹起されることが多いとの臨床経験に基づき, 1981 年に Jacobs らは初めて天然型 IFN $\beta$  を抗ウイルス薬として MS 患者の髄液腔内に投与し治療効果を認めた<sup>8)</sup>。一方, 1987 年に Panitch らは組み換え型 IFN $\gamma$  を MS 患者に静脈内投与した結果, 再発を惹起した<sup>9)</sup>。1990 年代に欧米で実施された大規模臨床試験 (multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study) により, IFN $\beta$  が RRMS や SPMS で再発頻度を約 30% 減少させ, Kurtzke's expanded disability status scale (EDSS) により評価された神経学的後遺

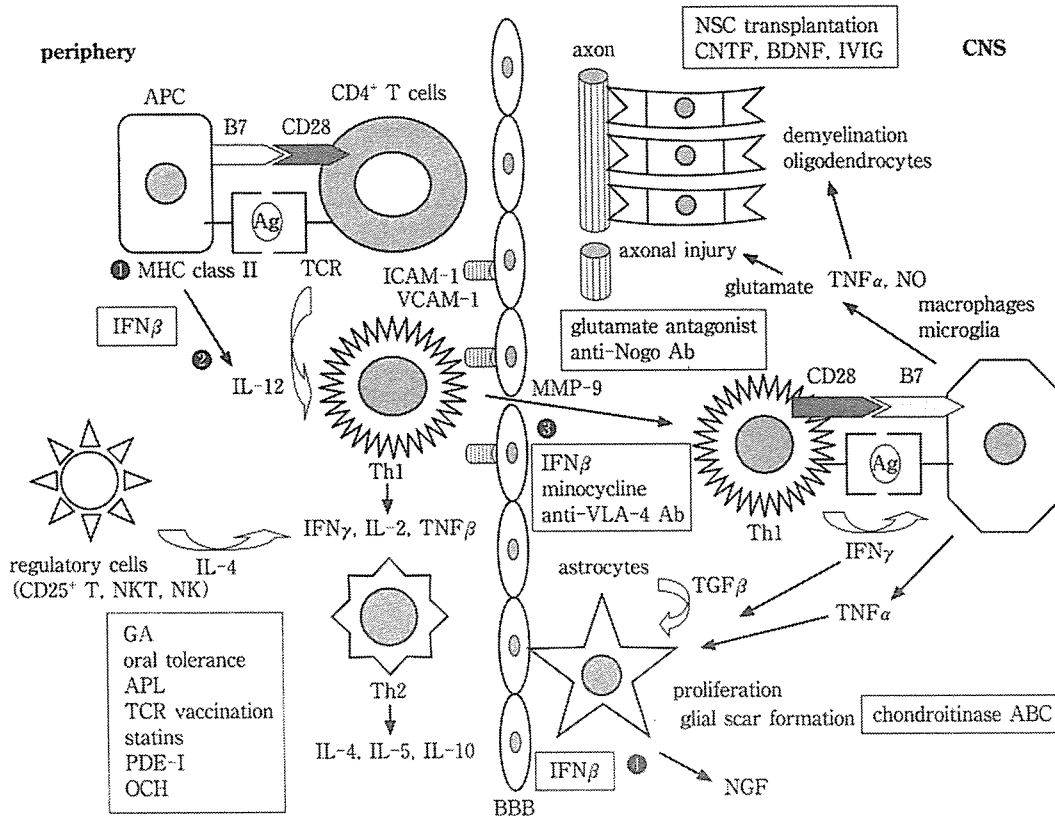


図1 多発性硬化症の発症機序とIFNβ治療効果発現部位

MSでは末梢(免疫系)で抗原提示を受けて活性化された自己反応性CD4<sup>+</sup>Th1細胞が血液脳関門(blood-brain barrier: BBB)を通過する。中枢神経系内でマクロファージ(macrophages)やミクログリア(microglia)により再度抗原提示を受けて、再活性化されTh1サイトカイン(IFN $\gamma$ など)を産生する。その結果macrophages/microgliaが活性化され、炎症増強因子(TNF $\alpha$ , nitric oxide(NO), glutamateなど)を大量に産生し、オリゴデンドロサイト(oligodendrocytes)が傷害されて脱髄(demyelination)が惹起される。IFN $\beta$ は①IFN $\gamma$ によるclass II MHC発現誘導に拮抗して抗原提示を抑制し、②抗原提示細胞のIL-12産生を抑制してTh1シフトを是正し、③活性化自己反応性T細胞のmatrix metalloproteinase-9(MMP-9)の産生を抑制してBBB通過を阻止し、④アストロサイト(astrocytes)による神経栄養因子(NGFなど)の産生を促進することにより、抗炎症作用と神経保護作用を呈する。MSに対する治療法(枠内; 研究段階のものを含む)の作用点を示す。

GA: glatiramer acetate, APL: altered peptide ligands, PDE-I: phosphodiesterase inhibitor, OCH: an altered glycolipid ligand named OCH, NSC: neural stem cells, CNTF: ciliary neurotrophic factor, BDNF: brain-derived neurotrophic factor, NGF: nerve growth factor, IVIG: intravenous immunoglobulins, Ab: antibody, Ag: self antigen.

症の進行を抑制し、MRI上の活動性病巣出現率を低下させることが立証された(表1)<sup>1,2)</sup>。すなわちIFN $\beta$ がMSで初めてclass I evidenceに基づき有効性が立証された治療薬(disease-modifying agents: DMAs)として承認された。我が国における臨床試験でも欧米と同様な治療効果が確認された<sup>3)</sup>。更にMS予備群である

初発例(clinically isolated syndrome: CIS)で、IFN $\beta$ 治療を開始するとclinically definite MSへの移行を抑制できることが明らかになり<sup>10)</sup>、早期治療開始の重要性が認識された。現在MSでは組み換え型ヒトIFN $\beta$ 1b(商品名Betaferon<sup>®</sup>, Betaseron<sup>®</sup>)およびIFN $\beta$ 1a(商品名Avonex<sup>®</sup>, Rebif<sup>®</sup>)が使用されている。IFN $\beta$ 1bは大腸菌で

表 1 MS における IFN $\beta$  臨床試験

| No. | 発表年     | 発表者   | IFNのタイプと量  |
|-----|---------|---|--|
| 1   | 1981    | Jacobs, et al   | natural IFN $\beta$ , 1 MIU twice a week for 4 weeks and once a month for 5 months, IT   |
| 2   | 1984    | Knobler, et al  | natural IFN $\alpha$ , 5 MIU every day for 6 months, IM  |
| 3   | 1986    | Camenga, et al  | recombinant IFN $\alpha$ 2, 2 MIU three times a week for 52 weeks, SC  |
| 4   | 1987    | Panitch, et al  | recombinant IFN $\gamma$ (Immuneron), 1 $\mu$ g, 30 $\mu$ g, or 1,000 $\mu$ g twice a week for 4 weeks, IV   |
| 5   | 1987    | Jacobs, et al   | recombinant IFN $\beta$ , 1 MIU once a week for 4 weeks and once a month for 5 months, IT  |
| 6   | 1989    | Australian Trial of Transfer Factor and IFN as Treatment for MS(AUSTIMS) Research Group               | natural IFN $\alpha$ , 3 MIU or transfer factor 0.5 U twice a week for 2 months, once a week for 10 months and once every two weeks for 2 years, SC                    |
| 7   | 1990    | Kastrukoff, et al   | natural IFN $\alpha + \beta$ , 5 MIU every day for 6 months, SC  |
| 8   | 1993    | IFNB MS Study Group, UBC MS/MRI Study Group (The pivotal trial) [Ref.1]                               | recombinant IFN $\beta$ 1b (Betaseron), 1.6 MIU (50 $\mu$ g) or 8 MIU (250 $\mu$ g) every other day for 2-5 years, SC  |
| 9   | 1994    | Durelli, et al  | recombinant IFN $\alpha$ 2a (Roferon-A), 9 MIU every other day for 6 months, IM  |
| 10  | 1996    | MS Collaborative Research Group (MSCRG) [Ref.2]   | recombinant IFN $\beta$ 1a (Avonex), 6 MIU (30 $\mu$ g) once a week for 2 years, IM  |
| 11  | 1998    | Prevention of Relapses and Disability by IFNB1a Subcutaneously in MS (PRISMS) Study Group             | recombinant IFN $\beta$ 1a (Rebif), 6 MIU (22 $\mu$ g) or 12 MIU (44 $\mu$ g) three times a week for 2 years, SC   |
| 12  | 1998    | European Study Group on IFNB1b in SPMS  | recombinant IFN $\beta$ 1b (Betaferon), 8 MIU (250 $\mu$ g) every other day for 2-3 years, SC  |
| 13  | 1999    | Once Weekly IFN for MS (OWIMS) Study Group  | recombinant IFN $\beta$ 1a (Rebif), 6 MIU (22 $\mu$ g) or 12 MIU (44 $\mu$ g) once a week for 48 weeks, SC   |
| 14  | 2000    | Controlled High-Risk Subjects Avonex MS Prevention Study (CHAMPS) Group                               | recombinant IFN $\beta$ 1a (Avonex), 6 MIU (30 $\mu$ g) once a week for 3 years, IM  |
| 15  | 2001    | Secondary Progressive Efficacy Clinical Trial of Recombinant IFNB1a in MS (SPECTRIMS) Study Group     | recombinant IFN $\beta$ 1a (Rebif), 6 MIU (22 $\mu$ g) or 12 MIU (44 $\mu$ g) three times a week for 3 years, SC   |
| 16  | 2002    | Independent Comparison of Interferon (INCOMIN) Trial Study Group                                      | recombinant IFN $\beta$ 1b (Betaferon), 8 MIU (250 $\mu$ g) every other day for 2 years, SC vs IFN $\beta$ 1a (Avonex), 6 MIU (30 $\mu$ g) once a week for 2 years, IM |
| 17  | 2002    | Evidence for Interferon Dose Effect: European-North American Comparative Efficacy (EVIDENCE) [Ref.11] | recombinant IFN $\beta$ 1a (Rebif), 12 MIU (44 $\mu$ g) three times a week, SC vs IFN $\beta$ 1a (Avonex), 6 MIU (30 $\mu$ g) once a week for 1-2 years, IM            |
| 18  | 2003    | Leary, et al (London trial)   | recombinant IFN $\beta$ 1a (Avonex), 6 MIU (30 $\mu$ g) or 12 MIU (60 $\mu$ g) once a week for 2 years, IM   |
| 19  | 2004    | Early Treatment of MS (ETOMS)   | recombinant IFN $\beta$ 1a (Rebif), 6 MIU (22 $\mu$ g) once a week for 2 years, SC   |
| 20  | 2005    | Multiple Sclerosis Study Group of Japan [Ref.3]   | recombinant IFN $\beta$ 1b (Betaferon), 1.6 MIU (50 $\mu$ g) or 8 MIU (250 $\mu$ g) every other day for 2 years, SC  |
| 21  | ongoing | OPTimization of Interferon for MS (OPTIMS)  | recombinant IFN $\beta$ 1b (Betaferon/Betaseron), 8 MIU (250 $\mu$ g) for 6 months, followed by 12 MIU (375 $\mu$ g) for a further 6 months every other day, SC        |
| 22  | ongoing | Betaferon/Betaseron in Newly Emerging Multiple Sclerosis for Initial Treatment (BENEFIT)              | recombinant IFN $\beta$ 1b (Betaferon/Betaseron), 8 MIU (250 $\mu$ g) every other day for 3 years, SC  |
| 23  | ongoing | Betaferon/Betaseron Efficacy Yielding Outcomes of a New Dose (BEYOND)                                 | recombinant IFN $\beta$ 1b (Betaferon/Betaseron), 8 MIU (250 $\mu$ g) vs 16 MIU (500 $\mu$ g) every other day, SC or glatiramer acetate 20 mg daily, SC for 2 years    |

RR: relapsing-remitting MS, SP: secondary progressive MS, PP: primary progressive MS, CP: chronic progressive MS (SP+PP), CIS: clinically isolated syndromes (first event of RR), CMS: classic MS, OSMS: opticospinal MS, IT: intrathecal, IV: intravenous, IM: intramuscular, SC: subcutaneous.

| 臨床病型               | 患者数 | 治療効果   |
|--------------------|-----|--|
| RR, SP,<br>stable  | 20  | decrease in number of relapses   |
| RR, SP             | 24  | decrease in number of relapses   |
| RR, SP,<br>CP      | 98  | no beneficial effects  |
| RR                 | 18  | increase in number of relapses   |
| RR                 | 69  | decrease in number of relapses   |
| RR                 | 182 | no beneficial effects  |
| CP                 | 100 | no beneficial effects  |
| RR                 | 372 | decrease in number of relapses and MRI activity  |
| RR                 | 20  | decrease in number of relapses and MRI activity  |
| RR                 | 301 | decrease in number of relapses and MRI activity and inhibition of progression of disability and brain atrophy                    |
| RR                 | 560 | decrease in number of relapses and MRI activity and inhibition of progression of disability                                      |
| SP                 | 718 | decrease in MRI activity and inhibition of progression of disability   |
| RR                 | 293 | decrease in MRI activity in the high dose group  |
| CIS                | 383 | decrease in MRI activity and inhibition of conversion into clinically definite MS  |
| SP                 | 618 | decrease in number of relapses and MRI activity but no inhibition of progression of disability                                   |
| RR                 | 188 | decrease in number of relapses and MRI activity more manifest in the IFN $\beta$ 1b group  |
| RR                 | 677 | high-dose/high-frequency treatment more effective than low-dose/weekly treatment in reducing number of relapses and MRI activity |
| PP                 | 50  | no efficacy in progression of disability   |
| CIS                | 263 | inhibition of conversion into clinically definite MS and slowing progression of brain atrophy                                    |
| RR of CMS,<br>OSMS | 205 | decrease in number of relapses and MRI activity in CMS as well as in OSMS  |
| RR                 | 216 | high dose is more effective than low dose in reducing MRI activity (unpublished)   |
| CIS                | 400 | the study includes pharmacogenetic/genomic analyses  |
| RR                 | 71  | the first phase completed  |

産生され、天然型 IFN $\beta$  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 $\beta$ 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 $\beta$  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<sup>5,6)</sup>、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 $\beta$  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<sup>11)</sup>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<sup>12,13)</sup>。  
ただし抗 integrin $\alpha$ 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<sup>14)</sup>。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 $\beta$ 1a に比較して IFN $\beta$ 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<sup>15)</sup>。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<sup>4,16)</sup>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 $\beta$ 治療効果の 発現機序

#### a. 免疫調節作用 (immunomodulatory effects)

MS における IFN $\beta$  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 $\beta$  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<sup>+</sup> 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 $\gamma$  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 $\beta$  は CIITA 抑制因子の  
発現を誘導して IFN $\gamma$  による class II MHC 発現  
増強に拮抗する<sup>17)</sup>。著者らはヒトアストロサイ  
ト (astrocytes) 純培養を用いて、IFN $\beta$  が IFN $\gamma$   
による class II MHC 発現誘導を選択的に抑制し、  
IFN $\gamma$  による増殖促進作用に対して拮抗するこ  
とを報告した<sup>18,19)</sup>。IFN $\alpha/\beta$  と IFN $\gamma$  の拮抗的相  
互作用 (antagonism) は種々の実験系で観察され  
ている<sup>20)</sup>。

第二に IFN $\beta$  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<sup>21)</sup>。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 $\beta$  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<sup>22)</sup>。例えば IFN $\beta$  は  
DC の分化成熟を促進して、CD4<sup>+</sup> T 細胞による  
IFN $\gamma$  と IL-10 の産生を誘導する<sup>23)</sup>。

第三に IFN $\beta$  は活性化自己反応性 T 細胞の  
BBB 通過を抑制する。IFN $\beta$  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<sup>24)</sup>。IFN $\beta$  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<sup>25)</sup>。IFN $\beta$  は EC の  
物質輸送・通過能を低下させる<sup>26)</sup>。IFN $\beta$  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<sup>27)</sup>。

第四に全身投与した IFN $\beta$  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 $\beta$ は培養astrocytesではIFN $\gamma$ 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<sup>28,29)</sup>。IFN $\beta$ 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<sup>30)</sup>。

#### 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 $\beta$ 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<sup>31)</sup>。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<sup>32)</sup>。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<sup>33)</sup>。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<sup>34)</sup>。またG-CSF投与でEAEが軽症化し、Ig Fc $\gamma$ -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<sup>34)</sup>。

遺伝子アレイはMSにおけるIFN $\beta$ 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 $\beta$ によるinterferon-regulatory factor IRF-7とpleiotrophinの上昇、IFN $\gamma$ によるIRF-1とICAM-1の上昇を認めた<sup>29)</sup>。WandingerらはRRMSと健常者のPBMCをIFN $\beta$ 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<sup>22)</sup>。著者らは13例のRRMSでIFN $\beta$ 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 $\beta$ 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<sup>35)</sup>。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 $\gamma$ (T), TNF $\alpha$ (non-T)の上昇傾向を認めた。この所見はIFN $\beta$ は必ずしも明確なTh2 shiftを誘導しないという見解<sup>22)</sup>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 $\beta$ 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 $\beta$  (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 はウイルス感染に応答して IFN $\alpha/\beta$  産生を増幅する制御因子である<sup>36)</sup>。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<sup>37)</sup>。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<sup>+</sup>T 細胞による結核菌抵抗力が減弱する<sup>38)</sup>。TNFAIP6 は TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  により誘導される分泌蛋白質で抗炎症作用を呈する<sup>39)</sup>。すなわち IFN $\beta$  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<sup>40)</sup>。

最近著者らは PBMC を IFN $\beta$  (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 $\beta$  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 $\beta$  は一連の炎症性サイトカイン(IL-6, IL-15, OPN, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ )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<sup>41,42</sup>. 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 $\beta$  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 $\beta$  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<sup>43</sup>. 多くは著者らの同定した *in vivo* IRG<sup>39</sup> 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<sup>44</sup>.

#### 4. 遺伝子アレイによる MS の IFN $\beta$ 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 $\beta$  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<sup>45</sup>. 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と, 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 $\beta$  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 $\beta$  治療後に TGF $\beta$ -stimulated protein TSC22 の発現上昇を認めた<sup>39</sup>. 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 $\beta$  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<sup>46</sup>. MMP-9 は IFN $\beta$  で低下し, GA では上昇した.

van Boxel-Dezaire らは 26 例の IFN $\beta$  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<sup>47</sup>. 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 $\beta$  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<sup>48</sup>. 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<sup>49)</sup>。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<sup>50)</sup>。Baranzini らは IFN $\beta$  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<sup>51)</sup>。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 $\beta$  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ァイルを、1,259 cDNA microarray (Hitachi Life Science) を用いて解析した<sup>52)</sup>。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 $\beta$  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<sup>52)</sup>。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 群は脳眼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 $\beta$  治療効果の予測に有用であると考えられた。

#### おわりに

IFN $\beta$  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 $\beta$  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、吉池史子先生、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。

#### 参考文献

- 1) The IFN $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$ . *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)  $\beta$  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- $\gamma$ . *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  $\alpha/\beta$  and  $\gamma$ -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- $\beta$  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  $\alpha/\beta$ -producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 192: 219-225, 2000.
  - 24) Stone LA, et al: The effect of interferon- $\beta$  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- $\beta$  stabilizes barrier characteristics of brain endothelial cells in vitro. *Ann Neurol* 56: 192-205, 2005.
  - 27) Stüve O, et al: Interferon  $\beta$ -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- $\beta$  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 $\beta$  vs IFN $\gamma$  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  $\beta$ -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- $\alpha$ -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  $\beta$ -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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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  $\beta$ -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<sup>-/-</sup> 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 $\beta$  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)

## 特集 多発性硬化症研究・治療の現状2006

### 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\*

三宅幸子\*\*

多発性硬化症などの自己免疫疾患では、免疫制御細胞が病態のコントロールに重要である。免疫制御細胞としては、 $CD4^+CD25^+$ T細胞などの制御性T細胞、IL-5やIL-13を産生するNK2細胞、Th2サイトカインを産生する $CD4^+$ NKT細胞などが報告されている。特にNKT細胞については、合成糖脂質を用いて特異的に刺激することが可能である。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は、合成糖脂質リガンドのひとつであるOCHにより抑制され、NKT細胞の機能制御が新規の治療戦略となる可能性が期待される。

キーワード：NKT細胞，NK細胞，制御性T細胞

#### はじめに

多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) は、自己の髄鞘抗原に対する免疫寛容が破綻して起こる自己免疫疾患と考えられている。自己抗原へのT細胞の免疫寛容により、まず胸腺での自己反応性細胞の除去が起こる (中枢性寛容)。しかし、clonal deletion は完全でないため、それを逃がれた自己反応性T細胞が末梢に存在する。末梢では、これらの自己反応性T細胞が自己抗原に対して反応しない、もしくは刺激に対するサイトカイン産生能の変化などが起こって組織障害を起こさない、というような機構 (末梢性寛容) があると考えられる。この末梢での免疫寛容を維持する機構の一つとして、様々な免疫調節細胞による制御が注目されている。多発性硬化症は、一般に再発と寛解を繰り返す疾患であり、その病態の変化にはこれら免疫調節細胞の役割が注目されている。本稿では、NKT細胞、NK細胞、抑制性T細胞について、自己免疫疾患との関連と、それらの細胞を利用した治療法開発について概説する。

#### I. NKT細胞

NKT細胞は、NKマーカーを発現するT細胞であり、肝臓や骨髄に多く存在している<sup>1,2)</sup>。その多くはT細胞受容体 (TCR) アルファ鎖に可変性のない invariant 鎖 (マウスでは  $V\alpha 14J\alpha 18$ 、ヒトでは  $V\alpha 24J\alpha 18$ ) を発現し、限られた  $V\beta$  遺伝子 (マウスでは  $V\beta 8.2$ ,  $V\beta 7$ ,  $V\beta 2$ 、ヒトでは  $V\beta 11$ ) と会合するため、TCRの可変性が乏しい。また、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I 類似の MHC クラス 1b 分子である CD1d 分子に提示された糖脂質を、抗原として認識する。CD1 分子は、MHC 分子と異なり多様性がないため、同一種内では共通であるが、このことは治療の標的として考えた場合は有利である。CD1d 分子は、抗原結合溝は極めて疎水性である。抗原結合溝が疎水性であること、NKT細胞の発生が抗原関連トランスポーター (TAP) 非依存性であること、他の CD1 ファミリー分子が結核菌細胞壁の構成脂質であるミコール酸や、レプラ菌の細胞壁糖脂質であるリポアラビノマンナン (LAM) を抗原提示することなどから、CD1d に

2006年5月2日受稿

\* Therapeutic potential for targeting regulatory cells for the treatment of multiple sclerosis.

\*\* 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 (〒187-8502 小平市小川東町4-1-1) Sachiko MIYAKE : Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan.  
0001-8724/06/ ¥500/論文/JCLS

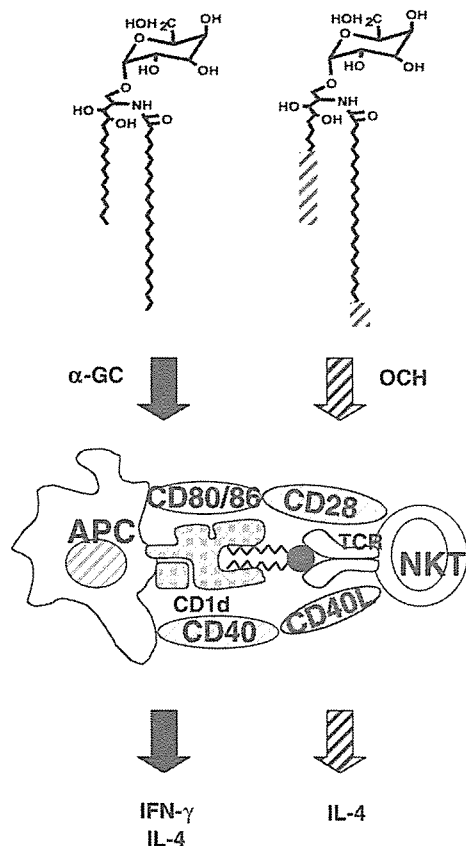


図1 NKT細胞

NKT細胞は、多型性のないCD1d分子に提示された糖脂質を抗原として認識する。多種類のサイトカインの迅速な産生能のために、多くの免疫調節に関与している。生体内では、内在性の自己抗原を認識していると考えられている。実験的には $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GC)が汎用されている。NKT細胞の特定の機能を引き出す合成糖脂質の探索がさかんに行われている。OCHは、Th2サイトカイン産生を選択的に誘導し、Th1優位な自己免疫を抑制する。

抗原提示を受けるNKT細胞も、蛋白ではなく糖脂質をリガンドとして認識すると考えられた。直接的な証明としては、NKT細胞のリガンドとして、谷口らが海綿の成分である $\alpha$ -ガラクトシルセラミド( $\alpha$ -GC)がNKT細胞のリガンドとなることを発見したことである(図1)<sup>3)</sup>。しかし、 $\alpha$ -GCは哺乳類の体内に存在することは証明されておらず、ヒトの臍帯血中のNKT細胞や、Germ freeマウスのNKT細胞もすでにメモリーマーカーが陽性であることから、生体内では何らかの自己抗原を認識しているのではないかと考えられている。これまで内因性抗原としては、ガングリオシ

ドGD3、Glycosylphosphatidylinositol (GPI)、Phosphoethanolamine (PE)などが報告されているが、いずれもNKT細胞ハイブリドーマのごく一部が反応する程度で、本当にこれらが内因性抗原として機能しているのかどうかについてはよくわからないといっているであろう。最近イソグロボシドが有力な抗原として示された<sup>4)</sup>ので、今後はこの抗原がどのようにNKT細胞の機能に関与するかの研究が待たれる。また、外来抗原も、Leishmania由来のglycoinositol phospholipids (GIPLs)やlipophosphoglycan (LPG)、Sphingomonas由来のglycosphingolipid (GSL)などが報告されており、NKT細胞は、内因性抗原に加え、外来の菌体成分も抗原として認識することがわかってきた。機能的な特徴としては、TCRを介した刺激によりIL-4、IFN- $\gamma$ を含む多くのサイトカインを短時間で大量に産生する。NKT細胞は、活性化される以前からこれらのサイトカインのmRNAが細胞内で産生されており、このために刺激に対して迅速に、大量のサイトカインを産生することができると考えられる。NKT細胞は、その多彩な機能から感染症、癌免疫、移植など様々な場面でその免疫調節機能が注目されているが、本稿では特に自己免疫疾患であるMSにおける役割を中心に述べる。

1. 自己免疫疾患とNKT細胞

NKT細胞は、MSのみならず、I型糖尿病、進行性全身性硬化症、関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)、シェーグレン症候群などの自己免疫疾患の末梢血において、その数が減少していることが報告されている<sup>1,5)</sup>。またこれらの全身性自己免疫性疾患では、NKT細胞の代表的な糖脂質リガンドである $\alpha$ -GCに対する反応が低下していることが報告されたほか、I型糖尿病から樹立したNKT細胞クローンは、IFN- $\gamma$ 産生に傾いていることなど機能的な異常も報告され、NKT細胞が自己免疫疾患病態に何らかの形で関与することが推測されている<sup>1,5)</sup>。

MSでは、荒木・山村らが寛解期にあるMS患者では、NKT細胞は健常人と比較して減少しているが、再発期にはNKT細胞の減少はむしろ軽度であることを報告している<sup>6)</sup>。この際、減少しているのはCD4、CD8を発現しないダブルネガティブ(DN)のNKT細胞であり、CD4陽性NKT細胞は寛解期、再発時ともに減少していなかった。サイトカイン産生に関しては、DN-NKT細胞では寛解期にIL-4、IFN- $\gamma$ ともに産生の低下がみられたが、CD4陽性NKT細胞では寛解期にむしろIL-4の産生亢進がみられた。実際に、自己免疫疾患においてNKT細胞がどのような機能を果たしているかについては不明であるが、MS寛解期には



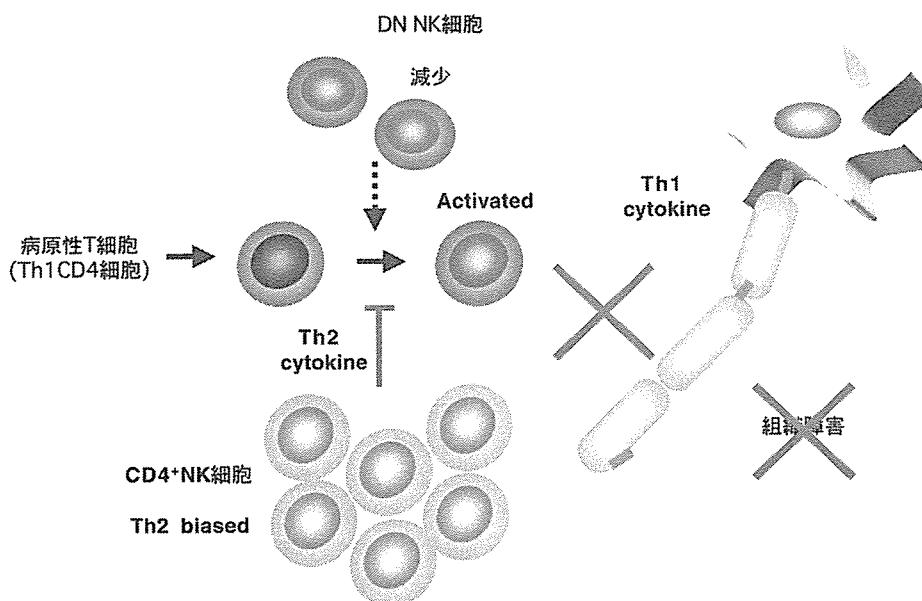


図2 多発性硬化症におけるNKT細胞の役割に関する仮説

多発性硬化症では、Th1 サイトカインを主に産生する DN NKT 細胞は減少しているが、CD4 陽性 NKT 細胞は比較的保たれている。この CD4 陽性 NKT 細胞は、健康人より Th2 サイトカイン産生が増強している。これらの機序により、病原性 Th1 細胞の抑制が行われていると考えている。

IFN- $\gamma$ などのサイトカインを産生する DN-NKT 細胞数が減少し、DN-NKT 細胞から産生されるサイトカインも減少していた。また、それに加えて残存している CD4 陽性 NKT 細胞の IL-4 産生能が上昇していることを考えると、MS 寛解期において NKT 細胞は疾患を抑制するように働いていることが推定される (図2)。

## 2. NKT 細胞と自己免疫疾患モデル

実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) は、MS の動物モデルで、Th1 細胞が介在する自己免疫病である。EAE における NKT 細胞の役割については、ノックアウトマウスを用いた研究から増悪、不変、改善と異なる研究結果が報告されている。自験データでは、NKT ノックアウトマウスでは EAE は軽度増悪し、疾患抑制に関与していることが示唆された。NKT 細胞の代表的な糖脂質リガンドである  $\alpha$ -GC は EAE を抑制しなかったが、サイトカイン・ノックアウトマウスなどを使った一連の解析から、 $\alpha$ -GC が EAE に無効である理由は、NKT 細胞に Th1 抑制的な IL-4 だけでなく、Th1 促進的な IFN- $\gamma$  の産生を促すためであると考えられた<sup>7)</sup>。そこで、NKT 細胞に IL-4 だけを産生させる糖脂質リガンドの探索を試み、 $\alpha$ -GC のスフィンゴシン鎖の短縮体である OCH がこのような性質を持つことがわかった<sup>8)</sup> (図1)。その選択的な IL-4 誘導能に一致して、

OCH 投与により EAE は強く抑制された。その後  $\alpha$ -GC の投与方法の違いで EAE が抑制されるという報告が出されたが、 $\alpha$ -GC の刺激による治療効果については見解が一致していない。

OCH は、NKT 細胞を刺激して Th2 サイトカインを選択的に産生させる合成糖脂質である。その性質から、EAE のほかにも、関節リウマチモデルであるコラーゲン関節炎 (CIA)、I 型糖尿病モデルである NOD マウスにおける糖尿病、炎症性腸炎モデルであるデキストラン誘導性腸炎など、Th1 細胞が病態悪化を引き起こす臓器特異的の自己免疫疾患モデルを抑制する。これらのモデルでは、自己抗原反応性 T 細胞の免疫応答を、Th2 に偏倚させることによって病態を抑制すると考えられる。OCH が、Th2 サイトカインを選択的に産生させる機序としては、 $\alpha$ -GC に比較して CD1d との結合安定性が弱いために、TCR から入る刺激時間が短く、そのために IFN- $\gamma$  産生に必要な c-Rel などの誘導が十分に起こらないことが一因となる<sup>9)</sup>。また、OCH による刺激では、NKT 細胞上の CD40L の発現誘導が弱い。上記の機序により NKT 細胞からの IFN- $\gamma$  産生が少ないことに加え、OCH 刺激では CD40/CD40L を介した刺激が弱く、樹状細胞などの抗原提示細胞からの IL-12 の産生、それに引き続く NK 細胞からの IFN- $\gamma$  産生が少なくなる。OCH の刺激では、IL-4 などの Th2

サイトカインの産生は良く保たれているために、全体としてTh2サイトカインが選択的に誘導されることになる<sup>10)</sup>。一方、 $\alpha$ -C-GCは抗原提示細胞からのIL-12産生を増強することによって、NK細胞からのIFN- $\gamma$ 産生を強く引き起こすと考えられている。

OCHは、ヒトのNKT細胞も反応し、末梢血から、OCH反応性のクローンを樹立することができる。また、OCHは、経口投与で自己免疫モデルの病態抑制効果を認めることから、経口治療薬として臨床応用される可能性が期待される。

## II. NK細胞

NK細胞は、細胞内顆粒を含む大型リンパ球で、自然免疫を担う細胞として知られている。サイトカイン産生や細胞障害活性などにより、感染や癌、移植拒絶反応など多くの免疫反応に関与する細胞である。本稿では、自己免疫疾患やそのモデル動物で行われた研究を概説し、多発性硬化症におけるNK細胞の関与についての研究を紹介する。

### 1. NK細胞と自己免疫

NK細胞は、SLEやRA、I型糖尿病などの自己免疫疾患では、末梢血中のNK活性の低下や数の減少が報告されている<sup>11-13)</sup>。RAでは、関節局所ではNK細胞のフェノタイプが末梢血とは異なり、IL-12、IL-15等のサイトカイン刺激によりIFN- $\gamma$ 等のサイトカイン産生能が高いという報告があり、NK細胞が局所でエフェクター細胞として病態形成に関与している可能性もある。NK細胞の病態に与える影響については、主に動物モデルを用いて研究がなされている。多発性硬化症の動物モデルであるEAEでは、マウスでもラットでも、抗体によるNK細胞除去により、病態が悪化することが報告されている<sup>14,15)</sup>。ループスモデルのひとつであるC57BL/6.lprマウスでは、抗ds-DNA抗体産生B細胞が、抗NK1.1抗体によるNK細胞の除去により増加し、NK細胞移入で減少すると報告された。

いずれの結果も、NKT細胞を含む細胞群を除去もしくは移入しているため、NK細胞のみの作用かどうかについては今後の検討が必要であるが、NK細胞が自己免疫病態抑制的に働いていることを示唆する。また、自験データでは関節リウマチモデルであるCIAでも、NK細胞除去で関節炎は増悪し、活性化NK細胞移入で軽減した。このように、NK細胞が疾患抑制的に働くことが想定される一方、重症筋無力症のモデルでは、NK細胞除去によって病態は軽減することが報告されている<sup>16)</sup>。以上の結果から、自己免疫モデルではNK細胞は保護的に働く場合もあるが、エフェクター細胞

として病態形成に関与する場合もあるようである。

### 2. 多発性硬化症におけるNK細胞

MSにおけるNK細胞についての報告としては、NK活性が低下しているとする報告と、正常人と違いがないという報告がある。さらに再発時には低下するが、寛解期には正常になるという報告、一卵性双生児で罹患していないヒトについてはNK活性が正常という報告などを考えると、疾患活動性によりNK活性が変化していることが推定される。高橋らは、MS寛解期には細胞の数は変化がないが、NK細胞のIL-5産生が亢進しており、再発時にはこの傾向が失われたことを報告した<sup>17)</sup>。NK細胞も、ヘルパーT細胞がその産生するサイトカインによってTh1とTh2細胞に大別されるように、IFN- $\gamma$ 、IL-10を産生するNK1細胞とIL-5、IL-13を産生するNK2細胞があることがわかってきた。したがって、MS寛解期では、NK細胞がNK2型になって、Th1細胞の活性化を抑制している症例があることが推定される。NK2細胞ではFas抗原を弱く発現することが報告されているが、MS寛解期のNK細胞ではFas抗原が発現している症例がある。このような症例では、末梢血からNK細胞を除去して髄鞘蛋白抗原であるmyelin basic protein (MBP)に反応して、IFN- $\gamma$ を産生するT細胞をフローサイトメトリーで検出できるようになる。この現象は、健康人やFas抗原を高発現していない症例ではみられず、MSの一部の症例では寛解期にNK細胞が自己反応性T細胞を抑制していることが示唆される<sup>18)</sup>。これらの結果から筆者らは、MSの寛解については、自己反応性T細胞が鎮静化している寛解と、自己反応性T細胞は不安定な状態にあるがNK細胞等のような免疫制御細胞が抑制することによって、ようやく寛解状態を保っている“くすぶり型寛解”があることを想定している(図3)。“くすぶり型寛解”のような不安定な寛解の場合、ストレスやウイルス感染を契機にNK細胞のフェノタイプが変化し、再発にいたる可能性がある。現時点では、NK細胞の自己反応性T細胞抑制の機序は、サイトカインによるのか、あるいは樹状細胞などに対する細胞障害によるのか、他の機序があるのかまだわかっていない<sup>18)</sup>。また、NK細胞の数や機能異常が自己免疫疾患の発症因子になるかどうかについては不明だが、これまでの報告ではNK活性は病勢の変化に影響されるようなので、ストレスやウイルス感染などの外的要因を契機に病態が増悪するような背景には、NK細胞の関与がある可能性がある。

NK細胞の賦活化が治療に関与する例としては、抗IL-2受容体 $\alpha$ 鎖抗体(daclizumab)による治療があげら

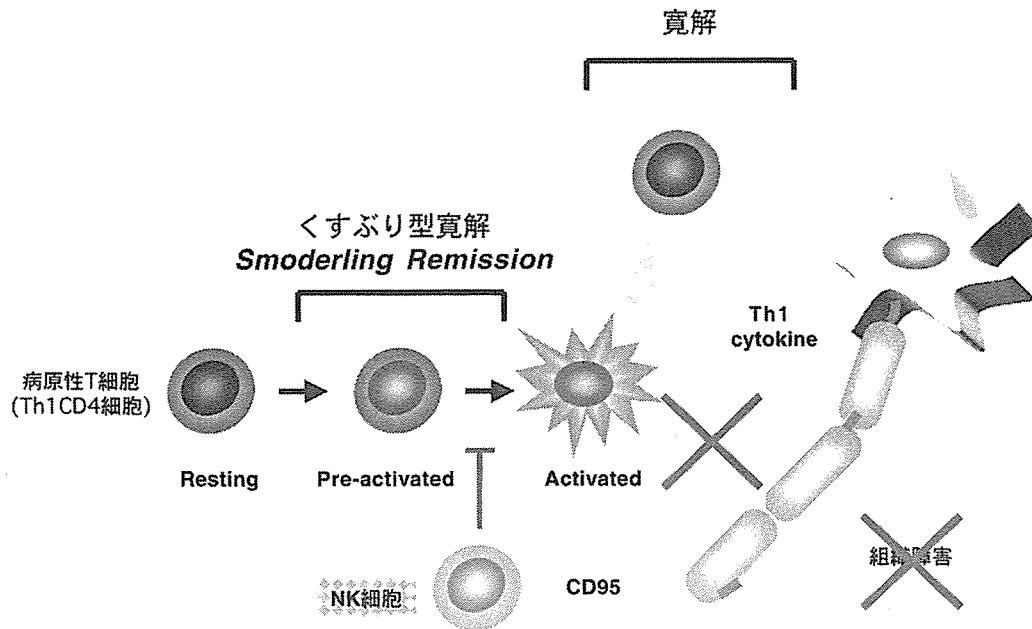


図3 NK細胞による多発性硬化症の病態制御に関する仮説

多発性硬化症の寛解期と再発期のNK細胞のフェノタイプを解析することにより、多発性硬化症の寛解には、自己反応性病原性T細胞がおちついた状態にある寛解と、自己反応性病原性T細胞は活動性だが、免疫制御細胞などの働きによってその活動が抑制されている状態にある、くすぶり型寛解があるのではないかと想定している。

れる<sup>19)</sup>。Daclizumabのphase II治療においては、NK細胞の増殖とT細胞の軽度の減少がみられ、この増加が治療効果と相関していたことが報告された。Daclizumabの今後の治療効果と、その作用機序についての今後の報告が待たれる。

### III. 抑制性T細胞

#### 1. 抑制性T細胞

末梢において、自己反応性T細胞の活性化を抑制しているT細胞亜集団の存在は、多くの実験系において指摘されてきた。特に1995年に、坂口らが $CD4^+CD25^+$ T細胞を抑制性T細胞のひとつの細胞集団として同定してから、制御性T細胞の研究が再びクローズアップされるようになった<sup>20-22)</sup>。抑制性T細胞は、 $CD4^+CD25^+$ T細胞以外にも多彩な細胞の存在が知られているが、CD4陽性細胞ではここ数年で最も精力的に研究されてきた $CD4^+CD25^+$ T細胞について概説する。CD25分子(IL-2 $\alpha$ 鎖)は、T細胞の活性化マーカーとして捉えられてきたが、未感作マウスにおいて、CD4陽性T細胞の5~10%がすでにCD25分子を発現している。坂口らは、BALB/cマウス脾臓細胞からCD25陽性T細胞を除去した細胞を同系ヌードマウス

に移入すると、様々な臓器に自己免疫病が誘導され、細胞移入の際に $CD4^+CD25^+$ T細胞を戻すと自己免疫病が起らなくなることから、 $CD4^+CD25^+$ T細胞が自己反応性T細胞を抑制することを示した<sup>21)</sup>。

$CD4^+CD25^+$ T細胞は、マウスではCD5、LFA-1、CD44、ICAM-1等を発現していることから、一度刺激を受けた細胞と推定される。 $CD4^+CD25^+$ T細胞は*in vitro*で抗原提示細胞存在下に $CD4^+CD25^-$ T細胞の増殖を阻害する。この抑制機構には、 $CD4^+CD25^+$ T細胞、抗原提示細胞、 $CD4^+CD25^-$ T細胞の細胞接触が必要とされる。一方、 $CD4^+CD25^+$ T細胞の自己反応性T細胞の抑制機序にはIL-10やTGF- $\beta$ の関与も報告されている。また $CD4^+CD25^+$ T細胞は、CTLA-4やTNF受容体ファミリーに属するGITR分子を発現しており、これらの分子に対する抗体で $CD4^+CD25^+$ T細胞による抑制作用が中和されることが報告されている。遺伝的自己免疫病であるIPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome)と、X染色体劣性遺伝で自己免疫症状を呈するScurfyマウスの疾患原因遺伝子としてクローニングされたFoxp3は、 $CD4^+CD25^+$ T細胞に特異的に発現する分子として報告された。CD25、CTLA-4、

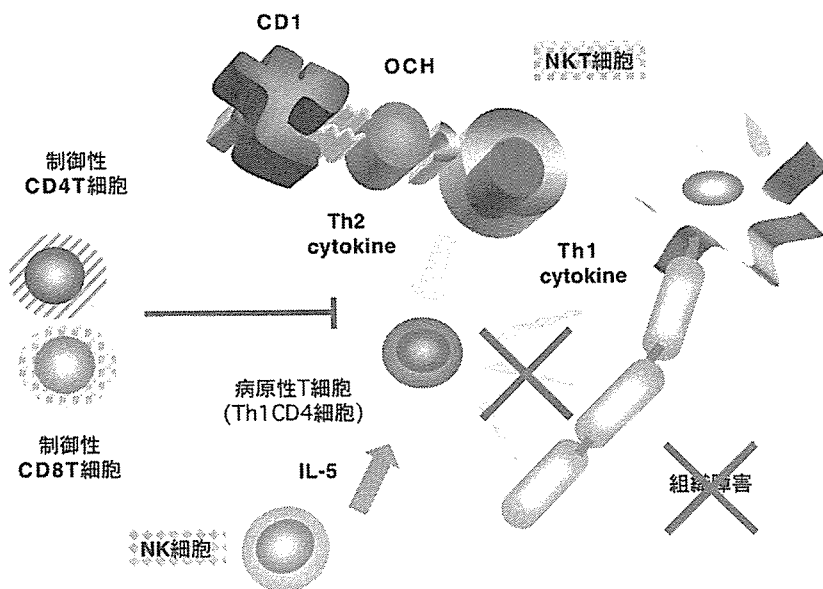


図4 様々な免疫制御細胞による多発性硬化症の病態制御に関する仮説  
多発性硬化症の病態調節には、様々な免疫制御細胞が関与していることが想定される。寛解期では、これら多彩な細胞が相互作用しながら再発を抑制していると考えられる。

GITR 等と比較して、内在性制御性 T 細胞の特異性の高いマーカーであると考えられている。

Foxp3 は、 $CD4^+CD25^{-}T$  細胞に強制発現させると  $CD4^+CD25^{+}T$  細胞と同様の表現型、機能を獲得し、 $CD4^+CD25^{+}T$  細胞の分化のマスター遺伝子と考えられる。マウスでは  $CD25^{+}$  細胞除去脾細胞の移入で起こる胃炎、卵巣炎、甲状腺炎等のほか、EAE でも疾患抑制に働くことが示されている<sup>23)</sup>。その他、CIA、NOD マウスにおける I 型糖尿病など、様々な自己免疫モデルでも  $CD4^+CD25^{+}T$  細胞が病態を抑制することが報告されており、 $CD4^+CD25^{+}T$  細胞は自己免疫疾患全般に関与していると考えられる。

CD8 細胞は、以前から免疫抑制作用があることが報告されていた。MHC クラス 1b 分子である Qa-1 分子を認識する CD8 T 細胞は、T 細胞ワクチンやスーパー抗原を用いた実験系で、T 細胞受容体  $\beta$  鎖特異的に CD4 T 細胞を抑制し、EAE の制御にも関与することが報告されている<sup>24)</sup>。その他、CD122 陽性 CD8 細胞などの様々な制御性細胞が報告されているが、多発性硬化症との関連についてはまだよくわかっていない<sup>25)</sup>。

## 2. 多発性硬化症における抑制性 T 細胞

ヒトにおける  $CD4^+CD25^{+}T$  細胞は、CD25 の発現が高い  $CD4^+CD25^{high}T$  細胞が、制御性 T 細胞であることが報告されている。多発性硬化症における  $CD4^+$

$CD25^{high}T$  細胞は、末梢血では健常人と比較して数に変化はないが<sup>3)</sup>、抑制機能が減弱していることが報告された<sup>26,27)</sup>。しかし、近藤らは Foxp3 の発現している細胞では、CD25 の発現はむしろ低く、Foxp3 陽性細胞は多発性硬化症では健常人よりも少ないことを見出し、自己免疫疾患患者でみられる  $CD4^+CD25^{high}T$  細胞はエフェクター細胞を含むために、このような結果の違いが出たと推定している。このように、ヒトでの制御性  $CD4^+CD25^{+}T$  細胞の解析法にはまだ問題があり、抑制機能を持つ細胞を選択的に同定できるマーカーが必要である。治療への応用では、制御性 T 細胞を *in vitro* で増殖させて投与する方法が研究されているが、臨床応用についてはまだ未知数である。制御性 T 細胞を特異的に賦活化できる表面分子抗原か、サイトカイン等が特定されれば、臨床応用に近づく可能性もある。

## おわりに

生体内では多くの細胞が協調して自己免疫を抑制し、外来抗原への免疫を効率的に行っていると考えられる(図4)。様々な免疫制御細胞が報告されているが、各細胞の特徴、作用機序、相互作用など複雑で不明な点が多く、さらなる研究が必要であろう。今後、さらに新しい制御性細胞も同定されるであろうし、その細胞間のネットワークが解明されれば、選択的な免疫調