

目 次

1. インターロイキン-25 (IL-25) の脳微小血管内皮細胞に対する役割 名古屋大学環境医学研究所神経免疫分野 菌部佳史 ……………	1
2. 脱髄関連因子Kalikrein 6 (KLK6) 活性化と脳血液関門脆弱性に関する研究 旭川医科大学解剖学講座機能形態学分野 板東良雄 ……	4
3. 「平成21年度医学助成について」のおしらせ ……………	9
4. 寄付者ご芳名 ……………	10
5. 日本MS協会役員名 ……………	11
6. 医学顧問団 ……………	13
7. あとがき ……………	17

インターロイキン-25 (IL-25) の 脳微小血管内皮細胞に対する役割

名古屋大学環境医学研究所神経免疫分野 菌部佳史

【緒言】

IL-25はIL-17ファミリーに属するサイトカインで、肺胞マクロファージ、マスト細胞、好酸球などのようなアレルギー反応に関わる細胞により産生される。IL-17AやIL-17Fのような他のIL-17ファミリーサイトカインと異なり、IL-25はナイーブT細胞に作用して、Th2細胞への分化を誘導する。一方で、通常状態のマウスの脳や脊髄においてもIL-25が発現することが報告されている(1)。また、野生型マウスでは多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalo- myelitis: EAE) を引き起こしても致死性ではないが、IL-25ノックアウトマウスにおいては全て死亡することが報告されている(2)。この原因としては、IL-13の誘導低下が挙げられているが、IL-13ノックアウトマウスにEAEを起こしても死亡しないことから、IL-25が直接EAEの発症、重症化に関与している可能性が高い。

我々は、以前に、IL-25が通常状態で脳微小血管内皮細胞により産生されることを見出した。しかし、血液脳関門 (Blood-brain barrier: BBB) の破綻が発症に不可欠であると考えられるMSやその動物モデルであるEAEにおけるIL-25の発現調節については不明である。したがって、本研究では、MS及びEAEの脳微小血管内皮細胞におけるIL-25の発現を調節する条件を明らかにすることを目的とする。

【方法】

本研究では、C57BL/6Jマウスを使用した。全ての動物実験は名古屋大学動物実験委員会の指針に則って行われた。EAEは200 μ g Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)₃₅₋₅₅と等量の結核菌死菌を含む完全フロイントアジュバントでエマルジョンを作製し、それを200 μ lずつ皮下注射し、さらに、感作初日及び2日後に百日咳毒素を200ng投与することにより作成し、感作後0、12、18、25日目に脊髄の凍結切片を作成した。4%パラホルムアルデヒドにより固定後、von Willebrand factor (vWF) 及びIL-25に対する抗体で4°Cで一夜インキュベートし、さらにAlexa 488及びAlexa 568が結合した二次抗体と1時間反応させることにより免疫染色を行った。in vitroにおけるIL-25の発現解析については、脳微小血管内皮細胞株をTNF- α 、IL-17、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6で24時間刺激後RNAを抽出し、リアルタイムRT-PCR法により解析を行った。また、脳微小血管内皮細胞のバリア機能を評価するためにEvan's blue albumin (EBA) を用いた透過性実験を行った。3 μ mの孔径のチャンバー上に単層の脳微小血管内皮細胞を培養し、EBAを加え、培養プレート中に漏出してきた (チャンバーの外側) EBAをプレートリーダーにより630nmで吸光度を測定した (図1)。また、tight junction protein

(occludin、JAM、claudin-5) の発現については、protease inhibitor mixture and a phosphatase inhibitor mixtureを含むTNES buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, and 0.1% SDS]により細胞を溶解し、全抽出液を用いてWestern blottingにより解析を行った。

【結 果】

MOG感作後、0日目、12日目（発症前）において脳微小血管内皮細胞は十分にIL-25を発現していた（約60%）が、18日後（発症のピーク期）、25日後（寛解期）においてはその発現は著しく減少した（約20～30%）。MS患者においても、無傷な部分と比較して、活発に炎症反応が起こっている部位における脳微小血管内皮細胞では、IL-25の発現が有意に減少した。また、脳微小血管内皮細胞株を用いてIL-25の発現について検討したところ、TNF- α 、IL-17、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6はIL-25の発現を減少させた。また、透過性実験において、IL-25はTNF- α により誘導されたバリア機能の低下を有意に抑制した（図2）。さらに、IL-25はoccludin、JAM、claudin-5の発現を誘導し、また、TNF-aにより抑制されたこれら3つのタンパク質の発現を回復させた。

【考 察】

本研究から、IL-25は脳血管内皮細胞において通常状態で発現しており、BBBのバリア機能を維持または保護することが明らかとなった。IL-25ノックアウトマウスにEAEを起こすと死亡することが報告されており(2)、この原因としてBBBのバリア機能の破綻が考えられる。また、本研究から、IL-25の投与が新規のMSの治療法として考えられるが、IL-25はTh2反応を誘導し、アレルギー性の炎症反応を起こすことが報告されているので、脳微小血管内皮細胞におけるIL-25レセプターの発現を上昇させるか又は局所においてIL-25を誘導する条件を探索するなど異なったアプローチが必要であると考えられる。

【結 論】

IL-25は脳微小血管内皮細胞において限局して発現し、tight junctionタンパクの発現誘導を介して血液脳関門を維持又は保護する。

【研究協力者】

錫村 明生

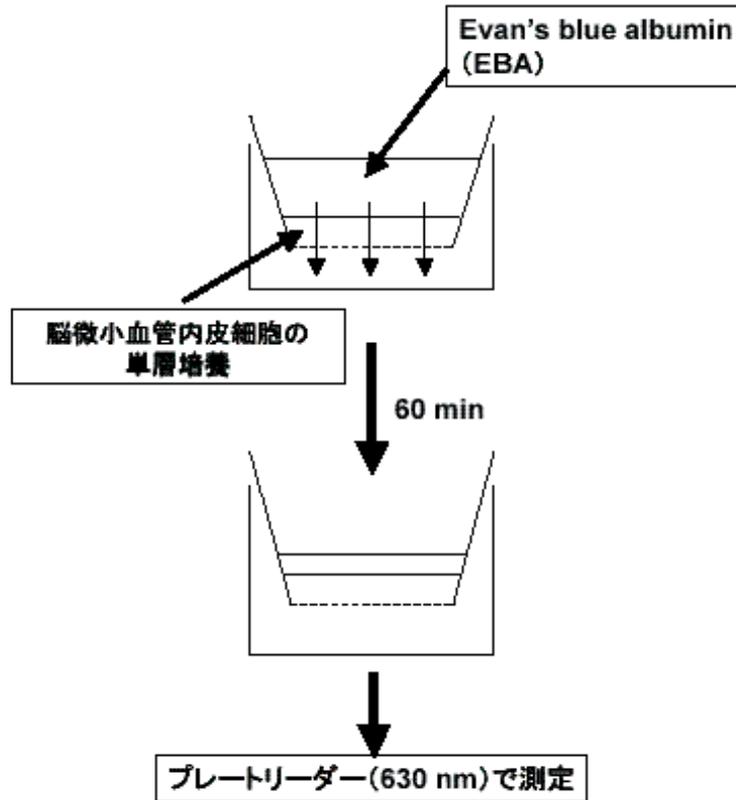
名古屋大学環境医学研究所神経免疫分野教授

【参考文献】

- (1) Pan G et al. Forced expression of murine IL-17E induces growth retardation, jaundice, a Th2-biased response, and multiorgan inflammation in mice. *Journal of Immunology* 167 6559-67 2001.

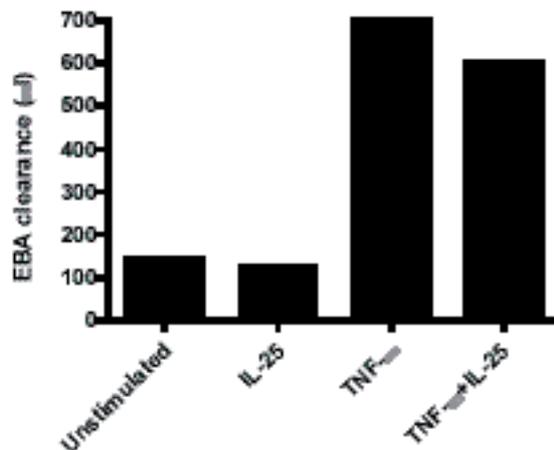
- (2) Kleinschek et al. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation, Journal of Experimental Medicine 204 161-170 2007.

図1 Evan's blue albumin (EBA) を用いた透過性実験の模式図



3 μ mの孔径のチャンバー上に単層の脳微小血管内皮細胞を培養し、EBAを加え、培養プレート中に漏出してきた（チャンバーの外側）EBAをプレートリーダーにより630nmで吸光度を測定した。

図2 IL-25がTNF- α により誘導されたBBBの透過性を抑制する



脳微小血管内皮細胞株であるMBEC4をTNF- α (50ng/ml)、IL-25 (50ng/ml)またはその両方によりを加えた。EBAをチャンバー上加え、1時間後にチャンバー外に漏出してきたEBAの量を測定した。

脱髄関連因子Kalikrein 6 (KLK6) 活性化と 脳血液関門脆弱性に関する研究

旭川医科大学解剖学講座機能形態学分野 板 東 良 雄

【目 的】

我々の教室で見出した細胞外プロテアーゼKLK6は中枢神経系に特異的に発現するカリクレインファミリーに属する因子であるが¹⁾、マウスEAEモデルや脊髄損傷モデルでは、脱髄時をピークとしてオリゴデンドロサイトからKLK6が分泌されることを現在までに明らかにしてきた^{2), 3), 4)}。また、KLK6がミエリン構成蛋白質であるMBPを分解する活性を持つことが報告されており^{5), 6)}、KLK6が多発性硬化症における脱髄のターゲット分子になる可能性が示唆されている。そこで、我々はKLK6 KOマウスを作成し、EAEモデルにおけるKLK6の役割を明らかにすることを目的とした。

【方 法】

(1) 実験モデル(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE)の作成と臨床的評価:
C57BL/6マウスを背景にもつ野生型(wild-type, KLK6+/+)とKLK6 KOマウス (KLK6-/-) を用いて、アジュバンドに混濁したペプチド (myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55: MOG35-55) の皮下注射および百日咳トキシンの腹腔内投与による免疫により、ヒト多発性硬化症様の症状を発症させ、臨床的評価を行った。症状の程度は以下のようにスコア化した (0:症状なし 1:尻尾の緊張消失 2:片側下肢の麻痺 3:両側下肢の麻痺 4:自力歩行不可 5:致死)。

(2) 組織学的検討

EAE発症ピーク時のマウスを4%PFAにて固定し、脊髄を摘出し、30%シュクロースに置換した後、ドライアイスにて急速に凍結した。凍結切片はクリオスタットを用いて作成し、髄鞘染色(LFB/CV染色)および蛍光抗体を用いた蛍光2重染色法によって組織学的に検討した。使用した1次抗体は抗CD45抗体 (serotec) および抗F4/80抗体 (BMA) を用いた。2次抗体にはAlexa-488抗体 (Molecular Probes) を用いて検出した。各切片の解析は蛍光顕微鏡 (ECLIPSE 80i, Nikon) を用いて行った。

(3) 血液脳関門破綻の評価

免疫後10-12日後の尾静脈からEvans Blueを注入し、2時間後に脊髄を取り出し、Evans Blueの脊髄への取り込みを吸光計にて測定し、定量化した。

【結 果】

(1) KLK6がEAE発症に及ぼす影響

KLK6+/+マウスおよびKLK6-/-マウスをMOGペプチドにて免疫し、EAEを発症させたところ、KLK6-/-マウスにおいてEAE発症が遅延し、症状も軽減した（図1）。次にEAE/CV染色を行い、髄鞘染色を行ったところ、臨床症状と一致した形態学的変化が認められた。つまり、KLK6+/+マウスではEAE発症により、脊髄白質において脱髄が認められたが、KLK6-/-マウスでは脱髄が抑制されていた（data not shown）。さらに、抗CD45抗体および抗F4/80抗体を用いた蛍光2重染色によってKLK6+/+マウスではEAE発症時に炎症細胞の脊髄内への浸潤やマイクログリア/マクロファージの集積が認められたが、KLK6-/-マウスではこのような現象が認められなかった（図1）。

(2) Evans Blueによる血液脳関門（BBB）破綻の評価

図1において、KLK6-/-マウスではEAE発症が少し遅延したことから、炎症細胞の脊髄内への浸潤にKLK6が影響を及ぼす可能性が考えられたため、BBB破綻について検討した。KLK6+/+マウスではEvans Blueの色素が脊髄に浸透し、脊髄が青色を呈しているが、KLK6-/-マウスでは青色を呈していなかった（図3A）。一方、腎臓はKLK6+/+, KLK6-/-マウスともに青色を呈していることから、KLK6-/-マウス脊髄におけるBBB破綻が抑制されていることが示唆された。実際、腎臓におけるEvans Blueの吸光度に対する相対値で定量化したところ、KLK6-/-マウスでBBB破綻が抑制されていることが明らかとなった（図3B）。

【考 察】

本研究において、KLK6-/-マウスではEAE発症が遅延し、症状が軽減することが明らかとなった。KLK6がMBPといったミエリン構成蛋白質を分解する活性をもつことから、KLK6の発現抑制が脱髄やオリゴデンドロサイトの細胞死を抑制した可能性が考えられる。また、KLK6-/-マウスでは脊髄内への炎症細胞の浸潤が抑制されていたが、これはBBBの破綻が抑制されていたことに起因すると考えられた。BBBの破綻に関係する分子はいくつか報告されているが、KLK6がこのような因子に影響を及ぼすか否かについては今後検討していく必要がある。

以上のことから、オリゴデンドロサイトから分泌されるKLK6は病変周囲の炎症細胞やグリア細胞に影響を及ぼし、炎症細胞の中枢神経内への浸潤を促すことによって脱髄病変を増悪させる可能性が示唆された。今後、ヒト多発性硬化症患者での発現検討を含め、KLK6をターゲットとした多発性硬化症治療法開発が可能か否かについて検討していきたい。

最後に平成20年度助成金を贈呈して頂きましたこと、この場を借りて心より御礼申し上げます。また、多発性硬化症根治療法開発に向けて微力ながら貢献して参りたいと考えておりますので、今後ともご指導賜りますよう、よろしくお願い申し上げます。

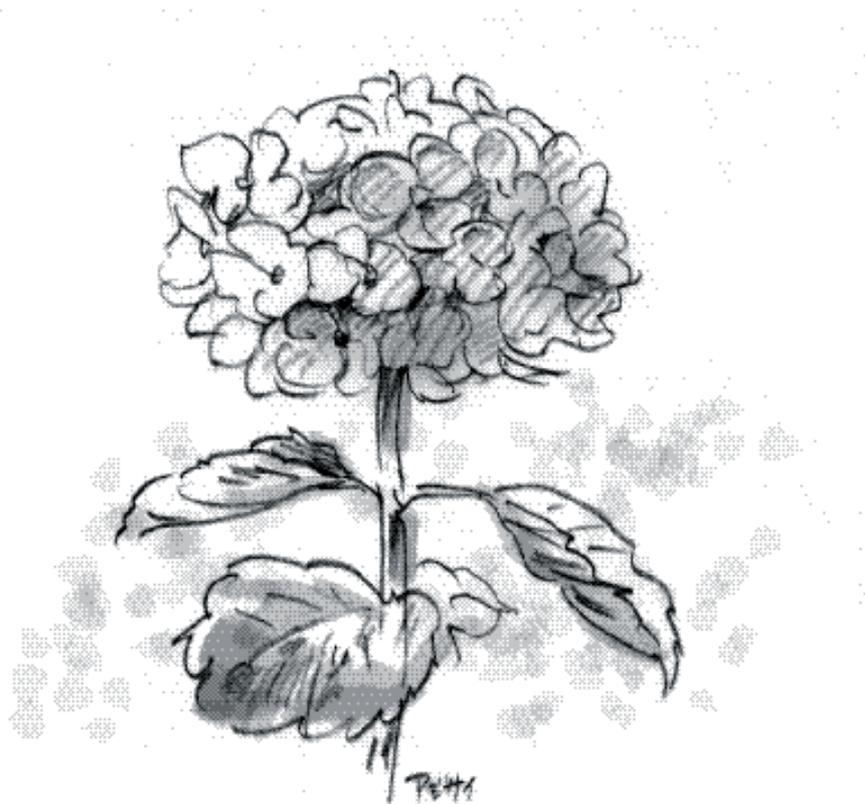
【研究協力者】

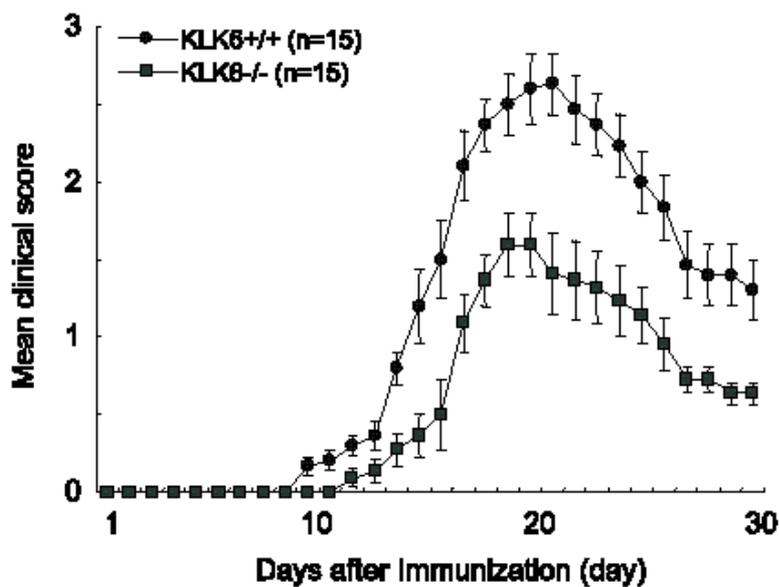
旭川医科大学医学部解剖学講座

教授 吉田成孝

【参考文献】

- 1) Yamanaka H. et al. Protease M/neurosin mRNA is expressed in mature oligodendrocytes. Mol Brain Res. 71: 217-224, 1999
- 2) Terayama R. et al. Differential Expression of neurosin and protease M/neurosin in oligodendrocytes after injury to the spinal cord. Glia 48: 91-101, 2004
- 3) Terayama R. et al. Differential expression of protease M/neurosin in oligodendrocytes and their progenitors in an animal model of multiple sclerosis. Neurosci. Lett. 382: 82-87, 2005
- 4) Bando Y. et al. Implications of protease M/neurosin in myelination during experimental demyelination and remyelination. Neurosci. Lett. 405: 175-180, 2006
- 5) Blaber SI. et al. Enzymatic properties of rat encephalon-specific protease. Biochemistry 41: 1165-1173, 2002
- 6) Scarisbrick IA. et al. Activity of a newly identified serine protease in CNS demyelination. Brain 125: 1283-1296, 2002





	Incidence	Mortality	Day of onset	Mean max grade
KLK6 +/+	15/15	-	12.2 ± 0.5	2.7 ± 0.2
KLK6 -/-	15/15	-	15.7 ± 0.6*	1.9 ± 0.2*

*P < 0.01 vs WT mice.

図1 KLK6 KOマウスにおけるEAE発症

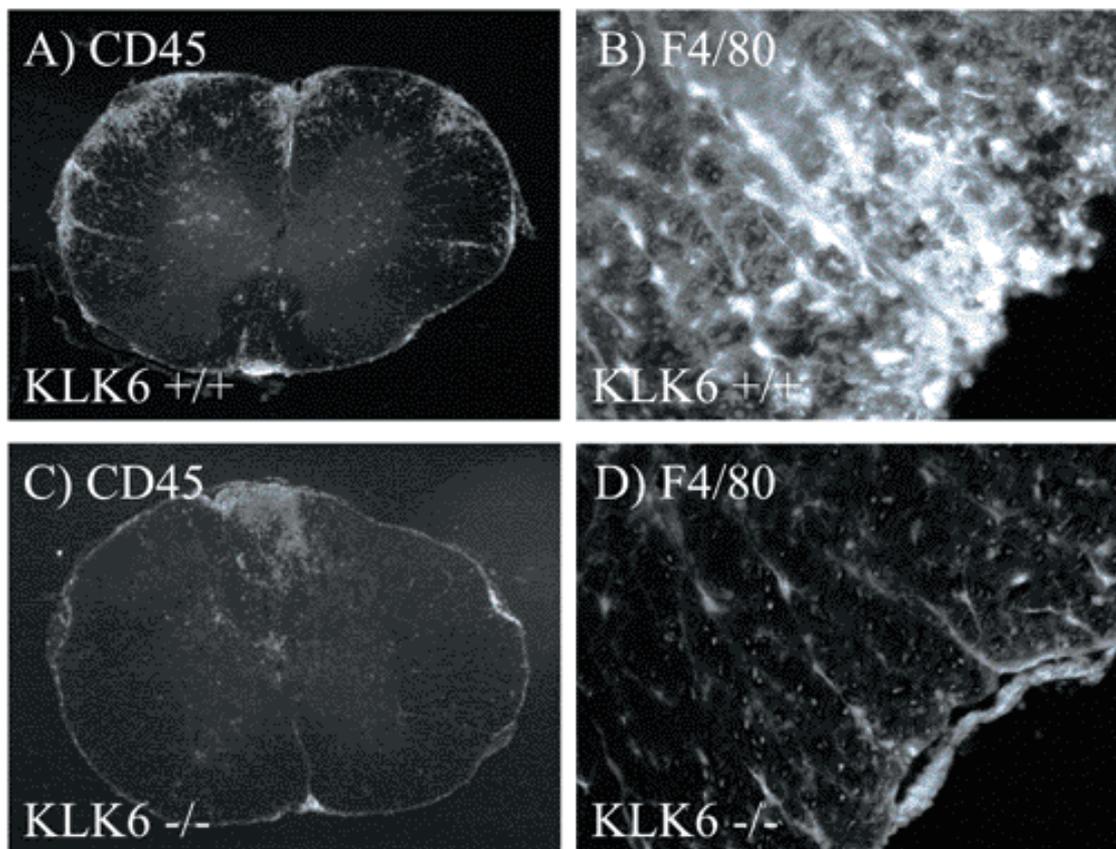


図2 EAE発症ピーク時の脊髄におけるCD45およびF4/80染色

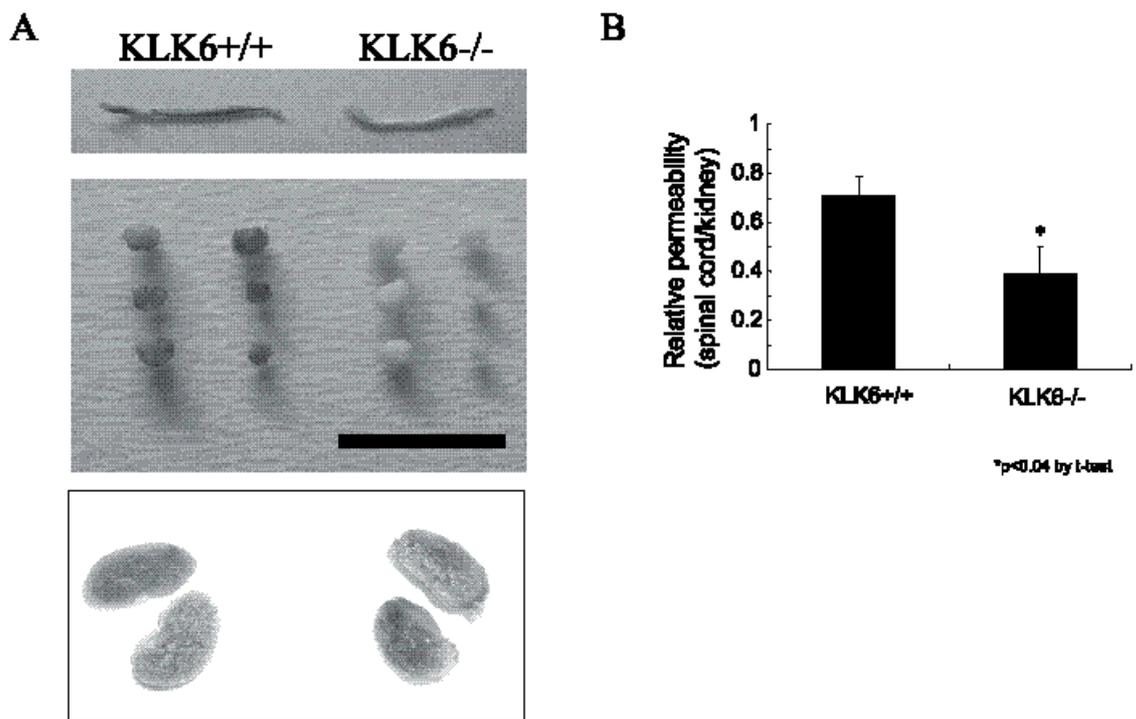


図3 Evans BlueによるBBB破綻の評価

A: Evans Blue注入後、取り出された脊髄および腎臓 B: 脊髄におけるEvans Blue色素の定量化 脊髄から色素を溶出し、吸光度を測定し、定量化した。



「平成21年度医学助成について」のお知らせ

日本多発性硬化症協会は下記の要領で医学助成を行います。

- (1) 助成対象は多発性硬化症（MS）に関する基礎または臨床研究とします。
- (2) 助成金は合計100万円とし、件数については2件以内とします。
（但し、金額及び件数については、本協会の財政等の状況を踏まえ、適宜見直しを行います。）
- (3) 応募資格
MS の基礎または臨床研究に従事する若手研究者を対象とします。
- (4) 応募方法
応募者は所定の申請書に必要事項をコンピューターかワープロで記入し（手書きの場合は楷書のこと）、下記の事務局へ郵送して下さい。申請書は事務局へご請求ください。
〒111-0042 東京都台東区寿4-1-2
私書箱 東京浅草28
日本多発性硬化症協会事務局
問い合わせ先 電話 (03)3847-3561、FAX (03)3843-2229
- (5) 申請受付期間
平成21年7月1日から31日までとします。
- (6) 審査方法及び通知
選考委員会で審査のうえ、9月初めにその結果を申請者に書面により通知いたします。
- (7) 平成21年度助成金交付日
9月1日以降可及的速やかに行います。

寄付者ご芳名

日本MS協会の活動は下記の方々のご支援により行なわれています。

(平成20年度賛助会員及び寄付者)

(アイウエオ順、敬称略)

法 人

アスピオファーマ株式会社
財団法人 化学及血清療法研究所
杏林製薬株式会社
株式会社三栄コーポレーション
帝人ファーマ株式会社
東京電力株式会社
東北電力株式会社
株式会社ニフコ
バイオジェン・アイデック・ジャパン株式会社
バイエル薬品株式会社
株式会社ベヒーユニバース
株式会社ユアテック

個 人

荒井好民
和泉国夫
菊地清明
篠木絵理
中西康晴
西村康
坂野尚美
堀井功
水谷裕之
山村道子
横尾與蔵

あ　と　が　き

前任の西村に代わりまして、昨年10月より事務局を預からせていただいております相田長利と申します。まだまだ暗中模索状態で仕事をさせていただいておりますが、皆様に迷惑をかけるようなことのないように頑張りたいと思いますのでどうぞ宜しくお願い申し上げます。今回のニュースレターの準備にしても、仕事が後手後手に回ってしまい、論文の原稿依頼にしても両先生方に十分な時間を差上げられず、大変失礼いたしました。このニュースレターに限らず何かお気づきの点がありましたら、どうぞ何でもお申し付けください。また、ニュースレターへの投稿もお待ち申し上げます。皆様とのコミュニケーションの場としてこの冊子が機能出来れば大変ありがたいことと思います。

事務局　相　田　長　利