

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
神経免疫疾患領域における難病の医療水準と患者の QOL 向上に資する研究
分担研究報告書

（課題名）多発性硬化症患者におけるフマル酸ジメチル (DMF) 投与での活動指標の検討

研究分担者 中西恵美 金沢医科大学 脳神経内科

共同研究者 森健太郎、内田信彰、藤田充世、濱口毅、松井真、朝比奈正人

研究要旨

多発性硬化症 (MS) の適切な疾患修飾薬 (DMD: Disease Modifying Drug) 導入継続による疾患活動性コントロールは、脳実質の慢性炎症、細胞障害の観点から重要であり、CD4+CD29+T細胞はMSの病態において、細胞障害性分子による直接的な髄鞘破壊に関与することも指摘されている。⁽³⁾本研究ではDMD投与下における末梢血内のCD4+CD29+T細胞に着目し、DMFによるMSの疾患活動性の抑制がCD4+CD29+T細胞の機能特性と関連するのか、細胞障害性分子の発現解析により検討した。MS患者に対するDMF導入は、末梢血中のCD4+CD29+T細胞の量的変化のみならず、細胞障害性因子の発現低下という質的变化併存の可能性が確認された。

A. 研究目的

多発性硬化症 (MS) 患者のDMD選択肢は年々増え、適切なDMDの導入継続による疾患活動性コントロールに加え、脳実質の慢性炎症、細胞障害の観点からも治療を行う事が重要である。再発寛解型MS (RRMS) への有効なDMDであるDMFは、酸化ストレスに対するNrf2-Keap1抗酸化経路に作用し、MSの病勢をコントロールすると考えられているが、病態に関与する免疫細胞の作用機序は不明な点が多い。

CD4+CD29+ T細胞はB細胞の抗体産生を誘導する機能を有するhelper inducer T細胞として同定され、またRRMSにおいて著明に増加するCD4+T細胞のサブセットである^{(1) (2)}。

我々はこれまでに疾患活動性安定時にDMFへ切替導入したMS患者の末梢血において、CD4+CD29+T細胞が有意に減少することを見出した。また、中枢神経内浸潤したCD4+CD29+T細胞のCD29を阻害するとTh17介在性の髄鞘破壊が軽減することが報告され、CD4+CD29+T細胞はMSの病態において、細胞障害性分子による直接的な髄鞘破壊に関与する側面が指摘されている。⁽³⁾本研究ではDMT投与下における末梢血内のCD4+CD29+T細胞に着目し、DMFによるMSの疾患活動性の抑制が、CD4+CD29+T細胞の機能特性と関連するのか、細胞障害性分子の発現解析により検討した。

B. 研究方法

MSの再発寛解型患者で、DMF導入前と導入後半年以内の末梢血をフローサイトメトリーで解

析し、比較検討した。導入前対象はMS患者4名（女性3名、男性1名）、平均年齢36歳、導入前平均EDSS2、導入後採血時は平均EDSS2であった。末梢血採血を施行、リンパ球を含む単核球を分離しフローサイトメトリーでCD4+CD29+T細胞とCD3-CD16+CD56+NK細胞を評価した。

また末梢血内CD4+CD29+T細胞の細胞障害性分子の発現解析を、DMF内服中RRMS患者4名（女性3名、男性1名。平均年齢46.5歳、平均EDSS1.75。DMF切り替えまでの平均疾患経過年数9.75年）と、健常人対照4名（女性3名、男性1名、平均年齢44.75歳）で施行した。末梢血よりリンパ球を含む単核球を分離し、PerCP-Cy5.5標識抗CD4抗体 (SK3, 341654, BD) 及びAPC標識抗CD29抗体 (MAR4, 559883, BD) と氷上反応させた。残存赤血球をLysingバッファー (BD Pharm™ Lyse, BD) により除去、PBS(-)で洗浄、FACSバッファー (25mM HEPES, pH7.0, 5mM EDTA, 2%FBS, 1xPBS) に懸濁した。CD4+CD29+T細胞及びCD4+CD29-T細胞はセルソーター (SH800, SONY) を用いて各検体より 4×10^5 個分離回収した。回収した細胞よりTotal RNAを抽出 (NucleoSpin RNA XS, MACHERY-NAGEL) し、Oligo(dT)₁₂₋₁₈プライマーを用いた逆転写反応により一本鎖cDNAを合成した。合成cDNAを鋳型とし、各標的遺伝子特異的プライマーを用い定量PCRを行い、各検体の標的遺伝子発現を定量解析した。PCR反応はPower Track SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用い、各検体発現量

定量はQuantStudio3 Real Time PCR System (Applied Biosystems)を用いた。

(倫理面への配慮)

後方視的に連結可能匿名データを解析を行う本研究は、施設承認を得て施行した。

C. 研究結果

DMF 導入後に末梢血における CD4+CD29+T 細胞数の低下と CD3-CD16+CD56+NK 細胞数の上昇を確認し、DMF 内服中 MS 患者由来の末梢血 CD4+CD29+T 細胞では健常人由来の CD4+CD29+T 細胞と比し GranzymeA (GZMA)、GranzymeB (GZMB)、GranzymeH (GZMH)、Perforin-1 (PER1) など細胞障害性分子発現が減少する傾向を認めた。また CD4+CD29+ T 細胞においてストレス応答因子 NF-E-related factor2 (Nrf2) は発現増加し、Nrf2 の標的因子で抗酸化ストレス応答因子 Heme oxygenase-1 (HO-1) 発現亢進も確認した。(図 1)

D. 考察

GZMA と GZMB は細胞障害性 T 細胞に高発現し、各異なる機序でアポトーシスを誘導する。希少 GZM の一つである GZMH は、NK 細胞へ高発現し活性化してない CD4+T 細胞や CD8+T 細胞での発現は低い。PER1 は CTL、NK 細胞などすべての細胞障害性細胞に発現、発現は T 細胞活性化と関連があるとされる。Nrf2 は、酸化ストレス防御機構の中心的役割をにない、破綻により酸化ストレス感受性亢進や炎症免疫応答異常が惹起されるとされる。RRMS 患者に有効な DMT の一つである DMF は、フリーラジカル産生による細胞障害に関連する核内因子 Nrf-2 抗酸化経路の活性に関連し、病勢をコントロール・改善すると考えられているが、CD4+CD29+T 細胞、NK 細胞上昇同様に Nrf2 発現増加、Nrf2 の標的因子で抗酸化ストレス応答因子 Heme oxygenase-1 (HO-1) 発現亢進を確認、同細胞における細胞障害性因子の発現低下という質的变化併存の可能性が示された。このことは、中枢神経内浸潤した Th17 細胞が、長期間オリゴデンドロサイトとコンタクトし、グルタミン酸放出誘導で髄鞘形成に障害を与え、表面に高発現する CD29 を阻害すると Th17 介在性での破壊が軽減される、との報告⁽³⁾ を支持する結果である。CD4+CD29+T 細胞が、MS 患者にお

ける CNS 内の内在的慢性活動性変化の病態形成の一翼を担う可能性があり、病勢惹起時期同様に長期全経過での関与の特質から“QOL 向上に繋がるバイオマーカー”になりうる可能性がある。外来診察時の追跡頭部 MRI と共にモニタリングする事で、適正な DMD 調整等患者 QOL 向上に寄与する可能性があると思われる。

E. 結論

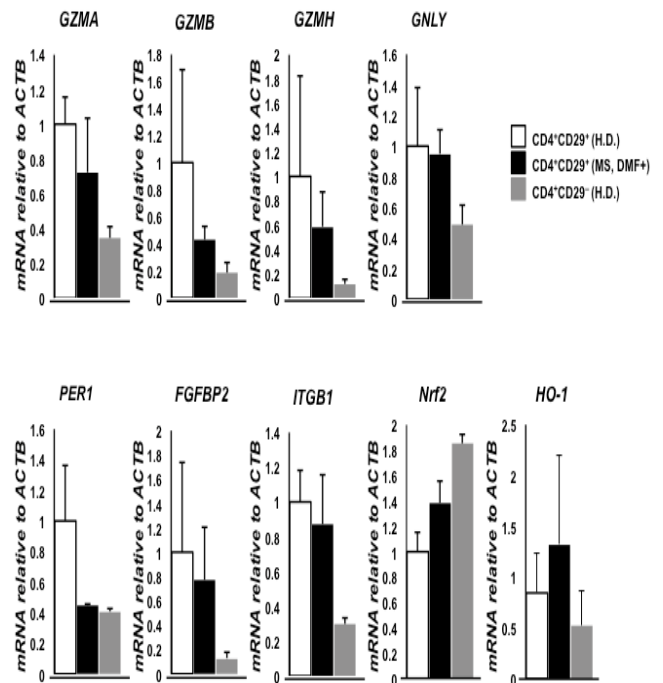
MS 患者に対する DMF 導入は、末梢中の CD4+CD29+T 細胞の量的変化のみならず、細胞における細胞障害性因子の発現低下という質的变化併存の可能性が想定された。外来診察時の追跡頭部 MRI と共にモニタリングする事で、適正な DMD 調整など患者 QOL 向上に寄与する可能性があると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表 無し
2. 学会発表 無し

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし



(図 1)

参考文献

- 1) Morimoto, C. et al J Immunol, 134, 1985,
- 2) Gambi D. et al. J Neuroimmunol 33, 1991
- 3) Laroche C et al, PNAS 118, 2021