

機関番号：82611

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2006～2010

課題番号：18109009

研究課題名（和文） 多発性硬化症の臨床に有用なバイオマーカーの探索と確立に関する研究

研究課題名（英文） Exploration and Identification of Biomarkers of Multiple Sclerosis which is relevant for Management and Research of MS

研究代表者 山村 隆 (YAMAMURA TAKASHI)

(独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部・部長

研究者番号：90231670

研究成果の概要（和文）：

多発性硬化症（MS）と関連疾患 NMO の診療に役立つバイオマーカー（検査指標）を明らかにするために、DNA マイクロアレイやフローサイトメーターによって患者血液・髄液サンプルを解析した。MS 髄液で顕著に増加する T 細胞集団（CCR2+CCR5+細胞）や、NMO の末梢血で特異的に増加する B 細胞集団を明らかにすることができた。研究成果は MS/NMO の補助診断に活用できるとどまらず、新たな治療法の確立につながるものである。

研究成果の概要（英文）：

By analyzing blood and cerebrospinal fluid (CSF) samples with DNA microarray and flow cytometry, we have attempted to identify biomarkers useful for diagnosis and treatment of multiple sclerosis (MS) and neuromyelitis optica (NMO). We successfully identified a T cell subset expanded in the CSF of MS and a B cell subset expanded in the blood of NMO. These results offer a novel method to make correct diagnosis and lead to development of new therapies targeting these expanded populations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	27,000,000	8,100,000	35,100,000
2007 年度	21,300,000	6,390,000	27,690,000
2008 年度	21,300,000	6,390,000	27,690,000
2009 年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2010 年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
総計	103,600,000	31,080,000	134,680,000

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：神経科学、脳神経疾患、マイクロアレイ、免疫学、薬剤反応性

## 1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) は再発・寛解を繰り返す中枢神経系内炎症に起因する脱髄疾患であるが、その本態は自己免疫であり根本的な問題は免疫系にある。代表研究者山村は、神経内科医が MS の本質に迫

る免疫学的研究を行えるような研究環境を整備し、患者末梢血の免疫細胞 (NK 細胞、NKT 細胞、T 細胞) の遺伝子発現変化や細胞表面抗原に関する解析を精力的に行ってきた。例えば、MS 寛解期の特徴として、NK 細胞の CD95 発現亢進や IL-5 産生亢進を指摘し (J. Clin.

Invest. 2001)、CD95 発現の高い症例ではNK細胞が自己免疫T細胞の活性化を制御し、寛解が維持されるという病態を明らかにした (Brain. 2004)。さらに樹状細胞のマーカーとされる CD11c がMSのNK細胞の一部で異常に高く発現していることを見だし、NK細胞の発現するCD11cの高い群 (CD11c high) と低い群 (CD11c low) に分けて患者の臨床経過を追跡調査した。その結果、CD11c high患者がCD11c low患者に比べて、有意に再発率が高いことを示した (J. Immunol. 2007)。また、MSの末梢血T細胞の遺伝子発現解析 (DNA マイクロアレイ解析) により、MSが細分類される可能性を示した (Neurobiol. Dis. 2005 ; J Neuroimmunol. 2006)。

本研究を開始したのとほぼ同じ時期に、従来視神経脊髄型MSとされて来た症例の中から、抗アクアポリン4抗体陽性例が視神経脊髄炎 (NMO) として区別されるようになり、MS研究は新たな時代に入った。抗アクアポリン4抗体にはアストロサイトを障害する活性も証明され、インターフェロン $\beta$ は同抗体の産生を促進することから、MSとNMOを正確に鑑別することが重要になって来た。

従来 IFN- $\gamma$ 産生性 Th1細胞が、MS病態形成に重要なT細胞サブセットであると考えられてきたが、2005年に強力な炎症惹起能を有するインターロイキン17 (IL-17) を産生するT細胞 (Th17細胞) が提唱され、MSの動物モデル、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) において、高い病原性を有することが示された。しかしMS患者の体内でTh17細胞が示す動態などについての研究は、ようやく始まったところであった。

## 2. 研究の目的

現在MSの診断は、神経学的診察とMRI所見によってなされ、熟練した神経内科医の技量

に依存している部分が多い。本研究課題の目的は、MS末梢血の免疫細胞の特徴的な変化を詳細に解析し、MSの診断、病態把握、予後推定、治療方針決定などに有用なバイオマーカーを同定することである。近年の免疫学における、T細胞分化機構の研究は日進月歩であり、次々と新たなT細胞サブセットが提唱されている。MSのバイオマーカー研究も、この研究の流れの中で発展させる必要がある。本研究では、フローサイトメーター、マイクロアレイ、プロテオーム解析を用いて、MSの鑑別診断、再発診断、予後判定、治療法決定などに有用なバイオマーカー (病態マーカー) を同定し、それぞれの臨床的な信頼性を検証することを目標とした。慢性疾患であるMSの研究には多くの症例を追跡調査する継続性と忍耐が必要であるが、国立精神・神経センターの研究所と病院の連携チームの5年間の共同研究によって目的を達成することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) NK細胞発現CD11c分子の研究と新規バイオマーカーの確立

- ①フローサイトメーターによるMS患者NK細胞CD11c発現量の経時的解析を行う。
- ②NK細胞のCD11c発現と相関 (逆相関) するNK細胞内分子群の同定
- ③NK細胞のCD11c発現と相関 (逆相関) する血清サイトカインの同定
- ④NK細胞のCD11c発現と相関 (逆相関) するT細胞 (B細胞) 分子群の同定を進める

(2) MS再発に関与するT細胞サブセットの同定

ケモカインおよびケモカイン受容体は、免疫系の恒常性の維持および免疫反応の成立に必須のシグナル伝達システムであるのみな

らず、自己免疫疾患など病的免疫状態においても、その成立に関与することが示唆されている。我々は、近年ヒト IL-17 産生性 T 細胞に特徴的なケモカイン受容体発現パターンを報告した (J. Immunol. 2007)。本研究においては、そこで確立したケモカイン受容体による T 細胞サブセットの同定方法を用いて、再発時 MS、炎症性神経疾患、非炎症性神経疾患の末梢血と髄液 T 細胞を比較した。

#### (3) NMO における抗 AQP4 抗体産生性 B 細胞の同定とバイオマーカーの確立

NMO においては抗 AQP4 抗体が重要なバイオマーカーとして用いられているが、抗 AQP4 抗体産生性 B 細胞の詳細は不明である。この B 細胞分画が同定できれば、NMO における第二のバイオマーカーとして期待される。NMO では、他の全身性自己免疫疾患で認められる種々の自己抗体が陽性であるなど、病態の類似性が認められる。全身性ループスエリテマトーデスの末梢血で増加する異常 B 細胞の特徴の一つが、CD180 分子の発現を欠くこと (CD180 陰性) であると報告されていることから、NMO における CD180 陰性 B 細胞の解析を行う。

#### (4) インターフェロン治療反応性を予測するバイオマーカーの同定

MS の治療薬である I 型インターフェロンで、逆に神経症状が悪化する症例が存在する。したがってインターフェロン反応性を予測するバイオマーカーの研究は重要である。本研究においては、インターフェロン単独およびインターフェロンと経口ステロイド併用療法の患者において、NK 細胞の頻度および増殖マーカーを解析し、同時に再発頻度の解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) MS 患者 NK 細胞 CD11c 発現

①これまで、フローサイトメーターによって、免疫修飾薬の投与されていない MS 患者 22 名から 3-5 回 NK 細胞 CD11c 発現量のデータを取得した。30%の患者において、経過中に CD11c の発現上昇を認め、CD11c low から CD11c high への転換を認めた。しかし、全体の 70%の患者では、CD11c low から CD11c high への転換は確認されなかった。

②NK 細胞活性化能を有するサイトカイン IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  の血清中濃度と CD11c の相関を解析したが、いずれにおいても有意な相関は認められなかった。

③NK 細胞、T 細胞、B 細胞上に発現する種々の表面分子の発現と、NK 細胞 CD11c 発現を解析したところ、NK 細胞 CD11c と NK 細胞の頻度の中に、有意な逆相関が認められた (n=170, p<0.00001, r=-0.37)。

④CD11c<sup>low</sup> および CD11c<sup>high</sup> MS それぞれ 3 名の NK 細胞から mRNA を抽出し、DNA マイクロアレイによって網羅的に遺伝子発現を解析した。抗アポトーシス蛋白クラスタリン (CLU) 遺伝子の発現が、CD11c<sup>high</sup> MS に比べて CD11c<sup>low</sup> MS の NK 細胞で 8 倍以上に上昇していることがわかった (p<0.05)。

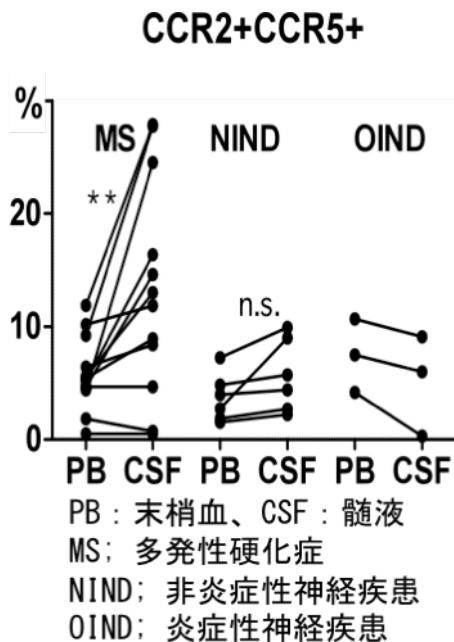
精製 NK 細胞を炎症性サイトカインで刺激すると、CLU 発現量が有意に低下した。以上より、NK 細胞の CLU 発現減少が、MS 病勢の増悪を示すマーカーとして有用であると考えられる。

⑤結語：自己免疫病態による炎症によって NK 細胞が bystander activation を受けることにより CD11c 発現上昇、CLU 発現低下が起こり、NK 細胞の頻度が減少する可能性が考えられた。以上より、NK 細胞 CD11c および末梢血 NK 細胞頻度減少が、MS 病勢悪化を示唆する

バイオマーカーとして有用であると考えられる。

(2) MS 再発に関与する T 細胞サブセットの同定 (論文投稿準備中)

①MS 再発時髄液では、末梢血と比較して、CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の有意な増加が認められた。このような傾向は、非炎症性中枢神経疾患ならびに炎症性中枢神経疾患においては認められなかった (図 2)。



(図 2)

②MS 再発時の末梢血における CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞は、髄鞘蛋白特異的に IFN- $\gamma$  および IL-17 を産生した。

③CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞は、脳実質への浸潤に重要なプロテアーゼであるメタロプロテイナーゼ 9 を、他の T 細胞分画と比較して、有意に大量に産生した。

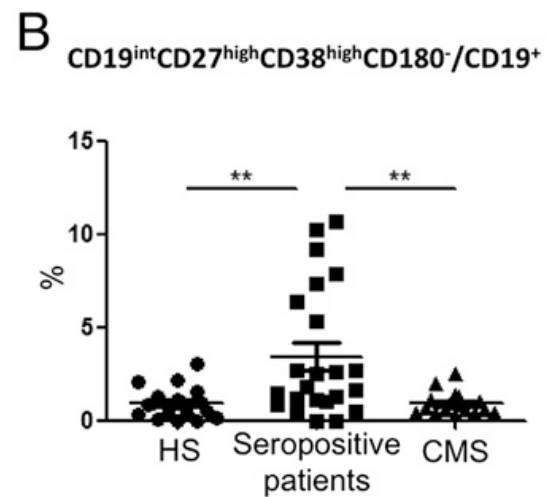
④CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞は、MS 再発における重要性が示唆されるオステオポンチンを、他の T 細胞分画と比較して、有意に大量に産生した。

⑤結語：CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞頻度の髄

液における増加は、MS 再発のバイオマーカーとして有用である。

(3) NMO における抗 AQP4 抗体産生性 B 細胞の同定とバイオマーカーの確立 (PNAS, 2011; 108(9): 3701-6.)

①健常者と MS、抗 AQP4 抗体陽性患者における、CD19 弱陽性 CD27 陽性 CD38 強陽性 CD180 陰性 B 細胞の頻度を解析したところ、他の 2 群と比較し、抗 AQP4 抗体陽性患者において有意に高いことが判明した (図 3)。



(図 3、PNAS, 2011, 108: 3701-3706)

②細胞表面分子、転写因子発現パターンおよび形態学的特徴から、上記特殊 B 細胞は、プラズマブラスト (PB、形質芽細胞) であることが判明した。

③精製分離した患者由来 PB は、末梢血における主要な抗 AQP4 抗体産生細胞であることが判明した。

④PB の生存および IgG 産生は IL-6 に依存する可能性が示唆された。

⑤結語：末梢血における PB 頻度の増加は、NMO のバイオマーカーとして有用である。

(4) インターフェロン治療反応性を予測するバイオマーカーの同定 (J. Neuroimmunol. 論文印刷中)

①健常者、免疫抑制剤治療を受けていないMS患者（未治療）群、IFN-β治療群、経口ステロイド群、IFN-βおよび経口ステロイド併用群における、NK細胞に占める増殖細胞の頻度（Ki-67陽性率）を比較したところ、健常者、未治療群および経口ステロイド群と比較し、IFN-β治療群およびIFN-βおよび経口ステロイド併用群において、Ki-67陽性率が有意に高いことが判明した。

②本研究コホートにおいては、IFN-β治療群およびIFN-βおよび経口ステロイド併用群の、治療前後の年間再発率を比較すると、いずれの群においても、再発率は治療後で有意に低いことが分かった。

③試験管内でPBMCをIFN-βあるいはIFN-βおよびデキサメサゾン存在下で培養し、NK細胞に占めるKi-67陽性細胞率を測定したところ、IFN-β容量依存性にKi-67陽性率の増加を認めた。このことからIFN-βあるいはIFN-βおよび経口ステロイドの直接作用により、NK細胞の増殖が刺激されていることが示唆された。

④結語：Ki-67陽性NK細胞がIFN-βあるいはIFN-βと経口ステロイドの併用療法の効果判定バイオマーカーとなり得る可能性がある。

（5）T細胞発現NR4A2（PNAS, 2008, 105: 8381-8386）

①健常者とMSの末梢血T細胞におけるNR4A2遺伝子産物の発現を比較したところ、MSにおいて有意に高いことが判明した。

②EAEにおいて、生体におけるNR4A2発現を解析したところ、神経症状を発症する直前に脊髄において高いNR4A2発現を認めた。

③NR4A2を強制発現させるとIFN-γおよびIL-17産生が有意に増加した。siRNAによりNR4A2発現を抑制するとそれらのサイトカイ

ン産生は有意に抑制された。

④NR4A2に対するsiRNAで処理したT細胞は、EAEの惹起能が有意に低下した。

⑤結語：NR4A2はMSの炎症反応に必須の転写因子であり、治療標的となり得ると考えられる。末梢血T細胞におけるNR4A2の発現レベルがMSの活動性と相関する可能性が推測される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計23件；すべて査読あり）

1. Sanvito, L., A. Tomita, N. Chihara, T. Okamoto, M. Ogawa, B. Gran, T. Aranami, and T. Yamamura: Increase of Ki-67+ natural killer cells in multiple sclerosis patients treated with interferon-β combined with low-dose oral steroids. *J. Neuroimmunol.* (in press)
2. Chihara, N., T. Aranami, W. Sato, Y. Miyazaki, S. Miyake, T. Okamoto, M. Ogawa, T. Toda, and T. Yamamura: Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *PNAS* 108 : 3701-3706, 2011
3. Chang, Y.-J., H. Y. Kim, L. A. Albacker, et al. (9番目) Influenza A infection in suckling mice expands a population of NKT cells that protects mice as adults from airway hyperreactivity. *J. Clin. Invest.* 121: 57-69, 2011
4. Theil, M.M., S. Miyake, M. Mizuno, C. Tomi, J.L. Croxford, H. Hosoda, J. Theil, S. von Hoersten, H. Yokote, A. Chiba, Y. Lin, S. Oki, T. Akamizu, K. Kangawa, and T. Yamamura: Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by Ghrelin. *J. Immunol.* 183: 2859-2866, 2009
5. Satoh, J.I., H. Tabunoki, and T. Yamamura: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. *Mult. Scler.* 15:531-541, 2009
6. Satoh, J.-i., T. Misawa, H. Tabunoki,

- and T. Yamamura: Molecular network analysis of T-cell transcriptome suggests aberrant regulation of gene expression by NF- $\kappa$ B as a biomarker for relapse of multiple sclerosis. *Dis Markers* 25: 27-35, 2008
7. Doi, Y., S. Oki, T. Ozawa, H. Hohjoh, S. Miyake, and T. Yamamura: Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8381-8386, 2008
  8. Sato, W., T. Aranami, and T. Yamamura: Cutting Edge. Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5-phenotype. *J. Immunol.* 178:7525-7529, 2007
  9. Aranami, T. and T. Yamamura: Th17 cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol. Int.* 57 115-120, 2008
  10. Yamamura, T., K. Sakuishi, Zs. Illes, and S. Miyake: Understanding the behavior of invariant NKT cells in autoimmune diseases. *J. Neuroimmunol.* 191:8-15, 2007
  11. Aranami, T., S. Miyake and T. Yamamura: Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. *J. Immunol.* 177: 5659-5667, 2006

[学会発表] (計 21 件)

1. Yamamura, T.: Orphan nuclear receptor NR4A2 and inflammatory cascade of MS/EAE. Plenary Session. Effector Mechanisms, IXth International Congress of Neuroimmunology, Sheraton Fort Worth Hotel and Spa, Fort Worth, Texas, USA, October 29, 2008

[図書] (計 6 件)

1. Yamamura, T.: Invariant NKT cells and immune regulation in multiple

sclerosis. In *Immune Regulation and Immunotherapy in Autoimmune Disease*. (Editor Jingwu Zhang). Springer, pp139-151, 2007 (査読なし)

2. Sakuishi, K., S. Miyake and Yamamura, T.: Role of NK cells and NKT cells in multiple sclerosis. *Molecular Basis of Multiple Sclerosis. The Immune System Series "Results and Problems in Cell Differentiation"* 51, 2009 pp127-147 Roland Martin, and Andreas Lutterotti, ed, Springer-Verlag, Heidelberg (査読あり)

[その他]

ホームページ等

日本語

[http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r\\_men/yamamura.html](http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_men/yamamura.html)

英語

[http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r\\_men/yamamura-e.html](http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_men/yamamura-e.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山村 隆 (Yamamura Takashi)

独) 国立精神・神経医療研究センター

神経研究所免疫研究部・部長

研究者番号: 90231670

### (2) 研究分担者

荒浪利昌 (Aranami Toshimasa)

独) 国立精神・神経医療研究センター

神経研究所免疫研究部・室長

研究者番号: 60435724

三宅幸子 (Miyake Sachiko)

独) 国立精神・神経医療研究センター

神経研究所免疫研究部・室長

研究者番号: 50266045