

表1. 高IgE血症とダニ特異的IgE陽性のMNM7例の臨床像

症例	1	2	3	4	5	6	7
年齢/性	38/F	25/M	60/M	40/F	13/F	36/M	48/M
発症	急性	急性	急性	急性	亜急性	急性	急性
アトピー性疾患	アトピー性皮膚炎	食物アレルギー (エビ、カニ)	(-)	食物アレルギー	アレルギー性鼻炎	食物アレルギー (マンゴー)	食物アレルギー (サバ)
血清全IgE (U/ml)	795	490	800	840	2040	360	292
好酸球 (%)	1.5	2	1.8	1.8	10	1.6	5.9
病型	MNM	MNM	MNM	MNM	MNM	MNM	MNM
神経症候の分布	感覚運動型	感覚運動型	感覚運動型	感覚型	運動型	感覚運動型	感覚運動型
電気生理学的検査	軸索障害型 右腓骨神経 CMAP低下 右浅腓骨神経 SNAP誘発(-)	軸索障害型 右正中神経 CMAP低下 両側腓骨神経 CMAP低下	軸索障害型 右腓骨神経 CMAP誘発(-) 両側腓腹神経 SNAP低下	軸索障害型 両側腓腹神経 SNAP誘発(-) 左正中、尺骨神経 F波誘発(-)	軸索障害型 右尺骨神経 CMAP低下	混合型 両側正中神経 MCV低下 伝導ブロック	混合型 両側脛骨神経 MCV低下 伝導ブロック 両側腓腹神経 SNAP誘発(-)
Hughesらの重症度分類	1	2	1	1	1	2	1
中枢神経病変の合併	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	頸髄、延髄、小脳歯髄、橋、視神経	
治療	ステロイド単独	ステロイド単独	ステロイド単独	ステロイド単独	治療(-)	ステロイド単独	治療(-)
ステロイド治療効果	効果的	効果的	無効	効果的		効果的	
長期予後	良好	良好	良好	良好	良好	良好	経過観察中

CMAP:複合運動活動電位, MCV:運動神経伝導速度, SNAP:感覚神経活動電位

表2. 末梢血 CD4 陽性 T 細胞内サイトカイン

	IL-4 ⁺ /IFN γ	IL-4 ⁻ /IFN γ ⁺	IL-4 ⁺ /IFN γ ⁺	IL-4 ⁻ /IFN γ ⁻	IFN γ /IL-4 ratio
多発単神経炎 (n=6)	3.37 ± 0.82	17.8 ± 5.97	1.89 ± 0.69	75.6 ± 8.4	5.27 ± 1.1*
GBS (n=10)	3.61 ± 2.73	20.19 ± 7.59	1.64 ± 0.83	74.6 ± 9.3	8.33 ± 5.38
変性神経疾患 (n=23)	3.28 ± 1.52	18.6 ± 5.15	2.16 ± 1.25	76.0 ± 6.65	7.01 ± 3.88
健常対象 (n=36)	2.89 ± 1.29	18.3 ± 6.27	1.88 ± 0.96	76.9 ± 6.87	7.38 ± 4.70

* P<0.05

表3. 末梢神経伝導速度検査

	上肢					下肢				
	全	運動	感覚	F波の異常率	F波の出現率	全	運動	感覚	F波の異常率	F波の出現率
全MS(n=26)	7/26(28.0)	6/26(23.1)	5/24(20.8)	3/25(7.5)	86.4±12.2	3/26(11.5)	2/26(7.7)	3/26(11.5)	4/23(17.4)	93.3±7.9
アジア型MS(n=13)	5/13(38.5)	4/13(30.8)	4/12(33.3)	3/13(23.1)	83.3±15.3	3/13(23.1)	2/13(15.4)	3/13(23.1)	1/11(9.1)	94.5±8.5
西洋型MS (n=13)	2/13(15.4)	2/13(15.4)	1/12(8.3)	0/12(0)	89.8±6.5	0/13(0.0)	0/13(0.0)	0/13(0.0)	3/12(25)	92.5±7.7
アトピー性脊髄炎	10/17(58.8)	7/17(41.2)	8/15(53.3)	10/17(58.8)	67.8±15.6	3/13(23.1)	1/13(7.7)	2/11(18.2)	4/14(28.6)	88.0±16.4
アトピー性皮膚炎有り (n=6)	3/5(60.0)	2/5(40.0)	3/5(60.0)	5/5(100)	64.0±8.2	1/3(33.3)	1/3(33.3)	0/1(0)	0/3(0)	92.0±6.9
アトピー性皮膚炎無し (n=12)	7/12(58.3)	5/12(41.7)	5/10(50.0)	5/12(41.7)	69.5±17.9	2/10(20.0)	0/10(0.0)	2/10(20.0)	4/11(36.4)	86.9±18.2

()内は異常率(%)

表れの1つとして脊髄・末梢神経も障害され得ることを強く示唆する。実際今回の検討により、高IgE血症とダニ特異的IgE陽性のMNMの存在が表明らかとなり、また、アトピー性脊髄炎でも潜在的な神経根や末梢神経病変の合併が示唆された。

文献

1) Kira et al. J Neurol Sci 148:199-203, 1997

2) Kira et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 64:676-679, 1998
 3) Kira et al. J Neurol Sci 166:53-57, 1999.
 4) Horiuchi I, et al. J Neurol Sci 166:77-80, 1999.
 5) Horiuchi I, et al. J Neurol Sci 172:17-24, 2000.

多発性硬化症における臨床病型と免疫病態の関連についての検討

藤原一男¹⁾、中島一郎¹⁾、三須建郎¹⁾、小野寺 宏¹⁾、
松本 陽²⁾、池 映欣²⁾、糸山泰人¹⁾

目的

近年多発性硬化症(MS)の研究において、本邦を含めたアジア諸国に比較的多い臨床病型として視神経脊髄型MS(OS-MS)が注目を集めている。欧米に多い通常型(C-MS)と比べて、OS-MSでは病変が視神経と脊髄に限局するという臨床的特徴とともに、Oligoclonal IgG Bands(OB)の陽性率が低い、頻度の高いHLA class II 遺伝子型が異なるなどの免疫学的な相違がみられる。今回、我々はこの2つの臨床病型における液性及び細胞性免疫について比較検討したので報告する。

方法

(1)サイトカイン、ケモカイン、接着因子の検討

MS患者19例(女性16例、男性3例、平均年齢は37.4歳[22~74歳]、OS-MS 6例、C-MS 13例)の再発時の血液中のTNF- α 、interferon- γ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、可溶性IL-2受容体、MIP-1 α 、MCP-1、RANTES、ICAM-1、VCAM-1及び髄液におけるTNF- α 、IL-6、IL-8、IL-10、RANTESの濃度をELISA法にて測定し、OS-MS群とC-MS群で比較検討した。

MS患者16例(女性13例、男性3例、OS-MS 3例、C-MS 13例)の再発時の血液及び髄液中のCD4陽性リンパ球のケモカインレセプター(CXCR3、CCR5、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4)の発現をフローサイトメーターを用いて比較解析した。

(2)T細胞受容体(TCR)の検討

20例のMS患者(女性17例、男性3例、平均年齢は36.4歳[18~64歳]、OS-MS 4例、C-MS 16例)の末梢血リンパ球25サンプルを用いた。再発時の治療前の検体が18例、寛解期が7例であった。TCR β 鎖1~24に対するプライマーを用いたRT-PCRを施行し、PCR産物を電気泳動し、そのスペクトラタイプ・パターンを蛍光イメージアナライザーで記録した。この検索でスペクトラタイプ増幅が認められたバンドを切り出し、cDNAを抽出して、再度PCRを行った。このPCR産物をクローニングした後、CDR3領域の塩基配列を決定した。また、DRB1*1501の有無、臨床病型(OS-MS、C-MS)、及び再発時の症候(視神経炎、脊髄炎、脳幹症候)と増幅のみられたスペクトラタイプとの関連を検討した。

結果

(1)OS-MSでは血中及び髄液中のIL-6濃度がC-MSより高く、一方C-MSではOS-MSに比べて血中のIL-10及びRANTESが高い傾向を示したが両群で有意差はみられなかった。なおOBは19例中10例(53%)で陽性で、6例のOS-MSのうちOB陽性は1例のみだった。MSの再発時には、髄液中の単核球におけるCD4/CD8比が血液中の比に比べて有意に高かった。またMSの髄液中のTh1関連ケモカインであるCXCR3及びCCR5を発現しているCD4及びCD8陽性細胞の割合が血液中の値に比較して有意に上昇していた(表1)。MSの血液中のCCR5発現CD4陽性細胞は対象群の血液中の値より有意に高かった(表1)。一部の症例では髄液中のCCR1の上昇もみられた。Th2関連ケモカインではMSの髄液中のCCR2発現CD4陽性細胞は血液中の値に比べて有意に高かったが、一方、髄液中のCCR4陽性のCD4陽性細胞の割合は血液中に比べて低い傾向がみられた(表1)。OS-MSでは髄液中のCCR5発現CD4陽性細胞の割合(2.0 \pm 0.9%)がC-MS(7.9 \pm 4.1%)に比べて低い傾向がみられた。

(2)再発時のサンプルでは全例でいずれかのTCRスペクトラタイプの増幅が認められた。一方、寛解期のサンプルでは7例中3例が正常パターン、1例がほぼ正常パターンであった。頻度の高い増幅スペクトラタイプとしては、25サンプル中9サンプルにV β 5(V β 5.1が3例、V β 5.2が6例)の増幅がみられた。またV β 24の増幅が6例、V β 11の増幅が4例にみられた。DRB1*1501は20例中9例で陽性だったが、DRB1*1501陽性患者に特異的なスペクトラタイプ・パターンは明らかではなかった。また臨床病型や再発時の症候別にみても特異的なスペクトラタイプ・パターンはみられなかった。増幅スペクトラタイプ由来のクローンのCDR3領域の解析では、90%以上で特定のクローンが優位であった。多くの症例で、優位のCDR3領域のアミノ酸配列は各々の患者に特有だったが、V β 5.2は6例中3例でLYRGGNQPHFが優位で、この6例全例のレパトア構成も類似していた。

考察

(1)リンパ球表面マーカーの解析により、欧米の報告と同様に日本人のMSにおいても再発時に中枢神経内でTh1系が優位の炎症反応が生じていることが示唆された。今回の検討した血液及び髄液中の可溶性因子(サイトカイン、ケモカイン、接着因子)の濃度はOS-MSとC-MSの2つの病型において有意差はみられなかった。しかし、OS-MS

1)東北大学大学院医学系研究科神経科学講座神経内科学分野

2)東京都神経科学総合研究所神経病理部門

表1. 再発時の多発性硬化症において発現が増加しているケモカインレセプター[増加していないものは(-)で示した]

Th1		Balashov KE ⁽¹⁾			Sorensen TL ⁽²⁾			Present report	
		Blood	CSF	Brain	Blood	CSF	Brain	Blood	CSF
↑	CCR5+	CD3+		m, MNC	(-)	CD4+, CD8+	m, M, MNC	CD4+	CD4+, CD8+
↑	CXCR3+	CD3+		LC	(-)	CD4+, CD8+	LC(CD3+)	(-)	CD4+, CD8+
↑	CCR1+			M, m			MNC	(-)	CD4+, CD8+
↑	CCR2+			M, m				(-)	(-)
↓	CCR3+	(-)					MNC	(-)	CD4+
↓	CCR4+	(-)						(-)	(-)

MNC: mononuclear cell LC: lymphocyte M: macrophage m: microglia

(1) Balashov KE, et al. Proc. Natl. Acad. USA Vol. 96: 6873-8, 1999

(2) Sorensen, TL, et al. J. Clin. Invest. Vol.103: 807-815, 1999

表2. 再発時の多発性硬化症患者の末梢血においてオリゴクローナルな増殖を示すTCR スペクトラタイプ

V β	total No.	DRB1*1501	
		(+)	(-)
1	2	1	1
3	1	0	1
4	1	0	1
5.1	3	1	2
5.2	6	4	2
7	1	1	0
8	1	1	0
9	1	1	0
11	4	1	3
13	1	1	0
14	1	1	0
15	2	0	2
16	1	1	0
22	1	0	1
24	6	2	4

の症例数がC-MSに比べて少なく、今後さらに多数例での検討が必要であろう。

(2)これまでのMS患者における疾患関連TCRの報告では結果は様々で一定の見解は得られていない。今回、Vβ5の頻度が比較的高かったが、現時点ではC-MSとの関連があるDRB1*1501や臨床病型、再発時の症候などに特異的なスペクトラタイプ・パターンはみられなかった。また患者全体にCDR3領域の共通のモチーフ構造は見いだせず、再発時の活性化T細胞のTCRは患者毎に異なるものと思われる。

まとめ

(1)今回のケモカインレセプターの解析によりMSの再発時に中枢神経内でTh1系が優位の炎症反応が生じていることが示唆された。また血液及び髄液中の可溶性因子(サイトカイン、ケモカイン、接着因子)の濃度はOS-MSとC-MSにおいて有意差はみられなかった。

(2)MS症例の末梢血リンパ球のTCRβ鎖のCDR3領域のスペクトラタイピングを施行し、再発時には全例でいずれかのスペクトラタイプの増幅を認めた。しかしながら現時点では、DRB1*1501や臨床病型、再発時の症候などに特異的なスペクトラタイプ・パターンはみられなかった。またMS患者全体に共通のCDR3領域のモチーフ構造は見いだせなかった。

文献

1)Kira J, et al. Western versus Asian types of multiple sclerosis: immunogenetically and clinically distinct disorders. *Ann Neurol*, 40: 569-574, 1996.

2)Nakashima I, et al. Oligoclonal IgG bands in Japanese multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*, 101; 205-206, 1999.

日本人 MS と DRB1 および DPB1 アレルとの関連

臨床型と性差の関与

菊地誠志¹⁾ 深澤俊行²⁾ 吉良潤一³⁾ 西村泰治⁴⁾ 田代 邦雄¹⁾

目的

多発性硬化症（以下 MS）は、自己免疫疾患と考えられており、複数の遺伝子と環境因子とが複雑に関与して発症するものと考えられる。MS と診断される症例のなかで、臨床症状から推定される病変が視神経と脊髄に限局する、いわゆる視神経脊髄型 MS（以下 OS-MS）とよばれる一群が知られ、アジア諸国に特徴的に多い病型とされる。本研究は、OS-MS および通常型 MS と HLA-class II 遺伝子多型との関連を検討し、わが国の MS の免疫遺伝学的背景を明らかにすることを目的とする。いっぽう、性差の免疫機構への影響、さらに MS の臨床像の多様性は広く知られている。したがって、今回われわれは、九州および北海道在住の多数例の多発性硬化症（以下 MS）と HLA-DRB1 および DPB1 との関連を臨床型（視神経脊髄型 / 通常型）、性差、臨床経過、重症度の関与を含め、多変数解析を用いて分析した。

対象

対象は最低一年以上経過観察している臨床的に診断確定な再発寛解型 MS あるいは二次的進行型 MS 166 例である。そのうち神経症状が視神経および脊髄に限局した OS-MS が 47 例（九州 29 例、北海道 18 例）、通常型が 119 例（九州 43 例、北海道 76 例）であった。視神経炎のみ、脳幹症状のみ、横断性脊髄炎のみを再発する例は除外した。対照は健常ボランティア 164 名を用いた。

方法

HLA-typing - 九州在住の患者 72 例と対照者 83 名は PCR-SSOP 法を、北海道在住の 94 例と対照者 71 名は reverse dot blot hybridization 法を用いて検討した。

統計処理 - まず、得られた HLA アレルの phenotype 頻度を九州と北海道それぞれでカイ二乗検定または Fisher's exact test を用いて単変数解析した。多重比較は Bonferroni 法にて対処し、得られた補正前 P 値に $74 (= [13 + 24] \times 2)$ を掛けて補正後 P 値とした。患者群、

対照群、いずれにおいても九州と北海道の間に有意差のないことを確認したうえで、合算した対象数にて同様の検討を行い、さらに、男女に分けて層別解析を行った。単変数解析にて疾患感受性との相関が示唆されたアレルに関しては当該アレルの有無、性差、および年齢を独立変数、MS の有無を従属変数としたロジスティック回帰分析を行った。さらに、性差、年齢、罹病期間を考慮したうえでの各アレルの EDSS および臨床経過（再発寛解型か二次的進行型か）に与える影響を重回帰分析あるいはロジスティック回帰分析にて検討した。

結果

患者群の臨床背景 - 年齢、発症年齢、EDSS score はいずれも OS-MS で有意に高かった（表 1）。その他の臨床像、経過、MRI 所見なども、これまで報告してきた OS-MS あるいは通常型 MS の特徴をよく反映していた。

HLA 背景 - OS-MS 群では DPB1*0301 陽性例は一例もなく、DPB1*0501 陽性例が対照群に比して統計学的に有意に高率であった（表 2）。いっぽう、通常型 MS では対照群に比して DPB1*0301 が統計学的に有意に高率であった（表 2）。また、補正後の P 値は有意水準に達しないものの、DRB1*1501 は通常型 MS において対照群より高率であり（補正前 $P = .0064$ ）、これまでの日本を含めた多くの報告とから本アレルと通常型 MS の関連が強く示唆された。年齢、性差を考慮したロジスティック回帰分析からは通常型 MS と DPB1*0301、DPB1*0501、DRB1*1501 それぞれとの独立した有意な相関が認められた（表 3）。また、これらアレル間の MS 発症に対する交互作用は認めなかった。いっぽう、男女別の層別解析からは DPB1*0501 および DRB1*1501 は女性患者群でのみ有意に高率で男性患者群での陽性率は対照男性群と同じであった（表 4）。各アレルと重症度、臨床経過との間にあきらかな相関は認められなかった。

考察

今回の共同研究は多数例の MS 患者と HLA class II との関連に関するアジアで初めての多変数解析を含めた検討である。DPB1*0501 と OS-MS との有意な相関はすでに報告されているが、今回はより多数例を対象として OS-MS と DPB1*0501 との強い相関が示された。いっぽう DPB1*0301 は OS-MS には一例も認められず、本アレル

- 1) 北海道大学神経内科
- 2) 北祐会神経内科病院
- 3) 九州大学神経内科
- 4) 熊本大学免疫識別学

ルが OS-MS の疾患抵抗性因子である可能性が示唆された。また今回、通常型 MS と DPB1*0301 との有意な相関をわが国ではじめて報告した。DPB1*0301 と MS との相関は欧米の報告でも示されており、本アレルと MS 発症との関連が人種差を超えて重要である可能性がある。さらに、最近わが国でも確認されているように、DRB1*1501 と通常型 MS の関連も今回示され、DPB1*0301 と DRB1*1501 がともに人種差を超えて通常型 MS の発症に重要かもしれない。そして、日本においては DPB1*0301 がもっとも強く通常型 MS と関連しているといえる。免疫応答に対する性差の影響はよく知られているが、今回の検討から MS と HLA class II との関連が男女で異なることが示された。MS の発症機序を考える際には性差の影響を十分に考慮する必要がある。

まとめ

DPB1*0501 は OS-MS 発症に強く関連し、いっぽう DPB1*0301 は OS-MS に抵抗性に働いている可能性がある。DPB1*0301、DPB1*0501、DRB1*1501 はそれぞれ独立して通常型 MS の発症と関連しているが日本では DPB1*0301 との関連がもっとも強力である。また、MS の発症機序に性差が関与している。いっぽう、HLA class II 分子は疾患予後へはあきらかな影響を有していないようである。

文献

- 1) Kira J. et al. Western versus Asian types of multiple sclerosis: Immunogenetically and clinically distinct disorders. *Ann Neurol* 40: 569-574, 1996.
- 2) Yamasaki K. et al. HLA-DPB1*0501 associated optico-spinal multiple sclerosis: clinical, neuroimaging and immunogenetic studies. *Brain* 122: 1689-1696, 1999.
- 3) Fukazawa T. et al. Both the HLA-DPB1 and -DRB1 alleles correlate with risk for multiple sclerosis in Japanese: clinical phenotypes and gender as important factors. *Tissue Antigens* 54: 2000 (in press).
- 4) Fukazawa T. et al. Genomic HLA profiles of MS in Hokkaido, Japan: important role of DPB1*0501 allele. *J Neurol* 2000 (in press).
- 5) Dekker JW. et al. HLA-DPB1 alleles correlate with risk for multiple sclerosis in Caucasoid and Cantonese patients lacking the high-risk DQB1*0602 allele. *Tissue Antigens* 41: 31-36, 1992.
- 6) Yu M. et al. A Class II restriction molecule involved in Epitopic spreading during the development of multiple sclerosis. *Human Immunol* 59: 15-24, 1998.
- 7) Ono T. et al. Molecular analysis of HLA class I (HLA-A and -B) and HLA class II (HLA-DRB1) genes in Japanese patients with multiple sclerosis (Western type and Asian type). *Tissue Antigens* 52: 539-542, 1998.

表1. 臨床背景

	OS-MS (n=47)	C-MS (n=119)	total MS (n=166)
男:女	10(21.3%) ^a	39(32.8%) ^a	49(29.5%)
年齢	47.3±14.6 ^b	36.9±11.0 ^b	39.9±13.0
発症年齢	36.9±13.9 ^c	26.3±9.3 ^c	29.3±11.8
罹病期間	10.4±7.9	10.7±8.7	10.6±8.5
EDSS	5.2±2.3 ^d	3.8±2.7 ^d	4.2±2.6

OS-MS: Optico-spinal MS (視神経脊髄型 MS)

C-MS: Conventional MS (通常型 MS)

EDSS: Expanded disability status scale of Kurtzke

^aP=.1864, ^bP<.0001, ^cP<.0001, ^dP=.0015

表2. HLA-DPB1 各アレルの陽性頻度

DPB1	OS-MS n=47	C-MS n=106	Total MS n=153	Controls n=163
0201	34.0	41.5	39.2	33.7
0202	2.1	4.7	3.9	4.9
0301	0.0 ^a	23.6 ^{ab}	16.3	8.6 ^b
0401	14.9	2.8	6.5	11.7
0402	12.8	10.4	11.1	18.4
0501	93.6 ^c	72.6	79.1 ^d	60.7 ^{cd}
0601	2.1	0.0	0.7	4.3
0901	14.9	15.1	15.0	19.6
1301	0.0	1.9	1.3	4.3
1401	0.0	0.9	0.7	4.3
1601	0.0	0.0	0.0	0.6
1701	0.0	1.9	1.3	0.6
1901	0.0	0.9	0.7	0.6

OS-MS: Optico-spinal MS (視神経脊髄型 MS)

C-MS: Conventional MS (通常型 MS)

^a Corrected P<.0074

^b Corrected P=.0444, OR=3.28, 95%CI=1.66-6.50

^c Corrected P<.0074, OR=9.48, 95%CI=3.27-26.6

^d Corrected P=.0296, OR=2.44, 95%CI=1.49-4.01

表3. ロジスティック回帰分析の結果

	chi-square	P	aOR	95%CI
通常型 MS				
DPB1*0301(+ vs -)	12.4	.0004	4.71	1.99 - 11.1
DPB1*0501(+ vs -)	7.00	.0081	2.50	1.27 - 4.93
DRB1*1501(+ vs -)	5.01	.0252	2.21	1.10 - 4.44
視神経脊髄型 MS				
DPB1*0501(+ vs -)	10.6	.0011	10.4	2.54 - 42.3

aOR: adjusted odds ratio

表4. DPB1*0301、DPB1*0501、DRB1*1501 の陽性頻度の男女別層別解析

	女性			男性		
	OS-MS	C-MS	controls	OS-MS	C-MS	controls
	n=38	n=70	n=75	n=9	n=36	n=84
DPB1*0301	0.0	21.4 ^c	5.3 ^c	0.0	27.7 ^d	9.5 ^d
DPB1*0501	94.7 ^e	81.4 ^{ef}	66.7 ^{ef}	88.9 ^e	55.6 ^a	54.8 ^e
	n=38	n=79	n=74	n=8	n=38	n=82
DRB1*1501	10.5	36.7 ^h	16.2 ^b	12.5	18.4 ^b	17.1

OS-MS: Optico-spinal MS (視神経脊髄型 MS)

C-MS: Conventional MS (通常型 MS)

P^a = .0047, P^b = .0447, P^c = .0059 (OR = 4.84), P^d = .0103 (OR = 3.65), P^e = .0008 (OR = 9.00), P^f = .0434 (OR = 2.19), P^g = .0743 (OR = 6.61), P^h = .0042 (OR = 3.00)

アジア型多発性硬化症におけるミエリン蛋白自己反応性 T 細胞の解析

吉良潤一¹⁾、三野原元澄^{1,2)}、堀内泉¹⁾、吳暁牧¹⁾、山崎賢智¹⁾、松下祥²⁾、西村泰治²⁾

目的

多発性硬化症(MS)の疾患感受性遺伝子としては、欧米白人においては HLA-DRB1*1501 が知られている。我々は、日本人の MS 患者において、通常型(西洋型)MS は欧米白人と同様に HLA-DRB1*1501 と正の相関を示すのに対し¹⁾、アジア人種に多いとされる視神経-脊髄型(アジア型)MS は HLA-DRB1*1501 とは相関せず、HLA-DPB1*0501 と正の相関にあることを報告してきた²⁾。アジア型 MS は西洋型 MS と比べ、臨床的に 1) 女性の罹患率が高い、2) 発症年齢がより高齢、3) 再発しやすい、4) 総合障害度が高い、5) 脳 MRI 上の病巣が少ない、6) 脊髄 MRI で異常信号域の長さが長く、萎縮を呈しやすい、7) 髄液細胞・蛋白増加が高度、などの特徴を示す^{1,3)}。本研究は臨床的、免疫遺伝学的に異なる日本人の MS の 2 病型において、免疫学的相違を検討した。

対照・方法

アジア型 MS 患者 10 名(視神経-脊髄型 8 名、脊髄型 2 名)、西洋型 MS 患者 11 名、健常人 13 名より PBMC を分離し、ミエリン蛋白であるミエリン塩基性蛋白(MBP)、ミエリンプロテオリピッド蛋白(PLP)、ミエリンオリゴデンドログリア糖蛋白(MOG)のそれぞれのオーバーラッピングペプチドを合成し(MBP: 24 種、MOG: 21 種、PLP: 19 種、計 64 種)、全ての混合液を抗原として末梢血単核細胞(PBMC)を刺激することにより、ミエリン蛋白反応性 T 細胞株又はクローンを樹立し、その特徴を検討した。

結果

アジア型 MS 患者 5/10 名、西洋型 MS 患者 6/11 名、健常人 7/13 名よりミエリン蛋白自己反応性 T 細胞株を樹立した。ミエリン蛋白反応性 T 細胞株の 3 種それぞれのオーバーラッピングペプチド混合液に対する反応性は、アジア型 MS では全例において MOG に反応性を示し、それに対し MBP や PLP に対する自己反応性 T 細胞は半数に満たなかった(MBP: 2/5 例、PLP: 2/5 例)。西洋型 MS では、アジア型に見られるような偏りはなく、幅広く反応性を示した。健常人においては、ほとんどが 1 つの蛋

白あるいは 1 つのペプチドにのみ反応性を示した。

MBP 反応性 T 細胞の認識するペプチドは 4 種類認められた。このうち ¹⁷⁰MBP 132-152 は 4 名に認めるが(W: 2 名、N: 2 名)、アジア型 MS では認められなかった。MOG 反応性 T 細胞の認識するエピトープはアジア型 MS 患者では広範に分布していた。PLP 反応性 T 細胞の認識するペプチドは、アジア型 MS や健常群に比べ西洋型 MS では拡大する傾向にあった(図 1)。

ミエリン蛋白自己反応性 T 細胞の拘束分子は、MBP や MOG では、DR 分子に拘束されるものが多いのに対し、PLP では DQ 分子に拘束されるものが多い傾向にあった。DP 分子により拘束されるミエリン蛋白自己反応性 T 細胞は、アジア型 MS 患者 1 名(A4)より樹立された。この T 細胞株は ¹⁸⁶MBP 74-93、¹⁷⁰MBP 47-67 の 2 つのペプチドを認識し増殖反応を示した。¹⁸⁶MBP 74-93 のペプチドに対して、他にアジア型 MS 患者 1 名(A5)で増殖反応が認められたが、反応性が低く拘束分子の検討には至らなかった。

アジア型 MS 患者 A4 から樹立された、DP 分子に拘束される T 細胞株のクローニングを行い SS1.2 を得た。SS1.2 は、¹⁸⁰MBP 78-93、¹⁷⁰MBP 52-67 の 2 つのペプチド、更に MBP リコンビナント蛋白を認識し増殖反応を示す(図 2-a)。HLA クラス II 遺伝子をトランスフェクトした L 細胞を用いた解析により、SS1.2 の拘束分子は DPA1*0202/DPB1*0501 であると同定され(図 2-b)、更に SS1.2 は、CD4 陽性で IFN- γ を大量に産生する Th1 タイプのクローンであることがわかった(図 2-c)。また、コアエピトープ(¹⁸⁰MBP 80-93)を 1 残基ずつ他のアミノ酸に置換したアナログペプチドを合成し、その増殖反応を検討した結果、¹⁸⁰MBP 84, 86, 87, 89, 90 のアミノ酸残基が DP5 分子との結合と TCR による認識に関与することが示唆された(図 2-d)。

考察

我々は日本人の MS 患者で臨床的に異なる 2 つの病型において、それぞれ異なる HLA クラス II 対立遺伝子に疾患感受性があることを示してきた。また、北大との共同研究により DPB1*0301 対立遺伝子が西洋型では正の

¹⁾九州大学神経内科、²⁾熊本大学免疫識別学

	epitope	A1	A2	A3	A4	A5	W1	W2	W3	W4	W5	W6	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7
MBP	198MBP74-93				DP	-													
	47-67				DP														
	132-152								DR	DR			DR	DR					
	141-161				-		DR								DQ				
PLP	33-53							DQ											
	89-109															DR, DQ			
	95-115								DR										
	131-151					DR, DQ			DQ							DR, DQ	DQ		
	183-202						DQ												
	190-209						DQ												
	207-226								DQ										
	256-276									DR									
MOG	33-48				DR														
	35-55				DR														
	69-89																		
	78-97																		
	95-115	DR	DR																
	112-132					-													
	140-160	DR																	
	149-169	DR																	
	167-186					-													
	184-204					-													
	193-213	DR				-													

: 反応なし A : Asian type W : Western type N : Normal control
 : エピトープの同定不能 - : 反応性の低さなどにより拘束分子の同定不能

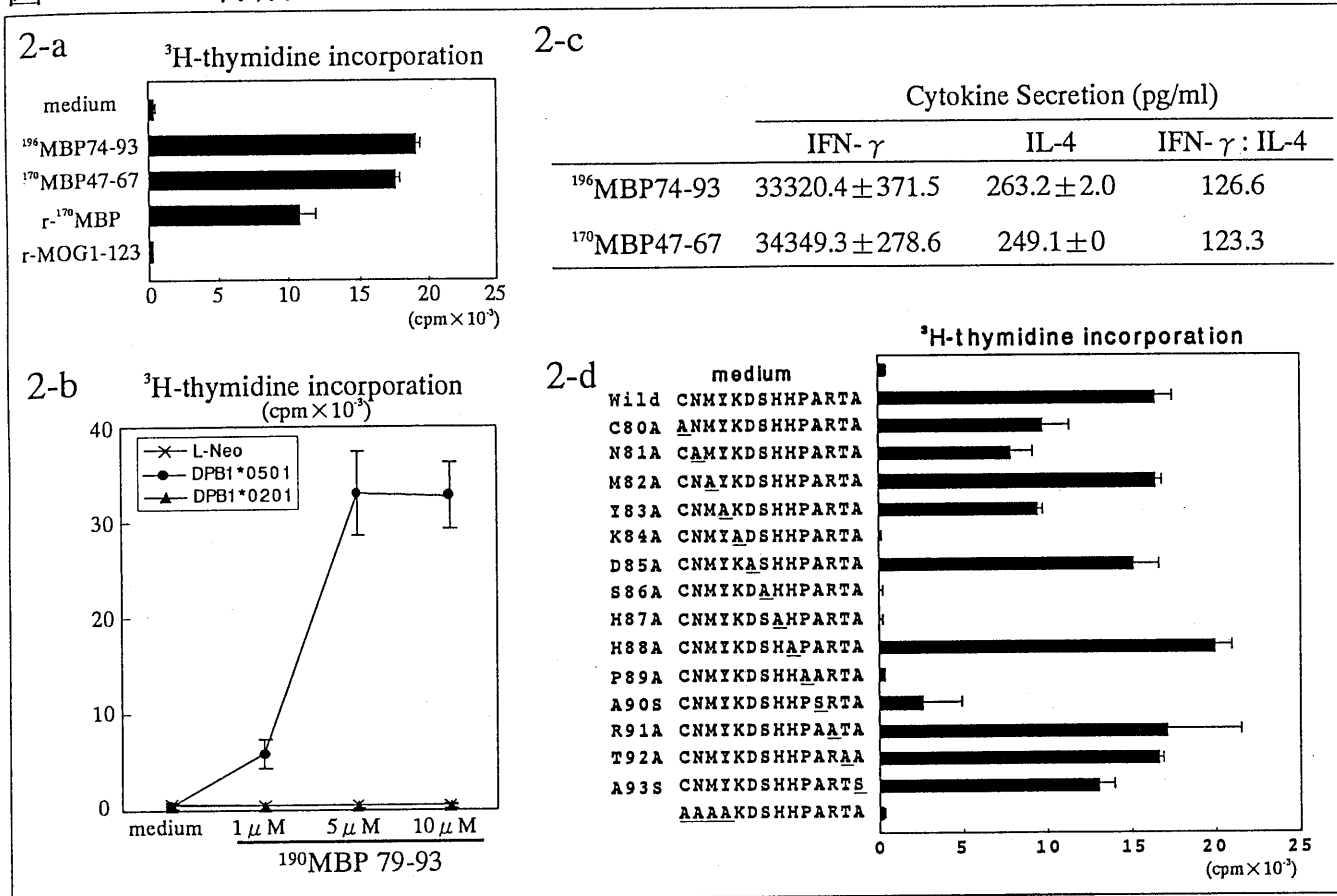
図1: ミエリン蛋白自己反応性 T細胞が認識するエピトープと拘束分子

相関にあるのに対し、アジア型では負の相関にあることを発見した。HLA 分子を構成するアミノ酸配列より、DPB1*0501 分子の、抗原ペプチドとの結合に最も重要な P1 のアンカーアミノ酸残基は正荷電、DPB1*0301 分子では疎水性のアミノ酸残基となっており、更に DR2 分子では脂脂肪酸であることから、西洋型とアジア型とは全く異なる抗原ペプチドを T 細胞に提示していることが予想された。今回、MS の経過中のある一時点におけるミエリン蛋白自己反応性 T 細胞を検索した結果として、健常人に比べ、MS 患者においては複数のエピトープ、或いは複数の蛋白に反応性を示す症例が多く、エピトープの拡大が示唆された。樹立された T 細胞株は西洋型では全てに幅広く、アジア型においては MOG 優位に反応性を示している。HLA クラス II 対立遺伝子と、アジア型、西洋型の病型形成との関連性を考える上で、疾患発症に関わる原因抗原蛋白の差、或いはその後の経過においてエピトープの拡がりの差がそれぞれの感受性を示す HLA クラス II 対立遺伝子により規定されうると考えられる。また、Storch ら⁹⁾の報告によると、BN ラットでは、MOG で EAE を誘導した場合、視神経-脊髄を主体として脱髄や炎症細胞浸潤が認められている。これらのことからアジア型における MOG 優位な反応性(エピトープの

拡大)が病型に対し何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。しかしながら、現時点において MOG 反応性 T 細胞において DP5 に拘束されるものは認められていない。これは通常発現している HLA クラス II 分子が、DR 優位に発現しているからなのかもしれない。この2つの病型において、それぞれ疾患感受性を示す HLA クラス II 分子に拘束される T 細胞の認識する抗原ペプチドを検索することは、アジア型、西洋型 MS の病型形成に関与する、原因抗原蛋白、或いはエピトープ拡大の傾向を知る上で非常に重要である。今後、このことを検討するためには、疾患感受性を示す HLA クラス II 分子のみを発現し、様々な抗原ペプチドを抗原提示し得る細胞集団の作製は不可欠である。

今回、アジア型 MS 患者 1 名より DP5 分子により拘束される MBP 反応性 T 細胞クローン(SS1.2)が樹立できた。SS1.2 の解析により、DP5 分子との結合、TCR に認識される抗原ペプチドのアミノ酸残基の位置が確認された。更に今後、DP5 結合モチーフを検討し、DP5 分子のみを発現し、様々なペプチドを抗原提示した細胞集団を作製、反応性を検討することで、アジア型 MS の原因抗原蛋白、或いはエピトープの拡大傾向を知りうるものと考えられる。

図2: SS1.2の特徴



結論

アジア型 MS 患者からミエリン蛋白自己反応性 T 細胞株を樹立でき、全例に MOG 反応性を認めた。MS 患者ではエピトープの拡大を認めたが、健常人では認めなかった。また、アジア型 MS 患者より、本病型と相関する DPA1*0202/DPB1*0501 分子に拘束された MBP 反応性 T 細胞クローンが樹立された。

文献

- 1) Kira J et al: Western vs. Asian types of multiple sclerosis: immunogenetically and clinically distinct disorders. *Ann Neurol* 40: 569-574, 1996.
- 2) Ito H et al: HLA-DP-associated susceptibility to optico-spinal form of multiple sclerosis in the Japanese. *Tissue Antigens* 52: 179-82, 1998.
- 3) Yamasaki K et al: HLA-DPB1*0501 associated optico-spinal multiple sclerosis: clinical, neuroimaging and immunogenetic studies. *Brain* 122: 1689-1696, 1999.

- 4) Storch MK et al: Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathology* 8: 681-694, 1998.

多発性硬化症における末梢血リンパ球細胞内サイトカイン解析の意義

松井 真 王 会雲 荒谷 信一 齋田 孝彦¹⁾

目 的

難治性の免疫性神経疾患である多発性硬化症 (MS) は、再発・寛解を繰り返す型から二次性進行性の経過を示す型への移行が少なからず存在し、予後を不良にすることが知られている。再発予防を目的に様々な免疫修飾療法が試みられているが、適切な治療法の選択には正確な疾患活動性の評価が不可欠である。今回われわれは、末梢血リンパ球の細胞内サイトカイン検知により、Th1介在性の疾患とされるMSの活動性をモニタリングすることを試みた。

対 象

診断の確定した再発寛解型MS患者5例(すべて女性、平均年齢54.2歳)について、計11回の検査を行った。うち2例は急性期およびメチルプレドニゾンによるパルス療法後ひと月を経過した回復期に、1例は同治療後の回復期の3カ月間に3回、あとの2例については6カ月以上続いた安定期に数カ月離れて2度の追跡調査を行った。11回の解析のうち、2例の急性期MS患者の一方の回復期は、臨床的かつMRI画像上もいまだ活動期にあると判断された。即ち3回のMS活動期および8回のMS非活動期に検索し得た。

方 法

1) T細胞で産生されるサイトカインのうち、IFN- γ とIL-2をTh1側の、IL-4をTh2側のサイトカインとして設定し、中枢神経系の脱髄に直接関与している可能性が示唆されているTNF- α も検索対象とした。

2) 一人につき8~16 mlの採血を行い、型通りFicoll-Paque比重遠沈法により末梢血単核球を取り出した後、0.2~1.0 x 10⁶/mlに調整し、Brefeldin A (20 μ g/ml)とMonensin (1 μ M)の存在下で培養した。刺激は最終濃度20ng/mlのPMAと2 μ g/mlのIonomycinにより、4時間かけて行った。

3) 上記の培養の後、細胞は洗浄し、PE標識抗CD4および抗CD8抗体を用いて摂氏4度下30分間で表面抗原を染色した。さらに、IntraPrep Reagent 1およびReagent 2 (Immunotech社)により表面膜の固定に引き続きpermealizationを行った後、FITC標識抗IFN- γ 、抗IL-2、抗IL-4抗体(以上Pharmingen社)および抗TNF- α

抗体(Becton Dickinson社)により細胞内のサイトカインを染色した(摂氏4度下45分間)。

4) 上記の二重染色の後、フローサイトメトリー(EPICS XL, Beckman Coulter社)を用いてリンパ球画分における蛍光陽性細胞を算定した。

結 果

1) 健常人1名で、新鮮血で得た結果と、同日に凍結保存したリンパ球を2週後に解凍して解析した結果を比較したところ、凍結細胞では、IFN- γ ・IL-2・TNF- α といったproinflammatory cytokineの著しい産生障害が認められた。IL-4については比較的よい再現性を示した。健常人での解析結果は、新鮮血を用いた場合バラツキが少なく、比較的小さな標準偏差の範囲の値を示した(表1)。

表1. 健常成人におけるリンパ球細胞内サイトカインプロフィール(百分率)

IFN- γ	n=7
CD4+IFN- γ +	11.8 \pm 4.4
CD8+IFN- γ +	19.4 \pm 7.9
IFN- γ +	44.5 \pm 16.8
IL-2	n=3
CD4+IL-2+	19.5 \pm 6.1
CD8+IL-2+	4.3 \pm 1.1
IL-2+	24.4 \pm 5.7
IL-4	n=7
CD4+IL-4+	2.9 \pm 1.9
CD8+IL-4+	1.4 \pm 1.4
IL-4+	7.9 \pm 6.9
TNF- α	n=3
CD4+TNF- α +	13.2 \pm 1.5
CD8+TNF- α +	8.2 \pm 6.7
TNF- α +	28.2 \pm 12.8

¹⁾ 国立療養所宇多野病院神経内科・臨床研究部

2) MS患者の追跡調査の結果、疾患活動性の低下から安定化への推移は、IL-4産生細胞の存在率の変化が比較的よく平行していた(表2)。また、安定期のMS患者における各サイトカイン産生細胞存在率は大きな変動を認めなかった(表3)。

表2. 急性期から回復期にかけての追跡調査

	59歳 女性		
	パルス療法前	パルス療法1M後	
CD4 ⁺ IFN- γ ⁺	17.7%	17.3%	
CD4 ⁺ IL-2 ⁺	25.7%	27.3%	
CD4 ⁺ IL-4 ⁺	0.6%	1.7%	
CD4 ⁺ TNF- α ⁺	12.5%	15.1%	

	31歳 女性		
	パルス療法前	パルス療法1M後*	
CD4 ⁺ IFN- γ ⁺	11.2%	8.9%	
CD4 ⁺ IL-2 ⁺	21.4%	21.9%	
CD4 ⁺ IL-4 ⁺	1.8%	1.8%	
CD4 ⁺ TNF- α ⁺	11.1%	12.1%	

	70歳 女性			
	パルス療法後	1M	2M	3M
CD4 ⁺ IFN- γ ⁺		13.0%	15.2%	13.3%
CD4 ⁺ IL-2 ⁺		26.3%	21.4%	29.5%
CD4 ⁺ IL-4 ⁺		0.7%	1.8%	2.3%
CD4 ⁺ TNF- α ⁺		19.4%	16.8%	20.6%

表3. 安定期患者における追跡調査

	45歳 女性	
	安定期	安定期7M後
CD4 ⁺ IFN- γ ⁺	11.3%	16.4%
CD4 ⁺ IL-2 ⁺	24.0%	16.8%
CD4 ⁺ IL-4 ⁺	1.6%	1.3%
CD4 ⁺ TNF- α ⁺	21.0%	13.3%

	66歳 女性	
	安定期	安定期3M後
CD4 ⁺ IFN- γ ⁺	24.1%	28.9%
CD4 ⁺ IL-2 ⁺	32.5%	31.3%
CD4 ⁺ IL-4 ⁺	3.8%	3.8%
CD4 ⁺ TNF- α ⁺	37.1%	35.3%

3) MS患者における11回の解析のうち、新たな神経症状やMRI上ガドリニウム造影病変の出現していた3回の解析(パルス前の急性期および*印の治療後1Mの時期)と、残りの8回の解析時を比較すると、非活動期にはむしろCD4⁺TNF- α ⁺の増加傾向が認められた(12.9% vs. 22.0%, p=0.066 by Mann-Whitney U test)。

考 按

凍結細胞において結果の再現性が不良であるのは、解凍後のPMAとionomycinによる刺激の効率が、細胞の4時間培養中の状態によりまちまちであるためと考えられた。これは、新鮮血で検査を行うことを原則にすることで解決し得る問題であると判断された。

臨床経過と対比させてみると、MSの疾患活動性の安定化ともいべき状態とよく相関する指標は、IL-4陽性細胞の存在率であった。本方法による細胞内サイトカインプロファイルの解析は、抗原非特異的な方法を行っているため、bulk Th1という形でIFN- γ やIL-2陽性細胞を解析しても、疾患に直接結びつく疾病惹起性のクロンの増加は検知できないものと推定された。対照的に、IL-4で代表されるTh2細胞の存在率の推移は、抗原の特異性に関わらず、炎症性の病態を制御する細胞集団のbulkな活性の指標として使用できる可能性が示唆された。

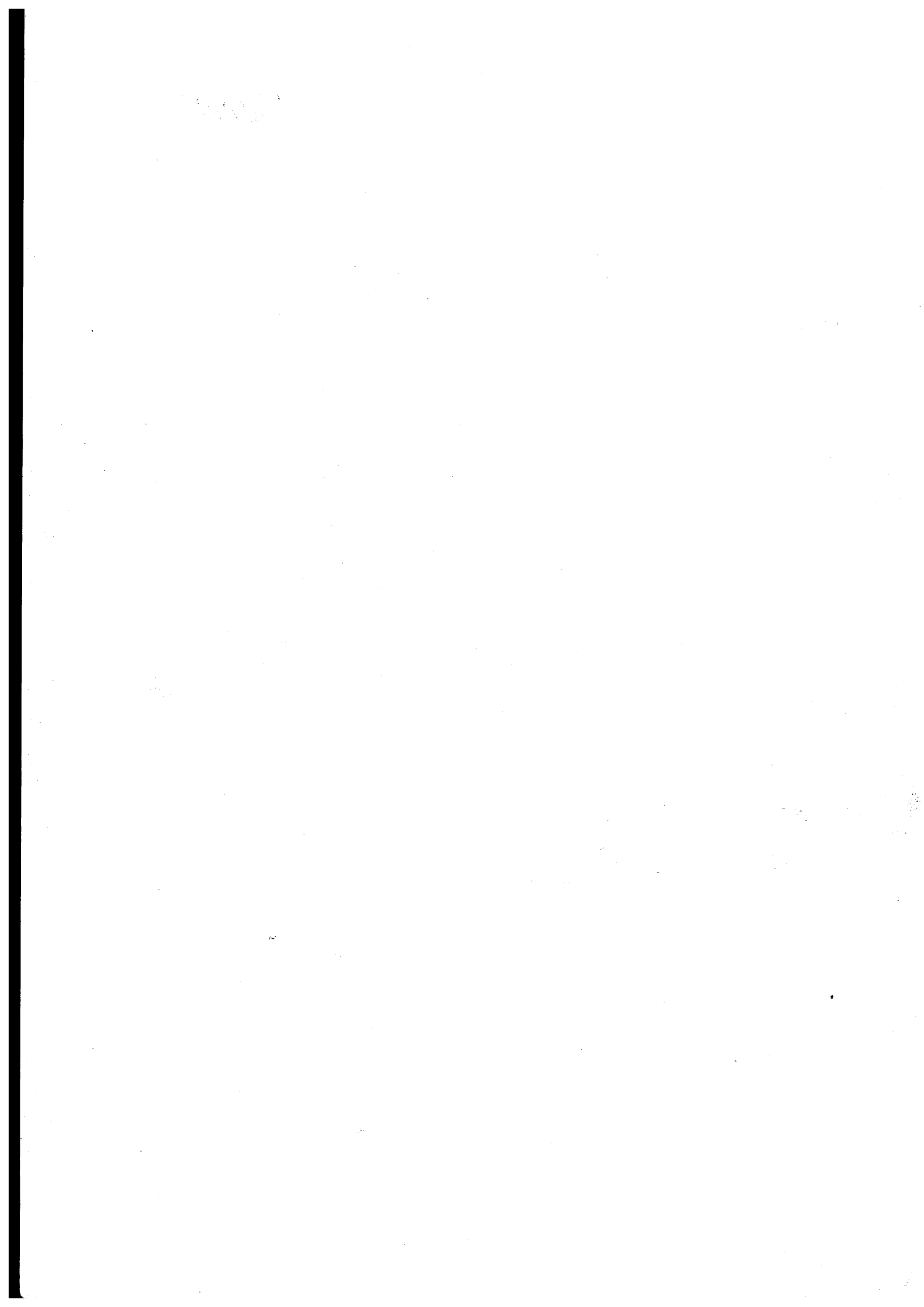
ところで、活動期のMS患者末梢血では、本報告と同様、TNF- α 陽性のリンパ球がかえって減少していたとする報告も存在する。本現象の意義を明らかにするためには、活動期MS患者の髄液中に存在するリンパ球における細胞内TNF- α を、同様な方法、もしくはin situ hybridizationやELISPOT法を用いて解析し、中枢神経内へ多数のTNF- α 陽性細胞が浸潤することが末梢血での減少をもたらしているのか、それともむしろ末梢血循環系におけるTNF- α 陽性細胞は免疫制御性の機能を担っており、その減少がMSの病態の増悪をもたらしているかを明らかにする必要があると考えられた。

ま と め

- 1) 末梢血リンパ球のサイトカイン産生能をflow cytometryで解析する場合、新鮮血で行う必要がある。新鮮血使用により再現性のよい結果が得られた。
- 2) 多発性硬化症の疾患活動性の軽快傾向の指標としては、IL-4産生細胞存在率の上昇が適していた。

文 献

- 1) Jung Tet al: Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. J Immunol Methods 159: 197-207, 1993
- 2) Krouwels FH et al: Immunocytochemical and flow cytometric detection of intracellular IL-4, IL-5 and IFN- γ : applications using blood- and airway-derived cells. J Immunol Methods 203: 89-101, 1997



多発性硬化症におけるビタミンD受容体及びエストロゲン受容体遺伝子多型についての検討

菊地 誠志¹⁾ 新野 正明¹⁾ 深澤 俊行²⁾ 矢部 一郎¹⁾ 田代 邦雄¹⁾

目的

多発性硬化症 (MS) は、日光の少ない高緯度地域の若年女性に多く発症し、妊娠・出産による再発率への影響が指摘されている。これらの理由は解明されていないものの、ビタミンDやエストロゲンなどのステロイドホルモンの関与が考えられている。さらに、最近、ビタミンDやエストロゲンの免疫抑制作用も報告され、MSの動物実験モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) では、それぞれのホルモンの投与により、その発症を遅らせたり、症状を軽減させたりすることが報告されている。そこで、我々は、MSの症状ないし病状の進展などにビタミンD受容体遺伝子 (VDRG) 及びエストロゲン受容体遺伝子 (ERG) を介したビタミンDやエストロゲンの関与の可能性を想定し、VDRG及びERGの多型とMSとの関連の有無を検討した。

対象

対象は最低1年以上経過している臨床的に診断確実な通常型MS患者及び健常対照者で、VDRGにおいては患者77例 (男21名、女56名; 平均年齢36.2歳)、対照95例 (男33名、女62名; 平均年齢34.4歳) で、ERGの検討では患者79例 (男22名、女57名; 平均年齢36.6歳)、対照73例 (男16名、女57名; 平均年齢34.5歳) で行った。

方法

MS患者及び健常対照者に十分な説明を行い、同意が得られた方からのみ末梢血より採血を行い、得られたDNAを用いてPCR-RFLP解析を行い、VDRGにおいては制限酵素Apa IないしBsm Iにてそれぞれ遺伝子多型AA, Aa, aa及びBB, Bb, bbを、ERGにおいては、制限酵素Pvu IIないしXba Iにてそれぞれ遺伝子多型PP, Pp, pp及びXX, Xx, xxを得た。その後、それぞれの多型を患者-対照間で比較検討し、また、MRIを含む臨床像、HLA背景、oligoclonal bandの陽性率などとの関連を検討した。

結果

VDRG多型の検討では、MS患者において、臨床像、経過及びMRI所見とVDRG多型との間に関連はなかった。一方、それぞれの多型におけるMS患者及び健常対照者間における検討では、Apa IのgenotypeにおいてAAが、そしてallele frequencyの検討では、A alleleの割合がMS患者群で有意に高率であった。また、Bsm Iにおける検討では、genotypeにおいてbbが、そしてallele frequencyの検討ではb alleleを有する頻度が対照群と比較してMS群では有意に高率であった (Table 1)。VDRG多型とHLA多型との相関では、A allele (+)のMS群ではA allele (+)の対照群およびA allele (-)のMS群と比較してDPB1*0501が補正後でも有意に高率であった。(それぞれ $P_c=0.0319$, $P_c=0.0165$) (Table 2)。また、haplotype bAを有するMS群は、haplotype bAを有する対照群およびhaplotype bAを有さないMS群よりも高率にDRB1*1501を有していたが (それぞれ $P_{unc}=0.0431$, $P_{unc}=0.0089$) (Table 3)、補正後の検討では有意な値までにはならなかった。

一方、ERG多型の検討では、Pvu II多型において、PP, Pp及びP alleleの割合が、MS群において有意に高かった (それぞれ $P=0.0005$, $P=0.0004$) (Table 4)。Xba I多型の検討では、MS患者群とControl群の間に、特に有意な相関は認めなかった。一方、臨床像、経過とERG多型との間の関連については、Xba I多型とMSの発症年齢の検討において、特に男性患者において、Xxを有する群の発症年齢が、XXないしxxを有する群より高い傾向にあったが、恐らく症例数が足りないためだと思われるが、分散分析の結果有意な値までは届かなかった (Table 5)。尚、それ以外の臨床像 (病型、MRI所見、HLA、OCB陽性) との検討では、特記すべき有意な相関は認められなかった。

考察

今回我々が検討したVDRG及びERGにおいては、その一部の多型が対照よりMS患者で有意に高率であったことから、VDRGやERGがMSの発症機序に関係している可能性が示唆される。VDRGの検討から、MSの発症にHLAとVDRGが協同的に作用している可能性を示すとともに、MSとHLAとの相関を検討する際には、他の遺伝的背景の関与を考慮すべきことも示している。HLA以

1) 北海道大学神経内科
2) 北祐会神経内科病院

外の遺伝的背景の相違 (たとえば VDRG 多型の人種差) が, HLA と MS との異なる相関結果を与えている可能性がある. ERG 多型と疾患との関係では, Xba I 多型において (特に男性において), Xx を有することで, 発症年齢が若年化する傾向が認められた. 女性における Xba I 多型と骨密度の研究では, エストロゲン濃度が低下する閉経前後では, Xx を有する群でそれまで高かった骨密度が他の群に比べ有意に低下することが指摘されており, Xx を有する場合エストロゲン濃度が低下すると効果が著しく減弱する可能性を指摘している. 今回我々の検討でも, エストロゲン濃度が低い男性において, MS の発症年齢が低下している傾向が認められたことから, エストロゲンが発症予防に関連して, Xx を有する場合エストロゲン効果が減弱する可能性が考えられる.

しかしながら, VDRG 及び ERG の多型についてはまだ未知の部分が多く, 基礎的研究も含めたさらなる検討が今後必要と思われる.

まとめ

MS の発症に VDRG や ERG 多型が関係している可能性が考えられ, さらに VDRG に関しては, HLA と共同して働いている可能性も示唆された. また, 発症年齢に ERG が影響している可能性も示唆される.

文献

- 1) Cantorina MT. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci USA 93: 7861-7864, 1996.
- 2) Bhalla AK. et al. Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human lymphocytes and monocyte/macrophages: inhibition of interleukin-2 and augmentation of interleukin-1 production. Cell Immunol 98: 311-322, 1986.
- 3) Bernardi S. et al. The influence of pregnancy on relapses in multiple sclerosis: a cohort study. Acta Neurol Scand 84: 403-406, 1991.
- 4) Jansson L. et al. Estrogen induces a potent suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis and collagen-induced arthritis in mice. J Neuroimmunol 53: 203-207, 1994.
- 5) Kobayashi S. et al. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. J Bone Miner Res 11: 306-311, 1996.
- 6) Mizunuma H. et al. Estrogen receptor gene polymorphism and bone mineral density at the lumbar spine of pre- and postmenopausal women. Bone 21: 379-383, 1997.

Table. 1 VDRG polymorphism

	MS patientsn (n=95)	Controls (n=77)
Genotype frequencies* (Apa I)		
AA	21 (27.3%)	18 (18.9%)
Aa	23 (29.9%)	27 (28.4%)
aa	33 (42.9%)	50 (52.6%)
Allele frequencies**		
A	65 (42.2%)	63 (32.2%)
a	89 (57.8%)	127 (66.8%)
Genotype frequencies*** (Bsm I)		
BB	0 (0.0%)	3 (3.2%)
Bb	11 (14.3%)	24 (25.3%)
bb	66 (85.7%)	68 (71.6%)
Allele frequencies****		
B	11 (7.1%)	30 (15.8%)
b	143 (92.9%)	160 (84.2%)

P*=0.0070

P**=0.0321, odds ratio=1.62, 95%CI=1.04 to 2.52

P***=0.0488

P****=0.0138, odds ratio=2.45, 95%CI=1.20 to 5.00

Table 2 Antigen frequencies (%) of HLA-DPB1*0501 and DRB1*1501 alleles in MS patients and controls.

	A allele positive		A allele negative	
	MS patients	Controls	MS patients	Controls
	n=33	n=38	n=28	n=29
DPB1*0501	93.9% ^{a,b}	63.2% ^a	57.1% ^b	55.2%
	n=42	n=38	n=32	n=29
DRB1*1501	35.7% ^{c,d}	15.8% ^c	9.4% ^d	17.2%

a; Pcorr = 0.0220, b; Pcorr = 0.0077, c; Puncorr = 0.0431, d; Puncorr = 0.0089
(Pcorr = corrected P value, Puncorr = uncorrected P value)

Table 3 HLA-DPB1*0501 and -DRB1*1501 alleles in bA positive MS patients and controls

	bA positive		bA negative	
	MS patients	Controls	MS patients	Controls
	n=33	n=27	n=26	n=31
DPB1*0501	93.9% ^{a,b}	63.0% ^a	53.8% ^b	54.8%
	n=40	n=27	n=31	n=31
DRB1*1501	37.5% ^{c,d}	14.8% ^c	6.5% ^d	16.1%

a; Pcorr = 0.0308, b; Pcorr = 0.0033, c; Puncorr = 0.0433, d; Puncorr = 0.0024

Table 4 ERG polymorphism

	MS patients (n=79)	Controls (n=73)
Genotype frequencies* (Pvu II)		
PP	15 (19.0%)	6 (8.2%)
Pp	49 (62.0%)	32 (43.8%)
pp	15 (19.0%)	35 (47.9%)
Allele frequencies**		
P	79 (50.0%)	44 (30.1%)
p	79 (50.0%)	102 (69.9%)
Genotype frequencies (Xba I)		
XX	5 (6.3%)	7 (9.6%)
Xx	35 (44.3%)	32 (43.8%)
xx	39 (49.4%)	34 (46.6%)
Allele frequencies		
X	45 (28.5%)	46 (31.5%)
x	113 (71.5%)	100 (68.5%)

P* = 0.0005

P** = 0.0004, odds ratio = 2.32, 95% CI = 2.03 to 2.65

Table 5 Age at onset in Xba I polymorphism

	XX (mean years ± SD)	Xx (mean years ± SD)	xx (mean years ± SD)
Male	32.50 ± 10.41	24.67 ± 7.14	32.44 ± 8.50
Female	18.00 (only one patient)	21.89 ± 8.34	26.00 ± 8.92
Total	29.60 ± 11.10	22.60 ± 8.04	27.49 ± 9.14

多発性硬化症 NK 細胞、NKT 細胞における killer inhibitory receptor (KIR)発現解析

高橋 和也 山村 隆

目 的

Natural killer (NK) 細胞は通常ウイルス感染、細胞内感染や腫瘍免疫に対するエフェクター細胞として重要な役割を担っているが、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)では NK 細胞が疾患抑制的に働く調節細胞として機能することが証明されている¹⁾。

一方、近年 NK 細胞の活性化を抑制する分子として種々の NK 活性抑制性レセプター(killer inhibitory receptors: KIRs)が同定され、それぞれ特有の MHC class I 分子を認識することが明らかになってきた^{2,3)}。KIR は NKT 細胞や一部の T 細胞にも発現しており、免疫応答の調節に重要な役割を果たしていることが証明されている。

我々は多発性硬化症(MS)の発症には NK 細胞または NKT 細胞の減少、または機能低下が関与している可能性を考えている。その仮説を検証するにあたって、NK 細胞および NKT 細胞の KIR 発現パターンを解析したところ、NKT 細胞における特定の KIR 遺伝子 mRNA の選択的発現低下を見いだしたので報告する。

対象と方法

臨床的に確実な MS 患者 22 名と、性・年齢の一致する健常対照群 24 名から末梢血を採取し、Ficoll-Hipaque 密度勾配遠心分離法を用い末梢

血単核球(peripheral blood mononuclear cells; PBMC)を分離した。つぎに QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN)を用い PBMC より genomic DNA を抽出し、Uhrberg らの方法³⁾に則り 13 組のプライマーを用いてゲノム KIR 遺伝子パターンを解析した。さらに HLA-Bw4 特異的配列プライマーを用いて HLA-Bw4 遺伝子の有無も調べた。

RT-PCR 解析には、抗 CD3 microbeads を用いて分離した CD3 陽性分画(T 細胞、NKT 細胞を含む。)と CD3 陰性分画(NK 細胞を含む。)を用いた(純度 95%以上)。各分画から QuickPrep Micro mRNA purification kit (Amersham Pharmacia)を用い mRNA を抽出し、First-strand cDNA synthesis kit (Amersham Pharmacia)で cDNA を合成し、PCR により KIR 発現パターンを解析した。さらに抗 CD158a 抗体(KIR 2DL1 と KIR 2DS1 に共通の決定基を認識)、抗 CD158b 抗体(2DL2、2DL3、2DS2 に共通の決定基を認識)、抗 CD94 抗体、抗 NKB1 抗体(KIR3DL1 分子を認識)、抗 CD161 抗体(NKRP1 分子を認識)の各抗体と抗 CD3 抗体、抗 CD56 抗体で染色後、フローサイトメーター解析を行った。

結 果

Genomic DNA の KIR レパトア解析では、MS 群と対照群間に有位差を認めなかった。一方、RT-PCR による CD3 陰性分画の解析では、やはり MS と対照群間に差を認めず、MS の NK 細胞において KIR

発現パターンが偏倚しているという可能性は否定的であった。しかし MS の CD3 陽性分画では、対照に比較して KIR3DL1 と KIR2DL2 の選択的発現低下が認められ (図)、一方 KIR 2DL4 の発現はむしろ亢進していることが示唆された。この結果から、MS の NKT 細胞において KIR 発現パターンに異常のあることが推測された。

次に MS と対照群の PBMC を抗 NKB1、抗 CD158a、抗 CD158b、抗 CD94、および抗 CD161 の各抗体を用いて染色し、NK、T、NKT 細胞における各抗体の染色陽性率を評価した。NKB1 陽性率は MS の CD3⁺CD56⁺細胞で低下傾向を認めた。これは KIR 3DL1 の mRNA 発現低下を反映している可能性があるが、有意差には至らなかった。それ以外では両群間で陽性率、発現量ともに明らかな差は認めなかった。CD3 陽性分画で mRNA の発現量の差を認めた KIR3DL1 のリガンドは HLA-Bw4 であるが、KIR3DL1 の発現量は患者 HLA-Bw4 発現の有無と相関しなかった。

考 察

以上の解析により、主に NKT 細胞を反映する CD3 陽性細胞分画では KIR3DL1、KIR2DL2 mRNA の発現が MS 群で選択的に低下していることが示された。2DL4 発現が MS の同細胞分画でむしろ亢進していることから、KIR 3DL1、KI 2DL2 の発現低下は NKT 細胞絶対量の低下によるものではないと考えられる。今回我々は CD3⁺CD56⁺細胞を NKT 細胞と規定しているが、その中には CD1 で拘束された狭義の NKT 細胞 (TCR に V α 24-J α Q invariant 鎖を発現)、および MHC 分子に拘束された広義の NKT 細胞の両者が含まれると考えられる。我々は最近 MS で V α 24-J α Q invariant NKT 細胞が著明に減少することを発見しており⁴⁾、KIR3DL1 と KIR2DL2 の発現低下が NKT 細胞レパトアの偏倚を反映したものである可能性は

高い。現時点では mRNA の低下を裏付けるだけの蛋白発現低下は証明できていないが、おそらく KIR 蛋白の slow turnover や使用した抗体の特異性に帰すべき問題であり、mRNA 低下を否定する材料ではないと考えている。

結 論

MS 患者では mRNA レベルで CD3 陽性細胞分画における KIR3DL1 および KIR2DL2 mRNA の選択的な発現低下がみられた。一方 KIR 2DL4 の発現はむしろ亢進し、その他の KIR 発現に関しては MS と対照群で差を認めなかった。以上の結果はおそらく MS における NKT 細胞レパトア偏倚を反映し、MS 病態を解析する新たな手がかりとなる可能性がある。

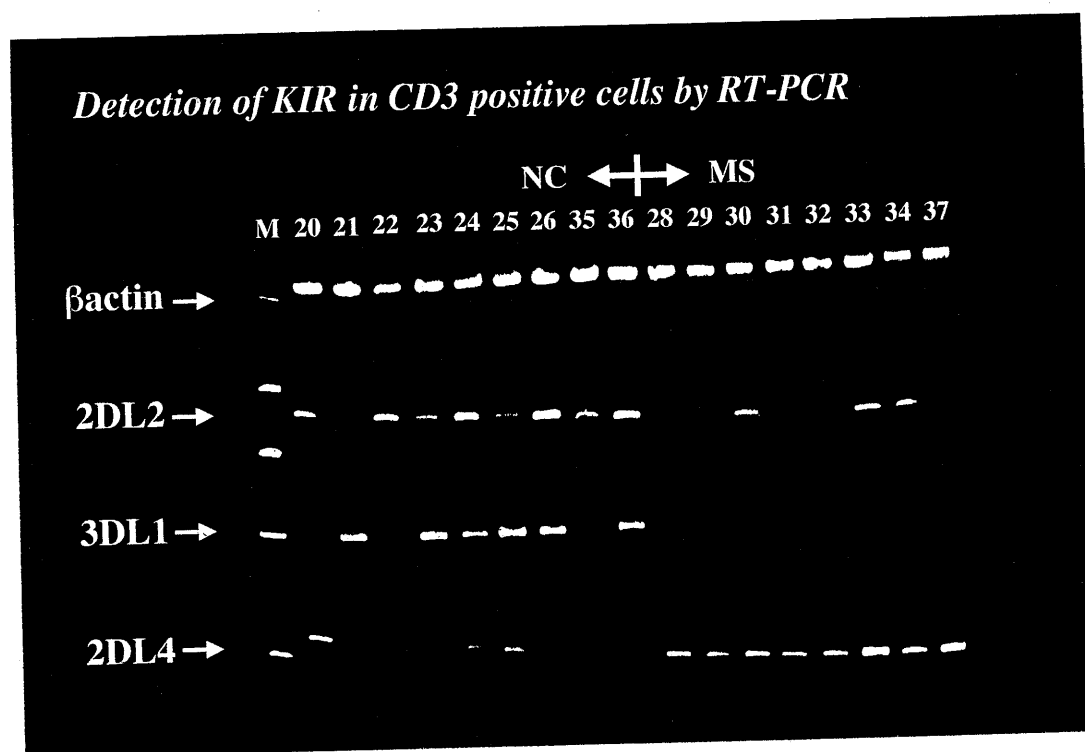
文 献

1. Zhang, B-n et al: Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J. Exp. Med.* 186:1677-1687, 1997
2. Valiante, N. M. et al: Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity.* 7:739-751, 1997
3. Uhrberg, M. et al: Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity.* 7:753-763, 1997
4. Illes, Zs et al: Differential expression of natural killer T cell V α 24J α Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Immunol.* (in press)

図の説明

CD3 陽性 T 細胞の RT-PCR 解析結果：

健康人(NC) (左側) と MS (右側) を比較すると、2DL2 および 3DL1 の発現が MS で低下している一方、2DL4 の発現は MS で亢進している傾向が伺われる。上の数字はサンプル番号を示す。



多発性硬化症と慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチーにおける NKT 細胞 V α 24-J α Q TCR 鎖発現の差異

山村 隆、Zsolt Illes、田平 武*、近藤 誉之、岡 伸幸**

目 的

CD1d 分子に拘束された natural killer (NK) T 細胞は、マウスでは V α 14-J α 281、ヒトでは V α 24-J α Q TCR invariant 鎖を発現する免疫調節細胞である。我々は近年多発性硬化症 (MS) の末梢血において V α 24-J α Q NKT 細胞 (以下 NKT 細胞) が著明に減少していることを見出した¹⁾。MS における NKT 細胞減少の意義をより明確にするため、本年度は慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチー (CIDP) および他の神経疾患における NKT 細胞の変化について、末梢血および病変サンプルを利用して検討を加えた。

対象と方法

末梢血単核細胞 (PBMC) は、44 例の MS (うち寛解期 18 例、増悪期 26 例)、20 例の MS 以外の神経疾患 (CIDP 6 例、パーキンソン病 3 例、重症筋無力症 2 例、その他の変性疾患、ニューロパチー等) から調製した。また病変部位の解析には、凍結中枢神経標本 (MS 25 サンプル、他の神経疾患 6 サンプル、非神経疾患 6 サンプル) および sural nerve 生検標本 (CIDP 10 サンプル、他のニューロパチー 11 例) を利用した。

V α 24-J α Q NKT 細胞の検出には、RT-PCR-SSCP 法を用いた^{1,2)}。V α 24 特異的プライマーおよび C α 特異的プライマーにより、まず V α 24 陽性 TCR 産物を増幅したあと SSCP ゲルに展開し、V α 24-J α Q invariant 鎖特異的なプローブで NKT 細胞 V α 24-J α Q invariant 鎖の発現を確認した。

結 果

MS 寛解期の PBMC では V α 24-J α Q TCR は検出できず、MS 末梢血における NKT 細胞の著明な減少が確認された。他方、増悪期の MS では 26 例中 7 例 (26.9%) に検出され、NKT 細胞の減少は永続的なものではないことが示唆された。他の神経疾患 20 例中 18 例の PBMC で V α 24-J α Q TCR が検出され、そのうち 6 例の CIDP では全例が V α 24-J α Q TCR 陽性であった。

MS の剖検脳では、検索した 25 サンプルのうち 15 サンプル (60.0%) で V α 24 TCR が検出されたが、V α 24-J α Q invariant 鎖を検出できたのは、うち 1 サンプルのみであった。一方、CIDP の生検神経標本の全例で V α 24 TCR が検出され、そのうち 6 例で V α 24-J α Q invariant 鎖を検出できた (図 A)。一方、対照の生検神経標本 11 例では invariant 鎖を検出できなかった (図 B)。以上の結果は、CIDP の末梢神経において NKT 細胞浸潤が頻繁に見られることを意味する。

最後に MS 剖検脳と CIDP 生検神経標本における CD1d 分子の発現を PCR 法により検討した。MS では 25 サンプル中 18 例 (72.0%) で陽性であったが、CIDP では 9 例中 2 例 (22.2%) においてのみ陽性であった。

考 察

自己免疫病において NKT 細胞の数または機能の異常が報告されている^{3,4)}。MS においても末梢血 V α 24-J α Q NKT 細胞の著明な減少が確認できたが、他の炎症性/自己免疫性神経疾患 (CIDP を含む) では NKT 細胞の減少は確認できず、NKT 細胞の減少は MS の免疫学的標識の一つとして認識されるべきものであることが明確になった。また、病変部の解析により、MS 病変では NKT 細胞

国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部

*同 疾病研究第六部

**京都大学医学部 神経内科

浸潤はごく稀であり、CIDP では NKT 細胞浸潤がより頻繁であることがわかった。我々の知る限りにおいて、炎症病変局所における NKT 細胞浸潤が証明されたのは本報告がはじめてであり、NKT 細胞が局所のサイトカイン環境を調節する可能性を示唆する興味深い所見である。

実際、MS と CIDP 病変局所における IFN- γ と IL-4 mRNA 発現を RT-PCR 法で検討すると、MS 病変では IFN- γ がほぼ一定して検出できるのに対し IL-4 は検出できない。一方、CIDP 病変では IL-4 が一定して検出でき²⁾、MS に比較して CIDP の局所環境が相対的に Th2 に偏倚していることが推察される。この結果は局所の NKT 細胞がサイトカイン環境を決定する因子である可能性を支持するが、詳細を明らかにするには今後 single cell level の検討を行う必要がある。

なぜ MS では NKT 細胞がこれほど減少するのであろうか？NKT 細胞減少のメカニズムは依然として明確ではないが、末梢神経疾患 (CIDP) と中枢神経疾患 (MS) における大きな相違は、NKT 細胞減少における臓器 (組織) 特異的因子の関与を示唆する。例えば、中枢神経系における CD1d 分子発現レベル亢進、あるいは中枢神経特異的な糖脂質抗原などの局所呈示が、MS における NKT 細胞減少に関与している可能性が考えられる。

結 論

末梢血における NKT 細胞の著明な減少は MS の免疫病態を特徴づけるものであり、CIDP など MS 以外の炎症性神経疾患では見られない。一方、MS 病変 では NKT 細胞が検出されることは稀であるが、CIDP ではかなり頻繁である (60%)。このように MS と CIDP は NKT 細胞の存在様態において大きく異なる疾患である。MS における NKT 細胞減少のメカニズムは明確でないが、組織特異的な因子 (CD1d 発現、糖脂質発現) が関与している可能性がある。

文 献

- 1) Illes, Zs et al.: Differential expression of NK T cell V α 24J α Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. J. Immunol. (in

press)

- 2) Illes, Zs et al. Identification of autoimmune T cells among in vivo expanded CD25⁺ T cells in multiple sclerosis. J. Immunol. 162:1811, 1999
- 3) Sumida, T. et al.: Selective reduction of T cells bearing invariant V α 24J α Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis. J. Exp. Med. 182:1163, 1995
- 4) Wilson, S.B. et al.: Extreme Th1 bias of invariant V α 24J α Q T cells in type 1 diabetes. Nature 391:177, 1998

図の説明

A: CIDP 末梢神経 SSCP 解析

B: 対照疾患末梢神経 SSCP 解析

それぞれ上パネルは V α 24 TCR の SSCP プロファイル、下パネルで示されたバンドは V α 24-J α Q 特異のプロープにより検出される NKT 細胞の invariant TCR α 鎖を示す。CIDP では 10 例中 6 例で invariant 鎖が明瞭に病出されている。