

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790617

研究課題名（和文）

CIDP 惹起性自己反応性 Th17 細胞の認識抗原の同定

研究課題名（英文）

Identification of the antigen recognized by autoreactive Th17 helper cells inducing CIDP

研究代表者

河村 信利 (NOBUTOSHI KAWAMURA)

九州大学大学院医学研究院神経内科学 講師

研究者番号：00432930

研究成果の概要（和文）：

我々は蛍光ビーズを用いたフローサイトメトリー法により、CIDP 患者および健常者における髄液サイトカイン・ケモカインの測定比較を行い、IL-17 に加えて、IL-8 および MCP-1 の上昇を見出した。この結果から CIDP において IL-8/IL-17 系が亢進している可能性が示唆された。一方で一部の CIDP 患者では IL-10 の測定感度以下の低下を認め、CIDP においては Th17 細胞系の亢進に加えて炎症制御性 T 細胞系の低下というヘルパー T 細胞バランスの破綻が病態に関与している可能性が考えられた。CIDP の末梢血を用いたフローサイトメトリーによる解析にて、無刺激下においては CIDP 患者、健常者ともに Th17 細胞を示唆する IL-17 産生細胞は認めなかった。細胞内サイトカイン測定においても、IL-17 陽性細胞は CIDP 患者、健常者ともに認めなかった。しかし、PMA および Ionomycin での刺激下での解析では、一部の CIDP 患者において CD4 陽性 IL-17 陽性リンパ球の増加を認め、CIDP 患者末梢血において Th17 細胞を同定した。これら結果から Th17 細胞が CIDP において存在し、その複雑な病態に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed multiplex inflammatory cytokine and chemokine levels in the cerebrospinal fluid (CSF) samples from the patients with CIDP and healthy controls using a fluorescent bead-based immunoassay. We found elevated levels of IL-8 and MCP-1 as well as IL-17, indicating activated IL-8/IL-17 axis in CIDP. Some patients with CIDP showed undetectably lower level of IL-10 in their CSF, which is an index of compromised anti-inflammatory T cells and their potential contribution to the mechanism of CIDP. We also performed flowcytometric analysis of peripheral blood cells in the CIDP patients and healthy controls. We found minimal T cells showing positivity for both IL-17 and CD4 in fresh peripheral blood samples from CIDP patients and healthy control. Intracellular cytokine-staining showed no significant increment of the number of IL-17 positive T cells in patients with CIDP. However, stimulating the peripheral blood cells by PMA and ionomycin resulted in the increased number of IL-17 positive cells in the patient with CIDP comparing to in healthy control. We identified Th17 cells in the peripheral blood cells from the patients with CIDP, indicating their potential contribution to the complex immunological mechanism in CIDP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000

年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：脳神経疾患、神経免疫、慢性炎症性脱髄性多発根神経炎

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症性脱髄性多発根神経炎(Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy, CIDP)は慢性進行性あるいは再発性に末梢神経の散在性脱髄を来し、筋力低下あるいは感覚障害を示す難治性疾患である。CIDPにおいては免疫抑制療法が一定の効果を示すことから、末梢神経を特異的な標的とした自己免疫的機序が想定されている。自己免疫疾患においては、自己免疫の認識抗原の同定はその病態特異的な治療法開発に必須であるが、これまでに血清を用いた液性免疫の観点からの研究においては CIDP 特異的な自己抗体は明らかにされておらず、CIDP の病態および原因は不明である。

CIDP では T リンパ球の末梢神経組織への浸潤を認める事などから、細胞性免疫の病態への関与が想定される。細胞性免疫において重要な役割を担う Th 細胞には少なくとも Th1、Th2、Th17、制御性 T 細胞といったサブセットが存在し、T 細胞依存性の免疫応答において相互調節を行っていると考えられる。このバランスの破綻が CIDP の病態に関与している可能性が考えられる。近年、IL-17 を産生する T 細胞は従来から知られていた Th1 細胞、Th2 細胞といった T 細胞サブセットではなく、新たな Th17 細胞と呼ばれるサブセットから特異的に産生されることが分かった。さらに、実験的アレルギー性脳脊髄炎において代表的 Th1 サイトカインである IFN γ ノックアウトマウスでは症状は悪化し、一方、IL-17 ノックアウトマウスでは脳脊髄炎発症が抑制されることから (Komiya, et al. 2006 J Immunol)、自己免疫疾患においては Th1 細胞よりむしろ Th17 細胞が重要である可能性が示唆されるようになった。

申請者らは CIDP 患者髄液における多項目サイトカイン測定に成功し、CIDP において Th1 サイトカインおよび IL-17 の上昇というサイトカインバランスの存在および自己反応性 Th1 細胞や Th17 細胞が病態に関与している可能性を報告している (Mei FJ, et al.

J Neurol Sci 2006)。このバランスの破綻が CIDP の病態に関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

申請者らは CIDP のサイトカインバランスにおいて IL-17 産生の上昇が特徴のひとつであり、Th17 細胞が CIDP の病態に関与している可能性を世界で初めて示した報告をさらに広げて、CIDP における更なるサイトカイン・ケモカインバランスの検討、Th17 細胞の CIDP の病態への関与の検討を行い、CIDP の病態を明らかにし、Th17 細胞が特異的に認識する抗原の同定を行うことを目的とした。これらの目的のために、1) CIDP 患者髄液におけるケモカインバランスを検討する。2) CIDP 患者の末梢血単核球中における IL-17 発現量および Th17 細胞頻度が、健常者との比較において上昇がみられるかどうかの検討。3) CIDP 患者と健常者における末梢血単核球を PMA および Ionomycin での刺激下における Th17 細胞増殖の違いおよびその臨床データとの関連性の検討 4) CIDP 患者由来の抗原特異的な Th17 細胞が認識する新規末梢神経抗原の同定に関して検討を行った。

3. 研究の方法

我々は CIDP 患者中髄液サイトカイン、ケモカインの変動の解析を進めた。対象は CIDP 患者 24 人 (平均年齢 56.7 \pm 13.2 歳)、非炎症性神経疾患患者群 (Other non-inflammatory neurological disease, OND) 27 名の脳脊髄液を採取し、fluorescent bead-based immunoassay 法を用いて IL-1 β 、IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、TNF- α 、interferon (IFN)- γ 、MCP-1、CCL3、CCL4、CCL5、CCL11、CXCL8、CXCL10、G-CSF、GM-CSF、bFGF、platelet-derived growth factor-bb (PDGFbb)、および VEGF の計 27 種類のサイトカイン、ケモカインの測定を行った。

CIDP 患者および健常者の末梢血より単核球を分離し、非刺激下にて CD4、IL-17、CCR6、IFN- γ 、IL-4、IL-9 に対する抗体をマーカーとしてフローサイトメトリーを用いたヘルパー T リンパ球のサブセットの解析を行った。また、非刺激下にて細胞膜透過処理薬

(Intraprep) を用いた処理後の末梢血単核球にて IL-17、CCR6 に対する抗体染色によるフローサイトメトリー解析を行うことにより、リンパ球の細胞内サイトカインの測定を行った。CIDP 患者および健常者の末梢血単核球を PMA および Ionomycin にて刺激培養し、その Th17 細胞の増殖能を CD4、IL-17、CCR6、IFN- γ 、IL-4、IL-9 に対する抗体をマーカーとしてフローサイトメトリーにてサブセットの解析を行った。

4. 研究成果

CIDP 患者髄液における様々なサイトカイン・ケモカインの分析において、CIDP 群では健常者との比較において、IL-17 に加えて、IL-8 および MCP-1 の有意な濃度上昇を認めた (図 1)。

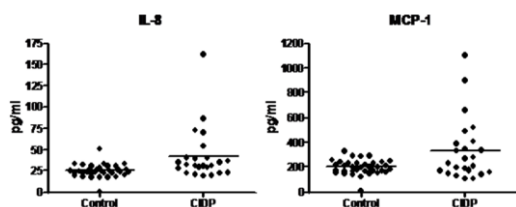


図1 CIDPの髄液サイトカイン・ケモカインプロファイル
CIDPにおけるIL-8、MCP-1の上昇

一方、IL-10 は CIDP 群の一部において低い傾向がみられた。これらの結果より CIDP においては IL-8/IL-17 axis の亢進および IL-10 の低下を認め、Th17 細胞および炎症制御性 T 細胞が病態に関与している可能性が示された。

CIDP 患者および健常者の末梢血を用いたフローサイトメトリーによる解析において無刺激の状態においては健常者、CIDP 患者ともに CD4 陽性 T 細胞に IL-17 陽性細胞は認めなかった。抗 CCR6 抗体での染色においても CCR6 陽性の T 細胞は認めなかった。Intraprep を用いた細胞処理後の末梢血単核球フローサイトメトリー解析においても IL-17、CCR6 陽性の細胞は無刺激下においては一方、PMA および Ionomycin での共刺激下においては健常者では CD4 陽性、IL-17 陽性細胞は 0.4% であったのに対して、CIDP 患者においては 1.4% と健常者よりも多くみられ、Th17 細胞性の反応が CIDP において亢進している可能性が示唆された (図 2)。本研究では刺激下条件における CIDP 患者の末梢血において Th17 細胞を同定し、CIDP では Th17 細胞性の反応が亢進している可能性が示唆された。これらの結果から Th17 細胞が CIDP の病態に深く寄与している可能性が考えられた。今後は今回の研究

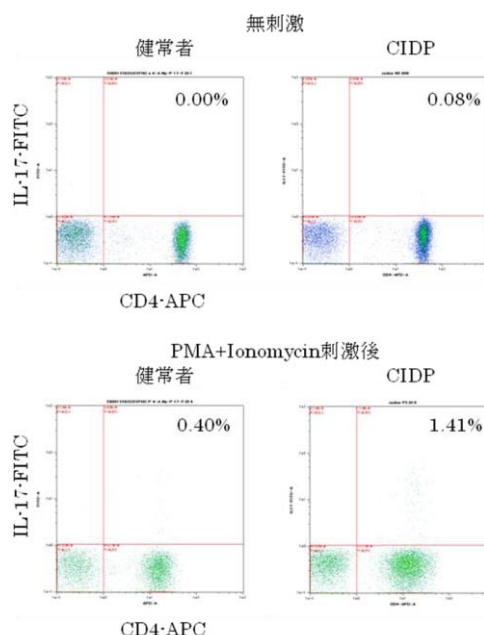


図2 健常者およびCIDP患者の末梢血における無刺激、刺激後のIL-17産生細胞のflowcytometryにおける同定および定量評価

にて分離した CIDP 患者の末梢血単核球由来の Th17 細胞を用いて、認識抗原の同定を行って行くことが CIDP の病態解明に必要と考えられた。

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)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Kawamura N, Dyck PJ, Schmeichel AM, Engelstad JK, Low PA, Dyck PJ. Inflammatory mediator in diabetic and non-diabetic lumbosacral radiculoplexus neuropathy. *Acta Neuropathol.* 115:231-9, 2008
2. Wang Y, Kawamura N, Schmelzer JD, Schmeichel AM, Low PA. Decreased peripheral nerve damage after ischemia-reperfusion injury in mice lacking TNF-alpha. *J Neurol Sci.* 267:107-11, 2008
3. Isobe N, Kira J, Kawamura N, Ishizu T, Arimura K, Kawano Y. Neural damage associated with atopic diathesis: nationwide survey in Japan. *Neurology* 73:790-7, 2009
4. Piao H, Minohara M, Kawamura N, Li W, Mizunoe Y, Umehara F, et al. Induction of paranodal myelin detachment and sodium channel loss in vivo by Campylobacter jejuni DNA-binding protein from starved cells (C-Dps) in myelinated nerve fibers. *J Neurol Sci.* 288:54-62, 2010

5. Ueda M, Kawamura N, Tateishi T, Sakae N, Motomura K, Ohyagi Y, Kira J. Phenotypic spectrum of hereditary neuralgic amyotrophy caused by the SEPT9 R88W mutation. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 81:94-6, 2010

6. 中村憲道, 河村信利, 立石貴久, 土井光, 大八木保政, 吉良潤一. 副交感神経障害を主徴とした MPZ 遺伝子変異 Thr124Met による Charcot-Marie-Tooth 病の 1 例. 臨床神経. 49:582-5, 2009

7. 古賀優子, 立石貴久, 河村信利, 土井光, 大八木保政, 吉良潤一. 頭部 MRI にて広汎な病変を認め, 抗 GAD 抗体の関連が示唆された免疫介在性脳症の 1 例. 臨床神経. 50:92-7, 2010

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 河村信利, 三野原元澄, 河野祐治, 大八木保政, 吉良潤一. CIDP における conformational epitope を認識する自己抗体の検索. 第 49 回日本神経学会総会, 横浜, 2008

2. 上田麻紀, 河村信利, 立石貴久, 本村今日子, 大八木保政, 吉良潤一. SEPT9 遺伝子変異に伴う hereditary brachial plexus neuropathy の 1 家系. 第 19 回日本末梢神経学会, 名古屋, 2008

3. 磯部紀子, 河野祐治, 河村信利, 三野原元澄, 吉良潤一. アトピー関連末梢神経炎・脊髄炎の全国疫学調査結果. 第 19 回日本末梢神経学会総会, 名古屋, 2008

4. 中村憲道, 河村信利, 立石貴久, 大八木保政, 吉良潤一. Adie 瞳孔および排尿障害を主徴とした MPZ 遺伝子変異 (Thr124Met) による Charcot-Marie-Tooth 病の 1 例. 第 61 回日本自律神経学会総会, 横浜, 2008

5. 河村信利, 上田麻紀, 立石貴久, 本村今日子, 大八木保政, 吉良潤一. SEPT9 R88W 変異に伴う hereditary brachial plexus neuropathy の臨床像. 日本神経学会総会, 仙台, 2009

6. 田中弘二, 立石貴久, 河村信利, 荒畑創, 山崎亮, 大八木保政, 吉良潤一. ミトコンドリア DNA に多重欠失を認めた SANDO (sensory ataxic neuropathy, dysarthria, ophthalmoplegia) の一例. 第 20 回日本末梢神経学会総会, さいたま, 2009

7. Kawamura N, Piao H, Minohara M, Mizunoe Y, Umehara F, Kusunoki S, Ikenaka K, Nabekura J, Kira J. Paranodal demyelination and sodium channel loss induced by Campylobacter jejuni protein in myelinated nerve fibers. 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry. Busan, 2009

8. 河村信利, 磯部紀子, 田中弘二, 大八木

保政, 植田光晴, 安東由喜雄, 岩城徹, 吉良潤一. TTR 質量分析および遺伝子検査が診断に有用であった FAP ATTR Ile107Val の 1 例. 第 62 回日本自律神経学会総会

〔図書〕(計 1 件)

1. 河村信利, 吉良潤一. 三叉神経痛. 神経障害性疼痛診療ガイドブック. 南山堂. 2010

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村信利 (KAWAMURA NOBUTOSHI)

研究者番号: 00432930

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし