

500)、S2/S1 比が正常と比較して低下していた (図3、統計的な有意さは認められなかった)。

500

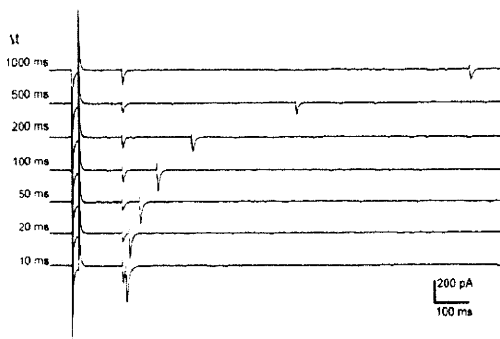


図3 症例500の髄液で前処理したスライスの平行線維シナプスで認められる促通現象。2発目のEPSCの振幅の促通の程度が減弱している。

そこで、この症例#500において、1Hzの連続刺激を30回行い、各刺激回のEPSCの振幅を測定した。各2発目以降のEPSCは対照スライスでは必ず振幅が増大していたが、症例#500の髄液で前処理したスライスでは、2発目以降のEPSCの振幅は、1発目と同じか、む

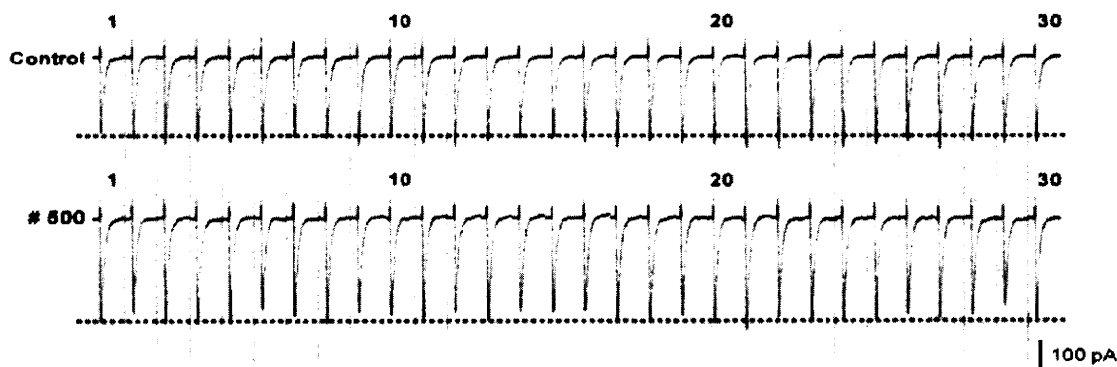


図4 1 Hz、30発の連続刺激で誘発されるEPSC (15発目までを図示)。対照スライスと、症例500の髄液で前処理したスライスでの比較。

しろ、小さく、促通現象は消失していた。各刺激回の振幅を比較しても、対照に比べ有意

に低下していた (図4)。

この症例#500は臨床的には、40歳代と若く、抗NAE抗体陽性であり、MRI上小脳の萎縮は認めず、ステロイドが著効した症例であった。

D.考察

今回の電気生理学的解析では、検出感度を上げるために、2つの工夫を行った。まず、髄液が十分に神経細胞に作用するために、スライス標本を患者髄液で1時間の前処理を行った。さらに、電気生理学的な解析においても、S1/S2比 (連続刺激による2発目の振幅の、1発目に対する比) を測定し、「グルタミン酸の放出のされやすさ」を検討した。

小脳失調を呈する橋本脳症6症例の中の1症例において、1Hzの連続刺激で2発目以降の促通が全く起こらなかったという今回の結果は、橋本脳症の病因・病態は多彩であること、

さらに、一部の症例においては、シナプス機能の障害が起きている可能性を示唆する。

グルタミン酸の放出機構に障害が起こると、生理学的には次の2つの変化を来すことが予想される。一つは、プルキンエ細胞の興奮

性が低下する可能性である。平行線維シナプスに促通が起きることによって、顆粒細胞が高頻度に発火すると、プルキンエ細胞に強い

興奮が生じることが初めて可能になる。従って、この促通作用が障害されると、プルキンエ細胞の活動性は低下することになる。もう

表 抗甲状腺抗体陽性で小脳失調を示す6例

年齢・性別	抗甲状腺抗体	抗NAE抗体	ステロイド反応性	失調症状 / MR I小脳萎縮
#71	41F	TPO/TG	陽性	著効 四肢、体幹、構音失調 /なし
#150	46F	TPO/TG	陽性	軽度 体幹失調 /なし
#500	46F	TPO	陽性	著効 体幹、構音失調 /なし
#694	84F	TPO/TG	陽性	軽度 四肢、体幹、構音失調 /あり
#198	55M	TPO	陰性	中等度 四肢、体幹、構音失調 /あり
#221	54M	TPO/TG	陰性	中等度 記載なし /あり

下線は、橋本病の既往あり。

一つの変化は、シナプス可塑性に障害が起きる可能性である。平行線維シナプスの1Hzの活動によって、長期増強が誘導されることが知られている。従って、1Hzの活動でグルタミン酸の放出が低下するならば、長期増強が起りにくくなるであろう。以上の2つの変化は、ともに小脳失調の要因になりうるものである。

シナプス作用があった症例#500は、臨床的には、小脳の萎縮はなく、ステロイドに著効を示しており、機能障害が起きていた可能性は十分に考えられる。今後は症例を重ね、さらに臨床像との比較を行うと共に、髄液中の何の物質がシナプス作用を示すかについても

検討する必要がある。

D.結論

橋本脳症の一部の症例の髄液は、小脳興奮性シナプスで、グルタミンの放出を阻害した。

E.文献

- 1) Mitoma H., et al. *J Neurol Sci.* 2003; 208, 51-56.
- 2) Ishida K, Mitoma H, Mizusawa H. *J Neurol Sci* 2008; 271: 186-190.

健康危険情報：なし

知的財産権の出願・登録状況：なし

免疫性神経疾患における医療費の問題をめぐって

研究分担者 荻野 美恵子¹⁾

研究要旨

神経免疫領域の疾患は高額な免疫学的治療を継続して必要とする疾患が多い。医療費が潤沢ではない中で、神経免疫疾患に対する医療費がどのような状況であるかを認識することは重要である。全国の保険者データを解析したところ、特定疾患治療研究事業対象 45 疾患において、多発性硬化症(MS)や重症筋無力症(MG)は上位の疾患となっており、発症から 30 年以上の経過年数の方も医療費は大きくかわらなかった。長期間高額な医療費の負担を余儀なくされる難病には、特段の対応が必要である。

研究目的

神経免疫領域の疾患は免疫学的治療を行うことで予後改善を見ることが多くなった。しかし、完全寛解にいたることは難しく、機能維持や再燃/再発時の治療など、継続して治療が必要となることも多い。近年汎用される免疫調整治療は高額なものが多く、自己負担のある患者にとっては経済的に困窮することもある。特定疾患そのものが見直されようとしている現状で、神経免疫疾患の医療費構造を捉え、今後の治療戦略におよぼす影響について考察する。

研究方法

「特定疾患の医療費構造に関する研究班」で収集したデータをもとに、神経免疫領域の疾患、特に多発性硬化症(以下 MS)、重症筋無力症(以下 MG)の医療費構造の現状を把握・分析する。特定疾患治療研究事業対象疾患(医療費助成対象疾患)については、社会保険診療報酬支払い基金(以下支払基金)および国民健康保険連合中央会(以下国保連合)から入手したレセプトデータをもとに検討する。

(倫理面への配慮)

個人情報特定できないように配慮した。

研究結果

1. 特定疾患受給者証保持者における受診割合(国保患者数は推計値)

疾患名	登録患者数(人)	月あたり受診者数(人)			受診割合(%)
		社保患者数	国保患者数	合計	
MS	14,227	4,388	3,848	8,236	57.9
MG	17,125	3,592	6,005	9,597	56.0

2. 治療研究事業対象 45 特定疾患中の医療費順位(図 1、2、3)

支払基金(平成 20 年 11 月~21 年 1 月診療分) MS 7 位 約 30%、MG 15 位約 12%
国保入院外来医療費(調剤薬局費は含まれない)(平成 21 年 3 月審査分)

MS 12 位約 8%、MG 15 位約 6%

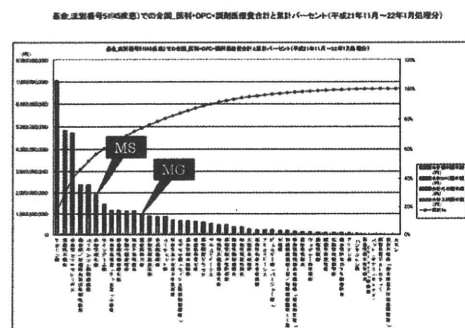


図 1. 基金入院外来医療費合計と累計パーセント(H20 年 11 月~21 年 1 月診療分)

1) 北里大学医学部神経内科学

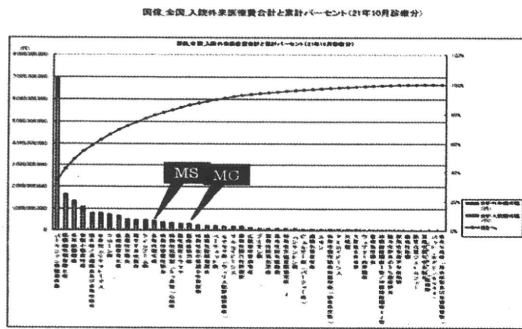


図2. 国保入院外来医療費合計と累計パーセント (H21年3審査分)

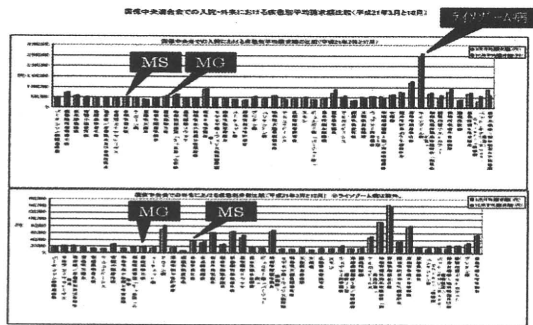


図3. 国保疾患別平均請求額 (H21年3月10月審査分)

3. 診療行為別請求金額比率

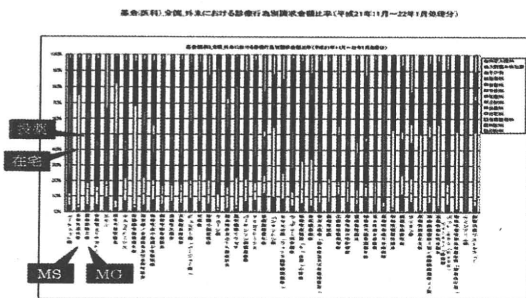


図4. 基金(外来) (平成21年11~22年1月処理分)

4. 施設当たり平均患者数

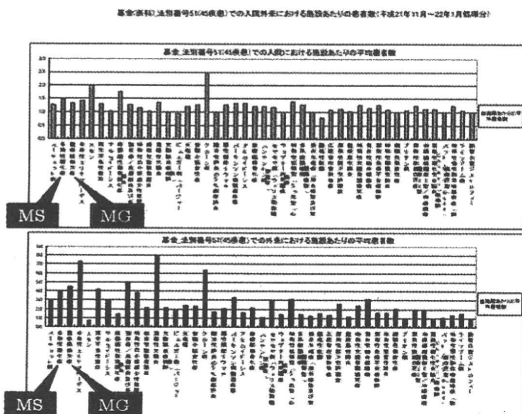


図5. 基金平均患者数(H21年11~22年1月処理分)

3. 一日あたり医療費(円)

疾患	保険	入院				外来	
		医科		DPC		診療実日数	一日当たり額
		診療実日数	一日当たり請求額	診療実日数	一日当たり額		
MS	国保	23,840	22,007	—	—	12,910	24,381
	社保	13,871	25,039	7,439	41,263	22,361	56,866
MG	国保	14,201	25,129	—	—	16,881	15,586
	社保	4,694	33,308	4,507	43,542	14,638	41,033

4. MSの医療費構造をみると在宅74.8%とインターフェロンの自己注射が大部分を占めることが推測される。MGでは検査43.8%、医学管理16.7%と検査に費用がかかっていた。

5. 入院は年代別にもMSもMGもおおよそ同じような金額となっており、MSは長年患っている方ほど少し高額になる傾向があり、MGは逆に低額になる傾向にあった。

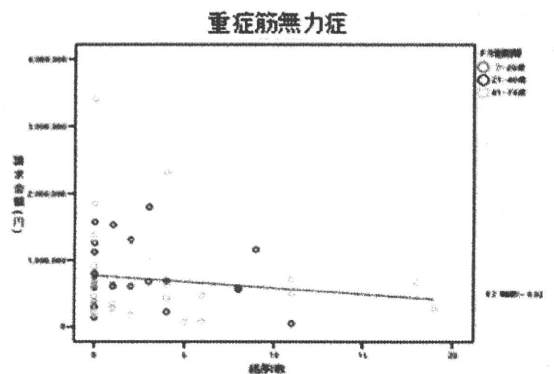
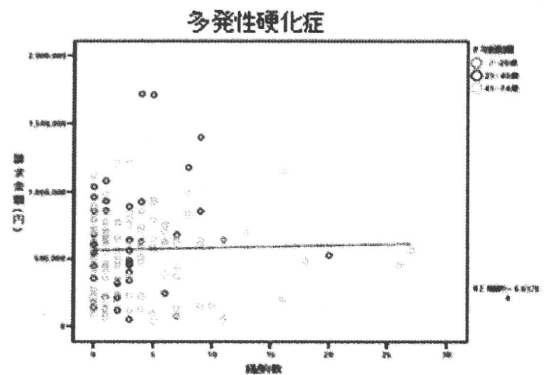


図6. 支払基金の入院における特定疾患の診療開始日からみた経過年数と請求金額の散布図

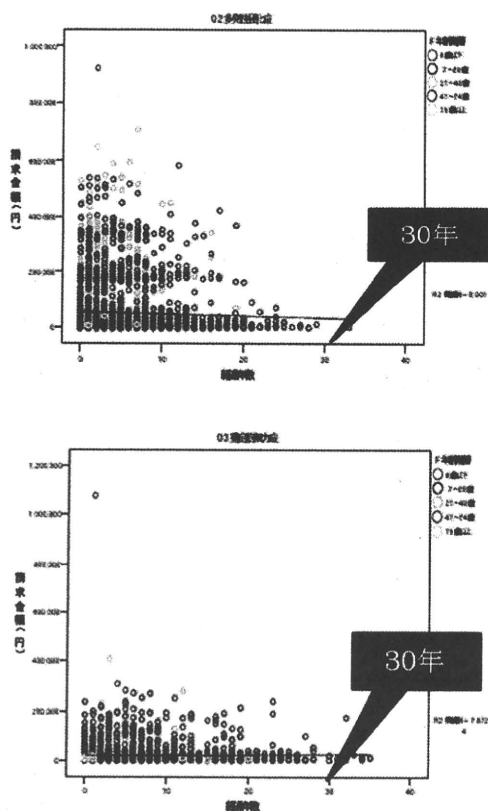


図7. 支払基金の外来における特定疾患の診療開始日からみた経過年数と請求金額の散布図

いずれの疾患も裡病期間が長く生涯医療費の観点を持つ必要がある

考察

国民総医療費は年々増加し、特定疾患認定患者数も増加の一途をたどっており、公的資金の増加の見通しが困難な現状で、特に現状でも地方自治体の負担が破綻寸前となっている。さらに、新規治療は一般に高額であり、治療効果も高いが、根治は難しく長期間継続するため、たとえ患者数が伸びなくても、今後見込まれる公費負担医療費は増加せざるを得ない状況である。

一方で同じように高額医療費がかかるがんの分野や、治療研究事業にしていさされていな

い他の特定疾患患者などから自己負担の軽減を求める要求がある。そのため、高額療養費の自己負担限度額引き下げの検討がなされたが、現在のところ財源が確保できず保留となっている。

難病患者ががんなどと異なるということを確認しない限り、難病患者のみを対象とした医療費助成の存続は難しい状況にある。

しかし、今回のデータからも明白なように疾患による差異はあるものの、難病患者は慢性進行性であり、30年以上にわたり医療が必要で、生涯にわたって治療費のみならず、就職や結婚、世代間介護の問題など社会的側面からも経済的困窮に陥りやすい状況にあるため、特段の対応が必要と考える。

結論

昨今の新規治療法の登場で、免疫関連疾患は特定疾患の中でも医療費が高額になることが多い。とくに潰瘍性大腸炎やクローン病、慢性関節リウマチですでに認可が下りている薬剤が今後神経免疫分野でも使用できるようになっていくと、それらの疾患が直面している問題も同様に起こってくると思われる。医療費構造を分析することで疾患によってどのような補助を考えればよいかを考える助けとなる。

文献

荻野美恵子: 神経難病疾患の医療費構造解析の問題点. Annual Review 神経 2010 中外医学社 鈴木則宏他編 2010(1) 東京 P65-70

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

IL-9 はアストロサイトの CCL-20 産生を介して T_H17 の中枢神経への移行を誘導する

分担研究者 錫村 明生¹⁾

共同研究者 菌部 佳史¹⁾、周 妍¹⁾、赤堀 友彦¹⁾、金 世杰¹⁾、川ノ口 潤¹⁾、野田 万理子¹⁾、水野 哲也¹⁾、岩倉 洋一郎²⁾

研究要旨

本研究においては、ヘルパーT細胞においてIL-9が誘導される条件及び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 (Experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) におけるIL-9の役割について明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、IL-9はT_H9だけでなくT_H2、iTreg、T_H17誘導条件下においても誘導された。したがって、T_H9は他のヘルパーT細胞サブセットと独立したサブセットではないと考えられる。また、中枢神経系において、IL-9がアストロサイトに作用して、CCL-20の産生を誘導し、T_H17の遊走を促進することが明らかとなった。さらに、IL-9の中和抗体を投与することによりEAEの臨床症状が抑制され、中枢神経系におけるアストロサイトにおけるCCL-20の発現抑制及びT_H17の浸潤抑制が確認された。また、IL-9の中枢神経系における役割として、アストロサイトによるCCL-20の産生を介したT_H17の遊走を促進し、EAEを悪化させることが明らかとなった。これらの結果から、IL-9の抑制が多発性硬化症の治療戦略として有効である可能性が示唆された。

研究目的

IL-9は元来T_H2サイトカインとして分類されてきた。近年、IL-9を産生するT_H9がT_H1、T_H2、T_H17、iTregとは別のサブセットであることが報告されたが、その後T_H2やT_H17がIL-9を産生することが報告されている。したがって、T_H9が他のヘルパーT細胞サブセットから独立したサブセットであるのか、IL-9がどのような条件下で誘導されるのかについては不明である。

また、IL-9Rノックアウトマウス及び抗IL-9中和抗体を投与した場合に、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

(Experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE)の臨床症状が抑制されることが報告されている。しかし、IL-9の中枢神経系における詳細な役割については不明である。

したがって、本研究においては、ヘルパーT細胞においてIL-9が誘導される条件及び中枢神経系におけるIL-9の役割について明らかにすることを目的として研究を行った。

-
- 1) 名古屋大学環境医学研究所神経免疫分野
 - 2) 東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター

研究方法

本研究では、C57BL/6J マウスを使用した。ナイーブ T 細胞は野生型及び IL-4KO マウスから MACS ビーズを用いて単離された。ヘルパー T 細胞の分化は以下の条件で行われた。T_H1: IL-12 (10 ng/ml), IFN- γ (5 ng/ml) + anti-IL-4 Abs (10 μ g/ml)、T_H2: IL-4 (2 ng/ml), anti IFN- γ (10 μ g/ml)、T_H17: TGF- β (5 ng/ml), IL-6 (30 ng/ml) + anti-IFN- γ Abs (10 μ g/ml)、iTreg: TGF- β (5 ng/ml)、T_H9: IL-4 (2 ng/ml) + TGF- β (5 ng/ml)。初代培養アストロサイトは混合グリア培養から型のごとく単離された。mRNA の発現量及びタンパク発現量の解析には、RT-PCR 法及びフローサイトメトリー、免疫組織染色、ELISA 法が用いられた。EAE は MOG₃₅₋₅₅ 及び百日咳毒素を用いて発症させ、抗 IL-9 中和抗体に関しては 40 μ g/mice で週 2 回尾静脈投与を行い、リコンビナント IL-4 に関しては 200 ng/mice で MOG₃₅₋₅₅ 感作初日から隔日で腹腔内投与された。

(倫理面への配慮) 全ての動物実験は名古屋大学動物実験委員会の指針に則って行われた。

研究結果

IL-9 は T_H9 だけでなく T_H2、iTreg、T_H17 誘導条件下において誘導された。また、iTreg、T_H17、TGF- β + IL-25、TGF- β + IL-1 β 誘導条件下において、IL-4KO マウス由来ヘルパー T 細胞における IL-9 の産生量は野生型マウス由来ヘルパー T 細胞において有意に抑制された。また、中枢神経系において、IL-9 がアストロサイトに作用して、CCL-20 の産生を誘導し、T_H17 の遊走を促進することが明らかとなっ

た。さらに、IL-9 の中和抗体を投与することにより EAE の臨床症状が抑制され、中枢神経系におけるアストロサイトにおける CCL-20 の発現抑制及び T_H17 の浸潤抑制が確認された。

考察

本研究から、IL-9 は IL-4 の存在下で Th9 だけでなく T_H2、T_H17、iTreg 誘導条件下で誘導されることが明らかとなった。したがって、T_H9 は他のヘルパー T 細胞サブセットと独立したサブセットではないと考えられる。また、IL-9 の中枢神経系における役割として、アストロサイトによる CCL-20 の産生を介した T_H17 の遊走促進が明らかとなった。この結果から、IL-9 は T_H17 の遊走促進を介して EAE を悪化させると考えられる。実際に、本研究により、IL-9 の中和抗体を投与することで EAE の臨床症状が抑制されている。したがって、IL-9 の抑制が多発性硬化症の治療戦略として有効である可能性が示唆された。

結論

T_H9 は他のヘルパー T 細胞サブセットと独立したサブセットではないと考えられる。また、IL-9 は中枢神経系において、アストロサイトによる CCL-20 の産生を介した T_H17 の遊走を促進し、EAE を悪化させる。

健康危険情報：なし

知的財産権の出願・登録状況：なし

実用新案登録：なし

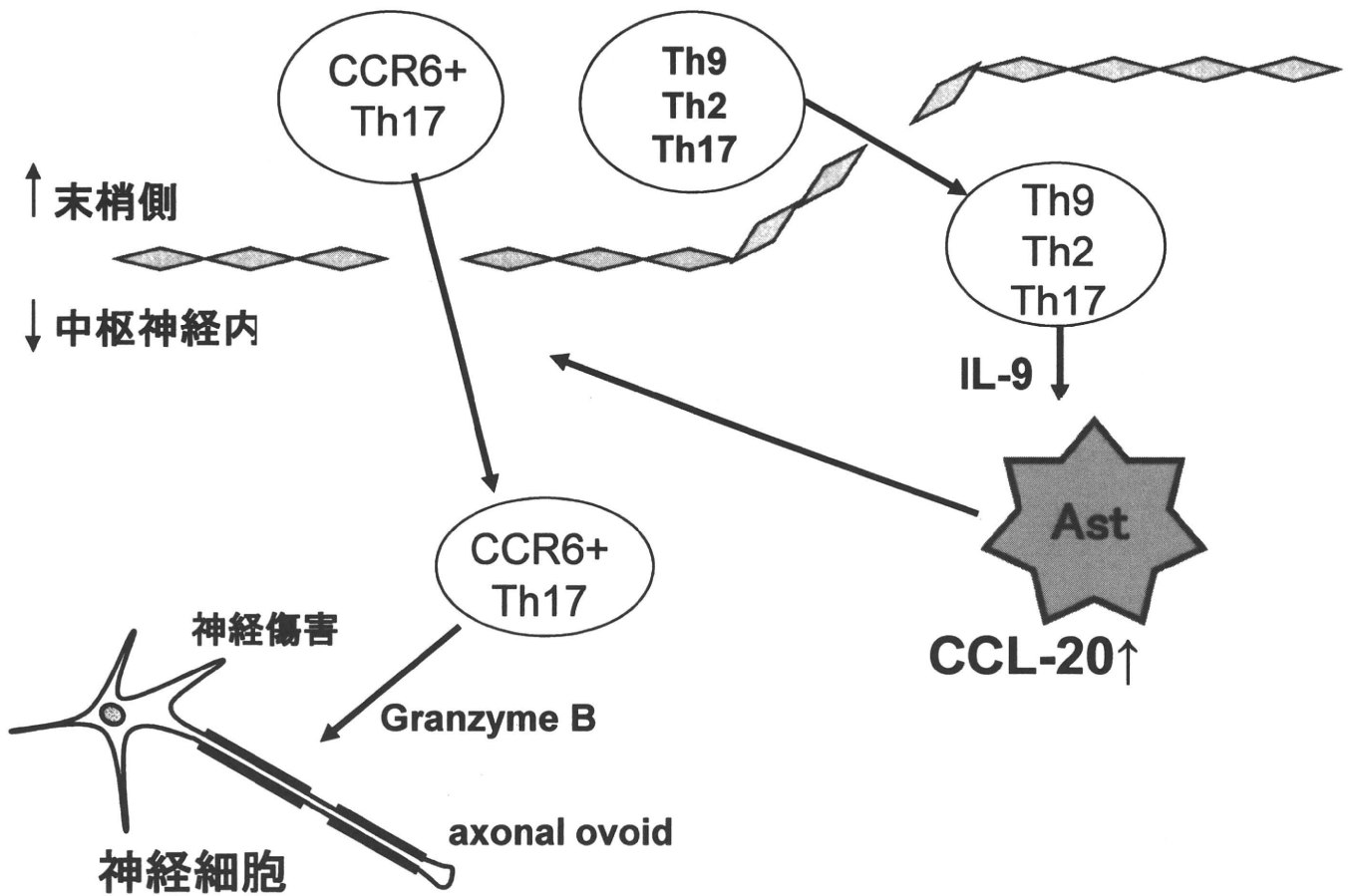


図 実験的自己免疫性脳脊髄炎におけるIL-9の役割

・IL-9は中枢神経系においてアストロサイトに作用し、CCL-20の産生を誘導する。

・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の発症に重要な役割を果たすTh17細胞はCCL-20の受容体であるCCR6を発現している。

・IL-9はアストロサイトによるCCL-20の誘導を介してTh17細胞を中枢神経系へ遊走させ、炎症反応を促進している。

フラクタルカインによる神経保護作用

分担研究者 錫村 明生¹⁾

共同研究者 野田 万理子¹⁾、土井 由紀子¹⁾、梁 劍峰¹⁾、川ノ口 潤¹⁾、
菌部 佳史¹⁾、竹内 英之¹⁾、水野 哲也¹⁾

研究要旨

本研究では、神経細胞に発現している膜結合型ケモカイン、フラクタルカイン (CX3CL1; FKN) のミクログリアに対する作用を、食食能および神経保護作用に着目して検討した。グルタミン酸による障害により、変性神経細胞から早期に FKN の産生分泌が認められた。さらにミクログリアへの FKN 刺激によって、細胞障害性物質の発現を伴うことなく heme oxygenase-1 (HO-1) 産生が誘導されることで神経保護作用を発揮するとともに、食食関連分子の発現を介した変性神経細胞断片の食食能亢進が認められた。さらにミクログリアへの FKN 刺激による JNK MAPK の活性化に伴い、転写因子 NF-E2-related factor 2 (Nrf2) の発現および核内移行を介した HO-1 産生の誘導が見られた。従って FKN は、ミクログリアの食食シグナルを誘導するとともに HO-1 発現を介した抗酸化作用により、残存神経細胞を保護しながら、効率的に変性神経細胞の除去を行っているものと考えられた。

研究目的

アルツハイマー病や多発性硬化症などの神経変性疾患では、病変部位におけるミクログリアの集積と活性化が認められている。ミクログリアは、サイトカインなどの液性因子を産生する他に、食食作用により変性神経細胞を速やかに除去することで、脳機能の維持に重要な役割を果たしている。このようなミクログリアの食食作用発現には、変性神経細胞から産生されるシグナル分子 (グリア応答因子) の関与が示唆されている。本研究では、膜結合型ケモカインである FKN の、グリア応答因子としてのミクログリアに対する作用を食食能、神経保護作用に着目して検討した。

研究方法

C57BL/6 マウス大脳皮質神経細胞へのグルタミン酸添加により神経細胞変性を誘導し、産生される FKN を ELISA 法を用いて経時的に定量した。FKN 刺激によるミクログリアの種々のサイトカイン、食食作用関連分子、および抗酸化酵素 HO-1 の発現を RT-PCR 法および ELISA 法により検討した。初代培養系神経細胞による新たなミクログリアの食食能評価系を用いて、FKN の食食能への影響を検討した。さらに変性神経細胞クリアランスおよび HO-1 産生に関与する細胞内シグナル伝達経路を種々の阻害剤および western blotting により検討した。

1) 名古屋大学環境医学研究所神経免疫分野

研究結果

グルタミン酸による障害により、変性神

経細胞から早期に FKN の産生分泌が認められた。さらにミクログリアへの FKN 刺激によって、細胞障害性物質の発現を伴うことなく HO-1 が産生されるとともに、食食作用に関与するホスファチジルセリン受容体 MFG-E8 の発現を介した変性神経細胞断片の食食能亢進が認められた。また FKN はミクログリアの共存下で ERK および JNK MAPK を介した神経保護作用を示した。ミクログリアへの FKN 刺激による JNK MAPK の活性化に伴い、転写因子 Nrf2 の発現および核内移行を介した HO-1 産生の誘導が見られた。

考察

本研究により、変性神経細胞から分泌される FKN がミクログリアに対して、Eat me signal として MFG-E8 発現を介した食食作用による変性神経細胞の除去を促すことが明らかとなった。一方で、FKN は Help me signal としても機能し、JNK MAPK-Nrf2 経路の活性化を介した HO-1 産生を誘導し、神経保護効果を発揮することも示された。本研究では、FKN の神経保護作用には JNK MAPK-Nrf2 経路の他にも、ERK MAPK 経路の活性化が関与していることが示されたが、その下流の因子は未だ同定されていない。

これらのことから、FKN は変性神経細胞から分泌され、残存神経細胞を保護しながら、効率的に変性神経細胞を除去することで、内在性の神経保護物質として機能して正常な脳機能の維持に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

結論

変性神経細胞より早期に産生される FKN は、ミクログリアの食食シグナルを誘導するとともに HO-1 発現を介した抗酸化作用により、残存神経細胞を保護しながら、効率的に変性神経細胞の除去を行っているものと考えられた。

文献

1) Noda *et al.* Fractalkine attenuates excitotoxicity via microglial clearance of damaged neurons and antioxidant enzyme heme oxygenase-1 expression, *J. Biol. Chem.* 286(3):2308-19 2011

健康危険情報：なし

知的財産権の出願・登録状況：なし

実用新案登録：なし

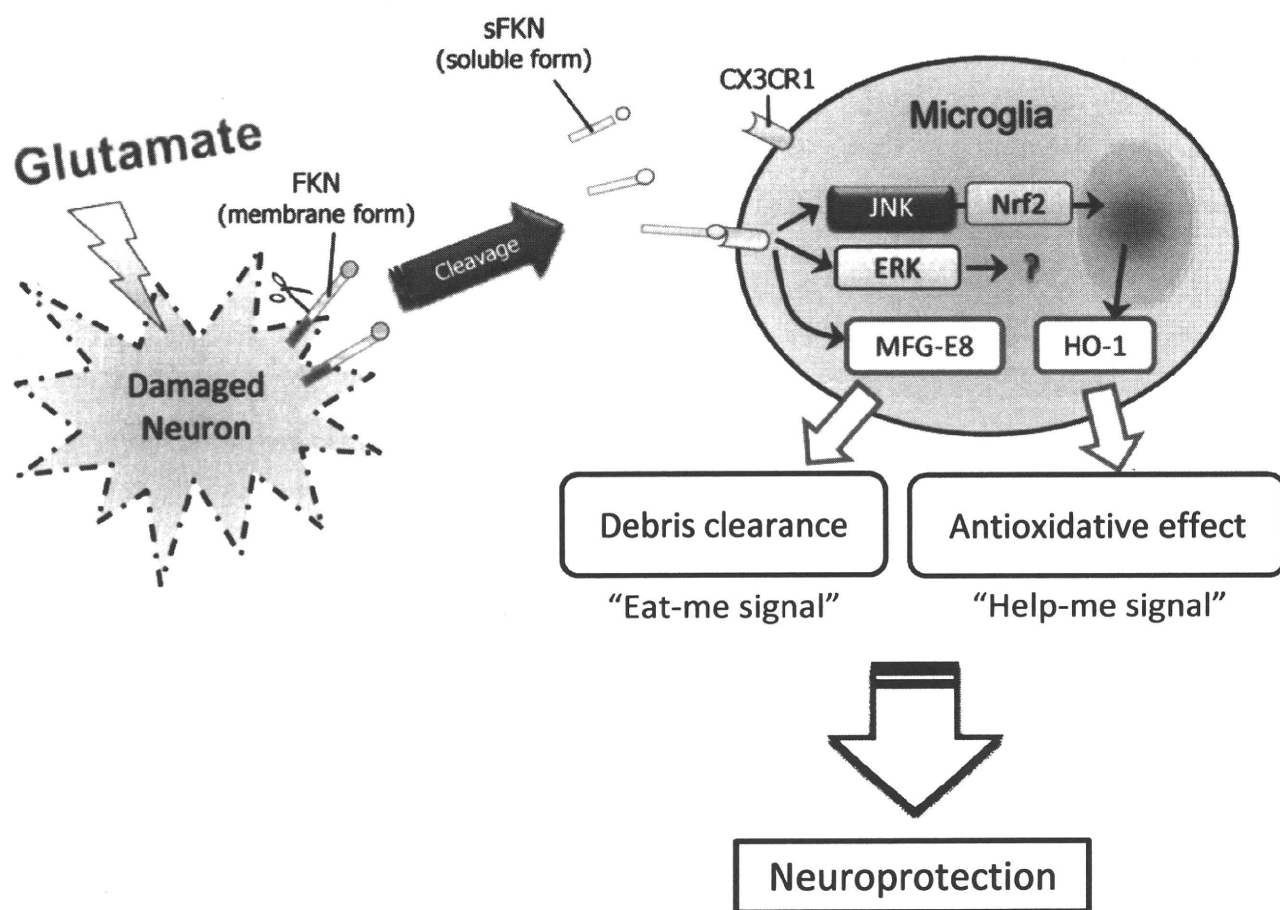


図1 変性神経細胞から分泌されるフラクタルカインによるミクログリアの貪食能亢進および神経保護作用機構

神経細胞へのグルタミン酸刺激によりフラクタルカイン (FKN) が分泌される (sFKN; 分泌型FKN)。sFKNはミクログリア上のレセプター (CX3CR1) に作用してMFG-E8発現を誘導することで、変性神経細胞断片の効率的なクリアランスを行う。一方で、sFKNによる神経保護効果にはERKおよびJNK MAPKが関与していることが明らかとなった。sFKNはJNK経路を活性化することにより、転写因子Nrf2の核への移行が促進され、これがHO-1産生を誘導し抗酸化作用を発揮する。従って、変性神経細胞から分泌されたsFKNは、ミクログリアにおいてMFG-E8発現の誘導およびJNK-Nrf2-HO-1経路の活性化を介して、神経保護的に作用するものと考えられる。

ヒトカルジオウイルスと免疫性神経疾患の関連 <第一報>

研究分担者 大原義朗¹⁾

共同研究者 姫田敏樹¹⁾、大桑孝子¹⁾、村木靖¹⁾、西山修平²⁾、高橋利幸²⁾³⁾、
藤盛寿一⁴⁾、三須建郎²⁾⁵⁾、中島一郎²⁾⁵⁾、藤原一男²⁾⁵⁾、糸山泰人⁶⁾

研究要旨

ヒトを自然宿主とするカルジオウイルス Saffold virus (SAFV) が、近年初めて報告された。カルジオウイルスは、これまで、げっ歯類に感染するウイルスとして知られており、その代表であるタイラーウイルス (TMEV) が起こすマウスの脱髄は、多発性硬化症 (MS) のモデルとして用いられている。MS はその要因のひとつとしてウイルス感染が疑われているが、原因ウイルスは未だ発見されていない。そこで本研究では、SAFV と MS を中心とした各種神経疾患との関わりを明らかにすることを目的とし、神経内科受診患者の髄液を対象として、SAFV 持続感染の有無を Nested RT-PCR 法によりスクリーニングした。しかし、これまでに解析した 50 検体から、SAFV は検出されなかった。SAFV と神経疾患の関係を明らかにするためには、対象検体を再検討するとともに、より多くの検体の解析を実施する必要があると考えられる。

研究目的

カルジオウイルスは、げっ歯類に感染するウイルスとして知られていたが、2007 年、ヒトを自然宿主とするカルジオウイルス “Saffold virus (SAFV)” が、Morris Saffold Jones らにより初めて分離された。それ以降、SAFV は、世界各国において、呼吸器感染症患者の咽頭ぬぐい液、腸管感染症患者の便、または、無菌性髄膜炎患者の髄液などから検出されており、ヒトの間で広く伝播している可能性が示唆されている。さらに、欧米における血清疫学的調査からは、10 歳以上のヒトの 99% 以上が、SAFV に対する抗体を保有

していることも報告され、多くのヒトが幼少期に SAFV の初感染を受けていることも明らかになってきた。しかし、SAFV のヒトに対する具体的な病原性については、依然不明である。

SAFV は、受容体結合蛋白 VP1 および VP2 以外のゲノム構造に、マウスカルジオウイルスであるタイラーウイルス (TMEV) と高い相同性を保持している。TMEV の慢性亜群は、マウス脊髄に持続感染し脱髄を引起することから、多発性硬化症の動物モデルとして用いられている。これらのことから、SAFV は、TMEV と自然宿主こそ異なるものの、同様の病

¹⁾ 金沢医科大学 医学部 微生物学部門

²⁾ 東北大学 大学院 神経内科学

³⁾ 国立病院機構米沢病院 神経内科

⁴⁾ 東北厚生年金病院 神経内科

⁵⁾ 東北大学 大学院 多発性硬化症治療学寄附講座

⁶⁾ 国立精神神経医療研究センター病院

原性を有している可能性が考えられ、ヒトの免疫性神経疾患に関与している可能性が強く疑われる。

そこで本研究では、神経内科受診患者の髄液を対象として、SAFV 持続感染の有無をスクリーニングし、各種神経疾患と SAFV 持続感染との関連を疫学的に調査することを目的とする。

研究方法

はじめに、10 倍段階希釈したウイルス含量既知の溶液各 200 μ L から、ウイルス RNA を抽出し、One step RT-PCR による逆転写および PCR 反応を行い、その反応液の一部を Nested-PCR に供することで、本検出条件におけるウイルス RNA の検出感度を解析した。さらに、用いたプライマーの特異性を確認するために、SAFV および TMEV のクローニングプラスミドをそれぞれ鋳型として PCR を行った。

以上により確認された反応条件を用いて、東北大学医学部附属病院および東北厚生年金病院を受診した患者由来の、匿名化処理後の凍結保存された髄液 50 検体を対象とし、疾患名を伏せた条件下で、髄液検体 (200 μ L) から RNA を抽出し、上記と同様に Nested RT-PCR による SAFV 感染のスクリーニングを行った。

研究結果

本検出条件では、検体 200 μ L 中に 0.16 pfu (感染性ウイルス粒子 0.16 個) 以上のウイルスが含まれていれば、ウイルスゲノムの検出が可能であることが確認された。さらに、Nested PCR に用いたプライマーは、TMEV を検出せず、SAFV のみ

を検出するデザインであることも確認された。

以上の検出条件を用いて、MS (8 例)・NMO (5 例)を含む 50 例の神経疾患患者の髄液を対象に SAFV 感染のスクリーニングを行ったが、いずれの検体からも SAFV は検出されなかった。

考察・結論

Nested RT-PCR を利用したウイルスゲノムの検出において、風疹ウイルスでは ≥ 0.18 pfu / test の検出限界が報告されている。今回検討した SAFV の検出限界は、 ≥ 0.16 pfu / test であったことから、本検出条件は、風疹ウイルスの検出と同等の感度であることが確認された。

しかし、これまでに実施した 50 例の髄液検体から、SAFV は検出されなかった。被験検体が少数であることに加え、TMEV の場合の持続感染細胞はマクロファージであることから、細胞を含んだ髄液および血液等を対象検体に加えた解析を継続する必要があると考えられた。また、SAFV 検出の報告は小児に多いことから、より若年層を対象とした解析も視野に入れる必要があると考えられる。

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

HAM/TSP 患者 HTLV-I 感染細胞の HTLV-I 感染伝播効率における 細胞内骨格再構成シグナルの検討

分担研究者 中村龍文¹⁾

共同研究者 中村英樹²⁾, 山崎聡士²⁾, 福田 卓²⁾, 佐藤克也¹⁾

研究要旨

HTLV-Iは細胞接着分子で構成されるvirological synapseを介してcell to cellで感染していくが、その際細胞内骨格の再構成が関与している可能性がある。今回、HAM/TSP患者HTLV-I感染細胞におけるHTLV-I感染伝播効率に関与する因子としてのactin polymerizationの役割についてHTLV-I感染T細胞株を用いて検討した。その結果、1) actin polymerizationはHTLV-Iの感染伝播効率を規定する一因となっている可能性が示された。2) HAM/TSP患者由来HTLV-I感染細胞株では細胞内cAMP濃度を低く設定し、VASPのリン酸化を制御することによって惹起されるactin polymerizationが効率のいいHTLV-Iの感染伝播の一因となっている可能性が示された。

研究目的

細胞内骨格再構成は多くのウイルスのassemblyや、buddingすなわち細胞外放出において重要な役割を演じている。Cell to cellで感染を伝播していくHTLV-Iでも細胞内骨格再構成が同様の役割を演じている可能性がある。細胞内骨格再構成においてはactin polymerizationが中心的な役割を果たしているが、actin分子にlinkする vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)はactin polymerizationを制御する重要なアダプター蛋白である。VASPはcAMP-dependent PKAの基質であり、本蛋白のリン酸化はactin polymerizationを負に制御している。今回、actin polymerizationに関与するVASPシグナルとHTLV-I感染伝播効率との関係についてHTLV-I感染T細胞株を用いて、HAM/TSP患者由来株とHTLV-Iキャリアー由来株で比較検討した。

研究方法

1) 細胞株：HTLV-I 感染 T 細胞株として HCT-5 (HAM/TSP 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株)、TL-Su (HTLV-I キャリアー由来) を使用した。混合培養の標的細胞として H9/K30 *Iuc* 細胞 (リンパ球系細胞株である H9 細胞に HTLV-I LTR にレポーターとしてのルシフェラーゼ遺伝子を繋いだプラスミドを permanent transfection した細胞株) を使用した。

2) HTLV-I 感染伝播効率の解析：HCT-5 または TL-Su (5×10^5 /well) と、あるいは $1.25 \mu\text{M}$ Latrunculin B (actin depolymerizer) または $15 \mu\text{M}$ Forskolin (adenylate cyclase 活性化剤) 処理 HCT-5 を H9/K30 *Iuc* 細胞 (3.5×10^5 /well) と混合培養し、6 時間後に細胞を回収、その後ルシフェラーゼアッセイを行い、relative luc activity を算出した。

3) ウェスタンブロット解析：HCT-5 を $1.25 \mu\text{M}$ Latrunculin B または $15 \mu\text{M}$ Forskolin にて処理し、経時的に細胞を回収後、cell lysate を作成し、

1) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫学
2) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学

ウエスタンブロット解析を行った。また、HCT-5 または TL-Su を培養し、経時的に細胞を回収後、cell lysate を作成し、ウエスタンブロット解析を行った。

4) 細胞内 cAMP 濃度の測定：HCT-5 または TL-Su を 1.5 時間培養後、細胞を回収し、cell lysate を作成。cyclic AMP complete (Stressgen 社) を用いて、細胞内 cAMP 濃度を ELISA 法にて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は長崎大学の倫理規定を遵守して行った。

研究結果

1) Latrunculin B が HTLV-I 感染伝播効率に与える効果：図 1 に示すように actin depolymerizer である latrunculin B 処理 HCT-5 では HTLV-I tax および gp46 の発現に変化はなかったにもかかわらず、有意に HTLV-I の感染伝播が抑制された。

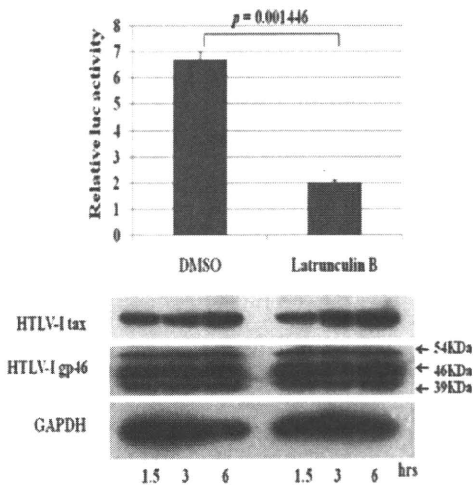


図1. Latrunculin B処理HCT-5におけるHTLV-I感染伝播抑制効果

この事実は HTLV-I の cell to cell spread には actin polymerization が重要な役割を果たしていることを示していた。

2) 細胞内 cAMP 濃度および VASP リン酸化と

HTLV-I 感染効率との関係：Actin polymerization は vasodilator-stimulated phosphoprotein

(VASP)によって促進され、逆に VASP がリン酸化 (P-VASP)されると阻害される。VASP のリン酸化は cAMP-dependent protein kinase A によって惹起されることより細胞内 cAMP 濃度が actin polymerization を制御していることになる。図 2

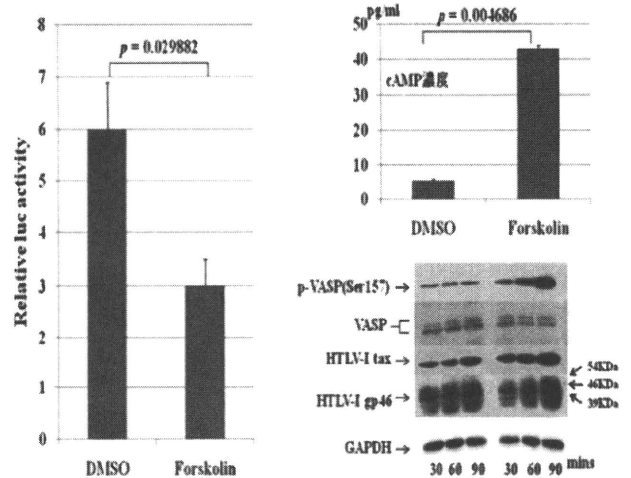


図2. Forskolin処理HCT-5における細胞内cAMP濃度およびVASPリン酸化とHTLV-I感染伝播抑制効果との関係

に示すように Adenylate cyclase 活性化剤である Forskolin にて処理された HC-5 では、細胞内 cAMP 濃度の上昇と共に、VASP のリン酸化が惹起され、このことによって、図 2 左欄に示すように HTLV-I の感染伝播が有意に抑制された。

3) HCT-5 と TL-Su における細胞内 cAMP 濃度, VASP リン酸化および HTLV-I 感染効率の比較：上記の事実を踏まえ、HAM/TSP 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株である HCT-5 と HTLV-I キャリアー由来

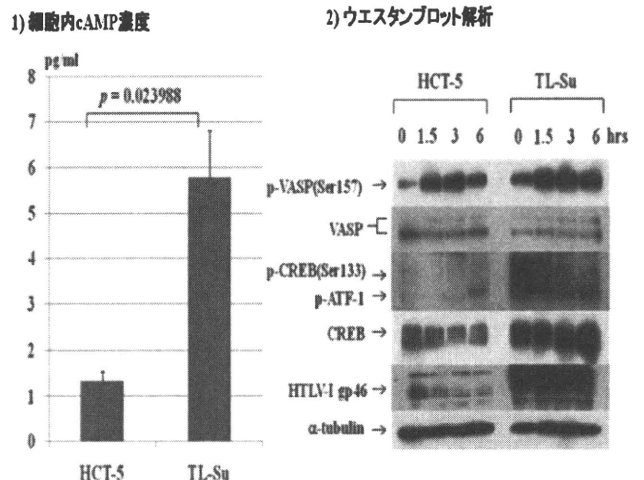


図3. HCT-5とTL-Suにおける細胞内cAMP濃度の比較とウエスタンブロット解析

HTLV-I 感染 T 細胞株である TL-Su で比較検討を行った。その結果、図 3 に示すように TL-Su では HCT-5 に比較して、細胞内 cAMP 濃度は有意に高値を示した。また、TL-Su においては cAMP-dependent PKA によってリン酸化される CREB に加え、VASP も HCT-5 に比較して強くリン酸化されていた。そこで、両株の HTLV-I の感染効率を比較検討した。その結果、HTLV-I gp46 の発現で見ると、TL-Su では HCT-5 に比較して高いにもかかわらず(図 3)、HCT-5 で有意に高い HTLV-I の感染効率を示した(図 4)。

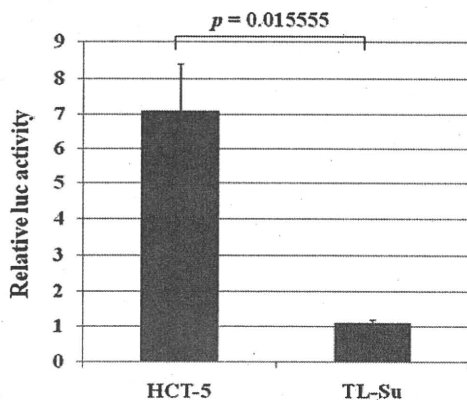


図4. HCT-5とTL-SuのHTLV-I感染伝播効率の比較

考察

細胞内骨格再構成は多くのウイルスの assembly や、budding すなわち細胞外放出において重要な役割を演じている。今回、HTLV-I 感染においても同様の可能性を考え、細胞内骨格再構成において中心的な役割を果たしている actin polymerization と HTLV-I の感染効率との関係について HTLV-I 感染 T 細胞株を用いて検討した。その結果、1) actin polymerization は HTLV-I の感染伝播効率を規定する一因となっている可能性が示され、2) HAM/TSP 患者由来 HTLV-I 感染細胞株では細胞内 cAMP 濃度を低く設定し、VASP のリン酸化を制御することによって惹起される actin polymerization が効率のいい HTLV-I の感染伝播

の一因となっている可能性が示された。Actin polymerization は細胞の遊走能にも関与し、今回は細胞株での検討であるが、HAM/TSP 患者由来株でみられた現象は我々が以前から報告している HAM/TSP 患者 HTLV-I 感染細胞の強い組織浸潤能とも関連している可能性が考えられ興味深い。

今回の結果から、actin polymerization の程度が HTLV-I の感染伝播効率に強く関与している一因となっていると考えられるが、それは結局、細胞内 cAMP 濃度によって規定されていることを示している。HCT-5 における細胞内 cAMP 濃度の低さは adenylate cyclase の活性低下、あるいは逆に phosphodiesterase の活性亢進に起因しているのか不明であるが、HAM/TSP 患者 HTLV-I 感染細胞における HTLV-I 感染伝播効率を考える上で重要であり、今後解析が必要である。

結論

細胞内骨格再構成において中心的な役割を果たしている actin polymerization は HTLV-I の感染伝播効率を規定する一因となっている可能性がある。HAM/TSP 患者由来 HTLV-I 感染細胞株における効率のいい HTLV-I 感染伝播の一因として細胞内 cAMP 濃度を低く設定し、VASP のリン酸化を制御することによって惹起される actin polymerization の関与が考えられた。

健康危険情報

なし。

知的所有権の出願・登録状況

特許取得：HTLV-I 関連脊髄症の予防・治療剤およびアポトーシス促進剤(特許出願中，特開 2007-277223)，実用新案登録：なし。

HTLV-I 関連脊髄症 (HAM/TSP) の発症機序における 単球系貪食細胞の関与について

分担研究者 渡邊 修

共同研究者 松浦英治、高嶋 博

研究要旨

HTLV-I 関連脊髄症の神経障害は、脊髄内に浸潤した HTLV-I 感染 CD4 陽性リンパ球とこれをターゲットとする HTLV-I 特異的細胞障害性 T リンパ球 (CTL) を中心とした炎症細胞との相互作用の結果、引き起こされると考えられてきた。一方、活性化した貪食系単核球 (Mononuclear phagocytes: MP 細胞) も重要な役割をはたしていることが病理学的に指摘されていた。しかしながら MP 細胞の HAM の病態への関与の程度はいまだはっきりしていない。近年の報告で、MP 細胞は CTL の degranulation を亢進し、また、それ自身も HTLV-I に感染しうることが示唆されている。今回われわれは HAM 患者の末梢血中の CTL が MP 細胞とどの程度 interact しているのか、CD4 陽性リンパ球との interaction と比較することで MP 細胞の pathogenesis への関与の程度を明らかにする。

目的

HTLV-I 関連脊髄症の神経障害は、脊髄内に浸潤した HTLV-I 感染 CD4 陽性リンパ球とこれをターゲットとする HTLV-I 特異的細胞障害性 T リンパ球 (CTL) を中心とした炎症細胞との相互作用の結果、引き起こされると考えられてきた。一方、活性化した貪食系単核球 (Mononuclear phagocytes; MP 細胞) も重要な役割をはたしていることが病理学的に指摘されていた。しかしながら MP 細胞の HAM の病態への関与の程度はいまだはっきりしていない。近年の報告で、MP 細胞は CTL の degranulation を亢進し、それ自身も HTLV-I に感染しうることが示唆されている。今回われわれは HAM 患者の末梢血中の CTL が MP 細胞とどの程度 interact しているのか、CTL の CD4 陽性リンパ球

との interaction と比較することで MP 細胞の pathogenesis への関与の程度を明らかにする。

対象・方法

HTLV-I に感染している患者から得られた PBMC を短時間培養し、CTL がコンタクトしている細胞の種類を con-focal laser scanning microscope を用いて決定した。CTL がコンタクトしている細胞の同定は、CTL がコンタクトしている細胞との接触面にパーフォリンを集積させている場合に、同細胞の phenotype を決定した。CTL とコンタクトしている 50 細胞を観察し、CD4 陽性細胞の割合と CD14 陽性細胞の割合を計測した。PBMC 中にたくさん存在する細胞は当然 CTL とコンタクトしやすいことを考慮するために、同じ条件で培養した PBMC 中の CD4 陽性細胞、CD14 陽性細胞の割合を同時にフローサイトメータ

鹿児島大学医歯学総合研究科神経内科・老年病学

(FACS) で測定し、先に計測した割合をそれぞれ FACS で測定したそれぞれの PBMC 中の割合で序除することにより、補正値を算出した。また、蛍光観察する際に接触している細胞の感染を確認するために HTLV-I tax での蛍光染色を同時に施した。

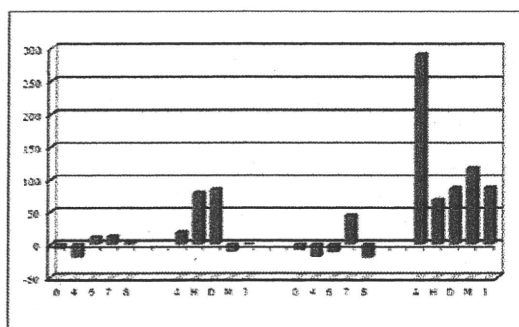
本研究は、鹿児島大学の倫理規定を遵守して行った。

研究結果

HAM 患者の CTL は CD4+細胞よりも有意に高い頻度で CD14+細胞と接触としていた。

CTL と接触していた CD4+あるいは CD14+細胞からは、高い頻度で HTLV-I tax が検出された。

Frequency of CD4+ and CD14+ cells in contact with CTL (normalized value)



CD4(ND) CD4(HAM) CD14(ND) CD14(HAM)

考察

フローサイトメーターにより患者 PBMC 中の CD4+あるいは CD14+細胞中の HTLV-I tax 検出率は、CTL と接触していた細胞中の Tax 陽性率と比べて著しく低いということは、この研究で観察し得えた CTL と細胞の接触が合目

的であることを示唆しており、CD4+細胞よりも CD14+細胞との接触が著しいことは HAM 患者の中核においても CTL は MP 細胞と頻回に接触していることが示唆された。

結語

HAM の発症機序としては、細胞障害性 T 細胞と HTLV-I 感染 CD4+細胞との interaction のみならず CD14+細胞をはじめとする Mononuclear phagocytes との interaction も関与している可能性がある。

文献

1. Jones KS, Petrow-Sadowski C et al. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nature Medicine* 2008 Apr;14(4):429-36
2. Enose-Akahata Y, Oh U, Grant C, Jacobson S. Retrovirally induced CTL degranulation mediated by IL-15 expression and infection of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I-associated neurologic disease. *Blood* 2008 Sep 15;112(6):2400-10

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

HAM における HTLV-1 Tax によるヘルパーCD4⁺ T 細胞の可塑的変化と その慢性炎症病変形成への関与

研究協力者：山野 嘉久¹⁾

共同研究者：新谷奈津美¹⁾、佐藤知雄¹⁾、安藤仁¹⁾、清水由紀子¹⁾、長谷川泰弘²⁾、宇都宮
與³⁾、鈴木登¹⁾

研究要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) は、脊髄での慢性炎症を特徴とする免疫性神経難病である HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) を引き起こす。HAM 病態の特徴は、HTLV-1 感染細胞に起因した過剰な免疫応答による脊髄の炎症と考えられている。よって、感染細胞の同定とその解析は疾患発症機構の理解およびその制御に重要である。最近、我々は HAM 患者において CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ T 細胞が HTLV-1 の主な感染細胞であり、その細胞群は IFN- γ を過剰産生し炎症に促進的に作用する異常化した T 細胞 (T-HAM) へと可塑的に変化して増加していることを証明した。本研究では、HTLV-1 依存的な T-HAM 細胞発生機構を解析し、HTLV-1 機能遺伝子 Tax が T-HAM 細胞誘導の中心的役割を担っていることを明らかにした。また、T-HAM 細胞が脊髄に浸潤して慢性炎症病変を形成する機構を明らかにするため、HAM 患者髄液中の各種ケモカインリガンドを測定し、HAM 病態に相関した IP-10/CXCL10 の発現上昇を明らかにした。よって、HAM の慢性炎症病態において IP-10/CXCL10 が炎症サイクルの形成に関与することが示唆された。

研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) は主に CD4⁺T 細胞に感染し、感染者の一部に HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) を発症する。HAM 病態の特徴は、HTLV-1 感染細胞に起因した過剰な免疫応答による脊髄の炎症と考えられている。我々は最近、HAM 患者において HTLV-1 は、Treg や Th2 を主に含む CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ T 細胞に優位に感染している事を示した。

さらに興味深いことに、HAM における HTLV-1 感染細胞では HTLV-1 機能遺伝子 Tax が高発現し、本来は宿主の免疫系に抑制的に作用する CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ T 細胞が、IFN- γ を過剰産生し炎症に促進的に作用する「異常化した T 細胞 (T-HAM 細胞)」へと変化して増加していた (PLoS One 2009)。そこで、本研究では、正常 CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ T 細胞から T-HAM 細胞への HTLV-1 依存的な発生機構を明らかにすることを目的とした。また、T-HAM 細胞が脊髄に浸潤して炎症を惹起し、その炎症の場で過剰産生され

- 1) 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター
- 2) 聖マリアンナ医科大学 神経内科
- 3) 慈愛会今村病院分院 血液内科