

ないように細心の注意を払い、プライバシーの保護には十分に配慮した。

研究結果

(1) 再発時における MS、NMO と正常対照との比較解析

発現比較解析の結果、正常対照と MS の比較で 10 個、NMO の比較で 11 個のペプチドにおいて、発現レベルに有意差を認めた。そのうち 6 個が MS と NMO に共通するペプチドであった。

(2) MS と NMO における再発時と寛解期の比較解析

(1) の解析で得られたペプチド (MS については 10 個、NMO については 11 個) の、再発時と寛解期における血清中での存在量の変化をみた。

有意差を持って再発時と寛解期で変化していたのは、MS・NMO の両者に共通の分子量 1741Da のペプチドで、寛解期と比較して再発時に有意に高値であった (Wilcoxon の順位和検定: $p=0.001$)。

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、補体 C4 の α 鎖上にある 15 個のアミノ酸配列からなることが分かった。

血清中の補体 C4 値は再発時の MS、NMO で正常対照と差がなく、寛解期とも変化は認めなかった。

考察

MALDI-TOF MS を用いたプロテオーム解析法は、これまで測定することができなかった低分子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。

今回 MS、NMO の再発期血清において正常対照と有意差のあるペプチドが複数検出された。そのうち 6 個が MS と NMO で共通のペプチドであり、両疾患の病態の一部に共通するメカニズムがある可能性が示唆された。

疾患活動性マーカーの候補として補体 C4 のフラグメントが挙げられた。このフラグメントの生成機序や機能は不明だが、再発時に寛解期と比較して有意な発現増加が認められており、MS と NMO における補体系の活性化を示唆する所見の可能性が考えられた。

結論

血清ペプチド解析による補体 C4 のフラグメントの発現レベルは MS、NMO の疾患活動性・再発マーカーとなる可能性がある。

知的所有権の出願・登録状況

特許取得・実用新案登録：特願 2008-239303 号「多発性硬化症または NMO の検査マーカーの測定方法」出願中

研究分担者 清水優子¹⁾、

共同研究者 太田宏平²⁾、久保幸子¹⁾、蒲澤千昌¹⁾、大原久仁子¹⁾、大橋高志³⁾、内山真一郎¹⁾

1) 東京女子医科大学 神経内科

2) 東京理科大学 理学部

3) 東京女子医科大学 八千代医療センター 神経内科

【研究要旨】

神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor: BDNF) は、神経細胞の発生、生存、維持、再生を調整する液性蛋白質で、多発性硬化症 (Multiple sclerosis: MS) では、病巣に浸潤しているリンパ球 (T細胞、B細胞、単球) が BDNF を産生している。MS の治療目的の一つとしてグリア・神経細胞の保護、再生 があげられており、MS の治療薬である IFN- β の作用機序として、神経細胞保護・再生機能の可能性が示唆されている。われわれは、神経保護・再生作用の指標として MS 患者血漿中の BDNF を測定し、再発期と寛解期、IFN- β 治療による変化の有無を検討した。寛解期 MS 患者血漿中 BDNF は、健常者と比較して有意に低下していた ($P < 0.05$)。MS 再発期は、寛解期と比較し有意に高値であった ($P < 0.05$)。IFN- β 治療後は、投与前と比較して有意に増加していた ($P < 0.05$)。以上の結果から MS では BDNF 産生が減少しており、神経保護・再生機能が低下している可能性が考えられた。IFN- β 治療後 BDNF 産生が増加したことから、IFN- β は BDNF を介し神経修復に関与している可能性が示唆された。

【研究目的】神経栄養因子 (BDNF) は神経細胞の発生、生存、維持、再生、シナプスの機能亢進という神経細胞の成長を調節する神経系の液性蛋白質で、パーキンソン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症などの神経疾患治療に応用できる蛋白として注目されている。

多発性硬化症 (MS) の治療薬である IFN- β の作用機序として、中枢神経系への T 細胞の進入を妨ぎ、抗炎症性サイトカインの産生により治療効果をきたすことが広く知られている。また IFN- β 治療を行うことにより中枢神経の軸索障害を抑制するだけでなく、一部の軸索障害を回復させることが報告されているが、その機序はまだ解明されていない。MS に

おける神経栄養因子の作用機序の検討は欧米でまだわずかししか報告されていない。それらの結果では IFN- β 治療後 6 ヶ月の再発寛解型 MS で再発しなかった患者群や glatiramer acetate 投与により炎症性サイトカインが減少していた患者群で末梢血単核球の BDNF 産生が増加していた。以上の結果から、BDNF の産生が増加し、脱髄を受けた中枢神経の再生が促進されることが治療効果に関連しているのではないかと推測している。これまでの欧米の結果を元に、IFN- β の治療作用機序のひとつとして、神経細胞保護があげられており、上記の結果はその機序を裏付けるものと考えられる。今回われわれは、MS 患者血漿中の BDNF 産生の再発期と寛解期、および IFN- β 投

与と未投与群における変化の有無について検討した。

【研究対象・方法】対象は、clinically definite MS 患者 32 例 (25 例; 1 年以上 IFN- β 治療継続, 7 例; IFN- β 未治療)、および健康人 20 例である。BDNF の測定方法は、保存血漿上清中の BDNF 産生量を ELISA 法により測定し、比較検討した。統計解析は Wilcoxon t-test を用いた。

【倫理面への配慮】本研究は東京女子医科大学の倫理委員会において承諾を得て行い、プライバシーの保護に十分配慮した。

【結果】寛解期 MS 患者血漿中の BDNF (650 pg/ μ L) は健康者 (1783.6 pg/ μ L) と比較して有意に低下していた ($P < 0.05$)。MS 再発期 (1121.3 pg/ μ L) と寛解期 (650.2 pg/ μ L) を比較したところ、再発期では有意に BDNF は上昇していた ($P < 0.05$)。また IFN- β の 1 年以上治療継続後 (1050.9 pg/ μ L) の MS 患者血漿中の BDNF は、IFN- β 投与前 (447.9 pg/ μ L) と比較して有意に増加していた ($P < 0.05$)。再発期 MS 患者において、IFN- β 治療群 (2244.5 pg/ μ L) は未治療群 (1121.3 pg/ μ L) と比較して有意に高値であった ($P < 0.05$)。なお、MS 患者において EDSS と BDNF に正の相関はみられなかった。

【考察】MS 再発時に、寛解期と比べ BDNF 産生が増加していたことから、炎症による神経修復、防御にともなう産生増加と考えられるが、健康人に比較して低値であった。これは、MS において神経修復・防御機能が低下しているためと考えられる。IFN- β 治療後に BDNF は治療前と比較し有意に増加、また再発時の BDNF 産生も IFN- β 未治療群とくらべて高値であったことから、IFN- β は BDNF 産生を増加させ、神経修復・防御作用に関与している可能性が考えられた。

【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

多発性硬化症および抗アクアポリン 4 抗体陽性症例における補体系の検討

研究分担者 吉良潤一

共同研究者 土井光, 松下拓也, 磯部紀子, 松岡健, 三野原元澄, 越智博文

研究要旨

【背景】視神経脊髄型多発性硬化症ではアクアポリン 4(AQP4)に対する自己抗体の存在が報告され, 補体介在性の神経障害が推定されている。【目的】抗 AQP4 抗体陽性および陰性 MS 患者における補体系の関与を明らかにする。【方法】118名の MS 患者の再発期および寛解期の CH50, C3, C4 を, 抗 AQP4 抗体陽性群, 抗 AQP4 抗体陰性 OSMS 群, 抗 AQP4 抗体陰性 CMS 群に分類し比較検討した。【結果】再発期での高補体血症(CH50 >50 U/ml)は, 抗 AQP4 抗体陽性群は他の 2 群, さらに寛解期と比較し有意に高かった。再発期での低補体血症は 3 群とも 1 例も認めなかった。C3, C4 に 3 群間に有意差はなかった。【結論】補体は SLE など液性免疫の関与する病態では消費され低補体血症となる。一方, 血管炎などでは非特異的反応として高補体血症となる。抗 AQP4 抗体陽性例では, 再発期に全身性炎症性反応が存在する可能性がある。

研究目的

アジア人に多い視神経脊髄型多発性硬化症(OSMS)は, 欧米人の再発型 Devic 病(Neuromyelitis optica; NMO)と類似した臨床像を呈する。両疾患とも星状膠細胞の足突起に存在するアクアポリン 4(AQP4)チャネルに対する自己抗体の存在が近年報告され, 補体介在性の神経障害が推定されている。しかしその障害を *in vivo* で証明した報告はない。今回, 抗 AQP4 抗体陽性および陰性 MS 患者における補体系の解析を行ない, 特に再発における補体の活性化による消費が認められるか否かを検討する。さらに, 全身性の炎症反応との関連を明らかにする。

研究方法

118名の MS 患者の再発期および寛解期に採取した血清中の CH50, C3, C4, および CRP の測定および分析を行い, 抗 AQP4 抗体陽性群, 抗 AQP4 抗体陰性 OSMS 群, 抗 AQP4 抗体陰性 CMS 群の 3 群に分類し比較検討した。CH50 は測定系の限界があり, >60 U/ml は 60 U/ml として記録した。また高補体血症は CH50 >50 U/ml, 低補体血症は CH50 <20 U/ml と定義した。さらに, 脊髄長大病変(矢状断 MRI での 3 椎体以上の病変)あるいは大脳白質長大病変(MRI での 3cm 以上の病変)の有無と補体系との関連を検討した。

結果

再発期における血清 CH50 値は, 抗 AQP4 抗体陽性群で 52.3 ± 7.2 U/ml であり,

抗 AQP4 抗体陰性 OSMS 群で 47.2 ± 6.9 U/ml, 抗 AQP4 抗体陰性 CMS 群で 44.0 ± 10.1 U/ml と比較し, 有意に高かった (各々 $P^{\text{corr}} < 0.05$, $P^{\text{corr}} < 0.005$) (図 1). 再発期における高補体血症は, 抗 AQP4 抗体陽性群では 70.5% (19/27) であり, 抗 AQP4 抗体陰性 OSMS 群で 36.4% (8/22), 抗 AQP4 抗体陰性 CMS 群で 29.0% (9/31) と比較し有意に高かった ($P^{\text{corr}} < 0.05$). さらに, 抗 AQP4 抗体陽性群では寛解期 35.9% (23/64) と比較しても再発期が有意に高かった ($P < 0.05$). 低補体血症は 3 群とも再発期には 1 例も認められなかった. C3 および C4 は再発期に 3 群間で有意差はみられなかった. 抗 AQP4 抗体陽性群では, 再発期に高 CRP 血症を認める頻度が抗 AQP4 抗体陰性 CMS 群と比較し有意に高く (46.4% vs 14.3%, $P < 0.05$), かつ, 再発期に高補体血症および高 CRP 血症を共に認める頻度も, 抗 AQP4 抗体陰性 CMS 群と比較し有意に高かった (36.0% vs 14.3%, $P^{\text{corr}} < 0.05$). 抗 AQP4 抗体陽性群では, 脊髄長大病変あるいは大脳白質長大病変を認める症例における高補体血症の頻度は, 他の 2 群合計と比較し有意に高かった (88.9% vs 16.7%, $P < 0.01$).

考察

補体は免疫系システムの一角を担い, 補体介在性免疫応答のみならず宿主における急性期非特異的反応物質でもある. SLE やシェーグレン症候群では急性期に消費による低補体血症を認め, 一方, 悪性腫瘍や感染症および血管炎では非特異的な反応としての高補体血症が報告されている. 本結研究では, 抗 AQP4 抗体陽性例で

は再発期に低補体血症は認められず, むしろ抗 AQP4 抗体陰性群と比較し高率に高補体血症が存在することが示された. 従って, 抗 AQP4 抗体陽性例では再発期に, 補体は全身性炎症反応物質の一部として非特異的に増加している事が想定される. 抗 AQP4 抗体陽性 OSMS および NMO の神経障害機序を自己抗体による補体介在性障害のみで説明する事は難しく, 何らかの別の神経障害機序の存在が示唆される.

結論

抗 AQP4 抗体陽性患者の高補体血症は, 再発期の全身性炎症性反応の存在を示唆している可能性がある.

文献

Doi H, et al. Hypercomplementemia at relapse in patients with anti-AQP4 antibody. *Mult Scler* 2009; in press.

健康危惧情報

なし

知的財産の出願・登録状況

特許取得: なし

実用新案登録: なし

ウイルス性脱髄におけるウイルス非構成蛋白の役割

分担研究者 大原 義朗¹⁾

共同研究者 谷浦 直子¹⁾、齊藤 峰輝²⁾、大桑 孝子¹⁾、斎藤 孔良¹⁾

研究要旨

タイラーウイルス(TV)は、マウスに致死性の急性灰白脳脊髄炎を起こすGDVII亜群と、脊髄に持続感染し一次性脱髄を起こすDA亜群の2群に分類される。我々は両亜群間の生物学的性状の違いを検討するため、非構成蛋白LとL*に注目した。L蛋白の細胞内局在を細胞免疫染色により調べたところ、DA株のL蛋白は細胞質及び核に存在するのに対し、GDVII株の野生型L蛋白は細胞質に存在した。両株L蛋白のキメラ分子の解析から、DA L蛋白の核内局在に分子後半部分の関与が示された。また、両株L蛋白の発現はアポトーシス細胞死を誘導することが示された。このアポトーシスはL*蛋白恒常発現細胞株において抑制された。本研究から、TVは、DA L蛋白を核移行させ核内での転写活性を調節することにより、IFNなどの初期免疫応答による攻撃を逃れると想定される。初期免疫反応を免れたTVはL蛋白・L*蛋白の相互作用により宿主細胞の生存をコントロールして、持続感染・脱髄発症に有利な状態を作り出すと考えられる。

研究目的

TV・DA亜群の病理像はヒトの代表的な脱髄疾患である多発性硬化症に類似しており、その動物モデルとして研究されている。従来、ウイルス性脱髄ではウイルス粒子を構成する蛋白(ウイルス構成蛋白)のみが注目されてきた。TVもその例外ではなく、遺伝子組み換えの技法により、両亜群間で種々の構成蛋白組み換えウイルスが作成され研究が行われてきたが、持続感染・脱髄のメカニズムは未だ解明されていない。我々は今回ウイルス粒子構成には関与しない非構成蛋白に注目した。非構成蛋白Lは5'末端にコードされ、両亜群間のアミノ酸配列の相同性が最も低い(他のウイルス蛋白の相同性の

平均は96%であるが、L領域は85%である)。もう一つの非構成蛋白L*はポリ蛋白の開始コドンAUGの13塩基下流にあるもう一つのAUGからout-of-frameで翻訳される蛋白である。GDVII亜群ではこのAUGが例外なくACGであるため、L*蛋白はDA亜群でのみ合成される。このように両亜群間で著しく異なる非構成蛋白LおよびL*がTVの生物学的性状を規定する大きな要因となっていると仮定し、比較検討を行った。

研究方法

L蛋白76アミノ酸(AA)の45AA(acidic domain 最後部)にある制限酵素サイトAatIIにより、N末側とC末側を組み替えた

¹⁾ 金沢医科大学 医学部 生体感染防御学部門

²⁾ 琉球大学大学院 医学研究科 免疫学

キメラ分子、N末側がDA由来C末側がGDVII由来の分子をD/G、その逆をG/Dとし、D/G・G/D及び両亜群野生型L蛋白を、C末にFLAGを付加した発現ベクター(p3xFLAG-CMV)に構築した。これらをBHK-21細胞に強制発現して、抗FLAG抗体による細胞免疫染色により、細胞内局在を調べた。

次に、BHK-21細胞あるいはL*蛋白の恒常発現株(L*/BHK-21)にL蛋白を強制発現し、細胞の生死をTrypan blue dye exclusion testで調べた。また、細胞をPE標識Annexin Vと7-AADで二重染色しFACSにて解析し、アポトーシス細胞の比率を検出した。また、Hoechst染色によりアポトーシス細胞の核の凝集を観察した。更に、Western blotによりアポトーシス関連蛋白を検出した。

倫理面での配慮

組換えDNA実験に際しては、金沢医科大学の組換えDNA実験安全委員会の承認を受け、その規定を遵守して行った。

研究結果

DA株の野生型L蛋白は強制発現により細胞質及び核に存在するのに対し、GDVII株の野生型L蛋白は細胞質に存在した。キメラ分子D/GはGDVII野生型L同様、細胞質に存在し、G/DはDAL様に細胞質及び核に存在した。

一方、BHK21細胞に両株L蛋白を強制発現させると、48時間後の生存率はコントロールの $94.4 \pm 0.7\%$ に対して、DA株、GDVII株ではそれぞれ $69.2 \pm 7.2\%$ 、 $63.2 \pm 3.1\%$ と両株ともに生存率の低下が認められた。この細胞死は、FACSによる解析において、Annexin V (+), 7-AAD (-)となるアポトーシス陽性細胞の増加(コントロールの $14.8 \pm 8.2\%$ に対してDA株、GDVII株ではそれぞれ $37.3 \pm 9.1\%$ 、 $29.2 \pm 10.1\%$)が見られたこと、核の凝集が確認されたことから、ア

ポトーシスの誘導によることが示された。更に、アポトーシスの指標となるCaspase-3の活性化とその基質であるPARPの分解が示された。これに対し、L*/BHK-21細胞では、DAL発現による細胞生存率、核の凝集、PARPの分解がいずれも抑制され、アポトーシスの誘導に拮抗していることが示された。

考察

従来、TVが属するビコルナウイルス科ではウイルス増殖に必要な過程は全て細胞質で行われるとされてきた。今回DA株のL蛋白が核内に検出されたことは非常に興味深い。更にL蛋白の核内局在には分子後半部分に関与していることが示された。なお未発表データであるが、このL蛋白核移行には分子後半部分に存在するSerine/Threonine-rich domainが深く関与していることが示唆されている。

本研究から、おそらくウイルスは、DAL蛋白を核移行させ核内での転写活性を調節することにより、IFNなどの初期免疫応答による攻撃を逃れると想定される。初期免疫反応を免れたウイルスはL蛋白・L*蛋白の相互作用により宿主細胞の生存をコントロールして、持続感染・脱髄発症に有利な状態を作り出すと考えられる。

結論

DA株のL蛋白が核内に局在すること、その局在には分子後半部分に関与していることが明らかになった。また、非構成蛋白Lがアポトーシスを誘導することが明らかになった。更にDA亜群でのみ合成されるもう一つの非構成蛋白L*によってL蛋白によるアポトーシスが抑制されることが明らかになった。このように、相同性は高いが生物学的特性の異なる両亜群をもつTVの非構成蛋白の解析はウイルス性脱髄の発症メカ

ニズムを明らかにする上で、非常に有用であると考え。

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 高 昌星¹⁾

共同研究者 柳澤智¹⁾、武市尚也¹⁾、兼山友輝¹⁾、八木田秀雄²⁾、Byung S. Kim³⁾

研究要旨

タイラー脳脊髄炎ウイルス(TMEV)を感受性マウスに接種すると免疫性脱髄疾患(TMEV-IDD)を誘導することができる。今回我々は抗 CD70 抗体を用いて細胞表面分子である CD70 をブロックすることにより、TMEV-IDD における CD70 の役割を検討した。抗 CD70 抗体を effector phase に投与することにより TMEV-IDD が有意($p < 0.05$)に抑制され、脊髄の組織像においても炎症は軽度であった。また real-time PCR を用いた mRNA の定量では、脊髄において IFN- γ の発現量は有意($p < 0.05$)に減少し TNF- α は減少する傾向にあった。脊髄浸潤細胞数も対照群に比して減少していた。ウイルスの排除には Th1 系免疫応答は重要であるが、TMEV-IDD のように持続感染が成立している状態では Th1 系免疫応答は炎症を増強し TMEV-IDD の特徴である脱髄を進行させ TMEV-IDD を増悪させたと考えられる。以上より、抗 CD70 抗体の投与により、Th1 系免疫応答が抑制され、その結果 TMEV-IDD が抑制されることが示唆された。

研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)はヒトにおける中枢神経の脱髄疾患であり、その発症機序に中枢神経系の髄鞘に対する自己免疫が関与していると考えられているが、現在もなおその炎症抗原は不明である。MS では自己免疫を誘導する因子は不明であるが何らかのウイルス感染がその引き金になっているものと考えられている。この観点より感受性マウスに MS に酷似した脱髄性病変を引き起こすタイラー脳脊髄炎ウイルス(Theiler's murine encephalomyelitis virus: TMEV)による免疫性脱髄疾患の動物実験モデル(TMEV-induced

demyelinating disease: TMEV-IDD)は MS の病因の解明及び治療の開発に非常に有用である。最近、CD70 分子は TNF/TNF-receptor families に属する細胞表面分子であり、CD27-CD70 interaction は T 細胞や B 細胞の機能発現に重要な補助刺激であり、CD70 の発現量によりコントロールされている。また CD27-CD70 interaction は NF- κ B 活性化、T細胞の分化、T-bet の発現増加による IL-12R β 2 の増加などにより Th1 系免疫応答を誘導すると言われていた。CD27 をブロックすることは免疫不全を起こす危険性があることが指摘されているが、抗 CD70 抗体は PLP 感作による実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を抑制することが報告されている。今回我々は自己免疫疾患とされている MS の慢性進行型のウイルス動物実験

1)信州大学医学部

2)順天堂大学医学部

3)Northwestern 大学医学部

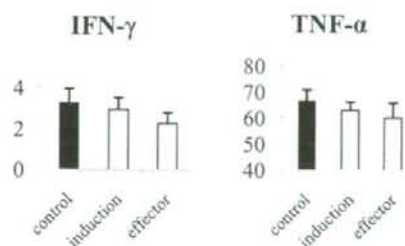


Fig.4 脾臓におけるサイトカイン産生細胞数

が有意差は得られなかった(Fig.4)。一方、induction phase で抗 CD70 抗体を投与すると、TMEV-IDD は対照群と同様もしくは若干増悪する傾向がみられ(Fig.1)、脊髄の組織像においても炎症は強度であった。脊髄浸潤細胞数も対照群よりは減少していたが、effector 群と比較すると増加していた(Fig.2)。

考察

抗 CD70 抗体は投与する時期が重要であり、effector phase に投与するときのみ TMEV-IDD を抑制した。また、mRNA の定量・サイトカイン産生細胞数の測定においても炎症性サイトカインである IFN- γ 、TNF- α ともに有意に減少もしくは減少する傾向がみられ、Th1 系免疫応答が抑制されていると考えられる。このことは既に発表されている論文にも一致する。しかし、脊髄浸潤細胞数では減少していたが、そのサイトカイン産生細胞数では差は見られなかったことから、脊髄への浸潤つまり接着分子にも何らかの影響を与えているのではないかと示唆される。一方、induction phase に抗 CD70 抗体を投与すると、Th1 系免疫応答が抑

制されることにより、TMEV の感染が容易となり対照群と同様もしくは若干の増悪という結果になったのではないかと考えられる。また、活性化された細胞にのみ発現する CD70 を抗 CD70 抗体でブロックすることは、恒常的に発現している CD27 をブロックするより選択的に Th1 を抑制し TMEV-IDD を抑制したのではないかと考えられた。

結論

抗 CD70 抗体の投与により Th1 系免疫応答が抑制され TMEV-IDD が抑制された。また、抗 CD70 抗体は免疫不全を起こさず、一次進行型 MS の治療薬となる可能性が示唆された。

文献

- 1) Michiel F. van Oosterwijk, Hedi Juwana, Ramon Arens, Kiki Tesselaar, Marinus H. J. van Oers, Eric Eldering, Rene A. W. van Lier: CD27-CD70 interaction sensitise naïve CD4+ T cells for IL-12-induced Th1 cell development. *International Immunology*, Vol. 19, No. 6, pp. 713-718, 2007
- 2) Atsuo Nakajima, Hideo Oshima, Chiyoko

- Nohara, Shinji Morimoto, Shin-ichi Yoshino,
Tetsuji Kobata , Hideo Yagita , Ko Okumura:
CD27-CD70 interactions sensitise naive CD4+
T cells for IL-12-induced Th1 cell development.
Journal of Neuroimmunology 109 (2000)188-196
- 3) Martijn A. Nolte and Rene A.W. van Lier: The
price of the CD27-CD70 costimulatory axis:
you can't have it all. JEM Vol. 203, No. 11,
October 30, 2006 2405-2408
- 4) Jannie Borst, Jenny Hendriks and Yanling
Xiao: CD27 and CD70 in T cell and B cell
activation. Current Opinion in Immunology 2005,
17:275-281

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

抗Delta抗体によるタイラーウイルス誘導性免疫性脱髄疾患の抑制

研究分担者 高 昌星¹⁾

共同研究者 武市尚也¹⁾、柳澤智¹⁾、兼山友輝¹⁾、八木田秀雄²⁾、Byung S. Kim³⁾

研究要旨

NotchシグナルはT cellの分化や活性化に重要な役割を担っており、Notchシグナルを活性化させる因子としてNotchレセプターのリガンドであるJagged 1、Deltaなどが知られている。今回我々は一次進行型MSの動物モデルであるタイラー脳脊髄炎ウイルス (TMEV) 誘導による免疫性脱髄疾患 (TMEV-induced demyelinating disease: TMEV-IDD) マウスを用いて、NotchレセプターのリガンドであるDeltaの役割を検討した。抗Delta抗体をTMEV-IDDマウスに投与することにより、その臨床症状が有意に抑制されることが明らかとなった ($p < 0.05$)。また、中枢神経系へ浸潤している単核細胞数が著明に減少しており、脊髄でのIFN- γ 、TNF- α のmRNAの発現が対照群と比べ減少していることが明らかとなった。以上のことから、抗Delta抗体投与はIFN- γ 産生の減少を介してTh1への分極化を阻害し、TMEV-IDDを抑制した可能性が示唆された。

研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis:MS)はヒトの中枢神経系を侵す代表的な脱髄疾患であり、その発症には免疫系が関与していると考えられているがその詳細な機序は未だ不明である。自己免疫を誘導する因子は不明であるが何らかのウイルス感染がその引き金になっているものと考えられている。この観点より感受性マウスにMSに酷似した脱髄性病変を引き起こすタイラー脳脊髄炎ウイルス (Theiler's murine encephalomyelitis virus: TMEV) による免疫性脱髄疾患 (TMEV-induced demyelinating disease: TMEV-IDD) の動物実験モデルはMS

の病因の解明及び治療の開発に非常に有用である。最近Notchシグナルは神経、造血、血管、体節など様々な器官の発生分化に重要であり、免疫系においては、Deltaを介したNotchシグナルはTh1への分化を促進し、一方、Jagged1を介したシグナルはTh2への分化を促進することが報告されている。MSの発症にはTh1細胞から産生されるサイトカインが発症に関与していると考えられており、今回Th1への分化を促進するDeltaを、抗Delta抗体を用いてブロックすることにより、TMEV-IDDにおける役割を検討するとともに、TMEV-IDDを用いて抗Delta抗体のMSに対する治療薬としての可能性を検討した。

1)信州大学医学部

2)順天堂大学医学部

3)Northwestern 大学医学部

モデルである TMEV-IDD を用いて、抗 CD70 抗体の効果を検討した。

研究方法

SJL/J マウス雌 6 週齢の左大脳半球内に TMEV(1×10^6 PFU)を接種し、TMEV-IDD を作製した。抗 CD70 抗体の投与時期による抗体効果を観察するために 3 群に分けた。induction phase 群には TMEV 接種 3 日前から抗 CD70 抗体 0.25mg 量を 3 日に 1 回計 8 回抗 CD70 抗体を投与した。effector phase 群は発症直前(接種後 20 日目)から計 8 回抗 CD70 抗体を投与した。対照群には rat IgG を同じ日程で投与した。TMEV 接種後 43 日目のマウスの脾臓および脊髄からリンパ球を分離した後、刺激培養し CD4+T 細胞における IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10 のサイトカイン産生細胞数を Flow cytometry を用いて測定した。TMEV 接種後 43 日目のマウスの脊髄から mRNA を抽出し各種サイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10) の mRNA を real-time PCR を用いて定量した。TMEV 接種後 43 日目のマウスを還流固定し脊髄の病理学的検討を行った

研究結果

抗 CD70 抗体を effector phase に投与すると TMEV-IDD は有意($p < 0.05$)に抑制された(Fig.1)。脊髄の組織像においても対照群と比較して炎症は軽度であり、脊髄浸潤細胞数も対照群と比較して減少していた(Fig.2)。サイトカインの mRNA の定量では IFN- γ のみが有意($p < 0.05$)に低下し、TNF- α は減少する傾向がみられた(Fig.3)。サイトカイン産生細胞数の測定では、

脊髄では特に差は見られなかったが、脾臓では IFN- γ ・TNF- α 共に減少する傾向は見られた

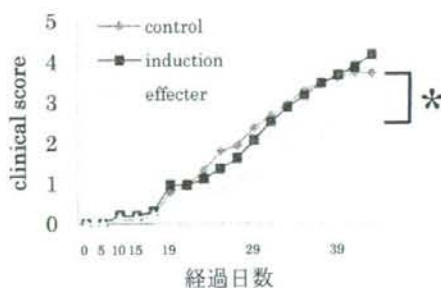


Fig.1 clinical score

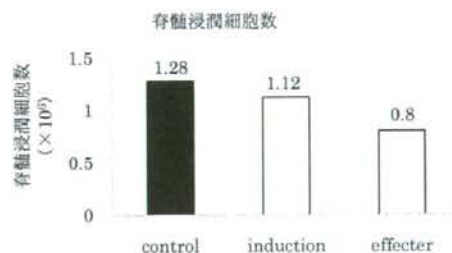


Fig.2 脊髄浸潤細胞数

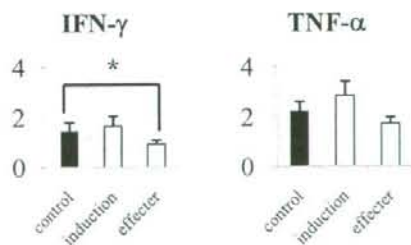


Fig.3 脊髄における mRNA の定量

研究方法

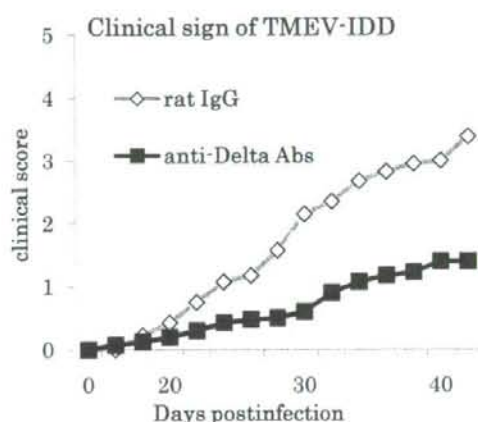
SJL/J マウス雌 6 週齢の左大脳半球内に TMEV(1×10^6 PFU)を接種し、TMEV-IDD を作製した。抗 Delta 抗体の投与時期による効果を観察するために 2 群に分けた。抗 Delta 抗体投与群は発症直前(接種後 20 日目)から計 8 回、抗 Delta 抗体を投与した。対照群には rat IgG を同じ日程で投与した。TMEV 接種後 43 日目のマウスの脾臓および脊髄からリンパ球を分離し、トリパンブルーで染色後、浸潤細胞数を測定した。また、分離してきたリンパ球を刺激培養し CD4+T 細胞における IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10 のサイトカイン産生細胞数を Flow cytometry を用いて測定した。TMEV 接種後 43 日目のマウスの脊髄から mRNA を抽出し各種サイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10)の mRNA を real-time PCR を用いて定量した。TMEV 接種後 43 日目のマウスを選流固定し脊髄の病理学的検討を行った。

研究結果

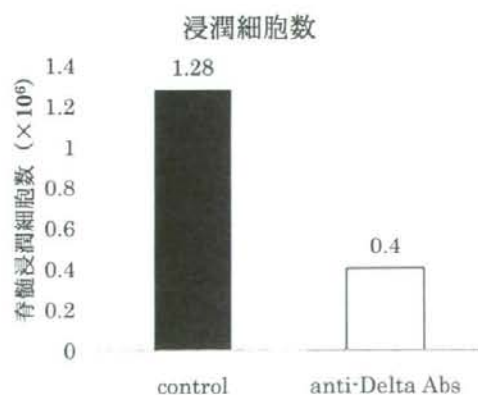
Rat IgG 投与対照群の TMEV-IDD の発症率は 100%(20/20)であり、臨床症状の増悪が見られた。一方、抗 Delta 抗体を投与した effector group は TMEV-IDD の発症率が 55%(11/20)と低下し、平均臨床スコアも有意に抑制された(図 1、 $p < 0.05$)。組織学的にも対照群ではマクロファージ、リンパ球の浸潤が広範囲に見られるが、抗 Delta 抗体投与群ではマクロファージ、リンパ球の浸潤が軽度であり、spinal cord への浸潤単核細胞数は対照群が 1.28×10^6 個に対して、Anti-Delta Ab 投与群では 0.4×10^6 個と明らかに減少した(図 2)。Spinal cord における

各サイトカインの mRNA の発現では抗 Delta 抗体投与群は、IFN- γ 、TNF- α の発現が低下していたが(図 3)、spinal cord、脾臓からの CD4+ サイトカイン産生細胞の割合では対照群、抗 Delta 抗体投与群ともに差は認められなかった(図 4, 5)。

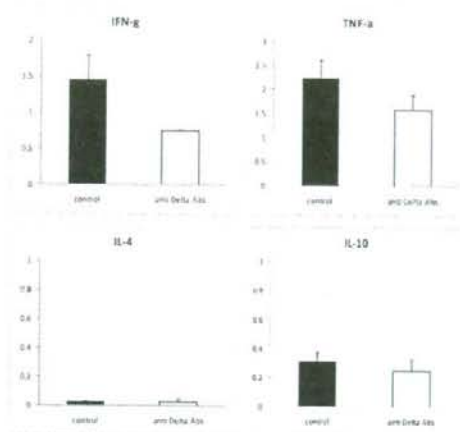
(図 1)



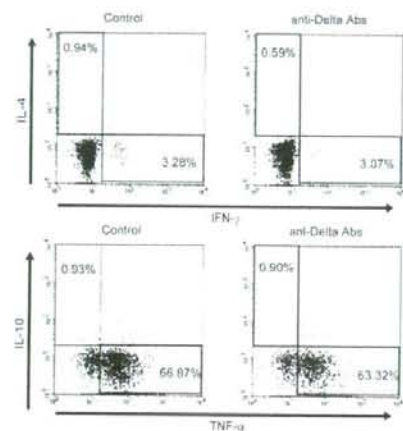
(図 2)



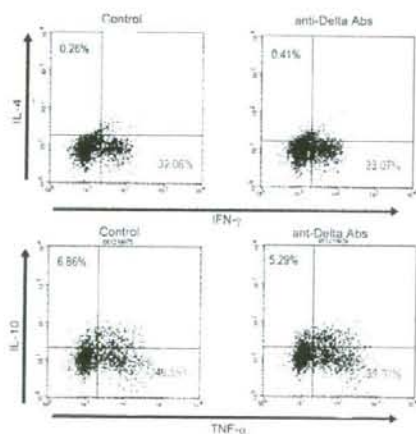
(図 3)



(図 4)



(図 5)



考察

NotchレセプターはT cellの活性化や分化など様々な細胞の運命決定を制御している。CD4⁺T cell上に発現しているNotchレセプターは樹状細胞上に発現しているDelta, Jaggedとの相互作用によりNotchシグナルが活性化し、辺縁CD4⁺T cellの反応を惹起する。T cellにおけるNotchシグナルは、いくつかの細胞内の現象、例えばNF-κB, PI3K/AKT経路やIL-4, T-betの遺伝子の翻訳の活性化などに関係があり、Deltaを介したNotchシグナルはTh1への分化を促進する役割を果たしていることが明らかとなっている。今回このNotchシグナルを抗Delta抗体でブロックすることにより、TMEV-IDDの臨床症状を有意に抑制し、CNSへの単核円形細胞の浸潤細胞数の著明な減少、脊髄でのIFN-γ, TNF-αのmRNAの発現が減少していることが明らかとなった。抗Delta抗体がどのようにTMEV-IDDを抑制するかは今後さらに検討が必要である。

結論

抗Delta抗体投与は、NotchとDeltaとの相互作用をブロックすることにより、Th1の活性化の抑制を介してTMEV-IDDを抑制する可能性が示唆された。

文献

- 1) Derk Amsen, J. Magarian Blander, Gap Ryol Lee, Kenji Tanigaki, Tasuku Honjo, and Richard A. Flavell: Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different Notch ligands

on antigen-presenting cells. *Cell*, 117: 515-526, 2004.

- 2) Maciej Juryneczyk*, Anna Jurewicz*, Cedric S. Raine† and Krzysztof Selmaj.(2008). Notch3 Inhibition in Myelin-Reactive T Cells Down-Regulates Protein Kinase Cθ and Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*, 180: 2634-2640, 2008

- 3) Wassim Elyaman*, Elizabeth M. Bradshaw*, Yue Wang*, Mohamed Oukka*, Pia Kivisäkk*, Shigeru Chiba†, Hideo Yagita† and Samia J. Khoury: Jagged1 and Delta1 differentially regulate the outcome of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 179: 5990-5998, 2007

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

健康危険情報

なし

Autoimmune regulator (Aire) はミエリン抗原の胸腺内発現と EAE の発症を制御する

研究分担者 山村 隆¹⁾

共同研究者 田川朝子¹⁾、荒浪利昌¹⁾、松本満²⁾

研究要旨

多発性硬化症(MS)の発症における中枢性免疫寛容が果たす役割は、完全には解明されていない。我々は、胸腺髄質上皮細胞(mTECs)に特異的に発現して組織抗原の異所性発現を司る、自己免疫調節遺伝子(Aire 遺伝子)によるミエリン抗原に対する免疫寛容の成立について検討し、中枢性免疫寛容の破綻が MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症に及ぼす影響について考察した。Aire 欠損マウスの mTECs では proteolipid protein (PLP) の splicing variant である PLP/DM20 の mRNA 発現量が野生型マウスに比べて有意に低く、PLP ペプチドを免疫した場合、EAE の経過は Aire 欠損マウスにおいて有意に重症であり、脾臓および脊髄病巣から分離した T 細胞による IL-17 と IFN- γ の産生量も Aire 欠損マウスにおいて高値であった。一方、myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) の胸腺内発現は野生型と Aire 欠損マウスで同等に認められ、MOG ペプチドに対する免疫応答にも差異がみられなかった。さらに Aire 欠損マウスでは、加齢とともに、無免疫でも髄鞘抗原に対する自己免疫応答が起きていることが示唆された。これらのことから、Aire がミエリン抗原に対する中枢性免疫寛容成立を介して、MS の発症を制御する重要な因子であることが示唆された。

研究目的

MS は中枢神経のミエリン抗原蛋白を標的とする、T 細胞が介在する自己免疫疾患であると考えられている。胸腺髄質では、種々の組織抗原が異所性に発現しており、これらに対して強い反応性を示す自己反応性 T 細胞はクローン消去され、中枢性免疫寛容が成立する。従って中枢性免疫寛容の破綻は自己免疫疾患を引き起こす重大な原因となり得る。ヒトやマウスの胸腺にはミエリン抗原が発現していることが知られているが^{1,2)}、ミエリン抗原に対する免疫寛容の成立およびその破綻が、MS 発症とどのように関連しているかは未だ明らかでない。

Aire 遺伝子は胸腺髄質上皮細胞(mTECs)に特異的に発現し、組織抗原の異所性発現を促進する転写因子として働き、T 細胞の中枢性免疫寛容を誘導する。Aire 遺伝子を欠損しているヒトやマウスは、種々の臓器に、臓器特異的自己免疫疾患を自然発症するが、中枢神経系における自己免疫疾患の報告はなく、Aire がミエリン抗原の免疫寛容の成立に関与するのかが明らかでない。我々は、Aire 遺伝子の、ミエリン抗原の胸腺内発現と中枢性免疫寛容成立への関与を検討し、中枢神経系自己免疫疾患の発症における中枢性免疫寛容の重要性について考察した。

研究方法

1) 対象: Aire 欠損および野生型 C57BL/6J の雌マウスを用いた。ミエリン抗原ペプチドの免疫には、

Aire 欠損による自己免疫症状の影響を避けるため、生後 6~8 週令のマウスを使用した。一方、中枢神経系における自己免疫応答の自然発症を検討する実験では、生後 6~8 ヶ月の加齢マウスを使用した。

2) 胸腺内髄鞘抗原の発現測定

野生型および Aire 欠損マウスの胸腺から、高純度の mTEC を精製分離し、mRNA を抽出した。定量的 RT-PCR により、MOG および PLP 遺伝子発現レベルを定量した。

3) EAE の誘導

MOG および PLP ペプチドと完全フロイントアジュバントでエマルジョンを作製し、野生型及び Aire 欠損マウスに免疫した。同時に、百日咳毒素を腹腔内注射し、臨床症状を追跡した。

4) サイトカイン産生量測定

免疫後のマウスの脾臓細胞を、T 細胞と非 T 細胞 (抗原提示細胞) に分け、ペプチドで再度刺激し、培養上清中の IFN- γ 、IL-17 濃度を ELISA 法により測定した。また、高齢マウスにおける脊髄浸潤細胞の解析においては、無免疫の生後 6~8 ヶ月の高齢マウスから脊髄を取り出し、比重遠心分離法により、脊髄浸潤単核球を採取、ペプチドで再度刺激し、培養上清中の IFN- γ 、IL-17 濃度を ELISA 法により測定した。

1) 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

2) 徳島大学疾患醸成学研究中心免疫病態研究部門

研究結果

1) mTECs におけるミエリン抗原の発現: MOG の発現は、野生型と Aire 欠損マウスとで同等であったが、PLP/DM20 は、Aire 欠損マウスで、野生型に比して $35 \pm 19\%$ と有意に低下していた。

2) MOG₃₅₋₅₅ と PLP₁₇₈₋₁₉₁ 免疫後の EAE の経過: MOG₃₅₋₅₅ による EAE は、両ストレインで同等のスコアであったが、PLP₁₇₈₋₁₉₁ 免疫後の EAE は、野生型に比べ Aire 欠損マウスで有意に重症であった ($p < 0.05$)。

3) MOG₃₅₋₅₅ 免疫後の脾臓 T 細胞の IL-17、IFN- γ 産生量は、両ストレイン間で有意差を認めなかったが、PLP₁₇₈₋₁₉₁ 免疫後には、野生型に比べ、Aire 欠損マウスの脾臓 T 細胞は、両サイトカインの産生量が有意に高値であった。

4) ミエリン抗原に対する中枢神経系自己免疫応答の自然発症: 無免疫の加齢 Aire 欠損マウスの脊髄からは、同週令の野生型に比べ、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞ともに有意に多く採取された。これらの細胞を、MOG₃₅₋₅₅、PLP₁₇₈₋₁₉₁ ペプチドで刺激すると、Aire 欠損マウスの脊髄浸潤細胞は有意に多くの IL-17 と IFN- γ を産生した。

考察

本研究から、Aire は、ミエリン抗原の胸腺内異所性発現と中枢性免疫寛容の成立を制御することが示唆された。ミエリン抗原に対する中枢性免疫寛容の成立は、MS 発症を制御する上で、重要な因子であると考えられる。さらに、Aire 欠損マウスでは神経症状の自然発症はみられないものの、中枢神経内にミエリン抗原特異的な T 細胞が侵入し、自己免疫応答が加齢とともに進行することが示唆された。2008 年 Giraud らは³、自己免疫的背景を持たない小児において、重症筋無力症の標的抗原であるアセチルコリン受容体遺伝子 CHRNA1 の mRNA の胸腺内発現量は、Aire の発現量と正の相関を示す、と報告している。Aire 欠損者でない健常者でも、Aire の胸腺内発現の減少は、ミエリン抗原の胸腺内発現減少を引き起こし、MS 発症の危険因子となりうると推察される。

結論

1. Aire 遺伝子はミエリン抗原のうち、PLP の胸腺内発現と中枢性免疫寛容の成立に関与する。
2. ミエリン抗原に対する中枢性免疫寛容の破綻は、MS 発症の危険因子となりえる。

3. Aire 非欠損者においても、Aire の胸腺発現の低下は、MS 発症の危険因子となりえる可能性がある。

文献

1. Pribyl TM, et al. J Neurosci Res. 45:812-819,1996.
2. Derbinski J. et al. Nat Immunol. 2:1032-1039,2001.
3. Giraud M, et al. Nature 448:934-937,2007.

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

1) 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

2) 徳島大学疾患酵素学研究中心免疫病態研究部門

MOG-EAE 急性期治療手段としてのフェニトイン療法の確立

班 員 松井 真¹⁾

共同研究者 荒谷信一¹⁾、稲田紘之¹⁾、中西恵美¹⁾、長山成美¹⁾
菌部佳史²⁾、錫村明生²⁾

研究要旨

多発性硬化症 (MS) の動物モデルと考えられている実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) では、再発予防手段として様々な免疫修飾作用のある薬剤や治療手段が試みられてきた。しかし、急性期の症状を緩和するという観点で他の薬剤の使用が行われたのは、フェニトイン (PHT) のみである。しかし既報では、急性期の症状を抑制するものの、個体死も多いという事実が存在している。このため、最適の投与経路および dose を決定するために、MOG-EAE のシステムを用いた。その結果、PHT は比較的大用量で個体死を招き、0.5mg の週 3 回経口投与では、効率的に臨床スコアを改善することが判明した。本 dose は、体重換算で 16mg/kg であり、ヒトでは 800mg となって投与し得る最大量を越えている。今後体重換算 5-15mg の範囲で有効性と安全性の確認を行う意義があると考えられる。また、投与中止により約一週間で症状が増悪する点について、別個の検討が必要である。

研究目的

多発性硬化症 (MS) の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) に Na チャネル阻害薬であるフェニトイン (phenytoin; PHT) を投与することで臨床スコアが抑制されることが報告されているが、PHT の至適投与量や投与経路を初め、急性期における症状抑制機序の解析も十分には行われていない。今回われわれは EAE 急性期症状の抑制が MS 再発時の治療に繋がる可能性を考慮し、PHT の効果を最大に引き出すための投与経路および至適投与量について検討した。

研究方法

1) EAE

EAE はミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白 (MOG) 35-55 とフロイント完全アジュバントをエマルジョン化し C57BL/6J ♀ 7 週齢の腰背部に皮下注射、その後百日咳菌毒素を腹腔内注射することで作製した。

1) 金沢医科大学脳脊髄神経治療学神経内科学

2) 名古屋大学環境医学研究所神経免疫

臨床スコアは以下のように評価した。

- 0: 正常、1: 尾の脆弱化・尾の低位置保持、
- 2: 後肢の脆弱化、3: 後肢麻痺、
- 4: 全身麻痺、5: 全身衰弱・死亡

2) フェニトイン投与経路および用量

PHT は、経口投与と腹腔内投与の実験系を並行して行った。

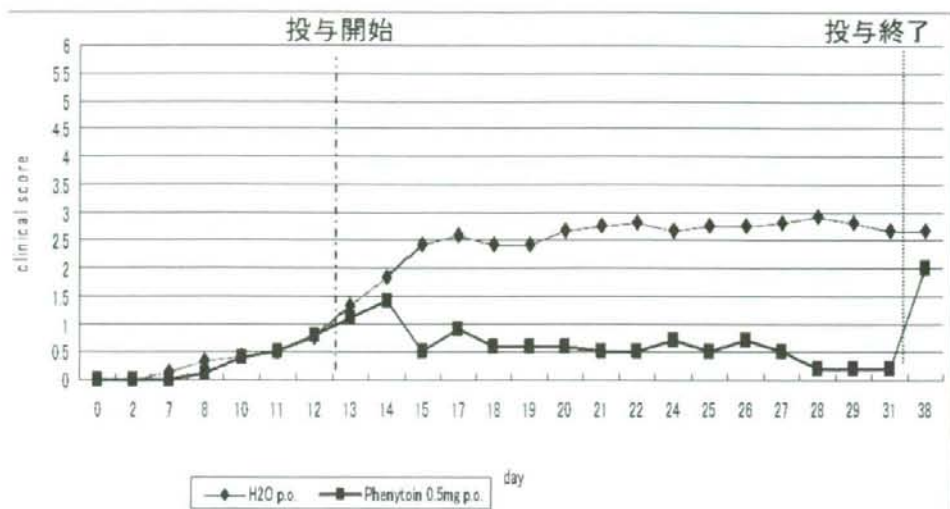
実験 1 では、注射用蒸留水を用いて 0.5 mg、5mg、10mg in 0.1ml の 3 濃度に調整、EAE 感作後 day12 より週 3 回隔日投与を施行した。Control として同量の注射用蒸留水を経口または腹腔内投与し、臨床スコアを比較した。

実験 2 では、投与濃度を 0.25 mg、1.0mg、2.5mg in 0.1ml に減量し、EAE 感作後 day17 より週 3 回隔日投与を行った。

実験 3 では、投与開始は EAE 感作後 day12 に固定し、投与の濃度をさらに減量して、0.1mg、0.5mg、1mg in 0.1ml を用いた。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、動物愛護の観点から、金沢医科大学動物実験委員指針に従って行われた。



結果

- 1) 実験1の5mg、10mg投与では、当日または、翌日に全ての個体が死亡した。
- 2) 実験2の2.5mg投与群では全ての個体が3日以内に死亡した。1mgおよび0.25mg投与群では、個体死はなかったが、臨床スコアの改善効果はなかった。
- 3) 実験3では、図のごとく、PHT 0.5mg経口投与群の臨床スコアはcontrolと比較し明らかに改善された。経口投与群と腹腔内投与群の効果は同様であった。さらに、day31にてPHTの投与を中止したところ、その後7日間でcontrol群と同レベルまで臨床スコアは増悪した。

結論

PHTは、MOG-EAEが発症し始めるday12から0.5mgを週3回経口投与することで有意に臨床スコアを軽減することができる。経口投与と腹腔内投与では効果に大きな差は出ない。

考察

マウス1個体につき0.5mgのPHT経口投与は、体重換算で16mg/kgであり、ヒトでは800mgとなって投与し得る最大量を越えている。今後体重換算5-15mgの範囲で有効性と安全性の確認を行う意義があると考えられる。また、マウスでの血中濃度測定を行い、16mg/kgのdoseがヒトにおけるどの程度の用量に相当するかの検討が必要である。

投与中止により症状が増悪する点については、既報でも観察されている。PHTの作用点については、免疫修飾以外の作用を含めた別個の検討が必要である。

参考文献：Black JA. Et al; J Neurol Sci 15; 57-63, 2008

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