

日本人 CIS 患者における OCB

研究分担者 田中正美¹⁾

共同研究者 大封昌子¹⁾、木下真幸子²⁾、田中恵子³⁾

研究要旨

我々は日本人 MS 患者の疾患活動性が低いこと、欧米では 90% 以上に見いだされるとされる、脳脊髄液中のオリゴクローナル IgG バンド(OCB)の陽性率が 50% 以下であることを報告してきた。最初の中枢神経脱髄病変によると考えられる症状を clinically isolated syndrome (CIS) と呼んでいるが、日本人 CIS 患者では欧米患者に比して脳 MRI 所見が乏しいことも報告してきた。今回は、日本人 CIS 患者での OCB 陽性率の検索と、MS への進展に日本人でも OCB が危険因子になり得るか否かについて検討した。その結果、陽性率は 5/26 例(19.2%)と低率であったが、CIS で OCB が存在している時の MS への進展リスクは、オッズ比 9.0 (95%CI: 1.03-78.58)で、欧米患者と同様に日本人でもリスクとなり得ることが示された。

研究目的

中枢神経の脱髄病変によると思われるエピソードを clinically isolated syndrome (CIS) と呼び、多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)の前段階として注目されている。最近では CIS の段階で近い将来に MS へ進展する危険因子を解析することにより、神経細胞の変性過程が進行していない早期から

の治療が推奨され、診断基準に脳 MRI 所見が採り上げられた。

脳脊髄液(oligoclonal IgG bands: OCB)はその一部はヘルペス系ウイルスと反応するが疾患特異性はない。しかし、CIS 患者での OCB の存在は MS への進展リスクになることが欧州の患者で認められている。

日本人 MS 患者は疾患活動性や障害度が欧米の患者より低く、日本人 CIS 患者の発症時の脳 MRI 所見も病変が乏しく、欧米患者とは病態が異なることが示唆されている。日本人 MS 患者での OCB

¹⁾ NHO 宇多野病院 MS センター

²⁾ NHO 宇多野病院神経内科

³⁾ 金沢医科大学神経内科

陽性率は欧米の患者より低い傾向であり、日本人 CIS 患者での OCB 陽性率および MS への進展率について、欧米での報告と比較した。

研究方法

2006年2月から2012年7月までに宇多野病院をCIS疑いで受診した患者37例を対象とした。経過観察中にリンパ腫や視神経脊髄炎(neuromyelitis optica: NMO)関連疾患と診断された患者を除外し、26例について、8から74ヶ月間経過観察した。

血中の抗アクアポリン4抗体は既報 (Mult Scler 2007; 13: 850-5) のように cell-based assay で、検者は臨床データに関しては blind 状態で金沢医大において検索した。OCB は等電点電気泳動で血中には存在しないバンドが2本以上認められた際に陽性と判断した (測定は三菱化学メディエンスで行った)。

結果

20例はCISのまま、6例がMSへ進展した。3例は発症10, 12, 35ヶ月後に再発し、残りの3例は3, 3, 44ヶ月後に新しい病変が脳MRIで認められた。これら6例のCIS

からMSと診断できた期間は、17.8 ± 17.4ヶ月(中央値: 11.0ヶ月)であった。

OCBが陽性だった5例中3例がMSへ進展した。CISに留まった20例中2例でOCBが陽性であった。MSへ進展した6例中3例でOCBが認められた。MSへ進展した群とCISのまま留まった群との間に有意差はなかったが($p=0.0624$)、OCB陽性CIS患者のMSへの進展リスクは、オッズ比が9.00で95%CIは1.03-78.58であった。

結語

OCB陽性率の低い日本人患者であっても、OCB陽性のCIS患者はMSへ進展するリスクが民族の違いを超えて高い可能性が示唆された。

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

末梢血プラズマブラスト頻度の高い再発寛解型多発性硬化症の病態検討

研究分担者 山村 隆^{1,2)}
共同研究者 ○中村雅一¹⁾, 松岡貴子¹⁾, 荒木 学²⁾, 林 幼偉^{1,2,3)}, 佐藤和貴郎^{1,2)},
岡本智子^{2,3)}, 村田美穂³⁾, 三宅幸子^{1,2,4)}, 荒浪利昌^{1,2)}

研究要旨

再発寛解型多発性硬化症 (RR-MS) における第一選択薬インターフェロン・ベータ (IFN-b) 抵抗性の病態は明らかにされていない。我々は、典型的 RR-MS とは対照的に IFN-b により悪化をきたすことが知られる視神経脊髄炎 (NMO) との病態の類似性を疑った。NMO 病態は抗アクアポリン 4 抗体産生性プラズマブラスト (PB) の介在を特徴とする。実際に、末梢血 PB 頻度の高い RR-MS (PB-high MS) には IFN-b ノンレスポonderが集積しており、PB における遺伝子発現プロファイルは免疫学的に規定され得る RR-MS 亜群であることが示唆された。RR-MS における IFN-b 抵抗性には PB が関与している可能性があり、これらのノンレスポonderの予測に末梢血 PB 頻度測定が有用と推測された。

研究目的

再発寛解型多発性硬化症 (RR-MS) の約 30% は第一選択薬インターフェロン・ベータ (IFN-b) 抵抗性であり、¹ これらの IFN-b ノンレスポonderの判別と治療には難渋することが多い。一方、視神経脊髄炎 (NMO) は IFN-b により増悪する性質があり、^{2,3} RR-MS における IFN-b ノンレスポonderと NMO とは共通の病態を有している可能性が疑われる。我々は、NMO における B 細胞亜群プラズマブラスト (PB) による抗アクアポリン 4 (AQP4) 抗体産生、及び同細胞群の末梢血中での増加を報告した。⁴ そこで、RR-MS 病態における PB の関与について検討することにした。

RR-MS 65 例。全例、血清抗 AQP4 抗体陰性であり、両側視神経炎、または長大脊髄病変の既往例、及び視神経脊髄型の表現型を示す例は除外した。

2) フローサイトメトリー：寛解期末梢血における PB (CD19⁺CD27⁺CD180⁺CD38^{high} 細胞) を解析した。

末梢血 B 細胞における PB の割合を PB 頻度と定義して、健常人 (n=15) の平均 PB 頻度をカットオフ値として対象を PB-low, または PB-high MS に分類した。

3) 遺伝子発現プロファイリング：末梢血より分離した PB の遺伝子発現プロファイルを nCounter[®] (NanoString Technologies) を用いて調べた。

研究方法

1) 対象：2010 年改訂 McDonald 基準⁵ を満たす

(倫理面への配慮)

本研究計画は当センター倫理委員会の承認を受けており、被検者より書面にてインフォームドコンセントを得た。個人情報とは連結可能匿名化された後厳重に保管され、データ発表の際は、個人を特定されないよう細心の注意を払った。

- 1) 国立精神・神経医療研究センター (NCNP) 神経研究所 免疫研究部
- 2) NCNP 病院 多発性硬化症センター
- 3) NCNP 病院 神経内科
- 4) 順天堂大学医学部 免疫学講座

研究結果

- 1) RR-MS 65 例は、PB-low MS 42 例と PB-high MS 23 例とに分類された。
- 2) PB-low MS と PB-high MS との臨床的背景は類似していたが、脳 MRI 上の ovoid lesion 保有率が PB-low MS に比して有意に低かった ($p = 0.0213$)。
- 3) IFN-b 治療歴のある 36 例では、IFN-b ノンレスポンス (n = 17) における PB 頻度は IFN-b レスポンス (n = 19) に比して有意に高かった ($p < 0.05$)。これらの症例を PB-low (n = 23)、または PB-high MS (n = 13) に分類すると、PB-low MS 19 例が IFN-b レスポンスである一方、PB-high MS は全例 IFN-b ノンレスポンスであった ($p < 0.0001$)。
- 4) nCounter[®]解析では、PB-low、及び PB-high MS 由来 PB における免疫関連遺伝子の異なる発現プロファイルを認めた。

考 察

高い末梢血 PB 頻度と IFN-b ノンレスポンスの集積より、PB-high MS 病態における PB の関与が示唆された。同 RR-MS 亜群は、臨床的には IFN-b への反応性の他に、脳 MRI 所見において PB-low MS と異なっており、PB における免疫関連遺伝子発現プロファイルの結果は、その基盤となり得る免疫学的背景の差違を示唆する所見と考えられた。

フローサイトメトリーを用いた末梢血 PB 頻度測定による両 RR-MS 亜群の鑑別は、IFN-b の治療効果予測に有用と推測されるが、より簡便なバイオマーカー測定系の確立が期待される。

結 論

RR-MS における PB 介在性病態は IFN-b 抵抗性に関与している可能性がある。

文 献

1. Sormani MP, et al. Nat Rev Neurol 2013; 9: 504-12.
2. Warabi Y, et al. J Neurol Sci 2007; 252: 57-61.
3. Shimizu Y, et al. J Neurol 2008; 255: 305-7.

4. Chihara N, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108: 3701-6.
5. Polman CH, et al. Ann Neurol 2011; 69: 292-302.

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

全ゲノムコピー数多型解析に基づく脱髄性疾患の新規疾患関連遺伝子の探索

研究分担者 吉良 潤一¹⁾

共同研究者 佐藤 眞也¹⁾、山本 健³⁾、松下 拓也¹⁾、磯部 紀子¹⁾、
飯沼 今日子¹⁾、河野 祐治¹⁾、渡邊 充¹⁾、米川 智¹⁾、眞崎 勝久¹⁾、
吉村 怜¹⁾、山崎 亮²⁾、

The Japan Multiple Sclerosis Genetics Consortium

研究要旨

我々は、多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)と視神経脊髄炎(neuromyelitis optica: NMO)およびNMO関連疾患(NMO spectrum disorder: NMOSD)に関連するコピー数多型(copy number variation: CNV)を明らかにするため、高密度 SNP マイクロアレイを用いて、患者群と健常対照者群との間でゲノムワイドに CNV 相関解析を実施した。Discovery studyにて、MS で約 130 個、NMO/NMOSD で約 240 個の CNV を疾患関連 CNV の候補として絞り込み、さらに別集団を用いた Replication studyにて、MS で約 30 個、NMO/NMOSD で約 20 個の CNV の再現性を確認した。このうち、MS と NMO/NMOSD に共通して、T 細胞受容体(T cell receptor: TCR)アルファ鎖の特定の遺伝子領域に疾患と相関の強い欠失型 CNV を同定し、加えて MS においては TCR ガンマ鎖の特定の遺伝子領域にも相関の強い欠失型 CNV を同定した。さらに、NMO/NMOSD では、上記 CNV を保有する亜群において、保有しない亜群と比較して血清抗アクアポリン 4 抗体が陰性または有意に低力価を示し、Barkhof 基準を満たす脳病巣を有する割合が、当該 CNV を保有する亜群が保有しない亜群と比較して有意に多かった。以上から、特異的な TCR を保有する T 細胞が両疾患の病態に関わっていることが示唆された。

研究目的

コピー数多型(copy number variation: CNV)は、1Kb から 1Mb の幅を有するゲノムの増幅や欠失であり、一塩基多型と同様、表現型や疾患感受性に影響を与える。これまで、統合失調症、自閉症、関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど多くの疾患において疾患関連 CNV が報告されている。一方、中枢神経系炎症性脱髄性疾患については、静脈奇形を伴う多発性

硬化症(multiple sclerosis: MS)や小児 MS 等の限られたゲノム領域を解析した報告があるのみである。本研究の目的は、MS と視神経脊髄炎(neuromyelitis optica: NMO)および NMO 関連疾患(NMO spectrum disorder: NMOSD)の日本人コホートにおいて、全ゲノム領域を対象とした CNV の相関解析を実施し、MS と NMO/NMOSD の疾患関連 CNV を明らかにすることである。

1) 九州大学大学院医学研究院神経内科学

2) 同 大学院医学研究院神経治療学

3) 同 生体防御医学研究所トランスオミクス医学研究センターゲノミクス分野

研究方法

イルミナ社製マイクロアレイ HumanOmniExpress[®]を用いて全ゲノム領域の SNP 遺伝子型解析を行い、各プローブの蛍光シグナル強度をもとに、患者群と健常者群との間で CNV 相関解析を実施した。まず、MS 患者 277 例、NMO/NMOSD 患者 135 例、健常対照者 288 例にて疾患関連 CNV のスクリーニングを行い (Discovery study)、解析の結果、 $p < 0.01$ かつオッズ比 > 1 を満たす CNV について、上記と独立したコホートである MS 患者 296 例、NMO/NMOSD 患者 76 例、健常対照者 790 例にて候補 CNV の再現性を確認し (Replication study)。さらに、同定した疾患関連 CNV と臨床像 (表現型) との関連も検討した。なお、本研究は九州大学医系地区部局ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得て実施された。

研究結果

Discovery study にて、MS で約 130 個、NMO/NMOSD で約 240 個の CNV を疾患関連 CNV の候補として絞り込み、Replication study にて、MS で約 30 個、NMO/NMOSD で約 20 個の CNV の再現性を確認した。このうち、MS と NMO/NMOSD に共通して、T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) アルファ鎖の特定の遺伝子領域に疾患と相関の強い欠失型 CNV を同定し (MS: 17.28%, $p = 1.70E-31$, OR = 13.0; NMO/NMOSD: 13.27%, $p = 5.79E-20$, OR = 54.6)、MS においては TCR ガンマ鎖の特定の遺伝子領域にも相関の強い欠失型 CNV を同定した (16.40%, $p = 2.44E-40$, OR = 52.5)。さらに、

NMO/NMOSD では、上記 CNV を保有する亜群において、保有しない亜群と比較して血清抗アクアポリン 4 抗体が陰性または有意に低力価を示し (ELISA 法, mean \pm SEM: 65.4 \pm 22.7 U/mL vs. 565.4 \pm 195.0 U/mL, $p = 0.0146$)、また、Barkhof 基準を満たす脳病巣を有する割合は、当該 CNV を保有する亜群が保有しない亜群よりも有意に多かった (33.3% vs. 17.2%, $p = 0.0484$)。

考察

同定された CNV の病的意義として、何らかの機序で TCR 遺伝子領域の偏った位置に生じた欠失型 CNV によって、発現する TCR のレパートリーにも偏りが生じ、その中で、自己の中枢神経系抗原に反応性を示す特定の TCR を保有する T 細胞が選択的に増殖、活性化することで MS および NMO の病態に関わっていることが推察された。

結論

ゲノムワイド CNV 相関解析により、MS と NMO/NMOSD に関連する新規の疾患連 CNV を同定した。TCR アルファ鎖遺伝子領域の欠失型 CNV は両疾患に共通する変異であった。同 CNV の結果、発現する特異的な TCR を保有する T 細胞が両疾患の病態に関わっている可能性が示唆された。

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

多発性硬化症の新規画像バイオマーカー¹¹C-酢酸 PET

分担研究者 中辻裕司¹⁾

共同研究者 高田和城¹⁾、奥野龍禎¹⁾、甲田亨¹⁾、オノラ ジョセフ¹⁾、多田智¹⁾、
望月秀樹¹⁾、加藤弘樹²⁾、下瀬川恵久²⁾、畑澤 順²⁾、木下允³⁾、
佐古田三郎⁴⁾

研究要旨

アストロサイトは中枢神経系(CNS)に最も多く存在する細胞であり、様々な中枢神経疾患病態への関与が報告されている¹⁾。多発性硬化症(MS)の病態においてアストロサイトが重要な役割を果たしていることが推測されていたが、これまで生体内での機能については不明であった。そこでアストロサイト特異的に代謝される^{2,3}酢酸をリガンドとした¹¹C-酢酸 PETを用いてMS患者におけるアストロサイト活性を初めて評価した。MS群では健常者群と比較し、白質と灰白質の両領域において有意に¹¹C-酢酸の取り込み上昇を認めた(p<0.01)。またMS群において頭頂葉、側頭葉、後頭葉皮質下白質で有意な上昇を認めた。脳MRI画像との対比では病巣数と¹¹C-酢酸の取り込み(SUV)に有意な相関を認めた。以上の結果から¹¹C-酢酸 PETはMSのアストロサイトを基盤とした病態解明のみならず、補助診断法として有用な新規画像バイオマーカーとなりうる。

研究目的

多発性硬化症(MS)の病理像において、病初期からアストロサイトの形態変化が認められることからアストロサイトが病態に重要な役割を果たしていることが推測されていた。しかしこれまで生体内でのアストロサイト機能を反映するバイオマーカーは存在せず、その機能については不明であった。酢酸はCNSにおいてはアストロサイト選択的に代謝される性質^{2,3}に着目し酢酸をリガンドとして¹¹C-酢酸 PETを

施行することでMS患者におけるアストロサイト活性を評価し、新たな画像バイオマーカーとして確立することを目的とした。

研究方法

1) 対象：大阪大学医学部附属病院通院中の再発寛解型多発性硬化症患者(RR-MS)6名、健常者ボランティア6名。患者6名は全員寛解期にあった。本研究は大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会の承認を受けており、文書にて同意をいただいた。

1) 大阪大学大学院医学系研究科神経内科学

2) 大阪大学核医学

3) 大阪大学免疫制御学

4) 国立病院機構刀根山病院

2) 方法：MRI は 3.0 T スキャナーで T1、T2 強調画像の撮像をおこなった。¹¹C-酢酸は院内で合成を行い、合成された ¹¹C-酢酸は被験者に静脈投与され、PET の撮像をおこなった。¹¹C-酢酸の取り込みは SUV (standardized uptake value) で評価し、関心領域 (volume of interest: VOI) の解析はそれぞれのデータを標準脳と重ね合わせた後に白質、灰白質に分離し、解析を行った。また MRI 画像上の病巣数と SUV との相関も検討した。健常者と MS 群の SUV の比較は Mann-Whitney U test を用いた。

研究結果

MS 群では健常者群と比較し、白質と灰白質の両領域において有意に ¹¹C-酢酸の取り込み (SUV) 上昇を認めた ($p < 0.01$)。白質/灰白質の取り込み比では MS 群 6 例全例において健常者群よりも上昇を認めた ($p < 0.01$)。また視床との取り込み比を検討すると、MS 群において頭頂葉、側頭葉、後頭葉皮質下白質で有意な上昇を認め、tract-based analysis においても上縦束、後視床放線など病変好発部位で取り込みの上昇を認めた。頭部 MRI 病巣との関連では病巣数と ¹¹C-酢酸の取り込みに有意な相関を認め、T1 black hole 数と白質の酢酸取り込みに最も強い相関が見られた ($R^2 = 0.50$, $p < 0.01$)。

考察

MS 脳において白質のみならず、灰白質でも酢酸の取り込みが有意に亢進しており、アストロサイトが活性化されていることが示された。脳 MRI での病巣数と SUV との正の相関は CNS 組織障害・アストログリオーシスを反映していると考えられる。

結論

¹¹C-酢酸 PET は MS のアストロサイトを基盤とした病態の解明のみならず、診断にも有用な新規画像バイオマーカーとなる。

文献

1. Brosnan CF, Raine CS. The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia*. 2013; 61:453-465.
2. Hosoi R, Okada M, Hatazawa J et al. Effect of astrocytic energy metabolism depressant on ¹⁴C-acetate uptake in intact rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004; 24:188-190.
3. Hosoi R, Matsuyama Y, Hirose S et al. Characterization of (¹⁴)C-acetate uptake in cultured rat astrocytes. *Brain Res*. 2009; 1253: 69-73.

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許出願：なし

実用新案登録：なし

アストロサイトの AQP4 蛋白発現を制御する因子の解析

分担研究者 神田 隆

共同研究者 ○大石真莉子, 佐野泰照, 清水文崇, 安部真彰, 前田敏彦, 西原秀昭

研究要旨

【目的】視神経脊髄炎(Neuromyelitis Optica; NMO)病巣ではアストロサイト(AST)に発現するアクアポリン4(AQP4)の脱落が確認され, AQP4 蛋白の減少と液性免疫因子による AST の障害が NMO の初期に生じる重要な病態であると考えられている. 一方, AQP4 の発現を増加させる因子については未解明であり, AST の AQP4 の発現を制御する物質が明らかになれば NMO 治療への応用が期待できる. 今回我々は, AST とともに血液脳関門を構成しているペリサイトや脳微小血管内皮細胞を介した AST の AQP4 蛋白発現制御について検討した. 【方法】当科で樹立したヒトアストロサイト株(hAST), ヒト脳微小血管内皮細胞株(TY09), ヒト脳由来ペリサイト株(HB-PCT)を用い, TY09 と HB-PCT が hAST の AQP4 蛋白の発現に与える影響について検討した. TY-09, HB-PCT それぞれの細胞株と hAST との共培養の実験系(co-culture)と, TY-09, HB-PCT それぞれの培養上清(CM: condition medium)を hAST 株に作用させる実験系の両者を用いて解析した. また対照としてヒト血液神経関門由来の内皮細胞株(FH-BNB)およびペリサイト株(HP-PCT)を用いて同様の実験を行った. 【結果】TY09 と HB-PCT それぞれの細胞株と hAST との共培養系, CM いずれも対照群に比べ AQP4 発現は mRNA および蛋白レベルともに増加していた. 一方で FH-BNB, HP-PCT はいずれも AQP4 の発現に影響を与えなかった. 【結論】血液脳関門由来内皮細胞および脳ペリサイトから放出される液性因子により, AST の AQP4 発現が増加することが示された.

【研究目的】

アストロサイト(AST)に発現するアクアポリン4(AQP4)は中枢神経系における主要な水チャネル蛋白であり, 血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)を構成する AST の足突起に高密度に発現している. 視神経脊髄炎(Neuromyelitis Optica; NMO)病巣では AQP4 の脱落が確認され, AQP4 蛋白の減少と液性免疫因子による AST の障害が NMO の初期に生じる重要な病態であると考えられている¹⁾が, AQP4 の発現を増加させる因子については未解明である. AQP4 は excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2)と astrocyte の細胞膜上で macromolecular complex を形成しており, AQP4 の発現が低下すれば EAAT2 の発現も低下し, 逆に AQP4 の強発現にて EAAT2 の発現が増強することが報告されている²⁾. AQP4 の

発現低下と同時に起こる EAAT2 の低下に伴うグルタミン酸 のホメオスターシスの破綻が NMO の病態に関与していると報告されている. よって, AST の AQP4 の発現を増加させる物質が明らかになれば NMO 治療への応用が期待できる.

BBB では AST の足突起は基底膜を介してペリサイトや脳微小血管内皮細胞と近接しており, この二つの細胞による AST の AQP4 蛋白発現制御を検討した.

【研究方法】

当科で樹立した温度感受性アストロサイト株(hAST), 温度感受性ヒト脳微小血管内皮細胞株(TY09), ヒト BBB 由来ペリサイト株(HB-PCT)を用いた. また, 対照細胞として温度感受性ヒト末梢神経神経内膜内微小血管内皮細胞株(FH-BNB)およびヒト血液神経関門(blood-nerve barrier: BNB)由来ペリサイト株(HP-PCT)を用いた.

- ① 培養上清(Condition Medium: CM)を用いた系:TY09 細胞, FH-BNB, HB-PCTまたはHP-PCT を 3.5cm dish に培養し, confluent になったのちに培養液を新しい DMEM (10%FBS)に交換した. 各々48 時間培養を行った後, 上清を回収したTY09, HB-PCT, FH-BNB, HP-PCT の培養上清(CM)をhAST に作用させた. CM ではなくDMEM(10%FBS)で培養を続けた hAST を対照群とした. 両群を 24 時間培養した後にhAST から mRNA と蛋白の抽出を行い, それぞれの AQP4 発現量について real time-PCR, Western Blot で解析を行った.
- ② 共培養系:コラーゲン塗布した 6-well plate 用セルカルチャーインサートにそれぞれTY09, FH-BNB, HB-PCT, HP-PCT 細胞を播種し, confluent になった後に新しい培養液(DMEM(10%FBS) に置換し, 各々のセルカルチャーインサートを hAST 培養中の 6-well plate に移し共培養群とした. 6-well plate 上で hAST 単独の培養を継続したもの(単独培養群)を対照群とした. 両群を 48 時間培養した後に hAST から mRNA と蛋白の抽出を行い, それぞれの AQP4 発現量について real time-PCR, Western Blot で解析を行った.

(倫理面への配慮)

本研究はヒト脳および末梢神経組織を材料として用いるため, 山口大学医学部倫理委員会による承認を得た上で研究を開始した. 組織提供者に対し十分な説明の後, 同意を得た上で組織を採取した. サンプルの匿名化に配慮し, プライバシーの保全に万全を尽くした.

【研究結果】

- ① TY09 および HB-PCT の CM は対象群に比較してhAST の AQP4 発現を mRNA および蛋白レベルで増加させた. 一方で, FH-BNB および HP-PCT の CM では対照群と差は無

かった.

- ② TY09, HB-PCT との共培養系ではそれぞれ対象群に比較して hASTAQP4 発現は mRNA および蛋白レベルともに増加していた. 一方で, FH-BNB および HP-PCT との共培養では対照群と差は無かった.

【考察】本研究では AST に近接する BBB 構成細胞である BBB 由来内皮細胞およびペリサイトから放出される液性因子により AST の AQP4 発現が増加することが示された.

従来から AST が放出する液性因子が脳微小血管内皮細胞 (EC)のバリア機能を制御することを示す報告は多い. 今回我々が行った解析により, EC から放出される液性因子により AST の AQP4 発現が制御される可能性が示されたことは非常に興味深い. また, 近年ペリサイトが EC のバリア機能に影響を与えることが報告³⁾されたが, AST の遺伝子制御にも深く関与している可能性が示されたことになる. BBB は脳実質組織の水分量を調節するインターフェースであり, AST に最も近い細胞である EC 及びペリサイトが積極的に水の流出入に参加する形で AST を制御している可能性が考えられた. 一方, BBB と同じバリアシステム構成細胞である BNB を構成する FH-BNB および HP-PCT は AST の AQP4 発現に影響を及ぼさなかった. このことは, AST の AQP4 を制御する機構は BBB 由来細胞(BBB 構成内皮細胞, ペリサイト)に固有のものであることを示唆している. 今後, 各細胞培養上清中のサイトカインプロファイルの解析を行うことにより, BBB 由来細胞のみが持つ AQP4 発現を制御する因子を同定する予定である.

【結論】

血液脳関門由来内皮細胞および脳ペリサイトから放出される液性因子により, AST の AQP4 発現が増加することが示された.

- 1) Misu T, Fujihara K, Kakita A, et al. Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. Brain

2007;130:1224-34.

2) Hinson SR, Roemer SF, Lucchinetti CF, Fryer JP, Kryzer TJ, Chamberlain JL, Howe CL, Pittock SJ, Lennon VA. Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2. *J Exp Med.* 2008; 205: 2473-2481.

3) Shimizu F, Sano Y, Saito K, et al.

Pericyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor increase the expression of claudin-5 in the blood-brain barrier and the blood-nerve barrier. *Neurochem Res.* 2012;37:401-9.

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

NMO-IgG による細胞内シグナル伝達系への影響

研究協力者 武藤多津郎¹⁾

共同研究者 朝倉邦彦¹⁾, 植田晃広¹⁾, 島さゆり¹⁾, 松本慎二郎¹⁾, 伊藤信二¹⁾

研究要旨

aquaporin4 (AQP4) の 2 つの isoform、AQP4M1 と AQP4M23 に異なる蛍光色素の標識を付け、AQP4M1 と AQP4M23 を同時に恒常的に発現するアストロサイト細胞株を作製した。この細胞では AQP4 のほとんどが脂質ラフトに局在し、コレステロールのキレート剤である methyl- β -cyclodextrin やコレステロール合成阻害剤である statin の投与により脂質ラフトを障害することにより、AQP4 分子の局在が変化し、NMO-IgG による細胞障害が軽減された。さらに、NMO 患者血清添加により、分子量約 40kDa の蛋白のチロシンリン酸化が亢進し、methyl- β -cyclodextrin 処理で脂質ラフトを減少させることにより、このチロシンリン酸化反応の亢進が消失した。MAPK も同様に NMO 患者血清によりリン酸化が亢進し、methyl- β -cyclodextrin 処理により、このリン酸化亢進反応が消失した。これらの結果から、分子量約 40kDa の蛋白を同定するか、このチロシンリン酸化反応を抑制する薬剤を見出すことにより、NMO-IgG によるアストロサイト細胞障害を軽減させる可能性が示唆された。

研究目的

これまで AQP4 の 2 つの isoform である M1 と M23 を同時に発現する系を作製し、この AQP4 M1/M23 同時発現細胞では、AQP4 のほとんどが脂質ラフトに局在することを明らかにした。さらにコレステロールのキレート剤である methyl- β -cyclodextrin やコレステロール合成阻害剤である statin の投与により脂質ラフトを障害することにより、AQP4 分子の局在が変化し、NMO-IgG による細胞障害が軽減され、脂質ラフトを標的としたアストロサイト障害抑制の可能性が示唆された。本年度は、NMO-IgG の細胞内リン酸化シグナル反応に及ぼす影響を、脂質ラフトに着目して検討した。

研究方法

アストロサイト細胞株に AQP4 M1 と AQP4M23 を同時に発現させた細胞に、正常血清または NMO 患者血清を 2% 濃度で添加し、添加後 0, 5, 10, 15, 30, 60 分後の全細胞蛋白を回収し、抗チロシンリン酸化抗体、抗セリン・スレオニンリン酸化抗体でウエスタンブロットを行い、各リン酸化の変化を調べた。また、細胞内シグナル伝達の下流に存在する MAPK のリン酸化についても検討した。

AQP4 M1/M23 発現細胞を methyl- β -cyclodextrin (2.5mM) で 24 時間処理した後、正常血清または NMO 患者血清を 2% 濃度で添加し、添加後 0, 5, 10, 15, 30, 60 分後の細胞を回収し、抗チロシンリン酸化抗体、抗セリン・スレオニン

¹⁾ 藤田保健衛生大学脳神経内科学講座

リン酸化抗体でウェスタンブロットを行い、各リン酸化の変化を調べるとともに MAPK のリン酸化についても検討した。

研究結果

AQP4 M1/M23 発現細胞に正常血清を添加すると、分子量 40kDa 付近に添加後 5 分からチロシンリン酸化の亢進が認められ、血清添加 30 分後まで持続した。血清添加後 5 分と 10 分での反応が最も顕著であった。NMO 患者血清を加えると、正常血清を加えた場合と同じく分子量 40kDa 付近に添加後 5 分よりチロシンリン酸化亢進が認められ、添加後 60 分程度まで持続し、正常血清を加えた場合よりも強いチロシンリン酸化反応が認められた。一方、AQP4 M1/M23 発現細胞を methyl- β -cyclodextrin で処理し、脂質ラフトを障害した場合、NMO 患者血清添加によるチロシンリン酸化の亢進は減弱し、正常血清との差はなくなっていた。

セリン・スレオニンリン酸化反応は正常血清を添加した場合と NMO 患者血清を添加した場合で差は認められなかった。また、methyl- β -cyclodextrin で前処理した場合も、セリン・スレオニンリン酸化反応に差は認められなかった。

MAPK のリン酸化は、正常血清を添加すると添加後 5 分からリン酸化の亢進が認められ、血清添加 30 分後まで持続した。血清添加後 5 分と 10 分での反応が最も顕著であった。NMO 患者血清を加えると、正常血清を加えた場合と同じく添加後 5 分よりリン酸化の亢進が認められ、添加後 60 分まで持続し、正常血清を加えた場合よりも強いリン酸化反応が認められた。

methyl- β -cyclodextrin で処理した場合、NMO 患者血清添加によるリン酸化の亢進は減弱し、正

常血清との差は消失していた。

考察

NMO 患者血清により AQP4 M1/M23 発現細胞で、分子量約 40kDa の蛋白のチロシンリン酸化が亢進し、methyl- β -cyclodextrin 処理で脂質ラフトを減少させることにより、このチロシンリン酸化反応の亢進が消失した。MAPK も同様に NMO 患者血清によりリン酸化が亢進し、methyl- β -cyclodextrin 処理により、このリン酸化亢進反応が消失した。これらの結果から、分子量約 40kDa の蛋白を同定するか、このチロシンリン酸化反応を抑制する薬剤を見出すことにより、NMO-IgG によるアストロサイト細胞障害を軽減させる可能性が示唆された。

結論

NMO 患者血清により分子量約 40kDa の蛋白のチロシンリン酸化が亢進し、脂質ラフトを減少させることにより、この亢進が消失した。MAPK も同様に NMO 患者血清によりリン酸化が亢進し、methyl- β -cyclodextrin 処理により、このリン酸化亢進反応が消失した。このリン酸化反応が NMO-IgG による病態発現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

中枢神経系の自己免疫発現における GM-CSF の役割

分担研究者 錫村 明生¹⁾

共同研究者 竹内 英之¹⁾、菌部 佳史¹⁾、Bijay Parajuli¹⁾、堀内 浩¹⁾、金 世杰¹⁾、川ノ口 潤¹⁾、水野 哲也¹⁾

研究要旨

Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)を産生するヘルパーT細胞が多発性硬化症の動物モデルである Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)を発症させるのに重要な役割を果たすことが報告されているが、詳細な EAE 誘導機序は不明である。

昨年までに我々は、中枢神経系内における主要な GM-CSF 受容体発現細胞はミクログリアであること、GM-CSF はミクログリアの抗原提示能や貪食能を促進し、樹状細胞様に分化誘導することを報告した。本研究では、GM-CSF によるミクログリアの神経傷害作用への影響について検討した。その結果、GM-CSF はミクログリアの NADPH オキシダーゼ Nox2 の活性化させて Reactive oxygen species (ROS) 産生を増強した。また、GM-CSF 産生ヘルパーT細胞のみでは神経傷害作用を示さないのに対して、GM-CSF 産生ヘルパーT細胞とミクログリアの共培養下では有意な神経傷害作用を呈し、その作用は GM-CSF 中和抗体および ROS スカベンジャーの投与により抑制された。これらの結果から、GM-CSF 産生ヘルパーT細胞はミクログリアの ROS 産生を介して間接的に神経傷害作用を発揮すると考えられた。

研究目的

Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) は約 23kD の糖タンパクであり、骨髄の顆粒球やマクロファージ前駆細胞の分化促進・分化後の単球・マクロファージの機能増強などの機能を持つ。GM-CSF ノックアウトマウスへの Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 感作や GM-CSF ノックアウトマウス由来の MOG 反応性 CD4 陽性 T 細胞のナイーブマウスへの移入は、とも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) を惹起し得ないことが報告されている。また、IFN- γ 産生性の Th1 や IL-17A 産生性の Th17 よりもむしろ GM-CSF を産生するヘルパーT細胞が EAE の誘導に不可欠であることも報告されている。しかし、その機序に関しては不明な点が多い。昨年までに我々は、中枢神経系内における主要な GM-CSF 受容体発現細胞はミクログリアであること、GM-CSF はミクログリアの抗原提示能や貪食能を促進し、樹状細胞様に分化誘導することを報告した。本研究では、さら

1)名古屋大学環境医学研究所神経免疫学

に、GM-CSF によるミクログリアの神経傷害作用への影響について検討した。

研究方法

全ての動物実験は名古屋大学動物実験委員会の承認を得て行われた。初代培養大脳皮質ニューロンは胎生 17 日目の C57BL/6J 胎仔より分離した。初代培養ミクログリアは C57BL/6J 新生仔由来の混合グリア培養から shaking off 法により単離した。8 週齢メスの C57BL/6J マウスを用いて MOG₃₅₋₅₅ ペプチド誘導性 EAE を作成し、MOG 感作 10 日目で脾臓細胞を単離し、MOG₃₅₋₅₅ ペプチドでの再刺激を TGF- β + IL-6 存在下あるいは IL-23 存在下で 5 日間した後、各々 GM-CSF 陰性 Th17 および GM-CSF 産生性 Th17 を単離した。培養上清中のサイトカイン濃度は ELISA により測定した。さらに、8 週齢メスの C57BL/6J マウスへ単離した CD4 陽性細胞の養子移入を行った際の EAE 誘導について評価した。初代培養ミクログリアをリコンビナント GM-CSF (20 ng/ml) で刺激し、NADPH オキシダーゼ Nox2 の活性化は細胞質サブユニット p47 phox・p67 phox のリン酸化にて検討した。ROS 産生は CellRox 蛍光染色にて解析した。神経細胞傷害については、CD4 陽性 T 細胞、ミクログリアおよび神経細胞の共培養系で評価した。

研究結果

GM-CSF 刺激によりミクログリアの NADPH oxidase Nox2 の活性化が生じ、ROS 産生が増加した。GM-CSF 産生性 Th17 のみでは神経傷害作用を示さないのに対して、GM-CSF 産生

性 Th17 とミクログリアの共培養下では有意な神経傷害作用を呈し、その作用は GM-CSF 中和抗体および ROS スカベンジャーの投与により抑制された。

考察

GM-CSF は中枢神経系内でミクログリアに以下のように多面的に作用する。1. 樹状細胞様の抗原提示細胞へ分化誘導させ、T 細胞を活性化する。2. CCL2 の産生を介してマクロファージの中枢神経系への浸潤を促進する。3. 貪食能や ROS 産生を増強させ、組織傷害を助長する。これらの作用によって、本来は免疫学的特権部位である中枢神経系内において様々な免疫反応を惹起するトリガーとなっている可能性が示唆される。また、GM-CSF 産生 Th17 がエフェクター細胞として組織を傷害するというこれまでの仮説とは異なり、GM-CSF 産生 Th17 はミクログリアの ROS 産生増強を介して間接的に神経傷害作用を発揮すると考えられた。

結論

GM-CSF で刺激されたミクログリアは様々な免疫反応を誘導することで、中枢神経系における免疫反応の中心的な役割を担い得る。GM-CSF で活性化されたミクログリアを標的とした治療戦略は、多発性硬化症をはじめとする免疫性神経疾患の治療において有望である可能性が示唆された。

健康危険情報：なし

知的財産権の出願・登録状況：なし

実用新案登録：なし

CCL11 potentiates glutamate mediated neurotoxicity via microglial reactive oxygen species production.

分担研究者 錫村 明生¹⁾

共同研究者 Bijay Parajuli¹⁾、竹内 英之¹⁾、菌部 佳史¹⁾、堀内 浩¹⁾、金 世杰¹⁾、川ノ口 潤¹⁾、水野 哲也¹⁾

研究要旨

Chemokines are small molecules secreted by various types of cells. They act through the shared and specific receptors that belong to a superfamily of G protein-coupled receptors. Chemokines induce cell migration during development, immune surveillance, and inflammation. Therefore, they play important roles in development and maintenance of the central nervous system (CNS).

CCL11 (eotaxin) is a chemokine that acts by binding with CCR2, CCR3, and CCR5. CCL11 is reported to decrease neurogenesis. Previous studies have reported that the concentration of CCL11 in the cerebrospinal fluid was elevated in neurologic disorders including atopic myelitis and Alzheimer's disease. However, it remains uncertain which cell produces CCL11 and how CCL11 functions in the CNS.

研究目的

To elucidate whether CCL11 is produced by cells in the CNS and its function in the CNS.

研究方法

Protocols for animal experiments were approved by the Animal Experiment Committee of Nagoya University. Primary cerebral cortical neurons were isolated from embryonic day 17 C57BL/6J embryos. Astrocytes and microglia were prepared from newborn C57BL/6J mice. The expression level

of CCL11 was assessed by quantitative PCR and specific ELISA in microglia, astrocytes and neurons treated with lipopolysaccharide. The expression levels of CCL11 receptors were examined by Western blotting. The neurotoxic effect of CCL11-treated microglia was evaluated with the co-culture system of neuron and microglia. The production of reactive oxygen species (ROS) was analyzed with the ROS indicator CellRox staining.

研究結果

CCL11 was produced by astrocytes in the CNS when stimulated with

¹⁾ 名古屋大学環境医学研究所神経免疫分野

pro-inflammatory mediators like LPS, TNF- α , IL-1 β . CCL11 receptors (CCR3 and CCR5) were expressed in microglia. CCL11 dose-dependently induced microglial migration and this CCL11 dependent microglial migration is inhibited by GPCR receptor antagonist pertussis toxin. CCL11 induced microglial ROS production via upregulation of NADPH oxidase 1 and potentiated glutamate-induced neurotoxicity.

考察

CCL11 which is upregulated in various neurological disorders like atopic myelitis, neuromyelitis optica can be produced by astrocytes in the CNS. This astrocytes produced CCL11 can induce migration of inflammatory cells like microglia as well as increase neurotoxicity via production of ROS. CCL11 may be a potential therapeutic target for treatment of neurologic disorders associated with glial

activation.

結論

In this report, we have shown that astrocytes produce CCL11 when stimulated with pro-inflammatory mediators. We further showed that CCL11 enhances glutamate induced excitotoxicity via microglial ROS.

文献

Tanaka M, Matsushita T, Tateishi T, Ochi H, Kawano Y, Mei FJ, Minohara M, Murai H, Kira JI. **Distinct CSF cytokine/chemokine profiles in atopic myelitis and other causes of myelitis.** Neurology. 2008;71(13):974-81.

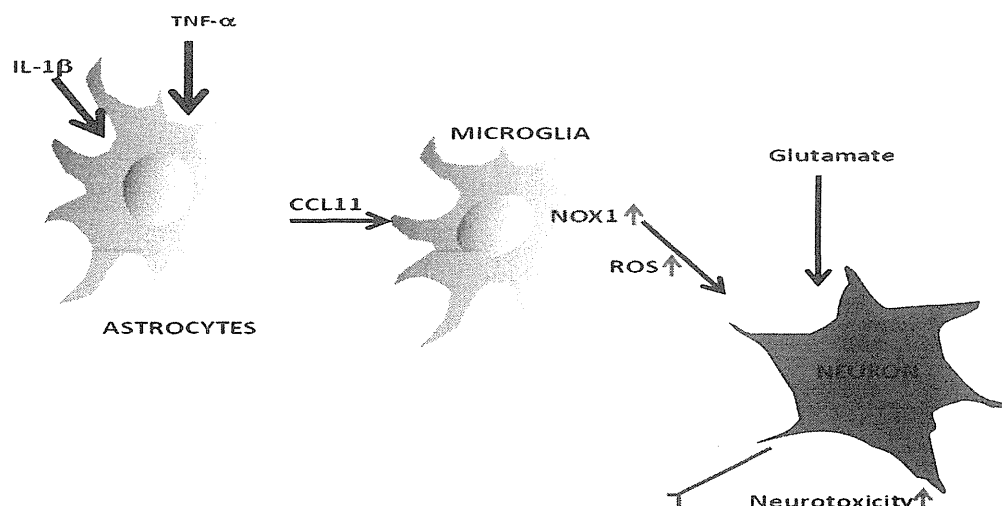
健康危険情報

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



Sema4A の IFN- β 治療効果阻害作用の EAE を用いた解析

分担研究者 中辻裕司¹⁾

共同研究者 甲田亨¹⁾、奥野龍禎¹⁾、高田和城¹⁾、オノラ ジョセフ¹⁾、多田智¹⁾、
望月秀樹¹⁾、木下允²⁾、熊ノ郷淳³⁾、佐古田三郎⁴⁾

研究要旨

再発寛解型多発性硬化症 (RRMS) 患者の一部では血清 Sema4A が著明高値を示し、この高値群の多くは IFN- β 治療抵抗性を示す¹⁾。今回、MS のモデル動物である実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を用いて Sema4A と IFN- β 治療抵抗性の相関について検証した。EAE は IFN- β 治療により軽症化するが、リコンビナント Sema4A を投与した Sema4A 高値 EAE 群では IFN- β による治療効果が打ち消された。この機序として Sema4A が IFN- β 治療下でも Th1、Th17 の分化を促進すること、および T 細胞の内皮への接着を促進することが示された。本研究によりヒトで認められた Sema4A 高値群の IFN- β 治療抵抗性がモデル動物においても再確認された。以上の結果は Sema4A が、Sema4A 高値 MS 患者には IFN- β 以外の治療を初期から選択すべきであるという治療選択のバイオマーカーであることを支持するものである。

研究目的

我々は先行研究で、クラス IV セマフォリン Sema4A が RRMS 患者血清において有意に増加し、さらに IFN- β 治療により Sema4A 高値群は低値群に比べ明らかに重症度が進行する、つまり Sema4A 高値患者には IFN- β が無効、あるいは逆に増悪を助長することを報告した¹⁾。このことから Sema4A 高値 MS 患者の治療については従来の第一選択治療薬である IFN- β 療法が適切でないことが考えられる。これまで Sema4A が IFN- β 治療に直接影響を与えるエビデンスはなく、我々は今回 MS のモデル動物 EAE

を利用してリコンビナント Sema4A の IFN- β 治療に及ぼす影響を検証した。

研究方法

・EAE は、C57BL/6 マウスに、MOG₃₅₋₅₅ ペプチドで免疫し誘導した。①コントロール群、②IFN- β -1b 治療群、③Sema4A 投与群、④IFN- β -1b 治療 + Sema4A 投与群の 4 群に分け検証した。IFN- β は免疫時より 1×10^4 単位を 10 日目まで隔日腹腔内投与し、リコンビナント Sema4A Fc を免疫後 0、1、3、5、7、10 日目に 20 μ g 静脈内投与した。
・臨床症状の評価と MOG 特異的 T 細胞のサイトカイン産生評価。免疫後 6 日目に所属

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) 大阪大学呼吸器・免疫アレルギー内科学

4) 国立病院機構刀根山病院

リンパ節より CD4 陽性 T 細胞を採取し MOG による再刺激を行い培養上清中の IFN- γ 、IL-17 を ELISA を用いて測定した。

・接着アッセイ：マウス脳血管内皮細胞株 bEnd. 3 をリコンビナント Sema4A Fc、IFN- β もしくはその両方で刺激し、その細胞層上に蛍光ラベルした T 細胞をおき、T 細胞の内皮への接着を評価した。

研究結果

(1) IFN- β 治療にて EAE の重症度は軽症化するが、IFN- β 治療に Sema4A Fc 投与を行うと、IFN- β の治療効果が打ち消された、あるいはむしろ症状が増悪し、Sema4A が IFN- β の治療効果を打ち消すことが明らかとなった。

(2) IFN- β 治療群では MOG 特異的 T 細胞からの IFN- γ 、IL-17 の産生は抑制されるが、Sema4AFc 投与によりその効果は打ち消された。

(3) 血管内皮細胞 bEnd. 3 をリコンビナント Sema4A で刺激すると T 細胞の内皮への接着が亢進した。

考察

Sema4A 高値 MS 患者は IFN- β 治療抵抗性であることをこれまで報告していたが、今回の研究により動物実験でも Sema4A により IFN- β 治療抵抗性が誘導されることが

裏付けられた。その機序として Sema4A が IFN- β 存在下でも Th1、Th17 分化を促進することや、細胞接着因子の発現を更新することから T 細胞の血液脳関門の透過性を更新させることが推測された。

結論

Sema4A 高値 MS 患者は IFN- β 治療抵抗性であることがモデル動物でも確認された。Sema4A は、高値患者には IFN- β 以外の治療法を選択すべきであるという治療選択のバイオマーカーである。

文献

- 1) Nakatsuji Y, Okuno T et al. Elevation of Sema4A implicates Th cell skewing and the efficacy of IFN- β therapy in multiple sclerosis. *Journal of Immunology* 188: 4858-65, 2012

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許出願：なし

実用新案登録：

TBP-2 ノックアウトマウスでは実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)が軽症化する

班 員 松井 真¹⁾

共同研究者 富岳 亮¹⁾、帆足福子¹⁾、長山成美¹⁾、増谷 弘²⁾

研究要旨

Thioredoxin は抗酸化ストレス作用のある蛋白で、Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) はその thioredoxin の負の調節因子である。TBP-2KO マウス由来の樹状細胞は、T細胞の反応を誘導する能力は Wild type に比べて低下している。今回、我々は実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)をTBP-2 Knock out mouse(TBP-2KO)に発症させ、TBP-2KOのEAEに対する影響を検討した。雌6匹ならびに雄7匹のTBP-2KOは各々のコントロールと比べEAEの症状において有意な抑制効果を認めた。今後Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞などの末梢血リンパ球サブセットならびにサイトカインと抗原提示細胞も含めた病理所見を検討し、TBP-2が免疫機構にどのように作用しているか解明して多発性硬化症の新たな治療薬への可能性について検討する。

研究目的

Thioredoxin は抗酸化ストレス作用のある蛋白で、Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) はその thioredoxin の負の調節因子であることが解っている。TBP-2KO マウス由来の樹状細胞は、同レベルのMHCclass II抗原を表現するにもかかわらずT細胞の反応を誘導する能力は wild type と比べて低下していることも判明している。

我々は多発性硬化症の動物モデルであるEAEをTBP-2KOとC57BL/6Jに発症させ、その臨床スコアを経時的に比較し、TBP-2KOのEAEに対する影響を検討している。TBP-2KOは繁殖力が弱く、一度に比較実験を行う匹数を確保することが困難である。パイロット研究では、雄4匹のTBP-2KOでEAEの抑制を示した。今回は比較的多数のTBP-2KOを得たのでEAEの軽症化効果を検証した。

方法

C57BL/6J および C57BL/6 の近交系で作製された TBP-2KO マウスを交配し myelin oligodendrocyte glycoprotein

(MOG)35-55 peptide を用いて EAE を作成した。今回は雄7匹と雌6匹の TBP-2KO を得たので EAE の軽症化効果を検証した。対照として、雄雌各々同数の C57BL/6J に MOG 35-55peptide を使用し EAE コントロール群を作成し、TBP-2KO と C57BL/6J による EAE の臨床スコアを経時的に比較検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、金沢医科大学実験動物委員会の承認を得て行われた。

結果

雄の C57BL/6J ならびに TBP-2KO を用いた EAE の臨床スコアの平均値の推移は、C57BL/6J(コントロール)では約10日で発症し14日で2.2に達し、20日で2.5前後を維持したのに対し、TBP-2KOでは10日で発症し15日で1.5に達し35日以降は1.25であった(図1)。

雌の C57BL/6J ならびに TBP-2KO の EAE における臨床スコアは、C57BL/6J(コントロール)では10日で発症し14日で0.5、22日には3.0、28日に2.5と軽減したが、35日で再び2.9に達した。TBP-2KOは14日で発症し、21日で1.0、39日には1.5と徐々に増悪した(図2)。

1) 金沢医科大学神経内科学

2) 京都大学ウイルス研究所感染防御