

|             |                                                                                                                                                                                                           |             |             |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|
| 氏 名         | オウ<br>王                                                                                                                                                                                                   | カイ<br>会     | ウン<br>云     |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                                 |             |             |
| 学 位 記 番 号   | 論 医 博 第 1869 号                                                                                                                                                                                            |             |             |
| 学位授与の日付     | 平 成 16 年 9 月 24 日                                                                                                                                                                                         |             |             |
| 学位授与の要件     | 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当                                                                                                                                                                                   |             |             |
| 学 位 論 文 題 目 | Chemokine receptors associated with immunity within and outside the central nervous system in early relapsing-remitting multiple sclerosis<br>(早期再発寛解型多発性硬化症患者における中枢神経系内外の免疫状態に関連するケモカイン受容体について)<br>(主 査) |             |             |
| 論文調査委員      | 教 授 長 澤 丘 司                                                                                                                                                                                               | 教 授 三 森 経 世 | 教 授 福 山 秀 直 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

多発性硬化症 (MS) は慢性で再発性の経過を示す中枢神経系の炎症性脱髄疾患である。主な病理学的変化は中枢神経系の多発性脱髄病巣の形成と病変部位の免疫細胞の浸潤であるが、T helper 1 (Th1) 細胞は MS の病態形成に重要な役割を果たしていると推定されている。ケモカインとケモカイン受容体は、脱髄病巣を形成する免疫細胞が末梢血から中枢神経内の病変部位へ遊走する際に重要であり、CCR5 と CXCR3 が Th1 細胞に、CCR3 と CCR4 が Thelper 2 (Th2) 細胞に特異的に発現されることが最近明らかにされた。本研究では、これらのケモカイン受容体が末梢血と髄液リンパ球でどのように発現されているかを解析することにより、MS 患者の中枢神経内外での Th1/Th2 バランスを含めた免疫病態を明らかにすることを試みた。

本研究の目的を達成するために、罹病期間 5 年以内の比較的早期の再発寛解型 (RR) MS 患者 34 名 (男 : 女 = 12 : 22) を対象とした。これらの患者について、臨床的増悪または MRI 画像においてガドリウム (Gd) 造影病巣の存在する活動期に 33 回、症状が安定し、MRI 造影病巣も検出されない非活動期に 12 回の解析を施行した。対照群として健常人 12 名 (男 : 女 = 3 : 9) を検索した。髄液と末梢血は同日に採取し、末梢血は比重遠沈法により単核球を得、髄液は 4℃ で低速遠沈して髄液細胞を得た。リンパ球に発現するケモカイン受容体と他の表面抗原は以下の FITC および PE 標識モノクローナル抗体の組み合わせで二重染色を行い、フローサイトメトリーにより蛍光陽性細胞を算定した (CD4/CCR3, CCR4/CD4, CD4/CCR5, CD8/CCR5, CXCR3/CD4, CXCR3/CD8, CD20/CD2, CD3/CD8, CD4/CD25, CD4/CD26, CD4/CD29, CD4/CD45RA, CD8/CD11a)。IgG index と中枢神経内 1 日 1 gG 産生量は Tourtellotte らの方法で算出した。

検索の結果、活動期 MS 末梢血では、非活動期に比して CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>Th1 細胞と CD4<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>helper inducer T 細胞の有意の増加が認められた。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞は活動期と非活動期ともに対照群に比して有意に増加していた。対照的に CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>Th2 細胞は活動期と非活動期ともに対照群より有意の減少が認められた。さらに、CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>Th1 細胞の存在率は、MRI 上 Gd 造影病巣数及び CD4<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>細胞存在率と有意の正相関が認められた。一方、活動期 MS の髄液では、髄液細胞数、IgG index が増加し、CD8<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>細胞は有意に減少した。髄液 CD8<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>細胞存在率は細胞数及び中枢神経内 1 日 1 gG 産生量と負の相関を示した。髄液では末梢血に比して CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>Th2 細胞はより少数であり、対照的に CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>及び CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>Th1 細胞が優勢であった。

以上の結果より、MS 病巣形成に関与する末梢血側の免疫の主役は CD29 あるいは CXCR3 を発現した CD4 陽性 Th1 細胞であると推定される。さらに、IFN- $\gamma$  や IL-2 を主に産生し、また B 細胞からの免疫グロブリンの産生を促進することが、helper inducer cell と従来呼称されてきた CD29 陽性の CD4 細胞の大部分が CXCR3 陽性であることがら、近年再び重要視されつつある液性免疫を介した病態へも関与している可能性が示唆された。また、末梢血 CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>Th2 細胞は活動期・安定期を問わず健常人よりも減少していたことから、MS では Th1 型免疫反応への偏倚が恒常的に存在することを示しており、活動期 MS 髄液中では同分画はさらに小規模な集団であることを考え合わせると、中枢神経内の免疫反応も Th1 側へ大きく傾いていることが判明した。一方、中枢神経内における疾患抑制因子としては、活動期 MS 髄液中では

減少している CXCR3 陽性 CD8 細胞が重要である可能性が示唆された。したがって、共通の CXCR3 を発現した CD4 及び CD8 細胞が MS の病態については末梢血側と中枢神経系で全く異なる方向で機能している可能性が明らかにされた。MS 治療の標的として CXCR3 は抗体製剤等による治療法の対象となり得ると考えられるが、CD4 および CD8 肺胞における同抗原陽性分画の拮抗的機能を考慮すると、MS 動物モデル (EAE) における CXCR3 治療や CXCR3 のリガンドに対する治療の試み等を経た慎重な検討が必要である。

#### 論文審査の結果の要旨

中枢神経系 (CNS) の炎症性脱髄疾患である多発性硬化症 (MS) では、CNS 内での病的過程と、その外側 (末梢血・リンパ節) での機序が異なっている可能性がある。そこで、Th1/Th2 バランスを含めた免疫病態の相違の有無を明らかにするため、Th1 細胞が発現するケモカイン受容体 CCR5 と CXCR3、Th2 細胞が発現する CCR3 と CCR4 を中心にリンパ表面抗原の発現パターンをフローサイトメトリーを用いて解析し、末梢血と髄液で比較検討することを試みた。早期再発寛解型 MS 患者 34 名と健常人 12 名を対象とした。

その結果、活動期 MS 末梢血では、非活動期に比して CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>Th1 細胞と CD4<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>helper inducer T 細胞が増加していた。対照的に、末梢血 CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>Th2 細胞は活動期・非活動期ともに対照群より低下していた。さらに、CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>Th1 細胞存在率は、MRI 上の造影病巣数及び CD4<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup> 細胞存在率と有意の正相関を示した。一方、活動期 MS 髄液では、CD8<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> 細胞存在率が低下しており、髄液細胞数及び CNS 内 1 日 IgG 産生量と負の相関を示した。髄液では末梢血に比して CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>Th2 細胞はより少数であり、対照的に、CCR5 および CXCR3 陽性 Th1 細胞がより優勢であった。

以上の結果より、MS 病巣形成に関与する末梢血側の免疫の主役は CD4<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>あるいは CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>Th1 細胞であると推定された。また、CNS では MS の病期を問わず Th1 応答が優位であった。他方、CD8<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> 細胞は CNS 内において疾患制御的に働いている可能性が示唆され、同一受容体 CXCR3 を発現した CD4 及び CD8 細胞が CNS 内外では MS 発症に対して相反する役割を担っている可能性が示唆された。

以上の研究は多発性硬化症の免疫病態の解明に貢献し今後の多発性硬化症の新規治療法開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 16 年 7 月 30 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。