

200935065A

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

炎症性 Th17 細胞を標的とする免疫性神経疾患
の画期的診断・予防・治療法開発に関する研究
(H21-こころ-一般-018)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 村 隆

平成22年（2010年）3月

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

炎症性 Th17 細胞を標的とする免疫性神経疾患
の画期的診断・予防・治療法開発に関する研究
(H21-こころ-一般-018)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 村 隆

平成22年（2010年）3月

目 次

I. 総括研究報告

■炎症性Th17細胞を標的とする免疫性神経疾患の画期的診断・予防・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 山村 隆 1

II. 分担研究報告

■多発性硬化症におけるMAIT細胞に関する研究

国立精神・神経センター神経研究所 三宅 幸子 5

■核内受容体を標的とした自己免疫疾患制御法の探索に関する研究

国立精神・神経センター神経研究所 大木 伸司 8

■ヒトTh17細胞解析に基づく新規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 荒浪 利昌 11

■遺伝子発現プロファイルから見たT細胞活性化に対するIFNβの効果

明治薬科大学薬学部バイオインフォマティクス 佐藤 準一 13

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 23

IV. 研究成果の刊行物・別刷 27

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書

炎症性 Th17 細胞を標的とする免疫性神経疾患の画期的診断・予防・治療法開発に関する研究

研究代表者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部部长

研究要旨

インターロイキン 17 (IL-17) を産生する Th17 細胞は、強い炎症惹起能を有し、多発性硬化症 (MS) や視神経脊髄炎 (NMO) などの病態に深く関わる。本研究では Th17 細胞および IL-17 産生細胞の表現型および機能的性状を明らかにし、得られた情報を免疫性神経疾患の診断・予防・治療に応用することを目標としている。初年度は MS 患者 T 細胞の発現する転写因子 NR4A2 の研究、および Th17 細胞制御能の有するレチノイン酸化合物 Am80 による治療実験において成果が挙げられた。我々は NR4A2 は T 細胞の炎症性サイトカインの産生に関与することを報告して来たが (PNAS 2008)、今回 Th17 細胞の IL-17 産生に必須の転写因子であることが明確になり、同分子の発現を制御することによって、様々な炎症病態が抑制されることも明らかになって来た。Am80 は MS の動物モデル EAE に対する治療効果を示す。本年度は、Am80 がマウス実験的自己免疫性ブドウ膜炎モデル (EAU) にも有効であり、局所における制御性リンパ球の誘導、炎症細胞の排除などの機序を介する可能性を示した。以上の成果は、新規治療法の開発につながるものであるが、その基盤整備 (遺伝子改変マウス開発など) においても進展があった。

研究分担者

三宅幸子 国立精神・神経センター 室長
大木伸司 国立精神・神経センター 室長
荒浪利昌 国立精神・神経センター 室長
佐藤準一 明治薬科大学薬学部バイオ
インフォマティクス 教授

A. 研究目的

多発性硬化症 (MS) は自己反応性 T 細胞や B 細胞が中枢神経組織障害を起こす自己免疫疾患で、T 細胞研究の成果は新規治療法の開発に直結する。従来、インターフェロン γ 産生性 Th1 細胞が炎症惹起 T 細胞であり、IL-4 を産生する Th2 細胞がそれに拮抗するというモデルが信奉されて来た。しかし、2003 年に IL-17 産生性 Th17 細胞が発見され、このドグマに対する疑義が公然と議論されている (Nat Med13:139, 2007)。研究の進展は早く、Th17 細胞誘導条件 (IL-6 + TGF- β) の同定 (Nature441:235, 2006) や転写因子 ROR \cdot t の同定 (Cell 126:1121, 2006) などのブレイクスルーがあったが、興味ある問題は尽きない。本研究の目的は、Th17 細胞の免疫性神経疾患における役割を明らかにし、同細胞を標的とする画期的な診断・予防・治療法を開発することにある。申請者らは、ヒト Th17 細胞を特徴づけるケモカイン受容体同定 (J. Immunol. 178: 7525, 2007)、レチノイン酸受容体 (RA) の合成リガンド Am80 の Th17 細胞抑制効果の証明、Th17 細胞機能に関わる転写因子 NR4A2 の同定、NR4A2 を抑制する siRNA による MS の動物モデル抑制効果の証明 (PNAS 105: 8381, 2008)、Th17 細胞と腸内細菌の相互関係の証明 (Am J Pathol

173:1714, 2008) など、この領域で数々の成果を挙げている。Th17 細胞特異的治療薬の開発では、ROR \cdot t を標的とする治療薬開発や抗 IL-17 抗体の導入などの試みがあるが、本研究では 1) ヒト Th17 細胞を用いた治療標的探索、2) 転写因子 NR4A2 を標的にする診断・治療法開発、3) Am80 の臨床応用、4) 腸内細菌による Th17 細胞修飾に関する基盤研究、を推進する。

本年度は上記 2) および 3) に関連する研究でまとまった成果が挙げられた。

B. 研究方法

NR4A2 の Th17 機能修飾機序の解析のため、NR4A2 の conditional knockout マウスを確立する。

NR4A2 特異的 siRNA の基本骨格の改変等により Drug delivery system の最適化を図る。

改良型 siRNA を用いて、EAE および EAU (ブドウ膜炎) の治療実験を行い、NR4A2 阻害の治療効果を総合的に評価する。また、分子モデリングにより、NR4A2 の既知アゴニストの修飾によるアンタゴニスト開発を試みる。さらに NR4A2 アンタゴニストと予測される分子を複数合成し、EAE の治療実験を行う。

Am80 による治療実験は、原則として *Am J Pathol* 174:2234-2245, 2009 に詳細した方法を用いた。EAE の誘導は MOG35-55 ペプチド、EAU の誘導は IRBP1-20 の感作によって C57BL/6J (B6) マウスに誘導した。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験に関しては、国立精神・神経センター神経研究所の動物実験規定に従って作成した実験計画書の承認を受けて行った。

C. 研究結果

NR4A2 conditional knockout マウスの作製に成功し、各種マウスとの交配を開始した。

ナイーブ T 細胞から Th17 細胞を誘導する実験系において、NR4A2 siRNA の添加によって IL-17 産生が完全に阻害されることが明らかになった。他方、EAE の脳病変部位から分離した T 細胞を磁気分離によって IL-17 および IFN- γ の産生能に基づいて分離し、NR4A2 mRNA 発現を RT-PCR によって測定した結果、IL-17 細胞のみが NR4A2 を発現していることを確認した。以上の結果から、NR4A2 は炎症性サイトカインである IL-17 産生において決定的な役割を果たし、NR4A2 を標的とする治療法が開発できる可能性が示唆された。

ナイーブ T 細胞から Th17 細胞を誘導する実験系において、Am80 は Th17 細胞の誘導を抑制し、同時に foxp3+ 制御性 T 細胞を誘導することが明らかになった (*Am J Pathol* 174 : 2234-2245, 2009)。それに呼応して、Am80 の予防的投与は EAE の発症を有意に抑制し、治療的投与も有効であった。治療を受けた EAE 発症マウスの脳内浸潤細胞では、ROR \cdot t などの転写因子の発現抑制が見られ Th17 細胞機能の抑制に対応するものと考えられた。しかし、foxp3+ 制御性細胞の増加は確認できなかった。EAU においても EAE と同様、Am80 の予防・治療効果が確認され、この実験系では炎症局所における foxp3+ 制御性細胞の増加も確認できた。Am80 の治療的投与による局所炎症細胞の減少は著明で、Am80 には炎症を能動的に標的臓器外に送り出す未知の作用があることが予想された。

D. 考察

本年度は NR4A2 が Th17 細胞の機能分子 IL-17 の産生を制御する分子であることを明確にし、NR4A2 を標的とする新薬の開発が有望であることを示した。NR4A2 は中枢神経系のグリア細胞や中脳黒質ニューロンにおいても発現しているが、T 細胞発現に着目して研究を続けているのは、われわれの研究グループに限られているようである。NR4A2 機能を修飾する低分子化合物の中から、MS や NMO の画期的な治療薬が同定される可能性が期待され、現在、研究を進めている (公表準備中)。NR4A2 が支配する免疫制御因子は IL-17 の他にも存在するので、分子間ネットワークを詳細に解析して、NR4A2 アゴニスト、あるいはアンタゴニストの免疫修飾効果を予測し、かつ動物モデルで確認する作業を進めているところである。

Am80 は既に市販されている合成レチノイドであるが、Th17 細胞と制御性 T 細胞の reciprocal な誘導を促す効

果が証明された他、炎症細胞を排除するという未知の作用も証明することができた。

E. 結論

Th17 細胞の表現型および機能的特性を明確にし、免疫性神経疾患の治療や予防に役立てようという試みは、Th17 細胞における NR4A2 機能の意義付けとその応用という方面からのアプローチが成功を納めつつある。この研究を大きく発展させるための遺伝子改変マウスの開発も順調に進んでいる。次年度以降は、ヒト Th17 細胞解析、遺伝子ネットワーク解析などの面からも、新たな展開が期待できる。

免疫性神経疾患における Th17 細胞の役割について、さまざまな研究が進められているが、Th17 細胞を特異的に制御する治療法の開発に向けて、有望な知見が得られつつあり、来年度以降の各分担研究者の研究の発展により、大きな成果が期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Satoh, J.I., H. Tabunoki, and T. Yamamura: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. *Mult Scler* 15:531-541, 2009
2. Klemann, C., B.J.E. Raveney, A.K. Klemann, T. Ozawa, S. von Hörsten, K. Shudo, S. Oki and T. Yamamura: Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates EAE. *Am J Pathol* 174 : 2234-2245, 2009
3. Theil, M.M., S. Miyake, M. Mizuno, C. Tomi, J.L. Croxford, H. Hosoda, J. Theil, S. von Hoersten, H. Yokote, A. Chiba, Y. Lin, S. Oki, T. Akamizu, K. Kangawa, and T. Yamamura: Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by Ghrelin. *J Immunol* 183: 2859-2866, 2009
4. Fujita, M., T. Otsuka, M. Mizuno, C. Tomi, T.M. Gallagher, T. Yamamura, and S. Miyake: Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates experimental autoimmune encephalomyelitis via iNKT cell-dependent mechanism. *Am. J. Pathol.* 175: 1163-1123, 2009

5. Klemann, C., B. Raveney, S. Oki, and T. Yamamura: Retinoid signals and Th17-mediated pathology. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* 32: 20-28, 2009
6. Croxford, J.L., and T. Yamamura: Back to the future for multiple sclerosis therapy: Focus on current and emerging disease-modifying therapeutic strategies. *Immunotherapy* 1: 403-424, 2009
7. Miyake, S., and T. Yamamura: Ghrelin: friend of foe for neuroinflammation. *Discov Med* 8: 64-67, 2009
8. 大木伸司, 山村 隆: 多発性硬化症の病態形成とオーファン核内受容体 NR4A2. *臨床免疫・アレルギー科* 52: 111-118, 2009
9. 宮崎雄生, 山村 隆: NKT 細胞と自己免疫. *医学のあゆみ (最新・自己免疫疾患 Update -研究と治療の最前線)* 3230: 651-656, 2009
10. 大木伸司, 山村 隆: 多発性硬化症の病態解析から治療標的の同定へ. *Jpn J Clin Immunol* 32: 214-222, 2009
11. 山村 隆, 横手裕明, 三宅幸子: 腸内細菌と自己免疫. *Current Insights in Neurological Sciences* 17: 10-11, 2009
12. 山村 隆: 多発性硬化症. 連載 サイトカインと炎症性疾患・自己免疫疾患 —その病態における役割と治療展開-. *炎症と免疫.* 18: 87-91, 2010
5. Aranami T, Sato W, Yamamura T: Small heat shock protein α B-crystallin, a candidate autoantigen in multiple sclerosis. Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS), San Francisco, 6.13, 2009
6. Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H, Yamamura T: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. The 8th International Workshop on Advanced Genomics. Tokyo, 6.17, 2009
7. Okamoto T, Ogawa M, Lin Y, Murata M, Takahashi T, Fujihara K, Yamamura T: Warning against interferon-beta treatment for anti-aquaporin-4 antibody positive neuromyelitis optica. Dusseldorf, Germany, 9.10, 2009
8. Raveney BJE, Oki S, and Yamamura T: Expression of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for IL-17 production by TH17 cells. 2nd European Congress of Immunology, Berlin, Germany, 9.15, 2009
9. 佐藤準一, 天竺桂弘子, 山村 隆: MS 脳病巣プロテオームの分子ネットワーク解析. 第50回日本神経学会総会. 仙台, 5.20, 2009
10. 佐藤和貴郎, 荒浪利昌, 富田敦子, 山村 隆: MMP9を高発現するCCR2陽性CCR5陽性細胞の多発性硬化症における重要性. 第37回日本臨床免疫学会, 東京, 11.13, 2009
11. 宮崎雄生, 三宅幸子, 山村 隆: ヒト末梢血における mucosal associated invariant T細胞に関する研究. 第37回日本臨床免疫学会, 東京, 11.13, 2009
12. 荒浪利昌, 佐藤和貴郎, 山村 隆: 多発性硬化症における自己抗原熱ショック蛋白 α B-crystallinの免疫刺激作用. 第39回日本免疫学会学術集会, 大阪, 12.2, 2009
13. 市川大樹, 水野美歩, 大木伸司, 山村 隆, 三宅幸子: T細胞アナジーに関連したE3リガーゼGRAILの基質同定. 第39回日本免疫学会学術集会, 大阪, 12.2, 2009
14. 千葉麻子, 宮崎雄生, 市川大樹, 山村隆, 三宅幸子: 炎症性関節炎におけるMRI拘束性MAIT細胞の役割, 第39回日本免疫学会学術集会, 大阪,

2. 学会発表

1. 山村 隆: 免疫性神経疾患の治療戦略. 日本レチノイド研究会第20回学術集会「AM80の開発から臨床まで」, 慈恵医大, 11.21, 2009
2. 荒浪利昌, 佐藤和貴郎, 山村 隆: 中枢神経系における炎症とHSP. シンポジウム2-5. ヒト免疫疾患研究の新展開. 第37回日本臨床免疫学会. 東京, 11.13, 2009
3. Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. 61st Annual Meeting of American Academy of Neurology. Seattle, 4.28, 2009
4. Raveney B, Oki S, Yamamura T: Expression of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for IL-17 production by Th17 cells. Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS), San Francisco, 6.13, 2009
5. Aranami T, Sato W, Yamamura T: Small heat shock protein α B-crystallin, a candidate autoantigen in multiple sclerosis. Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS), San Francisco, 6.14, 2009
6. Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H, Yamamura T: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. The 8th International Workshop on Advanced Genomics. Tokyo, 6.17, 2009
7. Okamoto T, Ogawa M, Lin Y, Murata M, Takahashi T, Fujihara K, Yamamura T: Warning against interferon-beta treatment for anti-aquaporin-4 antibody positive neuromyelitis optica. Dusseldorf, Germany, 9.10, 2009
8. Raveney BJE, Oki S, and Yamamura T: Expression of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for IL-17 production by TH17 cells. 2nd European Congress of Immunology, Berlin, Germany, 9.15, 2009
9. 佐藤準一, 天竺桂弘子, 山村 隆: MS 脳病巣プロテオームの分子ネットワーク解析. 第50回日本神経学会総会. 仙台, 5.20, 2009
10. 佐藤和貴郎, 荒浪利昌, 富田敦子, 山村 隆: MMP9を高発現するCCR2陽性CCR5陽性細胞の多発性硬化症における重要性. 第37回日本臨床免疫学会, 東京, 11.13, 2009
11. 宮崎雄生, 三宅幸子, 山村 隆: ヒト末梢血における mucosal associated invariant T細胞に関する研究. 第37回日本臨床免疫学会, 東京, 11.13, 2009
12. 荒浪利昌, 佐藤和貴郎, 山村隆: 多発性硬化症における自己抗原熱ショック蛋白 α B-crystallinの免疫刺激作用. 第39回日本免疫学会学術集会, 大阪, 12.2, 2009
13. 市川大樹, 水野美歩, 大木伸司, 山村 隆, 三宅幸子: T細胞アナジーに関連したE3リガーゼGRAILの基質同定. 第39回日本免疫学会学術集会, 大阪, 12.2, 2009
14. 千葉麻子, 宮崎雄生, 市川大樹, 山村隆, 三宅幸子: 炎症性関節炎におけるMRI拘束性MAIT細胞の役割, 第39回日本免疫学会学術集会, 大阪,

12. 2, 2009

15. Oki, S., B. J. E. Raveney, T. Yamamura: AM80, a synthetic retinoid, ameliorates Th17-mediated ocular autoimmunity and promotes the infiltration of Foxp3+ T cells into the eye. 第 39 回 日本免疫学会 学術集会 12. 2, 2009
16. B. J. E. Raveney, S. Oki, and T. Yamamura Expression of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for IL-17 production by Th17 cells 第 39 回 日本免疫学会総会・学術集会 12. 2, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
出願予定あり。
2. 実用新案登録
出願予定なし。
3. その他

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

多発性硬化症における MAIT 細胞に関する研究

研究分担者 三宅 幸子 国立精神・神経センター 神経研究所免疫研究部室長

研究要旨

ヒト CD4/8 double negative T 細胞の解析中に V α 24 natural killer T (NKT) 細胞とは異なるインバリアント T 細胞抗原受容体 (TCR) (V α 7.2-J α 33) を発現する細胞として同定され、腸管粘膜に多く分布することから Mucosal associated invariant T (MAIT) 細胞について、MS における動態ならびに機能について検討した。MAIT 細胞の分化は、MHC class Ib 分子に属する MR1 分子、B 細胞および常在細菌叢に依存するユニークな T 細胞集団である。これまで我々は、多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) の病巣部に MAIT 細胞が浸潤していること (Int Immunol 16, 223-30, 2003)、MAIT 細胞の実験的自己免疫性脳脊髄炎においては病態抑制作用を持つことを明らかにした (Nat Immunol 7, 987-94, 2006)。本研究では、ヒト MAIT 細胞の検出抗体を用いて、MS における MAIT 細胞の動態ならびに機能について検討した。ヒト末梢血中において、MAIT 細胞は DN T 細胞中の数 \sim 10%、CD8 α T 細胞中の数 \sim 20%であり、大きな細胞集団を形成していた。MAIT 細胞の頻度は CD4⁺V α 24NKT 細胞、CD56^{bright}NK 細胞の頻度と相関が見られ、これら細胞集団とシステムを形成し免疫制御を行っている可能性が考えられた。MS 緩解期の患者では、MAIT 細胞の頻度は有意に低かった。In vitro の培養において、血単核球から MAIT 細胞を除去すると、T 細胞からの IFN- γ 産生が減少することから、免疫抑制細胞として機能する可能性が示唆された。

A. 研究目的

MR1 拘束性 T 細胞は、可変性の限られた TCR を有し、MR1 拘束性のリンパ球である。これまでの研究で、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において、MAIT 細胞は病態抑制に関与することを示した。本年度は、MAIT 細胞の MS における動態と機能について検討した。

B. 研究方法

対象は 13 名の健常者、および 22 名の寛解期 MS 患者、4 名の再発期 MS 患者を対象とした。末梢血単核細胞を分離の後、MAIT 細胞の頻度、表面抗原、および Phorbol-Myristate-Acetate (PMA)、

Ionomycin 刺激に対するサイトカイン産生をフローサイトメーター、ELISA で解析した。

C. 研究結果

末梢血 α β T 細胞に占める MAIT 細胞の頻度は健常人で 3.92%、MS 緩解患者で 2.32%、MS 再発患者で 0.73%であり、MS 患者で有意に低値であった。さらに、MAIT 細胞の頻度と CD4⁺V α 24NKT 細胞、CD56^{bright}Natural Killer (NK) 細胞の頻度との間に正の相関が見られた。MAIT 細胞は健常者、MS 患者とも α 4 β 1 インテグリン、CCR5、CCR6 を高発現し、PMA、Ionomycin 刺激に対して Interferon (IFN)- γ を高産生したが、Interleukin (IL)-4、

IL-10, IL-17 の産生は低値であった。抗 CD3 抗体や PHA といった TCR からの刺激では、サイトカイン産生はほとんどみられなかった。In vitro で末梢血 PBMC から MAIT 細胞を除去すると、T 細胞からの IFN- γ 産生が抑制された。

D. 考察

ヒト末梢血中において、MAIT 細胞は単一の α 鎖を発現する細胞としては非常に大きな細胞集団を形成していた。V α 24NKT 細胞が末梢血 T 細胞の 0.01~0.5% であることを考えると MAIT 細胞は極めて大きなポピュレーションであると言える。さらに MAIT 細胞の頻度は CD4⁺V α 24NKT 細胞, CD56^{bright}NK 細胞の頻度と相関が見られ、これら細胞集団とシステムを形成し免疫制御を行っている可能性が考えられた。寛解期 MS 患者末梢血中で MAIT 細胞の減少が見られ、再発期ではさらに低下がみとめられた。In vitro で末梢血 PBMC から MAIT 細胞を除去すると、T 細胞からの IFN- γ 産生が抑制されたことから、MAIT 細胞は、病態抑制に関与する可能性が考えられた。

E. 結論

寛解期、再発期 MS 患者末梢血中で MAIT 細胞の頻度が減少していた。MAIT 細胞の頻度は他の免疫性細胞と相関していること、In vitro の培養系で末梢血 PBMC から MAIT 細胞を除去すると、T 細胞からの IFN- γ 産生が抑制されたことから、MAIT 細胞は病態抑制に関与する可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

I 論文発表

原著

1) Theil MM, Miyake S, Mizuno M, Tomi C, Croxford J, Hosoda H, Theil J, von Horsten S, Yokote H, Chiba A, Lin Y, Oki S, Akamizu T, Kanagawa K, Yamamura T: Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by Ghrelin. *J Immunol.* 83(4):2859-66, 2009

2) Fujita M, Otsuka T, Mizuno M, Tomi C, Yamamura T, Miyake S. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates experimental autoimmune encephalomyelitis via iNKT cell-dependent mechanism. *Ame J Patho* 175(3):1116-23, 2009

総説

1) Miyake S, Yamamura T. Ghrelin: friend or foe for neuroinflammation. *Descov Med* 8(41):64-67, 2009

2) 三宅幸子: Carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 と自己免疫. *臨床免疫・アレルギー科* 51(4):339-342, 2009

3) 千葉麻子、三宅幸子: NKT 細胞と関節リウマチ. *リウマチ科* 41(4):410-416, 2009

4) 山村隆、横手裕明、三宅幸子: 腸内細菌と自己免疫. *Neurological Science* 17(3):10-11, 2009

5) 三宅幸子: 新しいパラダイム? Th17 と神経免疫疾患. *BIO Clinica* 24(9):23-26, 2009

6) 千葉麻子、三宅幸子: インターロイキン 9 産生 T 細胞. *Frontiers in Rheumatology and Clinical Immunology* 13: 219-224, 2009

7) 三宅幸子: 腸管免疫と神経免疫のクロストーク. *BIO Clinica* in press

8) 三宅幸子: NKT 細胞と疾患. *臨床リウマチ* in press

著書

Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T: Role of NKT cells in multiple sclerosis: In a quest to understand and overcome their highly efficient double edged swords. **Molecular Basis of Multiple Sclerosis. The Immune System Series "Results and Problems in Cell Differentiation"** Gramm U, ed, Springer-Verlag, Heidelberg (in press)

II 学会発表

国際学会

1) Miyake S, Yokote H, Lin Y, Yamamura T. The role of regulatory cells in the regulation of EAE. 2nd German-Japanese Neuroimmunology Symposium, Eibsee, 10th, July 2009

2) Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D, Yamamura T, Miyake S: The role of MR-1 restricted MAIT cells in the pathogenesis of arthritis. American College of Rheumatology 73rd Annual Scientific Meeting, Philadelphia, 10.19, 2009

国内学会

1) 宮崎雄生, 三宅幸子, 山村 隆: ヒト末梢血における mucosal associated invariant T 細胞に関する研究. 第 37 回日本臨床免疫学会総会, 東京, 11. 13, 2009

2) 宮崎雄生, 千葉麻子, 水野美歩, 任海千春, 市川大樹, Iraide Alloza, 山村 隆, Koen Vandebroek, 三宅幸子: 新規 celecoxib アナログは Th17, Th1 細胞の抑制を介して多発性硬化症, 関節リウマチのマウスモデルを抑制する. ワークショップ 18, 第 39 回日本免疫学会総会, 大阪, 12. 2, 2009

3) 三宅幸子: T 細胞アナジーに関連した E3 リガーゼ GRAIL の基質同定. 第 39 回日本免疫学会,

大阪, 12. 2, 2009

4) 千葉麻子, 宮崎雄生, 市川大樹, 山村隆, 三宅幸子: 炎症性関節炎における MR1 拘束性 MAIT 細胞の役割, 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12.2, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

核内受容体を標的とした自己免疫疾患制御法の探索に関する研究

研究分担者 大木 伸司

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部室長

研究要旨

多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) は、自己抗原に対する過剰な免疫応答の結果として生じる典型的な自己免疫疾患である。MS の病態形成には、Th1 細胞、Th17 細胞などの炎症性免疫細胞の標的臓器への浸潤と、これらの細胞が産生する炎症性サイトカインが深く関わる。我々はこれまでに、APL 治療薬として臨床応用されている合成レチノイド Am80 が、*all-trans* レチノイン酸 (ATRA) を上回る Th17 細胞分化抑制能を有すること、Am80 の予防的あるいは治療的経口投与により、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症が有意に抑制されることを示してきた。今回、ヒトブドウ膜炎のマウスモデルとして病態研究に用いられるマウス実験的自己免疫性ブドウ膜炎 (EAU) に対する Am80 の病態抑制効果を検証し、Am80 による T 細胞機能制御とサイトカイン産生制御を比較解析することで、自己免疫疾患治療薬としての合成レチノイドの可能性を、さらに詳細に検討した。

A. 研究目的

近年、多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) に代表される種々の自己免疫疾患に対して、ATRA をはじめとするレチノイドによる Th17 細胞機能制御を介した新規治療アプローチの可能性が注目されている。本研究では、以前に報告した EAE に加えて、EAU という別のマウス自己免疫疾患モデルを導入することにより、合成レチノイド Am80 の病態抑制メカニズムの詳細を、Th17 細胞、制御性 T 細胞、抑制性サイトカイン IL-10 の挙動を中心に解析し、種々の自己免疫疾患に対する合成レチノイドの応用可能性を検証することを目的とした。

B. 研究方法

C57BL/6J (B6) マウス由来脾臓細胞より分離した T 細胞を、種々の合成レチノイド (10 nM~1 μM) 存在下に抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、培養上清中の IL-17 を測定した。さらに脾臓 T 細胞を Th17 細胞誘導条件下 (IL-6; 20 ng/ml) /TGF-β; 5 ng/ml) で合成レチノイドを添加して抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、抗 CD3 抗体にて再試激した後の Th17 細胞分化を、IL-17 産生能を比較した。培養後の細胞から RNA を抽出し、cDNA 合成後に定量 PCR 法を用いて、Th17 細胞分化のマスター遺伝子である RORγt の発現を比較した。B6 マウスに MOG35-55 ペプチドを免疫後、百日咳毒素 (PT) を腹腔内投与することで実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導した。CMC に懸濁した各種合成レチノイドの経口投与による EAE 発症抑制効果を比較した。MOG35-55 ペプチドあるいは hIRBP1-20 ペプチドと 1mg の結核死菌をフロイントアジュバントと混合して作製したエマルジョンを B6 マウスに皮下免疫した。さらに Day0、Day2 に百日咳毒素を腹腔内投与することに

より、EAE あるいは EAU を誘導した。0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) に懸濁した Am80 を、予防的あるいは治療的プロトコールで隔日経口投与 (3mg/kg) して、病態抑制効果を比較した。それぞれの標的臓器より単核球を分離し、浸潤細胞の組成、再刺激後のサイトカイン産生能を ELISA 法にて検証するとともに、Th17 細胞のマスター遺伝子 RORγt、制御性 T 細胞のマスター遺伝子 Foxp3 および IL-10 の発現を、定量 PCR 法を用いて比較した。発症マウスの標的臓器より得た浸潤細胞由来のヘルパー T 細胞を材料としてトータル RNA を回収し、GeneChip 解析を行った。Am80 投与群と非投与群の間で網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、Am80 の病態抑制作用の分子メカニズムの解析を試みた。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験に関しては、当研究所の動物実験規定に従って作成した実験計画書の承認を受けて行った。

C. 研究結果

IRBP1-20 ペプチドを免疫した EAU マウスでは、15 日目前後より有意な細胞浸潤が認められた。その後、17 日目頃に細胞浸潤のピークを迎え、20 日目以降には浸潤細胞数が減少し、寛解した。コントロール群では、15 日目に CD11b+細胞および CD45+細胞の浸潤を、17 日目には CD4+T 細胞浸潤の増大を認めた。全観察期間を通じて、CD4+T 細胞を含む浸潤細胞の組成はそれほど大きくは変化しなかった。Am80 投与群では、全観察期間を通じて眼球への細胞浸潤がほとんど消失し、総浸潤細胞数は CMC 投与群に対して 10%以下に抑制された。コントロール群および Am80 処理群の EAU マウス

の脾臓 T 細胞では、抗原特異的 (IRBP ペプチド刺激)、及び抗原非特異的 (固相化抗 CD3 抗体刺激) 細胞増殖には有意な差を認めなかった。眼球浸潤 CD4+T 細胞における ROR γ t 発現および Foxp3 発現を調べたところ、Am80 は病態形成に伴う ROR γ t の発現増加を抑制し Foxp3 発現の著明な増強を誘導することが明らかとなった。Am80 を継続投与することで、EAE の場合と同様、臓器浸潤 T 細胞の IL-10 産生抑制が認められたが、全観察期間を通じて Am80 の病態抑制効果には大きな影響を認めず、本系における IL-10 の関与は大きくはないと考えられた。

興味深いことに、Am80 投与により臓器浸潤細胞数の減少が認められるが、とくに治療的投与を行った場合、すでに浸潤している炎症性細胞が Am80 投与により極めて速やかに消失したことから、Am80 には炎症性細胞を能動的に標的臓器外に送り出す未知の作用があることが予想された。そこで、自己免疫病態発症マウスの標的臓器より得た浸潤細胞由来のヘルパー T 細胞を材料としてトータル RNA を回収し、Am80 投与群と非投与群の間で GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析を行うことで、この未知の作用に関与する遺伝子群の同定を試みた。Am80 投与により、T 細胞のケモカイン受容体発現と接着分子発現が大きく変動することが明らかとなり、これらの変動が Am80 の病態抑制作用の分子基盤となっている可能性が考えられた。

D. 考察

種々の自己免疫疾患モデルあるいはヒト自己免疫疾患において、Th17 細胞が病原性 T 細胞の主要な細胞集団であることが明らかにされている。よって、Th17 細胞分化の選択的抑制により、病態制御を可能にする新規治療法開発への道が開けると考えられる。RAR α/β に選択的に作用し、APL 治療薬として臨床応用されている合成レチノイド Am80 は、顕著な Th17 細胞分化抑制効果を示し、Am80 の経口投与により、EAE の発症が抑制された。Am80 は、標的臓器浸潤細胞の ROR γ t 発現と IL-17 産生を著しく抑制し、EAE のみならず EAU でも顕著な病態改善効果を示した。興味深いことに、EAU では Am80 により浸潤 T 細胞の ROR γ t 発現が有意に減少する一方で、Foxp3 発現は増加しなかったのに対し、EAU では投与群の浸潤 T 細胞における Foxp3 の著しい発現亢進を認めた。さらにいずれのモデルにおいても、Am80 の継続投与により臓器浸潤 T 細胞からの IL-10 産生が抑制されたが、EAE では病態後期の Am80 の効果の減弱が認められた一方で、EAU では実験期間を通じて Am80 による病態抑制効果の減弱は認めなかった。よって合成レチノイド Am80 は、複数の自己免疫疾患モデルに共通して Th17 細胞機能抑制による病態改善効果を示すことが明らかとなった。Am80 には病態形成に関わる T 細胞動態に対する作用も認められることから、得られた網羅的遺伝子発現解析データをさらに精査することで、今後この作用メカニズムの詳細を明らかに

する必要があると考えられた。

E. 結論

Am80 の経口投与により、Th17 細胞機能および T 細胞動態抑制効果を介した EAE および EAU の病態改善効果が得られた。Am80 が、種々の自己免疫疾患に対する新規治療薬として適用できる可能性が示された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Christian Klemann, Benjamin JE Raveney, Anna K Klemann, Tomoko Ozawa, Stephan von Hörsten, Koichi Shudo, **Shinji Oki**, Takashi Yamamura: Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates EAE

Am. J. Pathol. 174, 2234-45 (2009)

(2) Michael-Mark Theil, Sachiko Miyake, J. Ludovic Croxford, Hiroaki Yokote, Hiroshi Hosoda, Julia Schween, Stephan von Hörsten, Asako Chiba, Youwei Lin, **Shinji Oki**, Takashi Akamizu, Kenji Kangawa, Takashi Yamamura: Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by ghrelin.

J. Immunol. 181, 2859-2866 (2009)

(3) Christian Klemann., Benjamin JE Raveney, **Shinji Oki**, Takashi Yamamura: Retinoid signals and Th17-mediated pathology.

32 (1), 20-28 (2009)

(4) **Shinji Oki**, Takashi Yamamura: Identification of a possible therapeutic target through pathogenic T cell analysis of multiple sclerosis.

Jpn. J. Clin. Immunol. 32 (4), 214-222 (2009)

2. 学会発表

【国際学会】

1) Yamamura T., H. Yokote, J.L. Croxford, **S. Oki**, S. Miyake: NKT cell-dependent amelioration of EAE by altering gut flora. Keystone Symposia 2009: Multiple Sclerosis, Santa Fe NM, Jan. 25th, 2009

2) Yamamura T., H. Yokote, J.L. Croxford, **S. Oki**, H. Mizusawa, S. Miyake: NKT cell-dependent amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by altering gut flora. The 5th international symposium on CD1/NKT cells, Kamakura

Kanagawa, Mar.26th, 2009

3. その他 なし

3) Raveney B., S. Oki, T. Ozawa, T. Yamamura:
Expression of the orphan nuclear receptor NR4A2 is
required for IL-17 production by Th17 cells. 9th
Annual Conference of FOCIS, San Francisco, Jun.
11th-14th, 2009

4) Oki S: Nuclear receptors as therapeutic targets
for multiple sclerosis. 2nd Conference of Germany
and Japan Neuroimmunology Eibsee Germany, Jul.
7th-11th, 2009

5) Raveney B., S. Oki, T. Ozawa, T. Yamamura:
Expression of the orphan nuclear receptor NR4A2 is
required for IL-17 production by Th17 cells. 2nd
European Congress of Immunology, Berlin Germany,
Sep. 13th-16th, 2009

【国内学会】

1) 大木伸司、レイバニー・ベン、クレマン・クリス
チャン、首藤紘一、山村隆：実験的自己免疫性ブドウ
膜炎（EAU）に対する合成レチノイド Am80 の病態抑制
効果 第 21 回日本神経免疫学会学術集会（大阪） 2009
年 3 月 13 日

2) Shinji Oki、Raveney Benjamin JE、Takashi
Yamamura：AM80, a synthetic retinoid, ameliorates
Th17-mediated ocular autoimmunity and promotes the
infiltration of Foxp3+ T cells into the eye 第 39
回日本免疫学会総会・学術集会（大阪） 2009 年 12
月 2 日

3) Raveney Benjamin JE、Shinji Oki、Takashi Yamamura:
Expression of the orphan nuclear receptor NR4A2 is
required for IL-17 production by Th17 cells 第 39
回日本免疫学会総会・学術集会（大阪） 2009 年 12
月 2 日

4) Daiju Ichikawa, Miho Mizuno, Shinji Oki、Takashi
Yamamura, Sachiko Miyake: Identification of
substrates of GRAIL E3 ligase 第 39 回日本免疫学
会総会・学術集会（大阪） 2008 年 12 月 2 日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

ヒト Th17 細胞解析に基づく新規治療法開発に関する研究

研究分担者 荒浪利昌

国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部室長

研究要旨

多発性硬化症(MS)はCD4陽性T細胞が介在する自己免疫疾患であると考えられている。MSの動物実験モデルでは、Th1細胞サブセットやIL-17産生能を有するTh17細胞サブセットが重要であると考えられている。しかし、MS病態におけるT細胞サブセットの重要性については、未だ一定の見解は得られていない。我々は、ケモカイン受容体で同定されるT細胞サブセットとMS病態の関連性を検討した。非炎症性神経疾患とMS再発期の髄液中T細胞サブセットの頻度を、末梢血と髄液で比較したところ、両疾患群において、CCR2陰性CCR5陽性T細胞の髄液における有意な増加を認めた。一方、Th17サブセットであるCCR2陽性CCR5陰性およびCCR4陽性CCR6陽性T細胞サブセットはいずれの疾患群においても髄液で有意に減少していた。そして、CCR2陽性CCR5陽性サブセットのみが、MSに限って髄液での有意な増加が認められた。この分画はIFN- γ とIL-17の両方の産生能を有し、血液脳関門の破壊に関与すると考えられている、MMP9を高発現していることが判明した。以上より、CCR2陽性CCR5陽性サブセットは、MS再発の病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆される。

A. 研究目的

多発性硬化症 (MS) は CD4 陽性 T 細胞が介在する自己免疫疾患であると考えられている。CD4 陽性 T 細胞にはサイトカイン産生能の異なるサブセットが存在する。MS の動物実験モデルでは、Th1 細胞サブセットや IL-17 産生能を有する Th17 細胞サブセットが重要であると考えられている。しかし、MS 病態における T 細胞サブセットの重要性については、未だ一定の見解は得られていない。我々はヒト Th17 サブセットの解析を行い、その細胞表面マーカーとしてケモカイン受容体が非常に重要で、特に Th17 サブセットは CCR2 陽性 CCR5 陰性であると報告した (J. Immunol. 2007)。本研究ではこの知見に基づき、ケモカイン受容体で同定されるヒト T 細胞サブセットの MS 病態における重要性を明らかにし、それを標的とした新規治療法開発を目指す。

B. 研究方法

年齢性別のマッチした、MS 患者 20 名、非炎症性神経疾患 6 名あるいは健常者 11 名の末梢血および、MS 患者あるいは非炎症性神経疾患患者の髄液

よりリンパ球を分離し、4 種類のケモカイン受容体を同時に染色し、フローサイトメトリーによって、種々の T 細胞サブセットの頻度を測定する。さらに、T 細胞サブセットをフローサイトメトリーによってソーティングし、サイトカイン産生能並びにメタロプロテイナーゼ (MMP) の発現を定量的 RT-PCR によって測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は国立精神神経センター倫理委員会において承認されている (受付番号 21-8-事 5)。試料採取に当っては、書面による同意を取り、個人情報 は連結可能匿名化の上、国立精神神経センター病院で厳重に管理されている。

C. 研究結果

末梢血においては、MS と健常者の、各 T 細胞サブセットの頻度に有意差は認められなかった。非炎症性神経疾患と MS 再発期の髄液中 T 細胞サブセットの頻度を末梢血と髄液で比較したところ、両疾患群において、CCR5 陽性 CCR2 陰性 T 細胞の髄液における有意な増加を認めた。一方、Th17 サブセットである CCR2 陽性 CCR5 陰性および CCR4 陽性

CCR6 陽性 T 細胞サブセットはいずれの疾患群においても髄液で有意に減少していた。そして、CCR2 陽性 CCR5 陽性サブセットのみが、MS に限って髄液での有意な増加が認められた。この CCR2 陽性 CCR5 陽性サブセットにおける MMP9 の発現を測定したところ、他のサブセットに比べて、有意な発現上昇を認めた。

D. 考察

Th17 細胞は動物実験モデルでは病態形成に重要な細胞と考えられているが、MS では中枢神経系への移行を示唆するデータは得られなかった。一方、MS で中枢神経系への浸潤が増加している分画は、CCR2 陽性 CCR5 陽性サブセットであることが分かった。この分画は IFN- γ と IL-17 の両方の産生能を有し、血液脳関門の破壊に関与すると考えられている、MMP9 を高発現していることが判明した。以上より、CCR2 陽性 CCR5 陽性サブセットは、M 再発の病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆される。

E. 結論

MS 増悪時に髄液で増加する CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞は潜在的な BBB 破壊能を有し、MS 病態において重要な役割を果たしていると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 荒浪利昌、山村隆. 2009. 多発性硬化症. 炎症・再生医学事典 : 216-218.
2. 荒浪利昌、山村隆. 2009. 炎症と T 細胞サブセット. 治療学. 第44巻. 印刷中.

2. 学会発表

1. 山村隆、荒浪利昌 MS 病態における alpha-B-crystallin 自己免疫の意義. 厚生労働省免疫性神経疾患に関する調査研究班平成 20 年度班会議. 東京. 2009 年 1 月 28 日.
2. 山村隆、田川朝子、荒浪利昌、松本満 Autoimmune regulator (Aire) は、ミエリン抗原を標的とする自己免疫応答の発症を制御する. 厚生労働省免疫性神経疾患に関する調査研究班平成 20 年度班会議. 東京. 2009 年 1 月 28 日.
3. 佐藤和貴郎、荒浪利昌、山村隆 ケモカイン受容体の発現を用いた多発性硬化症患者におけるヒト Th17 細胞の検討. 第 21 回日本神経免疫学会学術集会. 大阪. 2009 年 3 月 12 日.
4. 荒浪利昌、佐藤和貴郎、山村隆 多発性硬化症病巣に高発現する熱ショック蛋白 α B-crystallin に

よる CD28 陰性 Th1 細胞偏倚の誘導. 第 21 回日本神経免疫学会学術集会. 大阪. 2009 年 3 月 12 日.

5. Tagawa A, Aranami T, Matsumoto M, Yamamura T. Aire-deficient Mice Develop Spontaneous Autoimmunity to the Central Nervous System Antigens. Annual meeting of Federation Of Clinical Immunology Societies (FOCIS). San Francisco, CA, USA. June 14 2009.
6. Aranami T, Sato, Yamamura T. α B-crystallin as an immunomodulator in MS. Second German-Japanese Neuroimmunology Symposium. Eibsee, Germany. July 11 2009
7. 荒浪利昌、佐藤和貴郎、山村隆 多発性硬化症病態における熱ショック蛋白 α B-crystallin の役割. 第 8 回東京 MS 研究会. 2009 年 9 月 25 日.
8. 荒浪利昌、佐藤和貴郎、山村隆 中枢神経系における炎症と HSP. 第 37 回日本臨床免疫学会総会. 東京. 2009 年 11 月 13 日.
9. 佐藤和貴郎、荒浪利昌、富田敦子、山村隆 MMP9 を高発現する CCR2 陽性 CCR5 陽性細胞の多発性硬化症における重要性. 第 37 回日本臨床免疫学会総会. 東京. 2009 年 11 月 13 日.
10. 荒浪利昌、佐藤和貴郎、山村隆 多発性硬化症における自己抗原熱ショック蛋白 α B-crystallin の免疫刺激作用. 第 39 回日本免疫学会学術集会. 大阪. 2009 年 12 月 2 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

遺伝子発現プロフィールから見た T 細胞活性化に対する IFNbeta の効果

研究分担者 佐藤 準一

明治薬科大学薬学部バイオインフォマティクス教授

研究要旨 Interferon-beta(IFNB)は、多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)の first-line therapy として用いられているが、治療効果発現の分子機序は十分解明されていない。現在まで Th17, Th1 shift の是正、MHC class II 抗原発現低下による抗原提示能抑制、血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)通過阻止が重要な機序として報告されている。2003 年にヒトゲノム解読が完了し、ポストゲノム時代の創薬研究戦略として、膨大なゲノム情報および網羅的な生物学的情報の有効活用が提唱されている。われわれは、2006 年にマイクロアレイで、健常者末梢血リンパ球 PBMC における IFN-responsive genes(IRGs)を網羅的に解析し同定した。本研究では Gene Expression Omnibus(GEO)のデータセットを用いて、バイオインフォマティクス解析手法を駆使し、IFNB 治療効果発現分子機序の解明を試みた。その結果、IFNB は活性化 T 細胞の BBB 通過に必要な matrix metalloproteases (MMPs), chemokines や Th17-producing proinflammatory cytokines の発現を抑制することにより、治療効果を呈している可能性が示唆された。

A. 研究目的

Interferon-beta(IFNB)は、多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)の first-line therapy として用いられているが、治療効果発現の分子機序は十分解明されていない。現在まで Th17, Th1 shift の是正、MHC class II 抗原発現低下による抗原提示能抑制、血液脳関門(BBB)通過阻止が重要な機序として報告されている(佐藤準一, 多発性硬化症. インターフェロン治療学. 最新の基礎・臨床. 日本臨床 64: 1297-1309, 2006)。

2003 年にヒトゲノム解読が完了し、ポストゲノム時代の創薬研究戦略として、膨大なゲノム情報および網羅的な遺伝子・タンパク質発現情報(omics data)の有効活用が提唱されている。われわれは、2006 年にマイクロアレイで、健常者末梢血リンパ球 PBMC における IFN-responsive genes(IRGs)を網羅的に解析し同定した(Satoh J, et al. Microarray analysis identifies a set of CXCR3 and CCR2 ligand chemokines as early IFN β -responsive genes in peripheral blood

lymphocytes: an implication for IFN β -related adverse effects in multiple sclerosis. *BMC Neurol* 6: 18-34, 2006)。本研究では、National Center for Biotechnology Information (NCBI)データベースである Gene Expression Omnibus(GEO)のデータセットを用いて、バイオインフォマティクス解析手法を駆使し、IFN β 治療効果発現分子機序の解明を試みた。

B. 研究方法

GEO のデータセット GSE14386(Zhang X, et al. IFN- β 1a inhibits the secretion of Th17-polarizing cytokines in human dendritic cells via TLR7 up-regulation. *J Immunol* 182: 3928 -3936, 2009)を用いた。GSE14386 は発症 1 年以内、MRI で 2 病巣以上を有し、6 週間は IVMP を行っていない clinically isolated syndrome(CIS)患者(n = 15)のアレイ解析データである。PBMC を無血清下、IFN β -1a(1000 U/ml)添加または未添加で、プレートコート抗 CD3, CD28 抗体で 24 時間刺激、RNA を抽出、HG-133 Plus 2.0 アレイ (Affymetrix; 39,000 transcripts)と反応させた解析データである。このデータ (CEL files) を GeneSpring GX10.0.2(Agilent) に入力、robust multiarray average(RMA)または MicroArray Suite 5(MAS5)で正規化、paired T-Test と multiple testing correction with Benjamini Hochberg FDR ($p \leq 0.05$), fold change ≥ 2.0 で differentially expressed genes(DEG)を絞り込んだ。IFN 応答プロモーター(ISRE, IRF, STAT, NF- κ B)は INTERFEROME(www.interferome.org), 分子ネ

ットワークは KeyMolnet(www.immd.co.jp), 正常細胞組織の発現は GNF SymAtlas(biogps.gnf.org)で解析した。

(倫理面への配慮)

本研究では、公共データベース GEO に登録されているマイクロアレイ解析データを用いるため、倫理面の問題は考慮する必要がない。

C. 研究結果

T 細胞活性化系で IFN β により有意に変動した遺伝子(40 in MAS5; 58 in RMA)を同定した(図 1)。MAS5 40 遺伝子のうち 32 遺伝子は RMA 58 遺伝子とオーバーラップしていた。58 遺伝子中 47 遺伝子は発現上昇、11 遺伝子(MMP9, CXCL5, IL9, IL1A など)は発現低下を示した。35 遺伝子は INTERFEROME でも IRGs として同定され、30 遺伝子には IFN 応答プロモーターが存在した(表 1)。58 遺伝子の分子ネットワークでは、共通上流転写因子として IRF, NF- κ B の関与が示唆された(図 2)。

D. 考察

GSE14386 を再解析し、T 細胞活性化系で IFN β により有意に変動した遺伝子(40 in MAS5; 58 in RMA)を同定出来た。IFN β により発現上昇する遺伝子の殆どは、IFN 応答プロモーターを有する IRGs である。分子ネットワーク解析でも、共通上流転写因子として IRF を同定出来た。一方、発現低下遺伝子には ISRE が存在しなかった。IFN β による MMP9, IL-1

の発現低下は既に報告されている。IFNB は MMP9 promoter への転写アクチベーター(NF-kappaB p65, Sp1, CBP, p300)のリクルートメントを抑制する (Zhao et al. The interferon-stimulated gene factor 3 complex mediates the inhibitory effect of interferon-beta on matrix metalloproteinase-9 expression. FEBS J 274: 6456-6468, 2007)。IFNB による発現低下した IL-9 は Th17 が産生し、EAE において炎症の増悪に関与している (Novak et al. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. J Exp Med 206: 1653-1660, 2009)。

E. 結論

IFNB は活性化 T 細胞の BBB 通過に必要な MMPs, proinflammatory chemokines や Th17-producing proinflammatory cytokines(IL9 など)の発現を抑制することにより、治療効果を呈している可能性がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Satoh J, Obayashi S, Misawa T, Tabunoki H, Yamamura T, Arima K, Konno H. Neuromyelitis optica/Devic's disease: Gene expression profiling of brain lesions. *Neuropathology* 28 (6): 561-576, 2008.
2. Tabunoki H, Shimada T, Banno Y, Sato R, Kajiwara H, Mita K, Satoh J. Identification of Bombyx mori 14-3-3 orthologs and the interactor Hsp60. *Neuroscience Research* 61(3): 271-280, 2008.
3. Satoh J, Misawa T, Tabunoki H, Yamamura T. Molecular network analysis of T-cell transcriptome suggests aberrant regulation of gene expression by NF-kB as a biomarker for relapse of multiple sclerosis. *Disease Markers* 25(1): 27-35, 2008.
4. Misawa T, Arima K, Mizusawa H, Satoh J. Close association of water channel AQP1 with amyloid-beta deposition in Alzheimer disease brains. *Acta Neuropathologica* 116(3): 247-60, 2008.
5. Satoh J, Obayashi S, Misawa T, Sumiyoshi K, Oosumi K, Tabunoki H. Protein microarray analysis identifies human cellular prion protein interactors. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 35: 16-35, 2009.
6. Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T. Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. *Multiple Sclerosis* 15: 531-541, 2009.
7. Obayashi S, Tabunoki H, Kim SU, Satoh J. Gene expression profiling of human neural progenitor cells following the serum-induced astrocyte differentiation. *Cellular and Molecular Neurobiology* 29: 423-438, 2009.