

たが有意な相関はなかった。免疫抑制薬による治療前後の抗AChR抗体価の低下率と血清GRP78濃度との関連を検討したところ（ただし、経過中にクローゼを起こした1例は除いた）、両者には負の相関を認めた（ $\rho = -0.799$, $p < 0.001$ ）。血清GRP78濃度が正常対象平均 + 2SD未満群（ $n=7$ ）とそれ以上群（ $n=8$ ）に分けて免疫抑制薬治療による抗体価の低下率について分析した結果、両者の低下率に有意差を認めた（2元配置分散分析 $p < 0.001$ ）。

考察

血清GRP78はどこでつくられたか。

MGでは正常対象に比べ血清GRP78濃度が有意に高値であった。炎症性筋疾患では正常対象と比べ有意差は認めなかったが、高値を示す症例が見られた。炎症性筋疾患では症例数が少ないため有意差が得られなかったと考えられた。GRP78は小胞体ストレス応答に関連し発現が亢進する。血清中のGRP78はいかなる組織からも分泌される可能性があるが、MGや炎症性筋疾患では骨格筋における小胞体ストレス応答により骨格筋から遊離した可能性が考えられた。MGにおける血清GRP78の由来については更なる検討が必要である。

血清GRP78はMGの臨床症状に影響を及ぼすか

MGFA分類による重症度と血清GRP78濃度との関連について検討したが、関連は認めなかった。さらに、反復神経刺激検査における減衰率や複合筋活動電位との関連についても検討したが、関連はなかった。骨格筋におけるGRP78発現量と血清GRP78濃度との相関や骨格筋における小

胞体ストレス応答が病態に与える影響について検討することが今後の課題である。**血清GRP78はMGの免疫反応に影響を及ぼしているか**

GRP78には免疫調整作用があることが既に示されている。今回の検討では抗AChR抗体価が治療に伴わない低下する低下率と血清GRP78濃度との間に負の相関があることが示された。さらに、血清GRP78濃度高値群と低値群とにわけ、治療後の抗AChR抗体の低下率を比較すると高値群では有意に抗体価が低下することが示された。このことは、血清GRP78が直接的もしくは間接的に自己抗体産生能に影響を及ぼしている可能性を伺わせるものであり、動物実験も含め治療への応用について検討を進めている。

結論

1. MGでは血清GRP78濃度が有意に上昇していた。
2. 血清GRP78濃度とMGFA分類、反復神経刺激検査の結果との間には関連はなかった。
3. 血清GRP78濃度が高い症例は治療により抗AChR抗体価が低下しやすいことが示された。

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

Autoimmune autonomic neuropathy / autoimmune autonomic ganglionopathy における抗 ganglionic アセチルコリン受容体抗体測定の確立

班員 松尾秀徳¹
共同研究者 中根俊成^{1,2}, 樋口 理²

研究要旨

Autoimmune autonomic neuropathy (AAN) は autoimmune autonomic ganglionopathy (AAG), acute pandysautonomia とも称されている疾患概念である(今回の報告では AAN/AAG と記載する)。AAN/AAG では自己抗体である抗 ganglionic アセチルコリン受容体 (gAChR) 抗体の陽性率が約 50% と報告されており, 病態に關与しているとされている。我々はこの抗 gAChR 抗体の高感度, 簡便, 安全な測定系の確立を目指し, 最終的には本邦における AAN/AAG の頻度調査や臨床像解析を計画している。

【目的】

AAN/AAG はこれまでには様々な名称で呼ばれてきており, 疾患概念としても acute autonomic sensory neuropathy (AASN) や paraneoplastic neuropathy, 膠原病に伴う sensory neuropathy など含まれている可能性がある。しかしながら病態としては「自己免疫機序を基盤に発症する(急性の後根神経節・自律神経節炎)」として括ることが可能とも指摘されている。

AAN/AAG の約 50% で陽性となると報告されている抗 gAChR 抗体を上記の疾患群で再度調査することは AAN/AAG の再定義だけではなく, AAN/AAG の頻度調査や臨床像解析につながると考える。本研究では簡便で, 高感度, 且つ定量性を備えた新規の抗 gAChR 抗体測定系の確立を目指す。

【対象症例】

症例 1: 以前に長崎大学第一内科で AASN と診断・治療された症例。

症例 2: X 年頃より立ちくらみが出現, その後症状は増悪し, X+16 年後に当科を紹介受診。受診時には起立性低血圧, 意識消失発作(3-8 回/日), 頑固な便秘(便通は 4-5 日に 1 回), 排尿困難による自己導尿を認めた。臨床的には pandysautonomia を呈しており, 精査にて抗 gAChR 抗体検査(米国グループに依頼)では陽性と判定され AAN/AAG と確定診断した。本症に対しては各種の免疫抑制療法の有効性が報告されており, 本例でもステロイドパルス治療および免疫グロブリン大量静注療法により臨床症状の著明改善を認め, 経口ステロイド薬内服の継続により症状は安定している。

1) 長崎川棚医療センター 神経内科
2) 長崎川棚医療センター 臨床研究部

【方法】

本研究では生物発光を利用したタンパク質間相

相互作用解析法であるカイアシルシフェラーゼ免疫沈降(Gaussia Luciferase Immunoprecipitation: GLIP)法を応用し, 新規の抗 gAChR 抗体検出法を開発した. 測定方法は下記の通りである.

- 1) ヒト AChR α 3 サブユニットと GL を融合させたリポーター分子(AChR α 3-GL)をヒト培養細胞 293F に強制発現させる.
- 2) リポーター分子を可溶画分として調製.
- 3) 可溶画分とヒト血清を反応させ, プロテイン G セファロースによる免疫沈降を実施した後, 免疫沈降物中 GL 活性をルミノメータにより測定した.

【結 果】

- 1) 上記 AAN/AAG 症例(治療前・治療後)のほか, 健常人 21 例からの血清検体を用いて抗体検査を実施した. 健常人血清にてカットオフ値の設定を行った.
- 2) GLIP 法による抗体検査では先述の AASN 症例, AAN/AAG 症例の治療前検体では高い GL 活性を認め, 後者の治療後検体ではその活性低下を認めた.

【考 察】

- 1) GLIP 法による抗 gAChR 抗体測定は従来法と比較して高感度である可能性が示された. 新規の抗 gAChR 抗体検査法を利用することで, 本邦における AAN/AAG の臨床像の詳細な解析を行うことを計画している.
- 2) その詳細な解析としては自律神経障害を呈する疾患群のほか, これまで AASN と診断されている症例や膠原病に伴う neuropathy と診断されている症例においても測定することにより, 疾患の位置づけを検討したい.
- 3) 重症筋無力症 (MG) ではサブユニット構造の異なるアセチルコリン受容体に対する抗

体が陽性となることが知られているが, MG の一部にも自律神経障害を呈し, 抗 gAChR 抗体陽性となる症例の報告がなされていることから, 神経筋接合部疾患における抗 gAChR 抗体の陽性率についても検討する必要がある.

【健康危険情報】

なし

【倫理面への配慮】

当院倫理委員会にて承認済み.

【知的財産権の出願・登録状況】

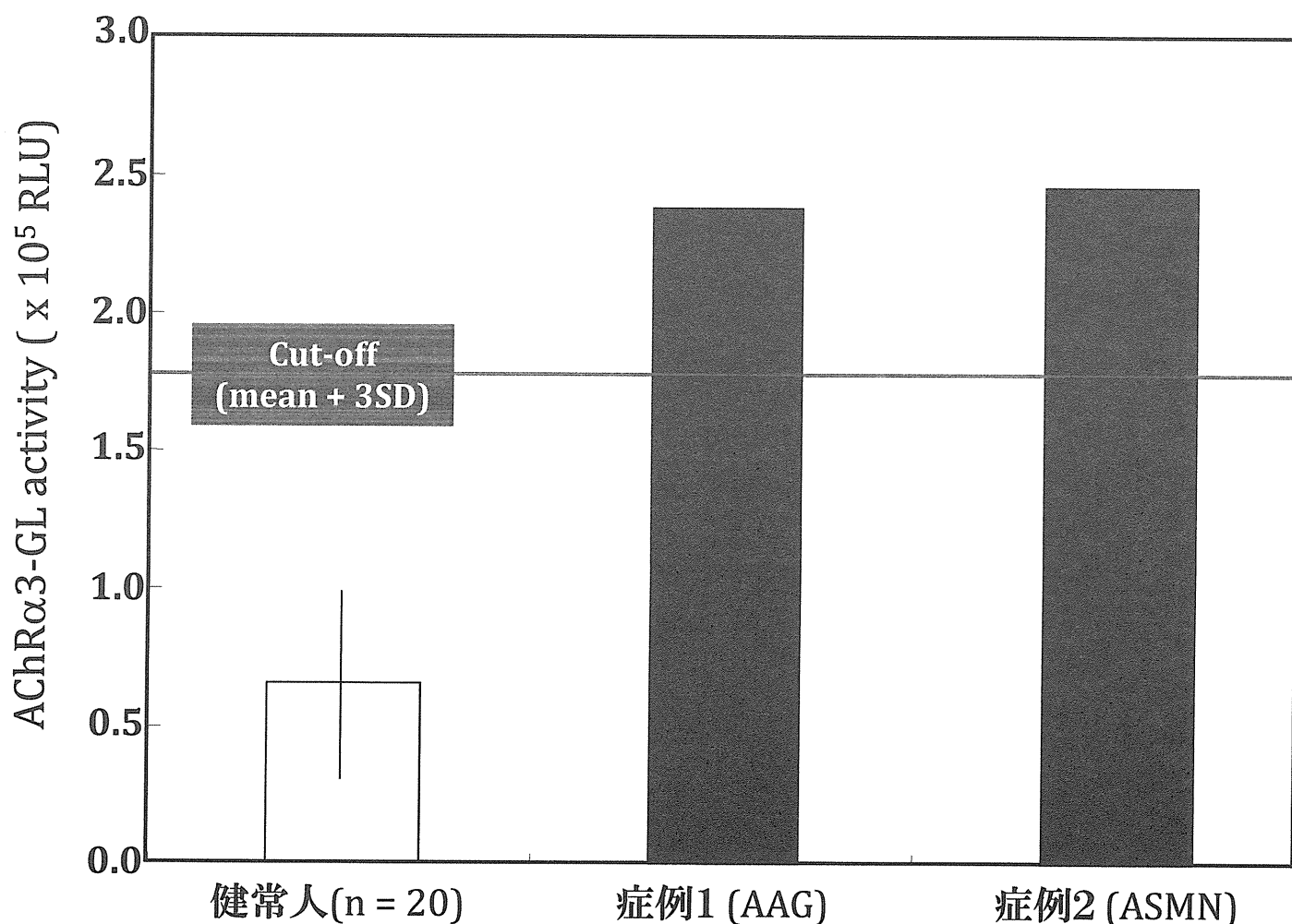
特許取得: なし

実用新案登録: なし

Autoimmune autonomic neuropathy (AAN) /
autoimmune autonomic ganglionopathy (AAG)
における抗ganglionicアセチルコリン受容体抗体測定的确立

AAN/AAG=自己免疫機序を基盤に発症する(急性の)自律神経節炎

- 目的) 抗ganglionic AChR抗体の新規測定系(安全・簡便・高感度・定量性)的确立。
- 結果) GLIP法によるganglionic AChR $\alpha 3$ subunitに対する自己抗体測定。(結果:下グラフ:2症例で陽性と判定した)
- 計画) 本邦におけるAAN/AAGの頻度把握, 臨床像解析。
■ 自律神経障害(AASN等)を呈するニューロパチーでの抗体測定。
■ 神経筋接合部疾患の自律神経障害との関連検討。



重症筋無力症胸腺の遺伝子発現（第2報）

研究協力者 小野寺 宏¹⁾

共同研究者 今野秀彦¹⁾

研究要旨

重症筋無力症(MG)は胸腺異常を高率に合併し、なかでも多くの MG 患者において認められる過形成胸腺では胚中心が観察されるなど、胸腺は異常免疫応答の場となっている。過形成胸腺の mRNA 発現プロファイルをマイクロアレイにて検討した。正常胸腺と比較して過形成胸腺において発現レベルが低下する遺伝子のなかで、自己免疫疾患に関連する遺伝子 PDLIM2 が見出された。PDLIM2 は NF- κ B を分解することにより免疫機能を抑制し、PDLIM2 欠損樹状細胞では NF- κ B 分解抑制と炎症性サイトカイン産生増加が認められることが知られている。今後、PDLIM2 のように免疫系を負に制御する遺伝子の解析が MG の病態解明に有用と考えられる。

研究目的

重症筋無力症(MG)は胸腺異常を高率に合併し、なかでも過形成胸腺では胚中心が観察されるなど胸腺は異常免疫応答の場となっている。MG 胸腺における免疫変調にはリンパ球の局在化・活性化異常が関与していると考えられる。過形成胸腺の病態解析には胸腺上皮細胞とリンパ球との相互作用に関連する遺伝子の検討が有用である。そこでこれらの遺伝子に注目して mRNA 発現プロファイルをマイクロアレイにて検討し、昨年度の本班では接着分子と metalloproteinase ファミリー遺伝子の発現が過形成胸腺で増加していることを報告した。今回は、過形成胸腺で発現が減少する遺伝子を中心に解析した。

研究方法

健常者と MG 患者（抗 acetylcholine 受容体抗体陽性の過形成胸腺症例）の胸腺各々 4 サンプルについてマイクロアレイにて解析し、GAPDH との発現比をもって群間比較した。

正常胸腺に比し過形成胸腺群において有意に mRNA 発現レベルが変化している遺伝子について報告する。

（倫理面への配慮）匿名化

研究結果

MG 過形成胸腺はリンパ組織に富むため、年齢をマッチさせた対照胸腺を用いた場合には脂肪組織由来のノイズのために解析が極めて困難になると予想される。そこで循環器疾患手術の際に術野を妨げるため除去された胸腺（未成年）のうち脂肪組織の少ない部分を切り出して対照胸腺とした。CD4 および CD8 の mRNA 発現は正常胸腺/過形成胸腺比がほぼ 1 であり、胸腺組織における mRNA 発現レベルの比較上問題の無いマイクロアレイデータと考えた。なお B cell マーカーの CD20 発現比は約 3 であり、過形成 MG 胸腺での germinal center 形成を反映していると思われる。

過形成胸腺において発現レベルが有意に増

¹⁾国立病院機構西多賀病院病院

加している遺伝子数は271, 有意に減少している遺伝子数は108であった.

過形成胸腺において減少している主な遺伝子(機能の一部が知られている遺伝子)を列挙する. iPS細胞樹立に必要な遺伝子 *lin28* がリストアップされたことは興味深い. *netrin* 受容体ファミリーに属し神経線維伸長や細胞移動に関与する *UNC-5c*, *lymphotoxin beta*, *PDLIM2*, *clathrin light chain beta*, *vang-like 1*, ケモカイン *XCL1*, *AMBP* (*alpha-1-microglobulin/bikunin precursor*) 等も過形成胸腺において発現レベルが減少していた. *PDLIM2* は *NF-κB* のユビキチン化と核内輸送ならびに分解に関与するユニークなユビキチンリガーゼとして知られる. *PDLIM2* 欠損樹状細胞では *NF-κB* 分解抑制と炎症性サイトカイン産生増加が認められることから自己免疫疾患への関与が推測されており興味深い.

過形成胸腺において増加している遺伝子のなかで, ケモカイン *CCL2*, *CXCL2*, *CXCL1*, *CCL8*, *IL6* などの液性因子が有意に増加していることは容易に想像できる. *VEGF* や *angiopoietin-like4* の発現レベルは正常胸腺の10倍にも達し, *Angiomotin-like protein 2* 等の血管関連遺伝子発現の増加もあわせて過形成胸腺内の血管構造が正常胸腺のそれと大きく異なる事が反映されていると推測される.

Pentraxin3 の過形成胸腺における著明な発現増加も興味深い. *pentraxin3* は炎症マーカーの *CRP* とともに遺伝子ファミリーを構成する. *CRP* がおもに *IL-6* 刺激により肝臓で産生され

るのに対して, *pentraxin3* はリポ多糖, *IL-1*, *TNF-α* などの炎症シグナルに反応して血管内皮細胞や血管平滑筋細胞などから産生されるため鋭敏な血管局所病変マーカーとして期待されている. 血中 *pentraxin3* レベルが *MG* の治療効果や *MG* 症状増悪の指標になりうるかについて今後検討すべきと考える.

昨年の本会議において, 過形成胸腺での *laminin* サブユニットや *metalloproteinase* ファミリー遺伝子, *von Willebrand factor*, *tissue plasminogen activator*, *epithelial membrane protein1(EMP1)* の発現レベルの著明な増加を報告したが, 近年の細胞生物学の成果をふまえた発現プロファイルの詳細な解析により胸腺病変と *MG* 発症を結び手がかりが見えてくるかもしれない.

結 論

正常胸腺と過形成胸腺における mRNA 発現プロファイルをマイクロアレイにて比較した. 上皮・血管系と免疫細胞との相互作用に関連する多くの遺伝子の発現レベルが変化していた. 過形成胸腺において発現レベルが低下する遺伝子のなかで自己免疫疾患に関連する遺伝子 *PDLIM2* が見出された.

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

実験的自己免疫性脳脊髄炎の病態におけるケラタン硫酸プロテオグリカンの役割

分担研究者 楠 進¹

共同研究者 ○宮本勝一¹、森口幸太²、田中紀子¹、門松健治³

研究要旨

ケラタン硫酸プロテオグリカン (KS) はガラクトース (Gal) と N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の二糖が交互に繰返した構造を基本骨格とし、中枢神経系ではコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CS) と同様に無秩序なシナプス形成を防ぐための再生阻害因子として機能している。本研究で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 KS の関与を検証した。脳でのケラタン硫酸合成に必要な N-アセチルグルコサミン 6-O-硫酸転移酵素 1 遺伝子をノックアウトした KS-KO では発症時の EAE スコアは野生型マウス (Wt) に比べて有意に軽症であった。病理学的にも KS-KO の脳、脊髄組織の炎症所見は Wt に比べて軽度であった。MOG 特異的リンパ球の recall response では、KS-KO 由来のリンパ球の細胞増殖反応は Wt のリンパ球に比べて弱く、KS は抗原特異的リンパ球の活性化に関与していることが示唆された。以上より EAE では KS の合成や生理活性を阻害することが治療に有効であると考えられた。KS 活性を阻害する物質が多発性硬化症の治療につながる可能性がある。

研究目的

プロテオグリカンは細胞表面や細胞外マトリックスに存在し、角膜や軟骨のほかにも豊富に存在することが知られている。ケラタン硫酸 (KS) は直鎖状の多糖鎖でケラタン硫酸プロテオグリカン (KSPG) として主に細胞表面や細胞外マトリックスに存在する。基本骨格はガラクトース (Gal) と N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の二糖が交互に繰返した構造であり、糖鎖上には硫酸基修飾が多くみられる。また糖鎖内部には硫酸化修飾が特に多いドメインが存在し KS の生物機能に重要であると考えられる。生体内での主な存在場所は角膜、軟骨、脳である。KS は中枢神経系において、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CS) と同様に無秩序なシナプス形

成を防ぐための再生阻害因子として機能している。神経軸索の伸長を阻害するグリア性瘢痕の形成に KS が重要な働きを示すことが、脳でのケラタン硫酸合成に必要な N-アセチルグルコサミン 6-O-硫酸転移酵素 1 (GlcNAc6ST-1) 遺伝子をノックアウトしたマウスを用いた脳損傷モデルによる実験により明らかにされている。

神経疾患との関連では、アルツハイマー病モデルマウス脳内において病態発症に連動してアミロイド斑沈着部位に KS が蓄積することが報告され病態との関連が考察されている。

-
- 1) 近畿大学医学部神経内科
 - 2) 防衛医科大学第三内科
 - 3) 名古屋大学医学部生化学

KS と中枢神経免疫疾患の病態との関連は不明であるが、本研究で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 KS の関与を検証した。

研究方法

B6 バックグラウンドの GlcNAc6ST-1 遺伝子をノックアウトしたマウス (KS-KO) に対して MOG(35-55)ペプチドを用いて EAE を誘導した。MOG 特異的リンパ球の 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 再刺激下で培養した。48 時間目の培養上清の各種サイトカインを ELISA にて測定し、細胞増殖は ^3H 取り込みにて評価した。

(倫理面への配慮)

患者情報、および血液検体は匿名化し個人が特定できないように配慮した。個人の情報が表にで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は十分に配慮した。

研究結果

KS-KO では発症時 (day 15-34) の EAE スコア (■) は野生型マウス (W_t : ○) に比べて EAE スコアは有意に軽症であった (図 1)。ヘテロノックアウトマウス (◆) は W_t と差がなかった。病理学的にも KS-KO の脳、脊髄組織の炎症所見は W_t に比べて軽度であった。MOG 特異的リンパ球の recall response では、KS-KO 由来のリンパ球の細胞増殖反応は W_t のリンパ球に比べて弱い傾向があった。サイトカイン産生パターンは少数例での比較では有意差は認めなかった。

考察

KS が欠損したマウスでは EAE は軽症化した。recall response の結果を考慮すると、KS は MOG 特異的リンパ球の活性化に関与していることが示唆された。EAE では KS が無いほうが疾患抑制的な結果が得られた。

我々の実験結果から、グリア性瘢痕形成の実験系と同じく、EAE では KS の合成や生理活性を阻害することが治療に有効であると考えられた。KS 活性を阻害する物質が多発性硬化症の治療につながる可能性がある。今後のさらなる検討が必要である。

結論

KS は EAE において疾患促進的に関与していることが示唆された。KS の機能を抑制することが EAE の治療につながる可能性がある。

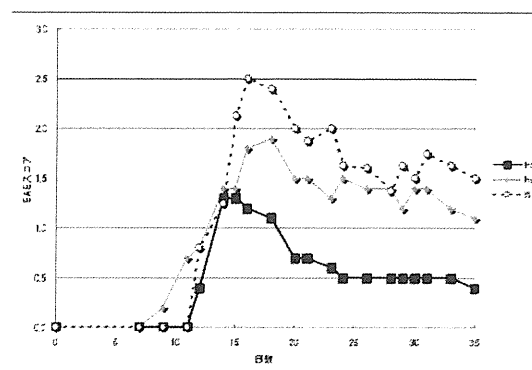
健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録：なし

図 1 KS-KO における EAE スコア



食餌抗原の腸管免疫に与える影響

分担研究者 中辻 裕司¹⁾

共同研究者 高田 和城¹⁾、甲田 亨¹⁾、オノラ ジョセフ¹⁾、多田 智¹⁾、奥野 龍禎¹⁾、
望月 秀樹¹⁾、木下 允²⁾、佐古田 三郎³⁾

研究要旨

近年我が国における多発性硬化症の患者数は炎症性腸疾患とともに急速に増加している。

また一方、経口摂取した糖鎖抗原や腸内細菌叢が、多発性硬化症の病態に重要な役割をはたしている Th17 細胞や Treg 細胞の分化に影響を及ぼし、各種自己疾患モデルの免疫動態に影響を与えることが報告されている。我々のグループでも昨年度の班会議において腸内環境に影響を与える乳酸菌の中から、1 次スクリーニングで選択した 2 菌の内 1 菌が経口投与で EAE の症状を改善させることを報告した。今年度はより有効な菌や菌体成分の探索を行うためのスクリーニング法の確立を目指し、EAE に有効であった菌と無効であった菌の腸管粘膜下層細胞に与える影響を検討した。有効菌は腸管粘膜下層細胞からの TNF- α の産生が有意に低下しており、更に多数の乳酸菌で検討したところ、様々なサイトカインの産生パターンがあることを示した。

EAE での効果とあわせて検討することにより、腸管粘膜下層細胞への反応性を評価することは多発性硬化症により効果的な成分のスクリーニング法となりうると考えられる。

研究目的

経口摂取した糖鎖抗原や腸内細菌叢が腸管粘膜下層、腸間膜リンパ節における Th17 細胞や Treg 細胞に影響を及ぼすことが近年報告されている。更に腸管の免疫動態が全身の免疫動態に影響を与えることも報告されており、各種自己免疫疾患と食餌抗原や腸内細菌叢の関連が示唆されている。今回我々は、多発性硬化症の治療ターゲットとして食餌抗原や腸内細菌の変化に伴う腸管免疫の修飾に注目し、多発性硬化症の治療および予防に有効な乳酸菌の菌体成分

や食餌性の抗原の探索を行うためのスクリーニング法の確立を目的とした。

研究方法

小腸粘膜下層細胞は C57BL/6 マウス雌 6 週齢より小腸を採取し、EDTA にて上皮細胞を除去した後に、Collagenase D、Dispase、DNase などで処理を行うことにより腸管粘膜下層単核球を採取した。

各種乳酸菌は培養後、80°C 30 分で殺菌処理を行った後に回収し凍結乾燥したもの

1) 大阪大学大学院医学系研究科神経内科学

2) 大阪大学大学院免疫制御学

3) 国立病院機構刀根山病院

を用いた。

(1) EAEでの有効菌と無効菌の腸管粘膜下層細胞との反応性の違いを検討するために採取した腸管粘膜下細胞にそれぞれの乳酸菌を1 μ g/ml、10 μ g/mlで投与し、72時間後の細胞上清中を採取した。炎症性サイトカインの指標としてTNF- α 、抑制性サイトカインの指標としてIL-10の産生をELISAにて評価を行った。

(2) 他の乳酸菌での腸管粘膜下細胞からのサイトカイン産生を調べるために合計18種類の乳酸菌において10 μ g/mlで投与した際のTNF- α 、IL-10産生の評価をおこなった。

研究結果

(1) 有効菌では腸管粘膜下細胞からのTNF- α の産生が有意に低下していた。一方抑制性のサイトカインであるIL-10の産生は有効菌、無効菌で産生に差はなかった。

(2) その他16種類の乳酸菌においてTNF- α 、IL-10の産生を検討したところ産生パターンは様々であり、大きく3つのグループ(IL-10優位、TNF- α 優位、両方産生)に分けることができることを示した。

考察

有効菌では腸管粘膜下細胞刺激によるTNF- α 産生は低下していた。炎症性サイトカインの産生抑制もしくは相対的なIL-10産生が重要である可能性はあり、同様の傾向を示した他の菌での検討が必要である。

結論

腸管粘膜下層細胞と乳酸菌を含む食餌抗原との反応は様々であり、in vivoでの結果を併せて検討することにより、腸管免疫を介した多発性硬化症の予防・治療に有効な菌のスクリーニング法が確立できる可能性がある。

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

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 TIM-3 の役割に関する検討

研究分担者 高昌星¹⁾

共同研究者 兼山友輝¹⁾、津金さやか¹⁾、滝沢章¹⁾、市川元基¹⁾、八木田秀雄²⁾

研究要旨

T cell immunoglobulin and mucin domain-3 (TIM-3) は Th1 細胞や樹状細胞上に発現する I 型膜貫通タンパクである。TIM-3 の機能としては、リガンドである Galectin-9 と反応することにより、Th1 応答を抑制し、末梢性寛容を誘導することが知られている。そこで我々は、多発性硬化症 (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 Murin Encephalomyelitis Virus: TMEV) の BeAn 株を用い、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 TIM-3 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) において、TMEV 感染により TIM-3, Galectin-9 mRNA 発現量が有意に増加した。また、TMEV-IDD マウスの脊髄において、TIM-3, Galectin-9 mRNA 発現量が、麻痺症状の進行に伴い有意に増加した。さらに、TMEV-IDD マウスに対して、抗 TIM-3 抗体を投与することにより、麻痺症状の有意な増悪、脊髄浸潤細胞数の増加、TNF α , IL-4, IL-10, IL-17 産生細胞数の増加がみられた。以上から、TIM-3 は TMEV-IDD の症状抑制に関与しており、抗 TIM-3 抗体投与によって TIM-3 pathway を阻害したため、TMEV-IDD が増悪したと考えられる。

研究目的

多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) はヒトにおける中枢神経系の炎症性脱髄疾患であり、その発症機序は未だ明らかにされていない。我々は、タイラー脳脊髄炎ウイルス (Theiler's Murin Encephalomyelitis Virus: TMEV) の BeAn 株を用い、感受性マウスである SJL/J マウスに接種することにより、TMEV 誘導による免疫性脱髄疾患 (TMEV-Induced Demyelinating Disease: TMEV-IDD) を作製している。

この TMEV-IDD は慢性進行型 MS に類似した臨床症状及び病理組織像を示すため、MS 発症機序の解明に有用な動物実験モデルとされている。

T cell immunoglobulin and mucin domain-3 (TIM-3) は Th1 細胞や樹状細胞上に発現する I 型膜貫通タンパクである。TIM-3 の機能としては、リガンドである Galectin-9 と反応することにより、Th1 応答を抑制し、末梢性寛容を誘導することが知られている。また MS 患者の CD4⁺ T 細胞において、TIM-3 の発現が低下することも報告されている。我々はこれまでに、末梢性寛容を誘導する抑制性共刺激受容体である PD-1 が TMEV-IDD の病態に関与している事を報告

1) 信州大学医学部

2) 順天堂大学医学部免疫学講座

した。加えて、TIM-3 と PD-1 の発現は、主に異なる population を示すと報告されており、TMEV-IDD における TIM-3 の検討はなされていない。そこで我々は、TMEV 感染による、*in vitro*、*in vivo* レベルにおける TIM-3 の発現量を解析すると共に、TIM-3 のアンタゴニスト抗体を用い、TMEV-IDD における TIM-3 の役割を検討した。

研究方法

①Naïve SJL/J マウスの大腿骨から骨髓を採取し、GM-CSF にて樹状細胞 (BMDC) を誘導した。この BMDC に TMEV を感染させた後、TIM-3, Galectin-9 mRNA 発現量を real-time RT-PCR 法にて測定した。

②SJL/J マウス雌 6 週齢の脳半球内に TMEV (6×10^5 PFU) を接種し、TMEV-IDD マウスを作製した。TMEV 接種後第 0, 10, 20, 30, 40 日に脊髄を採取し、TIM-3, Galectin-9 の mRNA 発現量を real-time RT-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 群として TMEV 接種 3 日前から抗 TIM-3 抗体 (RMT3-23) 0.25 mg を 3 日に 1 回 (計 8 回) 腹腔内投与した。Effector phase 群として発症直前 (第 14 日目) から、Induction phase 群と同様に計 8 回、抗 TIM-3 抗体を投与した。TMEV 接種から 38 日後に sacrifice を行い、脊髄における浸潤細胞数、脾臓・脊髄における CD4⁺ T 細胞のサイトカイン産生細胞を測定した。

研究結果

①TMEV 感染により、BMDC 上の TIM-3 mRNA 発現量は、感染後 48 時間をピークに約 5 倍増加した。また、Galectin-9 mRNA 発

現量は、約 13 倍増加した (図 1)。

②TMEV-IDD マウスの麻痺症状の進行に伴い、TIM-3 mRNA は約 13 倍、Galectin-9 mRNA は約 11 倍増加した (図 2)。

③Positive Control 群と比較し、抗 TIM-3 抗体投与群において臨床スコアが有意に増悪した (図 3)。また、Induction phase 抗体投与群では、半数のマウスが経過観察中に死亡した。脊髄における浸潤細胞数は、抗 TIM-3 抗体 Effector phase 投与群において有意に増加した (図 4)。脾臓における炎症性サイトカイン産生細胞に抗体投与による有意な差はなかったが、Effector phase 抗体投与群の脊髄において、TNF α , IL-4, IL-10 産生細胞数が上昇傾向であった (図 5)。

図 1 : TMEV 感染に伴う、BMDC 上の TIM-3, Galectin-9 mRNA 発現量。

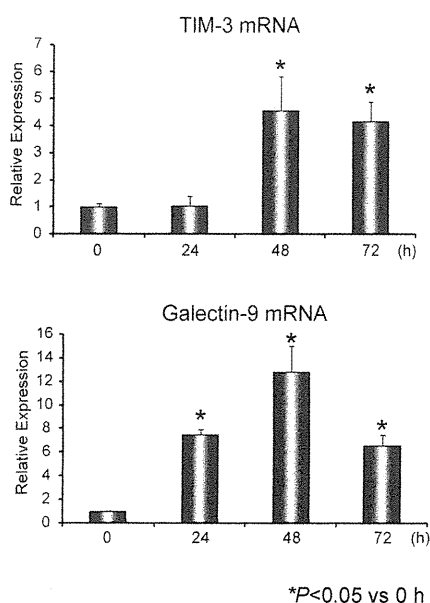


図 2 : TMEV-IDD の脊髄における TIM-3, Galectin-9 mRNA 発現量

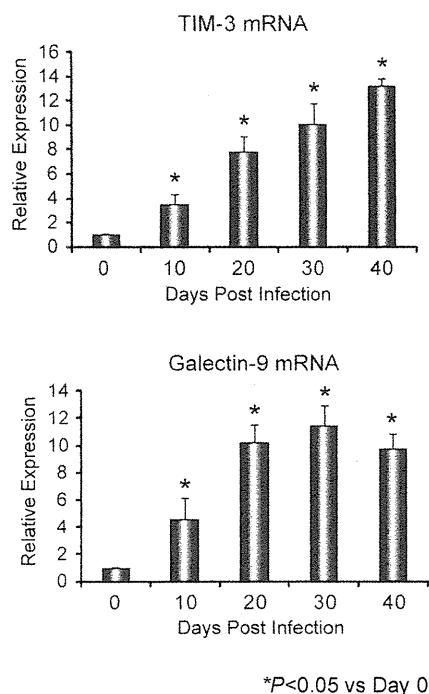


図 3 : TMEV-IDD の麻痺症状のスコア。

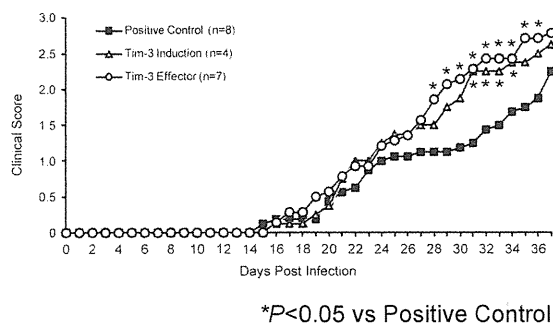


図 4 : 脊髄浸潤細胞数

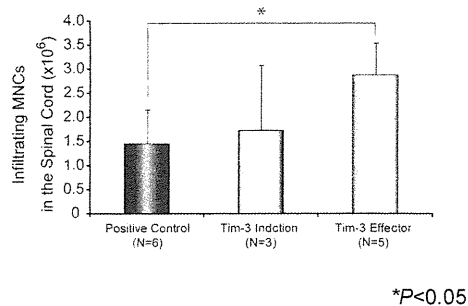
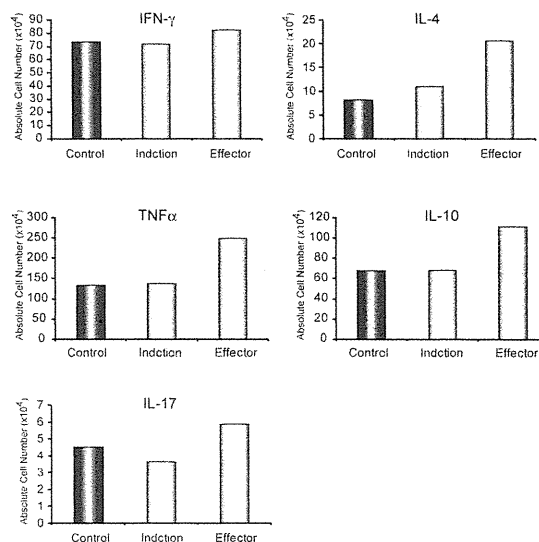


図 5 : 脊髄浸潤細胞中の CD4⁺ T 細胞におけるサイトカイン 産生細胞数



考察

本研究において、TMEV 感染により *in vitro*, *in vivo* 共に TIM-3/Galectin-9 mRNA 発現量が増加することを証明した。加えて、TMEV-IDD マウスに抗 TIM-3 抗体を投与することにより、麻痺症状が増悪することを明らかにした。TIM-3 は Galectin-9 との反応により、Th1 細胞の末梢性寛容を誘導することが報告されている。今回、抗 TIM-3 抗体の投与により、TIM-3/Galectin-9 の反応をブロックしたことから免疫寛容が阻害され、TMEV-IDD の臨床スコアが増悪すると共に、Induction phase 抗体投与群において、致死性の作用を示したと考えられる。

結論

TIM-3/Galectin-9 は、TMEV-IDD の麻痺症状抑制に関与しており、今後 TIM-3 pathway が MS の新たな治療ターゲットとして利用できる可能性が示唆された。

文献

Oleszak EL *et al.* Theiler's Virus Infection: a Model for Multiple Sclerosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Jan; 17 (1): 174-207.

Hafler DA, Kuchroo V. TIMs: central regulators of immune responses. *J Exp Med.* 2008 Nov 24; 205 (12): 2699-701.

Koguchi K *et al.* Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2006 Jun 12; 203 (6): 1413-8.

Monney L *et al.* Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature.* 2002 Jan 31; 415 (6871): 536-41

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 αV Integrin 抗体による タイラー脳脊髄炎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 滝沢 章¹⁾、中嶋 郁美¹⁾、市川 元基¹⁾、八木田秀雄²⁾

研究要旨

αV integrin は、integrin family に属する分子であり、免疫細胞の遊走や、炎症局所への浸潤に関与していることが知られている。さらに近年、T細胞の増殖、分化にも関与していることが示されている。加えて、 αV integrin のノックアウトマウスは Th17 細胞への分化が抑制され、実験的自己免疫性脊髄炎 (EAE) の麻痺症状が軽減されることも報告されている。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 αV integrin 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 αV integrin mRNA 発現量は、TMEV 感染によって有意に増加した。さらに、TMEV-IDD マウスに抗 αV integrin 抗体を投与することにより、麻痺症状が有意に抑制され、脊髄への浸潤細胞数が減少傾向を示した。さらに脊髄浸潤細胞中の CD4⁺T 細胞における IFN- γ 、TNF- α 、IL-10、IL-17 産生細胞が有意に増加した。以上より、 αV integrin は、TMEV-IDD の症状悪化に関与しており、今後、抗 αV integrin 抗体を MS の治療薬として用いることが出来る可能性が示唆された。

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。

αV integrin は integrin family に属する分子である。白血球の炎症部位への遊走、浸潤や、抗原による T細胞の活性化に関与している。また、近年では樹上細胞上に発現した αV integrin が TGF- β シグナルを介し、Th17 細胞への分化を促進することも報告されている。 αV integrin は、MS の病巣周囲における血管内皮細胞、マクロファージ、アストロサイト上にて発現量が増加することが報告されている。さらに、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) において、 αV integrin を血球細胞系特異的に欠損させることにより、麻痺症状が軽減され

¹⁾ 信州大学医学部

²⁾ 順天堂大学医学部免疫学講座

ることも示されている。

そこで今回我々は、TMEV-IDD における αV integrin の役割を検討した。

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 に TMEV を MOI (Multiply of Infection) = 10 にて感染させ、 αV integrin の mRNA 発現量を real-time RT-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 (6×10^5 PFU) を接種し、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 αv integrin 抗体 (RMV-7) 0.25mg を 3 日に 1 回 (計 8 回抗) 腹腔内投与した。Effector phase 抗体投与群として発症直前 (第 14 日目) から Induction phase 抗体投与群と同様に計 8 回抗 PD-1 抗体を投与した。TMEV 接種後 36 日目に脾臓・脊髄を採取した。脊髄から Mononuclear cell (MNC) を分離し、脊髄中の MNC 数をカウントした。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。

研究結果

①BMDC 上の αV integrin 発現量は、TMEV 感染によって有意に増加した (図 1)。

②Positive control 群と比較し、Effector phase 抗体投与群において発症率及び臨床スコアが有意に抑制された (図 2)。また、抗 αV integrin 抗体 Effector phase 抗体投与群において、脊

髄浸潤並細胞数の減少傾向が見られた (図 3)。さらに脊髄浸潤細胞中の $CD4^+T$ 細胞における IFN- γ 、TNF α の産生細胞数が、Effector phase 抗体投与群において減少傾向を示した (図 4)。また、脾細胞中の $CD4^+T$ 細胞において、TNF- α 産生細胞が Effector phase 抗体投与群において有意に減少し、IL-10 産生細胞数が Effector phase 抗体投与群において有意に増加した (図 5)。

図 1 : BMDC 上の αV integrin mRNA 発現量

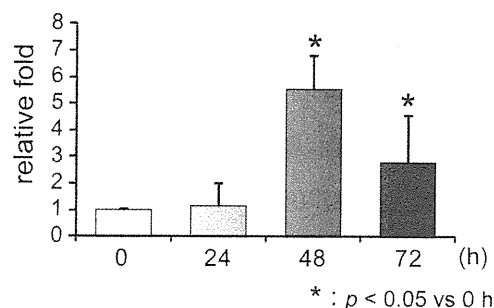


図 2 : 発症率及び臨床スコア

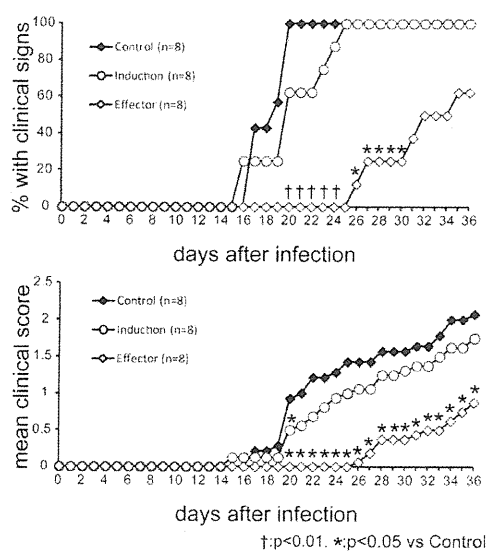


図 3： 脊髄浸潤細胞数

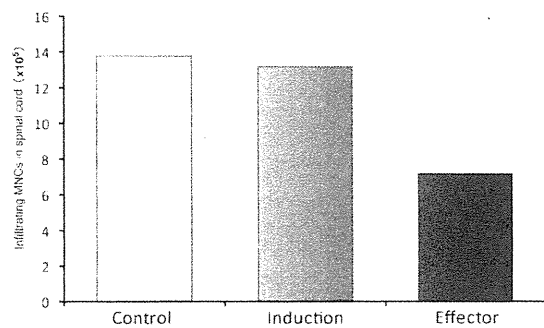


図 4： 脊髄浸潤細胞中の CD4⁺T 細胞における炎症性サイトカイン産生細胞

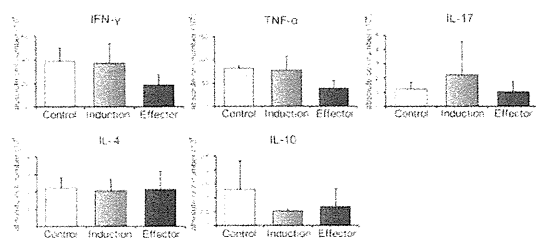
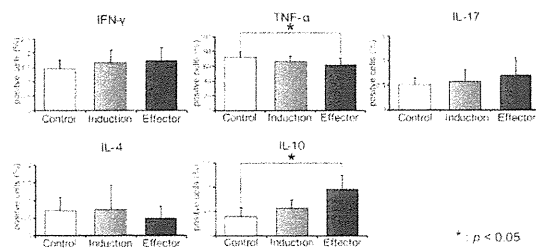


図 5： 脾細胞中の CD4⁺T 細胞における炎症性サイトカイン産生細胞



考察

本研究により、TMEV 感染によって BMDC 上の αV integrin 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 αV integrin 抗体を投与することにより臨床症状

が有意に抑制された。今回、抗 αV integrin 抗体投与により、免疫細胞の接着、遊走能が阻害された結果、脊髄への炎症性細胞浸潤が抑制されたと考えられる。そして、脊髄浸潤細胞数の減少を反映して、Th1 細胞をはじめとする Effector 細胞が減少し、TMEV-IDD の発症、及び臨床スコアの抑制につながったと推測される。

結論

αV integrin は、TMEV-IDD の症状悪化に関与しており、抗体 αV integrin 抗体を 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) Sobel RA, Hinojoza JR, Maeda A, Chen M. Endothelial cell integrin laminin receptor expression in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol.* 1998 Aug;153(2):405-15.

4) Acharya M, Mukhopadhyay S, Païdassi H, Jamil T, Chow C, Kissler S, Stuart LM, Hynes RO, Lacy-Hulbert A. αv Integrin expression by DCs is required for Th17 cell differentiation and development of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J Clin Invest.* 2010 Dec;120(12):4445-52.

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

活性酸素 (ROS) を標的とした多発性硬化症の治療に向けて 新規高尿酸血症治療薬による EAE 抑制作用

分担研究者 中辻裕司¹⁾

共同研究者 オノラ ジョセフ¹⁾、甲田亨¹⁾、高田和城¹⁾、多田智¹⁾、奥野龍禎¹⁾、望月秀樹¹⁾
木下允²⁾、佐古田三郎³⁾

研究要旨

多発性硬化症 (MS) およびその動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の病態に、活性酸素種 (ROS) が関与していることが報告されている^{1,2)}。我々はフリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンが EAE の重症度改善に有効であることを報告したが³⁾、エダラボンは半減期が短く、静脈投与が必要であり、より投与が簡便で作用時間の長い抗酸化剤が待たれていた。新規高尿酸血症治療薬フェブキシスタットはキサンチンオキシダーゼインヒビターで、抗酸化作用を有する。自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) マウスに投与したところ有効性が確認され、ヒト MS に対しても有効である可能性が示唆された。

研究目的

多発性硬化症 (MS) の病態に活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が関与しており、ROS の抑制が治療法となることが考えられる。われわれは以前フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンが EAE に有効であることを報告した³⁾。今回、より半減期が長く、しかも経口投与可能なフェブキシスタットが高尿酸血症治療薬として承認され、より強い効果が期待されるため、EAE を利用して効果を検証し、MS の治療薬として使用できるようにすることが目的である。

研究方法

(1) フェブキシスタットは帝人ファーマより供与いただいた。マウスへの投与は蒸留水に溶解し、超音波攪拌後給水ボトルで投与した。培養系実験では 0.01% DMSO 溶液に溶解使用した。

(2) 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の誘導。EAE は、8 週齢雌の SJL/J マウスに、PLP₁₃₉₋₁₅₁ ペプチド 150 µg を完全フロイントアジュバント (CFA) とともに免疫し誘導した。予防的投与群にはフェブキシスタットを 0.75mg/kg/日を免疫 10 日後から実験終了まで投与し、治療的投与群には同量を、免疫 20 日後から実験終了まで投与し、重症度を連日評価した。

1) 大阪大学大学院医学系研究科神経内科学

2) 大阪大学免疫制御学

3) 国立病院機構刀根山病院

(3)組織学的解析。クリニカルピークである免疫 16 日後に脊髄を採取し、HE 染色および抗 iNOS 抗体, 抗 Iba1 抗体, 抗 GFAP 抗体を用いた免疫組織化学染色で炎症細胞浸潤、グリア細胞の活性化の程度を検討した。

(4)細胞培養系における ROS 産生抑制効果の検討。ミクログリア細胞株を用い、細胞内活性酸素は DCFH-DA (Sigma)を用いて、NO は Griess 法にて測定した。

研究結果

(1)EAE の症状抑制効果。フェブキシスタットの経口投与により、EAE の重症度は予防的および治療的に有意に抑制された。また再発抑制効果も示された。

(2)組織学的解析。EAE 脊髄において炎症細胞浸潤が有意に抑制された。免疫組織化学的解析よりフェブキシスタット投与群では GFAP、および Iba1 の免疫反応性が低下しており、グリオーシスが抑制される。また iNOS は主にミクログリアで産生されていたが、iNOS 産生が著明に抑制された。

(3)培養ミクログリアによる ROS、NO の産生はフェブキシスタットの濃度依存性に抑制された。

考察

抗酸化作用を有するキサンチンオキシダーゼインヒビター、フェブキシスタットは MS のモデル動物である EAE に対して有効である。作用機序としてはグリア細胞の活性抑制、ミクログリアによる iNOS、ROS 発現抑制作用から、中枢神経系における抗酸化作用が貢献していることが考えられる。

フェブキシスタットは高尿酸血症治療剤としてすでに安全に使用されている経口薬剤であり、ヒト MS に対する有効性も期待できる。多発性硬化症の治療薬として複数のモノクローナル抗体等新薬が臨床現場で使用できるようになりつつあるが、フェブキシスタットは目立った副作用がなく、安価であり、それらの治療薬と併用できる可能性もあることから、ヒトでの適応拡大は意義が大きいと考える。

結論

キサンチンオキシダーゼインヒビター、フェブキシスタットは EAE において有効である。MS における有効性も期待される。

文献

- 1) Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. J Neurol 251: 261-268, 2004
- 2) Haider L, Fischer MT, Frischer JM et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. Brain 134(7): 1914-1924, 2011