

日本多発性硬化症協会 (略称日本MS協会)

Japan Multiple Sclerosis Society

ニュース・レター

No. 28

2004.4

〒111-0042 東京都台東区寿4-1-2 (私書箱 東京浅草 28) 無断転載を禁じます
TEL 03-3847-3561 FAX 03-3842-0289 E-mail: jmss@tk.sanyeicorp.co.jp



目 次

1. 日本MS協会会長職を去るにあたって —— 会長職引継ぎをかねて ——	日本MS協会名誉会長 菊 地 清 明 …………… 1 (元国連大使)
2. 日本MS協会会長就任ご挨拶	日本MS協会会長 荒 井 好 民 …………… 5
3. 平成15年度医学助成金贈呈者（若手研究者）の研究テーマ	
イ. 3テスラ超高磁場MRIを用いた多発性硬化症患者の大脳皮質および白質機能の非侵襲的評価 新潟大学脳研究所神経内科 寺 島 健 史 …………… 6	
ロ. Neuropeptide Yによる実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の制御 国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部 林 幼 偉 …………… 12	
ハ. 多発性硬化症病巣への浸潤に関わるリンパ球関連分子の解析 東北大学医学部附属病院神経内科 三 須 建 郎 …………… 18	
4. 研究集会 リポート「Recent progress in Neuroimmunology and NKT cell research」 国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部 山 村 隆 …………… 28	
5. 「平成16年度医学助成について」のおしらせ …………… 45	
6. 寄付者ご芳名 …………… 46	
7. 日本MS協会役員名 …………… 47	
8. 医学顧問団リスト …………… 49	
9. あとがき …………… 53	

日本 MS 協会会長職を去るにあたって —— 会長職引継ぎをかねて ——

日本MS協会名誉会長 菊 地 清 明
(元国連大使)
平成15年6月7日記

私が日本 MS 協会の会長をお引き受けしたのは、もう14年前になります〔1989年就任〕。

これは全くの偶然のことで、それまで私は多発性硬化症（multiple sclerosis—略して MS）なるものについては、なんらの知識を持ち合わせていませんでした。ただ日本多発性硬化症協会〔通称「日本 MS 協会」〕という任意団体があり、その創設者が、私の旧制第一高等学校時代の無二の親友であった、黒岩義吾郎博士であること〔1977年創設。彼は1965年ごろ当時日本には存在しないといわれていた多発性硬化症の存在を始めて指摘しました〕、そして彼の死去後〔1988年7月12日〕、前会長の(株)三栄コーポレーションの社長、和泉国夫氏が日本 MS 協会の会長を探しているということで、私にアプローチがあったのが始まりでした。41年間、国民の税金で、ご飯を食べさせて頂いたので、引退後は何か社会事業、慈善事業に尽くしてみたいと思っていた矢先でしたので、案外すんなりと会長をお引き受けしました。現役時代に培った実業界との人脈、退官後顧問になった企業の取引先、学生時代の級友などをお願いすれば、若干の募金活動は出来るかもしれないとの自負はありました。当時日本社会には、未だ80年代の経済的な余映があり、また企業側でも社会貢献(メセナ)、国際貢献の必要性を、まだ企業のトップの頭の中にあっただけです。私が一社一社を回って歩いて寄付をお願いしての感触は、好意的なものでした。もっとも日本では「知られざる難病」といわれる多発性硬化症のことですので、医学者でない私が、皆さんにご説明するのは、一苦勞でしたが。

黒岩君が、日本 MS 協会を始めたのは、ひとつには、後述のシルヴィア・ローリー女史の和泉さんを通ずる懇意があったことと、日本のMS研究者が世界MS協会連合〔International Federation of MS Societies (IFMSS)〕の年次総会（国際医学顧問委員会）に出席するのに〔MS 協会〕がないというのは不都合であること、また黒岩博士は、1981年に京都において開催される世界神経学会と並行して、IFMSSの年次大会を招致することを企画した、という事情があったからと聞いています。その関係で日本 MS 協会は始めから、IFMSS とは関係が深く、現在、IFMSS 本部に対し、年間5000ポンドの賦課金（assessment）を払っています。

勿論、日本 MS 協会の第一義的な目的は、この原因不明の難病である多発性硬化症の研究に、昼夜を分かたず携わっている医学者に対する研究助成金を差し上げることです。今でこそ文部科学省の科学研究費は、潤沢になっていますが、当時は、日本 MS 研究者は研究費を、アメリカ（NIH）から受

けるという状況でした。幸いにして、日本を含むアジア地域における MS の発症率は、北米、ヨーロッパに比して、格段に少ないといわれ「知名度」が低く、その上、厚生省によっていわゆる難病である特定疾患に指定され、手厚い社会保障が提供されているので、日本 MS 協会に対する患者さん達（この世界では Person with MS とよばれる）の期待や要望も、たとえば英国 MS 協会に対するようなものは感じられませんでした。なお日本には日本 MS 協会のほかに、「全国多発性硬化症友の会（会長、堀内勇一郎）」という姉妹団体があり過去30年間活発な活動をしておられます。

会長の最大の仕事は、寄付集め（fund-raising）です。欧米諸国においては、民間の社会事業、慈善事業の長い伝統があり、fund-raising（募金運動）の手法も、かなり発達しており、charity show, charity concert、また最近では、大衆を動員したwalk-a-thon（ウォークソン、いわゆるウォーク）、とか Read-a-thon（小学生等の低学年のための識字競争）とか、多彩なキャンペーンを展開しています。日本の MS 協会も、1993年5月、副腎白質ジストロフィー症患者をテーマにした映画、「ロレンゾのオイル」のプレミア・チャリティ・ショウ（ユニヴァーサル映画）を、セゾン、ラコステ等の協賛で開催したことがあります。その後、チャリティ・コンサートを何回か企画しましたが、実現の運びには至らなかったのは残念でした。同じ難病である筋萎縮性側索硬化症（ALS）の協会が、この方面で活躍していることは、私たちの模範になると思います。

私は世界 MS 協会連合の年次総会には、ボードメンバーとして、各地に出張しました。会長就任早々の89年2月には、ニューデリーで開催されたボードミーティングに出席しました。当時の会長はフォード社の副社長 William P. Benton であり、開催地のインドの理事は A. H. Tobaccowala だったことを覚えています。その他この世界における中心的な指導者〔理事たち〕に多数の知己をえました。彼らは本国においては錚々たる大物で、功なり、名をとげて、これからは慈善事業をやろうかと意気込んでいる人たちでした。歴代の IFMSS の会長も、William P. Benton から James R. Cantalupo（マクドナルド社社長）、James D. Wolfensohn（豪州人、現世銀総裁）、Peter Schweitzer（J. Walter Thompson 社長）と世界的な著名人が続いています〔本年、シュヴァイツァー会長は辞意を表明しました。〕

そのほか IFMSS の最高決議機関である Council（理事会）の同僚理事には、次のような人々がおり、彼らと親しくなりました。アメリカの George C. Boddiger〔後の IFMSS 会長〕、Charlie Goodyear（Exxon）、デンマークの言論界の人物、Ernst Klaeber、カナダの Sinclair、オランダの Udo Kruse、ドイツの Mariella von Klenck 等等。これらの人々は自国において実業界、ジャーナリズム等における有力者であるのみならず、彼らの親戚のうちに MS 患者を抱えているか、ないしは知人の中に MS 患者がいるという人々です。それほど MS は、欧米人においてはコモンな病気なのです。なお当時連合事務局には利発なイギリス婦人、Pauline Crowe 嬢がいて、パキパキと仕事をさばっていたのが印象に残っています〔ちなみに、MS の原因を決定的に究明することに成功すれば、その発見者はノーベル医学生理学賞は間違いなしといわれています〕。

インドのあとの IFMSS の年次ボードミーティングは、1991年にはアムステルダムで、92年にはロンドンで、93年にはバンクーヴァーで、84年、ブタペストで開催されましたが、いずれも、社用〔松下電器産業〕を兼ねて出張し、我われの医学顧問団の先生方とともに、大会に参加しました。

ここで IFMSS のことを説明したいと思います。IFMSS は2000年から MSIF (Multiple Sclerosis International Federation - MS 世界連合) と改称されましたが、本部所在地は従来通り、ロンドンにあります。1967年、アメリカにおける MS 運動のパイオニア的存在である、Sylvia Lawry 女史が、IFMSS (International Federation of Multiple Sclerosis Societies - [MS 協会世界連合]) を創設したのが始まりです。現在の MSIF は年一回開催される理事会〔Council〕と、年二回開催される執行委員会 (Executive Committee)、それに理事会と同時期に開催される世界大会からなっています。世界大会には、PwMS (Person with MS の略称 — MS を持った人、MS 患者のことをこう呼びます) も、車いす等で参加しています。毎年毎年、理事会を開催することについては、1994年頃から、遠距離から参加する理事たちにとって、旅費負担等が大きいことから、問題とされ、隔年にすべしとの議論が出ていました。年次大会の開催地は、1994年の Budapest のあとは Israel、Atlanta と続きましたが、1995年のアトランタ大会を最後に、年次大会は隔年に開催することが決定。次の Barsel から隔年になり、前回 (2001) は Melbourne で、そして本年は9月にベルリンで開催されます。ただしベルリン後は、定期的な隔年開催の形式に捉われずに、地域別、内容別の会議形式で、随時開催することに変更される模様。機関紙として、従来 MS Management を発行していたが、2003年2月から、MS in Focus に模様替えして、発行しています。

なお、私事ながら昨年5月、MSIF の組織変更有り、私はボードメンバーを英国の George Loudon 氏 (現在会計担当理事) と交代しました。その機会に、私はシュヴァイツァー会長から、Certificate of Merit 賞状と記念品 (ガラス器) を受けました。

私は医学者ではありませんので、MS そのものについて語る資格はありません。ただ MS 協会に関係したおかげで、里吉栄二郎先生〔国立精神・神経センター名誉総長〕、井形昭弘先生〔あいち健康の森健康科学総合センター長・愛知県健康づくり振興事業団理事長〕、それに前記の黒岩君の九州大学医学部時代のお弟子さんである柴崎浩〔NIH 米国国立衛生研究所〕、田平武〔国立療養所中部病院・長寿医療研究センター長〕、斎田孝彦〔国立療養所宇多野病院長〕、糸山泰人〔東北大学医学部神経内科〕、納光弘〔鹿児島大学医学部第三内科〕等の諸先生、それに少壮の山村隆先生〔国立精神・神経センター神経研究所〕等の、日本 MS 協会の「医学顧問団」の諸先生には、色々 MS についてご教示を願ったことは、大変有難く思っています。

日本国内における MS 研究の現状、業績等については、私などが申し上げることは出来ませんが、最近、山村隆先生の共同論文が、アメリカの Nature 誌〔2001年10月号〕に優先で掲載されたことな

どは、最近の快挙といえましょう。

注：MS 関係の国際賞といえば、故黒岩博士が受賞した、MS 医学会での古い賞である Charcot Award があります。シャルコー侯爵（1825-93年）は、フランス人で MS を研究したニューロロジストです。そのほかにこの世界には、MS でなくなった悲劇のチェリスト、ジャクリーヌ・デュプレ [Jacqueline Dupre] にちなんだ同名の賞、前記の Walfensohn 賞などがあります。有名なアメリカの野球選手、ルー・ゲーリッグも MS と同様に難病の ALS パーソンです。

最後に日本 MS 協会の今日あるのに貢献された、次の三人のお話をしたいと思います。日本 MS 協会を創始した黒岩博士の功績は絶大なものがありますが、彼を陰に陽に、支えてくださった和泉国夫さん〔現在協会の副会長〕をまず挙げなければなりません。社会事業、メセナ、今様に云えば、NGO 運動の先駆者であります。

MS 運動をアメリカ国内でまず盛んにし、US National MS Society（米国 MS 協会）と協力して、世界 MS 協会連合 [IFMSS] を創始した人に、シルヴィア・ローリー (Sylvia Lawry) というアメリカ人の資産家で慈善事業家でもある人がいます。彼女は、1940年代に、彼女の弟が MS に罹り、彼の病気を治したい一心で、NY Times に広告をだし、アメリカ全土の MS 患者に呼びかけたのをきっかけに、私財をなげうって、MS 患者の相互援助と MS の研究、治療の研究を推進するキャンペーンを起こしたのです。彼女は、黒岩、和泉両氏を通じて、日本の MS 協会の設置を働きかけたことは、前述の通りで、彼女は陰に陽にわが日本 MS 協会を援助してくれました。私も何回か彼女に会いましたが、MS に賭ける彼女の情熱には、ほとほと感心させられるものです。彼女は正に「フィランソロピスト」〔慈善家〕の鑑でした。彼女が2001年2月、惜しまれながら他界した後は、IFMSS の医学顧問団の議長であったカナダの Ian McDonald 博士が提唱して、独逸のミュンヘンに、彼女の名を冠した「シルヴィア・ローリー MS 研究センター」 [Sylvia Lawry Center for Multiple Sclerosis Research] が創立されました。因みに、現在のアメリカの National MS Society の会長は、91年の湾岸戦争で勇名を馳せた Mike Dugan 空軍大将です。

最後に忘れてならないのは、故青木正子さんです。私が MS 協会の会長を大過なく勤められたのは、ひとえに彼女が事務局となって、関係の医学者や「友の会」、さらには IFMSS [当時] との連絡を、一手に引き受けてくれ、私を補佐してくださったからです。彼女は自身肝臓病を患いながら、日本 MS 協会のために献身的に奉仕してくれました。彼女もヴォランティアの権化のような人でした。1997年、彼女がなくなったときは、私も同時に会長を辞めようかと思いましたが、和泉さんたちに説得されて踏みとどまった次第です。最後のころは彼女に、できるだけ安い航空切符を探してもらい、IFMSS 大会に出席をしてもらいましたが、これが早すぎた彼女の死に対するせめてもの、はなむけになったのかなと、密に偲んでおります。

日本 MS 協会会長就任ご挨拶

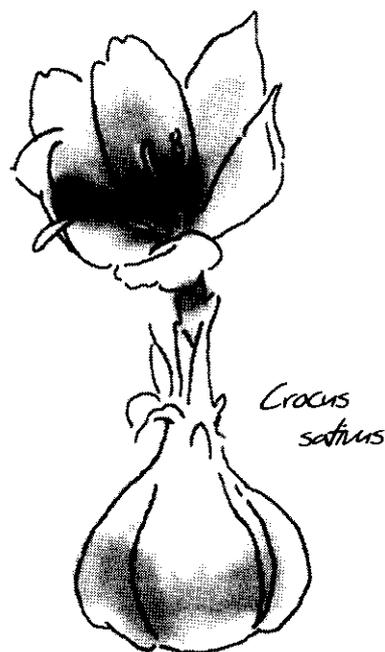
会長 荒井好民

今年度より、理事会の指名により菊地清明会長の後任として当協会の会長に就任いたしました。力不足ではありますが皆様のご協力のもと職責を全うする所存です。

顧みますと当協会は発足以来、この分野の研究者に対する助成、国際組織である MSIF との連絡、協調、患者に対する援助、広報活動など多くの実績を上げてまいりました。菊地前会長ならびに理事の方々、西村事務局長など関係者各位の弛まぬご努力に深く敬意を表する次第です。

しかし当協会もご多分に漏れずここ10数年続きました不況の影響を受け、財務的には決して余裕のある状態ではなくなっております。幸いわが国の景気もやや上向きになってまいりました。本年度は新規賛助会員を出来るだけ多く獲得し、当協会の方針に基づく活動を更に活発にしていきたいと考えております。

理事各位、並びに関係者の方々には今後とも以前に変わらぬご協力とご指導ご鞭撻を切にお願い申し上げます。



3 テスラ超高磁場 MRI を用いた多発性硬化症患者の 大脳皮質および白質機能の非侵襲的評価

新潟大学脳研究所神経内科 寺島健史

【緒言】

多発性硬化症 (multiple sclerosis、以下 MS) では白質がおもに病変の主座と考えられてきたが、病理所見では大脳皮質にも病変が認められ、この病変が MS 患者における高次機能障害や機能的予後に影響を与えている可能性が指摘されている。

今回われわれは、MRI 拡散テンソル解析を用いて大脳皮質および白質の機能を非侵襲的に評価し、正常対照群および MS 各病型群における差異を検討したので報告する。

【背景】

MRI の拡散強調画像は水分子の生体内での拡散の影響を反映させた画像である。この「拡散」は生体内のさまざまな組織構造により制限された拡散や、組織内の灌流現象、あるいは軸索流などを反映したものであり、方向によって拡散の程度が異なる「不等方性拡散」である。拡散テンソル解析とよばれる手法によって、この拡散の不等方性を解析することが可能となる。脳における拡散の不等方性はおもに神経線維によって生じると考えることができ、拡散テンソル解析で得られる3つの固有値は対応する固有ベクトル方向での拡散係数をあらわす。また、3つの固有値の和をトレースと呼び、平均化した拡散の程度をあらわす指標となる。

【対象】

新潟大学医歯学総合病院およびその関連病院に入院・通院中の患者から16歳から38歳 (平均27.5 ± 7.5歳) の古典型 MS 患者8名 (女7名、男1名) を選んだ。その内訳は再発寛解型 (RRMS) 4名、二次進行型 (SPMS) 4名である。一次進行型 MS および視神経背髄型 MS については今回の解析対象からは除外した。一方、正常対照群としては、患者群に年齢を適合させた15~39歳 (平均24.1 ± 5.0歳) の健常者ボランティア49名 (女26名、男23名) を採用した。患者群・正常群すべての対象者に対して書面による説明を行い、同意を得た。

【方法】

[MRI 撮像]

新潟大学脳研究所統合脳機能研究センターの3テスラ機 (GE Medical Systems) にて行った。

拡散強調画像はスピンエコー・エコープラナー法により、拡散強調傾斜磁場方向の組み合わせを6通りにかえて撮像した。マトリックスサイズは128×128、FOV は20cm×20cm、撮像時間は4スライス

で約4分30秒である。

[データ解析]

スライス選択

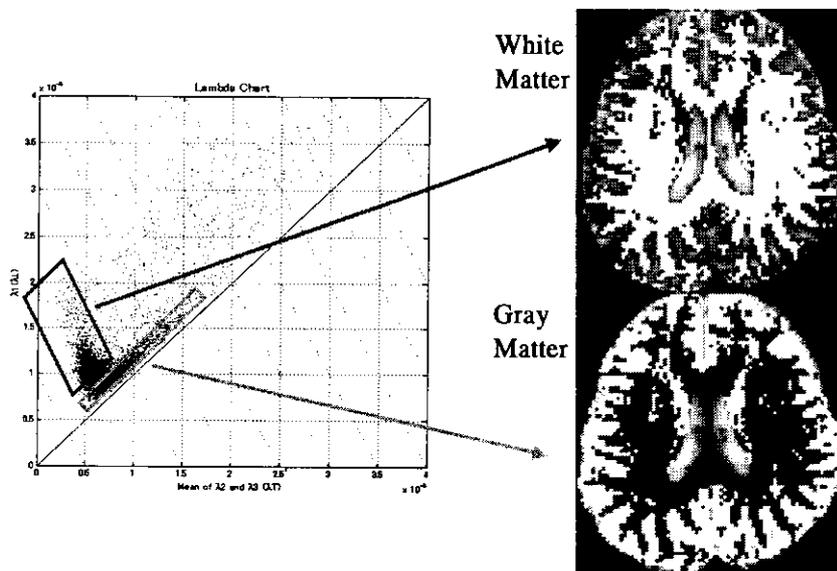
撮像した画像より、病変の好発部位である側脳室体部および放線冠を含む1スライスを選択した。

拡散テンソル解析：選択した1スライスのすべてのピクセルにたいして拡散テンソル解析を行った。

ラムダ・チャート解析

本法は新潟大学統合脳機能研究センターにて開発された手法である。図1に正常者の1スライス上の全ピクセルのラムダ・チャートに示す。このチャート上の特定の部位が、そのスライスでの大脳皮質および白質によく一致することを利用して、大脳皮質および白質ピクセルの分離・抽出を行った [1-3]。

図1



トレース・ヒストグラム解析

ラムダ・チャート解析で分離・抽出された皮質群・白質それぞれに属するすべてのピクセルについてトレースを計算し、ヒストグラムを作成した。大部分の場合、ヒストグラムは1峰性のピークとなるが、必ずしも正規分布とはならない。したがって、このトレース分布の代表値として、トレースの中央値、最頻値（ピーク位置でのトレース値）、ピーク高（ただしピクセル総数に対する割合であらわす）の3つのパラメータを採用し、MS 各病型群および正常群間で統計学的検定を行った。検定法としては、大脳皮質および白質において、正常群・RRMS 群・SPMS 群の3群間での1元配置分散分析と多重比較を行った。

【結果】

図2に正常者と典型的な SPMS 患者のヒストグラムを示した。大脳皮質では、正常者のヒストグラムは右に裾をひく分布となる。SPMS 患者のヒストグラムはピークがはっきりしなくなり、全体に右方に移動したかたちとなる。大脳白質のヒストグラムは正常者では大脳皮質にくらべてピークの高い、正規分布に近いかたちとなる。一方、SPMS 患者では、やはり全体に右方に移動し、ピークの高さも低くなり、ピークの裾もひろがってきている。このように正常群と SPMS 群の典型例ではヒストグラムの形状に明らかな違いが認められる。

図2

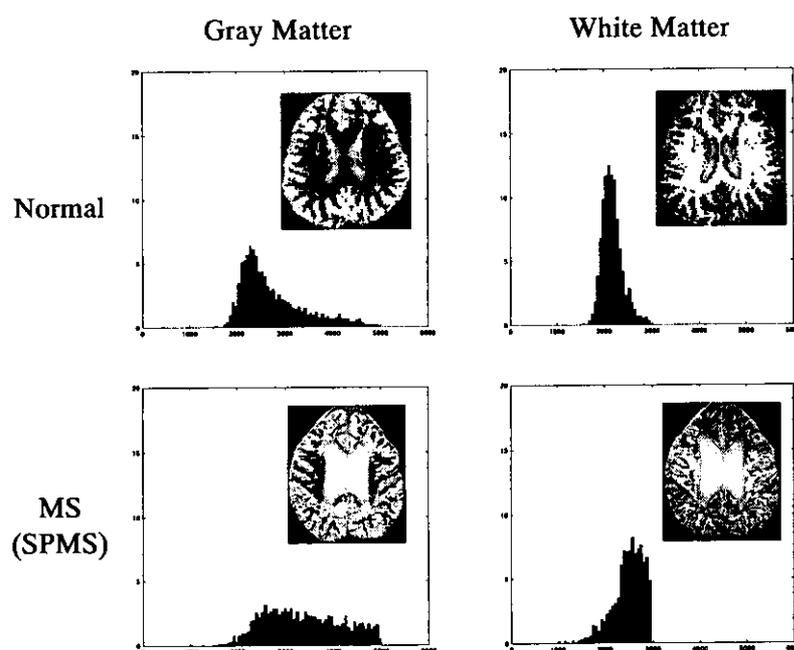


図3にトレースの中央値、最頻値、ピーク高の3つのパラメータについて、正常群、RRMS 群、SPMS 群での分布傾向を示した。大脳皮質・白質どちらにおいても、正常群→RRMS 群→SPMS 群の順に、トレースの中央値・最頻値が上昇し、ピーク高は逆に、低下する傾向にあることが、よくわかる。これらの解析の結果を図4に示した。まとめると、

- 1) 大脳皮質では、トレースの中央値は、正常群・RRMS 群・SPMS 群の3群で有意差が認められた。最頻値は、正常群と SPMS 群および RRMS 群と SPMS 群とでは有意差が認められたが、正常群と RRMS 群では認められなかった。ピーク高は、正常群・RRMS 群・SPMS 群の3群で有意差が認められた。
- 2) 大脳白質では、トレースの中央値および最頻値については、大脳皮質と同様の結果であった。ピーク高では、正常群と SPMS 群でのみ有意差が認められた。

図 3

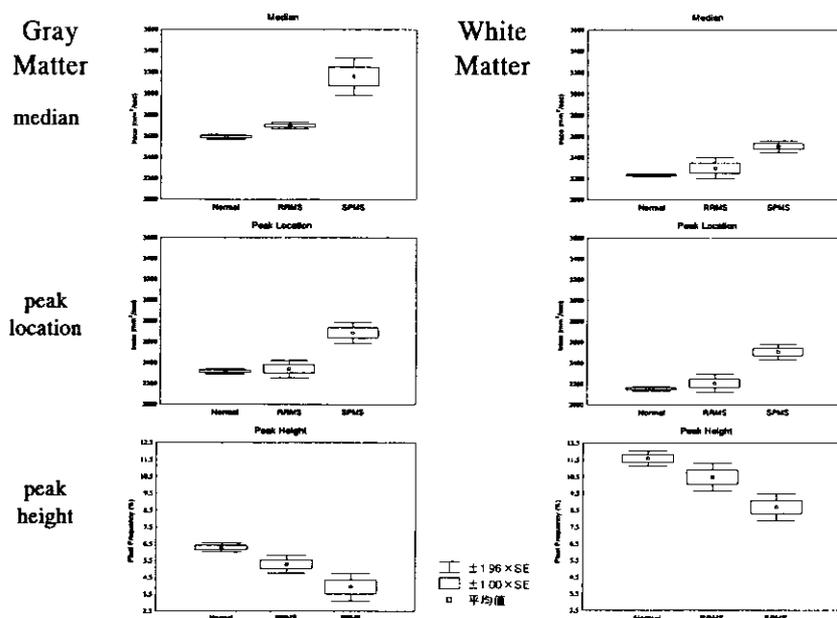


図 4

Gray Matter				平均の多重比較 (LSD検定)			
	平均±標準偏差						
	median (10 ⁶ ×mm ² /sec)	peak location (10 ⁶ ×mm ² /sec)	peak height (%)		median	peak location	peak height
Normal	2586±81	2303±83	6.28±0.92	Normal - RRMS	0.0190*	0.3978	0.0389
RRMS	2696±35	2340±85	5.29±0.54	Normal - SPMS	0.0000*	0.0000*	0.0000*
SPMS	3157±178	2685±102	3.94±0.85	RRMS - SPMS	0.0000*	0.0000*	0.0383*

White Matter				平均の多重比較 (LSD検定)			
	median (10 ⁶ ×mm ² /sec)	peak location (10 ⁶ ×mm ² /sec)	peak height (%)		median	peak location	peak height
Normal	2233±55	2153±73	11.6±1.6	Normal - RRMS	0.0348*	0.1797	0.1711
RRMS	2300±103	2205±90	10.5±0.86	Normal - SPMS	0.0000*	0.0000*	0.0006*
SPMS	2504±57	2505±75	8.7±0.81	RRMS - SPMS	0.0000*	0.0000*	0.1008

* p < 0.05

【考察】

MSにおける大脳皮質障害については、白質病変の二次的変化なのか、あるいは一次的に生じうるものなのかその機序はまだ明らかとはなっていない。しかし、これはMS患者の機能的予後や高次機能障害を考察する上でも重要な所見であると考えられる。さらにはMSの病態の標的が髄鞘のみならず軸索にもあるという説を検証していく上においても重要な所見である。しかし、とくに発症早期や軽症のMS患者では、CTやMRIなどの通常の画像所見ではほとんど異常を認めないことが多く、解析が困難であるという問題があった。

脳におけるMRI拡散テンソル解析は脳における拡散不等方性の定量化により、神経線維や神経細胞などの機能をとらえようとする手法であり、最近臨床応用が広がってきている。

多発性硬化症においても、欧米ではこの拡散テンソル解析を用いた報告が散見されるようになってきているが、国内での報告はまだほとんどないのが現状である [4]。

このMRI拡散テンソル解析はまだ新しい手法であり、標準的な解析法が存在するわけではないので、より有効な解析方法の開発もあわせて必要となる。今回考案した解析法は、大脳皮質・白質をきわ

めて高い精度で解析者の恣意性なしに分離することができる。しかも、分離・抽出する基準を対象によって変更する必要がないため、きわめて再現性の高い解析結果を得ることが可能である。約50名の正常ボランティアでの解析結果も安定しており、信頼性も高いものと考えられる。

今回の解析結果のポイントは、

- 1) MS の病変の主座と考えられる大脳白質のみならず、大脳皮質でも患者群と正常群で有意差が認められた
- 2) 正常群と SPMS 群との間のみならず、正常群と RRMS 群や、RRMS 群と SPMS 群の間でも有意差が認められた

という2点である。これらは、通常の MRI 画像で異常所見を認めない段階で MS 患者に大脳皮質障害が生じている可能性があることを示唆しており、きわめて注目すべき結果である。

このように、この手法は MS 患者における大脳皮質機能評価を非侵襲的にしかも短時間で行うことができるという点において従来にはなかった強力な可能性をもつものである。われわれは、今回の結果をもとに、

- 1) さらなる対象患者の蓄積
- 2) 罹病期間や重症度など臨床的な指標との相関
- 3) 我が国に多い視神経脊髄型 MS での解析
- 4) 同一患者における経時的な追跡評価
- 5) 神経免疫学および神経眼科的評価とくみあわせた解析

など現状での課題に基づいて、今後の研究計画を立案中である。

【 結 論 】

- 1) MRI 拡散テンソル解析を用いて、多発性硬化症 (MS) 患者の大脳皮質および白質の機能評価を行った。
- 2) MS 患者では正常群に比して、大脳白質のみならず皮質においても、トレースの中央値・最頻値の上昇、ピーク高の低下を認めた。この有意差は正常群と RRMS 群、RRMS 群と SPMS 群との比較でも認められた。
- 3) これらの結果は MS 患者における大脳皮質障害が通常の MRI 画像では異常を認めない段階で出現している可能性を示唆しており、病状評価や機能的予後の推定に役立つことが期待されている。

【 研究協力者 】

西 澤 正 豊	新潟大学脳研究所神経内科教授
中 田 力	新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター長
田 中 恵 子	新潟大学脳研究所神経内科助教授
松 澤 等	新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター助教授
田 中 正 美	国立療養所西新潟中央病院神経内科医長

【参考文献】

1. Matsuzawa H et al. Lambda chart analysis and eigenvalue imaging. In: Nakada T, editor. Integrated Human Brain Science:Theory, Method Application (Music). 219-225, 2000
2. Terajima K et al. T EZ-tracing:a new ready-to-use algorithm for magnetic resonance tractography. J Neurosci Methods. 116, 147-55, 2002
3. Suzuki Y et al. Feasibility study of single region lambda chart analysis for pyramidal tract physiology. J Neurol. 250, 1185-9, 2003
4. Bozzali M et al. Quantification of brain gray matter damage in different MS phenotypes by use of diffusion tensor MR imaging. Am J Neuroradiol. 23, 985-8, 2002



Neuropeptide Y による 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の制御

国立精神・神経センター神経研究所
免疫研究部 林 幼 偉

【緒言】

多発性硬化症 (MS) の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) は、ミエリンの構成タンパクを感作することで発症する¹。EAEの発症には IFN γ , TNF α などの Th1 型サイトカインを産生する CD 4 陽性自己反応性 Th1 細胞の関与が特に重要とされており、IL-4, IL-5 などの Th2 型サイトカインを産生する Th2 細胞とのバランス (Th1/Th2 バランス) を調節することで発症が制御されることが分かっている²。

神経系と免疫系は隔絶された環境にあることや自己・非自己を認識することなど類似する点が多く、以前から相互のクロストークは指摘されていた³。ストレスで交感神経系が活性化されるとリンパ球が減少し免疫系が低下するといわれており、カテコラミンによって EAE が軽減され⁴、枯渇させると EAE が悪化することが報告されている⁵。カテコラミンなどの神経伝達物質とともに神経終末に存在する神経ペプチドの中で、神経ペプチド Y (neuropeptide Y : NPY) は交感神経賦活化で放出されるペプチドである⁶。これは神経細胞に広く分布し、その受容体は Y1 から Y5 の 5 つが報告されているが、Y1 受容体は広汎に分布し、免疫細胞にも発現している⁶。近年 NPY が自己免疫疾患に影響を与えることが注目されており⁷、EAE における作用機序を明らかにするため実験を行った。

【対象・方法】

EAE は C57BL6/J マウス又は SJL/J マウスに MOG 35-55 または PLP 139-151 を免疫して誘導した。

EAE 誘導後、NPY またはそのアミノ酸置換体である Y1 受容体特異的アゴニスト (Y1R agonist) を隔日で腹腔内投与して臨床経過に与える修飾効果を見た。

NPY が臨床経過のどの期間にもっとも強く作用するのかを調べるため、全経過投与群 (感作後0~30日)、誘導期投与群 (感作後0~10日)、発症後投与群 (感作後10~30日)、対照 (PBS) 投与群と比較した。

NPY が臨床経過にどのように関与するのかを調べるため、Y1R agonist を隔日投与したマウスのリンパ節細胞と脾細胞をペプチド感作後11日目で調製し、ペプチド特異的な増殖反応と IFN γ 産生能を調べ、マウス血清における感作ペプチド特異的な IgG アイソタイプを対照群と比較した。さらに同様に調整した細胞を感作ペプチドで3日間再刺激した後、放射線照射した未感作マウスに移入して passive EAE を誘導し、対照群と比較した。またペプチド感作時に Y1R agonist を隔日投与したマ

ウスから、T細胞または抗原提示細胞を分離し、感作のみを行ったマウスのT細胞または抗原提示細胞とともに感作ペプチド存在下で培養し、反応性の差異を検討した。

【結果】

NPY 投与により用量依存性に EAE は軽減されたが (図 1 A, B)、Y1 受容体特異的拮抗薬 BIBO 3304 を NPY と同時に投与すると NPY による EAE 抑制効果が消失した (図 1 C)。Y1R agonist は低用量でも NPY と同等の EAE 抑制効果を示し、特に [D-His²⁶] NPY において顕著であった (図 1 D)。つまり NPY による EAE 抑制作用は Y1 受容体を介していることが分かった。このため以降の実験は Y1R agonist として [D-His²⁶] NPY を用い、NPY の作用を検討した。

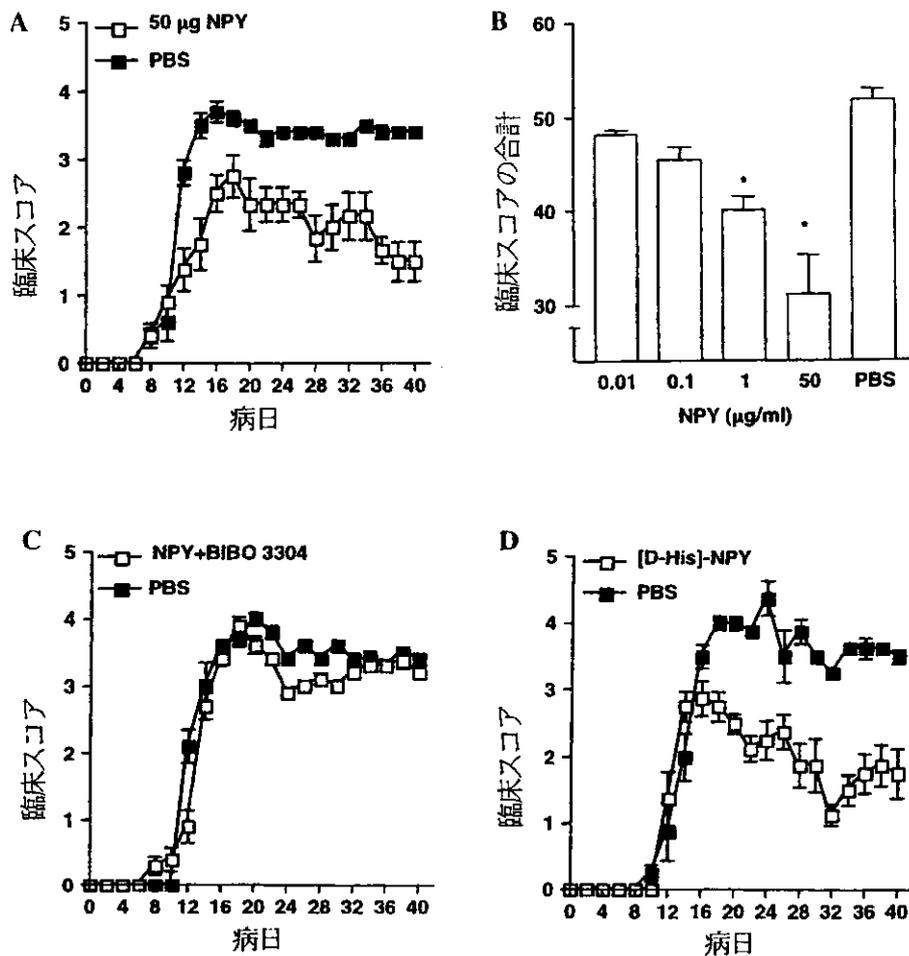


図1 NPY による EAE の抑制

C57BL6/J マウスに MOG 35-55 ペプチドを用いて EAE を誘導した。

A : EAE 誘導時に NPY (50 µg/kg) を投与すると、EAE が抑制された。

B : NPYの投与量を変えてみると、NPYはEAEを用量依存性に抑制した。

C : EAE 誘導時に NPY と Y1 受容体拮抗薬 (100 µg/kg) を投与すると、抑制が除去された。

D : EAE 誘導時に Y1 受容体アゴニストを投与すると、低用量 (0.01 µg/kg) で抑制された。

さらにこの Y1R agonist による EAE 抑制効果は、誘導期 (EAE 誘導時より10日間) の期間に投与した場合には見られたが、発症後 (EAE 誘導後10日後以降) の期間に投与した場合は認められなかった (図2)。つまりNPYの抑制作用はEAE誘導時期に有効であり、発症後の後期にはあまり効果がないことが分かった。

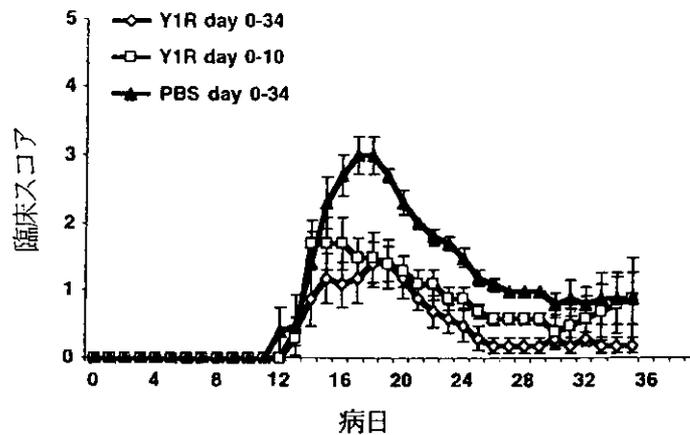


図2 NPY の投与時期による EAE 抑制効果の差異

EAE を誘導したあと、[D-His²⁶] NPY を全経過 (感作後 0 ~ 30日)、誘導期 (感作後 0 ~ 10日) で投与し、対照 (PBS) 投与群と比較した。誘導期投与した場合には抑制効果が見られたが、発症後の期間に投与した場合は効果が認められなかった。

次に感作抗原への免疫応答が Y1R agonist によってどのように変化するかを確かめるため、マウス血清中の感作ペプチド特異的 IgG アイソタイプを比較したところ、Y1R agonist を投与したマウスでは IgG2a が PBS 投与群に比べ有意に低く、IgG1/IgG2a 比が上昇しており、感作抗原への免疫応答が Th2 偏倚していることが示唆された (図3)。実際、Y1R agonist を投与したマウスのリンパ節および脾細胞のペプチド特異的な増殖反応と IFN γ 産生能を調べたところ Y1R agonist を投与したマウスでは、感作ペプチド特異的 T細胞の増殖反応に有意差は見られなかったものの、その IFN γ 産生は有意に抑制されており、感作抗原への免疫応答が Th2 偏倚していることが確認された (図4)。

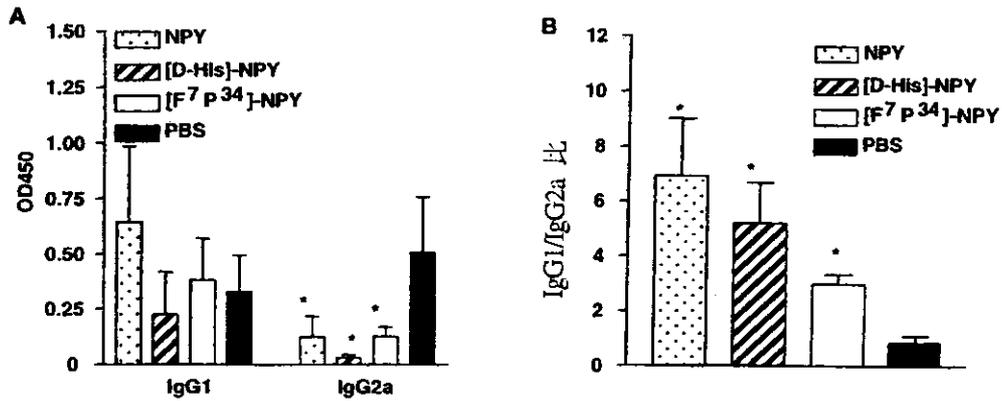


図3 NPYによる血清中の感作抗原特異的 IgG アイソタイプの差異

EAE を誘導したマウスに NPY、Y1R agonist を投与し、血清中の抗 MOG 35-55 抗体の IgG1, IgG2a アイソタイプの OD 値を測定した。

A : NPY, Y1R agonist ([D-His²⁶] NPY, [F⁷, P³⁴] NPY) 投与群では IgG2a の OD 値が有意に低値であった。

B : NPY, Y1R agonist 投与群では、IgG1/IgG2a 比が有意に高値であった。

NPY, Y1R agonist 投与にて T 細胞反応が Th2 偏倚していると考えられる。

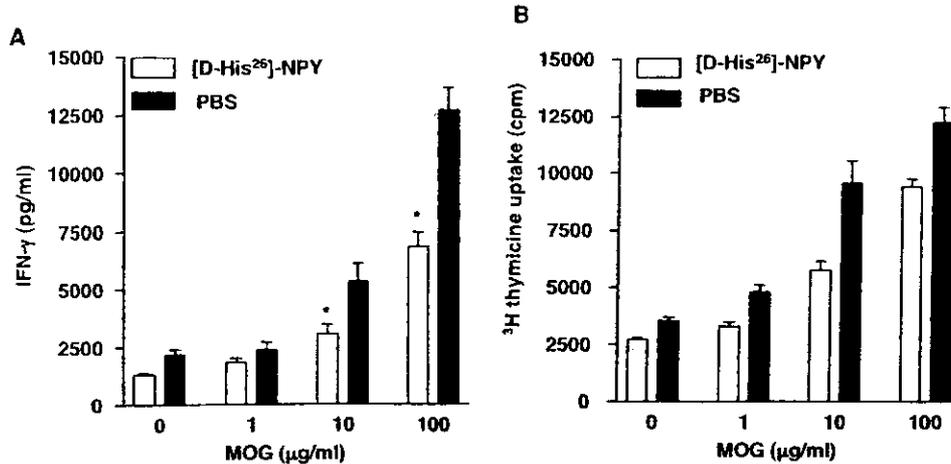


図4 NPYによるT細胞の Th2 偏倚

C57BL6/J マウスを MOG 35-55 ペプチドで免疫した後、Y1R agonist を投与し、リンパ節細胞のペプチド特異的な増殖反応とその際の IFN γ 産生能を調べた。

A : Y1R agonist を投与すると、MOG 35-55 特異的 T 細胞の IFN γ 産生が有意に抑制された。

B : MOG 35-55 特異的 T 細胞の増殖反応は有意な差は見られなかった。

またペプチド感作後 Y1R agonist を隔日投与したマウスのリンパ節細胞と脾細胞を調整して passive EAE を誘導したところ、Y1R agonist 投与を受けたマウスの細胞移入による passive EAE は軽症化した。

さらに NPY が作用する細胞がT細胞なのか抗原提示細胞（APC）なのかを検討するため、ペプチド感作時に Y1R agonist を隔日投与したマウスから、T細胞または APC を分離し、ペプチド感作のみを行ったマウスのT細胞または APC とともに感作ペプチド存在下で培養したところ、Y1R agonist を投与したマウスのT細胞を用いたときのみ IFN γ 産生が抑制された（図5）。つまり NPY はT細胞に作用して Th2 偏倚を生じていると考えられた。また固相化抗 CD3 抗体を使用して分離したT細胞を刺激する際、Y1R agonist を添加しても IFN γ 産生が抑制されることから、NPY は直接T細胞に作用することが確認された。

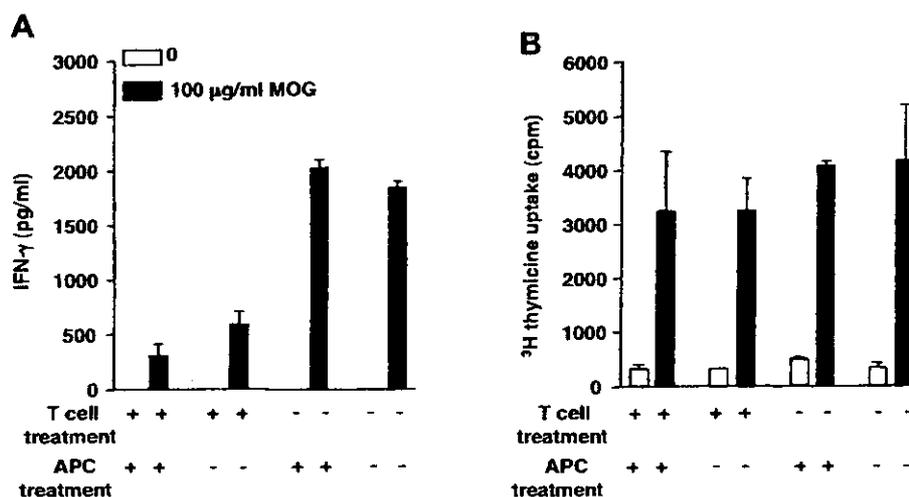


図5 NPY によるT細胞への影響

MOG 35-55 ペプチド感作時に Y1R agonist を隔日投与したマウスから、T細胞または抗原提示細胞を分離し、ペプチド感作のみを行ったマウスのT細胞または抗原提示細胞とともに MOG 35-55 ペプチド存在下で培養した。

A：抗原提示細胞（APC）にかかわらず、Y1R agonist を投与したマウスのT細胞を用いたときのみ IFN γ 産生が抑制された。

B：増殖反応に有意な差は見られなかった。

【考察】

NPY は EAE を抑制するが、Y1R agonist はそれより低用量で効果的に作用する。これは NPY の抑制作用が Y1R 特異的であることが推察される。またその EAE 抑制効果は主に発症前の誘導期においてもっとも高く、それは自己反応性の IFN γ 産生 Th1 細胞の Th2 偏倚によるものと考えられる。

自己免疫疾患はさまざまな身体的・精神的ストレスで影響されるが、その機序として神経系と免疫系という特殊な高次機構の間の相互作用に参与する NPY のような物質が介在している可能性がある。NPY 受容体を標的とした薬剤は、新たな視点からの MS 治療に応用できると思われる。

【結 論】

NPY は Y1 受容体を介して EAE の臨床経過を軽症化するが、EAE 誘導時期において顕著であった。これは NPY が T 細胞に直接作用し、自己反応性 Th1 細胞の Th2 シフトを生じるためであると確認できた。NPY を手がかりにして、神経ペプチドという神経系と免疫系の相互に関わる新たな視点から、MS 治療が期待できると思われる。

【研究協力者】

Bedoui Sammy¹、三宅幸子²、山村隆³

(国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部：外来研究員¹、室長²、部長³)

【参考文献】

1. Wekerle, H. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis as a model of immune-mediated CNS disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3: 779, 1993
2. Miyamoto, K. et al. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalo-myelitis by inducing Th2 bias of natural killer T cell. *Nature* 413: 531, 2001
3. Straub, R. et al. Dialogue between the CNS and the immune system in lymphoid organs. *Immunol. Today* 19: 40, 1998
4. Chelmicka-Schorr, E. et al. Chemical sympathectomy augments the severity of experimental allergic encephalo-myelitis. *J. Neuroimmunol.* 17: 347, 1988
5. Chelmicka-Schorr, E. et al. The β adrenergic agonist isoproterenol suppresses experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *J. Neuroimmunol* 25: 203, 1989
6. Felten, D. et al. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J. Immunol.* 135: 755s, 1985
7. Bedoui S. et al. Relevance of neuropeptide Y for the neuroimmune crosstalk. *J. Neuroimmunol* 134: 1, 2003
8. Bedoui S. et al. Neuropeptide Y (NPY) suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: NPY1 receptor-specific inhibition of autoreactive Th1 response in vivo. *J. Immunol.* 171: 3451, 2003

多発性硬化症病巣への浸潤に関わるリンパ球関連分子の解析

東北大学医学部附属病院神経内科 三 須 建 郎

はじめに

多発性硬化症 (Multiple sclerosis: MS) は、中枢神経症候が時間的および空間的多発性を示すことを特徴とする中枢神経系の炎症性脱髄性疾患であり、CD4 細胞とりわけ Interferon γ (IFN γ) 等を分泌する 1 型 helper T (Th1) 細胞の病巣局所への浸潤を特徴とする自己免疫疾患と考えられている。

数々の関連分子が中枢への浸潤に関わることが知られているが、我々は遊走や活性化に関わるケモカインやT細胞受容体分子に注目し、MS病巣への浸潤に関わる因子の同定を試みている。

近年、免疫細胞の遊走や活性化に関わり、相互に特異的な関係を持った種々のケモカイン及びケモカイン受容体が同定され、様々な局所の炎症における病態への関わりが注目されている。たとえば Th1 細胞では CCR5 や CXCR3 を発現し、一方 IL-4 等を優位に分泌する 2 型 helper T (Th2) 細胞では CCR3 や CCR4 が特異的に発現することから、Th1・Th2 に関わる多くの疾患で検討されている。MS においても主に CCR5 や CXCR3 の発現やそのリガンドの髄液中の発現と、疾患活動性や病巣・病型との関連が報告されている。また、免疫記憶に関わる naive T細胞や樹状細胞の遊走に強く関与するケモカイン受容体 CCR7 が報告されており、本来免疫学的に特異とされてきた中枢神経系における CCR7 関連分子を検討することは、中枢神経の自己免疫病態を考える上で興味深い。また MS の病態に特定の T細胞受容体 (人では V β 5.2他) が関わることで患者末梢血由来のミエリン塩基性蛋白 (MBP) 特異的 T細胞における検討から報告されており、治療の標的としても注目されている。しかし培養による修飾が多く、実際にどれだけの役割を実際の生体内で行っているかは不明であった。新鮮末梢血・髄液中のリンパ球における報告は少なく、MSの病態における髄液浸潤細胞あるいは中枢内に浸潤する T細胞の動態を把握する上で重要である。

我々は、これらのリンパ球の活性化・遊走に関わる因子を同定することにより、病態の理解・標的治療の可能性を検討することを目的とした。

研究背景

多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) は、再発と寛解を繰り返す中枢神経の炎症性脱髄疾患であり、中枢の髄鞘を標的抗原とする自己免疫疾患と考えられているが、未だにその病態は不明な点が多く有効な治療法は見出されていない^{1,2}。MS の病態においては、脱髄病巣に浸潤する T細胞やグリア細胞がサイトカインやケモカインを放出し、さらに多くの T細胞やマクロファージを活性化して病巣局所に遊走されることにより炎症反応が増強される³。CD4 陽性ヘルパー T細胞は、主にインターフェロン γ (Interferon γ ; IFN γ) を分泌する 1 型ヘルパー T細胞 (Th1) と、主にインターロイキン 4

(Interleukin 4; IL-4) を分泌する 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) に分類されるが、MS の病態には特に Th1 型のサイトカインである IFN γ や Interleukin-2 (IL-2)、Tumor necrosis factor α (TNF α) が関係することが数多く報告されている⁴⁶。ケモカインは細胞が遊走し活性化する際に働くサイトカインで、現在までに18種の受容体 (CCR1~10, CXCR1~6, CX3CR1, XCR1) や40種以上のリガンド (CCL1~27, CXCL1~15, XCL1~2, CX3CL1) が同定されている⁷。特に CCR5 や CXCR3 は活性化された Th1 細胞に発現し、一方 CCR3 や CCR4 は Th2 細胞に発現することが知られている^{8,9}。MS 患者の髄液中の CD4 陽性細胞や脱髄病巣に浸潤する T 細胞が CCR5 や CXCR3 が陽性であることが示された^{10,11}。また、CCR5 や CCR1 のリガンドである RANETS や MIP-1 α が MS の動物モデルとされる実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の病態において病巣への細胞浸潤に重要な役割を持つこと³、CCR1~3 のリガンドである MCP-1~3 が MS 病巣のアストログリアやマクロファージに発現することなど¹²、MS の病態に多彩なケモカインおよびケモカイン受容体の発現が関与していることが示されている。

CCR7 や CXCR4 はナイーブ T 細胞に発現しているケモカイン受容体である。これらのナイーブ T 細胞はリンパ組織の高内皮細静脈に発現する CCR7 のリガンドである SLC や ELC と反応することによってリンパ組織の T 細胞領域に侵入し、樹状細胞による抗原提示を受けて一次記憶を保持する CCR7 陽性の central memory T 細胞 (T_{cm}) や再度抗原提示を受けた後炎症局所に遊走して速やかにイフェクター機能を発揮する CCR7 陰性の effector memory T 細胞 (T_{em}) へと分化する^{13,14}。自己免疫疾患の病態において、どの過程で免疫記憶を獲得し、どのように免疫記憶を維持するのかが未だに不明な点が多く、臓器特異的自己免疫疾患と考えられている MS の末梢血中及び脳内の脱髄病巣局所でのこれらの細胞動態は不明である。免疫記憶に関連して、髄液中に浸潤している T 細胞がどのような T 細胞受容体の clonarity を持っているかを把握することは、免疫記憶病態を考察する上で意義深いものと考えられる。

MS の病態におけるケモカイン及びケモカイン受容体の知見としては、中枢神経系が Th1 型ケモカイン受容体 (CCR5, CXCR3) が優位に発現することが既に報告されているが、Th2 型ケモカイン受容体 (CCR3, CCR4) やその他のケモカイン受容体の発現は十分に検討されておらず、これらの分子の病勢との関連やメモリー T 細胞サブセットの動態も明かではない。本研究では、現在までに同定されているリンパ球のケモカイン受容体 (CCR1~CCR7, CXCR3, CXCR4) 及び一部リガンドの発現を MS 患者の再発時、寛解時の末梢血および髄液、さらには MS 剖検脳の脱髄病巣において解析した。さらに末梢血・髄液中の単核球における CDR3 spectratyping により T 細胞受容体レパートリーを検索した。これらの検討により MS の病巣局所に炎症細胞を遊走浸潤される機構が解明できれば、MS の病態に促した治療法の開発に役立つものと期待される。

研究方法

症 例

再発寛解型 MS 患者21名（女性15名、男性 6 名、平均年齢 34.2 ± 10.2 歳）で検討を行った。MS の診断は、Poser らの診断基準に従い、MS 類縁の脱髄疾患と考えられるDevic 型、ADEM、Balo 型などは対象外とした。全症例において、MRI で MS の脱髄疾患と考えられる多発性の中樞神経系病変が確認されており、また再発時は全症例において臨床症状に一致する急性期病変を MRI で確認した。対象症例は、前駆する感染症がなく、また過去3ヶ月間にインターフェロンやステロイド、免疫抑制剤の使用歴がないものとした。全例治療前に末梢血及び髄液の採取を行い、6人の患者では同意を得た上でステロイドパルス療法（メチルプレドニゾン18点滴静注×3日間）後の寛解期（治療2～3週後）にも末梢血及び髄液を採取し、治療前後での変化を比較検討した。健常対照者12名（女性8名、男性4名、平均年齢 27.3 ± 4.0 歳）の末梢血を用い、髄液の疾患対照群として、無菌性髄膜炎5例（平均年齢 30.8 ± 3.0 歳）、非炎症性疾患6例（脳梗塞2名、運動ニューロン疾患2名、パーキンソン病2名、平均年齢 55.7 ± 11.7 歳）を用いた。本研究は、東北大学医学部倫理委員会の基準に従い、患者の同意を得て行われた。

方 法

1. リンパ球の分離

末梢血を EDTA 入りのベノジェット 真空採血管（テルモ社、東京）に採取後、Ficall-Paque Plus（Pharmacia Biotech, Sweden）にて比重遠心分離し、リンパ球の存在する中間層を抽出し赤血球および顆粒球を除去した。回収したリンパ球はさらに PBS（Phosphate buffered saline）にて2回洗浄後、Lysis Buffer（155 mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM EDTA）にて5分間処理して赤血球を除去し、PBS にて2回洗浄後 assay buffer（0.5% BSA, 2mM EDTA 加 PBS）に浮遊させた。髄液細胞は、髄液を遠心して沈査を作成し、洗浄後 assay buffer に浮遊させた。

2. 3カラーフローサイトメトリー

3カラーフローサイトメトリーは、直接又は間接免疫蛍光法にて施行した。1×10⁶個の細胞を assay buffer に浮遊させて、20分間ヒト血清でブロッキング後（4℃）、細胞を表1で示した抗体の組み合わせにて氷上で30分反応させた。反応後、assay buffer で2回洗浄した。すべての反応は遮光下で施行した。細胞は FACS Calibur（Becton Dickinson(BD), San Jose, CA）にて、表面マーカーの解析を施行した。はじめに、前方散乱光（FSC）、側方散乱光（SSC）にて gating し、リンパ球を選択しそれぞれ1×10⁴個のリンパ球における染色陽性細胞の割合を Cell Quest ソフトウェアを用いて解析した。統計学的検討は、Mann-Whitney's U test あるいは Wilcoxon signed-ranks test を用いた。今回使用したモノクローナル抗体は以下の通りである。Phycoerythrin (PE) ラベル CD4 (BD, CA)、Fluorescein isothiocyanate (FITC) ラベル CD4 (BD, CA)、FITC ラベル CD8 (BD, CA)、Peridinin chlorophyll protein (PerCP) ラベル CD8 (BD, CA)、PerCP ラベル CD4 (BD, CA)、FITC ラベル CD45RA (BD, CA)、PE ラベル

CD45RO (BD, CA)、ビオチン化 CCR1 (DAKO, Denmark)、ビオチン化 CCR2 (DAKO, Denmark)、PE ラベル CCR3 (DAKO, Denmark)、CCR4 (マウスIgG1) (松島綱治先生より供与)、ビオチン化 CCR5 (DAKO, Denmark)、CCR6 (マウスIgG1) (義江修先生より供与)、CCR7 (rat IgG2a) (義江修先生より供与)、CCR7 (mouse IgG, Pharmingen, San Diego, CA)、PE ラベル CXCR3 (BD, CA)、PE ラベル CXCR4 (BD, CA)。精製抗体の染色時には、二次抗体として biotin rat IgG2a (Pharmingen, San Diego, CA) や biotin mouse IgG1 (Pharmingen, San Diego, CA) を用いて反応させた後、Streptoavidin PerCP (BD, CA) にて染色を行った。ネガティブコントロールにはビオチン化マウス IgG1 (CMG115, Cedarlane, Hornby, Canada) を使用した。

3. RT-PCR

RT-PCR には、表2に示す MS 剖検脳5例 (脱髄病巣及び非病巣白質)、正常対照脳2例、陽性対照群として重症筋無力症過形成胸腺3例の凍結組織を用いた。組織からの RNA の抽出は、Trizol (Gibco BRL, MD) を用いた Guanidium Isothiocyanate method で行った後、Superscript Preamplification system (Gibco BRL, MD) を用いてFirst-strand cDNA を得た。各種のケモカイン及びケモカイン受容体に対する特異的プライマーを用いて検討した。GAPDH を内因性のコントロールとして hot-start PCR method により半定量的 PCR を行った。PCR (Takara Taq, Takara Shuzo, Shiga) は全て30サイクル、アニーリング温度58°Cで施行した。PCR 産物はアガロース電気泳動にて泳動し、ethidium bromide で染色後半定量的に比較解析した。

4. 免疫組織化学

MS 剖検脳5例 (脱髄病巣及び非病巣白質)、正常対照脳2例の凍結組織を用いて免疫組織化学法を施行した。献体は、クライオスタット (Leica Japan, Tokyo) にて5~10 μ mの薄切標本を作製した後、全て常温で30分風乾した後、-80°Cに冷凍保存した。パラフィン切片には、10mM クエン酸溶液 pH6.0 に浸漬し、オートクレーブを用いて121°C、5分間の抗原賦活処理を施した。内因性ペルオキシダーゼの不活化のため0.3%過酸化水素水加100%メチルアルコールに15分浸漬した。その後まず10%ウサギ正常血清あるいは10%ヤギ正常血清 (Nitirei, Japan) と室温で15分間反応させ、PBS にて洗浄後、一次抗体として抗人 CCR7 抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA)、抗人 ELC 抗体 (Genzyme/Techne, USA)、抗人 SLC 抗体 (Genzyme/Techne, USA)、抗人 CD4 抗体、抗人 CD8 抗体 (Nitirei, Japan)、抗人 CD45LCA 抗体 (DAKO, CA)、抗牛 GFAP 抗体 (DAKO, CA)、抗人 CD68 抗体 (DAKO, CA)、抗人 HLA-DR (DAKO, CA) と反応させた (4°C、12時間)。PBS にて洗浄後、二次抗体 goat anti-mouse Envision+ / HRP (DAKO, CA) あるいは rabbit anti-goat antibody (Histofine MAX-PO(G), Nitirei, Tokyo) と室温で30分間反応させた。その後 Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) で発色させた。各切片はヘマトキシリンで対比染色の後封入して検討した。

5. CDR3 spectratyping analysis

詳細は既報告のとおりである¹⁵。MS 患者 (n=42) の再発時あるいは寛解時の末梢血および髄液

単核球・正常対照 (n=30) を用いて検討を行った。各々の細胞より RNA を分離し、各々の TCR V領域特異的 Primer を用いて cDNA を作製し、PCR 産物は同量の formamide/dye 泳動バッファーと混合した後、94°Cで2分加熱処理した。2ul を6% acrylamide ゲル (30W、210分) にて泳動した。FMBIO fluorescence image analyzer (Hitachi, Yokohama) を用いて、DNA 泳動結果を直接記録し、oligoclonal expanded pattern を視覚的・客観的に決定した。

研究結果

1. CD4 陽性T細胞

末梢血 CD4 陽性細胞に占める各種ケモカイン受容体の解析では、MS 症例では Th1 関連の CCR5 や一部リガンドを共有する CCR2 が正常対照に比して有意に増加していたが ($p<0.05$)、一方 Th2 関連の CCR3 や CCR4 は有意に減少していた ($p<0.05$)。CCR1, CXCR3, CXCR4, CCR6 は有意な差が認められなかった。また MS 症例の再発時における髄液と末梢血の比較においては、髄液中の CCR1, CCR5, CXCR3 の発現は末梢血中の値に比べて有意に増加していたのに対し ($p<0.001$)、髄液中の CCR4 は逆に有意に減少していた ($p=0.016$)。CCR3 は髄液中で有意に多く発現していた ($p=0.005$)。髄液中の CCR2 の発現は末梢血中の発現と差はなかった。

2. CD8 陽性T細胞

MS 症例の再発時の末梢血 CD8 陽性T細胞に占める各種ケモカイン受容体の発現率は、CD4 で の検討と同様の傾向であり、CCR5 の発現は正常対照に比して有意に ($p=0.028$) 増加しており、一方 CCR4 は有意に ($p=0.03$) 減少していた。また MS 症例における再発時の髄液と末梢血の比較においては、髄液中の CCR1, CCR5, CXCR3 の発現は末梢血の値に比べて有意に増加していたのに対し ($p<0.01$)、CCR3 の発現には有意差は認められなかった。

3. 急性憎悪期及び寛解期における各種ケモカイン受容体発現の比較検討

急性憎悪期及び治療後寛解期における末梢血 (CD4 細胞の CCR1~CCR5、CXCR3 及び CD8 細胞の CCR1、4、5、CXCR3 の各発現率) 及び髄液中 (CD4 及び CD8 細胞中の CCR5、CXCR3 の各発現率) 各ケモカイン受容体発現率を検討した結果、末梢血においては治療前後で有意差が認められなかったが、髄液中 CD4 細胞の CCR5 発現率は有意に治療後に減少した ($p<0.05$)。CXCR3 の発現率は有意差はなく、治療寛解後も高い発現率がみられた。

4. 末梢血及び髄液中の CCR7 発現細胞

末梢血及び髄液中の Tcm について検討したところ、髄液中では MS 再発時 ($31.3\pm 8.0\%$) は、MS 寛解期 (15.1 ± 9.9)、無菌性髄膜炎 (15.5 ± 1.9) や非炎症性疾患群 (7.1 ± 5.5) に比して有意に増加しており、また MS の再発時の末梢血や正常対照群の末梢血に比して増加していた。一方、CD4 陽性細胞における Tem 細胞の割合は疾患や対照群に関わらず中枢神経系においては末梢血に比し

て高値であるが、MS 再発時には髄液中の発現率は寛解時に比べ低下する傾向がみられた。髄液中の naive T細胞は、MS 再発時 (4.3±1.6%)、MS 寛解時 (4.0±2.0%)、対照群 (5.1±4.6%) などいずれも末梢血対照群 (39.7±16.9%) や MS 末梢血 (39.5±15.4%) に比して有意に低値であった。

5. MS 病巣及び対照群の病理所見及び mRNA レベルの検討

MS 5例のうち4例は脱髄巣の周囲に軽度から中等度のグリオーシスと著明なマクロファージの浸潤を伴っており、De Groot らが提唱する MS の病巣分類では chronic active であった。一方、1例の MS は、著明な脱髄及びグリオーシスを伴うがマクロファージの浸潤が比較的軽度であり、chronic inactive と考えられた。Th1 関連のケモカイン・ケモカイン受容体遺伝子の発現が優位であり、Th2 関連因子はほとんど発現が認められなかった。4例 chronic active な病巣を有する脱髄病巣において CCR7 および ELC の mRNA の発現が認められたが、SLCの発現は極わずかであった。一方正常大脳白質では1症例を除いて発現は認められず、脱髄病巣で優位に発現していると考えられた。また一次・二次抗原提示が行われている胸腺組織においては CCR7、SLC、ELC いずれも明らかな発現がみられた。

6. MS 病変部における CCR7 陽性抗原提示細胞およびT細胞

CCR7 陽性細胞は形態的にはマクロファージやミクログリアと思われた主に血管周囲に浸潤する細胞に発現が見られるが血管内皮には発現していない。一方、CCR7 のリガンドである ELC は血管内皮及び血管周囲のグリア系細胞に発現が見られる。特に ELC に関しては管内皮細胞に優位に発現が見られた。非病巣には、脱髄病巣に見られるような ELC の発現は認められなかった。

7. MS の髄液浸潤リンパ球の CDR3 spectratyping

MS 患者の末梢血中において Vβ5.2 の clonality が33.3%に認められ、またVβ24 (14.3%)、Vβ1 (9.5%)、Vβ9/11 (9.5%) も認められた。髄液・末梢血の両者で検討を行い得た6例全例において、末梢血での発現に関わらず髄液中で Vβ5.2 が clonality を示した。

考 察

MS 中枢神経系の Th1 関連ケモカインの優位性

MS の病態においては、IFNγ や IL-2、TNFα が病勢に関連するなど、Th1 優位な病態であることは周知の事実であるが、細胞遊走に関わるケモカインの観点から Th1・Th2 関連因子を検討した報告は未だに少ない。

我々は再発時の MS 髄液中の CCR5 陽性 Th1 細胞の割合は寛解時に比して有意に高く、治療後寛解期に有意に低下することを明かにした¹⁶。一方、Th2 関連の髄液中の CCR4 陽性細胞は対照群に比して有意に再発時に減少しており、また CCR3 や CCR4 は末梢血に比して髄液中で低下していた。MS 再発の病態において、ケモカインによる検討からも Th1 優位に傾くことが重要であることが明か

となった。Th1 関連ケモカイン受容体のうち MS の再発時には CCR5 を介した自己反応性 Th1 細胞が中枢神経系へ浸潤し、Th1 サイトカインである IFN γ を放出して炎症性脱髄の病態を引き起こしていると考えられる¹¹。

CXCR3 については、MS の髄液中あるいは脱髄巣周囲の CD4 あるいは CD8 陽性 T 細胞の多くが発現することが報告され、また CXCR3 のリガンドである IP-10 が血管周囲のアストログリアに発現することが報告された¹⁰。また、髄液中の IP-10 は髄液細胞数と相関することが示されるなど、Th1 細胞の中枢神経系への浸潤に重要な因子と考えられている¹⁰。我々の検討では、CXCR3 の発現は MS 再発時の CD4 及び CD8 陽性細胞の大部分において認められ、また寛解期にも髄液中 T 細胞の CXCR3 発現率は低下していなかったことから、病勢に関わらず Th1 細胞の中枢神経系の浸潤に用いられている受容体であることを示唆している。Th1 細胞が髄液中に浸潤する際に恒常的に CXCR3 が利用されているとすれば、治療への応用も期待される場所である。その一つの試みとして、CXCR3 のリガンドである IP-10 を中和抗体を用いて抑制したところ、むしろ EAE が増悪することが示された。IP-10 が末梢リンパ組織で働く際に抗原特異的 T 細胞に対して抑制的に働くなど、中枢神経系の発現とは異なる役割を持っている可能性が示され、今後さらなる検討が期待される¹⁷。

中枢神経系における CCR7 関連因子の役割

リンパ節におけるリンパ球のホーミングの際には CCR7 及びそのリガンドが大きく関与している。まずリンパ球表面に発現している L-セレクチンやインテグリンを介して高内皮細静脈 (high endothelial venules; HEV) と弱く接着してローリングをした後、血管内皮上の ICAM-1 と強固に接着すると HEV の間隙へ潜り込む。血管内皮上に発現する CCR7 のリガンド (SLC など) により、CCR7 を発現する naïve T 細胞が遊走を受けることが示唆されている^{14, 16}。末梢組織で抗原を捕捉して CCR7 を発現した樹状細胞は輸入リンパ管よりリンパ節に入り、同様に SLC などを経た遊走を受け、さらに ELC を介して T 細胞領域に集積し、抗原提示が行われている¹³。MS は中枢神経抗原に対する自己免疫疾患とされてきたが、未だに実際に抗原提示が行われている部位や動態については議論が分かれている¹²。実際の中枢神経内は血液脳関門により細胞や物質が容易に流入できず、またリンパ組織が存在しないなど他の臓器と異なる特殊な環境がある。MS を含めた自己免疫疾患において病状の進行とともに自己抗原への反応性が拡大する (Epitope spreading) ことが知られるようになり¹⁸、病巣局所での抗原提示および免疫記憶の保持は病態を説明する上で重要と考えられる。

T_{cm} 細胞は MS の再発時において、末梢血においては変化が認められなかったが髄液中においては寛解期や非炎症疾患群に比して有意に多く、また無菌性髄膜炎患者の髄液と比較しても有意に高いため、単なる反応性の増加ではなく MS の病勢に関係して増加していると推測される。慢性期の MS 剖検脳病巣組織において CCR7 やそのリガンドである ELC の mRNA の発現が同症例の非病巣組織や対照群に比して多く発現していること、CCR7 陽性の抗原提示細胞の存在が認められること、急性期には髄液中あるいは病変局所に T_{cm} 細胞が浸潤していることなどから、MS 再発の際に CCR7 を介した何らかの免疫反応が起こっているものと推測される。CCR7 及びそのリガンドはリンパ組織

における免疫記憶機構に非常に重要であるが、今回の結果から MS の中枢神経内で CCR7 を介した抗原提示による機構が MS の病態に関与する可能性が示唆された。今後モデル動物などによりさらに詳細な検討が必要と思われる。

MS 病態に関連する T 細胞受容体レパートリー

MBP 特異的 T 細胞株が特定の TCR を用いることや、MBP 特異的 T 細胞、HLA-DA2 および人 CD4 を移入したマウスが中枢神経系に自然発症の脳症を起こすことが知られ、特定の T 細胞レパートリーが MS の病態に深く関与することが示唆されている。しかし、過去の報告はいずれも MBP など株化した細胞における検討が中心であり培養による影響が強く関与すると考えられた。非刺激下での末梢血や髄液での検討は少なく、病態を考える上で髄液中リンパ球のレパートリーを検討することは非常に重要と考えられる。

今回の検討により、従来の報告が示すように MS 患者では末梢血中に V β 5.2 が高頻度であることが示されたが、更に特筆すべきは末梢血・髄液を同時期に調べることができた患者では、末梢血の結果に関わらず髄液中では一様に V β 5.2 が expand していることが示された。神経抗原反応性株が V β 5.2 を用いることが示されているように、V β 5.2 が MS の病態に深く関わることを示唆するとともに、髄液中に浸潤する細胞はより病態に関わるサブセットを反映していると推測され、今後 MS の病態に関わる因子を検討する上で興味深い。今後は更に髄液中に expand する細胞がどのような性状の細胞であるのかを検討していくことが必要と考え、現在患者由来の V β 5.2 陽性等の特定の repertoire を持った株の樹立を目指している。

おわりに

今回の検討により、MS の中枢神経系内においては Th1 型のケモカイン受容体である CCR5 や CXCR3 の発現が優位であり、また多くのケモカインをリガンドとして共有する CCR1 や CCR2 の関与が示唆された。一方、Th2 型の受容体である CCR3 や CCR4 の発現は中枢神経内で低下する傾向がみられた。病状の回復とともに髄液中の CCR5 陽性 Th1 細胞の割合が低下したことから、このリンパ球サブセットは疾患活動性を反映していることが示唆され、今後 MS の治療法を開発する際の標的として期待される。また naive 細胞や Tcm 細胞に発現するとされる CCR7 やそのリガンドの発現が MS の活動期の病巣で増加していることが確認され、MS の病態における Tcm 細胞の病態への関与が示唆され興味深い。

MS におけるこれらのケモカイン受容体およびそのリガンドの解析結果は、今後有効な治療法の開発に有用な知見となることが期待される。

References

1. Martin, R., McFarland, H.F., McFarlin, D.E., 1992. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 153-187.
2. Steinman, L., 1996. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 85, 299-302.
3. Ransohoff, R.M., 1999. Mechanisms of inflammation in MS tissue : adhesion molecules and chemokines. *J. Neuroimmunol.* 98, 57-68.
4. Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Schindler, J., et al, 1987. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 37, 1097-1102.
5. Olsson, T., Wang, W.Z., Hojeberg, B., et al., 1990. Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen induced secretion of interferon-gamma. *J. Clin. Invest.* 86, 981-985.
6. Strunk, T., Bubel, S., Mascher, B., Schlenke, P., Kirchner, H., Wandinger, K-P., 2000. Increased numbers of CCR5+interferon- γ -and tumor necrosis factor- α -secreting T lymphocytes in multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.* 47, 269-273.
7. Luster, A.D., 1998. Chemokines-Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New Engl. J. Med.* 338, 436-445.
8. Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P.A., Mantovani, A., Sinigaglia, F., 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.* 187, 129-134.
9. Imai, T., Nagira, M., Takagi, S., Kakizaki, M., Nishimura, M., Wang, J., Gray, P.W., Matsushima, K., Yoshie, O., 1999. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int. Immunol.* 11, 81-88.
10. Sørensen, T.L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V.A., Qin, S., Rottman, J., Sellebjerg, F., Strieter, R.M., Frederiksen, J.L., Ransohoff, R.M., 1999. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest.* 103, 807-815.
11. Balashov, K.E., Rottman, J.B., Weiner, H.L., Hancock, W.W., 1999. CCR-5⁺ and CXCR3⁺ T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 96, 6873-6878.

12. McManus, C., Berman, J.W., Brett, F.M., Staunton, H., Farrell, M., Brosnan, C.F., 1998. MCP-1, MCP-2, MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J. Neuroimmunol.* 86, 20-29.
13. Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., et al., 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23-33.
14. Sallust, F., Lenig, D., Förster, R., et al., 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712.
15. Matsumoto, Y., Yoon W.K., Jee, Y., Fujihara, K., Misu, T., Sato, S., Nakashima, I., Itoyama, Y., 2003. Complementarity-Determining region 3 spectratyping analysis of the TCR repertoire in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 170, 4846-4853.
16. Misu, T., Onodera, H., Fujihara, K., et al., 2001. Chemokine receptor expression on T cells in blood and cerebrospinal fluid at relapse and remission of multiple sclerosis: imbalance of Th1/Th2-associated chemokine signaling. *J. Neuroimmunol.* 114, 207-212.
17. Narumi, S., Kaburaki, T., Yoneyama, H., et al., 2002. Neutralization of IFN-inducible protein 10/CXCL10 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 32, 1784-1791.
18. Baekkevold, E.S., Yamanaka, T., Palframan, R.T., et al, 2001. The CCR7 ligand ELC (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J. Exp. Med.* 193, 1105-1111.
19. Lehmann, P.V., Forsthuber, T., Miller, A., et al., 1992. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 358, 155-7.

Recent progress in Neuroimmunology and NKT cell research

Special symposium supported by Japan Multiple Sclerosis Society

事務局 国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部
平成 16 年 3 月 9 日 (火) 10:00 – 17:00
全共連ビル (東京都千代田区) 本館 1 階 Room No.5

10 : 00-

Opening remarks

10 : 10- 11 : 10

Session I: New topics in the basic research of multiple sclerosis

(Chair: Jun-ichi Satoh)

Takashi Kanda (*Tokyo Medical and Dental University*) [20 min]

Neuroimmunological Disorders and Barrier Breakdown

J. L. Croxford (*National Institute of Neuroscience*) [20 min]

Immunoregulation of viral model of multiple sclerosis using the synthetic cannabinoid R+ WIN55,212

Jun-ichi Satoh (*National Institute of Neuroscience*) [20 min]

14-3-3 protein epsilon isoform expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis: Its binding to vimentin and GFAP in cultured human astrocytes

11 : 10 – 11 : 45

Special Lecture (I)

(Chair: Takashi Yamamura)

Dale I. Godfrey (*University of Melbourne*) [35 min]

Evidence for functionally distinct mouse NKT cell subsets based on tissue of origin and CD4 expression

11 : 50-13 : 00

***** Lunch *****

13 : 00-13:45

Special lecture (II)

(Chair: **Takashi Yamamura**)

Terry L. Delovitch (*University of Western Ontario*) [45 min]
Cytokine- and chemokine-mediated regulation of iNKT cell activity in the prevention of type 1 diabetes

13:45-15:05

Session II : The role of NKT cells in the immunopathology

(Chair: **Sachiko Miyake**)

Ko-hei Sonoda (*Kyushu University*) [20 min]
The role of NKT cells in the ocular inflammatory disease

Kazuya Iwabuchi (*Hokkaido University*) [20 min]
A possible role of NKT cells in the development of atherosclerosis

Yoshitaka Ueno (*Hiroshima University*) [20 min]
Role of NKT cells in the inflammatory response of experimental colitis in mice

Asako Chiba(*National Institute of Neuroscience*) [20 min]
The role of NKT cells in collagen-induced arthritis

15:05-15:20

***** Coffee break *****

15:20-16:05

Session III. The glycolipid ligand therapy: mechanism

(Chair: **Kazuya Iwabuchi**)

Sachiko Miyake(*National Institute of Neuroscience*) [25 min]
The clinical application and molecular mechanism of preferential IL-4

production by OCH

Sachiko Hirose (*Juntendo University*) [20 min]

Genetic dissection of autoimmune disease and NKT cell function

16:05-16:45

Session IV. Invariant T cells and autoimmunity

(Chair: **Sachiko Hirose**)

Michio Shimamura (*Mitsubishi Kagaku Institute of Life Science*) [20 min]

Development and immunoregulatory functions of a novel subset of NKT cells bearing an invariant V α 19-J α 26 (AV19-AJ33) TCR α chain

Takashi Yamamura (*National Institute of Neuroscience*) [20 min]

The role of invariant T cells in multiple sclerosis

16:45

Closing Remarks

Neuroimmunological Disorders and Barrier Breakdown

Takashi Kanda

Department of Neurology and Neurological Science, Tokyo Medical and Dental University Graduate School

Endothelial cells (ECs) in the adult central nervous system (CNS) and also in the peripheral nervous system (PNS) are coupled by tight junctions (TJ) that resemble those of epithelial barriers and show extremely low permeability. Breakdown of these TJ in the blood-brain barrier (BBB) and blood-nerve barrier (BNB) may admit anti-myelin antibodies and various inflammatory cytokines to central and peripheral nerve tissues, exacerbating nervous system injury in multiple sclerosis (MS), inflammatory neuropathies including Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). Hence, development of new therapeutic strategies to restore BBB/BNB function based on properties of these barriers long has been awaited. Using cultured ECs obtained from microvessels from CNS and PNS, we investigated the characteristics specific for these cells and mechanisms of barrier breakdown in neuroimmunological disorders. Conclusion: (1) ECs forming BBB/BNB are different from ECs originated from non-neuronal tissues in the expression of certain barrier-specific proteins and various chemokines. (2) Microvascular ECs from nervous system share various glycosphingolipid antigens with CNS/PNS parenchyma. (3) Scattered distribution of the lesions in neuroimmunological disorders is a reflection of patchy destruction of BBB/BNB. (4) Mechanisms to destroy BBB/BNB include (a) Extravasation of humoral factors and (b) Inflammatory cell invasion, which are triggered by inflammatory cytokines. (5) BBB/BNB may select some population of lymphocytes to be infiltrated into CNS/PNS parenchyma.

Symptomatic and Therapeutic Treatment of Animal Models of Multiple Sclerosis by Cannabinoids

J. Ludovic Croxford

*National Institute of Neuroscience,
Tokyo, JAPAN.*

Multiple sclerosis (MS) is a human autoimmune demyelinating disease of the central nervous system (CNS), whereby the immune system attacks myelin, the outer covering of nerve fibres. MS symptoms include spasticity, tremor, bladder dysfunction, weakness and pain. Current potent immunosuppressive therapies such as beta-interferon and copaxone decrease the MRI-lesion load, and blood-brain barrier dysfunction in relapsing-remitting MS. In addition, patients often suffer from fewer relapse episodes. However, disease progression is largely unaffected in a high number of relapsing-remitting MS patients. Furthermore, it is unclear whether they are beneficial in primary-progressive MS. Therefore, there is a need for novel therapeutic agents with which to treat MS.

Anecdotal evidence, and recent clinical surveys suggest that many MS patients derive subjective improvements in spasticity, chronic pain and spasms from smoking or marijuana. Cannabinoid agonists such as Δ^9 -tetrahydrocannabinol and R(+)-WIN55,212 mediate their effects through cannabinoid receptors (CB). CB1 is mainly expressed on CNS neurons and is thought to be involved in the regulation of neurotransmission. In contrast, CB2 is expressed only in the periphery on leucocytes, and is thought to have an immunomodulatory role. Therefore cannabinoids may be beneficial in the symptomatic and therapeutic treatment of animal models of MS.

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an animal model of MS mediated by myelin-specific CD4⁺ T cells. EAE induction in Biozzi ABH mice leads to a relapsing-remitting course of disease. Following the 3-4th relapse episode mice develop spasticity and tremor. R(+)-WIN55,212 treatment of these mice can significantly reduce spasticity and tremor associated with EAE, as early as 5 minutes post-treatment and up to 1-2 hours. Furthermore, treatment with endogenously occurring cannabinoids or inhibitors of cannabinoid transport or hydrolysis can also reduce spasticity.

Cannabinoids also have immunosuppressive effects. As immune cells express CB2, this could be a potential therapeutic target for inhibition of autoimmune disease. Intra-cranial

infection of SJL mice with Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) induces a chronic progressive form of disease similar to primary-progressive MS. We have demonstrated that treatment with R(+)WIN55 at the time of infection, at the onset of clinical disease or during ongoing disease can significantly inhibit clinical disease. This effect was associated with the inhibition of delayed type hypersensitivity reactions and IFN- γ responses of myelin specific T cells, which mediate disease.

In conclusion, cannabinoids are potent therapeutic agents which may be beneficial in MS both as a symptomatic treatment for spasticity and as an immunosuppressive agent in chronic progressive disease.

Recent progress in Neuroimmunology and NKT cell research

—Special symposium supported by Japan Multiple Sclerosis Society—

- 事務局) 国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部
- 平成16年3月9日(火) 10:00-17:00
- 全共連ビル(東京都千代田区)本館1階 Room No. 5

- Takashi Kanda** *Neuroimmunological Disorders and Barrier Breakdown*
- J. L. Croxford** *Immunoregulation of viral model of multiple sclerosis using the synthetic cannabinoid R+ WIN55,212*
- Jun-ichi Satoh** *14-3-3 protein epsilon isoform expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis: Its binding to vimentin and GFAP in cultured human astrocytes*
- Dale Godfrey** *Evidence for functionally distinct mouse NKT cell subsets based on tissue of origin and CD4 expression*
- Terry L. Delovitch** *Cytokine- and Chemokine-Mediated Regulation of iNKT Cell Activity in the Prevention of Type 1 Diabetes*
- Ko-hei Sonoda** *The role of NKT cells in the ocular inflammatory disease*
- Kazuya Iwabuchi** *A possible role of NKT cells in the development of atherosclerosis*
- Yoshitaka Ueno** *Role of NKT cells in the inflammatory response of experimental colitis in mice*
- Asako Chiba** *The role of NKT cells in collagen-induced arthritis*
- Sachiko Miyake** *The clinical application and molecular mechanism of preferential IL-4 production by OCH*
- Sachiko Hirose** *Genetic dissection of autoimmune disease and NKT cell function*
- Michio Shimamura** *Development and immunoregulatory functions of a novel subset of NKT cells bearing an invariant V α 19-J α 26 (AV19-AJ33) TCR α chain*
- Takashi Yamamura** *The role of invariant T cells in multiple sclerosis*

参加ご希望の方は下記までご連絡下さい。

国立精神・神経センター 神経研究所 免疫研究部 山村 隆

yamamura@ncnp.go.jp

The 14-3-3 protein epsilon isoform expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis: Its binding to vimentin and GFAP in cultured human astrocytes

Jun-ichi Satoh

Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, Tokyo, Japan.
(satoj@ncnp.go.jp)

Objective: To investigate the differential expression of seven 14-3-3 isoforms in multiple sclerosis (MS) lesions. **Background:** The 14-3-3 protein is a family of acidic 30-kDa proteins enriched in the brain with the localization primarily in neurons. Seven isoforms, named β , γ , ϵ , ζ , η , θ , and σ , form a dimeric complex which acts as a novel type of molecular chaperone interacting with key signaling components. The 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid (CSF) provides a diagnostic marker for Creutzfeldt-Jacob disease, although we recently showed that it is also detectable in the CSF of MS patients at the peak of acute relapse, suggesting that this protein is a marker for extensive brain destruction (Satoh et al. J Neurol Sci 212: 11-20, 2003). However, it remains unknown whether the 14-3-3 protein plays an active role in pathological processes of MS. **Methods:** Brain tissues of four progressive cases were immunolabeled with a panel of isoform-specific antibodies. Pure astrocyte cultures were established from human neuronal progenitor cells incubated in the 10% FBS-containing culture medium. The 14-3-3 protein-binding proteins were identified in cultured human astrocytes by protein overlay on 2D blots, mass spectrometry, immunoprecipitation, and double immunolabeling analysis. **Results:** Reactive astrocytes in chronic demyelinating lesions expressed intensely β , ϵ , ζ , η , and σ isoforms, among which both ϵ and σ isoforms represent a highly specific marker for reactive astrocytes. Furthermore, the 14-3-3 ϵ , ζ , and β isoforms interacted with both vimentin and GFAP in cultured human astrocytes. Reactive astrocytes in MS lesions coexpressed vimentin, GFAP and ϵ isoform. **Conclusions:** These results suggest that the 14-3-3 protein plays an organizing role of the intermediate filament network by bridging vimentin and GFAP in reactive astrocytes in demyelinating lesions of MS.

"Evidence for functionally distinct mouse NKT cell subsets based on tissue of origin and CD4 expression."

Dale I Godfrey¹, Nadine Y. Crowe¹, Jonathan Coquet¹, Stuart P. Berzins¹, Konstantinos Kyparissoudis¹, Rachael Keating¹, Daniel G. Pellicci¹ and Mark J. Smyth²

1. Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Melbourne, Australia

2. Cancer Immunology Program, Peter MacCallum Cancer Centre, Melbourne, Australia

A paradox in the field of NKT cells is the diverse range of effects ascribed to these cells, ranging from promotion to suppression of cell-mediated immunity. NKT cells are essential for promoting tumour rejection in both methylcholanthrene-induced fibrosarcoma, and B16 melanoma mouse tumour models, yet in other models they have been implicated in suppression of tumour rejection. Similar conflicting evidence has been presented in autoimmune disease models, including EAE in mice. We have shown that adoptive transfer of NKT cells from liver of normal mice into NKT cell deficient mice could fully restore anti-tumour immunity, and that this required IFN- γ production by the NKT cells. We sought to determine whether this was a general characteristic of NKT cells, and therefore compared liver-derived NKT cells to those from other tissues including thymus, spleen and bone marrow. Surprisingly, only liver NKT cells were capable of mediating tumour rejection. Furthermore, when liver NKT cells were subdivided into CD4⁺ and CD4⁻ subsets, the CD4⁻ subset was found to contain nearly all of the tumour protective capacity. The impaired ability of thymus-derived NKT cells to mediate tumour rejection was partly overcome by isolating these cells from IL-4 deficient mice, suggesting that production of IL-4 inhibits the anti-tumour capacity of NKT cells. This raises important questions about the differential role of these subsets in various diseases in which NKT cells have been implicated.

Cytokine and Chemokine-Mediated Regulation of iNKT Cell Activity in the Protection Against Type 1 Diabetes.

Terry L. Delovitch, Ph.D.

Autoimmunity/Diabetes Group, Robarts Research Institute, and Department of Microbiology and Immunology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada

A deficiency in the number and function of iNKT cells mediates the development of type 1 diabetes (T1D). Previously, we demonstrated that activation of iNKT cells with the CD1d ligand α -galactosylceramide (α -GalCer) corrects this deficiency and prevents the onset and recurrence of T1D in NOD mice. To investigate how α -GalCer enhances the number, function and migration of iNKT cells to secondary lymphoid organs in NOD mice, we conducted gene profiling studies and showed that α -GalCer treatment selectively increases IL-4 and IL-10 and decreases IL-16 gene expression in the spleen. Protection from T1D was observed in NOD.IL-10^{-/-} but not NOD.IL-4^{-/-} knockout mice treated with α -GalCer, indicating that expression of IL-4 but not IL-10 is required to achieve this protection. Given the importance of CD4⁺ T cells for the development of T1D, we examined whether IL-16 directs the recruitment of CD4⁺ T cells to islets and promotes islet inflammation and islet β cell destruction. We show that IL-16 mediates the pathogenesis of insulinitis and T1D in NOD mice, and that treatment with an anti-IL-16 mAb protects against T1D even when administered after the development of invasive insulinitis. The protection from T1D induced by anti-IL-16 mAb treatment involves the reduced trafficking of CD4⁺ and CD8⁺ T cells to islet lesions, increased susceptibility of CD4⁺ T cells to apoptosis and a dependency upon CCL4 activity. Administration of anti-CCL4 to anti-IL-16 treated NOD mice reverses anti-IL-16 mediated protection from T1D, suggesting that CCL4 protects against insulinitis and T1D in NOD mice. Importantly, these findings support the notion that IL-16 may antagonize CCL4 function *in vivo*. Thus, by the control of expression of IL-16 and CCL4 and their receptors, immunomodulation of iNKT cell number and activity by α -GalCer treatment may profoundly regulate susceptibility to T1D.

To determine how CCL4 confers protection from insulinitis and T1D, a model of intradermal gene transfer of CCL4 by a non-immunogenic HSV/EBV hybrid plasmid vector (pHERO8100) to NOD mice was investigated. NOD mice were administered pHERO8100-CCL4 (1 μ g/dose) or empty pHERO8100 intradermally once weekly during 3-14 or 9-14 wk of age, with similar results. One week later, protection from insulinitis and T1D was observed and correlated with a relative decrease of islet-infiltrating CD8⁺ T cells, reduced surface expression of CCR5 on spleen and islet-infiltrating CD8⁺ T cells and increased proliferation of spleen T cells accompanied by the elevated secretion of IL-2, IFN- γ , and CCL4. These spleen T cells adoptively transferred significant protection from T1D. PLN-derived T cells from these treated mice also produce elevated levels of CCL4, and display a 2-fold increase in the frequency of CD4⁺CD25⁺ T cells. To investigate whether pHERO8100-CCL4 induced protection from T1D depends upon decreased recruitment of CD8⁺ to the pancreas, NOD.8.3 TCR transgenic mice were treated weekly from 3 wk of age with pHERO8100-CCL4 (1 μ g/wk). This treatment significantly delayed the onset of T1D by 7 wk, suggesting that CCL4 blocks islet-specific CD8⁺ T cell recruitment to islets. Our data show that CCL4 may function as an anti-inflammatory chemokine in the protection against spontaneous T1D, and suggest that this protection is mediated by downregulating CD8⁺ T cell function and upregulating CD4⁺ regulatory T cell activity.

A possible role of NKT cells in the development of atherosclerosis

Kazuya Iwabuchi (Immunobiology, Inst. Genetic Medicine, Hokkaido University, Japan)

Atherosclerosis is an inflammatory vascular disease that involves components of both the innate and acquired immune systems. Previous studies have suggested that lymphocytes, which are detected in atherosclerotic lesions in both human and mouse, play a pro-atherogenic role. Recent studies have focused on the role of different lymphocyte subsets in the development of atherosclerosis. NKT cells constitute a unique subset of lymphocytes that express surface markers and have functional properties of both T-cells and NK-cells and recognize lipid antigens presented by the major histocompatibility complex (MHC) class I-like molecule CD1d. We assumed that NKT cells may be involved in atherogenesis and examined the potential role of NKT cells in the development of atherosclerosis. NKT-deficient CD1d^{-/-} mice, when fed an atherogenic diet, had significantly smaller atherosclerotic lesion areas in comparison with wild-type mice. Conversely, activation of NKT cells in apolipoprotein E^{-/-} mice with glycolipids during the early phase of atherosclerosis enlarged the lesion areas. NKT cell activation in apolipoprotein E^{-/-} mice with established atherosclerotic lesions did not accelerate disease, but decreased the collagen content and increased the number of foam cells. Development of atherosclerosis was associated with detection of V α 14J α 281 transcripts in the atherosclerotic arterial walls, indicating that NKT cells are recruited to these lesions. Macrophages incubated with oxidized low-density lipoproteins showed enhanced CD1d levels and induced NKT cells to produce interferon- γ . Collectively, we conclude that NKT cells are pro-atherogenic in mice.

Role of NKT cells in the inflammatory response of experimental colitis in mice

Yoshitaka Ueno¹, Shinji Tanaka², Takashi Yamamura³, Sachiko Miyake³, and Kazuaki Chayama¹

¹ Department of Medicine and Molecular Science, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan.

² Department of Endoscopy, Hiroshima University Hospital, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan.

³ Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan.

Background & AIM: Natural killer T (NKT) cells appear to play a key role in the development of various autoimmune diseases. However, the pathophysiological role of NKT cells in inflammatory bowel disease remains unclear. We have recently demonstrated that colonic mucosal NK-receptor positive T cells (CD56⁺T and CD161⁺T cells) are decreased in the inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. To clarify the mechanism by which NKT cells mediate protection against intestinal inflammation, we investigated the role of V α 14 NKT cells in a mouse experimental model of colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS). **METHODS:** Colitis was induced in C57BL/6 (B6) and J α 18 NKT cell-deficient (KO) mice by oral administration of 1.5% DSS for 9 days and assessed by body weights, bloody stools, and colonic mucosal injury. To examine the role of activated NKT cells on the protection against intestinal inflammation, NKT cell ligand, OCH or α -galactosylceramide (α GalCer) was administered on day 3 after induction of colitis. IFN- γ and IL-4 levels in the supernatants from *in vitro*-stimulated colonic lamina propria lymphocytes (LPLs) were measured by ELISA. **RESULTS:** Mice deficient for J α 18 NKT cells had more severe intestinal inflammation when treated with DSS. Administration of a single dose of OCH on day 3 of DSS treatment attenuated colonic inflammation in a J α 18 NKT cell-dependent manner. In contrast, treatment with α GalCer did not elicit protective

immunity. OCH but not α GalCer improved the IFN- γ /IL-4 ratio from *in vitro*-stimulated colonic LPLs on day 9 after DSS treatment. **CONCLUSIONS:** The present data indicated that activation of V α 14 NKT cells plays a pivotal role in mediating intestinal inflammation via altered Th1/Th2 responses. Therapeutic strategies designed to activate specifically V α 14 NKT cells may prove beneficial in treating intestinal inflammation.

A modified Glycolipid ligand, OCH Suppresses Collagen-induced Arthritis by Inducing Th2 Bias of Natural Killer (NK) T Cells

Asako Chiba, Takashi Yamamura, Sachiko Miyake
National Institute of Neuroscience, NCNP, Kodaira, Japan

We have previously reported on a modified glycolipid ligand OCH for CD1d-restricted NKT cells expressing the semi-invariant T cell receptor (Nature, 413:531-534). OCH is an analog of a prototype NKT cell ligand, alpha-galactosylceramide (α GC) with a truncated sphingosine chain and stimulates NKT cells to produce IL-4 predominantly, whereas α GC would render NKT cells produce both IFN- γ and IL-4. Here we show that OCH suppressed development of collagen induced arthritis (CIA).

C57BL6 Mice were immunized intradermally at the base of the tail with 100 μ g of chicken type II collagen (CII) emulsified with an equal volume of CFA, containing 250 μ g of H37RA Mycobacterium tuberculosis. Mice were boosted by intradermal injection with the same antigen preparation on day 21. Starting from day 21, mice were injected intraperitoneally twice per week with either OCH or α GC at a dose of 500 μ g/kg. Arthritis development was monitored by inspection three times a week, and was evaluated by histological examination on day 60. The level of serum antibodies to CII and cytokines were measured by ELISA. We also examined the effect of OCH on CIA induced with bovine CII in SJL mice, which are known to have reduced number of NKT cells and susceptible to CIA. OCH treatment effectively inhibited development of arthritis both in B6 and SJL mice. In contrast, administration of α GC didn't suppress arthritis. Histological analysis revealed that OCH treatment protected against infiltration of inflammatory cells and destruction of cartilage and bone. We next examined the effect of OCH on CIA induced in CD1 knockout (KO) mouse in which NKT cells are deficient. CIA induced in CD1 KO mice was not suppressed by OCH, indicating that the protective effect for arthritis of OCH is dependent on NKT cells. Neutralization of IL-4 and IL-10 with monoclonal antibodies abolished disease protection by OCH, which indicates a critical role of these cytokines in OCH-mediated suppression of CIA.

In summary, we demonstrate that a new synthetic glycolipid OCH suppresses CIA by inducing predominant production of Th 2 cytokines by NKT cells. The lack of polymorphism of CD1d and cross-reactive response of mouse and human NKT cells to the same ligand indicates that targeting NKT cells with OCH may be an attractive means for intervening in human autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis.

The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells

Sachiko Miyake, Asako Chiba, Takashi Yamamura, Shinji Oki

OCH, a sphingosine-truncated analogue of α -galactosylceramide (α GC), is a potential therapeutic reagent for a variety of Th1-mediated autoimmune diseases through the selective induction of Th2 cytokines from natural killer T (NKT) cells. The molecular mechanism of differential cytokine production in NKT cells by different glycolipid antigen is a major question for the development of drug targeting NKT cells. We demonstrate here that the NKT cell production of IFN- γ is more susceptible to the sphingosine length of glycolipid ligand than that of IL-4, and the length of sphingosine chain determines the stability of ligand binding to the CD1d molecule expressed on antigen presenting cells. Furthermore, IFN- γ production by NKT cells requires longer T cell receptor stimulation than required for IL-4 production by NKT cells stimulated either with immobilized anti-CD3 mAb or immobilized α GC-loaded CD1d molecule. Interestingly, transcription of IFN- γ , but not that of IL-4 was sensitive to cycloheximide treatment, indicating the intrinsic involvement of de novo protein synthesis for IFN- γ production by NKT cells. Finally, we determine c-Rel is preferentially transcribed in α GC-stimulated, but not in OCH-stimulated NKT cells and is an essential protein for IFN- γ production by activated NKT cells.

Genetic dissection of autoimmune disease and NKT cell function

Sachiko Hirose, Kazuyuki Tsukamo and Shuji Matsuoka

Department of Pathology, Juntendo University School of Medicine

Genes that predispose to systemic lupus erythematosus (SLE) are closely related to key events in pathogenesis of this disease. As much of the pathology can be attributed to high affinity autoantibodies, some of the genes may exert effects in the process of emergence, activation and differentiation of self-reactive B cells. We have so far examined the genetic basis for aberrant activation of self-reactive B cells using SLE-prone (NZB x NZW) F1 mice. In the present studies, we focused on the role of NKT cells in the pathogenesis of SLE, since NKT cells are now shown to be central regulator of Th1/Th2 cytokine balance, which plays a pivotal role in immune regulation and in autoimmune disease. However, there are reports showing two contradictory effects of NKT cells on SLE, i.e., suppressive or enhancing effects. To determine the exact role of NKT cells on SLE, we examined genetic basis of NKT cell function in (NZB x NZW) F1 mice, and found that major two genes contribute to IL-4 production by NKT cells and that these genes partly contribute to SLE pathogenesis.

Development and immunoregulatory functions of a novel subset of NKT cells bearing an invariant V α 19-J α 26 (AV19-AJ33) TCR α chain

Michio Shimamura

Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences

Invariant V α 19-J α 26 TCR α -bearing cells, originally found in peripheral blood, are predominantly present as NKT cells in liver. To further characterize this subset (V α 19 NKT cell), transgenic mice overexpressing the invariant TCR α gene (V α 19 Tg mice) were analyzed. NK1.1⁺, TCR $\alpha\beta$ ⁺ cells develop in the liver, spleen, lymph nodes, bone marrow, thymus and intestine of the V α 19Tg mice in a TCR α -deficient background, thus indicating that the expression of the invariant TCR α chains is responsible for the development of V α 19 NKT cells. Upon invariant TCR engagement *in vivo* and *in vitro* spleen and liver lymphocytes isolated from the V α 19 Tg mice on a CD1-deficient background exhibited a Th2-dominant phenotype in the early phase followed by Th1-dominant cytokine production. V α 19 NKT cells are suggested to be involved in the homeostasis of Th1/Th2 balance since they moderated the disease conditions caused by excess of either Th1 or Th2. V α 19 NKT cells were reactive to certain glycolipids with non-reducing end α -mannosyl residues in the context of MR1. Collectively, V α 19 NKT cells are demonstrated to participate in the control of Th1/Th2 immune responses in cooperation with V α 14 NKT cells and may be important in mediating cross-talk between the innate and adaptive immune systems.

Invariant T cells in multiple sclerosis

Takashi Yamamura MD,PhD

Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP

As is widely known, a highly diverse human T cell repertoire would contain numerically minor subpopulations characterized by expression of an invariant TCR α -chain and recognition of non-peptide antigens. The representative “invariant” T cells, namely human CD1d-restricted T cells, expressing invariant V α 24 TCR, could rapidly produce regulatory cytokines upon recognizing glycolipid bound to CD1d. Because of the outstanding ability to produce Th1 and Th2 cytokines and due to their numerical reduction in autoimmune diseases, the V α 24 inv T cells are thought to play an important role in protecting against autoimmunity. However, it has recently become appreciated that CD4⁺ and CD4⁻ populations in the V α 24 inv T cells are functionally very different, which has directed our attention to re-analyze the change of V α 24 inv T cells in multiple sclerosis (MS). Bearing the functional dichotomy of the CD4⁺ and CD4⁻ cells in mind, we examined the number and functions of the V α 24 inv T cells in peripheral blood of MS. Our flow cytometry as well as functional analysis showed that CD4⁻ cells, which mainly produce proinflammatory cytokines, are greatly reduced in remission of MS, but CD4⁺ cells capable of producing both Th1 and Th2 cytokines are relatively spared. Furthermore, the CD4⁺ cells were biased for secreting more IL-4 (Araki et al. 2003). These findings allow us to propose new interpretations that the V α 24 inv T cells are functionally altered in the remission state of autoimmune disease MS so that they could stabilize the Th1 disease activity (but not to promote the inflammatory process).

More recently, properties of another “invariant” T cells bearing V α 7.2-J α 33 TCR (V α 7.2 inv T cells) have been intensively characterized in France and Japan. Shimamura showed that the mouse homolog with V α 19 inv TCR are enriched in liver NK1.1⁺ lymphocytes, which suggests us to call the population as a “second” NKT cells. On the other hand, Lantz et al. reported that the V α 19 inv T cells are restricted by MR1 molecule and they are accumulated in the gut mucosa. Based on the unique localization in the gut, Lantz et al. have proposed to call the invariant T cells as mucosal associated invariant T cells (MAIT) and speculate their role in gut immunity. However, it remains an open question as to if the hV α 7.2 inv (mV α 19 inv) T cells may play an alternative role outside gut and in autoimmune conditions. Using PCR-SSCP technique, we have explored the presence of V α 7.2 inv TCR in various human samples such as peripheral blood, brain lesions and cerebrospinal fluid samples from MS and peripheral nerve lesions from chronic inflammatory inflammatory polyneuropathy (CIDP). As previously reported (Illes et al. 2001), expression of V α 24 inv TCR is greatly reduced in the PBMC from MS. In contrast, V α 7.2 inv TCR expression was not reduced in PBMC from MS. The V α 24 inv TCR was detected in a majority of CIDP lesions (60%) but only occasionally seen in MS lesions (7.1%). However, V α 7.2 inv TCR was more frequently detected in MS brain lesions (50%) and was also detected in 72.7% of cerebrospinal fluid, indicating that the V α 7.2 inv T cells may be preferentially recruited to the inflammatory lesions of MS. Our results reveal the involvement of the V α 7.2 inv T cells in MS. However, it needs to be fully investigated as to if the cells detected in MS and MAIT cells would share the same properties (cytokine production, TCR β -chain usage etc) and if the V α 7.2 inv T cells are inhibitory or promoting for brain inflammation. It is also very interesting to examine whether the glycolipid ligand for the MR1-restricted NKT cells may control immune disorders if properly given.

あ と が き

平成15年度は、医学助成金贈呈者を3名選出しましたので、従って本号ではMS調査研究論文が3件載せてあります。これは先の総会で決議されていますように、平成15年度の繰越金が多少多かったため優秀な若手調査研究者を例年より1名増やして3名にした為です。

それに加えて、神経センターの山村隆先生主催の研究集会「Recent progress in Neuroimmunology and NKT cell research」のreportも掲載しています。このreportは英文にて掲載していますが、事実研究集会会議場では討論を全部英語で行っている訳なので敢えて英文のまま掲載した次第です。

また、菊地清明新名誉会長と荒井好民新会長夫々のご就任の挨拶文が載せてありますが、一読して、当協会はいろいろな方々のご協力で成り立っていることが良く分かります。新名誉会長と新会長のもと、気持ちを新たに団結し頑張っていきたいと思えます。

事務局 西 村 康