

201027087A

厚生労働科学研究費補助金  
障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 村 隆

平成23年（2011年）3月

厚生労働科学研究費補助金  
障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 村 隆

平成23年（2011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

独) 国立精神・神経医療研究センター 山村 隆 P1

## II. 分担研究報告

■ヒト Th17 細胞解析に基づく新規治療法開発

独) 国立精神・神経医療研究センター 荒浪 利昌 P5

■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

独) 国立精神・神経医療研究センター 大木 伸司 P7

■多発性硬化症における腸管局在リンパ球 (MAIT 細胞) に関する研究

独) 国立精神・神経医療研究センター 三宅 幸子 P10

■多発性硬化症末梢血の microRNA プロフィールと標的遺伝子ネットワークに関する研究

明治薬科大学 佐藤 準一 P14

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P23

IV. 研究成果の刊行物・別刷 P27

# I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））  
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 独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 部長

### 研究要旨

インターロイキン17 (IL-17) を産生し、強い炎症誘導能を有するTh17細胞が2003年に発見された。本研究の目的は、免疫性神経疾患におけるTh17細胞の役割を明確にし、同細胞を標的とする画期的診断・予防・治療法を開発することにある。プロジェクト1) 最近、IL-17とインターフェロン $\gamma$ の両者を産生するTh17細胞に関心が集まっている。我々は、インターフェロン $\gamma$ を産生するTh17細胞が、ケモカイン受容体CCR2とCCR5を同時に発現するメモリーT細胞であり、多発性硬化症 (MS) の再発時の髄液中において特異的に増加していることを明らかにした。また、この細胞はミエリン塩基性タンパク (MBP) に反応し、脳血液関門を破壊する酵素MMP-9を産生した (論文投稿中)。CCR2+CCR5+ T細胞は中枢神経に浸潤して炎症を惹起する能力を有するので、同細胞を標的とする治療法開発を検討する必要がある。プロジェクト2) MSの末梢血で発現の高い転写因子NR4A2の機能について研究を進めた結果、NR4A2のTh17細胞特異的な発現を確認し、この分子がIL-17産生に必須であることを明らかにした。NR4A2 siRNAの全身投与によってMSの動物モデルEAEの発症は強く抑制され、MSの治療への応用が期待された。以上、Th17細胞の発現する分子や表面抗原の解析から、MSの病態解析や治療法開発に貢献する事実が明らかになった。

### 研究分担者

三宅幸子 独) 国立精神・神経医療研究センター 室長  
大木伸司 独) 国立精神・神経医療研究センター 室長  
荒浪利昌 独) 国立精神・神経医療研究センター 室長  
佐藤準一 明治薬科大学 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 $\gamma$ 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 (Th1/Th2 ドグマ)。しかし、2003年にIL-17産生性Th17細胞が発見され (Nature 421:744, 2003)、このドグマは崩壊した (Nat Med13:139, 2007)。研究の進展は早く、Th17細胞誘導条件の同定 (Nature441:235, 2006)や転写因子ROR $\gamma$ tの同定 (Cell 126:1121, 2006) などのブレークスルーのあと、インターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) を産生するTh17細胞の発見、IL-21依存性に誘導されるTh17細胞の発見などが続き、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の同定 (J. Immunol. 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 (Am J Pathol 2009)、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) などの実績のもとに、Th17細胞の基盤研究から臨床医学に結びつくような研究成果を目指している。本年度は、ヒト末梢血CCR2+CCR5+ T細胞がIFN- $\gamma$  産生Th17細胞であり、自己反応性を示し、MS病態において決定的な役割を果たすことを発見した (分担研究者: NCNP 荒浪利昌室長との共同)。また、転写因子NR4A2が、Th17細胞機能(サイトカイン産生)において決定的な役割を果たし、同分子を阻害するsiRNAが治療効果を発揮することを明らかにした (分担研究者: NCNP大木伸司室長)。

### B. 研究方法

ヒトのCCR2+CCR5+ T細胞解析は、マルチカラーのフローサイトメーター解析により、患者、対照群の血液および髄液サンプルを用いて進めた。マウスの実験的自己免疫性脳炎 (EAE) の解析は、B6マウスにMOG35-55ペプチドを用いて誘導する系を用いて行った。個々の研究手法は、分担研究

報告（荒浪分担研究、大木分担研究）を参照されたい。

#### （倫理面への配慮）

動物実験は施設の動物実験指針に基づき倫理審査委員会の承認を受けた上で行った。ヒト血液、髄液検体を用いた解析については、国立精神・神経医療研究センターの倫理委員会の承認を受けて行い、書面による説明と同意を得た上で、採血を行った。

### C. 研究結果

#### [CCR2+CCR5+細胞の研究]

CCR2+CCR5+ T 細胞は、MS 再発時髄液で特異的に増加していることが明らかであり、MS 病態において重要な役割を果たすことが推測された。さらに、同細胞は MS の標的抗原の一つミエリン塩基性タンパク (MBP) に対して特異的に反応し、IFN- $\gamma$ 、IL-17、MMP-9、osteopontin を産生することがわかった。脳血液関門モデルを用いた解析では、同細胞が glia limitans を通過する能力の高いことが示唆された。以上の結果を総合すると、CCR2+CCR5+ T 細胞は、炎症惹起脳の高い Th17 細胞であり、中枢神経浸潤脳が高いことから、MS 病態の根幹に関わることが推測された。

#### [NR4A2 分子の研究]

NR4A2 は EAE を発症したマウスの中枢神経浸潤 CD4+ T 細胞に発現し、それに引き続いて末梢血 CD4+ T 細胞における発現を示した。これらの T 細胞の中で、IL-17 を産生する細胞のみが NR4A2 を発現していることがわかり、Th17 特異的な転写因子と考えられた。さらに siRNA によって Th17 細胞の NR4A2 発現を抑制すると、IL-21 および IL-17 の産生がほぼ完全に抑制された。また、siRNA によって EAE が抑制できることも明らかになった。

### D. 考察

我々の研究成果は、Th17細胞の同定法、Th17細胞を特異的に抑制する治療法の開発につながるものであり、学術的価値とともに厚生労働科学研究としての価値も高いと考えている。それは、Th17細胞を標的とする画期的治療薬が開発されれば、特定疾患であるMSに対する治療法の選択肢が増え、その結果、患者の予後の向上、医療レ

ベルの向上につながり、国民の保健・医療・福祉の向上に資するところが大きいからである。以上の研究の流れを加速するために、研究体制を強化して、前臨床試験等を実行して行く必要がある。

### E. 結論

Th17 細胞研究の中から、病原性 T 細胞を同定するケモカイン受容体発現パターンを明らかにした他、転写因子 NR4A2 を標的とする医薬開発の可能性を示した。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Chang, Y-J., H. Y. Kim, L. A. Albacker, H.-H. Lee, N. Baumgarth, S. Akira, P. Savage, S. Endo, T. Yamamura, J. Maaskant, N. Kitano, A. Singh, A. Bhatt, G. Besra, P. van den Elzen, B. Appelmelk, R. W. Franck, G. Chen, R. DeKruyff, M. Shimamura, P. Illarionov, and D. Umetsu. Influenza A infection in suckling mice expands a population of NKT cells that protects mice as adults from airway hyperreactivity. *J. Clin. Invest.* 2010 Dec 13. pii: 44845. doi: 10.1172/JCI44845. [Epub ahead of print]

Chihara, N., T. Aranami, W. Sato, Y. Miyazaki, S. Miyake, T. Okamoto, M. Ogawa, T. Toda, and T. Yamamura: Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *PNAS* early edition online, 2011

荒浪利昌, 山村 隆: 炎症と T 細胞サブセット. 特集抗体療法. 治療学 44:11-13, 2010

能登大介, 山村 隆: <Special Article> 免疫性神経疾患の免疫学. 内科 105:756-761, 2010

三宅幸子, 山村 隆 : NKT 細胞と多発性硬化症. Yamamura, T. : Immunological basis of multiple sclerosis and neuromyelitis optica in Japan. Max Planck Institute & National Center of Neurology and Psychiatry. Joint Symposium. Front Line of the Research on Psychiatry & Neurology. Tokyo 10.13, 2010

荒浪利昌, 山村 隆 : Th17 細胞のケモカインレセプターの発現. *Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology* 4: 156-160, 2010

千原典夫, 山村 隆 : 神経疾患と炎症 -多発性硬化症を中心に- *最新医学* 65: 2390-2395, 2010

千原典夫, 山村 隆 : 神経疾患と分子マーカー : 多発性硬化症. *Clinical Neuroscience* 28: 1396-1399, 2010

富田敦子, 荒浪利昌, 山村 隆 : 免疫病態のトピックス. 特集 : MS と NMO, *Brain Medical* 22: 317-322, 2010

## 2. 学会発表

Yamamura T : Invariant T cells as sensors and regulators of commensal flora. 14th International Congress of Immunology (ICI), Kobe, Japan, 8. 24, 2010

Yamamura T : Asian type MS versus Western type MS: immunological background. Neuroimmunology Kyoto Conference 2010 (Satellite Symposium in conjunction with ICI 2010). Kyoto, Japan, 8.21, 2010

Noto, D., K. Takahashi, T. Yamamura, and S. Miyake: In vitro differentiation of lineage-negative bone marrow cells and monocytes into microglia-like cells. Neuroimmunology Kyoto Conference 2010 (Satellite Symposium in conjunction with ICI 2010). Kyoto, Japan, 8.20, 2010

Chihara, N., T. Aranami, W. Sato, Y. Miyazaki, S. Miyake, T. Okamoto, M. Ogawa, and T. Yamamura: Plasma cell-like B cells produce aquaporin 4 autoantibody in neuromyelitis optica. Neuroimmunology Kyoto Conference 2010 (Satellite Symposium in conjunction with ICI 2010). Kyoto, Japan, 8.21, 2010

Yamamura, T.: Keynote lecture. Immunology of NK and NKT cells in MS. Multiple Sclerosis Immunology: A foundation for Current and Future Treatments. Nottingham, UK, 10.31, 2010

Yamamura, T.: IL-6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica (NMO). 2010 Neuromyelitis optica roundtable conference. A rare approach to a rare disease. The Beverly Hilton. Los Angeles, CA, 11.8, 2010

Yamamura, T. : Progress in pathophysiology in NMO and clinical implications. The 5th Bochum-Dusseldorf MS symposium. Bochum, Germany, 2.19, 2011

Sato, W., A. Tomita, T. Aranami, T. Okamoto, M. Ogawa, and T. Yamamura: CCR2<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells enriched in cerebrospinal fluid of relapsing multiple sclerosis patients strongly express matrix metalloproteinase-9 and osteopontin. 4th International Congress of Immunology (ICI), Kobe, Japan 8. 23, 2010

Aranami, T., W. Sato, and T. Yamamura: An immunodominant role of aB-crystallin in multiple sclerosis. 4th International Congress of Immunology (ICI), Kobe, Japan 8. 23, 2010

Chiba, A., R. Tajima, Y. Miyazaki, D. Ichikawa, T. Yamamura, and S. Miyake: The role of MR1 restricted MAIT cells in the pathogenesis of murine models of arthritis. 4th International Congress of Immunology (ICI), Kobe, Japan 8. 24, 2010

Lin, Y., S. Miyake, and T. Yamamura: Dominancy

of encephalitogenic peptide itself directs sustainable regulation of a model of multiple sclerosis, by induction of 'armoured' Treg. 10<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology, Sitges (Barcelona, Spain), 10.27, 2010

Noto, D., K. Takahashi, T. Yamamura, M. Yamada, and S. Miyake: In vitro differentiation of lineage-negative bone marrow cells and monocyte into microglia-like cells. 10<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology, Sitges (Barcelona, Spain), 10.27, 2010

Chiba, A., Y. Miyazaki, R. Tajima, M. Mizuno, C. Tomi, D. Ichikawa, I. Alloza, T. Yamamura, K. Vandebroek, and S. Miyake: Celecoxib analogue lacking COX-2 inhibitory activity suppresses inflammatory disorders by inhibiting inflammatory cytokines. 10<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology, Sitges (Barcelona, Spain), 10.28, 2010

Sato, W., A. Tomita, Y. Lin, M. Ogawa, T. Okamoto, M. Murata, T. Aranami, and T. Yamamura: CCR2+CCR5+ CD4+ T cells enriched in cerebrospinal fluid of relapsing multiple sclerosis patients strongly express matrix metalloproteinase-9 and osteopontin. 10<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology, Sitges (Barcelona, Spain), 10.28, 2010

Chihara, N., T. Aranami, W. Sato, Y. Miyazaki, S. Miyake, T. Okamoto, M. Ogawa, T. Toda, and T. Yamamura: Plasma cell-like B cells produce aquaporin 4 autoantibody in neuromyelitis optica. 10<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology, Sitges (Barcelona, Spain), 10.29, 2010

## 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

特になし



## Ⅱ. 分担研究報告

ヒト Th17 細胞解析に基づく新規治療法開発

研究分担者 荒浪利昌 国立精神・神経医療研究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）は原因不明の慢性炎症性脱髄性疾患であるが、その本態は Th1 細胞及び Th17 細胞が惹起する自己免疫疾患であると考えられている。我々は、ケモカイン受容体を細胞マーカーとして、末梢血と髄液浸潤細胞のフェノタイプ解析を行った。その結果、再発期の MS 髄液では、他の炎症性或非炎症性神経疾患と異なり、CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞サブセットの増加が認められた。このサブセットは、他の T 細胞に比べ、ミエリン塩基性蛋白特異的 T 細胞をより多く含み、メタロプロテイナーゼ 9 やオステオポンチンの産生能を有し、高い組織浸潤能を示した。以上より、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。この細胞群は診断マーカーとして有用であるだけでなく、新たな治療標的の候補となり得ると考えられる。

**A. 研究目的**

多発性硬化症（MS）は原因不明の慢性炎症性脱髄性疾患であるが、その本態は Th1 細胞及び Th17 細胞が惹起する自己免疫疾患であると考えられている。我々はケモカイン受容体を細胞マーカーとして T 細胞サブセットを同定する手法を報告している（J. Immunol. 2007）。本研究ではこの手法を用いて、MS 髄液中に浸潤している T 細胞のフェノタイプ解析を行った。

**B. 研究方法**

- (1) 対象：炎症性神経疾患患者 3 名、非炎症性神経疾患患者 6 名、再発期 MS 患者 9 名より、末梢血単核球細胞（PBMC）あるいは髄液細胞を分離し、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6 の 4 種類のケモカイン受容体を染色し、フローサイトメトリーで T 細胞亜分画の頻度の測定を行った。
- (2) 抗原特異的サイトカイン産生の解析：CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞およびメモリー T 細胞よりこのサブセットを除去した T 細胞をフローサイトメトリーで分取した。これらの T 細胞を、代表的ミエリン抗原ミエリン塩基性蛋白（MBP）あるいは卵白アルブミン（OVA）存在下で抗原提示細胞と共培養し、培養上清中のサイトカイン産生を ELISA 法で測定した。
- (3) 定量的 RT-PCR：CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞およびメモリー T 細胞よりこのサブセットを除去した T 細胞をフローサイトメトリーで分取し、PMA とイオノマイシンで

活性化し、メタロプロテイナーゼ 9（MMP9）、オステオポンチン（OPN）の mRNA を real time PCR 法で定量的に解析した。

- (4) T 細胞浸潤能の解析：CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞およびメモリー T 細胞よりこのサブセットを除去した T 細胞をフローサイトメトリーで分取し、マトリゲル浸潤能を解析した。

**（倫理面への配慮）**

本研究においては、全ての患者から書面によるインフォームドコンセントを得た上で採血を行った。また、患者から得られた情報は、連結可能匿名化の後、国立精神神経センター病院にて厳重に保管されている。以上から、本研究は、倫理面への十分な配慮がなされている研究であると考えられる。

**C. 研究結果**

- (1) Th17 細胞分画は、MS と NIND の両者で、髄液での頻度が末梢血に比べて減少していることが判明した。
- (2) CCR2 陽性 CCR5 陽性亜分画は、MS においてのみ、再発時に髄液での頻度が末梢血より高いことが判明した。
- (3) 再発期 MS 患者の CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞は、MBP に対してのみ有意な IFN- $\gamma$  および IL-17 産生を示した。健康者 T 細胞は、そのような反応を示さなかった。
- (4) CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞は、他の T 細胞分画と比較して MMP9 および OPN の発現が有意に高いことが判明した。
- (5) CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞はマトリゲルを

用いた基底膜浸潤モデルにおいて、他のT細胞に比べ、有意に高い浸潤能を示した。

#### D. 考察

MS再発期のCCR2陽性CCR5陽性T細胞には、MBP特異的T細胞がエンリッチされている可能性がある。MMP9は基底膜の主成分であるコラーゲンtypeIVの分解酵素であり、リンパ球が血液脳関門(BBB)を破壊し、中枢神経に浸潤する際に重要な役割を果たしていると考えられている。OPNは自己反応性T細胞の生存を促進し、IFN- $\gamma$ およびIL-17産生性T細胞からのサイトカイン産生を促進するなど多様な機能が報告されている。従って、CCR2陽性CCR5陽性分画は潜在的に高い病原性を有すると考えられる。

#### E. 結論

MS特異的に、その増悪時に髄液中で増加する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。この細胞群は診断マーカーとして有用であるだけでなく、新たな治療標的の候補となり得る可能性がある。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Norio Chihara, Toshimasa Aranami, Wakiro Sato, Yusei Miyazaki, Sachiko Miyake, Tomoko Okamoto, Masafumi Ogawa, Tatsushi Toda and Takashi Yamamura. 2011. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. in press.

##### 2. 和文総説

1. 富田敦子, 荒浪利昌, 山村隆. 2010年, MSの免疫病態のトピックス. Brain Medical 22 : 25-30.
2. 荒浪利昌, 山村隆. 2010年, Th17細胞のケモカインレセプターの発現. Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology 4 : 28-32.
3. 荒浪利昌, 山村隆. 2010年, 炎症とT細胞サブセット. 治療学 : 11-13.

#### 2. 学会発表

##### 国際学会

1. Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Yamamura T: Plasma cell-like B cells produce aquaporin 4 autoantibody in neuromyelitis optica. Kyoto: Neuroimmunology Kyoto Conference 2010, P-9
2. Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Yamamura T: Auto-reactive anti-aquaporin 4 antibodies are secreted from peripheral plasma cell-like B cells in neuromyelitis optica. Kobe: 14th International Congress of Immunology 2010, PP-038-38
3. Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Yamamura T: Auto-reactive anti-aquaporin 4 antibodies are secreted from peripheral plasma cell-like B cells in neuromyelitis optica. Kobe: 14th International Congress of Immunology 2010, August 23.
4. Wakiro Sato, Atsuko Tomita, Youwei Lin, Masafumi Ogawa, Tomoko Okamoto, Miho Murata, Toshimasa Aranami and Takashi Yamamura: CCR2+ CCR5+ CD4+ T cells enriched in cerebrospinal fluid of relapsing multiple sclerosis patients strongly express matrix metalloproteinase-9 and osteopontin. Kobe: 14th International Congress of Immunology 2010, August 23.
5. Aranami T, Sato, Yamamura T: T cell subsets identified with chemokine receptors in MS. MS Immunology Seminar. Nottingham, England. October 31 2010.
6. Aranami T, Sato, Yamamura T: T cell subsets identified with chemokine receptors in MS. MS Immunology Seminar. Nottingham, England. October 31 2010.

#### 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

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 氏名 大木 伸司

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第六部 職名 室長

研究要旨 多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)をはじめとする種々の自己免疫疾患では、Th1 細胞や Th17 細胞が、とくに初期の病態形成に重要な役割を果たす。我々はこれまで MS の病原性に関わる自己反応性 T 細胞の機能制御法の確立を目指して、網羅的遺伝子発現解析による病原性 T 細胞の性状解析を行い、MS 患者由来末梢血 T 細胞で選択的に発現亢進しているオーファン核内受容体 NR4A2 分子が、活性化 T 細胞からの炎症性サイトカイン産生を制御することを示してきた。今回、RNAi 干渉法の原理に基づいて構築した NR4A2 特異的 siRNA を用いて、NR4A2 の発現制御による新規自己免疫応答制御法の確立を目指して研究を進めた。その結果、NR4A2 が自己応答反応を含む IL-17 依存性の T 細胞反応に極めて密接な関連を示す重要な免疫応答制御因子であり、自己免疫疾患の治療標的として有力な標的分子の候補であることを明らかにした。

A. 研究目的

これまで MS の病原性に関わる自己反応性 T 細胞の機能制御法の確立を目的として、網羅的遺伝子発現解析による病原性 T 細胞の性状解析を進め、MS 患者由来末梢血 T 細胞で選択的に発現亢進しているオーファン核内受容体 NR4A2 分子が、活性化 T 細胞からの炎症性サイトカイン産生を制御することを見出した。今回、病原性 T 細胞の機能に対する NR4A2 の役割をさらに詳細に解析し、MS の病態形成に関わる病原性 T 細胞の機能と NR4A2 発現との相関の解明を試みた。

B. 研究方法

C57BL/6J(B6) マウスに MOG<sub>35-55</sub> ペプチドあるいは hIRBP<sub>1-20</sub> ペプチドを免疫することで、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導した。EAE マウスから脳・脊髄、末梢血、リンパ節と脾臓を回収し、フローサイトメーターを用いてヘルパー T 細胞をソーティングした。脳・脊髄は、それぞれコラゲナーゼ・DNase I 処理した後、パーコール密度勾配遠心法で単核球を分離し、ヘルパー T 細胞をソーティングした。Cytokine Secretion Assay Kit を組み合わせて、*in vitro* で PMA・イオノマイシン刺激した細胞について、IL-17 産生と IFN- $\gamma$  産生を指標に 4 分画し、各画分の NR4A2 発現を定量 RT-PCR 法を用いて定

量した。マウス脾臓から分離したナイーブ T 細胞 (CD4<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>high</sup>) に、Nucleofector (Amaxa 社) を用いて NR4A2 特異的 siRNA を導入し、*in vitro* の Th17 細胞誘導条件 (IL-6 + TGF- $\beta$ ) 下で培養した後の IL-17 産生を、ELISA 法あるいは細胞内サイトカイン染色法を用いて定量解析した。さらに同条件で培養した T 細胞における、IL-21、IL-23 受容体、および NR4A2 と ROR $\gamma$ t の発現を、それぞれ定量 PCR 法を用いて経時的に比較した。コラーゲンマトリクスに封入した NR4A2 特異的 siRNA を EAE 誘導マウスに静脈投与して、病態抑制効果を検討した。

(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

MOG 誘導性 EAE を発症したマウスの中枢神経系 (CNS) に浸潤した T 細胞および末梢血 T 細胞中には、相当数の IL-17 産生細胞および IFN- $\gamma$  産生細胞が認められ、さらに IL-17 と IFN- $\gamma$  を同時に産生する細胞も確認できた。Cytokine Secretion Assay Kit を組み合わせて、IL-17 と IFN- $\gamma$  の産生

を指標に得られた細胞を4群に分画し、各画分に含まれる T 細胞から抽出した RNA を用いて NR4A2 発現を定量 PCR 解析した。その結果、IFN- $\gamma$  産生とは無関係に、IL-17 産生細胞選択的な NR4A2 の高発現が認められ、標的臓器浸潤 T 細胞の IL-17 産生能と NR4A2 発現が強く相関することが明らかとなった。また in vitro 分化時に NR4A2 特異的 siRNA をトランスフェクションすると、得られた Th17 細胞中の NR4A2 発現と IL-17 産生をほぼ完全に抑制できた。この時、NR4A2 特異的 siRNA 処理により、in vitro 分化させた Th17 細胞の ROR  $\gamma$  t 発現と、Th1 細胞の IFN- $\gamma$  産生はほとんど影響を受けなかった。NR4A2 特異的 siRNA 処理により、Th17 細胞分化に必須の因子である T 細胞の IL-21 産生と、それに引き続く IL-23 受容体発現が強く抑制された。siRNA 処理による IL-23 受容体抑制は、IL-21 を添加することで回復したことから、NR4A2 特異的 siRNA による IL-17 産生抑制には、IL-21 産生から始まるサイトカイン産生カスケードをブロックすることで、Th17 細胞の分化が抑制されることによるものと考えられた。MOG ペプチド免疫時に、コラーゲンマトリクスに封入した NR4A2 特異的 siRNA をマウスに静脈投与すると、く EAE 病態が顕著に軽快した。この時、末梢血 T 細胞の NR4A2 発現は、siRNA 処理群で有意に抑制されていた。さらに、PMA・イオノマイシンで再刺激した後の CNS 浸潤細胞の IL-17 産生と、所属リンパ節由来 T 細胞の、抗原特異的 IL-17 産生は、いずれも siRNA 処理群で有意に抑制されていることが示された。

#### D. 考察

病原性 T 細胞における炎症性サイトカイン産生の制御因子と機能する可能性が示された NR4A2 分子について、とくに病態形成に深く関わることが知られている IL-17 産生に焦点を絞って、T 細胞における NR4A2 発現との機能的な相関を詳細に解析した。T 細胞の NR4A2 発現上昇は IL-17 産生細胞のみで認められ、IFN- $\gamma$  産生能とは相関しなかった。一方、in vitro で分化させた Th17 細胞の IL-17 産生が NR4A2 特異的 siRNA 処理によりほぼ完全に消失したことから、NR4A2 がエフェクター T 細胞の IL-17 産生に至る T 細胞分化過程に重要な役割を果たすことが示された。さらに NR4A2 は、Th17 細胞分化に必要な IL-21 産生と引き続く IL-23 受

容体発現に関わることが示され、NR4A2 が Th17 細胞の機能全般に深く関わる可能性が示された。さらに、コラーゲンマトリクス封入 siRNA の投与により EAE 病態と、Th17 細胞応答が有意に抑制されたことから、自己免疫疾患発症マウスの末梢血 T 細胞における NR4A2 発現を抑制することで、病態の改善が期待できることが明らかとなった。以上より、NR4A2 が T 細胞の IL-17 産生および Th17 細胞機能に極めて強く相関する重要な免疫応答制御因子であることが明らかとなった。今後、NR4A2 阻害作用を有する低分子化合物を探索することで、全く新しい自己免疫疾患治療薬候補が得られる可能性が示された。

#### E. 結論

NR4A2 は、自己応答反応に代表される IL-17 依存性の T 細胞反応に極めて密接な関連を示す重要な免疫応答制御因子であり、自己免疫疾患の治療につながる有望な標的分子の候補と考えられる。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

大木 伸司:核内受容体を標的とした Th17 細胞制御と自己免疫疾患、生化学(日本生化学会編)、第 82 巻 745-750 (2010)

大木 伸司:多発性硬化症の病態解析から新規治療法の開発へ、ファルマシア(日本薬学会編) 第 46 巻 745-749, (2010)

吉村 元、大木 伸司:Ustekinumab の有効性と疾患、Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology 第 4 巻 57-60, (2010)

##### 2. 学会発表

[国際学会]

Raveney B., **S. Oki**, T. Yamamura: Expression of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for IL-17 production by Th17 cells. **97th Annual Meeting of the American**

*Association of Immunologist*, Baltimore,  
May. 7<sup>th</sup>-11<sup>th</sup>, 2010

Raveney B., S. Oki, T. Yamamura: Expression  
of the orphan nuclear receptor NR4A2 is  
required for IL-17 production by Th17 cells.  
*14<sup>th</sup> International Congress of  
Immunology*, Kobe, Aug. 22<sup>nd</sup>-27<sup>th</sup>, 2010

S. Oki, Raveney B., T. Yamamura: Oral  
administration of the synthetic retinoid  
Am80 ameliorates Th17-mediated autoimmunity  
of the eye and central nervous system  
*14<sup>th</sup> International Congress of  
Immunology*, Kobe, Aug. 22<sup>nd</sup>-27<sup>th</sup>, 2010

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

## 多発性硬化症における腸管局在リンパ球（MAIT細胞）に関する研究

研究分担者 三宅 幸子 独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 室長

### 研究要旨

MR1 拘束性 T 細胞は、可変性の限られた T 細胞受容体(TCR)（マウス V $\alpha$ 19 J $\alpha$ 33、ヒト V $\alpha$ 7.2 J $\alpha$ 33）を有し、炎症病変に集積してサイトカインを産生する MHC クラス Ib 分子である MR1 拘束性のユニークなリンパ球であり、腸管などの粘膜に多く存在し、その分化が腸内細菌叢に依存することから、Mucosal associated invariant T (MAIT) 細胞とも呼ばれている。これまで、自己免疫動物モデルにおける MAIT 細胞の役割を検討してきたが、本研究では多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) における MAIT 細胞について検討を行った。MS 患者末梢血中では MAIT 細胞の頻度が減少しており、その頻度は MS の疾患活動性を反映していた。加えて、健常者においては MAIT 細胞の頻度と CD4<sup>+</sup>iNKT 細胞、CD56<sup>bright</sup>Natural Killer 細胞の頻度との間に正の相関関係が見られたが、MS 患者ではこの相関は確認できず、MAIT 細胞はこれら免疫制御細胞とシステムを形成し免疫制御を行っていること、および MS においてこのシステムに乱れが存在する可能性が示唆された。MAIT 細胞は、phorbol myristate acetate の刺激により IL-17 および IFN- $\gamma$  を産生するが、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体刺激には反応しなかった。さらに、末梢血単核細胞より MAIT 細胞を除去すると phytohemagglutinin 刺激に対する IFN- $\gamma$  産生が増強したことから、MAIT 細胞は T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生を抑制し、MS の病態抑制に関与すると考えられた。

### A. 研究目的

MAIT 細胞はヒト CD4/8 double negative T 細胞の解析中に iNKT 細胞とは異なるインバリエント T 細胞抗原受容体を発現する細胞集団として同定され、MAIT 細胞は MHC class Ib 分子に属する MR1 に拘束され、腸管粘膜に多く分布し、その分化や増殖に B 細胞および常在細菌叢を必要とする T 細胞集団である。われわれは MAIT 細胞が実験的自己免疫性脳脊髄炎において疾患抑制作用を持つこと、多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) の病巣部に MAIT 細胞が存在することを報告しているが、MS における MAIT 細胞の詳細な役割は不明である。本研究では MS の病態における MAIT 細胞の役割を検討した。

### B. 研究方法

対象は 13 名の健常者、および 26 名（寛解期 22 名、再発期 4 名）の MS 患者である。末梢血単核細胞を分離の後、MAIT 細胞の頻度、表面抗原をフローサイトメーターで解析した。MAIT 細胞は Martin らの報告に従い V $\alpha$ 7.2<sup>+</sup>CD161<sup>high</sup> の  $\alpha\beta$  T 細胞集団とし、V $\alpha$ 24iNKT 細胞、Natural Killer (NK) 細胞、およびそれらのサブポピュレーションの頻度を測定した。セルソーターを用いて分離した MAIT 細胞や、MAIT 細胞を除去した末梢血単核細胞の各種刺激に対するサイトカイン産生を ELISA 法を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

対象より血液サンプル採取は文書を用いて説明し、同

意を得た上で行った。その他個人情報の管理を含めて国立精神・神経医療研究センターの倫理規定に従った。

### C. 研究結果

末梢血 $\alpha\beta$ T細胞に占めるMAIT細胞の頻度の平均は、寛解期MS患者で2.32%、再発期MS患者で0.73%、健常者で3.92%と、MS患者では再発期、寛解期とも健常者と比べ有意に低値であった。MAIT細胞の頻度はMSの疾患活動性と相関し、活動性が高い患者でより低値であった。また、同一患者の再発期と寛解期を比較すると、再発期でより低値であった。健常者ではMAIT細胞の頻度とCD4<sup>+</sup>NKT細胞、CD56<sup>bright</sup>NK細胞の頻度との間に正の相関が見られたが、MS患者ではこの相関は確認できなかった。MAIT細胞はCCR5、CCR6、 $\alpha 4\beta 7$ インテグリンを高発現していた。末梢血単核細胞よりMAIT細胞を除去すると、phytohemagglutininに対するIFN- $\gamma$ 産生の亢進が見られた。一方で、MAIT細胞はCD3、CD28刺激に対して無反応であったが、phorbol myristate acetateの刺激によりIL-17およびIFN- $\gamma$ を産生し、炎症性サイトカインを組み合わせるとIFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ を産生した。

### D. 考察

ヒト末梢血中において、MAIT細胞は頻度の高い細胞集団を形成していた。末梢血T細胞の0.01~0.5%であるiNKT細胞と比較すると、MAIT細胞は相当に大きなポピュレーションであると言える。その頻度はMSの疾患活動性と関連して低下しており、MSの病勢を反映する疾患マーカーとして有用であると考えられた。また、CD4<sup>+</sup>NKT細胞、CD56<sup>bright</sup>NK細胞の頻度との相関関係から、MAIT細胞はこれら免疫制御細胞とシステムを形成し免疫制御を行っていること、およびMSにおいてこのシステムに乱れが存在する可能性が示唆された。さらにMAIT細胞はT細胞からのIFN- $\gamma$ 産生を抑制していることが示され、MSの病態抑制に関与することが推定された。一方で、MAIT細胞はCCR5、CCR6、 $\alpha 4\beta 7$ インテグリンを高発現し、これらを利用してMS病巣に浸

潤すると考えられるが、炎症性サイトカインの存在下では自らIFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ を産生し炎症増強細胞として作用する可能性もあり、MS病巣におけるMAIT細胞の役割を更に解明する必要があると考えられた。

### E. 結論

MAIT細胞はMS患者末梢血ではその頻度が低下し、その程度は疾患活動性と相関した。末梢血からMAIT細胞を除去すると、他のT細胞からのIFN- $\gamma$ 産生が増強することから、免疫調節に関与することが想定された。

### F. 健康危険情報

### G. 研究発表

#### I 論文発表

##### 原著

- 1) Noto D, Takahashi K, Miyake S, Yamada M. In vitro differentiation of lineage-negative bone marrow cells into microglia-like cells. *Eur J Neurosci* 31:1155-63, 2010
- 2) Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, Yamamura T. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci USA* in press.

##### 総説

- 1) 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, 51:127-147, 2010
- 2) 三宅幸子 : 腸管免疫と神経免疫のクロストーク.  
 Clinical Neuroscience  
 28(2) : 154-155, 2010
- 3) 三宅幸子 : NKT 細胞と疾患. 臨床リウマチ  
 22(2) : 154-160, 2010
- 4) 三宅幸子 : MAIT 細胞と自己免疫疾患. リウマチ  
 44(3) : 361-364, 2010
- 5) 三宅幸子, 山村隆 : NKT 細胞と多発性硬化症. *Mebio*.  
 27(6) : 95-101, 2010
- II 学会発表
- 国際学会
- 1) Miyake S. MAIT cells in autoimmunity  
 Neuroimmunology Kyoto Conference 2010, Kyoto,  
 August 18, 2010
- 2) Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D,  
 Yamamura T, Miyake S: The role of MR-lrestricted  
 MAIT cells in the pathogenesis of murines models  
 of arthritis. 10<sup>th</sup> Annual Conference of FOCIS,  
 Boston, June 24, 2010 (Clinical Immunology,  
 135S:S52, 2010)
- 3) Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D,  
 Yamamura T, Miyake S: The role of MR-lrestricted  
 MAIT cells in the pathogenesis of arthritis. 14<sup>th</sup>  
 International Congress of Immunology, Kobe, Aug  
 24, 2010
- 4) Ogura H, Satoh M, Gilfillan S, Miyake S, Onoe  
 K, Iwabuchi K: MR1-restricted NKT cells exhibit  
 beneficial role for the development of  
 atherosclerosis. 14<sup>th</sup> International Congress of  
 Immunology, Kobe, Aug 23, 2010
- 5) Lin Y, Miyake S, Yamamura T: Dominancy of  
 encephalitogenic peptide itself directs  
 sustainable regulation of a model of multiple  
 sclerosis, through induction of "armoured"  
 regulatory T cells. 14<sup>th</sup> International Congress  
 of Immunology, Kobe, Aug 23, 2010
- 6) Chihara N, Sato W, Aranami T, Miyazaki Y, Miyake  
S, Okamoto T, Ogawa M, Yamamura T: Auto-reactive  
 anti-aquaporin 4 antibodies are secreted from  
 periphrral plasma cell-like B cells in  
 neuromyelitis optica. 14<sup>th</sup> International  
 Congress of Immunology, Kobe, Aug 23, 2010
- 7) Noto D, Kazuya T, Yamamura T, Masahito Y, Miyake  
S: In vitro differentiation of lineage-negative  
 bone marrow cells and monocyte into  
 microglia-like cells. 10<sup>th</sup> International  
 Congress of Neuroimmunology, Barcelona, Nov15,  
 2010
- 8) Chiba A, Miyazaki Y, Ryohsuke T, Miho M, Tomi  
 C, , Ichikawa D, Iraide A, Yamamura T,  
 Vandebroek K, Miyake S: Celecoxib analogue  
 lacking COX-2 inhibitory activity suppresses  
 inflammatory disorders by inhibiting  
 inflammatory cytokines. 10<sup>th</sup> International  
 Congress of Neuroimmunology, Barcelona, Nov15,  
 2010

9) Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, Yamamura T: Plasma cell-like B cells produce aquaporin 4 autoantibody in neuromyelitis optica. 10<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology, Barcelona, Nov15, 2010

10) Lin Y, Miyake S, Yamamura T: Dominancy of encephalitogenic peptide itself directs sustainable regulation of a model of multiple sclerosis, by induction of "armoured" Tregs. 10<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology, Barcelona, Nov15, 2010

11) Chiba A, Ryohsuke T, Miho M, Tomi C, , Ichikawa D, Iraide A, Yamamura T, Vandebroek K, Miyake S: Celecoxib analogue lacking COX-2 inhibitory activity inhibits arthritis by suppressing IL-23 and inflammatory cytokines. American College of Rheumatology 73<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, Atlanta, Georgia, November 7, 2010 (Arthritis Rheum. 62:S371, 2010)

12) Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D, Yamamura T, Miyake S: Mucosal associated invariant T cells contribute to the pathogenesis of arthritis. American College of Rheumatology 73<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, Atlanta, Georgia, November 11, 2010 (Arthritis Rheum. 62:S938, 2010)

#### 国内学会

1) 三宅幸子: NKT 細胞と自己免疫. 第 53 回日本リウマチ学会, 横浜, 4 月 23 日, 2010 (第 54 回日本リウマチ学会総会抄録集 p243)

2) 千葉麻子、三宅幸子: 関節リウマチなど関節炎における MR1 拘束性 MAIT 細胞の役割、第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会、神戸、4.22, 2010 (第 54 回日本リウマチ学会総会抄録集 p500)

#### 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

多発性硬化症末梢血の microRNA プロフィールと標的遺伝子ネットワークに関する研究

分担研究者 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** 多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は、自己抗原反応性 T 細胞により惹起され、時間的空間的多発を特徴とする中枢神経系炎症性脱髄疾患である。回復期には髄鞘再生を認めるが、再発を反復して炎症が遷延化すると、軸索傷害や神経変性を来して不可逆的な機能障害を残す。MS は通常の血液検査では異常を認めず、診断は臨床症状・経過・神経学的所見・脳脊髄液所見・MRI 画像に基づいてなされるが、鑑別疾患が多く必ずしも容易ではない。近年、インターフェロンベータ(IFNB)の MS 再発抑制効果が立証された。MS 前駆病態である clinically isolated syndrome(CIS)では、早期に IFNB 治療を開始すると MS への移行を抑制可能である。早期治療開始のためには MS の高精度診断法の樹立が望まれる。最近、われわれは DNA マイクロアレイ解析により、MS 患者と健常者の末梢血 T 細胞で発現差異を認める遺伝子群を指標にして MS 病型分類データベースを樹立した(Satoh et al. J Neuroimmunol 174: 108-118, 2006)。2003 年にヒトゲノムが解読され、タンパク質をコードする領域が全ゲノムの僅か 1.2%であることがわかった。すなわち、ゲノムの大部分の領域が RNA に転写されても、タンパク質をコードしない non-coding RNA(ncRNA)である。MicroRNA(miRNA)は、ゲノムから転写される 22 塩基からなる短い ncRNA で、標的となる messenger RNA(mRNA)の 3'非翻訳領域(UTR)に結合して、発現を翻訳レベルで抑制する。現在までに、1048 種類のヒト miRNA がデータベース miRBase に登録されており、個々の miRNA は複数の標的遺伝子の発現を同時に抑制する。すなわち miRNA は、転写因子やエピジェネティクス機序と並び、主要な遺伝子発現制御系を構成し、発生・癌化・細胞死・免疫制御に関与していると考えられるが、MS 再発に直接関連する miRNA は明らかではない。本研究では、データベース Gene Expression Omnibus(GEO)に登録されている MS 末梢血の miRNA 発現データ(GSE17846)について、バイオインフォマティクス手法を駆使して再解析し、MS に特徴的な miRNA の同定と標的遺伝子およびその分子ネットワークの予測を試みた。本研究の成果は、miRNA を標的とする MS 診断法や治療法の開発につながると思われる。

**A. 研究目的**

MS は自己抗原反応性 T 細胞により惹起され、時間的空間的多発を特徴とする中枢神経系炎症性脱髄疾患である。回復期には髄鞘再生を認めるが、再発

を反復して炎症が遷延化すると、軸索傷害や神経変性を来して不可逆的な機能障害を残す。MS は通常の血液検査では異常を認めず、診断は臨床症状・経過・神経学的所見・脳脊髄液所見・MRI 画像に基づ

いてなされるが、鑑別疾患が多く必ずしも容易ではない。近年、IFNB の MS 再発抑制効果が立証された。MS 前駆病態である CIS では、早期に IFNB 治療を開始すると MS への移行を抑制可能である。早期治療開始のためには MS の高精度診断法の樹立が望まれる。最近、われわれは DNA マイクロアレイ解析により、MS 患者と健常者の末梢血 T 細胞で発現差異を認める遺伝子群を指標にして MS 病型分類データベースを樹立した(Satoh et al. J Neuroimmunol 174: 108-118, 2006)。さらに MS 患者の末梢血 T 細胞において、急性増悪期と完全寛解期で発現差異を呈する遺伝子群を同定し、MS 再発時の NF-kappaB 遺伝子発現制御系の異常を発見し報告した(Satoh et al. Dis Markers 25: 27-35, 2008)。

2003 年にヒトゲノムプロジェクトが完了し、全ヒト遺伝子約 22,000 の塩基配列が解読された。驚くことに、ヒトではタンパク質をコードする領域は、全ゲノムの僅か 1.2% であった。またゲノムの大半の領域が RNA に転写されても、タンパク質をコードしない non-coding RNA(ncRNA) であることが判明した。MicroRNA(miRNA)は、22 塩基からなる短い ncRNA で、その標的となる遺伝子の発現を翻訳レベルで抑制する(post-transcriptional regulation)。microRNA はゲノムから転写され、前駆体 pri-miRNA が RNase III Drosha で切断されてヘアピン状の pre-microRNA(70-100 塩基)となり、exportin-5 を介して核外へ輸送された後、RNase III Dicer で切断されて、一本鎖の mature miRNA となる。Mature miRNA は、RNA-induced silencing complex(RISC)に移行して、標的となる mRNA の 3'UTR に、不完全な配列相補性で結合してタンパク質の翻訳を抑制するか、完全な配列相補性で結合して

mRNA を分解する。

現在までに、1048 種類のヒト miRNA がデータベース miRBase(Release 16)に登録されており、個々の miRNA は複数の標的遺伝子の発現を同時に抑制する。多くの miRNA は、進化を通じてよく保存されており、その発現は時間的・空間的に制御され、発生・分化・癌化・細胞死・感染防御・免疫制御において、重要な役割を果たしている。全ヒト遺伝子の少なくとも 30%は、miRNA を介する発現調節を受けている。すなわち miRNA は、転写因子やエピジェネティクス機序と並び、主要な遺伝子発現制御系を構成している。さらに miRNA は疾患のバイオマーカーや治療薬として臨床応用可能なことが示唆されている(Elmén et al. Nature 452: 896-899, 2008)。

本研究では、遺伝子発現データベース Gene Expression Omnibus(GEO)に登録されている MS の miRNA 発現データ(GSE17846)について、バイオインフォマティクス手法を駆使して再解析し、MS に特徴的な miRNA の同定と標的遺伝子およびその分子ネットワークの予測を試みた。本研究の成果は、miRNA を標的とする MS 診断法や治療法の開発につながると思われる。

## B. 研究方法

GEO のデータセット GSE17846(Keller et al. Multiple sclerosis: microRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls. PLoS One 4: e7440, 2009)を用いた。GSE17846 は McDonald criteria に基づいて診断した 20 名の relapsing-remitting MS 患者(治療:10 名は IFNB, 9 名は glatiramer acetate, 1名は none)と 19 名の健常者 healthy controls (HC)の末梢血全血から、