

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

Exploration and Identification of Biomarkers of Multiple Sclerosis Which is Relevant for Management and Research of MS

山村 隆 (YAMAMURA TAKASHI)

国立精神・神経センター・神経研究所疾病研究第六部・部長



研究の概要

多発性硬化症 (MS) は、中枢神経系の脱髄性自己免疫疾患である。本研究は、MS の日常診療に有用なバイオマーカーの確立を目的とする。我々は、患者末梢血 NK 細胞 CD11c の発現量が再発に関連し、新たなバイオマーカーになることを提唱した。最近、CD11c と連動するマーカーとして、末梢血中 NK 細胞頻度および NK 細胞中クラスタリン発現などを見いだした。これらのバイオマーカーを併用することで、MS の病勢評価や再発予測の精度が向上するものと思われる。

研究分野：神経免疫学

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、NK 細胞、バイオマーカー、CD11c

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (MS) は中枢神経系脱髄疾患であるが、その本態は自己免疫 (autoimmune) である。日常診療に有用な血液検査が確立されていないため、診療は経験に頼るところが大きい。申請者は、樹状細胞マーカーとされる CD11c が MS の NK 細胞の一部で高発現し、その発現量 (MFI) が高い症例では、数ヶ月以内に再発する割合が高いことを見いだした (*J. Immunol.* 2006. 177:5659)。この結果は、MS の病勢を評価するマーカー分子が、NK 細胞の分子発現解析から同定できることを示唆している。

2. 研究の目的

MS の免疫細胞に特徴的な変化を解析し、MS の診断、病態把握、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。

3. 研究の方法

1) NK 細胞発現 CD11c 分子のバイオマーカーとしての確立

フローサイトメーターによる MS 患者 NK 細胞 CD11c 発現の経時的解析、CD11c 発現と関連 (逆相関) する T 細胞、B 細胞、NK 細胞分子群の同定、CD11c 発現と関連 (逆相関) する NK 細胞内分子群の同定

2) MS の新規バイオマーカーの探索

4. これまでの成果

1) CD11c のバイオマーカーとしての確立

A) MS 患者 22 名から 2 回以上の NK 細胞 CD11c データを取得した。約 1 年半の間に 5 回測定を行った代表例の結果を図 1 に示す。本症例のように経過観察中に CD11c が上昇傾向を示し、明らかな CD11c^{high} ステージに入ってから再発した症例が他に 9 例あった。残りの患者では、数回の測定結果は CD11c^{low} の値を示した。前者と後者は病態機序が異なるのか、検査タイミングの僅かな差によって違いが強調されたのか、今後の検討課題である。

2) CLU のバイオマーカーとしての意義

1) NK 細胞 CD11c と関連の T 細胞・B 細胞・NK 細胞マーカーの解析
種々の免疫細胞表面分子の発現と、NK 細胞 CD11c 発現を解析したところ、NK 細胞 CD11c と NK 細胞の頻度間に、有意な逆相関が認められた ($n=170, p<0.00001, r=-0.37$)。以上より、末梢血 NK 細胞頻度減少 (NK 細胞死の亢進) が、病勢増悪を示すバイオマーカーとして有用であると考えられる。

2) CD11c 発現と関連 (逆相関) する NK 細胞内分子の同定

CD11c^{low} および CD11c^{high} の MS 患者それぞれ 3 名の NK 細胞から mRNA を抽出し、DNA マイクロアレイで解析した。CD11c 発現増加が NK 細胞の減少と関連することからアポトーシス関連遺伝子を検索すると、クラスタリン (CLU)

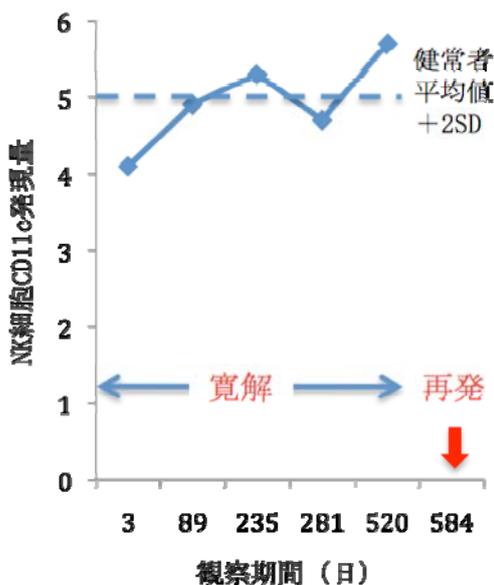
遺伝子発現が、CD11c^{high}群に比べてCD11c^{low}群で8倍以上上昇していることが分かった (p<0.05)。CLUは抗アポトーシス機能を有する蛋白であるが、リンパ球における機能は不明であった。精製NK細胞を種々の方法で刺激すると、CLU発現量が有意に低下した。また、PHAで末梢血単核球を刺激する際にCLUに対するsiRNAでCLU発現を抑制すると、NK細胞数の有意な減少が認められた。このことは、CLUがNK細胞において抗アポトーシス機能を担っていることを示唆する。以上より、NK細胞内CLU発現の減少が、病勢増悪を反映するバイオマーカーとして有用であると考えられる(投稿準備中)。

3)MSの新規バイオマーカーの探索

CD28陰性T細胞

我々は、一部のMS患者において増加しているCD28陰性T細胞が、MS病巣に高発現しているαB-crystallin (CRYAB)という熱ショック蛋白反応性T細胞を多く含むことを見いだした。CD28陰性T細胞は、CRYAB刺激によりIFN-γ産生を示したことから、MS病巣でCRYABに反応し、IFN-γを産生することで病態形成に関与している可能性がある。従って、CD28陰性T細胞の頻度は、CRYABに対する自己免疫が、病態において重要である一群を同定するバイオマーカーとして重要であると考えられる(投稿準備中)。

NK細胞CD11c発現量の経時的変化



5. 今後の計画

NK細胞の頻度およびCD11c、CLU発現の経時的測定を継続し、バイオマーカーとしての有用性を確立する。CD11c^{low}およびCD11c^{high}のMS患者T細胞およびB細胞よりmRNAを抽出し、NK細胞の変化に関連するT細胞、B細胞バイオマーカーを同定する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む) (研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、 連携研究者は一重下線)

- 原著
1. Sato, W., T. Aranami, and **T. Yamamura**. 2007. Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5- phenotype. *J. Immunol.* 178:7525-7529.
 2. Satoh, J., M. Nakanishi, F. Koike, H. Onoue, T. Aranami, T. Yamamoto, M. Kawai, S. Kikuchi, K. Nomura, K. Yokoyama, K. Ota, T. Saito, M. Ohta, S. Miyake, T. Kanda, T. Fukazawa, and **T. Yamamura**. 2006. T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 174:108-118.
 3. Aranami, T., S. Miyake, and **T. Yamamura**. 2006. Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. *J. Immunol.* 177:5659-5667.

総説

1. T. Aranami, and **T. Yamamura**. 2008. Th17 cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol. Int.* 57:115-120.
2. 佐藤和貴郎, 荒浪利昌, 山村隆. 2008年. ヒトTh17細胞におけるケモカインレセプターの発現. *臨床免疫・アレルギー科* 49:89-94.
3. 荒浪利昌, 山村隆. 2008年. 多発性硬化症の疾患活動性のマーカーとそのモニタリング. *新興医学出版社* pp265-270.
4. 荒浪利昌, 山村隆. 2007年. NK細胞サブセットと難治性自己免疫疾患. *実験医学* 25:1315-1320.

ホームページ等

http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_men/index.html