

率が異なるが、その機序としてはIgGサブクラスの吸着率が異なることによる可能性が考えられる。

今後、アフェレシス療法の施行に際して1回の血漿処理量・施行回数を明確に規定することが必要と思われる。またIAPPにおけるIgGサブクラスの吸着

率に差異が生じる機序の解明が必要である。

## 7. 結論

免疫吸着 (TR-350) 療法は自己抗体のIgGサブクラスにより除去能が異なる。

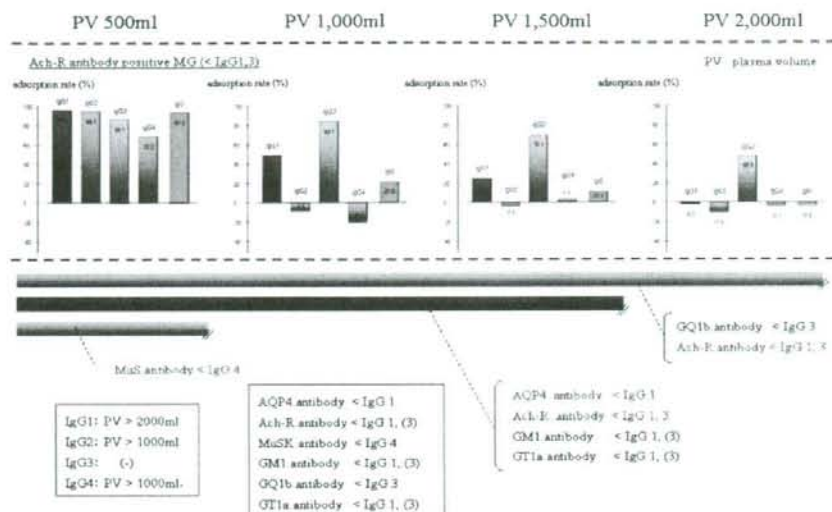


Fig. 1. The association between IAPP plasma volume and the adsorption rate of IgG subclass in Ach-R antibody positive myasthenia gravis  
Plasma volume and the several auto-antibody in the neuroimmunological disorders.

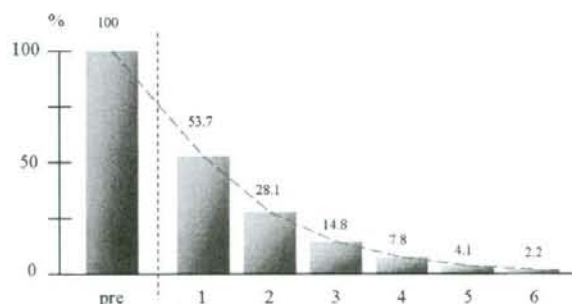


Fig. 2. The relationship between the adsorption rate of IgG and the number of IAPP

## 8. 研究発表

### (1) 国内(主なもの)

口頭発表 4 件 / 原著論文による発表 5 件

### ・ 発表論文

1. 野村恭一: Critical care of Guillain-Barre

Syndrome, Neurological and Neurosurgical

Intensive Care, 4th ed p227-243, ニューロ

ICU : 有賀 徹, 堤 晴彦, 坂本哲也 監訳

2006, Medical Science International (MEDSi)

2. 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 巻(2号):102-105

3. 野村恭一, 齊藤豊和, 楠 進: ギラン・バレー症候群治療のあり方 -治療ガイドラインの発表を踏まえて-Progress in Medicine 25:419-426, 2005
4. 王子 聡, 野村恭一: ステロイド・パルス療法と血液浄化療法の適応, 日本臨牀, 66(6): 1127-1132, 2008.
5. 王子 聡, 野村恭一: 内科医のための脳疾患講座, アフェレシス, ブレインメディカル Vol.20(2), 2008.

・学会発表

1. 王子 聡, 伊崎 祥子, 小島 美紀, 吉田 典史, 山里 将瑞, 島津 智一, 大貫 学, 富岳 亮, 野村 恭一: 多発性硬化症に対する免疫吸着療法の有用性と血清サイトカインの変動. 第 19 回日本神経免疫学会 2007
2. 王子 聡, 伊崎 祥子, 三井 隆男, 野村 恭一, 岡田 奈三, 黒田 厚介, 山口 由美子, 金山 由紀, 小川 智也, 松田 昭彦, 松村 治: 免疫性神経疾患に対する血液浄化療法による血圧低下. 第 28 回日本アフェレシス学会 2007
3. 野村 恭一: 多発性硬化症の治療とアフェレス. 第 28 回日本アフェレシス学会 シンポジウム 2007
4. 王子 聡, 伊崎 祥子, 三井 隆男, 野村 恭一, 岡田 奈三, 黒田 厚介, 山口 由美子, 金山 由紀, 小川 智也, 松田 昭彦, 松村 治: 免疫性神経疾患に対する IAPP 療法の血漿処理量と IgG サブクラス. 第 29 回日本アフェレシス学会 2008

(2) 海外(主なもの)

口頭発表 1 件 / 原著論文による発表 2 件

・ 発表論文

1. Nomura K, Mitsui T, Okuma A, Kinoshita S, Tomioka R, Takasago Y : Tacrolimus treatment in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy refractory to intravenous immunoglobulin and serum cytokines. Neurology. 2007 (in press)
2. Kyoichi Nomura, Takao Mitsui, Yukako Takasago, Ryo Tomioka, Kunio Shimazu: Periodical immunoadsorption plasmapheresis correlates immunological abnormality and reduces relapses in relapsing-remitting multiple sclerosis. Therapeutic Plasmapheresis, 2007 投稿

・学会発表

1. Ohji. S, Izaki. S, Mitsui. T, Iguchi. T, Takizawa. K, Tomioka. R, Nomura. K : Efficacy of IAPP therapy for steroid resistance Multiple Sclerosis and Serum cytokines, ECTRIMS2007
9. 知的財産権の出願・登録状況  
特許取得・実用新案登録: なし
10. 謝 辞  
本研究は厚生労働省「難治性疾患克服研究事業」からの補助を受け行った。深謝いたします。
11. 参考文献

1. 渋谷統寿ほか: 神経疾患のアフェレシス, 新版アフェレシスマニュアル: 難治疾患の治療革命, クリニカルエンジニアリング別冊, 日本アフェレシス学会編

## 多発性硬化症における血管内皮前駆細胞の血中動態の解析

研究分担者 郡山達男 1)

共同研究者 越智一秀 1), 曾我潤子 2), 東 幸仁 3), 松本昌泰 1)

### 研究要旨

多発性硬化症(multiple sclerosis, MS)の病変形成における血管内皮細胞の傷害と修復における血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell, EPC) の意義を解析した。そのために、MS患者血中においてEPCを測定し、血管内皮細胞の活性化/傷害の指標であるvon Willebrand因子 (vWF) とthrombomodulin (TM) およびEPCの動員に關与するとされているケモカインのstromal cell-derived factor-1 (SDF-1), サイトカインのgranulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) および増殖因子のvascular endothelial growth factor (VEGF) とhepatocyte growth factor (HGF)との關連を検討した。対象は、増悪・寛解型MS/neuromyelitis optica (NMO) 患者52例を用いた。MS/NMOにおいて、急性期は再発から1カ月未満、回復期は2ヶ月以降から3ヶ月未満、寛解期は3カ月以降とした。対照として年齢を一致させた健常者28名を用いた。血中EPCは、flow cytometryを用い、CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup>を計数した。その結果、血中EPC数は急性期MS/NMOでは対照に比べて有意に低値であり、回復期や寛解期では対照と有意差がないことを明らかにした。MS/NMOの血中EPC数は血管内皮細胞の傷害の指標である血清TM濃度との間に有意の關連がみられたことから、MS/NMOにおいて血中EPCは血管内皮細胞の傷害を反映して動員されることが示唆された。MS/NMOにおいて、血中EPC数と血漿SDF-1濃度および血漿HGF濃度との間に關連の傾向がみられ、また血清TM濃度と血漿SDF-1濃度および血漿HGF濃度との間に有意の關連がみられた。これらの結果から、MS/NMOにおいて血中EPCは血管内皮細胞の傷害を反映して上昇したSDF-1およびHGFを介して動員されることが示唆された。

### 研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis, MS)の病態は血管内皮細胞がその本態である血液脳関門の破綻とそれに引き続くマクロファージとTリンパ球の病変部位への浸潤で特徴づけられる。このようにMSの病変形成と修復において血管内皮細胞は重要な役割を果たしている。

1997年にAsahara Tらにより成人の末梢血中に血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell, EPC) が存在することが見いだされた<sup>1)</sup>。EPCは骨髓で産生され、骨髓から末梢血中に動員

されたEPCは血管内皮細胞に分化し、血管形成や血管内皮機能の維持に關与すると考えられている<sup>2)</sup>。

EPCの骨髓から末梢血への動員には、stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)などのケモカイン、granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)などのサイトカインあるいはvascular endothelial growth factor (VEGF)やhepatocyte growth factor (HGF)などの増殖因子が關与することが報告されている<sup>3)</sup>。

本研究は、MSの病変形成における血管内皮細胞の傷害と修復におけるEPCの意義を解析することを目的とした。そのために、MS患者血中においてEPCを測定し、血管内皮細胞の活性化/傷害の指標であるvon Willebrand因

- 1) 広島大学大学院脳神経内科学
- 2) 広島大学大学院循環器内科学
- 3) 広島大学大学院心臓血管生理医学



子(vWF)とthrombomodulin(TM)およびEPCの動員に関与するとされているケモカインのSDF-1, サイトカインのG-CSFおよび増殖因子のVEGFやHGFとの関連を検討した。

## 研究方法

対象は、増悪・寛解型MS/neuromyelitis optica(NMO)患者52例(年齢:中央値48.9歳,標準誤差2.1歳;女性:35例,男性17例)を用い,そのうち7例は抗aquaporin-4(APQ4)抗体陽性NMO患者であった。MS/NMOにおいて,急性期は再発から1カ月未満,回復期は2ヶ月以降から3ヶ月未満,寛解期は3カ月以降とした。対照として,年齢と性別を一致させた健常者28名(年齢中央値48.3歳,標準誤差2.8歳;女性:17例,男性11例)を用いた。

血中EPCは,flow cytometry(Calibur Flow Cytometer, Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA)を用い,CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup>を計数した<sup>4)</sup>。血管内皮因子として,血管内皮細胞の活性化/傷害の指標である血漿vWF活性は固定血小板法で,血管内皮細胞の傷害の指標である血清TMはELISA法で測定した。EPCの動員に関与する因子として,血漿SDF-1 $\alpha$ ,血清G-CSF,血漿VEGFおよび血漿HGFをELISA法(R&D Systems Inc., Minneapolis, USA)で測定した。

統計解析は,群間比較はWilcoxon検定を,単回帰は分散分析を,重回帰はロジスティック回帰分析を用い, $p<0.05$ を有意とした。

## (倫理面への配慮)

本研究は「臨床研究に関する倫理指針」に則って実施した。被験者に対しては,本研究への参加により期待される効果および利益,不利益,起こりうる危険性を十分に説明し,その内容が理解された上で同意を得た。

## 研究結果

### (1) 対照における血中EPC数と年齢および性別との関連

対照において,血中EPC数と年齢との間に

有意の逆相関がみられた( $F=11.2135$ ,  $p=0.0011$ ,  $n=28$ )。そのため,本研究ではMS群と年齢を一致させた対照群を用いた。なお,血中EPC数に性差はなかった。

### (2) MSとNMOにおける血中EPC数

血中EPC数は,抗APQ4抗体陰性MS患者24例と抗APQ4抗体陽性NMO患者7例との間に有意差がなかった。そこで,本研究では抗APQ4抗体陽性NMOもMSと併せて検討を行った。

### (3) MS/NMOと対照における血中EPC数

血中EPC数は,急性期MS/NMO( $497.0 \pm 107.8/\text{ml}$ , 中央値 $\pm$ 標準誤差;  $n=16$ )では,対照( $691.0 \pm 83.0/\text{ml}$ ,  $n=28$ )に比べて有意に低値であった( $\chi^2=3.94$ ,  $p=0.0471$ ) (図1)。MS/NMOにおいて,血中EPC数は,回復期( $608.5 \pm 124.5/\text{ml}$ ,  $n=12$ )および寛解期( $568.0 \pm 59.2/\text{ml}$ ,  $n=52$ )では対照と有意差がみられなかった。

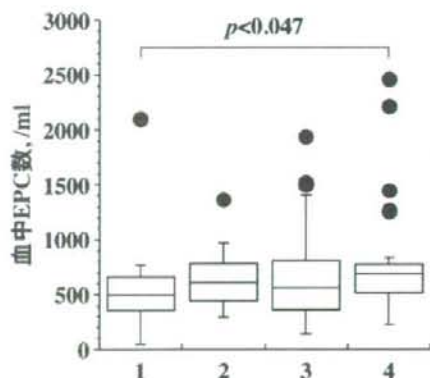


図1 MS/NMOと対照における血中EPC数  
1: 急性期MS/NMO ( $n=16$ ), 2: 回復期MS/NMO ( $n=12$ ), 3: 寛解期MS/NMO ( $n=52$ ), 4: 対照 ( $n=28$ )

### (4) MS/NMOにおける血中EPC数と血管内皮因子との関連

MS/NMOにおいて,EPC数は血清TM濃度との間に有意の関連がみられた( $F=12.2520$ ,  $p=0.0008$ ,  $n=77$ ) (図2)。一方,

血漿vWF活性との間には有意の関連はみられなかった。

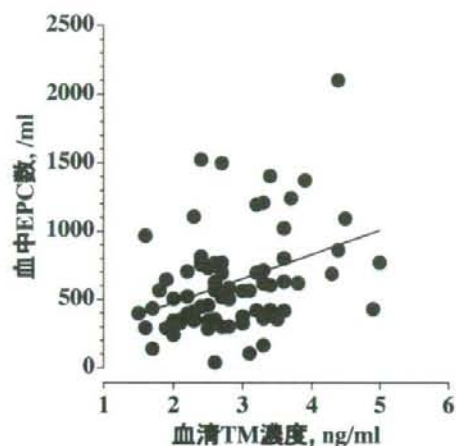


図2 MS/NMOにおける血中EPC数と血清TM濃度との関連

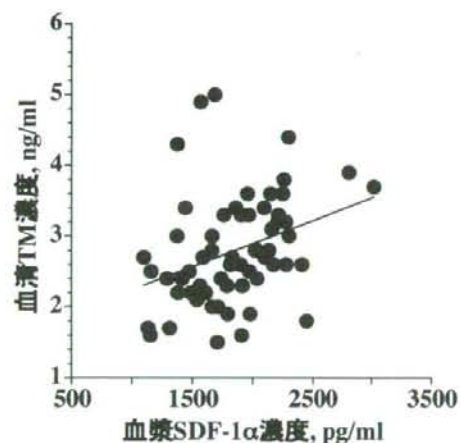


図3 MS/NMOにおける血清TM濃度と血漿SDF-1α濃度との関連

#### (5) MS/NMOにおける血中EPC数とEPCの動員に関与する因子との関連

MS/NMOにおいて、EPC数と血漿SDF-1α濃度および血漿HGF濃度との間に関連の傾向がみられた(それぞれ、 $F=2.8122$ ,  $p=0.0987$ ,  $n=63$ と $F=3.9209$ ,  $p=0.0522$ ,  $n=63$ )が、EPC数と血清G-CSF濃度および血漿VEGF濃度との間に有意の関連はみられなかった。

#### (6) MS/NMOにおける血管内皮因子とEPCの動員に関与する因子との関連

MS/NMOにおいて、血清TM濃度は血漿SDF-1α濃度および血漿HGF濃度との間に有意の関連がみられた(それぞれ、 $F=7.5575$ ,  $p=0.0079$ ,  $n=62$ と $F=33.4624$ ,  $p<0.0001$ ,  $n=62$ ; 図3と図4)が、血清G-CSF濃度および血漿VEGF濃度との間に有意の関連はみられなかった。これに対して、血漿vWFとこれらの因子との間には有意の関連はみられなかった。

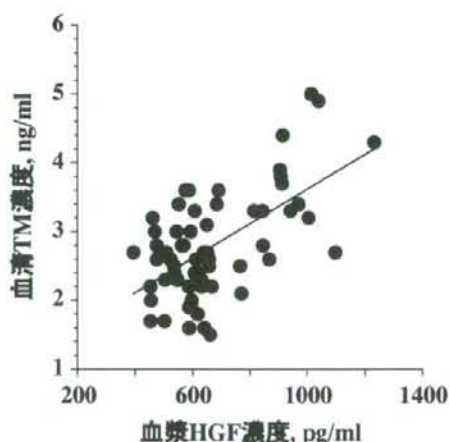


図4 MS/NMOにおける血清TM濃度と血漿HGF濃度との関連

#### 考察

本研究において、血中EPC数は急性期MS/NMOでは年齢を一致させた対照に比べて有意に低値であり、回復期や寛解期では対照と有意差がないことを見いだした。これまで、

MS/NMOあるいは自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)において血中EPCを検討した報告はなかった。従って、本研究は、MS/NMOの病態

にEPCが関与することを初めて明らかにした。

急性期脳梗塞において血中EPC数は、発症7日目をピークに14日目までは有意に増加し、30日目までに基礎値に復帰すると報告されている<sup>5)</sup>。急性心筋梗塞においても7日目をピークに血中EPC数が増加すると報告されている<sup>6)</sup>。これに対して、慢性期脳梗塞<sup>7)</sup>、冠動脈疾患<sup>8)</sup>、膠原病<sup>9)</sup>、などでは血中EPC数は低値であることが報告されている。これらの病態におけるEPCの低下の機序は明らかではないが、(1)骨髄からの動員の減少、(2)血管内皮の傷害部位におけるEPCの消費の増加、(3)血中EPCの半減期の減少、といった機序が単独あるいは組み合わせで関与していることが想定されている<sup>2)</sup>。

本研究において、MS/NMOの血中EPC数は血管内皮細胞の傷害の指標である血清TM濃度との間に有意の関連がみられ、血管内皮細胞の活性化/傷害の指標である血漿vWF活性との間には有意に関連がみられなかった。著者らは活動期MSにおいて血管内皮因子の血漿vWF活性と血清TM濃度が上昇することを明らかにした<sup>10)</sup>。vWFは血管内皮細胞の傷害<sup>11)</sup>のみでなく活性化<sup>12)</sup>においても血中濃度が上昇する。一方、TMは血管内皮細胞の傷害においてのみ血中濃度が上昇する<sup>13)</sup>。これらの結果から、MSにおいてvWFとTMは血管内皮細胞の傷害/活性化に基づく血液脳関門の破綻を反映する指標になると考えられる<sup>10)</sup>。本研究では、MS/NMOにおいて血中EPCは血管内皮細胞の活性化よりも傷害を反映して増加することが示された。血管内皮細胞の傷害は骨髄から血中へEPCを動員することが報告されている<sup>14)</sup>。この血中EPCは傷害された血管内皮細胞を修復すると考えられている<sup>1)</sup>。

本研究では、MS/NMOにおいて血中EPC数と血漿SDF-1濃度および血漿HGF濃度との間に関連の傾向がみられ、また血清TMと血漿SDF-1濃度および血漿HGF濃度との間に有意の関連がみられることを示した。これらの結果から、MS/NMOにおいて血中EPCは血管内皮細胞の傷害を反映して上昇したSDF-1およ

びHGFを介して動員されることが示唆された。血管内皮傷害において、血中EPCの増加と共に血漿SDF-1の上昇がみられることから、血管内皮傷害における血中EPCの動員や傷害部位への遊走にSDF-1が重要な役割を果たしていることが報告されている<sup>14)</sup>。SDF-1は骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cell) のみでなく傷害された血管内皮細胞においても産生される<sup>15)</sup>。一方、HGFは血管内皮細胞の遊走と増殖を促進し、血管形成を誘導する<sup>16,17)</sup>。さらに、HGFはEPCを骨髄から動員することにより血管内皮細胞の修復を促進することが報告されている<sup>18)</sup>。血中HGFは、高血圧<sup>19)</sup>といった動脈硬化の危険因子を有する患者あるいは急性心筋梗塞<sup>20)</sup>や冠動脈硬化<sup>21)</sup>といった血管病変を有する患者で上昇する。血中HGFの上昇は血管内皮傷害にもとづく血管病変の存在や進展を示すと考えられている<sup>19)</sup>。著者らはMSにおいて血管内皮細胞の傷害/活性化を反映して血中HGFが上昇することを報告している<sup>22)</sup>。これらのことから、MS/NMOにおいて血管内皮傷害を反映して上昇したHGFは、血管内皮細胞に直接に作用し、血管内皮細胞の遊走や増殖を促進するとともに血中EPCを動員することにより血管内皮傷害を修復すると考えられる。

## 結論

MS/NMOにおける血中EPCは、急性期に有意に低下し、寛解期には回復する。MS/NMOにおいて血中EPCは血管内皮細胞の傷害を反映して上昇したSDF-1およびHGFを介して動員されることが示唆される。

## 謝辞

抗AQP4抗体を測定していただいた九州大学大学院医学研究院神経内科 松下拓也先生と吉良潤一先生に深謝致します。

## 文献

1) Asahara T, et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.



- Science 275: 964-7, 1997
- 2) Hristov M, et al: Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1185-9, 2003
  - 3) Urbich C, et al: Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 95: 343-53, 2004
  - 4) Umemura T, et al: Aging and hypertension are independent risk factors for reduced number of circulating endothelial progenitor cells. *Am J Hypertens* 21: 1203-9, 2008
  - 5) Taguchi A, et al: Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 109: 2972-5, 2004
  - 6) Shintani S, et al: Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 103: 2776-9, 2001
  - 7) Ghani U, et al: Endothelial progenitor cells during cerebrovascular disease. *Stroke* 36: 151-3, 2005
  - 8) Werner N, et al: Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353: 999-1007, 2005
  - 9) Avouac J, et al: Endothelial progenitor cells and rheumatic disorders. *Joint Bone Spine* 75: 131-7, 2008
  - 10) 郡山達男, ら: 多発性硬化症における血管内皮の活性化・傷害—von Willebrand因子とthrombomodulinを用いた検討—. *臨床神経学* 37: 287-291, 1997
  - 11) Jones DK, et al: Release of von Willebrand factor antigen (vWF:Ag) and eicosanoids during acute injury to the isolated rat lung. *Am Rev Respir Dis* 145: 1410-5, 1992
  - 12) Paleolog EM, et al: Differential regulation by cytokines of constitutive and stimulated secretion of von Willebrand factor from endothelial cells. *Blood* 75: 688-95, 1990
  - 13) Ishii H, et al: Soluble thrombomodulin antigen in conditioned medium is increased by damage of endothelial cells. *Thromb Haemost* 65: 618-23, 1991
  - 14) Garg R, et al: The effect of percutaneous coronary intervention on inflammatory response and endothelial progenitor cell recruitment. *Catheter Cardiovasc Interv* 72: 205-9, 2008
  - 15) Abi-Younes S, et al: The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 86: 131-8, 2000
  - 16) Nakamura Y, et al: Hepatocyte growth factor is a novel member of the endothelium-specific growth factors: additive stimulatory effect of hepatocyte growth factor with basic fibroblast growth factor but not with vascular endothelial growth factor. *J Hypertens* 14: 1067-72, 1996
  - 17) Bussolino F, et al: Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 119: 629-41, 1992
  - 18) Ishizawa K, et al: Hepatocyte growth factor induces angiogenesis in injured lungs through mobilizing endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 276-80, 2004
  - 19) Nakamura Y, et al: A vascular modulator, hepatocyte growth factor, is associated with systolic pressure. *Hypertension* 28: 409-13, 1996
  - 20) Matsumori A, et al: Increased circulating hepatocyte growth factor in the early stage of acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 221: 391-5, 1996
  - 21) Nishimura M, et al: Serum hepatocyte growth factor as a possible indicator of vascular lesions. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 2475-80, 1999
  - 22) 郡山達男, ら: 多発性硬化症の血管内皮細胞の損傷と修復における血管増殖因子の役割. *神経免疫学* 8: 40-41, 2000
- 健康危険情報**  
なし
- 知的財産権の出願・登録状況**  
特許取得: なし  
実用新案登録: なし

## 多発性硬化症における ROR $\gamma$ t 発現細胞の検討

分担研究者 西澤正豊<sup>1)</sup>

共同研究者 河内 泉<sup>1)</sup>、柳川香織<sup>1)</sup>

### 研究要旨

CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> double-negative T (DNT) は、CD1d 拘束性 V $\alpha$ 24/T, MR1 拘束性 V $\alpha$ 7.2/T,  $\gamma\delta$ T をはじめとした innate T (iT) が豊富に含まれる重要な細胞分画である。近年、iT は自然免疫と獲得免疫の橋渡しをすることで自己免疫疾患発症に関与する可能性が示唆されており、注目を浴びている。そこで、多発性硬化症 (MS) の発症機序を解明する目的で、iT を豊富に含む DNT の機能解析を試みた。MS、その他の炎症性神経疾患、健康者由来の単核球に発現する CD3, CD4, CD8, IFN- $\gamma$ , IL-17, Foxp3, ROR $\gamma$ t, T-bet 分子を検討してみると、末梢血で T<sub>H</sub>-17 と推測される CD4<sup>+</sup>IL-17 産生細胞は各群で差を認めなかったが、DNT 分画に着目すると、MS 群でのみ IL-17 産生細胞頻度が増加していた。また、再発期は寛解期に比較して IL-17 及び IFN- $\gamma$  産生 DNT 細胞頻度が増加していたことより、MS 再発期の DNT 分画には double producer (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup>) が存在する可能性が示唆された。更に、DNT 分画の ROR $\gamma$ t 分子の発現を検討すると MS 群で有意に高値であった。以上より、ROR $\gamma$ t を発現し、IL-17 産生に特化した活性化 iT が、免疫動態を修飾し、MS を疾患誘導もしくは調節している可能性が示唆された。

### 研究目的

近年、マウスで同定された T<sub>H</sub>-17 系列は IL-17 を産生することを特徴とするヘルパー CD4 細胞である。「IL-12p35 欠損マウス、IFN- $\gamma$  欠損マウスにおけるマウス実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) susceptibility」の観察、および「IL-23p19 欠損マウス、IL-12/IL-23p40 欠損マウス、抗 IL-17 中和抗体移入マウスにおける EAE resistance」の観察から、従来、長く提唱されていた EAE における IL-12/T<sub>H</sub>1 システム病態仮説は、IL-23/T<sub>H</sub>-17 システム病態仮説へとパラダイムシフトされつつある。一方で、ヒト多発性硬化症 (MS) における抗 IL-12/IL-23p40 中和抗体 (ustekinumab) の有効性の乏しさ (Lancet Neurol 2008;7:796) は、マウス EAE の観察結果と異なるものであり、ヒトにおける IL-23/IL-17 システムの全容解明は、MS の病態を考える上で重要な論点である。本研究では、マウスで IL-17 の発現が確認されている T<sub>H</sub>-17, NKT,  $\gamma\delta$ T 細胞などの系列において、IL-17 とそのマスターレギュレーター分子である ROR $\gamma$ t 発現能およびサイトカインプロファイルをヒト MS 検体で解析し、ヒト病態、特に MS における「IL-23/IL-17 システム」を解明することを目的とした。

### 研究方法

MS、その他の炎症性神経疾患患者、健康者からの末梢血から単核球 (PBMC) を分離し、フローサイトメーター (FACS) を使用し、CD3, CD4, CD8, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17, Foxp3, 各種ケモカイン受容体分子の描出を試みた。また、FACS sorting により各分画に分けた後、T-bet, ROR $\gamma$ t 分子の発現を real time RT-PCR 法にて確認した。さらに CD3 ligation 及び IL-23 刺激にて各分画のサイトカイン産生能を検討した。DNT 分画の描出に関しては、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> 細胞群を使用した。

### 研究結果

結果は以下の通りである。(1) CD4 陽性分画で IL-17 産生細胞頻度は各群で差を見出すことができなかった。(2) double negative T (DNT) 分画では、PMA, Ionomycin 刺激による細胞内サイトカイン染色法にて、IL-17 産生細胞は MS 群で有意に高値であることが確認された。(3) (2)は CD3 ligation 刺激システムでも再現できた。(4) MS の疾患活動性による違いを検討してみると、DNT 分画では健康者と比較して、寛解期で IL-17 産生細胞頻度の増加と IFN- $\gamma$  産生細胞頻度の減少を認めた。一方、再発期では IL-17 産生細胞および IFN- $\gamma$  産生細胞両者の頻度が寛解期に比較して増加していた。以上より、MS 再発期の

1) 新潟大学脳研究所神経内科学分野



DNT 分画には double producer (IFN- $\gamma$ /IL-17) が存在する可能性が示唆された。(5) DNT 分画の ROR $\gamma$ t 分子発現は MS 群で有意に高値であった。(6) MS 群を含めた全群で、IL-17 産生  $\gamma\delta$ T 細胞、IL-17 産生 NKT/hV $\alpha$ 24 $\bar{T}$  の存在を確認できなかった。(7) 健常者群では、CD3 ligation システム条件下で、CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> 分画だけではなく、CD56<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T $\bar{C}$ R<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> 分画においても大量の IL-17 産生を認めた。また、両分画ともに ROR $\gamma$ t 分子の発現上昇を認めたことより、ヒト末梢血において CD56<sup>+</sup> 分子は ROR $\gamma$ t 分子関連 IL-17 産生細胞系列の新たなマーカーとなる可能性が示唆された。

#### 考察

ヒト T<sub>H</sub>-17 系列 (CD4) は、1) CCR6 陽性、2) CXCR3 陰性、3) double producer (IFN- $\gamma$ /IL-17) の存在 (T<sub>H</sub>-17/T<sub>H</sub>1)、4) ROR $\gamma$ t 発現に加え、状況に応じ T-bet を同時発現する、5) マウス NK1.1 のヒトホモログである CD161 陽性、7) 末梢血よりも腸管に集積が多い細胞であるなどの特徴が報告されており、マウスとの相違点の一部が明らかにされつつある。一方、DNT 分画の主体をなす  $\bar{T}$  細胞の IL-17 産生系列に関しては、マウス NKT/mV $\alpha$ 14 $\bar{T}$ 、 $\gamma\delta$ T 細胞系列で ROR $\gamma$ t 発現を伴いながら IL-17 産生を行うことが報告されているが、ヒトにおけるその詳細は不明なままである。本研究により、ヒト MS において 1) DNT 分画に IL-17 を分泌する細胞群が存在すること、2) その細胞群は再発期には double producer (IFN- $\gamma$ /IL-17) である可能性があること、3) ROR $\gamma$ t を発現していること、4)  $\gamma\delta$ T、NKT/V $\alpha$ 24 $\bar{T}$  は候補細胞系列でないことが示唆された。 $\bar{T}$  細胞は DNT 分画の主要系列であり、また  $\bar{T}$  細胞のひとつ MAIT/hV $\alpha$ 7.2 $\bar{T}$  は MS 病変局所に浸潤している (Int Immunol 2003;16:223) とする報告からも、IL-17 産生  $\bar{T}$  細胞は MS の病態形成に関与している可能性が示唆される。今後、IL-17 産生  $\bar{T}$  細胞の特徴を明らかにするとともに、特に中枢神経脱髄においてどのような挙動を示すのか検討する必要がある。

#### 結論

MS における ROR $\gamma$ t 発現 IL-17 産生 DNT 細胞は何らかの特殊な機能を発揮した  $\bar{T}$  細胞系列の可能性があり、自己免疫病態への関与が推測される。

#### 文献

1. Treiner E, Duban L, Bahram S, Radosavljevic M, Wanner V, Tilloy F, Affaticati P, Gilfillan S, Lantz O. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nat* 2003;422(6928):164-169.
2. Kawachi I, Maldonado J, Strader C, Gilfillan S. MR1-restricted V $\alpha$ 19/mucosal-associated invariant T cells are innate T cells in the gut lamina propria that provide a rapid and diverse cytokine response. *J Immunol* 2006;176:1618-1627.
3. Croxford JL, Miyake S, Huang YY, Shimamura M, Yamamura T. Invariant V $\alpha$ 19 $\bar{T}$  cells regulate autoimmune inflammation. *Nat Immunol*. 2006;9:987-994.
4. Segal BM, et al. Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet Neurol* 2008;7(9):796-804.
5. Ivanov II, et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006;126:1121-1133.
6. Wilson NJ, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007;8:950-957.

#### 健康危険情報

なし

#### 知的財産権の出願・登録状況

特許取得:なし

実用新案登録:なし

# IFN $\beta$ 投与 MS 患者群・非投与群・健常者群比較による B 細胞 CD molecule, adhesion molecule, chemokine receptor 発現解析

研究分担者 菊地 誠志<sup>1)</sup>

共同研究者 新野正明<sup>2)</sup>, 廣谷 真<sup>2)</sup>, 宮崎雄生<sup>2)</sup>, 佐々木秀直<sup>2)</sup>, 深澤俊行<sup>3)</sup>

## 研究要旨

最近, B 細胞をターゲットにした多発性硬化症 (MS) の再発予防薬である rituximab の臨床試験結果が公表され, その効果が確認された. 一方, B 細胞の中でも MS の病態に関わっている subpopulation はその一部と考えられ, より狙いを定めた治療法の開発も必要と考えられる. 現在, 日本で使用可能な再発予防薬としては 2 種類の interferon  $\beta$  (IFN $\beta$ ) 製剤があるが, その作用機序は十分解明されておらず, 特に B 細胞への影響に関しては不明な点が多い. そこで, 今回我々は, IFN $\beta$ -1b を使用している MS 群, 非使用 MS 群, そして健常者群の B 細胞表面 molecule の発現を解析することにより, どのような B 細胞の subpopulation が MS の病態に関係している可能性があるか, そして IFN $\beta$ -1b によりどのような影響を受ける可能性があるのかを, 特に memory B 細胞と naïve B 細胞において比較検討した.

## 研究目的

Rituximab は, B 細胞をターゲットとした多発性硬化症 (MS) の再発予防薬として現在欧米で臨床試験が行われており, 最近その MRI 上での病変抑制効果が確認された. Rituximab は, ほぼすべての B 細胞を depletion するが, MS の病態に影響を与えている B 細胞の subpopulation はその一部と考えられる. 一方, IFN $\beta$  は MS の再発予防等として使用されているが, その作用機序に関しては, 抗原提示能の低下, T 細胞の増殖能抑制, サイトカイン産生能の変化などが推測されているが, 十分に解明されていない. また, IFN $\beta$  の B 細胞への影響に関しても未知の部分が多い. 今回, B 細胞表面抗原等の発現を IFN $\beta$ -1b 投与群と非投与群, そして健常者群で検討し, 特に memory B 細胞と naïve B 細胞において比較検討した.

## 研究方法

再発・寛解型の MS 患者のうち, IFN $\beta$ -1b を 6 ヶ月以上使用している患者 13 例 (投与群), 及び IFN $\beta$ -1b を全く使用していないか, 使用中中止後 2 年以上経過している患者 14 例 (非投与群), そして, 健常者 21 例を対象とした. いずれにおいてもステロイドをはじめとする免疫抑制剤等併用していない症例を対象とし, 患者における採血は, すべて寛解期に行った. それぞれの患者・健常者の末梢血を用いて, B 細胞識別のために抗 CD19 抗体を, memory B 細胞を識別するために抗 CD27 抗体を用い, 更に CD5, CD11a, CD49d, CD80, CD86, CCR5, CXCR3 の各種抗体を加え, トリプルカラーにてフローサイトメトリーで解析した.

## (倫理面への配慮)

本研究は北海道大学医学部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

- 1) 国立病院機構札幌南病院 神経内科
- 2) 北海道大学 神経内科
- 3) さっぽろ神経内科クリニック



は十分に配慮した。

#### 研究結果

B細胞におけるCD27陽性細胞(memory B細胞)の割合は健康者群と非投与群においては差がなかったが、投与群においては有意に非投与群及び健康者群よりもその割合が低値であった。また、B細胞におけるCD80の割合も同様に投与群では健康者群及び非投与群よりも低値であり、CD27/CD80 double positiveの細胞の割合は、投与群が非投与群及び健康者群に比べ有意に低値を示した。一方、B細胞におけるCD86の割合は、投与群と健康者群では差はなかったが、健康者群・投与群に比べ非投与群で有意に高値であり、これはnaïve B細胞においてより顕著であった。CD11aやCD49dといった接着分子のMean Fluorescence Intensity (MFI)は、投与群・非投与群で差がなかった。また、ケモカインレセプターCXCR3の割合に関しても投与群・非投与群・健康者群で差がなかった。CCR5の割合は、投与群と健康者群では差はなかったが、健康者群・投与群に比べ非投与群で有意に高値であり、この傾向はnaïve B細胞でのみ見られた。

#### 考察

Co-stimulating factorをはじめとする表面抗原の発現の程度は、病期や治療によって変化することはこれまでも様々な報告がある。ただ、主にT細胞上の表面抗原に関するものが多く、B細胞に関するものは比較的少ない。これまでの報告をみると、IFN $\beta$ -1bの投与により、B細胞のCD80陽性細胞を減少させるとの報告がある<sup>1)</sup>。この報告では、B細胞のCD86陽性細胞も検討しておりB細胞のCD86陽性細胞には影響を与えないとされているが、一方で単球のCD86陽性細胞を増加させるとされる。また、別の報告では、IFN $\beta$ -1aの投与

によりB細胞におけるCD86は変化しないが、CD80の発現する割合が低下するとされている<sup>2)</sup>。ところで、今回の研究では、IFN $\beta$ -1b投与群においてCD27陽性B細胞、すなわちmemory B細胞の割合が減少していたが、memory B細胞ではTNF及びLT等のpro-inflammatory cytokineの産生が多いのに対し、CD27陰性B細胞、すなわちnaïve B細胞ではanti-inflammatory cytokineであるIL-10の産生が亢進していることから<sup>3)</sup>、このようなこともIFN $\beta$ -1bの治療効果の一端を担っている可能性がある。

#### 結論

IFN $\beta$ -1b投与により、B細胞 subpopulationに変化が生じる可能性がある。

#### 文献

1. Genç K, Dona DL, Reder AT. Increased CD80 B<sup>+</sup> cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon $\beta$ -1b therapy. *J Clin Invest.* 1997; 99: 2664-2671.
2. Liu Z, Pelfrey CM, Cotleur A, Lee JC, Rudick RA. Immunomodulatory effects of interferon beta-1a in multiple sclerosis *J Neuroimmunol.* 2001; 112: 153-162.
3. Duddy M, Niino M, Adata F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, Kim HJ, Bar-Or A. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2007; 178: 6092-6099.

#### 健康危険情報

なし

#### 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし



## MS 病態における $\alpha$ B-crystallin 自己免疫の意義

研究分担者 山村 隆<sup>1</sup>

共同研究者 荒浪 利昌<sup>1</sup>、佐藤 和貴郎<sup>1</sup>

### 研究要旨

多発性硬化症(MS)は、ミエリン抗原特異的T細胞が介在する自己免疫疾患であり、Th1細胞や Th17 細胞が病態形成に重要な役割を果たしていると考えられている。一部のMS患者においては、他の慢性炎症性疾患において増加が認められる、共刺激分子 CD28 の発現を欠く CD28 陰性 T 細胞の増加が報告されている。この細胞群は高い IFN- $\gamma$  産生能を示し、他疾患では熱ショック蛋白 60 に対する反応性が報告されている。しかし、MS における特異的抗原およびこの細胞群の MS 病態における役割は不明である。我々は本研究において、この細胞群が MS の炎症病巣に高度に発現する熱ショック蛋白 $\alpha$ B-crystallin (CRYAB)特異的 T 細胞を高頻度を含むこと、また、CRYAB が PBMC を刺激し、サイトカイン産生を誘導する特異な自己抗原であること、さらに CD28 陰性 T 細胞の増加に EB ウイルス再活性化の関与が示唆されることを示した。

---

<sup>1</sup> 国立精神神経センター神経研究所免疫研究部

## 背景

T 細胞の増殖およびサイトカイン産生には、T 細胞抗原受容体からのシグナルのみならず、共刺激分子 CD28 からのシグナルが必須である。健康者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞は、殆どが CD28 陽性であるが、関節リウマチなどの慢性炎症性疾患において、この細胞表面分子の発現を欠くにもかかわらず、高い IFN- $\gamma$  産生能を示す CD28 陰性 T 細胞が増加することが報告されている。これらの疾患では、この細胞群が熱ショック蛋白 60 やサイトメガロウイルスに反応することが報告されている。MS においても、一部の患者においてこの細胞が増加することが報告されているが<sup>1</sup>、MS 病態における役割および抗原特異性は不明である。今回我々は、MS の CD28 陰性 T 細胞が、MS 病巣に高発現する熱ショック蛋白  $\alpha$ B-crystallin (CRYAB)<sup>2</sup> 反応性 T 細胞を高頻度を含む細胞群であり、CRYAB が、免疫系細胞を活性化し、サイトカイン産生を誘導する、特異な自己抗原であることを報告する。

## 研究方法

- (1) 対象：健康者 9 名と免疫抑制剤非投与中の MS 患者 40 名より、末梢血単核球細胞 (PBMC) を分離し、CD4 陽性 CD28 陰性 T 細胞の解析を行った。
- (2) フローサイトメトリー：CD28 陰性 T 細胞の頻度解析および T 細胞分化状態の解析 (細胞内 T-bet 染色) はフローサイトメトリーによって行った。
- (3) IFN- $\gamma$  secretion assay：抗原特異的 T 細胞の頻度解析においては、Ovalbumin、Myelin Basic Protein、CRYAB 存在化で PBMC を培養した後、IFN- $\gamma$  産生細胞の頻度を測定した。
- (4) 炎症性サイトカイン ELISA：PBMC を CRYAB 存在下で培養し、上清中の IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12、IL-10 濃度を ELISA により測定した。
- (5) 血清 EBNA-1 抗体価：EB ウイルス再活性化の指標として、血清抗 EBNA-1 抗体価を ELISA により測定した。

## (倫理面への配慮)

本研究においては、全ての患者から書面に

よるインフォームドコンセントを得た上で採血を行った。また、患者から得られた情報は、当研究部でのみ使用し、厳重に保管されている。以上から、本研究は、倫理面への十分な配慮がなされている研究であると考えられる。

## 研究結果

- (1) CD28 陰性 T 細胞は、CD4 陽性 T 細胞の中で T-bet の発現が最も高い、独立した集団であることが判明した。
- (2) 抗原特異的 T 細胞の解析では、健康者の CD4 陽性 T 細胞は、いずれの抗原にも有意な反応を示さなかった。一方、MS の CD28 陰性 T 細胞は、MBP に反応を示さず、CRYAB 特異的な T 細胞を有意に多く含むことが判明した。
- (3) CRYAB は PBMC を刺激して、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-12 の産生を誘導した。また、PHA で PBMC を刺激する際に CRYAB を加えると、IFN- $\gamma$  産生が増加、IL-17 産生が減少した。
- (4) 血清抗 EBNA-1 抗体価と CD28 陰性 T 細胞の頻度の間に、MS においてのみ、逆相関を認めた。

## 考察

熱ショック蛋白は、内因性の TLR リガンドとして抗原提示細胞を刺激することが報告されている。今回我々は、CRYAB が PBMC を活性化し、サイトカイン産生を誘導することを見出した。なかでも IL-12 は Th1 細胞分化に必須のサイトカインであり、このことが、CRYAB 反応性 CD28 陰性 T 細胞の著しい Th1 偏倚に関与していると考えられる。実際、PHA で PBMC を刺激する際に CRYAB を加えると、IFN- $\gamma$  産生が増加、IL-17 産生の減少が認められた。近年 EB ウイルス感染が MS 病態において重要な役割を果たしている可能性が報告されている。血清抗 EBNA-1 抗体価と CD28 陰性 T 細胞の頻度との相関については、MS においてのみ、逆相関を認めた。抗 EBNA-1 抗体の陰性化は、慢性活動性 EB ウイルス感染症において認められることから、抗体価の低下に伴う、EB ウイルス再活性化や CRYAB の発現上昇が CD28 陰性 T 細胞の増加に関与している可能性が考えられる。

## 結論

CRYAB は、CD28 陰性 T 細胞を活性化し、IFN- $\gamma$  産生を誘導する、MS 病態における重要な自己抗原の一つであると考えられる。CRYAB 特異的 CD28 陰性 T 細胞は、MS における新たな抗原特異的治療標的となる可能性がある。

## 文献

- (1) CD4+CD28- costimulation -independent T cells in multiple sclerosis. Markovic-Plese S, Cortese I, Wandinger KP, McFarland HF, Martin R. J Clin Invest.2001. 108(8): 1185-94.
- (2) Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets

validated in autoimmune encephalomyelitis. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Nat Med. 2002.8(5):500-8

## 健康危険情報

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし



研究分担者 菊地誠治<sup>1)</sup>

共同研究者 大槻美佳<sup>2)</sup>、菊地ひろみ<sup>3)</sup>、中川賀嗣<sup>4)</sup>、新野正明<sup>5)</sup>、  
三船恒裕<sup>6)</sup>、佐々木秀直<sup>5)</sup>

## 研究要旨

欧米で繁用されている Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests in Multiple Sclerosis (多発性硬化症のための簡易反復測定可能な神経心理学的検査バッテリー) の日本語版を作成し、健常者 24 名、多発性硬化症 (MS) 患者 22 名に施行した。9 つの下位項目全体の信頼度係数は  $\alpha 0.92324$  と高い信頼性を持った尺度であることが示唆された。また、記憶に関する検査以外は年齢と有意な負の相関が得られ、教育歴との相関はなく、普遍的に用いることが可能と考えられた。健常人群と患者群の比較では、4 つの機能別尺度全てにおいて、患者群より健常人群の得点が有意に高かった。患者群の罹病期間と得点の関係では、機能別尺度では、集中力と注意に関しては、罹病期間との間に負の相関が認められた。以上より、BRB-N 日本語版は MS 患者の高次脳機能の評価バッテリーとして、また、MS 患者の高次脳機能低下の特徴を明らかにする上でも有用である可能性が示唆された。(400 字程度)

## 研究目的

多発性硬化症 (MS) 患者の約 50% に認知障害が認められることが指摘されている<sup>1) 2)</sup>。認知障害を早期に把握するには、簡単で感度の高い神経心理学的検査が必要である。欧米では、Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests in Multiple Sclerosis (BRB-N)<sup>3)</sup> (簡易反復測定可能な神経心理学的検査バッテリー) が繁用されており、標準化

が進められ<sup>4) 5)</sup>、薬剤承認申請用試験にも利用されている<sup>6)</sup>。そこで、日本語版 BRB-N を作成し、健常人と MS 患者に施行し、信頼性および両群の結果を比較した。

## 研究方法

(1) 対象：神経疾患の既往のない健常被験者 24 名 (21-59 歳、平均 35.5 歳)、および北海道大学病院通院中の MS 患者で本研究に書面で承諾した 22 名 (23-59 歳、平均 39.2 歳)。両群とも、平均教育歴 14 年。

(2) 方法：BRB-N を日本語に翻訳したものを試行し、9 つの下位項目①選択記憶、②選択的記憶、③視空間記憶、④符号課題、⑤PASAT 3 秒、⑥PASAT2 秒、⑦選択記憶の遅延再生、⑧視空間記憶の遅延再生、⑨単語再生および

- 
- 1) 独立法人国立病院機構札幌南病院
  - 2) 北海道医療大学心理科学部
  - 3) 公立大学法人札幌市立大学看護学部
  - 4) 北海道医療大学看護福祉学部
  - 5) 北海道大学神経内科
  - 6) 北海道大学大学院文学研究科社会心理学分野、  
日本学術振興会特別研究員

9つの下位項目を、高次脳機能別に分類した尺度（記憶：①、②、③、長期記憶：⑦、⑧、集中力と注意：④、⑤、⑥、単語再生：⑨）とあわせ、その結果を解析した。

#### （倫理面への配慮）

本研究は、北海道大学医学部倫理委員会の審査を受け、承認されている。被験者には書面にてインフォームドコンセントを得ている。

#### 研究結果

9つの下位項目の全体の信頼度係数は、 $\alpha$  0.92324であり、BRB-N日本語版は高い信頼性を持った尺度であることが示唆された。

年齢との関係では、下位項目①、⑦、⑧以外で、有意な負の相関が認められた。この傾向は、4つの機能別尺度でも同様であり、患者群と健常人群で相違はなかった。教育歴との相関は、患者群、健常人群いずれでも認められなかった。健常人群と患者群の比較では、視空間検査（③、⑧）以外は、患者群で有意に低下していた。また、4つの機能別尺度では、全てにおいて患者群より健常人群の得点が有意に高かった。患者群の罹病期間と得点の関係では、検査全般では有意な相関は認めなかったが、下位項目では⑤⑥⑧に有意な負の相関が認められた。機能別尺度では、集中力と注意で、罹病期間との間に負の相関が認められた。

#### 考察

BRB-N日本語版は、信頼度の高い検査と考えられた。この検査は、主に遅延再生や長期の記憶以外は、年齢と共に低下する傾向が示唆され、妥当性も高い可能性が示唆された。また、教育歴との有意な相関は見られず、教育

歴にかかわらず、用いられると考えられた。

MS患者では、視空間性の記憶能力は低下しにくい、言語性記憶や集中力・注意力、単語再生などは低下しやすいこと、また、低下しやすい機能のうち、集中力・注意力と単語再生は罹病期間と相関し、言語性記憶は罹病期間と相関しなかった。以上より、MS患者の高次脳機能障害の中でも、低下しやすい機能と低下しにくい機能があること、また、言語性記憶は罹病期間にかかわらず早期でも低下しうること、集中力・注意力などの基盤となる機能は、罹病期間が長くなると徐々に影響を受けてくることなどが示唆された。

#### 結論

BRB-N日本語版はMS患者の高次脳機能の評価に有用であると考えられた。また、MS患者の高次脳機能低下の特徴を明らかにする上でも有用である可能性が示唆された。

#### 文献

- 1) Kujala P, Portin R, Ruutiainen J. The progress of cognitive decline in multiple sclerosis - a controlled 3 year follow-up. *Brain* 120: 289-297, 1997
- 2) Rao SM, Leo GJ, Bernardin L et al. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis I. Frequency, patterns and prediction. *Neurology* 41: 685-691, 1991
- 3) Rao SM, Cognitive Function Study Group of the National Multiple Sclerosis Society. A manual for the Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests in multiple sclerosis. Medical College of Wisconsin Milwaukee, WI, 1990
- 4) Boringa JB, Lazeron RH, Ruellink IE et al. The

Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests: normative values allow application in multiple sclerosis clinical practice. *Mult Scler* 7: 263-267, 2001

- 5) Schere P, Baum K, Bauer H, Gohler H, Miltenburger C. Normierung der Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests (BRB-N) für den deutschsprachigen Raum. *Nervenarzt* 75: 984-990, 2004
- 6) European Study Group on interferon  $\beta$ -1b in Secondary Progressive MS. Placebo-controlled

multicentre randomised trial of interferon  $\beta$ -1b in treatment of secondary progressive multiple sclerosis. *Lancet* 352: 1491-1497, 1998

#### 健康危険情報

なし

#### 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし



## 多発性硬化症補助診断法としての ELISA による末梢血 Sema4A 測定

分担研究者 佐古田三郎<sup>1)</sup>

共同研究者 中辻裕司<sup>1)</sup>、森谷真之<sup>1)</sup>、木下允<sup>1)</sup>、杉本知之<sup>2)</sup>、

奥野龍禎<sup>3)</sup>、熊ノ郷淳<sup>3)</sup>

### 研究要旨

セマフォリンは主に神経軸索ガイダンス分子として神経発生学領域で研究されてきた分子群であるが、近年アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症との関連を示唆する報告も見られ、その神経疾患における重要性が明らかにされつつある。神経系と免疫系の発生学的、機能的共通点が認識されるようになりその両者に発現するクラスIVセマフォリン Sema4A は免疫系においてはT細胞活性化、Th1分化に重要な分子であることが判明している。このことより多発性硬化症(MS)の病態に関与している可能性が推測され、まず ELISA によるヒト Sema4A 測定系を構築した。この ELISA システムを用いて多発性硬化症(MS)患者末梢血中 Sema4A を測定しその疾患感受性と疾患特異性を示し、末梢血 Sema4A 測定が MS の補助診断法となりうることを明らかにした。また本研究の過程で臨床情報と特定の研究データの統計処理を簡便に遂行できる優れたソフトを作成した。

### 研究目的

多発性硬化症(MS)の補助診断法として、脳脊髄液(CSF)を用いたオリゴクローナルバンド(OCB)やIgG indexがあるがCSF採取が侵襲的であり頻りに再検したり、外来診療において簡便にできる検査ではない。近年 neuromyelitis optica (NMO)で末梢血中抗アクアポリン4抗体が高率に陽性となることが内外より報告され、NMOの検査として定着した感があるが、通常型のMSにおいてはこれまでさまざまなバイオマーカーが探索されてきたにも関わらず、いまだ有効といえるものは見出されていない。

Sema4A は Th1 分化に重要な分子であることが判明していたので Th1 病でもある MS の病態に関与している可能性を推測し、まず ELISA によるヒト Sema4A 測定系を構築する。これを用い患者末梢血 Sema4A を測定し MS の補助診断法となりえることを示す。また本研究の過程で患者情報の管理と統計学的解析が必要であり、患者情報データベースを作成したのでこのソフトの紹介と普及を目的とする。

### 研究方法

対象は大阪大学医学部附属病院、市立豊中病院、大阪府立急性期総合医療センターで診療した MS 患者と他神経疾患患者血清。凍結保

- 1) 大阪大学大学院医学系研究科神経内科学
- 2) 大阪大学医学系研究科医学統計学
- 3) 大阪大学微生物病研究所感染病態分野

存血清中の Sema4A を ELISA にて測定した。ELISA に関しては Sema4A ノックアウトマウスをヒトリコンビナント Sema4A で免疫することにより得られた複数のモノクローナル抗体のうち HIAT2 と 1A2 を capture 抗体、ピオチン化 5E3 を detection 抗体とし、streptavidin ペルオキシダーゼで発色させ吸光度を測定した。

症例の蓄積、統計的解析および臨床医への汎用性を意図して、患者情報データベースをソフトウェア(ファイルメーカー)を用いて構築し、測定された Sema4A と共に、患者の臨床情報をより便利に、正確に記録・保存するための工夫を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究は大阪大学臨床研究倫理審査委員会、市立豊中病院、大阪府立急性期総合医療センター倫理委員会の承認の上施行された。

#### 研究結果

ELISA 法を用いた Sema4A 測定により MS 患者血清(n=69, 平均= 3758, SE=685)において他神経疾患(n=113, 平均=1089, SE=285)に比較し有意に高値を示す(p=0.0004)。疾患感受性、疾患特異性はそれぞれ約36%、90%であった。

また MS の患者情報を入力後、必要な統計学的解析も可能な優れたデータベースソフトを開発した。

#### 考察

これまで通常型の MS 末梢血において有効なバイオマーカーはなかったが Sema4A 測定は侵襲が少なく有効な補助診断法となりえると考えられる。約 1/3 の症例で Sema4A が高値を示すことは MS の病態が heterogeneous であることを裏付けるものであるかもしれない。

また構築したデータベースは患者情報管理および統計学的解析も容易におこなえ、利用価値が高いと思われるがより多くの臨床研究に携わる方々に利用していただけるよう改良を続けたい。

#### 結論

末梢血 Sema4A 測定は侵襲が少なく MS の有効な補助診断法となりえる。構築したデータベースは統計学的解析も容易におこなえ、利用価値が高い。

#### 健康危険情報

なし

#### 知的財産権の出願・登録状況

特許取得:なし

実用新案登録:なし

# 血清プロテオーム解析による多発性硬化症・視神経脊髄炎の疾患活動性マーカーの網羅的探索

分担研究者 桑原 聡<sup>1)</sup>  
共同研究者 澤井 撰<sup>1)</sup>、森 雅裕<sup>1)</sup>、早川 省<sup>1)</sup>、梅村啓史<sup>2)</sup>、佐藤 守<sup>2)</sup>  
小寺義男<sup>2)</sup>、朝長 毅<sup>2)</sup>、野村文夫<sup>2)</sup>

## 研究要旨

本研究では多発性硬化症 (MS)、視神経脊髄炎 (NMO) の疾患活動性を反映する血清マーカーを検出することを目的に、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-TOF MS) によるプロテオーム解析を行った。

MALDI-TOF MS を用い、MS 31 例、NMO 15 例と正常対照 48 例の血清中ペプチドプロファイルを解析し、存在量に差のある低分子ペプチドを検索した。次に正常対照と有意差のあったペプチドを対象に、MS 16 例、NMO 6 例の再発時と寛解期の血清を比較した。

血清中の存在量に差のあるペプチドを、正常対照と MS の比較で 10 個、NMO の比較で 11 個認めた。そのうち 1 つのペプチド (分子量 1741Da) が、MS と NMO の両者で、寛解期と比較し再発時に有意に高値であった。このペプチドはタンデム質量分析で補体 C4 のフラグメントと同定された。なお、血清中の補体 C4 値は再発期の MS、NMO で正常対照と差がなかった。

MALDI-TOF MS を用いたプロテオーム解析は、これまで測定することができなかったペプチド領域を含めた生物学的マーカーの検出に有用であった。本研究で同定された補体 C4 のフラグメントは MS、NMO の再発マーカーとなる可能性がある。

## 研究目的

多発性硬化症 (MS) と視神経脊髄炎 (NMO) は再発と寛解を繰り返す中枢神経自己免疫性疾患である。これまで疾患活動性、再発予測マーカーとして、血清あるいは髄液のリンパ球表面マーカー、サイトカインなどが検討されてきたが、臨床応用には至っていない。病勢をモニターするためには採取の容易な血清における疾患活動性の評価マーカーが求められている。

本研究では MS、NMO の疾患活動性を反映する血清マーカーを検出することを目的に、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計 (MALDI-TOF MS) によるプロテオーム解析法を用い患者血清を直接分析し、血清中の低分子ペプチドの網羅的解析を行った。

## 研究方法

MALDI-TOF MS を用い、MS 31 例、NMO 15

- 1) 千葉大学医学研究院神経病態学 (神経内科)
- 2) 千葉大学医学部附属病院・疾患プロテオミクスセンター

例と正常対照 48 例の血清中ペプチドプロファイルを解析し、患者急性期と正常対照との間に存在量に有意差のある低分子ペプチドを検索した。

次に正常対照と有意差のあったペプチドを対象に、MS 16 例、NMO 6 例の再発時と寛解期の血清を比較した。

その結果得られた疾患活動性マーカーの候補のペプチドを、タンデム質量分析で同定した。

なお、血清サンプルからのペプチド抽出には弱陽イオン交換ビーズを用い、マトリックスには  $\alpha$ -シアノ-4 けい皮酸を用いた。ペプチド抽出と測定プレートへの滴下は、測定値の安定のため ClinProtRobot (Bruker Daltonics, Germany) を用い全自動で行った。また、質量分析計は AutoFlex® II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Germany) を用いた。

## 倫理面への配慮

本研究に際しては、千葉大学大学院医学研究院および医学部附属病院の倫理規定を遵守して行った。血清保存とその研究への利用に関しては患者からはインフォームド・コンセント・同意を得た。個人の情報は決して表に出ることが