

12月10日、2014

37) Kadowaki A, Miyake S, Chiba A, Saga R, Yamamura T. Regulation of organ specific autoimmunity by gut resident T cells. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 京都 12月10日、2014

38) Lin Y, Miyake S, Yamamura T: Inverse vaccination for autoimmune diseases by sensitization of superior dominant peptide through efficient induction of functionally stable regulatory T cells possessing high antigen-specificity. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 京都 12月10日、2014

39) CHIBA Asako, TAMURA Naoto, TAKASAKI Yoshinari, Miyake Sachiko: Involvement of MAIT cells in human autoimmune diseases. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 京都 12月10日、2014

40) NAKAJIMA Akihito, NEGISHI Naoko, TSURUI Hiromichi, NANNÔ Masanobu, YAGITA Hideo, OKUMURA Ko, Miyake Sachiko, HABU Sonoko: Commensal bacteria regulate thymic Aire expression. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 京都 12月10日、2014

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- 1) GM-CSF 産生 T 細胞抑制剤、及び Th1/Th2 免疫バランス調整剤 (特願 2014-99587)
- 2) NKT 細胞活性化に伴う選択的 IL-4 産生誘導活性の評価方法 (特願 2014-104272)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

慢性炎症性脱髄性多発神経炎の病態と治療に関する研究

研究分担者 佐藤和貴郎 (独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 室長

研究要旨

慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)は、ヘルパーT細胞(Th細胞)の関与が想定される神経難病である。T細胞のケモカイン受容体の発現に着目し、Th細胞サブセットの病態への関与を調べた結果、CCR5+CCR6+Th細胞が末梢血で減少し髄液に集積していること、機能解析および遺伝子発現解析から同細胞が病原性Th17細胞の特徴をもつことを見出した。またMucosal associated invariant T(MAIT)細胞などの自然リンパ球について解析を行い、MAIT細胞およびiNKT細胞の頻度減少を認めた。診断や治療への応用へ向け更なる検討が必要である。

A. 研究目的

慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)は、運動、感覚障害を呈する末梢神経の神経難病である。1)インターフェロン γ (IFN γ)を産生するTh1細胞やインターロイキン17

(IL-17)を産生するTh17細胞の関与が指摘されている。各Th細胞は特徴的なケモカイン受容体を発現するため、ケモカイン受容体の発現パターンを調べCIDPにおけるTh細胞の役割を解明することを目的とする。2)MAIT細胞やiNKT細胞は、CIDP患者の末梢神経に存在しており(Zilles 2003)、自然リンパ球のCIDPへの関わりが示唆され検討を行った。

B. 研究方法

年齢性別をマッチさせた健常者とCIDP患者、多発性硬化症(MS)患者の末梢血を用い、1)代表的な炎症性ケモカイン受容体(CXCR3、CCR4、CCR5、CCR6)の共発現パターン、2)疾患の関連するCCR5+CCR6+分画の機能解析・遺伝子発現解析、3)薬剤抵抗性と関連するP糖蛋白質の発現、4)患者血清中の多種類のサイトカイン・神経栄養因子の濃度測定、5)MAIT細胞などの自然リンパ球の頻度

を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は、NCNP倫理委員会にて承認を得て行われ、被験者にはインフォームド・コンセントを得ている。

C. 研究結果

1)CCR5+CCR6+Th細胞(以下5+6+細胞)の頻度は健常者やMS患者と比較し有意に($p < 0.05$)減少していた。細胞表面CCR5陰性・細胞内CCR5陽性細胞の存在が見いだされた。5+6+細胞は髄液中に集積していた。2)5+6+細胞はIFN γ とIL-17の両者を産生し、病原性Th17細胞として知られる遺伝子発現パターンを示した。3)5+6+細胞は、P糖蛋白質を発現する細胞を高頻度を含む。4)患者血清中のIL-7、IL-4、IL-13、VEGF、PDGFが有意に増加していた。CCR5のリガンドであるRANTES(CCL5)も一部の患者で高い傾向を認めた。5)患者末梢血中のMAIT細胞の頻度が健常者と比べ有意に低下($p < 0.05$)、またiNKT細胞とMAIT細胞の頻度は活動性を有する患者で低い傾向を認めた。

D. 考察

CIDP患者末梢血におけるCCR5+CCR6+Th細胞

の減少のメカニズムとして、1) ケモカイン刺激などで活性化しCCR5が細胞内へ内在化した、2) 病変部へ移行した、可能性が考えられる。同細胞は免疫抑制治療に対する抵抗性を有する細胞である可能性がある。MAIT細胞やiNKT細胞の疾患や活動性との関連は他の自己免疫疾患と共通するメカニズムを示唆する。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

E. 結論

CIDPでは、CCR5+CCR6+Th細胞が病原性Th17細胞として、またMAIT細胞やiNKT細胞も病態に関与している

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 佐藤和貴郎 慢性炎症性脱髄性神経炎 (CIDP)におけるT細胞ケモカイン受容体の解析 *Peripheral Nerve* 25(2), 238-242, 2014
2. 佐藤和貴郎 多発性硬化症における脳脊髄液T細胞ケモカイン受容体解析 *Jpn. J. Clin. Immunol* 37(2), 83-89, 2014
3. Wakiro Sato Chemokine receptors on T cells in multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 5(2), 162-174, 2014
4. Wakiro Sato et al. CCR2+CCR5+ T Cells Producing Matrix Metalloproteinase-9 and Osteopontin in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *J. of Immunol* 189: 5057-5065, 2012

2. 学会発表

1. 佐藤和貴郎 CIDPにおけるT細胞ケモカイン受容体の解析 シンポジウム4「免疫介在性末梢神経障害の診断と治療」第25回日本末梢神経学会, 京都, 8.30, 2014
2. Wakiro Sato et al chemokine receptor expressions on T cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy Mainz, 11, 12, 2014

多発性硬化症発症の分子メカニズムを探る

研究分担者 佐藤 準一 明治薬科大学薬学部バイオインフォマティクス教授

研究要旨 多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は中枢神経系白質に炎症性脱髄巣が多発し、様々な神経症状が再発を繰り返して進行する難病である。遺伝的要因(遺伝因子)と環境的要因(感染因子と環境因子)の複雑な相互作用により発症が誘導される。MSでは髄鞘自己抗原反応性ヘルパーT細胞(Th1, Th17)が血液脳関門を通過して脳・脊髄に浸潤し、マクロファージやミクログリアを活性化し、エフェクター細胞が産生する炎症性サイトカインが脱髄(demyelination)と軸索傷害(axonal damage)を惹起する。しかしながら詳細な分子メカニズムは未だ明らかではない。環境的要因としては、ビタミンD欠乏やEBウイルス(Epstein-Barr virus; EBV)の感染とMS発症のリスクが論じられている。また病理学的な観点からはMS類似の炎症性脱髄巣を呈する那須ハコラ病(Nasu-Hakola disease; NHD)との比較が重要である。本研究では、バイオインフォマティクスの研究手法を駆使して、ビタミンD、EBウイルス、NHDをキーワードとしてMS発症の分子メカニズムを探索した。その結果MS発症と関連するビタミンD受容体標的遺伝子、EBNA1標的遺伝子、NHDとMSのオリゴデンドロサイトオートファジーの相違を明らかにすることが出来た。

A. 研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)は、中枢神経系白質に炎症性脱髄巣が多発して再発を繰り返す難病で、若年成人に好発する。近年日本では患者数は増加傾向にある。MSは遺伝因子・感染因子・環境因子の複雑な相互作用により発症が規定されている。MSでは髄鞘自己抗原反応性ヘルパーT細胞(Th1, Th17)が出現し、血液脳関門を通過して脳・脊髄に浸潤し、マクロファージやミクログリアを活

性化し、エフェクター細胞が産生する炎症性サイトカイン(TNF)と活性酸素(reactive oxygen species; ROS)が脱髄と軸索傷害を早期から惹起する。現在臨床ではIFN β , FTY720などの免疫調節薬が投与されているが難治例も多く、新規標的分子に対する画期的な創薬が待望されている。

MS有病率の人種差は顕著であり、白人で最も高く、北欧の有病率は10万人対50-100人程度であり、アジア人やアフリカ人では低く、

欧米でも有色人種では低い。日照時間の短い高緯度地域ほど、MS 有病率が上昇する。北緯 42°以北および南緯 37°以南では、MS 発症リスクが 3 倍上昇する。最近の大規模メタ解析では、HLA-DRB1 アレルの分布差を補正後にも、緯度と有病率の相関が再現性された。米軍兵 700 万人の血清ビタミン D 濃度と MS 発症の因果関係に関する前向き研究より、ビタミン D は MS 発症抑制因子として働くことが示唆されている。活性型ビタミン D(calcitriol)は、核内受容体 VDR に結合し、RXR とヘテロダイマーを形成して、標的遺伝子プロモーター上の応答配列(vitamin D response element; VDRE)に結合し、標的遺伝子の転写を活性化して、免疫調節作用など多彩な生理活性を呈する遺伝子群の転写を活性化する。しかしながら MS 発症に関与する VDR 標的遺伝子群は明らかではない。

EBV の慢性持続感染は、MS 発症率を数倍高める。EBV nuclear antigen 1(EBNA1)は、EBV ゲノムのエピゾーマルな維持と複製に必須なタンパク質で、EBV の潜伏感染で中心的な役割を果たしている。EBNA1 は EBV ゲノムの遺伝子発現のみならず、宿主ゲノムの遺伝子発現も制御する転写因子として働く。抗 EBNA1 抗体の上昇は clinically isolated syndrome(CIS)から MS への移行を予測する指標となる。しかしながら MS 発症に直接関与する EBNA1 標的遺伝子群は明らかでない。

那須ハコラ病(NHD)は、1970 年代初頭に那須毅博士と Hakola 博士により同時期に発見された稀少疾患であり、日本とフィンランドに集積し、DAP12 遺伝子または TREM2 遺伝子の機能喪失変異で発症し常染色体劣性遺伝形式を呈する。TREM2 と DAP12 は破骨細胞・樹状細胞・マクロファージ・ミクログリアの細胞表面上に発現し、受容体・アダプター複合体を形成し、下流に位置する非受容体型チロシンキナーゼ Syk リン酸化を介してシグナルを伝達する。TREM2 はアポトーシスに陥った神経細胞の phagocytic receptor として働くが、内在性リガンドは未だ同定されていない。NHD 脳は MS 様の広汎な脱髄、アストログリオシスとミクログリア活性化、軸索腫大とスフェロイド形成を呈するが分子機序は明らかでない。

2003 年に、ヒトゲノム全塩基配列の解読が完了し、マイクロアレイを用いて個々の細胞における全遺伝子発現情報や多型情報を網羅的に解析出来るようになった。最近では、次世代シーケンサー(NGS)を用いて、個人の全ゲノムやエクソームを数日で解析出来るようになった。

本研究では、バイオインフォマティクスの研究手法を駆使して、ビタミン D、EB ウイルス、NHD をキーワードとして MS 発症の分子メカニズムを探索した。本研究の成果は MS 発症機構解明に貢献し、厚生労働行政を主導とする患者の QOL 向上につながる。

B. 研究方法

1. VDR ChIP-Seq データ解析

VDR ChIP-Seq データ SRP002673, SRP005910 を Bowtie と MACS で再解析し、ゲノムワイド VDR 標的遺伝子を同定した。また KEGG, KeyMolnet, Ingenuity Pathways Analysis を用いて、VDR 標的遺伝子の分子ネットワークを解析した。

2. EBNA1 ChIP-Seq データ解析

EBNA1 ChIP-Seq データ SRP015132 を Bowtie と MACS で再解析し、ゲノムワイド EBNA1 標的遺伝子を同定した。また KeyMolnet, Ingenuity Pathways Analysis を用いて、EBNA1 標的遺伝子の分子ネットワークを解析した。

3. 免疫組織化学的解析

MS(n =4), normal control(NC; n =4), myotonic dystrophy(n = 4), NHD(n = 5, among them, 3 with 141delG in exon 3 of DAP12)の 大脳皮質・海馬・基底核のホルマリン固定パラフィン切片を用いて、抗 LC3, BECN1, NBR1, HDAC6, p62, ubiquitin, UBQLN1 抗体で免疫組織化学的に解析した。

(倫理面への配慮)

データ解析に関して、全て公開された公共データであり、使用に当たり倫理的な問題はない。脳組織は脳バンク Research Resource

Network(RRN)を介して提供された、文書で研究使用に関するインフォームドコンセントを取得したサンプルであり、倫理的問題はない。本研究は国立精神・神経医療研究センターと明治薬科大学の倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

1. VDR 標的遺伝子と分子ネットワークの解析

全部で 4717 ChIP-Seq peaks を検出し、hexameric (G/A)G(G/T)TCA repeat with 3 intervening base pairs (DR3)モチーフを同定した。Calcitriol 投与で 134 遺伝子が発現上昇し、29 遺伝子(20%)が ChIP-Seq の VDR 標的遺伝子と一致した。重複および calcitriol 未刺激で検出された遺伝子を除去した 1543 遺伝子を抽出し、分子ネットワークを解析した。KEGG では leukocyte transendothelial migration (hsa04670; p = 1.17E-04), Fc gamma (Fcy) receptor-mediated phagocytosis (hsa04666; p = 2.39E-03)との関連性を認めた。IPA では Fcy receptor-mediated phagocytosis in macrophages and monocytes (p = 6.85E-07), との関連性を認めた。

2. EBNA1 標的遺伝子と分子ネットワークの解析

全部で 418 ChIP-Seq peaks を検出し、EBNA1 結合部位の consensus sequence motif 5'[G/A]GG[T/C]AG[C/T/G]A[T/A][G/A]TGC T[G/A]CCC[A/G]3'を同定した。そのうち 228

EBNA1 標的遺伝子の分子ネットワーク解析を行った。IPA では “Nutritional Disease, Cell Death and Survival, Cellular Development” ($p = 1.00E-67$),との関連性を認めた。KeyMolnet では、“transcriptional regulation by IRF” ($p = 1.97E-80$), “transcriptional regulation by STAT” ($p = 1.51E-68$)との関連性を認めた。

3. MS 脱髄巣マクロファージ・ミクログリアと NHD 脱髄巣残存オリゴデンドロサイトにおける LC3 の高発現

MS 活動性脱髄巣辺縁部に集積している Iba1 陽性マクロファージ・ミクログリアが LC3 を高発現していたが、反応性アストロサイトは発現していなかった。脱髄巣に残存するオリゴデンドロサイトおよび正常様白質(NAWM)のオリゴデンドロサイトも LC3 を発現していなかった。

NHD では脱髄巣に残存している多数の Nogo-A 陽性オリゴデンドロサイトが LC3 を高発現していたが、アストロサイトは発現していなかった。少数の Iba1 陽性ミクログリアでも LC3 の発現を認めた。一方大多数の神経細胞では LC3 の構成的な発現を認めた。NHD 白質に散見されるスフェロイドは抗 LC3 抗体で染色された。LC3 陽性オリゴデンドロサイトは、BECN1, p62, cleaved caspae-3 陰性、NBR1 弱陽性、HDAC6 陽性を示した。

D. 考察

はじめに ChIP-Seq データをバイオインフォ

マティクスの手法を駆使して再解析し、1543 VDR 標的遺伝子を同定出来た。分子ネットワーク解析では、主要なネットワークとして免疫寛容と密接に関連する leukocyte transendothelial migration, Fcg receptor-mediated phagocytosis を検出した。ビタミン D は、活性化 T 細胞のアポトーシスや単球の脳への移入の阻止を介して、MS モデル EAE の症状を軽減する。ビタミン D 欠乏は MS においては、VDR 標的遺伝子群の発現低下とネットワーク機能不全を誘導している可能性が示唆される。

次に EBV 宿主 B 細胞における EBNA1 標的遺伝子群 228 を同定した。分子ネットワーク解析では、主要なネットワークとして、細胞生存・細胞死・ウイルス感染防御(インターフェロンのシグナル伝達系 IRF, STAT1)と密接に関連するネットワークとの関連性を認めた。すなわち MS において EBV はこれらのシステムを利用して持続感染を維持し、免疫寛容や自己免疫を誘導している可能性が示唆される。

最後に脳組織の免疫組織化学的解析で MS 発症の分子メカニズムを探索した。オートファジーマーカー LC3 は、MS 脳では脱髄のエフェクター細胞である Iba1 陽性マクロファージ・ミクログリアが高発現し、NHD 脳では脱髄の標的となる残存 Nogo-A 陽性オリゴデンドロサイトが高発現していた。このことは脱髄の分子メカニズムとして、MS では自己免疫

型炎症性脱髄 (autoimmune-mediated inflammatory demyelination)であり、NHDではオートファジー破綻型脱髄(deregulated autophagy-mediated degenerative demyelination)である可能性を示唆する。

E. 結論

バイオインフォマティクスの研究手法を駆使して、ビタミンD、EBウイルス、NHDをキーワードとしてMS発症の分子メカニズムを探索した。その結果MS発症と関連するビタミンD受容体標的遺伝子、EBNA1標的遺伝子、NHDとMSのオリゴデンドロサイトオートファジーの相違を明らかにすることが出来た。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K. Immunohistochemical characterization of gamma-secretase activating protein expression in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38(2): 132-141, 2012.
2. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Futamura N, Kobayashi M, Toyoshima I, Yoshioka T, Enomoto K, Arai N, Saito Y, Arima K. Phosphorylated Syk expression is enhanced in Nasu-Hakola disease brains. *Neuropathology* 32(2): 149-157, 2012.
3. Satoh J. Molecular network of microRNA targets in Alzheimer's disease brains. *Experimental Neurology* 235(2): 436-446, 2012.
4. Satoh J, Shimamura Y, Tabunoki H. Gene expression profile of THP-1 monocytes following knockdown of DAP12, a causative gene for Nasu-Hakola disease. *Cellular and Molecular Neurobiology* 32(3): 337-343, 2012.
5. Tabunoki H, Saito N, Suwanborirux K, Charupant K, Satoh J. Molecular network profiling of U373MG human glioblastoma cells following induction of apoptosis by novel marine-derived anti-cancer 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline alkaloids. *Cancer Cell International* 12(1): e14, 2012.
6. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K. Dystrophic neurites express C9orf72 in Alzheimer's disease brains. *Alzheimer's Research and Therapy* 4(4): e33, 2012.
7. Satoh J. Molecular network analysis of human microRNA targetome: from cancers to Alzheimer's disease. *BioData Mining* 5(1): e17, 2012.
8. 佐藤 準一: アルツハイマー病脳におけるマイクロRNA発現異常. *マイクロRNA発現制御と疾患*. *細胞* 44(10): 10-14, 2012.
9. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K. Accumulation of a repulsive axonal guidance molecule RGMa in amyloid plaques: a possible hallmark of regenerative failure in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 39(2): 109-120, 2013.
10. Satoh J, Tabunoki H. Molecular network of ChIP-Seq-based vitamin D receptor target genes. *Multiple Sclerosis* 19(8): 1035-1045, 2013.
11. Satoh J, Tabunoki H. A comprehensive profile of ChIP-Seq-based STAT1 target genes suggests the complexity of

- STAT1-mediated gene regulatory mechanisms. *Gene Regulation and Systems Biology* 7: 41-56, 2013.
12. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K. Ubiquilin-1 immunoreactivity is concentrated on Hirano bodies and dystrophic neurites in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 39(7): 817-830, 2013.
 13. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Konno H, Arima K. Reactive astrocytes express the potassium channel Kir4.1 in active multiple sclerosis lesions. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 4(1): 19-28, 2013.
 14. Satoh J, Kawana N, Yamamoto Y, Ishida T, Saito Y, Arima K. A survey of TREM2 antibodies reveals neuronal but not microglial staining in formalin-fixed paraffin-embedded postmortem Alzheimer's brain tissues. *Alzheimer's Research and Therapy* 5(5): e30, 2013.
 15. Tabunoki H, Ono H, Ode H, Ishikawa K, Kawana N, Banno Y, Shimada T, Nakamura Y, Yamamoto K, Satoh J, Bono H. Identification of key uric acid synthesis pathway in a unique mutant silkworm *Bombyx mori* model of Parkinson's disease. *PLoS One* 8(7): e69130, 2013.
 16. Satoh J, Kawana N, Yamamoto Y. Molecular network of ChIP-Seq-based EBNA1-target cellular genes supports biological implications of EBV persistence in multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 4(2): 181-192, 2013.
 17. Kawana N, Yamamoto Y, Ishida T, Saito Y, Konno H, Arima K, Satoh J. Reactive astrocytes and perivascular macrophages express NLRP3 inflammasome in active demyelinating lesions of multiple sclerosis and necrotic lesions of neuromyelitis optica and cerebral infarction. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 4(3): 296-304, 2013.
 18. Satoh J. A possible role of microgliopathy in the pathogenesis of Nasu-Hakola disease. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 4(Suppl. 1): 17-26, 2013.
 19. Satoh J, Kawana N, Yamamoto Y. Pathway analysis of ChIP-Seq-based NRF1 target genes suggests a logical hypothesis of their involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Gene Regulation and Systems Biology* 7: 139-152, 2013.
 20. Satoh J, Kawana N, Yamamoto Y. ChIP-Seq data mining: Remarkable differences in NRSF/REST target genes between human ESC and ESC-derived neurons. *Bioinformatics and Biology Insights* 7: 357-368, 2013.
 21. 佐藤 準一. Nasu-Hakola 病と HDLS. 神経軸索 spheroid を伴う遺伝性白質脳症 (HDLS). *神経内科* 78(4): 396-404, 2013.
 22. Choi SS, Lee HJ, Lim I, Satoh J, Kim SU. Human astrocytes: Secretome profiles of cytokines and chemokines. *PLoS One* 9(4): e92325, 2014.
 23. Satoh J, Kino Y, Kawana N, Yamamoto Y, Ishida T, Saito Y, Arima K. TMEM106B expression is reduced in Alzheimer's disease brains. *Alzheimer's Research and Therapy* 6(2): e17, 2014.
 24. Satoh J, Motohashi N, Kino Y, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Arai N, Nakamagoe K, Tamaoka A, Saito Y, Arima K. LC3, an autophagosome marker, is expressed on oligodendrocytes in Nasu-Hakola disease brains. *Orphanet Journal of Rare Diseases*

- 9: e68, 2014.
25. Kawana N, Yamamoto Y, Kino Y, Satoh J. Molecular network of NLRP3 inflammasome activation-responsive genes in a human monocyte cell line. *Austin Journal of Clinical Immunology* 1(4): e1071, 2014.
 26. Ohtani R, Shibuya K, Satoh J, Kuwabara S. A piece of X-ray revealed Nasu-Hakola disease. *Internal Medicine* 53(20): 2407, 2014.
 27. Satoh J. Molecular network of ChIP-Seq-based NF- κ B p65 target genes involves diverse immune functions relevant to the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 3(1): 94-106, 2014.
 28. Satoh J, Yamamoto Y, Kitano S, Takitani M, Asahina N, Kino Y. Molecular network analysis suggests a logical hypothesis for the pathological role of C9orf72 in amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia. *Journal of Central Nervous System Disease* 6: 69-78, 2014.
 29. Satoh J, Kino Y, Yamamoto Y, Kawana N, Ishida T, Saito Y, Arima K. PLD3 is accumulated on neuritic plaques in Alzheimer's disease brains. *Alzheimer's Research and Therapy* 6: e70, 2014.
 30. Satoh J, Asahina N, Kitano S, Kino Y. A comprehensive profile of ChIP-Seq-based PU.1/Sp1 target genes in microglia. *Gene Regulation and Systems Biology* 8: 127-139, 2014.
 31. Satoh J, Yamamoto Y, Asahina N, Kitano S, Kino Y. RNA-Seq data mining: Downregulation of NeuroD6 serves as a possible biomarker for Alzheimer's disease brains. *Disease Markers* 2014: ID123156, 2014.
 32. 佐藤準一. 神経症候群(第2版)III. 那須ハコラ病. *日本臨牀 新領域別症候群シリーズ* 28: 694-697, 2014.
- 著書
1. Satoh J. Human microRNA targetome indicates a specialized role of microRNAs in regulation of oncogenesis. In *Systems Biology in Cancer Research and Drug Discovery*, ed by Azumi AS. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 247-266, 2012.
 2. Satoh J. Molecular network analysis of target RNAs and interacting proteins of TDP-43, a causative gene for neurodegenerative diseases ALS/FTLD. In *Technological Advancements in Biomedicine for Healthcare Applications*, ed by Wu J. IGI Global, Hershey, Pennsylvania, USA, pp. 314-335, 2012.
 3. 佐藤準一: アクアポリン-4(AQP-4). 多発性硬化症(MS)診療のすべて. 山村隆編. 診断と治療社, p. 170-172, 2012.
 4. 佐藤準一: 多発性硬化症(MS)の血液診断. 多発性硬化症(MS)診療のすべて. 山村隆編. 診断と治療社, p. 232-237, 2012.
 5. 佐藤準一: DNA マイクロアレイ. 多発性硬化症(MS)診療のすべて. 山村隆編. 診断と治療社, p. 238-241, 2012.
 6. 佐藤準一: 2. 網羅的遺伝子発現解析からみた病因・病態. 第1章 多発性硬化症の病態と診断 K. 病因・病態をめぐって. アクチュアル脳・神経疾患の臨床. 最新アプローチ 多発性硬化症と視神経脊髄炎. 辻省次・吉良潤一編. 中山書店, p. 125-136, 2012.
 7. Satoh J. Gene expression profiling and pathway analysis for identification of molecular targets in MS. In *Multiple Sclerosis Immunology - A Foundation for*

- Current and Future Treatments, ed by Gran B and Yamamura T. Dordrecht, Springer, Netherlands, pp. 229-256, 2013.
8. 佐藤準一. 免疫性神経疾患発症要因. 免疫性神経疾患ハンドブック. 楠進編. 南江堂、p. 31-41, 2013.
 9. Satoh J. Gene expression profiling and pathway analysis for identification of molecular targets in MS. In Multiple Sclerosis Immunology - A Foundation for Current and Future Treatments, ed by Gran B and Yamamura T. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 229-256, 2013.
2. 学会発表
- 国際学会
1. Satoh J, Tabunoki H, Arima K: Immunohistochemical characterization of gamma-secretase activating protein (GSAP) expression in Alzheimer's disease brains. 64th Annual Meeting of American Academy of Neurology. New Orleans, USA, 2012.4.25.
 2. Satoh J, Tabunoki H: Accumulation of a repulsive axonal guidance molecule RGMA in amyloid plaques: a pathological hallmark of regeneration failure in Alzheimer's disease brains. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Aging and Diseases of Aging. Tokyo, Japan, 2012.10.25.
 3. Satoh J, Tabunoki H: Molecular network analysis of ChIP-Seq-based vitamin D Target genes. 11th International Congress of Neuroimmunology. Boston, USA, 2012.11.6.
 4. Satoh J: Molecular network profiling of U373MG human glioblastoma cells following induction of apoptosis by novel marine-derived anti-cancer 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline alkaloids. The JSPS 3rd Medicinal Chemistry Seminar of Asia/Africa Scientific Platform Program. Tokyo, Japan, 2012.12.4.
 5. Nojima Y, Tabunoki H, Satoh J: Isolation and characterization of SOD1 and SOD2 in silkworm *Bombyx mori*. The JSPS 3rd Medicinal Chemistry Seminar of Asia/Africa Scientific Platform Program. Tokyo, Japan, 2012.12.4.
 6. Kawana N, Tabunoki H, Nojima Y, Satoh J: Identification of a key uric acid synthesis regulator in a novel silkworm *Bombyx mori* model of Parkinson's disease. The JSPS 3rd Medicinal Chemistry Seminar of Asia/Africa Scientific Platform Program. Tokyo 2012.12.4.
 7. Satoh J, Tabunoki H. A comprehensive profile of ChIP-Seq-based STAT1 target genes suggests the complexity of STAT1-mediated gene regulatory mechanisms. The 10th International Workshop on Advanced Genomics. The Genome Renaissance. Tokyo, Japan, 2013.5.21.
 8. Satoh J, Kino Y: Molecular network of ChIP-Seq-based EBNA1-target cellular genes supports biological implications of EBV persistence in multiple sclerosis. 66th Annual Meeting of American Academy of Neurology. Philadelphia, USA, 2014. 5.1.
- 国内学会
1. 佐藤準一: Reanalysis of ChIP-seq data of vitamin D receptor-binding sites by using GenomeJack. NGS 現場の会. 第2回研究会. 大阪、2012.5.24.
 2. 佐藤準一、天竺桂弘子、石田剛、柳下三郎、陣内研二、二村直伸、小林道雄、豊

- 島至、吉岡年明、榎本克彦、新井信隆、有馬邦正: 那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究第3報. 第53回日本神経学会総会. 東京、2012. 5.25.
3. 野島陽水、天竺桂弘子、佐藤準一: カイコ MnSOD の cDNA のクローニングと発現解析. 第53回日本神経学会総会. 東京、2012. 5.25.
 4. 佐藤準一、天竺桂弘子、石田剛、柳下三郎、陣内研二、二村直伸、小林道雄、豊島至、吉岡年明、榎本克彦、新井信隆、有馬邦正: 那須ハコラ病脳の神経細胞におけるリン酸化 syk の発現増強. 第53回日本神経病理学会総会. 新潟、2012. 6.30.
 5. 佐藤準一、野島陽水、島村悦光、川名夏生、天竺桂弘子: 次世代シーケンサー ChIP-seq データを用いた VDR 結合部位の網羅的解析. 第24回日本神経免疫学会学術集会 軽井沢、2012. 9.21.
 6. Satoh J, Tabunoki H: Molecular network of ChIP-Seq-based vitamin D receptor target genes supports a protective role of vitamin D in development of multiple sclerosis. 生命医薬情報学連合大会. 東京、2012.10.16.
 7. 野島陽水、天竺桂弘子、伴野豊、佐藤準一: カイコ SOD1, SOD2 の cDNA クローニングと組織分布の解析. 第85回日本生化学会大会. 福岡、2012.12.16.
 8. 川名夏生、天竺桂弘子、嶋田透、伴野豊、坊農秀雅、佐藤準一: カイコ尿酸代謝における DJ-1 の役割. 第85回日本生化学会大会. 福岡、2012.12.16.
 9. 天竺桂弘子、川名夏生、伴野豊、嶋田透、中村有希、山本公子、坊農秀雅、佐藤準一: カイコ DJ-1 の尿酸代謝系における役割の解明. 日本薬学会第133年会. 横浜、2013.3.29.
 10. 天竺桂弘子、島村悦光、野島陽水、川名夏生、Khanit Suwanborirux、Kornvika Charupant、齋藤直樹、佐藤準一. 海洋生物由来新規テトラヒドロイソキノリンアルカロイドによるヒトグリオーマ細胞に対するアポトーシス誘導機序の分子ネットワーク解析. 日本薬学会第133年会. 横浜、2013.3.29.
 11. 佐藤準一、天竺桂弘子、石田剛、齊藤祐子、有馬邦正. アルツハイマー病脳の平野小体と変性神経突起における ubiquilin-1 の高発現. 第54回日本神経病理学会総会. 東京、2013. 4.26.
 12. 天竺桂弘子、川名夏生、野島陽水、伴野豊、嶋田透、坊農秀雅、佐藤準一. カイコ尿酸代謝における DJ-1 の役割. 第54回日本神経学会総会 東京、2013. 5.31.
 13. 佐藤準一、島村悦光、野島陽水、川名夏生、天竺桂弘子. 次世代シーケンサー ChIP-seq データを用いたゲノムワイド VDR 結合部位の解析. 第54回日本神経学会総会 東京、2013. 6.1.
 14. 佐藤準一、天竺桂弘子、石田剛、齊藤祐子、有馬邦正. アルツハイマー病脳の dystropic neurites における C9orf72 の発現. 第36回日本神経科学大会. Neuro2013. 京都、2013. 6.20.
 15. Jun-ichi Satoh. Primary microgliopathy causes demyelination and axonal degeneration: neuropathology and DNA microarray analysis in Nasu-Hakola disease. 12th MS Workshop in Fukuoka. Cutting edge Research in MS and NMO from Asia. 福岡、2013. 8.4.
 16. 佐藤準一. Alzheimer 病脳における microRNA の発現異常. 国立長寿医療研究センターバイオバンクセミナー. 大府、2013. 8.8.
 17. Jun-ichi Satoh. Molecular network of ChIP-Seq-based NF- κ B p65 target genes. NGS 現場の会. 第3回研究会. 神戸、2013.9.4.
 18. Jun-ichi Satoh, Natsuki Kawana, Yoji Yamamoto. A comprehensive profile of

- ChIP-Seq-based STAT1 target genes suggests the complexity of STAT1-mediated gene regulatory mechanisms. 生命医薬情報学連合大会. 東京、2013.10.29.
19. 佐藤準一、川名夏生、野島陽水、山本洋司. MS 活動性脳病巣反応性アストロサイトにおける Kir4.1 の高発現. 第 25 回日本神経免疫学会学術集会 下関、2013. 11.29.
 20. 佐藤準一. 神経難病の創薬. 平成 25 年度文京アカデミア講座. 最近話題の医学・薬学. 東京、2013.12.7.
 21. 川名夏生、山本洋司、佐藤準一. 多発性硬化症における NLRP3 inflammasome の役割. 日本薬学会第 134 年会. 熊本、2014. 3.30.
 22. 山本洋司、川名夏生、小島寛人、近藤徳信、佐藤準一. FTD/ALS 責任遺伝子 C9orf72 機能解析モデル系の樹立. 日本薬学会第 134 年会. 熊本、2014. 3.30.
 23. 岡部由幸、金澤恵美、佐藤準一、吉田久博. 網羅的遺伝子解析によるアスピリン耐性発現機構の研究. 日本薬学会第 134 年会. 熊本、2014. 3.30.
 24. 佐藤準一、川名夏生、山本洋司、紀嘉浩. 次世代シーケンサー ChIP-Seq データによるゲノムワイド NF-kappaB p65 標的遺伝子群の解析. 第 55 回日本神経学会総会 福岡、2014. 5.24.
 25. 佐藤準一、紀嘉浩、川名夏生、山本洋司、石田剛、齊藤祐子、有馬邦正. Alzheimer 病脳の Iba1 陽性 microglia は TREM2 を発現しない. 第 55 回日本神経病理学会総会. 東京、2014. 6.26.
 26. 佐藤 準一. 脳の病気の遺伝子を調べてみよう. 文部科学省・研究成果の社会還元・普及事業. ひらめきときめきサイエンス. ようこそ大学の研究室へ. 東京、2014. 7.27.
 27. 檜垣小百合、村松昌、松田明生、松本健治、佐藤準一、道川誠、新飯田俊平. アルツハイマー病モデルマウス脳における miR-200 ファミリーの機能解析. 第 6 回日本 RNAi 研究会. 広島、2014. 8.28.
 28. 佐藤準一. MS のバイオマーカー抗 KIR4.1 抗体. 第 26 回日本神経免疫学会学術集会. シンポジウム III. Autoimmune channelopathies –update-. 金沢、2014. 9.5.
 29. 佐藤準一、川名夏生、山本洋司、朝比奈直弘、北野翔大、紀嘉浩. MS 活動性脳病巣における NLRP3 inflammasome の発現. 第 26 回日本神経免疫学会学術集会. 金沢、2014. 9.5.
 30. 佐藤準一、山本洋司、川名夏生、朝比奈直弘、北野翔大、紀嘉浩. アルツハイマー病脳における TMEM106B の発現低下. 第 37 回日本神経科学大会. Neuro2014. 横浜、2014. 9.13.
 31. Jun-ichi Satoh, Yoshihiro Kino. Remarkable differences in NRSF/REST target genes between human ESC and ESC-derived neurons. 生命医薬情報学連合大会. 仙台、2014. 10.2.
- G. 知的所有権の取得状況**
1. 特許取得 該当なし
 2. 実用新案登録 該当なし
 3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)
分担研究報告書(総合)

MRI を用いた多発性硬化症と視神経脊髄炎関連疾患に関する研究

研究分担者 佐藤典子 国立精神・神経医療研究センター病院放射線診療部 部長

研究要旨

多発性硬化症 (MS) や視神経脊髄炎関連疾患 (NMO) の病変を、MRI の様々な手法を用いて評価した。3DT1 volume data にて脳の灰白質、白質、脳室の体積測定、T2 で異常高信号を示す病変の体積測定、ASL 法による脳血流測定、拡散テンソルによる微細白質変化を測定し、臨床データとの相関や、MS と NMO との比較検討も行った。T2 高信号域と EDSS は有意に相関し、脳脊髄液容積とは相関の傾向を認めた。また視床や後部帯状回などの領域で白質病変と血流との間に負の関連を認めた。また MS 患者における拡散テンソル解析は、脳内の広い範囲で、EDSS、精神機能のスコア、小脳機能のスコアと FA 値の間にそれぞれ統計学的に有意な逆相関がみられた。さらに NMO と比較し MS では両側視床における局所脳皮質容量低下や白室領域の異方性の低下が認められた。これはより強い脱髄性変化が MS で生じ、それによる間接的効果が視床領域に影響を及ぼしたことが推測された。疾患の鑑別や再発予防効果をみる方法として、MRI の定量的解析がひとつの有力な手段になるとと思われる。

A. 研究目的

現在多発性硬化症 (MS) や視神経脊髄炎関連疾患 (NMO) の病変評価には客観的な MRI 画像が使用されており、その画像の占める役割は大きい。MRI で脳を評価するための手法には、3次元の T1 強調像による脳の容積測定、T2/FLAIR での病変領域の体積測定、Arterial Spin Labeling (ASL) 法による非侵襲的脳血流測定、水拡散の動態を通じて生体脳の白質における微細白質変化を検索したり、脳室内温度を測定できる拡散テンソル (diffusion tensor imaging、以下 DTI) 等様々ある。今回の研究では、3DT1 volume data にて脳の灰白質、白質、脳室の体積測定、T2 で異常高信号を示す病変の体積測定、ASL 法による脳血流測定、拡散テンソルによる微細白質変化と脳室内温度を測定を行った。これらの画像解析データと Expanded Disability Status Scale (以下、EDSS) や MMSE などを含めた様々な臨床データとの相関も検討する。また MS と NMO とは鑑別が問題となるが、両者の画像を中心とした比較検討もおこなった。

B. 研究方法

＜MS 患者における脳の容積や白質病変、脳血流と臨床データとの相関＞

対象は当院で多発性硬化症と臨床診断された 22 人で、年齢、罹病期間、重症度 (EDSS) と Mini Mental Scale (MMSE) を評価し、QBrain にて頭蓋内容積、脳脊髄液、脳容積、T2 高信号病巣容積を自動算出した。各臨床データと MR データとの相関には回帰分析をおこなった。

MRI を用いた脳血流の評価は、多発性硬化症患者 9 例と年齢、性別をマッチさせた健常者 16 名を対象とし、Pseudo-continuous arterial spin labeling (PCASL) にて ASL 撮影を行った。撮影されたデータは Matlab で起動する ASL toolbox を用いて解析を行った。またその他に 3DT1WI の volume data や T2WI, FLAIR も同時に撮影し、脳の容積や白質病変との相関も評価した。

＜MS 患者における拡散テンソル解析を用いた白質の微細構造変化の検討＞

対象は 2011 年 1 月より 2013 年 8 月の間に再発寛解型の多発性硬化症患者の診断で国立精神・神経医療研究センター病院 (以下、当

院)に入院時に EDSS で評価され、当院の Philips 社製 3T MRI 装置で拡散テンソル像を撮像した 47 人。DTI の全脳解析法である Tract Based Spatial Statistics 法を用いて、47 人全員の EDSS、機能別障害度の錐体路機能、小脳機能、脳幹機能、感覚機能、膀胱直腸機能、視覚機能、精神機能のスコアと、DTI 画像から得られた拡散異方性値 (fractional anisotropy value、以下 FA 値) との相関を検討した。

<MS, NMO 患者における拡散強調画像を利用した脳室内温度測定>

共同研究機関にて開発されたソフトウェアを使用し、多発性硬化症や類縁疾患の拡散強調画像の解析を行った。対象は 2012 年 6 月から 12 月まで、当院で撮影された安定期 MS 30 名、NMO 11 名、活動期 (慢性進行性を含む) MS 18 名、健常人ボランティア 15 名を評価した。撮像はすべて Philips 3T の MRI で行い、中枢神経の温度と病変活動性の相関を検討した。

<拡散テンソル解析を用いた MS と NMO の鑑別>

抗アクアポリン 4 抗体陽性の視神経脊髄炎関連疾患患者 21 名 (平均年齢; 52.0 ± 18.9 歳、男性:女性=5:16)、再発寛解型多発性硬化症患者 32 名 (平均年齢; 47.7 ± 10.1 歳、男性:女性=9:23)、性別年齢をあわせた健常者 39 名 (平均年齢; 50.1 ± 8.8 歳、男性:女性=10:29) を対象に 3T MR system (Philips Medical Systems, Best, the Netherlands) により 3 次元 T1 強調画像や拡散強調画像を撮影し、健常群と疾患群における 3 群の差異を検討した。

(倫理面への配慮)

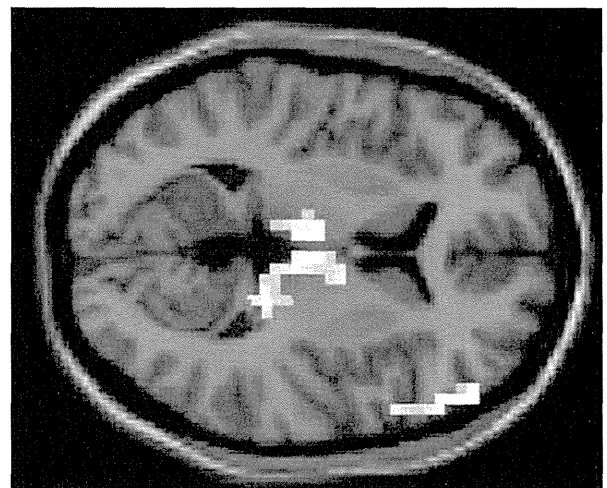
これらの研究は後ろ向き観察研究として、倫理委員会で承認されている。「疫学研究に関する倫理指針」に準拠して、研究に参加する試料提供者の人権に最大限配慮して行われた。

C. 研究結果

<MS 患者における脳の容積や白質病変、脳血流と臨床データとの相関>

ルーチンの撮影法は軸位断 T2WI, T1WI, FLAIR 矢状断 FLAIR で 20 分ほどで撮影可能であった。QBrain を用いて T2 高信号域の体積を算出し、各臨床データやその他の容積の相関を検討したところ、EDSS と有意に相関 ($p < 0.01$) し、脳脊髄液容積とは相関の傾向を認め ($p = 0.055$)、年齢や罹病期間、MMSE、脳容積とは相関なかった。脳容積と各データとの相関は、MMSE は相関の傾向 ($p = 0.055$)、脳脊髄液容積と頭蓋容積は相関が強く、EDSS とは相関はなし。脳脊髄液と各データとの相関は、MMSE とは有意に相関 ($p = 0.02$) し、EDSS とは相関しなかった。

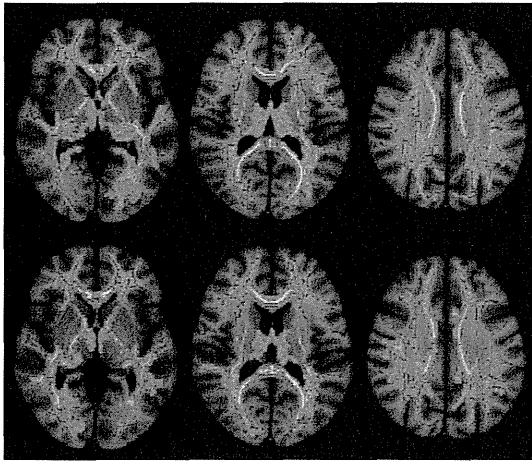
ASL においては良好な大脳皮質の脳血流画像を撮影することができた。MS 群では健常群と比較し、右有意にびまん性に皮質領域の血流低下を認めた他、視床、尾状核、後部帯状回などの領域で血流低下を認めた。右有意にびまん性に皮質領域の血流と全脳白質病変容量に関連を認めたほか、視床や後部帯状回などの領域で白質病変と血流との間に負の関連を認めた。



<MS 患者における拡散テンソル解析を用いた白質の微細構造変化の検討>

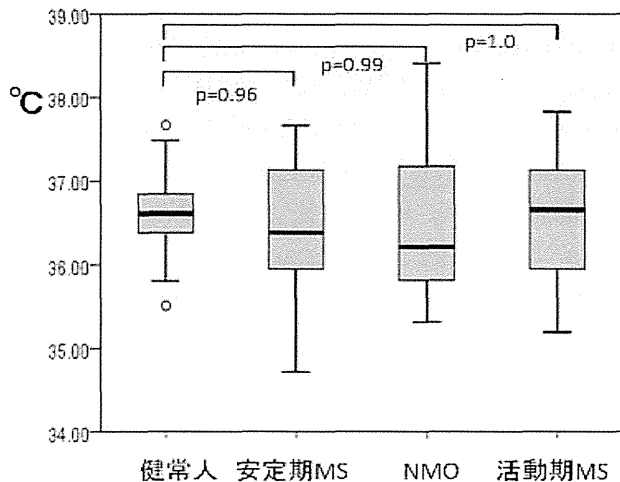
脳内の広い範囲で、EDSS と FA 値の間に統計学的に有意な逆相関 ($p < 0.05$ 、多重比較補正済) がみられた。また精神機能のスコアは、FA 値の間に統計学的に有意な逆相関 ($p <$

0.05、多重比較補正済)がみられ、小脳機能のスコアにもFA値の間に統計学的に有意な逆相関 ($p < 0.05$ 、多重比較補正済)がみられた。



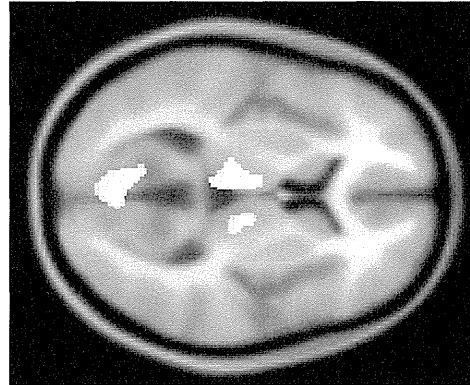
<MS, NMO 患者における拡散強調画像を利用した脳室内温度測定>

安定期 MS、NMO、活動期 MS、健常ボランティアの平均温度はそれぞれと 36.61 ± 0.61 °C, 36.50 ± 0.99 °C, 36.51 ± 0.79 °C, 36.60 ± 0.74 °Cであった。活動期 MS、安定期 MS、NMO、健常者ボランティアの間でソフトウェアから測定される中枢の体温に有意差は認められなかった。少なくとも活動期にある MS でも中枢神経の温度変化をもたらすほどの影響は認められなかった。



<拡散テンソル解析を用いたMSとNMOの鑑別>

健常被験者と比較し視神経脊髄炎関連疾患患者や再発寛解型多発性硬化症患者ではびまん性の局所脳皮質容量低下や白室領域の異方性の低下が認められた。視神経脊髄炎関連疾患患者と比較し再発寛解型多発性硬化症患者では両側視床における局所脳皮質容量低下や白室領域の異方性の低下が認められた。



D. 考察

QBrainでの容積測定は、完全自動でなく手動の作業が多少必要になるものの、比較的容易にかつ客観的に脳容積、脳脊髄液容積、T2高信号域の測定することが可能であった。EDSS (日常生活能力) はMS病変 (T2高信号病変) と、一方MMSEは脳容積 (脳萎縮) が相関した。視床が血流低下と白質病変との相関を認めたが、過去のSPECTの報告で血流低下が指摘されており、この新しい手法でもそれを支持する結果が得られた。多発性硬化症の評価はMRIによる白質病巣や脳萎縮の評価が主なものであるが通常撮影方法では大脳皮質病変は描出されにくく問題となっている。脳灌流画像であれば皮質機能も含めた評価が可能であると思われる。

またこれまでにも多発性硬化症患者においてEDSSが上昇すると脳内の病的状況の進行を反映してFA値が低下するとする報告があるが、本検討の結果もこれを支持する。本検討ではEDSSスコアそのものだけでなく、下位基準である機能別障害度に関しても個別にて評価した。機能別障害度の中では、FA値の低

下は精神機能と小脳機能のスコアとの間でのみ有意な相関が観察された。

MSなどの疾患では複数の機序による体温調節の異常や体温の急激な変動による症状の悪化が報告されている。この機序としては温度上昇による神経伝導障害の増悪や視床下部の視索前野の障害が原因と考えられている。だが直接に中枢温度を測定することは難しく、体表から体温障害と中枢神経の温度との関連は不明な点が多い。今回の結果ではMSやNMOと健常ボランティアとの間で中枢の体温に有意差は認められず、脱髄病変が存在することによる直接の中枢温度変化は認められないことが示唆された。しかしながら、MR患者において脳の温度が低下するとの報告もされている。おり、体温の変化は生理的変動や病変範囲、病変部位、罹病期間との評価など因子にも影響をうけるため、今後は詳細な解析を検討していく必要がある。ちなみに我々はパーキンソン患者や多系統萎縮症の神経変性疾患で脳内温度が上昇する興味深い結果を得ており、MSを含めた中枢神経疾患においてさらなる見当を行う予定である。

再発寛解型多発性硬化症患者では神経脊髄炎関連疾患患者と比較し、疾患に伴う脳形態変化がより強度であることが明らかとなった。免疫組織化学的手法による検討より、神経脊髄炎関連疾患では皮質領域の脱髄がみられないことが報告されている。今回認められた神経脊髄炎関連疾患における皮質領域の障害は直接的な炎症反応よりも、繰り返す白質の炎症により間接的に変化していることが示唆された。

E. 結論

QBrainは通常の臨床撮影で様々な有用な評価を行えることが示された。またMRIを用いたASL法による脳灌流画像撮影は短時間で可能で被爆も侵襲性もなく多発性硬化症患者の脳機能評価に大変有用である。拡散テンソル像解析は、再発寛解型多発性硬化症の精神機能低下と小脳機能低下の進行の評価に有用である可能性がある。また神経脊髄炎関連疾

患と比較してより強い脱髄性変化が再発寛解型多発性硬化症で生じており、これによる間接的効果が視床領域に影響を及ぼしたことが推測された。当2疾患の鑑別において、視床の変化に注目することは非常に有益であることが示唆された。今後新薬などの介入による、MS再発予防効果をみる方法としてはMRIの定量的解析がひとつの有力な手段となると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ota M, Sato N, Matsuo J, Kinoshita Y, Kawamoto Y, Hori H, Teraishi T, Sasayama D, Hattori K, Obu S, Nakata Y, Kunugi H. Multimodal image analysis of sensorimotor gating in healthy women. *Brain Res* 2013;1499:61-8.
- 2) Ota M, Hori H, Sato N, Sasayama D, Hattori K, Teraishi T, Obu S, Nakata Y, Kunugi H. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyperactivity and brain differences in healthy women. *Neuropsychobiology*. 2013;68(4):205-11.
- 3) Shigemoto Y, Matsuda H, Kamiya K, Maikusa N, Nakata Y, Ito K, Ota M, Matsunaga N, Sato N. In vivo evaluation of gray and white matter volume loss in the parkinsonian variant of multiple system atrophy using SPM8 plus DARTEL for VBM. *Neuroimage Clin*. 2013 Apr 5;2:491-6.
- 4) Ota M, Sato N, Nakata Y, Ito K, Kamiya K, Maikusa N, Ogawa M, Okamoto T, Obu S, Noda T, Araki M, Yamamura T, Kunugi H. Abnormalities of cerebral blood flow in multiple sclerosis: A pseudocontinuous arterial spin labeling MRI study. *Magn Reson Imaging* 2013;31(6):990-5.
- 5) Ota M, Nakata Y, Ito K, Kamiya K, Ogawa M, Murata M, Obu S, Kunugi H, Sato N. Differential diagnosis tool for

parkinsonian syndrome using multiple structural brain measures. Comput Math Methods Med. 2013;2013:571289.

6) Adachi Y, Sato N, Saito Y, Kimura Y, Nakata Y, Ito K, Kamiya K, Matsuda H, Tsukamoto T, Ogawa M. Usefulness of SWI for the Detection of Iron in the Motor Cortex in Amyotrophic Lateral Sclerosis. J Neuroimaging 2014. Apr;44(4):311-7.

7) Ota M, Sato N, Sakai K, Okazaki M, Maikusa N, Hattori K, Hori H, Teraishi T, Shimoji K, Yamada K, Kunugi H. Altered coupling of regional cerebral blood flow and brain temperature in schizophrenia compared with bipolar disorder and healthy subjects. J Cereb Blood Flow Metab 2014. 09;34(12):1868-1872.

8) Ota M, Noda T, Sato N, Hattori K, Teraishi T, Hori H, Nagashima A, Shimoji K, Higuchi T, Kunugi H. Characteristic distributions of regional cerebral blood flow changes in major depressive disorder patients: a pseudo-continuous arterial spin labeling (pCASL) study. J Affect Disord 2014. 08;165:59-63.

2. 学会発表 なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特記すべきことなし

動物モデルを用いた MS 病態の多様性に関する基礎研究

研究分担者 大木 伸司

(独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第六部 室長

研究要旨

多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)は、中枢神経系に分布するミエリン分子などの自己抗原に対する過剰な免疫応答を起因とする自己免疫疾患の一種である。MS 患者の大部分を占める再発寛解型(RR) MS の病態形成には、Th17 細胞を主体とする炎症性 T 細胞が関わることから、この自己反応性 Th17 細胞の機能を選択的かつ効率的に制御する治療法の確立が喫緊の課題となっており、免疫修飾薬 OCH による新規治療法もこれを目指したものである。我々は、MS 患者末梢血 T 細胞で選択的に高発現するオープン核内受容体 NR4A2 が、MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)でも病態とよく相関した挙動を示し、その発現が病態形成に関わる自己反応性 Th17 細胞に限られることを明らかにした。さらに siRNA の *in vivo* 投与することにより、病原性 Th17 細胞の IL-17 産生抑制を伴って、EAE 病態が有意に軽快したことから、T 細胞の NR4A2 発現は EAE 病態に密接に関わり、RRMS 病態のバイオマーカーおよび新規治療標的として極めて魅力的な候補分子であることが示された。さらに新規樹立した NR4A2 の欠損マウスでは、RRMS に対応すると思われる Th17 細胞依存性の初期 EAE 病態がほぼ完全に抑制された一方で、新たな病態が遅れて出現することを見いだした。この後期 EAE 病態では、あるマーカー遺伝子を発現するユニークな T 細胞の CNS への浸潤が認められた。この T 細胞は強い病原性を有しており、同マーカー遺伝子を標的に作製した siRNA の *in vivo* 投与により、NR4A2cKO マウスの後期 EAE 病態は有意に改善した。さらにヒト末梢血におけるマーカー遺伝子陽性 T 細胞の頻度が、SPMS 患者で有意に増加することが示されたことから、RRMS と SPMS の科学的な根拠に基づく鑑別法の可能性が開かれ、OCH の治療成績向上を目指す上でも極めて重要な知見を得たと考えている。

A. 研究目的

多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)は、中枢神経系に分布するミエリン分子などの自己抗原に対する過剰な免疫応答を起因とする自己免疫疾患の一種である。MS 患者の大部分を占める再発寛解型(RR) MS の病態形成には、Th17 細胞を主体とする炎症性 T 細胞が関わることから、この自己反応性 Th17 細胞の機能を選択的かつ効率的に制御する治療法の確立が喫緊の課題となっており、免疫修飾薬 OCH による新規治療法もこれを目指したものである。発症から 5~10 年程度経過した再発寛解型(RR) MS 患者の多くは二次進行型(SP) MS に移行し、その頻度は本邦で全体の 20%、欧

米では半数以上にも達する。SPMS の発症機序は不明であるが、既存の RRMS 治療薬はほぼ無効であり、異なる病因が予想される。RRMS を対象とした免疫修飾薬 OCH の医師主導治験による評価を行う上で、RRMS と SPMS を識別しうる客観的な基準を確立することは、OCH の治療成績向上を目指す上でも極めて重要である。このような背景から、今年度は MS の動物モデルを用いて RRMS と SPMS の病態の異同を、分子・細胞レベルで明らかにすることを目的として研究を進めた。

B. 研究方法

ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質

(MOG) 由来ペプチド (MOG35-55) をフロイント完全アジュバントと混合して得たエマルジョンを、C57BL/6J (B6) マウス皮下に免疫することで、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導した。EAE を発症したマウスから末梢血、リンパ節と脾臓を回収し、分散後フローサイトメーターを用いてヘルパーT 細胞をソーティングした。EAE マウスの脳および脊髄をコラゲナーゼおよびDNase I で処理した後にパーコール密度勾配遠心法で単核球を分離し、浸潤細胞をソーティングした。分離したT細胞のサイトカイン産生と各種遺伝子発現を、定量PCR、Suspension Array、Gene Chip、ELISAなどを用いて解析した。マウス脾臓から分離したナイーブT細胞に、Nucleofector (Amasa社) を用いてNR4A2 特異的 siRNA を導入し、*in vitro* のTh17細胞誘導条件(IL-6+TGF- β) 下に固相化抗CD3抗体で刺激培養した後の上清中のIL-17産生を、ELISA法あるいは細胞内サイトカイン染色法を用いて定量した。さらに同条件で培養したT細胞における、c-maf、IL-21、IL-23受容体、およびNR4A2とROR γ tの発現を、それぞれ定量PCR法を用いて経時的に比較した。コラーゲンマトリクスに封入して安定化させたsiRNAを、EAEを誘導したB6マウスに静脈投与して、病態抑制効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、ヒトを対象とする医学系研究に対する倫理指針に基づいて作成した実験計画書をセンター内の倫理委員会提出し、その承認を受けた上で研究を行った。インフォームドコンセントを得た上で、患者あるいは健康人の末梢血を採取した。また本研究においては、あらかじめ当研究所の動物実験規定に沿って作成した実験計画書を提出し、実験動物委員会の承認を受けた実験方法に従って、研究を進めた。

C. 研究結果

MOG誘導性EAEを発症したマウスの中枢神経系(CNS)に浸潤したT細胞および末梢血T細胞

では、IL-17産生細胞に局限してNR4A2の高発現が認められ、T細胞のIL-17産生能とNR4A2発現が強く相関することが明らかとなった。またあらかじめNR4A2特異的siRNAをトランスフェクションしたナイーブT細胞をTh17細胞分化条件下に刺激すると、得られたTh17細胞中のNR4A2発現とIL-17産生をほぼ完全に消失したが、Th17細胞のマスターレギュレーターであるROR γ t発現およびTh1細胞のIFN- γ 産生は変化しなかった。さらにNR4A2特異的siRNAは、Th17細胞分化に必須の因子であるT細胞のIL-21産生と、それに引き続くIL-23受容体発現を強く抑制した。同様にコラーゲンマトリクスに封入したNR4A2特異的siRNAをマウスに静脈投与すると、EAE病態が顕著に軽快した。この時、CNS浸潤T細胞と所属リンパ節T細胞のIL-17産生は、いずれも有意に抑制された。樹立したNR4A2cKOマウスにMOGペプチドを免疫してEAEを誘導すると、初期の急性期病態はほぼ完全に抑制され、CNSへの浸潤細胞数および再刺激後のCNS浸潤T細胞のIL-17産生はいずれも低下した。ところがMOGペプチドを免疫した誘導したNR4A2cKOマウスでは、2~3週間遅れて対照マウスと酷似した新たなEAEを発症した。この後期EAE病態発症時にCNSに浸潤したT細胞はIL-17を産生せず、ユニークなマーカー遺伝子を発現するT細胞であることがわかり、移入実験により極めて強い病原性が確認された。同遺伝子を標的に作製したsiRNAを*in vivo*投与することにより、NR4A2cKOマウスの後期EAE病態は有意に改善した。興味深いことに、ヒト末梢血におけるこのマーカー遺伝子発現T細胞の頻度を調べると、RRMS患者における頻度は健康人と差がなく低値にとどまったが、SPMS患者では有意に増加していることが明らかとなった。

D. 考察

寛解期RRMS患者末梢血およびEAEマウスの末梢血およびCNS浸潤T細胞で発現が亢進するNR4A2分子に関して、病態形成に深く関わるこ