

平成21年3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590994

研究課題名（和文） 視神経脊髄型多発性硬化症における自然免疫異常と再発惹起因子

研究課題名（英文） natural immunity dysregulation and relapse inducing factor  
in patient with opticospinal multiple sclerosis

研究代表者

河野 祐治 (KAWANO YUJI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20333479

研究成果の概要：

まず好中球や好塩基球の正確な分離のための基礎実験として、フローサイトメトリーによる条件の決定を行った。好塩基球に関しては数が極めて少ないため、CRTH2, CD200R, CD203c, Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ などを用いて同定、分離を試みた。その結果、CRTH2は使用した抗体のせいかな染色性が極めて不良であったが、他の抗体、特に抗Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ 抗体を用いたものでは明瞭に他の細胞分画と区別できた。その後の機能解析はうまくいかなかった。大きな問題は細胞の数および純度であった。この点においては、本申請期間の終了間際になり、より高精度の血球分離器の導入の目処が立ち、実験に耐えるだけの細胞数と純度が確保できる可能性が出てきたため、継続して行く計画としている。

次にTh17細胞の解析に向けた同定と分化誘導のための基礎的研究を進めた。それにはこれまでに行ってきたTNF $\alpha$ , IL-2, IL-4, IFN $\gamma$ 産生細胞の末梢血と髄液での検出系を用いた。しかしIL-17はPMAとイオノマイシンで刺激後でも1%以下の割合でしか検出されていなかった。しかし刺激系をCytostim試薬に変更し、また検出分離系をIL-17 Secretion Assayに変更したところ、IL-17産生細胞を生きたまま分離可能となった。並行して行った細胞内、髄液中のサイトカインOS-MSではTh1シフトと、抗AQP4抗体の有無にかかわらずIL-17、およびその下流に属するIL-8, G-CSF濃度が上昇していることを明らかにした。IL-8は好中球の走化性に、G-CSFは好中球の分化、成熟に関与しており、視神経脊髄型多発性硬化症では、通常型多発性硬化症とは異なった自然免疫異常の存在が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：多発性硬化症, 自然免疫, 再発惹起因子, IL-17, 好中球

## 1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症(MS)は主として若年成人に発症し、中枢神経系に脱髄性炎症を反復し、障害が蓄積する疾患である。そして日本には視神経と脊髄を主に障害する視神経脊髄型MS(OS-MS)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(C-MS)の2型に大別される。これまで病態にはTh1細胞の関与が重要とされてきた。しかし近年、IL-17を産生するT細胞(Th17)が本当の主役であるといった知見が、主にマウスでの実験系で得られてきた。ところで、Th17細胞は、IL-17相同性の高いIL-17Fや、IL-10ファミリーに属するIL-22も産生することが示され、好中球の動員や抗菌ペプチドの誘導を介して生理的には病原体に対する防御機構に大きな役割を果たしているとされる。しかし病的状態、例えば喘息では、IL-17とIL-17Fは共にケモカインを誘導し障害部位へ好中球を動員してしまうとされる。またIL-17は主にT細胞が産生する一方、IL-17Fは好塩基球、肥満細胞なども産生するが、それらの意義についてはまだあまり解明されてなかった。

## 2. 研究の目的

OS-MS患者、C-MS患者、炎症性神経疾患患者、非炎症性神経疾患患者、健常対象者における以下の仮説の検討を当初の目的とした。

仮説(1) OS-MSでは、好中球や好塩基球をはじめとする自然免疫系が普段から活性化状態にあり、感染症に対しても過剰に反応し、それがTh17細胞の過剰反応を惹起し、そのTh17細胞は中枢神経系に移行して好中球の動員を介して再発を引き起こす。

仮説(2) OS-MSでは、好中球や好塩基球をはじめとする自然免疫系が普段から低反応状態にあり、感染症に対しても適切に処理できない。したがって代償的にTh17細胞も過剰に反応し、そのTh17細胞は中枢神経系に移行して好中球の動員を介して再発を引き

起こす。

以上の仮説を検討するため、本申請研究では以下の項目の検討を試みた。

OS-MS患者、C-MS患者、炎症性神経疾患患者、非炎症性神経疾患患者、健常対象者における(1)好中球機能の検討。(2)好塩基球機能の検討。(3)Th17細胞の割合の定量とIL-17、IL-17F、IL-22の検討。(4)Th17細胞におけるT細胞受容体の多様性の検討(末梢血と髄液)。

## 3. 研究の方法

OS-MS患者、C-MS患者、炎症性神経疾患患者、非炎症性神経疾患患者、健常対象者において、明らかな急性感染がなく、原疾患の活動性が安定している時期、何らかの、例えば上気道感染の急性期、MS再発期、再発からの回復期(ステロイド治療中、終了後)、それぞれの時期の末梢血と、できるかぎり髄液も採取し、以下の項目を検討する。

### (1) 好中球機能の検討

接着能、貪食能、走化性をそれぞれ検討するほか、表面抗原、サイトカイン産生能などのmRNAと蛋白の発現も検討する。

### (2) 好塩基球機能の検討

磁気ビーズ法により末梢血より好塩基球を分離する。それを抗IgE抗体、fMLPまたはIL-3にて刺激し、その際の培養上清中のヒスタミン、ロイコトリエンC4、IL-4、IL-13、IL-17Fの定量を行う。またCD200R発現量、CD63の細胞表面での発現量、高親和性IgEレセプターであるFcεRI発現量も検討する。

### (3) Th17細胞の割合の定量とIL-17、IL-17F、IL-22の検討

細胞内サイトカインの染色とフローサイトメーターによるTh17細胞の定量的評価、培養上清中のそれぞれのサイトカインの測定。Th17だけでなくTh1、Th2、Tregもあわせて解析を行う。またナイーブ細胞からの各Thサブセットへの分化誘導のパターンの患

者間、患者と健常者との相違などの解析も予定していた。

(4) Th17 細胞における T 細胞受容体の多様性の検討（末梢血と髄液）

末梢血より磁気ビーズ法にて CD4 陽性細胞を分離し、Th17 メモリー T 細胞の増殖を特異的に誘導する IL-23 の存在下で活性過刺激を与える。細胞が十分増殖し、細胞内サイトカインの染色にて大多数が IL-17 産生細胞となった時期に、RNA を抽出し、T 細胞受容体の CDR3 の部分の塩基の長さを検索するレパトワ解析を考えていた。しかしこの方法では、本来 IL-17 産生細胞ではないものまで IL-17 を産生するようになる危惧もあった。そこで、研究の途中での予備実験により、IL-17 Secretion Assay により IL-17 産生細胞を高純度で分離できることが判明したため、予定を一部変更し、以後の検討では IL-17 Secretion Assay を利用した。

以上の計画は、技術的に困難が予測されていたため、平行してデータ収集の一環として、特に抗 Aquaporin4 抗体陽性例での細胞内、髄液中のサイトカインも測定した。

#### 4. 研究成果

まず好中球や好塩基球の正確な分離のための基礎実験として、フローサイトメトリーによる条件の決定を行った。好中球は末梢血中における数が多く、分離は問題ないと考えられた。しかし好塩基球に関しては数が極めて少ないため、CRTH2, CD200R, CD203c, Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  などを用いて同定、分離を試みた。その結果、CRTH2 は使用した抗体のせいかに染色性が極めて不良であったが、他の抗体、特に抗 Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  抗体を用いたものでは他の細胞分画と区別できた。その後、コントロール、患者において分離同定、機能解析の最適の条件設定条件設定を試したが、貪食能を含め、うまく解析には至らなかった大きな問題は細胞の数および純度であった。この点においては、本申請期間の終了間際になり、より高精度の血球分離器の導入の目処が立ち、実験に耐えるだけの細胞数と純度が確保できる可能性が出てきたため、継続して行く計画としている。

次に Th17 細胞の解析に向けた同定と分化誘導のための基礎的研究を進めた。まずは Th17 細胞が実際の MS 患者の末梢血および髄液中にどのくらいの割合で含まれているのかを検討した。それにはこれまでに行ってきた TNF $\alpha$ , IL-2, IL-4, IFN $\gamma$  産生細胞の末梢血と髄液での検出系を用いた。しかし IL-17 は PMA とイオノマイシンで刺激後でも 1%以下の割合でしか検出されていなかった。細胞数、刺激条件、時間を各種検討したが、PMA とイオノマイシン、または PHA での刺激ではうまく IL-17 産生細胞は検出できなかった。

その後、Cytostim 試薬によって T 細胞を刺激したところ、IL-17 産生細胞が安定して検出されるようになった。

本申請期間の後半になり、IL-17 Secretion Assay を入手できたため、実験系の改良に取りかかった。この方法は IL-17 産生細胞を高純度、かつ生きたまま分離できることが判明したため、予定を一部変更し、以後の検討では IL-17 Secretion Assay を利用した。この方法を用いても PMA とイオノマイシンでの刺激では IL-17 産生細胞は十分に活性化されなかったため、やはり Cytostim 試薬を用いた。実験系確立に手間取ったこともあり、十分な検体の検討が行えなかった、行った範囲ではこれまでのところ疾患特異的な異常は見出されていない。

平行してデータ収集の一環として、特に抗 Aquaporin4 抗体陽性例での細胞内、髄液中のサイトカインも測定しており、この方法では、OS-MS では Th1 シフトと、抗 AQP4 抗体の有無にかかわらず IL-17、およびその下流に属する IL-8, G-CSF 濃度が上昇していることを明らかにした。IL-8 は好中球の走化性に、G-CSF は好中球の分化、成熟に関与しており、視神経脊髄型多発性硬化症では、通常型多発性硬化症とは異なった自然免疫異常の存在が示唆された。

#### 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）

〔学会発表〕（計 1 件）

松下拓也、磯部紀子、松岡健、三野原元澄、河野祐治、吉良潤一。抗 aquaporin-4 (AQP4)

抗体陽性例における T 細胞内サイトカイン,  
脳脊髄液柱サイトカインの動向. 第 21 回神  
経免疫学会学術集会. 2009 年 3 月 12 日, 大  
阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河野 祐治 (KAWANO YUJI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20333479

### (2) 研究分担者

三野原 元澄 (MINOHARA MOTOZUMI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70398113

### (3) 連携研究者