

界面活性剤で処理した後、シヨ糖密度勾配による超遠心法で lipid rafts 画分を分離し、Western blotting により AQP4 M1 と AQP4 M23 の局在を検討した。さらに、NMO 患者血清(8 例)で AQP4 M1,と AQP4 M23 発現細胞を染色し、その染色強度の違いを検討した。

研究結果

用いた 3 種類の細胞すべてで、C 末端に EGFP と RFP の標識をつけた AQP4 M1 および AQP4 M23 を発現する stable transformant を得ることができた。AQP4 の発現様式は、細胞の種類にかかわらず同じであった。これらの細胞では、AQP4 M1 は細胞表面に斑点状に発現しており、AQP4 M23 はび慢性に発現していた。lipid rafts のマーカーである caveolin を異なる蛍光色素で染色したところ、AQP4 M1 と caveolin は同じ染色パターンを示した。一方 AQP4 M23 を発現した細胞では、AQP4 M23 と caveolin は異なる染色パターンを示した。

また、EGFP 標識 AQP4 M1 と EGFP 標識 AQP4 M23 の stable transformant を用いてシヨ糖密度勾配による超遠心法でそれぞれの細胞より lipid rafts 画分を精製し、AQP4 M1 と AQP4 M23 の局在を Western blotting により検討したところ、lipid rafts 画分に抗 GFP 抗体で認識される AQP4 M1 が認められた。一方 AQP4 M23 は lipid rafts 画分には認められなかった。

さらに NMO 患者 8 例の血清で、これらの stable transformant を染色したところ、AQP4 M1 と AQP4 M23 はどちらも同じような染色強度で、isoform の違いによる染色性の差は認められなかった。

考察

蛍光色素との融合蛋白として発現させた AQP4 M1 分子は、蛍光染色およびシヨ糖密度勾配・Western blotting 法により lipid rafts 画分に存在することが示唆された。一方、パルミトイル化される可能性のある N 末端 13 番目と 17 番目のシステイン残基を持たない AQP4 M23 は、AQP4 M1 と異なり、lipid rafts には存在しないことが示唆された。

最近の報告では、isoform に対する染色性の違いから、AQP4 M23 に対する抗体の方が病的意義が高いとするものがあるが、我々の実験系では、NMO 患者血清はいずれの isoform も同様に染色した。

結論

AQP4 M1 分子は、lipid rafts 画分に存在し、AQP4 M23 は lipid rafts 画分に存在しないことが示された。一方、AQP4 M23 は、AQP4 M1 と異なり、lipid rafts には存在しないことが示唆された。

また、NMO 患者血清は、細胞表面の AQP4 M1 と AQP4 M23 の 2 つの分子を同じように認識していることが示唆された。

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

抗アクアポリン4抗体の定量的測定方法の開発および有用性の検討

研究分担者 吉良潤一¹⁾

共同研究者 米川智¹⁾, 真崎勝久¹⁾, 磯部紀子¹⁾, 松下拓也²⁾,

研究要旨

視神経脊髄炎 (NMO) に特異的な抗体とされる抗アクアポリン4(AQP4)抗体の測定方法については、フローサイトメトリー法 (FCM), ELISA 法, 免疫染色法(IF)がある. 私たちの独自に開発した IgG サブクラス特異的 FCM 法, bridging ELISA 法と IF を比較して検討した. 特異度は三つの方法全てで 100%であった. NMO の感度は IF で 41.4%, FCM で 51.7%, ELISA で 48.3%であった. 多発性硬化症検体で陽性率は IF で 12.0%, FCM で 16.9%, ELISA で 14.1%であった. ELISA での抗 AQP4 抗体レベル, FCM での mean fluorescence intensity (MFI) 比は IF での抗体価と相関を認めた. ELISA の抗 AQP4 抗体レベルは, 視神経炎の再発回数と正の相関を示し, FCM の IgG 抗体サブクラス解析では, IgG1 の MFI 比は, 視神経炎の再発回数及び罹病期間に正の相関を示した. IgG2 の MFI 比は, 罹病期間との相関はなく, SS-A/B 抗体陽性者で有意に高く, 脊髄病変の長さとの負の相関を示した. FCM と bridging ELISA は, IF と比較し特異度, 感度が優れ, 有用性が高い. 抗 AQP4 抗体の IgG1 サブクラスは罹病期間が長く, 再発回数が増えると affinity maturation により抗体価が高くなる. 一方, IgG2 サブクラスは病勢との負の相関があると考えられる.

研究目的

視神経脊髄炎 (NMO) は視神経, 脊髄に選択的に障害を起こす炎症性疾患である. 抗 AQP4 抗体は NMO に対し, 高い特異度と中等度の感度を有している. 抗 AQP4 抗体の測定法としては, AQP4 発現細胞をもちいた間接蛍光免疫染色法 (IF) が一般的だが, 抗体価の定量には煩雑な手技と時間を要する. 私たちは AQP4 持続発現細胞を用いたフローサイトメトリー (FCM) による抗 AQP4 抗体の定量的測定法を開発した. 今回, 神経疾患患者と健常者の血中抗 AQP4 抗体を FCM 法と RSR 社の開発した bridging ELISA 法, IF 法により測定し, それぞれの NMO に

対する感度, 特異度を明らかにする.

さらに抗体価, および IgG サブクラスの関係と臨床像との関連を明らかにする.

研究方法

多発性硬化症患者 (MS) 142 名, NM029 名, 再発性脊髄炎等 (RM/LM) 19 名, その他の炎症性神経疾患 57 名, 非炎症性神経疾患 29 名, 健常者 28 名の血清を用い, FCM, bridging ELISA, IF 法で抗 AQP4 抗体価を測定した. IF 法は, Green Fluorescent Protein (GFP) - AQP4 蛋白を発現させた HEK293 細胞に検体血清を反応させ, 蛍光標識された二次抗体を加えて, 共焦点レーザー顕微鏡で判定を行った. 抗体価は段階希釈により決定した. FCM 法は, GFP - AQP4 蛋

¹九州大学大学院医学研究院神経内科学

²九州大学大学院医学研究院臨床神経免疫学

白を発現させた HEK293 細胞と非発現の細胞を混合し、検体血清と反応させた後に、蛍光標識された IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 特異的二次抗体を添加して、フローサイトメトリーを行い mean fluorescence intensity (MFI) 比を計算した。Bridging ELISA 法では、プレート上に固相化されたヒト AQP4 とビオチン標識した液相の AQP4 を架橋できる抗 AQP4 抗体のみを定量的に測定した。

結果

NMO に対する特異度は三つの方法全てにおいて 100%であった。NMO に対する感度は IF 法で 41.4%, FCM 法で 51.7%, ELISA 法で 48.3%であった。RM/LM 検体で抗 AQP4 抗体陽性率は IF 法で 31.6%, FCM 法で 31.6%, ELISA 法で 36.8%であった。MS 検体で陽性率は IF 法で 12.0%, FCM 法で 16.9%, ELISA 法で 14.1%であり、ELISA 法での抗 AQP4 抗体価、FCM 法での MFI 比は IF 法での抗体価と相関を認めた。ELISA 法の抗 AQP4 抗体価は、視神経炎の再発回数と正の相関を示し、FCM 法の IgG 抗体サブクラス解析では、IgG1 の MFI 比は、視神経炎の再発回数及び罹病期間と正の相関を示した。IgG2 の MFI 比は、罹病期間との相関はなく、抗 SS-A/B 抗体陽性者で有意に高く、脊髄病変の長さとの相関を示した。

考察

NMO における抗 AQP4 抗体の測定感度は FCM 法が最も高かった。スライドに細胞を固着させるため、細胞表面上の蛋白構造が変化する可能性がある IF 法と異なり、FCM 法は液相の生細胞と反応させるため、AQP4

の三次構造が保持され、IF 法と比較し感度、特異度が高くなったと考えられた。また、bridging ELISA 法も従来の固相化蛋白だけでなく、液相化したビオチン結合 AQP4 蛋白を併用したことで、IF 法と比較し十分な特異度、感度が得られており、実際の診療において有用性が高いと考えられた。また IgG1 サブクラスの抗 AQP4 抗体は罹病期間、視神経炎の再発回数と正の相関があり、再発を繰り返すことによって affinity maturation により抗体価が上昇していると考えられる。一方、IgG2 サブクラスは補体結合能が弱く、脊髄病巣の長さとの逆相関がみられることから、中枢性炎症性疾患に対し保護的に作用している可能性がある。

結論

FCM 法と ELISA 法は抗 AQP4 抗体の同定に有用である。また、その抗体価および IgG サブクラスと臨床上的特徴に関連が認められた。ELISA 法の抗 AQP4 抗体価は視神経炎の再発回数と正の相関を示したものの、再発の発生と抗体価の上昇には関連を示さず、再発を繰り返すことによって affinity maturation により抗体価が上昇しているものと考えられた。

文献

- 1) Matsuoka T, Matsushita T, Kawano Y, et al. (2007) Heterogeneity of aquaporin-4 autoimmunity and spinal cord lesions in multiple sclerosis in Japanese. *Brain* 130:1206-1223.
- 2) Matsushita T, Isobe N, Matsuoka T, et al. Aquaporin-4 autoimmune syndrome and anti-aquaporin-4 (2009)

antibody-negative opticospinal
multiple sclerosis in Japanese. *Mult*
Scler 15:834-847

知的財産権の出願・登録状況
なし

健康危険情報

なし

シェーグレン症候群を伴う NMO における

抗アクアポリン 5 抗体の検討

研究分担者 松井 真

共同研究者 田中恵子

研究要旨

Neuromyelitis optica (NMO) は、抗アクアポリン 4 (AQP4) 抗体がその病態に深く関わる抗体介在性の疾患と考えられている。NMO では他の全身性自己免疫病で検出される自己抗体の陽性率が高く、また自己免疫疾患の合併が多い。この中で特にシェーグレン症候群 (Sjogren syndrome: SJS) の合併が多いことが特徴である。SJS の病変の場となる唾液腺などの分泌腺ではアクアポリン 5 (AQP5) の発現が多いことから、本研究では抗 AQP4 抗体と抗 AQP5 抗体との関連について検討し、NMO では AQP4 のみならず AQP5 に対する抗体も存在することが、SJS を合併しやすい背景になっていると考えられた。

研究目的

Neuromyelitis optica (NMO) は、抗アクアポリン 4 (AQP4) 抗体がその病態に深く関わる抗体介在性の疾患と考えられている。NMO では他の全身性自己免疫病で検出される、抗核抗体などの自己抗体の陽性率が高く、また自己免疫疾患の合併が多い。この中で特にシェーグレン症候群 (Sjogren syndrome: SJS) の合併が多いことが特徴である。SJS の病変の場となる唾液腺などの分泌腺ではアクアポリン 5 の発現が多い。NMO に SJS の合併が多い理由は不明であり、NMO では、抗 AQP4 抗体のみならず AQP5 に対する抗体が産生される可能性、抗 AQP4 抗体が AQP5 と交叉反応をすることで SJS 様の病態を生じる可能性などが考えられる。今回我々は、抗 AQP5 抗体の検出系を作成したことから、SJS 合併の条件として抗 AQP5 抗体の関与の有無を検討した。

研究方法

対象は、抗 AQP4 抗体陽性 NMO で抗 SS-A/Ro 抗体が陽性の 10 例、抗 AQP4 抗体陽性 NMO で抗 SS-A/Ro 抗体が陰性の 10 例、抗 AQP4 抗体陰性で抗 SS-A/Ro 抗体陽性の primary Sjogren 症候群 22 例、抗 AQP4 抗体陰性で抗 SS-A/Ro 抗体陰性の疾患対照 (多発性硬化症、脳血管障害、運動ニューロン病、脊髄小脳変性症) 10 例、健常人 6 名の血清である。

抗 AQP5 抗体の検出は、ヒト AQP5 cDNA を transfect した HEK 293 細胞に血清検体を反応させ、さらにウサギ抗 AQP5 抗体を反応させ、FITC-抗ヒト IgG および PE-抗ウサギ IgG を二次抗体として二重染色で両者の反応の一致する染色性を確認して陽性を判断した。

(倫理面への配慮)

本研究は金沢医科大学臨床研究倫理審査委員会で承認され、患者へのインフォームドコ

ンセントのもと収集された検体を使用した。

研究結果

抗 AQP5 抗体陽性の場合、HEK 細胞の細胞表面が縁取りされるように染色された。このような染色パターンで抗 AQP5 抗体陽性と判断されたのは、抗 AQP4 抗体陽性 NMO で抗 SS-A/Ro 抗体が陽性の 10 例中 10 例、抗 AQP4 抗体陽性 NMO で抗 SS-A/Ro 抗体が陰性の 10 例中 10 例、抗 AQP4 抗体陰性で抗 SS-A/Ro 抗体陽性の primary SjS 22 例中 17 例であり、抗 AQP4 抗体陰性で抗 SS-A/Ro 抗体陰性の疾患対照 10 例および健常人 6 名はすべて陰性であった。

考察

NMO においては、抗 AQP4 抗体陽性の全例で抗 AQP5 抗体も陽性であった。一方、primary SjS では、抗 AQP4 抗体はすべて陰性であったが、うち 77% に抗 AQP5 抗体が陽性であった。疾患対照、健常人ではすべて陰性であり、SjS においては、抗 AQP5 抗体が疾患の診断マーカーとなりうる可能性が考えられた。しかし、NMO では抗 AQP4 抗体陽性例と抗 AQP5 抗体陽性例が overlap することから、抗 AQP4 抗体の一部が交叉反応により AQP5 を認識している可能性が高いと考えられた。

SjS では抗 SS-A/Ro 抗体が高値の例で、より抗 AQP5 抗体が陽性となる傾向が見られたことより、抗 AQP5 抗体が陽性となる NMO 症例では、抗 SS-A/Ro 抗体が陽性になる頻度が高く、SjS を生じやすい背景がある可能性が考えられた。

結論

抗 AQP5 抗体は、必ずしも SjS を合併する NMO にのみ出現するわけではない。しかし、抗 AQP4 抗体陽性の NMO では抗 AQP5 抗体が

併存することで、何らかの条件が加わることにより抗 SS-A/Ro 抗体が生じたり、その一部で SjS を合併する背景になりう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

実験的自己免疫性脳脊髄炎の病態における コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの役割

班員 楠 進¹⁾
研究協力者 ○宮本勝一¹⁾
共同研究者 田中紀子¹⁾、門松健治²⁾
1) 近畿大学医学部 神経内科
2) 名古屋大学医学部 分子生物学

【目的】

コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)は中枢神経系における細胞外マトリックスの主要構成成分であり神経可塑性に関与することが知られている。脊髄外傷モデルでは CSPG は神経修復に阻害的に働き、CSPG を抑制する方向に調節すると修復が良好になることが知られている。しかし、中枢神経免疫疾患においては、CSPG の解析は進んでおらず、病態への影響は不明である。今回、我々は多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を用いて、中枢性神経免疫疾患における CSPG の役割を検証した。

【方法】

6位の硫酸化を担うコンドロイチン 6-O-硫酸基転移酵素 1 を欠損するマウス(C6ST1-KO、B6バックグラウンド)に対してMOG(35-55)ペプチドを用いてEAEを誘導した。C6ST1-KOは相対的に4位硫酸化が増加しているが、生存、生育、生殖に影響はなく、脾臓におけるnaive T細胞が減少している程度の変化しか見られない。MOG反応性リンパ球のrecall responseを評価するために、MOG感作12日目で脾臓と所属リンパ節を摘出しsingle cell状態のリンパ球をMOG再刺激下で48時間培養した。細胞増殖は³[H]取り込みにて評価し、培養上清はELISA法にて各種サイトカインを測定した。また、MOG(35-55)反応性T細胞をC6ST1-KOあるいは野生型マウス(Wt)に静脈注入し、Adoptive Transfer EAEを誘導した。さらにEAEにおいて、活性化T細胞の中枢神経内へ侵入程度を評価するためにActive immunization EAE誘導後10日目にマウス脳を摘出し、比重液を用いてリンパ球を分離し、さらにFACSを用いてCD4+細胞数をカウントした。

【結果】

C6ST1-KOではピーク時(day 23、30、31)のEAEスコアはWtと比べて有意に高く、麻痺からの回復も遅延した(Figure1)。MOG特異的リンパ球のrecall responseでは

サイトカイン産生パターンや細胞増殖反応に有意な差がみられなかった(Figure3)。Adoptive Transfer EAE では C6ST1-KO は Wt 比べて軽症であった(Figure2)。EAE 脳内に浸潤した CD4+細胞は C6ST1-KO と Wt では差がなかった(Figure4)。

【考察】

CSPG の糖鎖の改変は EAE を重症化し、回復も遅らせることが判明した。CSPG は抗原特異的 T 細胞の活性化や、活性化 T 細胞の血液脳関門浸潤には関与していなかった。これらの結果から、(正常構造の)CSPG は EAE effector phase において中枢神経内で神経組織の感受性や修復メカニズムに何らかの役割を果たしていることが示唆された。

【結論】

EAE において、(正常構造の)CSPG は神経保護的に作用する。CSPG の調節(硫酸化パターンの修飾)が多発性硬化症の治療につながる可能性がある。

Figure 1

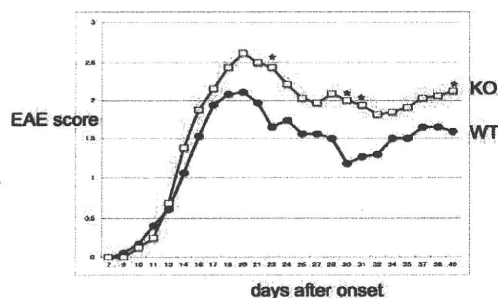


Figure 2

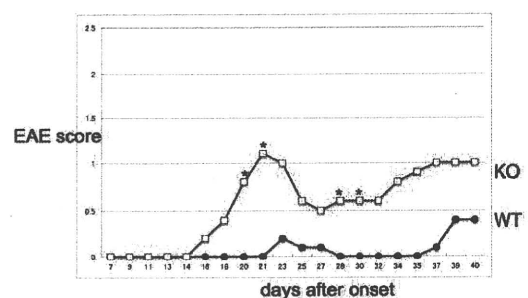


Figure 3

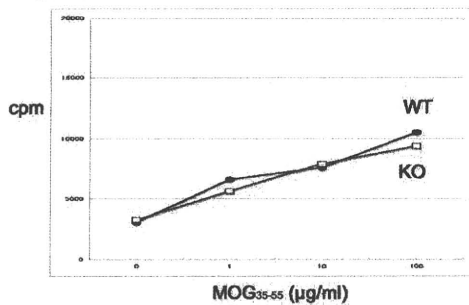
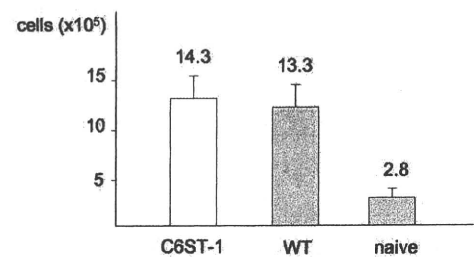


Figure 4



腸管免疫を利用した EAE 治療の試み

分担研究者 中辻裕司¹⁾

共同研究者 高田和城¹⁾、木下允¹⁾、奥野龍禎¹⁾²⁾、佐古田三郎³⁾

研究要旨

多発性硬化症(MS)の患者数が我が国において急速に増加している。一方、腸管粘膜下層、腸管膜リンパ節における Th17 細胞、制御性 T 細胞(Treg)に腸内環境が影響を及ぼし、腸内環境の変化に伴う、全身での免疫動態の変化が炎症性腸疾患や膠原病を始めとする様々な自己免疫疾患において重要な役割を果たしていることが近年報告されている。

今回、我々は腸内細菌叢制御による多発性硬化症治療の第一歩として、乳酸菌の経口投与による実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)に及ぼす効果を検討した。乳酸菌 *Pediococcus acidilactici*(R037)の経口投与により、腸管膜リンパ節での CD4 陽性 IL-10 産生細胞の増加を認め、クリニカルスコアの改善、中枢神経への炎症細胞浸潤の減少、全身での炎症性サイトカイン産生の低下を認めた。

以上より腸内細菌叢制御による多発性硬化症の治療の可能性が示された。

研究目的

腸内細菌叢は、腸管粘膜下層での CD4 陽性 IL-17 産生細胞(Th17 細胞)や、制御性 T 細胞(Treg)の分化に重要な役割を果たしていることが知られている。

腸内環境の変化が、腸管免疫に影響を与え、炎症性腸疾患や膠原病などの様々な自己免疫疾患において重要な役割を果たしていることも示唆されている。

今回、我々は多発性硬化症の治療ターゲットとして腸管免疫に注目し、腸管免疫を制御するものとして古くから知られている乳酸菌を使用し、その動物モデルである EAE に対する乳酸菌投与の効果

とその作用メカニズムについて検討した。

研究方法

EAE は、C57/BL6♀ に myelin oligodendrocyte glycoprotein MOG(35-55)ペプチドと完全フロイントアジュバンド(CFA)を投与後、百日咳毒素(PT)を腹腔内に2回(同時および48時間後)投与し免疫することにより作成した。免疫2週間前から実験終了まで乳酸菌群 (*Lactobacillus*, *Pediococcus*) には、菌 4mg/day、コントロール群には PBS を投与し免疫時、発症時(免疫後 11 日)、症状ピーク時(免疫後 17 日)のリンパ球の解析を用いて行った。

1) 大阪大学大学院医学系研究科神経内科学

2) 大阪大学微生物病研究所感染病態分野

3) 国立病院機構刀根山病院

1) 乳酸菌による腸管免疫の変化を明らか

にするため、乳酸菌を2週間投与した段階での腸管膜リンパ節、粘膜下層におけるT細胞刺激時のサイトカイン産生およびTreg、CD4陽性IL-10産生細胞の比率を調べた。

- 2) EAEの誘導後、全身の免疫動態を調べる為、免疫11日後の所属リンパ節、脾細胞をMOGで再刺激を行いIL-10、IL-17、IFN- γ を測定した。
- 3) 中枢に浸潤した単核細胞の性質を調べるため、免疫17日目の脊髄より単核細胞を分離し、MOG再刺激によるサイトカイン産生およびFACSによるTh17細胞の比率を調べた。

研究結果

- 1) *Pediococcus* 投与群において、EAEのクリニカルスコアの有意な軽減を認めた。
- 2) *Pediococcus* を2週間投与した時点での腸管膜リンパ節では、CD4陽性Foxp3陽性細胞の比率の変化は認めなかったものの、CD4陽性IL-10産生細胞の増加を認めた。

- 3) EAE発症時における所属リンパ節での炎症性サイトカインの低下を認めた。

考察

Pediococcus 経口投与により、腸管膜リンパ節におけるCD4陽性IL-10産生細胞を誘導することで、EAE誘導時の炎症を抑制しEAEの症状を軽減させることが示された。

結論

乳酸菌の経口投与を含む腸内細菌叢の制御は、多発性硬化症の新たな治療法となる可能性が示された。

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

タイラー脳脊髄炎ウイルス誘導による免疫性脱髄性疾患における PD-1/PD-L pathway の役割に関する検討

研究分担者 高 昌星¹⁾
共同研究者 滝沢 章¹⁾、兼山 友輝¹⁾、津金 さやか¹⁾、柳澤 智¹⁾、
武市尚也¹⁾、市川 元基¹⁾、八木田秀雄²⁾

研究要旨

PD-1 は T 細胞、B 細胞、抗原提示細胞上に発現する抑制性の共刺激受容体である。抗原提示細胞上のリガンドである PD-L1 と T 細胞上の PD-1 が反応することにより、T 細胞の活性化を抑制することが明らかとなっている。また、ウイルス感染細胞の免疫機構からの逃避に PD-1/PD-L pathway が関与していることが示されている。今回我々は多発性硬化症 (MS) の動物モデルであるタイラー脳脊髄炎ウイルス (Theiler's murine encephalomyelitis virus : TMEV) 誘導による免疫性脱髄疾患 (TMEV-induced demyelinating disease: TMEV-IDD) マウスにおける PD-1/PD-L の役割を検討した。SJL/J マウスの骨髄から誘導した樹状細胞 (BMDC) の PD-1/PD-L1 mRNA 発現量は、TMEV 感染によって有意に増加した。また、TMEV-IDD マウスの脾臓、脊髄における PD-1/PD-L1 mRNA 発現量は、症状の進行に伴って増加した。さらに、TMEV-IDD マウスに抗 PD-1 抗体を投与することにより、麻痺症状が有意に増悪し、脾臓における IFN- γ 、TNF- α 、IL-10、IL-17 産生細胞が有意に増加した。以上より、PD-1/PD-L は、TMEV-IDD の症状抑制に関与しており、抗 PD-1 抗体投与によって PD-1 pathway を阻害したことで TMEV-IDD が増悪したと考えられる。

研究目的

MS はヒトの中枢神経系における自己免疫性脱髄疾患であり、詳細な発症機序は未だ不明である。TMEV-IDD は慢性進行型 MS と類似した臨床症状及び組織学的所見を示すため、MS 発症機序の解明に有用な動物実験モデルとして用いられている。我々はこれまでの研究で、TMEV-IDD には Th1 及び Th17 細胞が重要な役割を果たしていることを示してきた。

PD-1 は T 細胞、B 細胞、抗原提示細胞上に発現する抑制性の共刺激受容体である。抗原提示細胞上のリガンドである PD-L1 と T 細胞上の PD-1 が反応することにより、T 細胞の活性化を抑制することが明らかとなっている。またウイルス感染細胞の免疫機構からの逃避に PD-1/PD-L pathway が関与していることが示されている。そこで今回我々は、TMEV を用いて、in vitro 並びに in vivo レベルにて PD-1/PD-L の役割を検討した。

1) 信州大学医学部

2) 順天堂大学医学部免疫学講座

研究方法

①SJL/J マウスの大腿骨から骨髓を採取し、GM-CSF にて BMDC を誘導した。BMDC を TMEV で刺激し、PD-1、PD-L1 の mRNA 発現量を real-time PCR 法にて測定した。

②SJL/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 マウスを作製した。TMEV 接種後第 0 日、第 10 日、第 20 日、第 30 日、第 40 日にそれぞれ脾臓・脊髄を採取し、PD-1、PD-L1 の mRNA 発現量を real-time PCR 法にて測定した。

③②と同様に TMEV-IDD マウスを作製した。Induction phase 抗体投与群として TMEV 接種 3 日前から抗 PD-1 抗体 (RMP1-14) 0.25mg を 3 日に 1 回 (計 6 回抗) 腹腔内投与した。Effector phase 抗体投与群として発症直前 (第 17 日目) から Induction phase 抗体投与群と同様に計 6 回抗 PD-1 抗体を投与した。なお、TMEV 接種後抗体投与を行わなかった群を Positive control 群とした。TMEV 接種後 34 日目に脾臓・脊髄を採取した。脊髄は HE、KB 染色にて組織学的に評価を行った。脾臓・脊髄からリンパ球を分離し、CD4+T 細胞における IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-17 の産生細胞を Flow cytometry にて測定した。脊髄の TMEV および IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10、T-bet、GATA3、ROR γ t の mRNA 発現量を real-time PCR 法にて測定した。

研究結果

①BMDC 上の PD-1/PD-L1 発現量は TMEV 感染によって有意に増加した (図 1)。

②TMEV-IDD マウスでは、症状の進行に伴っ

て PD-1/PD-L1 の発現量が増加した (図 2)。

③Positive control 群と比較し、Effector phase 抗体投与群では臨床スコアが有意に増悪した (図 3)。また、抗 PD-1 抗体 Effector phase 抗体投与群で脊髄の炎症性細胞浸潤並びに脱髄の増加が見られた (図 4)。脊髄における TMEV の mRNA 量は Positive control 群と抗 PD-1 抗体投与群の間に有意差は見られなかった (図 5)。脊髄における各サイトカイン mRNA 量に有意差は見られなかったが、Th2 転写因子である GATA3 のみ Effector phase 抗体投与群で有意増加した (図 6)。脾臓における IFN- γ 、TNF- α 、IL-10、IL-17 産生細胞は、Effector phase 抗体投与群において有意に増加した (図 7)。

図 1 : BMDC 上の PD-1/PD-L1 mRNA 発現量

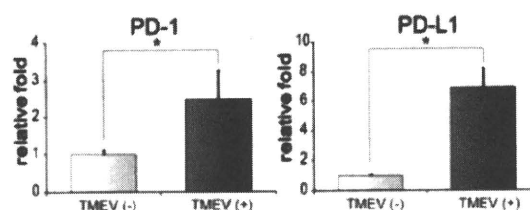


図 2 : TMEV-IDD の PD-1/PD-L1 mRNA 発現量

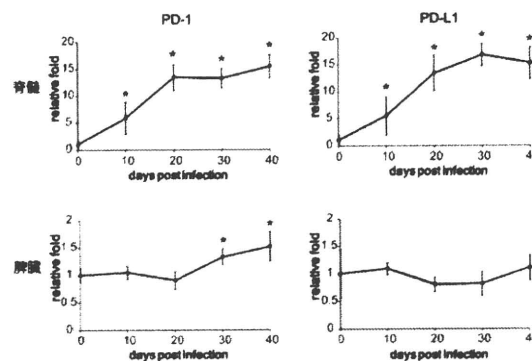


図 3 : 臨床スコア

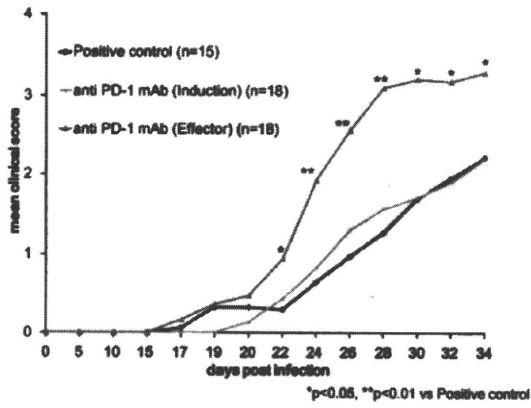


図 4 : 組織学的所見

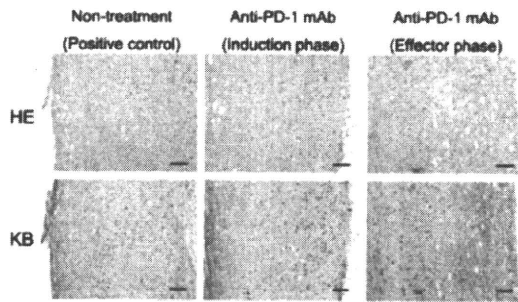


図 5 : 脊髄中の TMEV mRNA 量

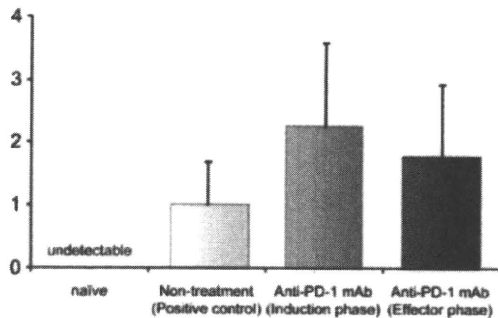


図 6 : 脊髄中のサイトカイン、転写因子の mRNA 量

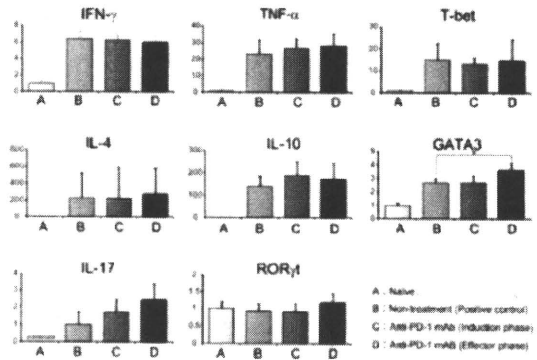
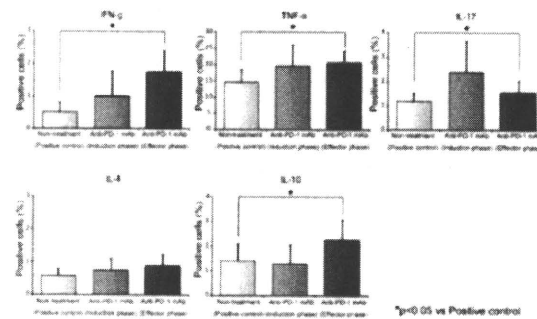


図 7 : 脾臓におけるサイトカイン産生細胞



考察

本研究により、TMEV 感染によって in vitro、in vivo 共に PD-1/PDL1 が増加することが明らかとなった。加えて、TMEV-IDD に対して抗 PD-1 抗体を投与することにより臨床症状が増悪することが明らかとなった。PD-1 はリガンドである PD-L1 との反応によって T 細胞の活性化を抑制し、免疫寛容に関与することが報告されている。今回、抗 PD-1 抗体投与により PD-1/PD-L1 の反応をブロックしたことから T 細胞の活性化を抑制する機構が阻害され、TMEV-IDD の臨床スコア増悪につながったと考えられる。

結論

PD-1/PD-L は、TMEV-IDD の症状抑制に関与しており、今後 PD-1 pathway の agonist が MS の新たな治療薬として利用できる可能性が示唆された。

文献

- 1) Kim BS, Lyman MA, Kang BS, Kang HK, Lee HG, Mohindru M, Palma JP. Pathogenesis of virus-induced immune-mediated demyelination. Immunol Res. 2001;24(2):121-30.
- 2) Hou W, Kang HS, Kim BS. Th17 cells enhance viral persistence and inhibit T cell cytotoxicity in a model of chronic virus infection. J Exp Med. 2009 Feb 16; 206(2):313-28
- 3) Loise M. Francisco, Peter T. Sage, Arlene H. Sharpe. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. Immunol Rev. 2010 Jul;236:219-42
- 4) Martinic MM, von Herrath MG. Novel strategies to eliminate persistent viral infections. Trends Immunol. 2008 Mar;29(3):116-24

健康危険情報

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

抗 Delta1 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 津金さやか¹⁾、兼山友輝¹⁾、滝沢章¹⁾、市川元基¹⁾、八木田秀雄²⁾

研究要旨

Notch シグナルは、発生や分化だけでなく免疫系においても、重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。中でも、Notch レセプターのリガンドである Delta like1(Delta1)は、活性化 CD4⁺ T cell の増殖促進作用、T helper 1 (Th1)への分化促進作用、Th2 への分化抑制作用をもつことが報告されている。そこで、今回我々は多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) の動物実験モデルである、タイラー脳脊髄炎ウイルス (Theiler's murine encephalomyelitis virus : TMEV) 誘導による免疫性脱髄疾患 (TMEV-induced demyelinating disease : TMEV-IDD) における、抗 Delta1 抗体の効果を検討した。

SJL/J マウスの骨髄から誘導した樹状細胞 (bone marrow-derived dendritic cell : BMDC)における Delta1 発現量は、TMEV 感染により有意に増加した。また、TMEV-IDD マウスに抗 Delta1 抗体を投与したところ、臨床症状の有意な抑制が見られた。脊髄における炎症性サイトカイン mRNA 量では、GATA3 が有意に増加していた。更に、TMEV-IDD マウスの脾細胞から採取した CD4⁺ T cell の増殖能は、抗体投与群において、有意に低下していた。以上のことから、抗体投与により、脊髄への T cell 浸潤が減少したこと、Th1 への分化促進作用及び Th2 への分化抑制作用が阻害されたことが推測され、臨床症状抑制に繋がったと考えられる。

研究目的

MS は、ヒトにおける中枢神経系の炎症性脱髄疾患である。発症機序は髄鞘に対する自己免疫反応が関与していると考えられているが、その反応を誘導する因子は未だ明らかにされていない。MS は何らかのウイルス感染を引き金として発症すると考えられており、その動物実験モデルとして、TMEV-IDD が挙げられる。この TMEV-IDD は MS に類似した脱髄病変を示すことから、MS の病因の解明や治療法の開発に有用であると考えら

れている。

最近、神経や造血系などの発生、分化に関わる Notch シグナルが、免疫系においても重要な役割を果たしていることが明らかになり、注目を集めている。中でも、Notch レセプターのリガンドである Delta1 は、活性化 CD4⁺ T cell の増殖促進作用、Th1 への分化促進作用、Th2 への分化抑制作用をもつことが報告されている。また、実験的自己免疫性脳脊髄炎において、抗 Delta1 モノクローナル抗体 (Anti-Delta1 mAb) 投与により臨床症状が抑制されたという報告があるが、TMEV-IDD における Delta1 の機能について

1) 信州大学医学部

2) 順天堂大学医学部免疫学講座

は明らかにされていない。そこで今回我々は、Delta1 に焦点を当て、TMEV 感染における抗 Delta1 抗体の効果を実験的、in vivo レベルで検証した。

研究方法

①SJL/J マウスの骨髄細胞を GM-CSF で刺激し、BMDC を誘導した。BMDC を TMEV で刺激してから、0、12、24、36、48 時間後に、Delta1 の mRNA 量を real time-PCR 法にて測定した。

②SJL/J マウス雌 6 週齢の左大脳半球内に TMEV を 1×10^6 PFU 接種し、TMEV-IDD マウスを作製した。発症直前（接種後 20 日目）から、Anti-Delta1 mAb (HMD1-5) を 250 μ g 又は同量の Nonspecific IgG を、3 日に 1 回、計 8 回腹腔内投与し、臨床症状をスコア化した。TMEV 接種後 42 日目のマウスから脊髄を採取し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色、Klüver-Barrera (KB) 染色により、病理組織学的検討を行った。また、同マウスの脊髄と脾臓における、TMEV、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-17、T-bet、GATA3、ROR γ t の mRNA 量を real time-PCR 法にて測定した。それぞれのマウスの脾細胞から、ビーズを用いて CD4⁺ T cell を採取し、増殖能の測定を行った。

研究結果

①TMEV 感作により BMDC における Delta1 mRNA 量が有意に増加した。(Fig.1)

②Anti-Delta1 mAb 投与により、TMEV-IDD マウスの臨床症状が有意に低下した。(Fig.2)

Fig.1 BMDC 上の Delta1 mRNA 発現量

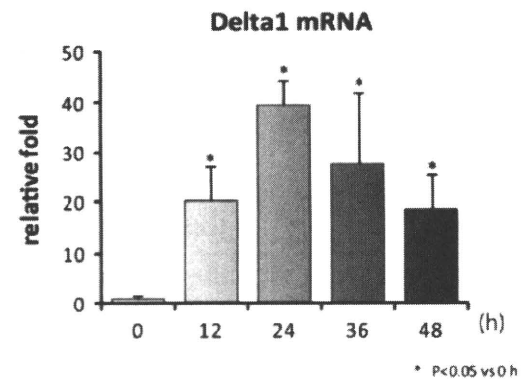


Fig.2 clinical score

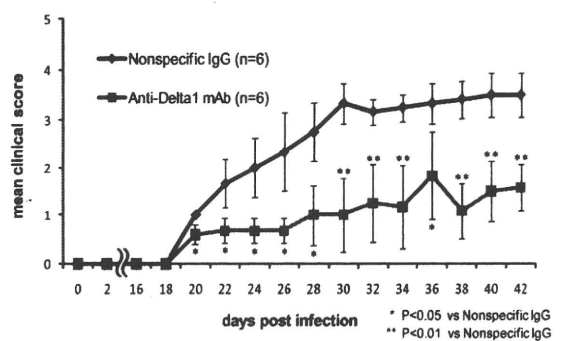
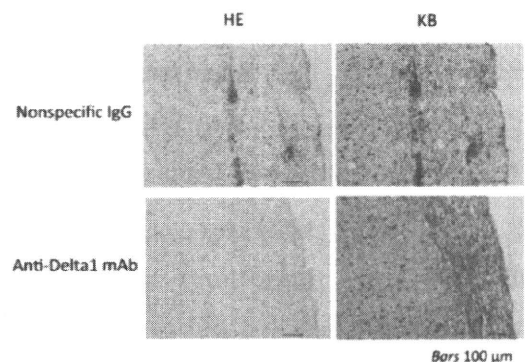


Fig.3 病理組織学的所見



病理組織学的検討では、Anti-Delta1 mAb 投与群において、血管周囲の炎症性細胞浸潤や脱髄が抑制されている傾向がみられた。

(Fig.3) 脊髄における TMEV mRNA 量には、

Fig.4 TMEV mRNA 量

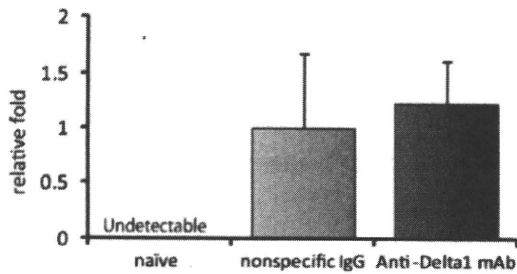


Fig.6 CD4⁺ T cell の増殖能

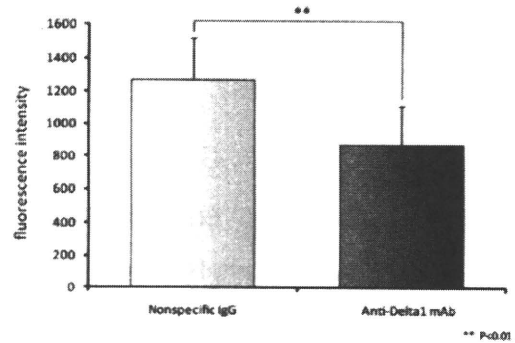
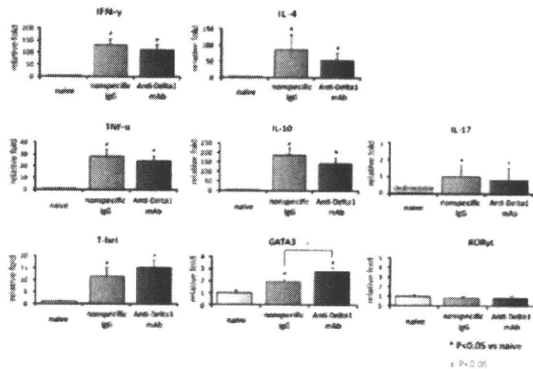


Fig.5 脊髄中のサイトカイン、転写因子の mRNA 量



低下したために、脊髄への T cell 浸潤が減少し、臨床症状の抑制に繋がったと考えられる。また、脊髄における GATA3 の mRNA 量増加より、Th1 への分化促進作用、Th2 への分化抑制作用が阻害されたことも、臨床症状抑制の一因と考えられる。

Anti-Delta1 mAb 投与による有意差は見られなかった。(Fig.4) 脊髄における各種サイトカイン、転写因子の mRNA 量は、Th2 の転写因子である GATA3 が Anti-Delta1 mAb 投与により有意に増加した。(Fig.5) Nonspecific IgG 投与群と比べ、Anti-Delta1 mAb 投与群の CD4⁺ T cell は、増殖能が有意に減少した (Fig.6)。

考察

今回の研究では、抗 Delta1 抗体の投与により、脾臓における CD4⁺ T cell の増殖能が

結論

Delta1 が MS の病態悪化に関与しており、新たな治療薬として、抗 Delta1 抗体が用いられる可能性が示唆された。

文献

- 1) Sophie M. Lehar, James Dooley, Andrew G. Farr, and Michael J. Bevan: Notch ligands Delta1 and Jagged1 transmit distinct signals to T-cell precursors. Blood. 2005;105: 1440-1447

2) Justin D. Lathia, Mark P. Mattson, and Aiwu Cheng: Notch: from neural development to neurological disorders. Journal of Neurochemistry 2008; 107, 1471-1481

3) Yoichi Maekawa, Shin-ichi Tsukumo, Shigeru Chiba, Hisamaru Hirai, Yuki Hayashi, Hiriko Okada, Kenji Kishihara, and Koji Yasutomo: Delta1-Notch3 Interactions Bias the Functional Differentiation of Activated CD4⁺ T Cells. Immunity, Vol. 19, 549-559, October, 2003

4) Freddy Radtke, Nicolas Fasnacht, and H. Robson MacDonald: Notch Signaling in the Immune System. Immunity January 29, 2010

5) Byung S. Kim, Michael A. Lyman, Bong-Su Kang, Hee-Kap Kang, Hee-Gu Lee, Mani Mohindru, Joann P. Palma: Pathogenesis of Virus-Induced Immune-Mediated Demyelination. Immunologic Research 2001; 24/2: 121-130

6) Wassim Elyaman, Elizabeth M. Bradshaw, Yue Wang, Mohamed Oukka, Pia Kivisakk, Shigeru Chiba, Hideo Yagita, and Samia J. Khoury: Jagged1 and Delta1 Differentially Regulate the Outcome of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. The Journal of Immunology, 2007, 179: 5990-5998.

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

小児急性散在性脳脊髄炎、多発性硬化症の全国疫学調査（第3報）：

我が国の小児多発性硬化症の特徴

研究分担者 原 寿郎¹⁾

共同研究者 山口 結¹⁾、鳥巢 浩幸¹⁾、吉良 龍太郎¹⁾、實藤 雅文¹⁾、石崎 義人¹⁾、

吉良 潤一²⁾、楠 進³⁾、日本小児免疫性脳炎研究グループ

研究要旨

1984年以來となる小児多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)の全国疫学調査を行った。集積された症例は58例、平均発症年齢は8.3歳、男女比は1:1.9であった。平均観察期間は6.2年、96%がRelapsing-remitting MSであり、平均EDSSは1.1だった。日本人成人MS患者と比べると、日本人小児MS患者は視力低下を示す割合は高い傾向にあり、横断性脊髄炎徴候は低かった。また頭部MRIで脳室周囲病変を示す患者の割合は低く、皮質下白質病変は高かった。海外小児MS患者と比べると、けいれん、視力低下で割合が高く、頭部MRIで脳室周囲病変の割合が低かった。また、日本人小児MS患者のBarkhof基準陽性率は33.3%と低く、日本人成人MS患者の陽性率同様海外小児MS患者、海外成人MS患者より低くなっていた。これらの成人MS、海外小児MSとの違いは、脳の未熟性や、遺伝・環境要因による違いを示している可能性があり、今後各要因とMS病態との関連が明らかになることが期待される。

研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)は20歳代以降の女性に好発する脱髄性疾患であり、その0.4から16%は小児期に発症する。近年、海外における小児MSの臨床的特徴や予後などが明らかになってきたが、これまでに我が国における小児MSの調査はほとんどなされていない。今回、我々は2008年から2009年に実施した全国疫学調査で得られた小児MSに関するデータの解析を行い、日本人小児MSの臨床的特徴を明らかにし、日本人成人MS患者ならびに海外の小児MS患者との比較検討を行った。

1) 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野(小児科)

2) 九州大学大学院医学研究院神経内科

3) 近畿大学医学部神経内科

研究方法

対象：平成17年1月1日～平成19年12月31日に全国の小児科を標榜する病院(950施設)を受診したMS患者

方法：患者数調査(一次調査)を行い、その後調査票を用いてMS患者の臨床像に関する調査(二次調査)を行った。二次調査では、発症年齢、性、臨床症候、検査所見、MRI画像、治療法、予後を調査した。

(倫理面への配慮)

本調査研究を開始するにあたっては、九州大学医学研究院等倫理委員会の承認を得た(20-64号)。

研究結果

一次調査で 100 例の小児 MS 患者が集積され、最終的に 58 例の解析を行った。報告患者数に地域による偏りはなかった。平均発症年齢は 8.3 歳、男女比は 1:1.9 だった。平均観察期間は 6.2 年であり、96%が RRMS であり、平均 Expanded Disability Status Scale (EDSS) は 1.1 だった。臨床症候として、けいれんが 44.8%、視力低下が 71.9%に認められた。頭部 MRI では皮質下白質病変が 75.5%に認められ、Barkhof 基準陽性率は 33.3%だった。日本人成人 MS 患者同様に女性の割合が高かった¹⁾。日本人成人 MS 患者と比較すると、臨床症候では視力低下を示す割合が高い傾向にあり、(71.9% vs 56.1%)、横断性脊髄炎徴候を示す割合は低かった(0% vs 27.4%)。頭部 MRI では、脳室周囲病変を示す割合は低く(36.7% vs 62.3%、 $p < 0.001$)、皮質下白質病変で割合が高かった(75.5% vs 38.5%、 $p < 0.001$)。海外小児 MS 患者と比べると、臨床症候として、けいれん(44.8% vs 6~15%)、視力低下(71.9% vs 13~35%)を示す割合が高かった²⁾。頭部 MRI では脳室周囲病変を示す割合が低かった(36.7% vs 65%、 $p = 0.0075$)。また、Barkhof 基準陽性率も有意に低く(33.3% vs 76%、 $p < 0.001$)、日本では成人 MS 患者の陽性率(45.3%)も海外小児 MS 患者(76%)、海外成人 MS 患者(82%)の陽性率と比べて低くなっていた。

考察

我が国の小児 MS 患者が日本人成人 MS 患者と比べけいれんの割合が高く、頭部 MRI で脳室周囲病変の割合が低く、皮質下白質病変の割合が高かったのは、脳の構造上の未熟性に関連する可能性がある。また、海外小児 MS 患者と比

較して、けいれんの割合が高かったのは、病変分布の違いや人種間のけいれん感受性の違いによると予想された。さらに、Barkhof 基準陽性率が低かったのは、日本人成人 MS 患者でも低いことから、遺伝・環境要因が関与すると考えられた¹⁾。

結論

1. 小児期発症 MS 患者として、58 例を検討した。
2. 我が国の小児 MS は日本人成人 MS 同様女性の割合が高かったが、臨床症候や MRI 病変分布、Barkhof 基準陽性率で日本人成人、海外小児 MS と異なった特徴が認められた。
3. 日本人小児 MS と日本人成人 MS、海外小児 MS との違いは、脳の成熟度や遺伝・環境要因による病態の違いを示しているのかもしれない。

文献

1. Osoegawa M, Kira J, Fukazawa T, Fujihara K, Kikuchi S, Matsui M, Kohriyama T, Sobue G, Yamamura T, Itoyama Y, Saida T, Sakata K, Ochi H, Matsuoka T; Research Committee of Neuroimmunological Diseases: Temporal changes and geographical differences in multiple sclerosis phenotypes in Japanese: nationwide survey results over 30 years. *Mult Scler.* 2009;15:159-73.
2. Callen DJ, Shroff MM, Branson HM, Lotze T, Li DK, Stephens D, Banwell BL: MRI in the diagnosis of pediatric multiple sclerosis. *Neurology.* 2009;72:961-7.

健康危険情報