

平成 21年 5月 10日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390261
 研究課題名（和文） 視神経脊髄型多発性硬化症の IL-17 産生性 T 細胞の認識自己抗原とその役割の究明
 研究課題名（英文） Role of IL-17 producing T cells in opticospinal multiple sclerosis

研究代表者
 吉良 潤一（KIRA JUN-ICHI）
 九州大学・大学院医学研究院・教授
 研究者番号：40183305

研究成果の概要：

日本人の視神経脊髄型多発性硬化症（OSMS）と再発寛解型 neuromyelitis optica（NMO）はその病像が類似点が多い。抗 aquaporin-4（AQP4）抗体の有無により日本人 MS 患者を再分類し、細胞内サイトカイン、並びに髄液中のサイトカイン・ケモカインを測定した結果、抗 AQP4 抗体陽性患者では脳脊髄液中の CD4 陽性 T 細胞内サイトカインでは IL-4 産生細胞が上昇し、一方で末梢血では抗体陰性 OSMS において IFN- γ ⁺IL-4⁻細胞の比率が高く Th1 シフトの傾向を認め、脳脊髄液中では、OSMS では IL-17、IL-8、G-CSF の濃度が上昇している点など、抗 AQP4 抗体陽性例と、陰性群の中でも OSMS と CMS ではそれぞれ異なる炎症性機序が働いていることが示唆された。今後さらに責任自己抗原の違いや拘束分子の相違など検討を進めることで病態を把握し、各病型に特異的な治療法の確立に努めたい。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：多発性硬化症、視神経脊髄型、IL-17、自己反応性 T 細胞、抗 AQP4 抗体

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症（MS）は、最も頻度の高い炎症性脱髄性疾患である。アジア人種の MS は、視神経と脊髄を選択的に侵す視神経脊髄型（opticospinal MS；OSMS）と大脳や小脳も含めて多巣性に中枢神経系を侵す通常型

（conventional MS；CMS）の 2 型に大別され、両者はそれぞれ疾患感受性遺伝子が *HLA DPB1*0501* と *HLA DRB1*1501* と異なっている（Kira et al, Lancet Neurology, 2003）。欧米白人の MS と比較すると、アジア人種の MS は OSMS の頻度が高く、かつ病理学的には

強い組織壊死を呈することが多いのが大きな特徴である。この脊髄病巣は、MRI では3椎体以上に及ぶ長大な脊髄病巣 (longitudinally extensive spinal cord lesion) を呈し、その頻度は OSMS で CMS より有意に高い。

最近、私たちは日本人 MS 患者髄液中の16種のサイトカイン・ケモカインの多項目同時測定に成功し、OSMS ではその他の非炎症性神経疾患や CMS に比し有意に髄液中で IL-17 が上昇していることを見出した (Ishizu et al, Brain, 2005)。しかも IL-17 とその下流に位置する炎症性サイトカインである IL-8 は、血液脳関門の破綻の指標となる髄液・血清の albumin ratio、および脊髄 MRI での脊髄病巣の長さとは有意な正の相関を示した。さらに髄液中 IL-8 は総合障害度 (Expanded Disability Status Scale、以下 EDSS) とも有意な正の相関を示した。IL-17/IL-8系は好中球を局所へ遊走・活性化させ myeloperoxidase (MPO) など組織を障害する酵素類の発現を高める。事実、MS では血清の MPO が再発期・寛解期を通じて健常対象群より有意に上昇し、EDSS と有意な正の相関を示すことを発見した (Minohara et al, J Neuroimmunol, 2006)。病理学的にも OSMS の脊髄病巣には MPO 陽性の好中球が多数浸潤していることを証明した (Ishizu et al, Brain, 2005)。

一方、私たちは日本人 MS 患者の遺伝的背景の検討により、platelet activating factor (PAF) を代謝する PAF acetylhydrolase (PAF-AH) を不活化する遺伝子変異の頻度が、OSMS では健常対象群や CMS より有意に高いことを見出した (Osoegawa et al, J Neuroimmunol, 2004)。次いで、血清の様々な血管増殖因子を測定したところ、MS では再発期に有意に vascular endothelial growth

factor (VEGF) が増加し、その値は脊髄病巣の長さとは有意な正の相関を示すことを発見した (Su et al, J Neurol Sci, 2006)。これらのことは、長大な脊髄病巣の形成に血管透過性因子や血管増殖因子が重要な役割を担っていることを強く示唆する。

2. 研究の目的

私どもは、長大な脊髄病巣の形成には、IL-17/IL-8 系の亢進による好中球の活性化と VEGF や PAF の活性亢進による血管性浮腫の両者が関与するとの仮説を立てた。最近、自己免疫病の発症には、IFN- γ 産生性 T 細胞ではなく、むしろ IL-17 を産生する T 細胞が深く関わっていることが報告され、大きな注目を集めている。この IL-17 産生性 T 細胞は、VEGF をも産生することが示されているので、上記の2経路は IL-17 産生性自己反応性 T 細胞が鍵となっていると考えられる。そこで、本研究では、この IL-17 産生性自己反応性 T 細胞に着目し、OSMS の病巣形成の鍵を握る IL-17 産生性 T 細胞が認識する責任自己抗原を解明することを最大の目的とする。

一方で、近年 Nemyelitis optica に特異的に認められる抗 aquaporin-4 (AQP4) 抗体が発見された。抗 AQP4 抗体は、日本人 MS の一部の症例でも認められており、本研究では、抗 AQP4 抗体の有無での細胞内サイトカインや、髄液中のサイトカイン・ケモカインの差異を検討し、特徴付けることも目的としている。

3. 研究の方法

臨床的に診断確実な再発寛解型 MS 148 例、特発性再発性脊髄炎 17 例、特発性再発性視神経炎 4 例の再発性脱髄性疾患の全 169 例について、GFP-AQP4 蛋白を発現させた HEK293 細胞を用いて非固定で患者血清を4倍希釈に

て反応させ、ヒト IgG に対する間接蛍光免疫法にて抗 AQP4 抗体の測定を行い抗体陽性群と陰性群とに分類した。抗体陽性例 7 例を含む OSMS8 例、CMS7 例について脳脊髄液中 CD4 陽性 T 細胞を PMA/ionomycin 刺激後、細胞内 IFN- γ 、IL-4 をフローサイトメトリー法により測定、サイトカインバランスを比較した。また同様に末梢血 CD4 陽性 T 細胞についても抗体陽性例 15 例、抗体陰性 OSMS11 例、抗体陰性 CMS15 例、正常健常者群 20 例において比較を行った。また抗体陽性例 12 例を含む OSMS20 例、CMS24 例、その他の炎症性中枢神経疾患 (OIND) 20 例、非炎症性中枢神経疾患 20 例の脳脊髄液を対象に、蛍光ビーズを用いた多重サイトカイン測定を行った。

4. 研究成果

髄液中 CD4 陽性 T 細胞については、抗 AQP4 抗体陽性例と抗体陰性例の比較で、抗体陽性例において有意に IFN- γ ⁺IL-4⁻細胞の比率が高いことが示された。末梢血 CD4 陽性 T 細胞内のサイトカイン産生の測定では、抗 AQP4 抗体陰性 OSMS の IFN- γ ⁺IL-4⁻細胞の比率、および IFN- γ /IL-4 比が健常対照群と比較して有意に高い一方、抗 AQP4 抗体陽性群では健常者群との比較で有意な違いを認めなかった。抗 AQP4 抗体中-高力価群 (n = 12) と低力価群 (n = 3) との比較では低力価群は IFN- γ ⁺IL-4⁻細胞の比率が高く、抗体陰性 OSMS と同様の傾向を認めた (図 1)。IFN- γ /IL-4 比も同様の経口であった (図 2)。脳脊髄液中サイトカインの測定では、IL-17、IL-8、IFN- γ 、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 濃度が抗体の有無に関わらず、CMS および OIND より OSMS で有意に高かった (いずれも $P^{corr} < 0.05$) (図 3, 4)。

抗 AQP4 抗体陽性患者では脳脊髄液中の CD4 陽性 T 細胞内サイトカインについて IL-4 産

生細胞が上昇しており、一方末梢血では抗体陰性 OSMS において IFN- γ ⁺IL-4⁻細胞の比率が高く Th1 シフトの傾向を認めた。脳脊髄液中サイトカイン濃度では、OSMS では IL-17、およびその下流に属する IL-8、G-CSF の濃度が上昇しており、以上の点から、OSMS では IL-17 の高い点で CMS とは異なる炎症性機序が存在すると考えられ、一方で抗 AQP4 抗体の産生に関しては Th2 シフトによる液性免疫の亢進が影響していることが示唆された。このような相違を生む背景に、疾患感受性遺伝子の相違などが関連している可能性が示唆される。今後さらに責任自己抗原の違いや拘束分子の相違など検討を進める必要があると考えられた。

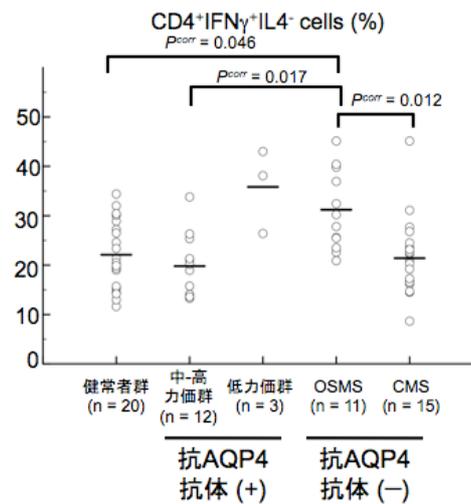


図 1 末梢血 CD4+IFN γ +IL4-T 細胞の割合

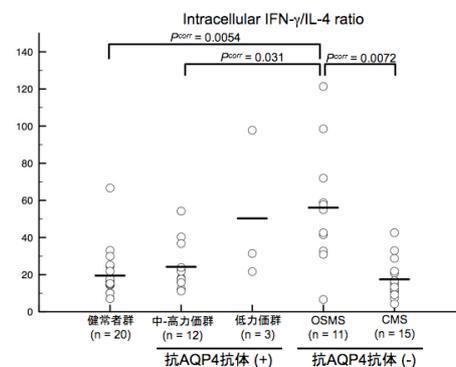


図 2 末梢血 IFN γ /IL4 産生 T 細胞比

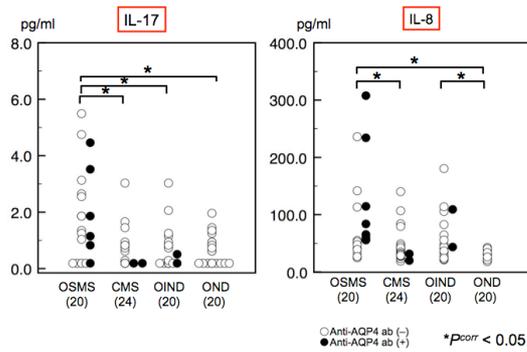


図3 髄液中 IL-17 と IL-8

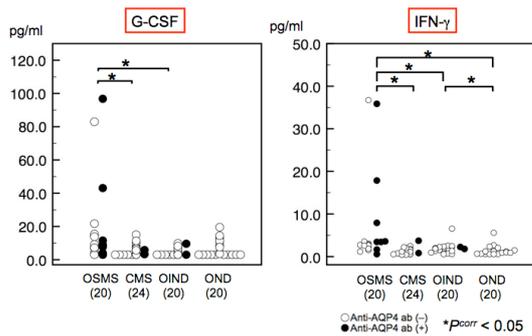


図4 髄液中 G-CSF と IFN- γ

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件) (全て査読有り)

- 1) Su J-J, Osoegawa M, Minohara M, Tanaka M, Ishizu T, Mihara F, Taniwaki T, Kira J: Upregulation of vascular growth factors in multiple sclerosis: correlation with MRI findings. J Neurol Sci 243: 21-30, 2006
- 2) Mei F-J, Osoegawa M, Ochi H, Minohara M, Shi N, Murai H, Ishizu T, Taniwaki T, Kira J: Long-term favorable response to interferon beta-1b is linked to cytokine deviation toward the Th2 and Tc2 sides in Japanese patients with multiple sclerosis. J Neurol Sci 246: 71-77, 2006
- 3) Minohara M, Matsuoka T, Li W, Osoegawa M, Ishizu T, Ohya Y, Kira J: Upregulation of myeloperoxidase in patients with opticospinal multiple sclerosis: positive correlation with disease severity. J Neuroimmunol 178: 156-160,

2006

- 4) Sun X*, Minohara M*, Kikuchi S, Ishizu T, Tanaka M, Piao H, Osoegawa M, Ohya Y, Shimokawa H, Kira J: The selective Rho-kinase inhibitor Fasudil is protective and therapeutic in experimental allergic encephalomyelitis. J Neuroimmunol 180: 126-134, 2006 *Equal contribute.
- 5) Li W, Minohara M, Su JJ, Matsuoka T, Osoegawa M, Ishizu T, Kira J: Helicobacter pylori is a potential protective factor against conventional type multiple sclerosis in the Japanese population. J Neuroimmunol 184: 227-231, 2007
- 6) Matsuoka T, Matsushita T, Kawano Y, Osoegawa M, Ochi H, Ishizu T, Minohara M, Kikuchi H, Mihara F, Ohya Y, Kira J: Heterogeneity of aquaporin-4 autoimmunity and spinal cord lesions in multiple sclerosis in Japanese. Brain 130: 1206-1223, 2007
- 7) Matsushita T, Matsuoka T, Ishizu T, Kikuchi H, Osoegawa M, Kawano Y, Mihara F, Ohya Y, Kira J: Anterior periventricular linear lesions in optic-spinal multiple sclerosis: a combined neuroimaging and neuropathological study. Multiple Sclerosis 14: 343-53, 2008
- 8) Matsuoka T, Matsushita T, Osoegawa M, Ochi H, Kawano Y, Mihara F, Ohya Y, Kira J: Heterogeneity and continuum of multiple sclerosis in Japanese according to magnetic resonance imaging findings. J Neurol Sci 266: 115-25, 2008
- 9) Matsuoka T, Matsushita T, Osoegawa M, Kawano Y, Minohara M, Mihara F, Nishimura Y, Ohya Y, Kira J: Association of the HLA-DRB1 alleles with characteristic MRI features of Asian multiple sclerosis. Multiple Sclerosis 14: 1181-1190, 2008
- 10) Tanaka M, Matsushita T, Tateishi T, Ochi H, Kawano Y, Mei F-J, Minohara M, Murai H, Kira J: Distinct CSF cytokine/chemokine profiles in atopic myelitis and other causes of myelitis. Neurology 71: 974-981, 2008

- 11) Shi N, Kawano Y, Matsuoka T, Mei F-J, Ishizu T, Ohyagi Y, Kira J: Increase of CD4⁺ TNF α ⁺ IL-2⁻ T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis* 15: 120-123, 2009
- 12) Kawajiri M, Mogi M, Higaki N, Matsuoka T, Ohyagi Y, Tsukada K, Kahara K, Horiuchi M, Miki T, Kira J: Angiotensin-converting anzyme (ACE) and ACE2 levels in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 15: 262-265, 2009
- 13) Osoegawa M*, Kira J*, Fukazawa K, Kikuchi S, Kohriyama T, Sobue G, Yamamura T, Itoyama Y, Saida T, Sakata K, Ochi H, Matsuoka T: Temporal changes and geographical differences in multiple sclerosis phenotypes in Japanese: nationwide survey results over 30 years. *Multiple Sclerosis* 15: 159-173, 2009 *Equal contribution.
- 14) Doi H, Matsushita T, Isobe N, Matsuoka T, Minohara M, Ochi H, Kira J: Hypercomplementemia at relapse in patients with anti-aquaporin-4 antibody. *Multiple Sclerosis* 15: 304-310, 2009
- 15) Matsushita T, Matsuoka T, Isobe N, Kawamura Y, Minohara M, Shi N, Nishimura Y, Ochi H, Kira J: Association of the HLADPB1*0501 allele with anti-aquaporin-4 antibody positivity in Japanese patients with idiopathic central nervous system demyelinating disorders. *Tissue Antigens* 72: 171-176, 2009
- 16) Ishizu T*, Kira J*, Osoegawa M, Fukazawa T, Kikuchi S, Fujihara K, Matsui M, Kohriyama T, Sobue G, Yamamura T, Itoyama Y, Saida T, Sakata K: Heterogeneity and continuum of multiple sclerosis phenotypes in Japanese according to the results of the fourth nationwide survey. *J Neurol Sci* 280: 22-28, 2009 *Equal contribution.
- 17) Matsushita T, Isobe N, Matsuoka T, Shi N, Kawano Y, Wu X-M, Yoshiura T, Nakao Y, Ishizu T, Kira J: Aquaporin-4 autoimmune syndrome and anti-aquaporin-4 antibody-negative optico spinal multiple sclerosis in Japanese. *Multiple Sclerosis* (in press)
- [学会発表] (計 19 件)
- 1) 吉良潤一: 神経免疫疾患のエフェクターアーム; 第 18 回日本神経免疫学会学術集会 2006 年 3 月 2 日 (名古屋)
 - 2) 松岡健ら: 日本人多発性硬化症の自験 130 例 脳・脊髄 MRI の特徴と欧米例との差異; 第 18 回日本神経免疫学会学術集会 2006 年 3 月 2 日 (名古屋)
 - 3) 三野原元澄ら: 日本人多発性硬化症における血清 myeloperoxidase 値の上昇; 第 18 回日本神経免疫学会学術集会 2006 年 3 月 2 日 (名古屋)
 - 4) 吉良潤一: 日本人多発性硬化症の疫学と動向-視神経脊髄型多発性硬化症を中心として-; 第 47 回日本神経学会総会 2006 年 5 月 11 日 (東京)
 - 5) 三野原元澄ら: 日本人多発性硬化症における MRI 所見と HLA クラス II 遺伝子多型との相関; 第 48 回日本神経学会総会 2007 年 5 月 16 日 (名古屋)
 - 6) 吉良潤一: アクアポリン 4 と多発性硬化症: AQP4 自己免疫症候群と seronegative OSMS; 第 20 回日本神経免疫学会学術集会 2008 年 4 月 17 日 (新潟)
 - 7) 河野祐治ら: 抗 aquaporin-4 (AQP4) 抗体価による多発性硬化症の免疫学的・遺伝学的背景の差異; 第 20 回日本神経免疫学会学術集会 2008 年 4 月 17 日 (新潟)
 - 8) 河村信利ら: 多発性硬化症における conformational に AQP1 を認識する抗体の検索; 第 20 回日本神経免疫学会学術集会 2008 年 4 月 17 日 (新潟)
 - 9) 田中正人ら: 脊髄炎症性疾患のサイトカイン・ケモカインプロフィール; 第 20 回日本神経免疫学会学術集会 2008 年 4 月 17 日 (新潟)
 - 10) 河野祐治ら: FACS による抗 native AQP4 抗体の高感度検出法の開発; 第 49 回日本神経学会総会 2008 年 5 月 15 日 (横浜)
 - 11) 松下拓也ら: 抗 aquaporin-4(AQP4) 抗体価と MRI 所見・サイトカインバランス・HLA との相関; 第 49

- 回日本神経学会総会 2008年5月15日(横浜)
- 12) 史楠ら: CD4⁺TNF α ⁺IL2⁺T細胞のMS髄液中での増加; 第49回日本神経学会総会 2008年5月15日(横浜)
 - 13) Kira J. Neuromyelitis optica. MULTIPLE SCLEROSIS: COMPREHENSIVE APPROACHES TO COMPLEX CHALLENGES 22ND CMSC ANNUAL MEETING. 2008/5/28 (Denver, USA)
 - 14) Kira J. Japanese opticospinal form of MS—the real story. International Neuro-Ophthalmology Society. 2008/6/7 (California, USA)
 - 15) Kira et al. CSF and peripheral blood cytokine production profiles and HLA class II alleles in patients with antibody to aquaporin-4. 133rd Annual Meeting of the American Neurological Association. 2008/9/21 (Salt Lake City, USA)
 - 16) Kira J et al. Distinct cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in opticospinal multiple sclerosis, atopic myelitis and other causes of myelitis. WORLD CONGRESS ON TREATMENT AND RESEARCH IN MULTIPLE SCLEROSIS. 2008/9/17 (Montreal, Canada)
 - 17) 吉村 怜ら: 末梢免疫担当細胞における brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 産生能と多発性硬化症 (MS) 病態との関連; 第21回日本神経免疫学会学術集会 2009年3月12日(大阪)
 - 18) 土井 光ら: 多発性硬化症および抗アควアポリン4抗体陽性症例における補体系の検討; 第21回日本神経免疫学会学術集会 2009年3月12日(大阪)
 - 19) 松下 拓也ら: 抗 aquaporin-4 (AQP4) 抗体陽性例における細胞内・脳脊髄液中サイトカインの特徴; 第21回日本神経免疫学会学術集会 2009年3月12日(大阪)

[図書] (計7件)

- 1) Kira J.: Etiology of multiple sclerosis. WFN Seminars in Clinical Neurology. Edited by Oger J, Al-Aragi A. Demos Medical Pub. Inc. (New York) pp.

1-6, 2006

- 2) 三野原元澄、吉良潤一: 多発性硬化症. 神経疾患最新の治療 2006-2008 小林祥泰 水澤英洋(編) 南江堂 pp. 120-4, 2006
- 3) Kira J., Matsushita T, Matsuoka T: Aquaporin 4 autoimmunity in multiple sclerosis in Japanese. Ed. by Tabira T, Yamamura T, Kira J. Current Topics in Neuroimmunology; Medimond pp. 33-39, 2006
- 4) 吉良潤一: 多発性硬化症. よくわかる病態生理. 第8巻「神経疾患」 松尾理(編) 日本医事新報社 pp. 124-128, 2007
- 5) 吉良潤一: 脱髄性疾患. 最新神経内科学. 荒木淑朗(編) 金芳堂 pp. 655-670, 2008
- 6) 吉良潤一: わが国における多発性硬化症の臨床像・診断・治療の変遷. 多発性硬化症の診断と治療. 吉良潤一(編). 新興医学出版 pp. 3-8, 2008
- 7) 吉良潤一: 多発性硬化症の治療の進め方. 急性憎悪期の治療の進め方. 副腎皮質ステロイド薬. 多発性硬化症の診断と治療. 吉良潤一(編). 新興医学出版 pp. 144-150, 2008

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/neuro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉良 潤一 (KIRA JUN-ICHI)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 40183305

(2) 研究分担者

三野原 元澄 (MINOHARA MOTOZUMI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号: 70398113

河村 信利 (KAWAMURA NOBUTOSHI)
九州大学・医学研究院・学術研究員
研究者番号: 00432930