JMSS 日本多発性硬化症協会 （略称日本MS協会）
Japan Multiple Sclerosis Society

ニュース・レター

No. 27
2003.4

〒111-0042 東京都台東区寿4－1－2 （私書箱 東京浅草 28） 無断転載を禁じます
TEL 03-3847-3561 FAX 03-3842-0289 E-mail : jmss@tk.sanyeicorp.co.jp

目　　次

1．平成14年度医学助成金贈呈者（若手研究者）の研究テーマ

イ．多発性硬化症に対する再生医学的治療法開発に関する研究

国立精神・神経センター神経研究所
組織培養研究室長　佐　藤　準　一 …… 1

ロ．多発性硬化症の病因に関連する感染因子の同定

東北大学医学部付属病院神経内科　　中　島　一　郎 …… 9

2．“What's your name?” や “May I help you?” を聞くあしたのために

日本MS協会会員
MS患者国際委員会担当　坂　野　尚　美 …… 16

3．「平成15年度医学助成について」のお知らせ …… 18

4．寄付者ご芳名 …… 19

5．日本多発性硬化症協会役員リスト …… 20

6．医学顧問団リスト …… 22

7．あとがき …… 26

多発性硬化症に対する再生医学的治療法開発に関する研究

国立精神・神経センター神経研究所　免疫研究部
組織培養研究室長　佐　藤　準　一

1．目　的

多発性硬化症（multiple sclerosis; MS）は中枢神経系髄鞘（myelin）抗原で活性化されたT細胞により惹起される脳脊髄炎で、視神経・脊髄・大脳白質などに炎症性脱髄巣（inflammatory demyelinating lesions）が多発して（空間的多発性）、多彩な神経症状が再発（relapse）・寛解（remission）を繰り返す（時間的多発性）。MS の発症には自己免疫学的機序の関与が示唆されているが、未だ根本的病因は解明されていない。MS では不完全な寛解、すなわち破壊された髄鞘の不完全な再生や軸索の傷害（axonal injury）により永続的後遺症を残すことがあり、この点が治療上最大の問題点である。近年再発の予防薬として interferon-β(IFNβ）の有効性が確立されたが[1]、髄鞘再生促進薬は未だ開発されていない。

発生学的には髄鞘は新生児から乳児期にオリゴデンドロサイト（oligodendrocyte; OL）により形成される。最近、生体において全ての細胞の根幹となるような細胞、すなわち幹細胞（stem cell）の存在が明らかにされた。胚性幹細胞（embryonic stem cell; ESC）や神経幹細胞（neural stem cell; NSC）から分化を誘導した OL 前駆細胞をラット脊髄に移植すると髄鞘の再生を促進出来ること[2]、また骨髄間質細胞（bone marrow stroma cell; BMSC）や臍帯血細胞（cord blood cell）など、人体から生検で採取可能な細胞からも ES や NSC を分離出来ることが報告された[3]。NSC は脳脊髄に広く分布し、増殖能・自己複製能を保有し、神経細胞（neuron）および OL やアストロサイト（astrocyte）への分化能を呈する幹細胞である。これらの知見は「MS患者から骨髄を採取して BMSC を得て NSC を分離し、OL への分化を誘導する。NSC 由来 OL を再び同一患者の脳脊髄液腔内にもどす。この細胞が脱髄巣に移動・生着して髄鞘の再生を促進する。しかも自己の細胞であり拒絶反応が起こらない。」という MS に対する細胞移植による再生医学的治療法開発の可能性を示唆する（図1）。既に欧米ではMS患者の末梢神経系髄鞘形成細胞（Schwann cell）を用いた移植治療が試みられている[4,5]。

現在MS再発予防には組換え型ヒト IFNβ1b（Betaseron, Betaferon）または IFNβ1a（Avonex, Rebif）が使用されている。IFNβ1b は大腸菌で産生され、天然型 IFNβ の17位システインがセリンに置換され糖鎖修飾はなく、隔日皮下注射で使用される。一方 IFNβ1a は Chinese hamster ovary（CHO）細胞で産生され糖鎖修飾があり、週1回筋肉内注射で使用される。しかし IFNβの年余にわたる注射は、患者にとって精神的負担であり、また皮膚潰瘍形成を惹起する危険性も高く、医療経済学的にも莫大なコストを必要とする。この問題点を解決すべく、遺伝子工学的手法により作成された IFNβ 恒常的産生細胞を移植する方法の開発も重要である。しかし現在まで国内外の研究を通じて、

幹細胞から OL への分化を誘導する因子（OL differentiation-inducing factor; ODIF）や OL 分化制御機構は十分明らかにされていない。また組み換え型 IFNβ を産生するヒト由来株化細胞は樹立されていない。本研究では MS に対する再生医学的治療法開発の糸口を見い出すために多面的なアプローチを試みる。

2．方　法

＃1．マウス NSC 純培養の樹立：既報[6]に従い、B6マウス新生児（PO）終脳を摘出し細切後に 0.1% papain, 20 μg／ml DNAseで37℃、20分処理、ナイロンメッシュを通し single cell suspension を得て、無血清培地 DMEM／F12 supplemented with insulin-transferrin-selenium plus 20ng／ml epidermal growth factor（EGF）で2ヶ月間培養することにより、NSC 純培養を樹立する。同様にB6系green fluorescent protein（GFP）トランスジェニックマウス[7]の P0 終脳からも NSC を樹立する（GFP^+ NSC）。GFP^+ NSC は螢光顕微鏡下の観察で GFP 特異的螢光を発し、細胞を可視的に追跡出来る。

＃2．NSC における幹細胞・神経細胞・グリア細胞特異的マーカー遺伝子発現パターンおよび ODIF の探索：NSC を ODIF の候補因子であるplatelet-derived growth factor（PDGF-AA), transforming growth factor（TGFβ1), IFNβ, brain-derived neurotrophic factor（BDNF), neurotrophin-3（NT-3), pleiotrophin（PTN), heregulin（HRG), dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP), phorbor 12-myristate 13-acetate（PMA), or anti-NOGO antibody を添加した培地で48時間培養後に total RNA and protein を抽出する。NSC は nestin または musashi homolog-1 (MSI1), neuron は high molecular weight neurofilament protein（NF-H), microtuble-associated protein (MAP2), βⅢ isoform of tubulin（βTub), astrocyteはglial fibrillary acidic protein (GFAP), OL は myelin basic protein（MBP), myelin oligodendrocyte glycoprotein（MOG）の発現を指標として RT-PCR法・Northern blot法・Western blot法・免疫細胞化学染色法 (immunocytochemistry）により解析する。Northern blot法では nestin mRNA6.0kb, NF-H mRNA4.4kb, GFAP mRNA2.6kb, MBP mRNA2.3kbで、Western blot法では nestin protein 220-kDa, NF-H protein 200-kDa, GFAP protein 50-kDa, MBP protein 14-21.5-kDa である。NSC に対して MBP または MOG の発現を上昇（up-regulation）させ、同時に nestin の発現を低下 (down-regulation）させる因子を ODIF と定義する。

＃3．OL への分化過程で発現変動を来す遺伝子（OL 分化関連遺伝子）群の包括的解析：ODIF で OL への分化を誘導した NSC および ODIF 未処理の未分化 NSC を準備する。各々から mRNA を抽出して蛍光色素 Cy3 or Cy5-labeled cDNA probe を作成する。各々の probe で mouse cDNA microarray (Hitachi Life Science）をハイブリダイズし、特異的シグナルを検出・定量化する。NSC において OL への分化に並行して up-regulation or down-regulation を示す遺伝子群を同定し、その発現量を LightCycler による real-time PCR および Northern blot法で定量的に解析する。

＃４．実験的アレルギー性脳脊髄炎（experimental allergic encephalomyelitis；EAE）に対するNSC 移植治療の試み：EAE はマウス・ラットなどを髄鞘抗原で免疫することにより誘導可能な脳脊髄炎であり、MS の動物モデルとされている。GFP⁺NSC を B6 マウス MOG-induced EAE 急性期に経静脈的に移入し、回復期に脳脊髄を摘出して、EAE 病巣における NSC 生着を免疫組織学的に解析する。

＃５．ヒト IFNβ 恒常的産生細胞株の樹立：ヒト IFNβ 遺伝子（N-terminal signal peptide を除いた部分）を発現ベクター pSecTag／FRT／V5-His-TOPO（Invitrogen）にクローニングする。Flp-In system を利用して、このベクターを human embryonal kidney（HEK）293細胞に Lipofectamine PLUS（Invitrogen）で導入し、hygromycin-B 耐性細胞を選択して株化する。対照には prostate specific antigen（PSA）遺伝子を組み込んだベクターを用いる。この系では N-terminal Igk leader sequence と C-terminal V5,6xHis epitopes を持つ組み換え蛋白質が細胞培養液中に分泌される。培養上清中に含まれる IFNβ 活性を調べるため、IFNβ 導入細胞とヒト末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cells; PBMC）を 0.4μm 透過膜を隔てて共培養し、PBMC における IFN 制御遺伝子群（IFN-responsive genes; IRG）の発現誘導を、既報[8]に従い Northern blot 解析で検出する。

３．結　果

＃１．マウス NSC 純培養の樹立：B6 マウスおよび B6 系 GFP トランスジェニックマウスより EGF 添加無血清培養下、自律的に増殖（self-renew）する NSC を樹立した（図２）。NSC は球状浮遊状態（floating sphere）（図２c）またはプラスチック表面に円板状付着状態（adherent discoid）の形態を呈して増殖し、後者の一部から neuron, astrocyte, OL が遊出・分化した（図２a,b）。NSC を10%fetal bovine serum（FBS）添加培地、poly-L-lysine（PLL）コート表面上で培養時には、付着性細胞が非常に増加し、多くは astrocyte の形態を示した（図２d）。

＃２．NSC の細胞特異的マーカー遺伝子発現パターンおよび ODIF の探索：NSC は EGF 添加無血清培養下では、免疫細胞化学的に nestin を高レベル発現し、GFAP を中レベル発現していた（図２e; green が nestin, red が GFAP）。また同条件下 RT-PCR による解析では、nestin, MSI1 を高レベル発現し、GFAP, MBP を中レベル発現し、NF-H, MOG を低レベル発現していた（図３, panels a-f, lane 3）。Northern blot 解析では10%FBS 添加培養下、GFAP の発現レベルは顕著な上昇を認めた。しかし現在 NSC に対する ODIF は同定されていない。

＃３．OL 分化関連遺伝子群の包括的解析：ODIF が同定され次第、解析を開始する予定である。

＃４．実験的アレルギー性脳脊髄炎（experimental allergic encephalomyelitis; EAE）に対するNSC 移植治療の試み：GFP⁺NSC を EGF および fibroblast growth factor（FGF-2）添加無血清培養地で培養し、その 1×10^7 cells／mouse を B6 マウス MOG-induced EAE 急性期（day 8-10）に経静脈的に移入し、２週間後に４％ paraformaldehyde で灌流固定後に腰髄組織切片を作成した。現在 GFP 特異的螢光を指標として NSC 生着を確認する実験を進行中である。

＃5．ヒト IFNβ 恒常的産生細胞株の樹立：pSecTag／FRT／V5-His-TOPO にクローニングしたヒト IFNβ 遺伝子を HEK293 細胞に導入した。培養上清の抗 V5 抗体による Western blot 解析で、組み換え蛋白質 PSA (32-kDa)（図4 A, lane 1）と IFNβ (25-kDa non-glycosylated form and 28-kDa glycosylated form)（図4 A, lane 2）の産生を検出した。また IFNβ 遺伝子導入細胞と PBMC を共培養すると、PBMC において IFN-induced 15-kDa protein (ISG15)（図4 Ba, lane 4）および IFNα-inducible cDNA6-16 (IFI6-16)（図4 Bb, lane 4）の発現が誘導されたが、PSA 遺伝子導入細胞の培養上清には、PBMC に対する IRG 発現誘導活性を認めなかった（図4 Ba, 4Bb, lane 3)。

4．考　察

本研究では①マウス NSC 純培養を樹立し、②NSC における幹細胞・神経細胞・グリア細胞特異的マーカー遺伝子の発現を確認し、また③ヒト IFNβ 恒常的産生細胞株を樹立することに成功した。NSC は OL の無限の供給源となる可能性があるが、現時点では NSC に対する ODIF の同定および OL 分化関連遺伝子群の解析は進行中である。NSC 培養系での解析上の問題点は、NSC が2つの異なる形態を呈して増殖することである。すなわち（i）球状浮遊状態 (floating sphere) で未分化な幹細胞を主体とする形態と（ii）円板状付着状態 (adherent discoid) で、その一部から neuron, astrocyte, OL が自律的に分化する形態である。通常の培養条件下ではこの両者が混在しており、RT-PCR 解析では NSC, neuron, astrocyte, OL のマーカー遺伝子 (nestin, MSI1, NF-H, GFAP, MBP, MOG) 全ての発現が検出される。しかし NSC における MOG の発現レベルは非常に低いため、MOG の発現上昇が最も重要な ODIF 同定の指標となる。

また MS に対する細胞移植による再生医学的治療法開発の前段階として、EAE に対する NSC の移植実験を進行中である。中枢神経系では血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) が存在するため、血行性に投与した物質は BBB 透過性に応じて選択的に脳組織に取り込まれる。MS や EAE の急性期炎症性病巣においては BBB が破綻しており、脳組織へ移行し易くなっていると推測される。従って経静脈的に投与した NSC は肺を通過後に動脈系へ移行し、脳循環を介して病巣に到着可能と思われる。しかし肺で貪食系細胞にトラップされて数が著明に減少するので、頚動脈や脳脊髄液腔内への投与法の開発が必要となるかもしれない。マウス NSC 培養系で培地に血清を添加すると astrocyte への分化が促進されるが、ヒト中枢神経系組織には常時血清成分が存在することを考えると、未分化 NSC そのものを生体に移植するとほとんどが astrocyte へ分化してしまう可能性がある。

IFNβ 恒常的発現 HEK293 細胞はヒトの由来の細胞であり、この細胞が産生する IFNβ は、現在 MS 治療で使用されている IFNβ1b や IFNβ1a と比較して、さらに生理的状態に近い蛋白質である。Flp-In system ではあらかじめ外来遺伝子の導入部位 (FRT site) が既知であり、遺伝子導入の際に染色体の予期せぬ部位に組み込まれて発癌遺伝子を活性化するような事態が起こらない。本研究で作成したヒト IFNβ 恒常的産生細胞株は、発現量を自由に調節可能なように改良を加えれば、臨床への応用が期待出来る。すなわち患者自身から生検で採取した細胞、例えば皮膚線維芽細胞を培養して

FRT site を導入後に、発現量を調節出来るプロモーター（Tet-off systemなど）の下流に IFNβ 遺伝子をクローニングしてから細胞へ導入し、患者本人の皮膚へ移植することが理論上は実現可能である。自己の細胞を移植した場合は拒絶されないため、永続的に IFNβ を供給する source となり得る。

5．結　論

本研究では MS に対する再生医学的治療法開発研究の糸口として、マウス NSC 純培養およびヒト IFNβ 恒常的産生細胞株を樹立した。今後は ODIF の同定が重要な研究課題となる。

6．研究協力者

二枝　隆博　国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部　研究員

中西　恵美　国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部　研究生

山村　隆　　国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部　部長

7．参考文献

1．佐藤 準一ら、多発性硬化症におけるインターフェロンベータ療法の効果発現機序、医療2003印刷中

2．Brüstle O et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. Science 284: 754-756, 1999.

3．Sanchez-Ramos J.Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. J Neurosci Res 69: 880-893, 2002.

4．Stangel M. Transplantation of myelinating cells as regenerative therapy for multiple sclerosis-experimental basis and present state of clinical studies. Nervenarzt 73: 937-945, 2002.

5．Halfpenny C et al. Cell transplantation, myelin repair, and multiple sclerosis. Lancet Neurol 1: 31-40, 2002.

6．Reynolds BA et al. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science 255: 1707-1710, 1992.

7．Okabe M et al. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. FEBS Lett 407: 313-319, 1997.

8．Satoh J et al. Differing effects of IFNβ vs IFNγ in MS. Gene expression in cultured astrocytes. Neurology 57: 681-685, 2001.

8．図の説明

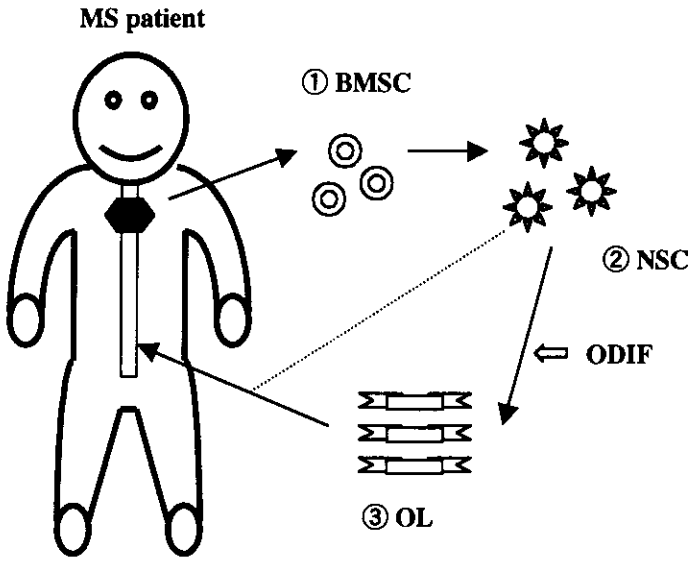


図1．MS に対する細胞移植による再生医学的治療法

MS 患者の胸骨より骨髄間質細胞（bone marrow stroma cell; BMSC）を採取し、細胞分画採取法（cell sorting）により、神経幹細胞（neural stem cell; NSC）を分離する。NSC の培養にオリゴデンドロサイト（oligodendrocyte; OL）分化誘導因子（OL differentiation-inducing factor; ODIF）を添加して，OL への分化を誘導する。NSC 由来 OL を再び同一患者の脳脊髄液腔内にもどす。これが脱髄巣に移動・生着して髄鞘の再生を促進する。

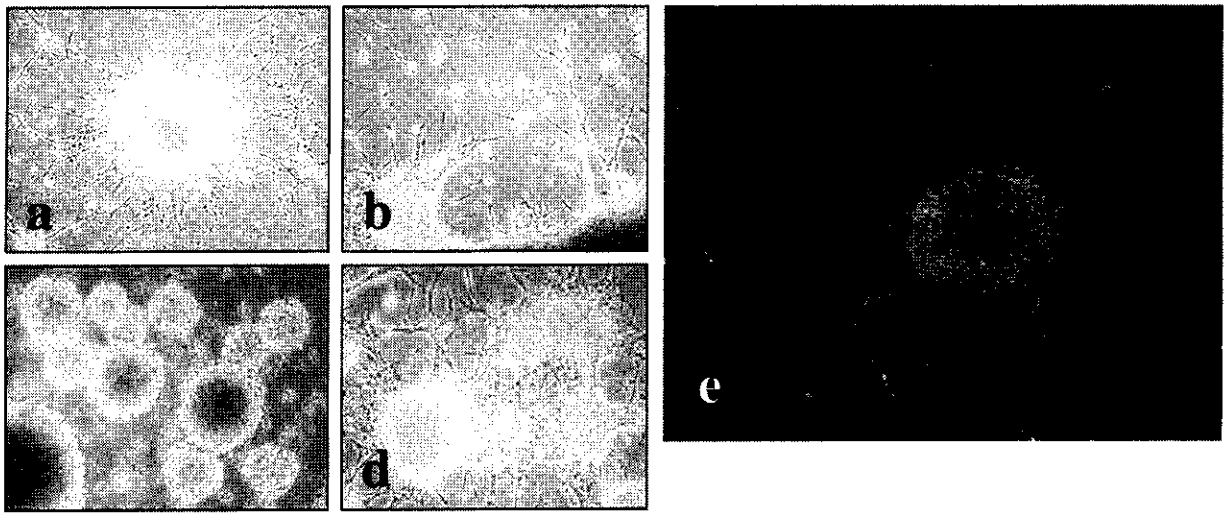


図2．マウス NSC 純培養

EGF 添加無血清培養下、NSC は球状浮遊状態（c）または円板状付着状態（a）の形態を呈して増殖し、後者の一部から neuron, astrocyte, OL が遊出・分化する（b)。NSC を10% FBS 添加培地、PLL コート表面上で培養時には付着性細胞が増加する(d)。NSC の抗 nestin 抗体（e: green）と抗 GFAP 抗体（e:red）による二重染色。

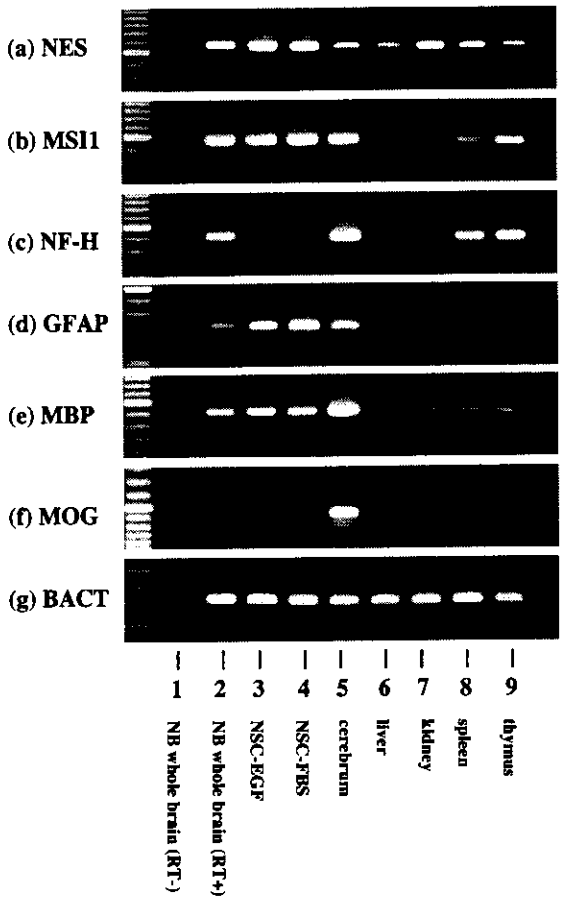
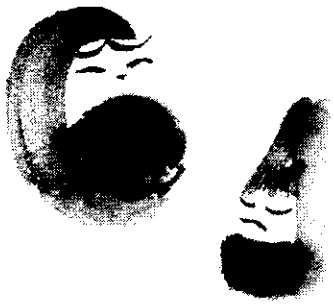


図3．RT-PCR 法による細胞特異的マーカー遺伝子発現の解析

Panelは(a) nestin, (b) musashi-1, (c) NF-H, (d) GFAP, (e) MBP, (f) MOG, (g) β-actin の PCR 産物を示す。Lane は(1) PO マウス全脳 reverse transcriptase 前処理(−), (2) PO マウス全脳 reverse transcriptase 前処理 (+), (3) EGF 添加無血清培養下 NSC, (4) 10%FBS 添加培地、PLL コート表面上培養下 NSC, (5) 成体マウス大脳, (6) 成体マウス肝臓, (7) 成体マウス腎臓, (8) 成体マウス脾臓, (9) 成体マウス胸腺。



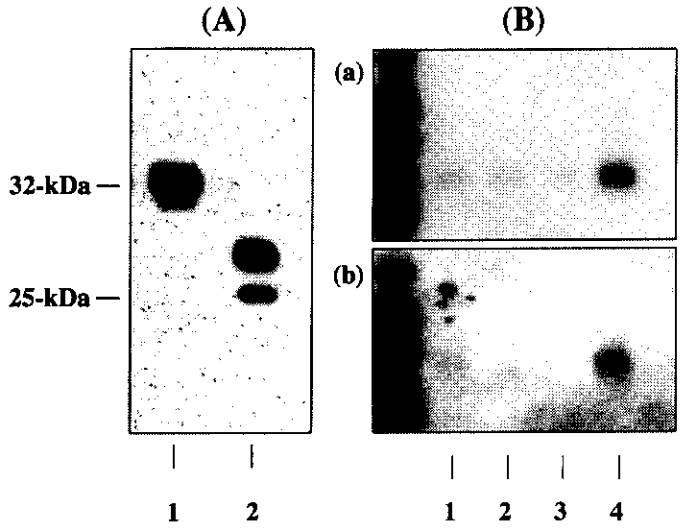


図4．ヒト IFNβ 恒常的産生細胞株の樹立

(A) 細胞培養上清の抗 V5 抗体による Western blot 解析。Lane は (1) PSA 遺伝子導入 HEK293 細胞, (2) IFNβ 遺伝子導入 HEK293 細胞。(B) 遺伝子導入細胞と共培養した PBMC における IFN 制御遺伝子発現の Northern blot 解析。Panel は (a) IFN-induced 15-kDa protein (ISG15), (b) IFNα-inducible cDNA6-16 (IFI6-16)。Lane は (1) 共培養細胞なし, (2) 遺伝子未導入 HEK293 細胞, (3) PSA 遺伝子導入 HEK293 細胞, (4) IFNβ 遺伝子導入 HEK293 細胞との共培養。IFNβ 遺伝子発現 HEK293 細胞と共培養時のみ、PBMC における ISG15, IFI6-16 の発現誘導を認める。

多発性硬化症の病因に関連する感染因子の同定

東北大学医学部附属病院神経内科　中　島　一　郎

緒　　言

欧米においては診断確実な MS の95%で髄液 IgG 産生が亢進し、オリゴクローナルバンドが出現するといわれている。健常対象でもその10%程度にオリゴクローナルバンドが出現すると言われている他、神経梅毒、結核性および真菌性髄膜炎、亜急性硬化性全脳炎、HTLV-1 関連ミエロパチーなどの中枢神経感染症でも高頻度に出現することが知られている(1,2)。これら感染症での髄液中で増加した IgG は感染因子に対する抗体であることが確認されており、髄液中で特異的に産生が亢進する結果オリゴクローナルバンドが出現する。一方、MS の 髄液 IgG の認識抗体は不明である。ウイルスの抗体価を測定すると、MS の髄液中では対照と比較して風疹ウイルス、麻疹ウイルス、帯状疱疹ウイルス、単純ヘルペスウイルスなどに対する抗体価が上昇していることが知られている(4)。これらの抗体価の上昇が病態に関与しているかどうかは不明であり、非特異的な反応として考えられていることが多い。

ファージライブラリ法は、バクテリオファージ M13 のコート蛋白領域にランダムなアミノ酸配列でペプチドを提示し、モノクローナル抗体のリガンドを効率よく検出することの出来る方法である(3)。

対象・方法

症例背景

診断確実な MS14 例の急性期の髄液を用いて IgG のエピトープ検索を行った。14例のうち、女性が12例で男性が 2 例。年齢は21歳から60歳で平均37歳。発症年齢の平均は29歳で平均罹病期間は 8 年であった。14例中12例はオリゴクローナルバンド (oligoclonal IgG bands: OB) 陽性で、14例の IgG index の平均は1.07であった。1 例では異なる 3 病期に採取した髄液をそれぞれ検索した。対照とした中枢神経感染症は亜急性硬化性全脳炎、神経梅毒、およびクリプトコッカス髄膜炎の 3 症例である。

オリゴクローナルバンド

Amersham Pharmacia Biotech 製の PhastSystem を用いて等電点電気泳動法および銀染色を行い高感度に OB を同定した(6)。PhastGel™ IEF3-9 の産生側に Pharmalyte™ 8-10.5 をしみこませてゲルのアルカリ領域を拡大したのち、IgG 濃度を 3mg／dl に希釈した髄液を 3μl 添加し約30分の泳動を行った。抗ヒト IgG ウサギ血清をゲルに反応させた後、polyethylene glycol 6000 溶液で洗浄、銀染色を行って特異的に IgG のバンドを検出した。血清には見られない明瞭なバンドが髄液で 2 本以上認められた症例を OB 陽性とした。

ファージディスプレイ法

100μl の Dynabeads Protein A™ (Dynal Biotech ASA社、Oslo、Norwayより購入) を髄液500ml と混合し、4℃にて一晩反応させた。リン酸ナトリウム緩衝液で2回洗浄後、ランダムファージライブラリ (Ph. D. -12™) (New England Biolabs Inc., Bervely, MAより購入) を10μl (およそ 4×10^{10}個のファージが含まれる) 添加し、室温にて1時間反応させた。ビーズ-IgG 複合体と未結合のファージを0.1% Tween 20 加リン酸緩衝液で2回洗浄した。1 ml の溶出バッファー (0.2M glycine, pH2.2) を加えて室温で10分間反応させ、ビーズに結合した IgG を溶出した。溶出液を新しいチューブに移した後、150μl の中和バッファー (1M Tris, pH 9.1) を加えて中性化した。溶出液800μl に含まれているファージを大腸菌に感染させ増幅し、10,000回転で10分間遠心し、上清をpolyethylene glycol 溶液 (20% polyethylene-glycol 8,000、2.5M NaCl) と混合し一晩4℃で放置してファージを沈殿させた。10,000回転で15分間遠心し、沈殿物を1 ml のトリスバッファーで溶解した。得られたファージ溶液を段階希釈にてタイトレーションを行い濃度を測定した。

2×10^{11} 個のファージを含んだ量のファージ溶液を新たに作成した髄液 IgG と protein A ビーズの結合体溶液と混合し、1時間反応させた。0.1% Tween 20 加リン酸緩衝バッファーで6回洗浄したのち、溶出バッファーを用いてファージを溶出した。上記と同様の方法でファージを大腸菌で増幅し、アガープレート上で 32クローンを無作為に取り出しファージから cDNA を抽出した。コート蛋白の翻訳領域を含む塩基配列を DNA シークエンサーで解析し、コート蛋白領域の 12個のアミノ酸配列を決定した。

32種類の 12アミノ酸配列の中から数個以上の共通アミノ酸配列をインターネット上に公開された解析プログラム (Parallel Protein Information Analysis) を用いて検索した。共通アミノ酸配列が既知のウイルス蛋白やペプチドと相同性がないか National Center for Biotechnology Information の提供する BLAST プログラムを用いて検索を行った。

共通配列を有するファージに対する症例髄液の反応をウエスタンブロット法にて確認し、他の MS 症例や対照症例の髄液や血清では反応しないことを同様にウエスタンブロット法にて確認した。

特異的配列による IgG 吸着

共通アミノ酸配列に対応する IgG がオリゴクローナルバンドを構成しているかどうかを確認するため、gluthathione S-transferase (GST) 融合の合成蛋白を作成し、特異的髄液 IgG の吸着を試みた。用いたアミノ酸配列はオリゴクローナルバンド陽性の症例で、異なる3病期でファージディスプレイを行い確認した配列で EB ウイルスの ZEBRA 蛋白と相同性を有する TDPYQLPFDQSL という配列である。このうち、DPYQLPF の領域が ZEBRA 蛋白と相同であるため、4種類の合成ペプチド〔TDPYQLPFDQSL (WT)、TDPYQL (△C)、PFDQSL (△N)、DPYQLPF (EB)〕を作成して同領域の特異性も検討した。

GST 融合ペプチドをグルタチオンビーズに4℃で3時間反応させて結合させた後、300μl の髄液を4℃で一晩反応させた。遠心してビーズを沈殿させ、上清を用いて上記の方法でオリゴクローナルバンドの測定を行った。

結　果

対照のファージディスプレイと相同性検索

亜急性硬化性全脳炎の症例の髄液からは ALALWSEI というアミノ酸配列が 32クローン中の20クローンで共通配列として同定された。BLAST による相同性の検索により、この配列は麻疹ウイルスの RNA ポリメラーゼと相同性があることが判明した。同様にクリプトコッカス髄膜炎の症例の髄液からは LPPLSA という共通配列が 30クローン中の 12クローンで同定され、BLAST の検索でクリプトコッカスネオホルマンズの N-anthranilate isomerase に相同性があることが判明した。神経梅毒の症例からは KPTPMQMQ という共通配列が 34クローン中の 17クローンで同定され、トレポネーマの flagellar biosynthetic protein と相同性があることが判明した。

MS のファージディスプレイと相同性検索

14例の MS 症例のうち、12例の髄液で 2 種類以上の共通アミノ酸配列が同定された。症例間で共通した配列はなかった。それぞれの共通配列を BLAST でウイルス蛋白を中心に相同性を検索した。相同性を示す頻度の高かったウイルスとして、サイトメガロウイルス（CMV）が 8 例で、1 型単純ヘルペスウイルス（HSV-1）が 7 例で、EB ウイルス（EBV）が 6 例で同定された。髄鞘関連蛋白の相同性も検索したが、1 例でミエリン塩基性蛋白と相同性をしめしたのみであった。異なる 3 病期で検索した症例では、いずれの髄液でも EBV の 3 種類の構成蛋白と相同性を示した。

ウエスタンブロッティングによる検討

それぞれの症例から得られた共通配列を有するファージを用いてウエスタンブロットを行ったところ、すべてのファージは自身の髄液と反応し、バンドを認めたが、異なる症例の髄液では反応を認めなかった。IgG の濃度をそろえた血清を用いて髄液との反応と比較したところ、一部のファージに対しては血清よりも明らかに強い反応が髄液で示された。

EBV との相同性を示した 6 症例の髄液の、EBV 感染 AKATA 細胞（5）の lysate に対する反応をウエスタンブロットで確認した。6 症例中、3 症例の髄液で AKATA 細胞に対する反応が確認された。

IgG の吸着

作成した 4 種類の GST 融合ペプチドに対する髄液の反応を確認したところ、WT、△C、EB は髄液と強い反応がみられ、血清でも弱い反応がみられたが、いずれも △N に対しては反応が見られなかった。したがって、EBV との相同性を示す DPYQLPF の領域が IgG の対応ペプチドであることが確認された。WT、EB の 2 種類の合成ペプチドを髄液と反応させて IgG の吸着を行い、等電点電気泳動法にてオリゴクローナルバンドを測定したが、吸着前とバンドの出現パターンに変化はなかった。

考　察

今回の研究で明らかになったことをまとめると、以下のようになる。(1) SSPE を初めとするオリゴクローナルバンドが陽性の中枢神経感染症患者の髄液 IgG の標的抗原をファージディスプレイ法にて同定することが出来た。(2) 2つ以上の特異的アミノ酸配列が MS 症例 14人中の 12人で同定されたが、患者間で共通した配列は認められなかった。(3) 個々の症例から得られたファージは他の症例の髄液と反応しなかった。(4) 特異的アミノ酸配列のウイルス抗原との相同性を検索した結果、CMV (57%)、HSV-1 (50%)、EBV (43%) の構成蛋白の頻度が高かった。(5) MS の自己抗原として考えられている髄鞘蛋白に関しては、1症例でミエリン塩基性蛋白との相同性を認めたのみであった。(6) 1人の症例は異なる3病期において3種類の同じアミノ酸配列が同定され、いずれも EBV の構成蛋白と高い相同性を有していた。AKATA 細胞を用いたウエスタンブロットで EBV に対する髄液の反応を確認した。(7) 合成ペプチドを用いた髄液 IgG の吸着で、オリゴクローナルバンドを消化することは出来なかった。

これまでの我々の研究では、MS の病態に関連する抗原を同定する事は出来ていない。過去の報告によれば、MS の髄液において麻疹や風疹、帯状疱疹ウイルスに対する抗体価は健常人よりも高いとされ(4)、オリゴクローナルバンドの構成 IgG の主な標的もこれらのウイルスの可能性が指摘されてきた。今回の結果からは、むしろ CMV や HSV-1、EBV など、ヘルペスウイルス属に対する抗体が特異的に増加している可能性が示唆された。これらのウイルスに対する抗体が髄液中で増加することが MS の病態に関与しているかどうかは不明であるが、ヘルペスウイルス属に対する異常な免疫反応が存在している可能性は十分考えられる。また、非特異的に髄液 IgG が増加することで、血中に比較的豊富に存在するこうした普遍的なウイルスに対する抗体が MS の髄液中では同定されやすいのかもしれない。今後は症例を増やして検討するとともに、個々の特異的アミノ酸配列の病態への関与の可能性について詳細に検討していく予定である。

研究協力者：

東北大学大学院医学系研究科神経内科学講座　教授　糸山　泰人
東北大学医学部附属病院神経内科　助教授　藤原　一男
東北大学大学院医学系研究科　藤盛　寿一
東北大学大学院医学系研究科　三須　建郎
東京医科歯科大学医学部ウイルス制御　教授　山本　直樹

参考文献

1. Burgoon, M. P., et al. Antigen discovery in chronic human inflammatory central nervous system disease: panning phage-displayed antigen libraries identifies the targets of central nervous system-derived IgG in subacute sclerosing panencephalitis. J Immunol 167:6009-14. ;2001.

2. Pedersen, N. S., et al. Specificity of immunoglobulins synthesized within the central nervous system in neurosyphilis. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand〔C〕90:97-104.; 1982.
3. Rand, K. H., et al. Improved methods for the application of random peptide phage libraries to the study of the oligoclonal bands in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. J Neurosci Methods 101:131-9.; 2000.
4. Reiber, H.,et al. The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. Mult Scler 4:111-7.;1998.
5. Takada, K., et al. An Epstein-Barr virus-producer line Akata: establishment of the cell line and analysis of viral DNA. Virus Genes 5: 147-56.;1991.
6. Wybo, I., et al. Oligoclonal bands in cerebrospinal fluid detected by PhastSystem isoelectric focusing. Clin Chem 36:123-5.; 1990.

表1　異なる3病期で同じ3種類の特異的アミノ酸配列を示した症例の結果

	(SPxxMH)	(DPYQxP)	(PYxxYQxP)
1999.12	**SPPKMH**	**DPYQVP**	**PYEFYQYP**
	SPKSMH	**GPYQDP**	**PYLNYQHP**
(remission)	**SPPLMH**	**DPYQLP**	
	SPRNMH		
	SPVHMH		
2000.1	**SPRIDH**	**DPYQLP**	**PYTGYQ**
	SPPLMH	**DPYQSL**	**PYAGYQ**
(relapse)		**DPYQVY**	
		DQYQQP	
2000.10	**SPYHSH**	**DYYQQH**	**PYSPYQLP**
	SPRNMH	**DPYQTA**	**PYNLYQTP**
(remission)	**SPGNMH**	**DPYQLP**	**TYGAYQLA**
			PYAHYQPY
	IYYSPSIMHR	**PDPYQLPFA**	**APYQGYQEPP**
	(EBV VP19)	**(EBV ZEBRA)**	**(EBV EBNA6)**

表２　相同性検索により特異的アミノ酸配列と相同性のあった主なウイルス

●は特に相同性の高かったもの

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
EBV	○	●				●	○			○		●		
CMV	○	●			○	○	○					○	○	○
HSV-1		○				○	○		○	○		○		○
HSV-2						○								○
HHV-6														○
VZV					○								○	
ADEV						○	○		○					
HPV									○	○		●		○
VACV						○	○			○			○	

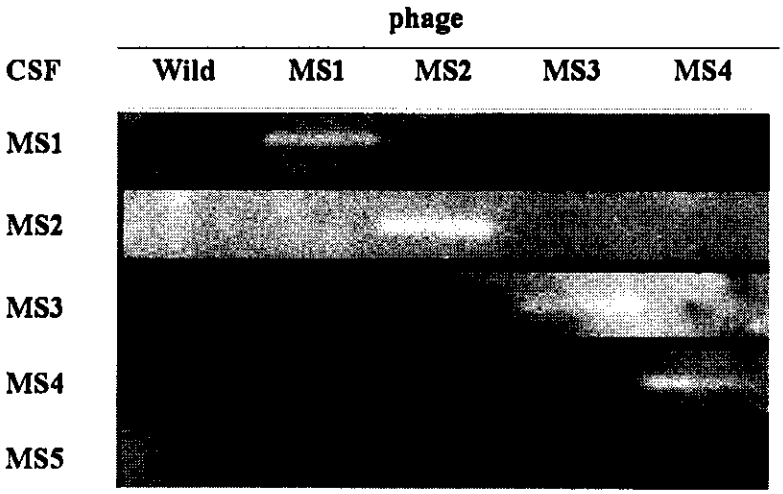


図１　個々の症例の選択されたファジーは他の症例髄液と反応しない

ウエスタンブロットにより、４症例（MS１～４）から得られたファージを５症例（MS１～５）の髄液（CSF）と反応させた。

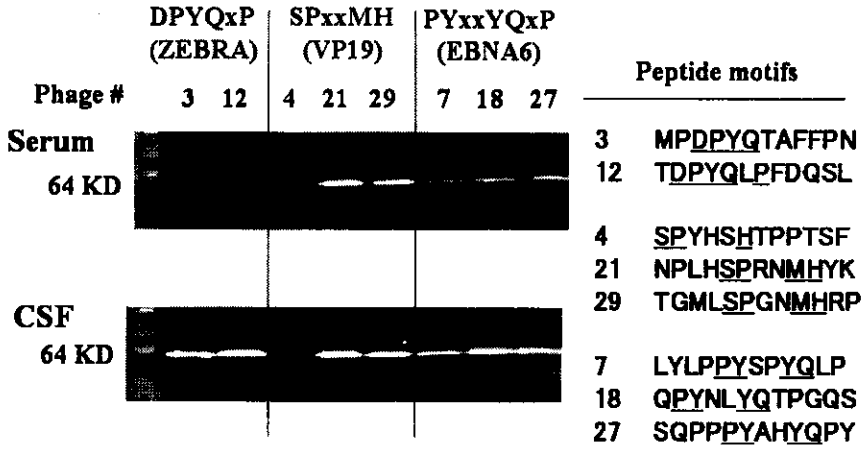


図2　選択されたファージの中には血清よりも髄液でより強く反応するものがある

1症例から得られた特異的配列を有するファージ（#3、12、4、21、29、7、18、27）を同じ症例の血清および髄液と反応させた。

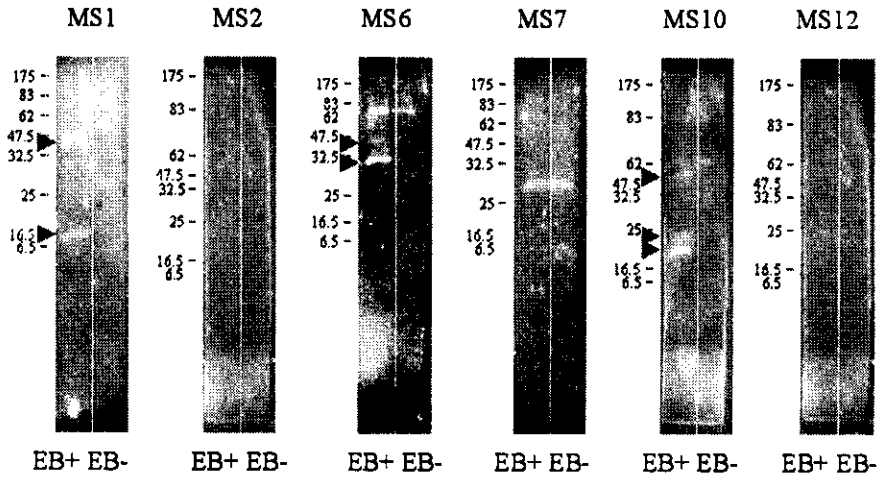


図3　EB ウイルス抗原を発現する AKATA 細胞で特異的なバンドがみられる

EB ウイルスと相同性のみられた6症例の髄液を AKATA 細胞の lysate と反応させたところ、3症例で明確なバンドがみられた。

“What's your name?” や “May I help you?” を聞くあしたのために

日本MS協会会員
MS患者国際委員会担当　坂　野　尚　美

ニューヨークの大学の社会福祉のビルディングは、地下鉄 N・R なら 8th Street で下車。6番のラインなら、Aster place で下車する。南に位置する大学で、都市型キャンパスである。社会福祉の大学院の建物は、Washington Square park の北東のコーナーに位置している。この Washington Square Park には、実はビデオカメラが備え付けられている。薬の売買がなされるためらしい。ニューヨーク大学のそばにはホームレスを支援する組織がいくつかある。ニューヨーク大学の南東方角にある Bowery 地区も、アルコール依存のホームレスの集まる街として有名なところである。2002年9月から入学した私は早速ホームレスの人たちのことをレポートに書くために、ホームレス支援組織に電話でアポイントを取ったり、ホームレスに関する文献調査をした。社会福祉の建物も前には、ホームレスの人たちが「Change, Change!」と学生たちにも声をかけてくる。お金をあげないと「お前たち、社会福祉勉強しているんだろう? 金をくれよ」と嫌味をたっぷりに言ってくる。講義を受けるたびに＄1ずつあげるとしても結構大変なので、私は彼らの話しを聞くことにした。名前を聞き身の上話を私にした彼らは、それから私にはお金をせびらなくなった。きっと心の声を聞いて欲しかったに違いない、と思った。社会福祉のレポートは、ホームレスのことだけではないし、講義も人間行動学、民族文化の問題、グリーケアー、社会福祉調査法、社会福祉政策や社会福祉実習など幅広い分野で行われる。

私はニューヨーク大学病院に通院している。学生は、ニューヨーク大学の学生保険に加入するため、医療費は殆どかからない。(ただし特別な検査や治療を除く。) 薬剤に関しては、もちろん支払わなければならないが、1回おおよそ＄20くらいである。さて、Primary care の医師 (メディカルコーディネーターを兼任) は、私が多発性硬化症 (MS) の専門医 (神経内科医) と潰瘍性大腸炎を診る消化器内科の医師に対し、3ヶ月に一度的確に診察や検査、治療が行われているかを判断してくれる。私達患者は、直接主治医に聞けないことや主治医に不満がある場合なども、このメディカルコーディネーターに言うことが出来る。またどの医師も患者に検査内容、検査結果、薬の効果、副作用について分かりやすく説明してくれる。患者が質問するのを、医師たちが喜んでくれる雰囲気がとてもいい。主治医は、私の MS が進行したために、手や足の筋力が弱っているということで、リハビリテーションも始まった。時間は30分程で、毎回違ったプログラムを提案してくれる。歯科にも通っている。個室で痛みを軽減した治療をしてくれる。まさに私は5人の医師たちに支えられた留学生活である。昨年11月病状が悪化したとき、メディカルコーディネーターの医師が、「今勉強を中断して、休学することは夢をあきらめることじゃないわよ。あなたには未来があるのだから、学校を休むことや勉強を中断することは、未来の

夢を叶えることよ」と言われた。結局病状は治療のおかげで良くなり、前学期はちゃんと終えることが出来た。とても心にしみる台詞だった。日本とアメリカの医療従事者たちとの間に、私の治療については殆ど差がなく、アメリカと日本の医療従事者たちの知識や技術の高さを改めて感じた。

いろいろな人といろいろなことにちゃんと向き合う、机上の勉強だけではなく社会福祉という学問を教えてくれるところ、それがニューヨーク大学。アメリカの社会福祉の分野は、さまざまな諸領域の分野の寄せ集めのような感じがする。それぞれのしたいことを追求していく窓口がいっぱいある。私は、自分が追求したい方向性を模索しながら、一歩ずつ歩んでいきたい。

私がニューヨーク大学に入学できたのも、大学の恩師を始めMS国際連盟や日本MS協会のスタッフたちが推薦状を書いて下さったからだと思う。応援して下さった方々に、心よりお礼申し上げます。ありがとうございました。

あ　と　が　き

本号では平成14年度医学助成金贈呈者による MS 調査研究論文２件と、現在 New York University SM Ehrenkranz School of Social Work にて社会福祉を勉強中の坂野尚美氏からの New York リポートを載せてあります。

日本MS協会の医学顧問団の中でこのところ退職された先生方もおりますので、糸山泰人先生（東北大学医学部神経内科）と田平武先生（国立療養所中部病院・長寿医療研究センター）お二人のご協力を得て、医学顧問団の見直しを行いました。本号掲載の医学顧問団リストは見直し後のもので、新しいメンバーも含まれており、優れた強力な陣容になったものと確信しております。

MS を患って病気療養中のところ急性肺炎を併発し急逝された前田加奈様のご両親（前田長蔵様及びカヨ子様）より多額の寄付金（150万円）を戴きました。ご寄付誠に有り難く感謝申し上げます。ほかからの浄財を含め MS の調査研究のため有効に使用させて頂きますことをお約束いたします。

事務局　**西　村　　康**