

201122019A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 村 隆

平成24年（2012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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 村 隆

平成24年（2012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

■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 P5

■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 P9

■多発性硬化症と視神経脊髄炎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 P12

■Th17 細胞分化関連遺伝子群の網羅的解析

明治薬科大学 佐藤 準一 P15

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P27

IV. 研究成果の刊行物・別刷 P31

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

研究代表者 山村 隆 （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 部長

研究要旨

Th17細胞は炎症性サイトカインIL-17を産生する新しいリンパ球集団で、組織破壊的炎症を惹起する。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診断・予防・治療法を開発することにある。これまでに核内転写因子NR4A2がTh17細胞特異的に発現することを明らかにし、同分子がTh17細胞のサイトカイン産生に必須であることを示した。本年度は新たに作製したCD4陽性T細胞特異的NR4A2欠損マウスを用いて詳細な検討を進めた。

昨年度までにCCR2およびCCR5ケモカイン受容体を発現するメモリーCD4+T細胞T細胞（CCR2+CCR5+T細胞）が、多発性硬化症患者髄液で特異的に増加していることを見出した。このT細胞サブセットは、IFN- γ 及びIL-17の産生能を有する。今年度は正常ヒトアストロサイトと中枢神経実質基底膜成分ラミニンにより、*in vitro*血液脳関門（グリアリミタンス）モデルを用いて、MS増悪時に髄液で増加するこのT細胞集団は潜在的な血液脳関門破壊能を有することを証明した。

研究分担者

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

三宅幸子

（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

ほか、MS患者髄液で特異的に増殖しているT細胞集団として、ケモカイン受容体CCR2とCCR5の両者を発現するメモリーT細胞(CCR2+CCR5+ T細胞)を同定するなどの成果を挙げた。

最終年度は、昨年度までに確立したCD4陽性特異的NR4A2欠損(NR4A2c KO)マウスを用いて、Th17細胞、自己免疫、多発性硬化症病態におけるNR4A2の関与を詳細に解析した他、CCR2+CCR5+ T細胞の機能的特徴を明らかにするために、*in vitro*の血液脳関門モデルを確立して検討を進めた。

A. 研究目的

多発性硬化症(MS)の治療・予防法を開発するには、中枢神経に浸潤して炎症を惹起するリンパ球(脳炎惹起性細胞)の性状を明らかにすることが重要である。従来、脳炎惹起性細胞は、インターフェロン γ を産生するヘルパーT細胞(Th1細胞)であると考えられて来たが、2005年にインターロイキン17(IL-17)を産生するTh17細胞が同定され、その強い炎症誘導能や血液・脳関門(BBB)通過能に注目が集まり、MSをはじめとする免疫性神経疾患におけるTh17細胞の研究が盛んになった。

本研究ではTh17細胞の発現する転写因子の同定、MS病態に関わるリンパ球の同定、腸内細菌叢とTh17細胞および関連リンパ球の関係の解明などに関する研究を進めてきた。前年度までにTh17細胞サイトカイン産生に関わる転写因子としてNR4A2を同定した

B. 研究方法

EAEの誘導は完全フロイントアジュバントと混和したMOG35-55ペプチドをマウスの皮下に接種することによって行った。

CD4陽性特異的NR4A2欠損(NR4A2c KO)マウスの作成方法は分担研究報告書(大木)を参照。

MOG36-55ペプチド特異的T細胞応答の解析には、MOG特異的T細胞受容体とランスジェニックマウス(2D2)を用いた。

マウスTh17細胞の*in vitro*誘導には、IL-6 + TGF- β あるいはIL-1+IL-6+IL-23存在下での培養を行った。

ヒトリンパ球のフローサイトメーター解析：末梢

血単核細胞 (PBMC) また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特異抗体で染色して解析した ((詳細は分担研究報告書 (荒浪) を参照)。

Th17 細胞遺伝子群ネットワーク解析: ROR γ t 欠損マウス T 細胞の Th17 細胞分化誘導培養条件下における遺伝子発現データを用いて、バイオインフォマティクス手法を駆使して、Th17 細胞分化関連遺伝子群の網羅的解析および分子ネットワークの同定を試みた (佐藤の分担項目を参照)。

MAIT 細胞解析:

抗 V α 7.2 抗体染色後に Flow cytometer を用いて MAIT 細胞の末梢血中の頻度を解析した。また MAIT 細胞のサイトカイン産生を細胞内染色で解析した (三宅の分担)。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立精神・神経医療研究センターの動物実験倫理指針に則り、施設の動物実験委員会の承認を受けで行った。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 細胞特異的転写因子 NR4A2 の研究

NR4A2cKO マウスで EAE を誘導したところ、初期の EAE の発症が強く抑制されたが、対照マウスより 2 ~ 3 週間遅れて臨床スコアが同程度の EAE を発症した。この時、中枢神経内 T 細胞浸潤と、T 細胞の IL-17 産生を認め、GM-CSF 産生は対照マウスよりむしろ高値を示す傾向にあった。

NR4A2 欠損マウスと対照マウスのリンパ球から Th1 細胞 (IL-12) を分化させたところ、抗原特異的 IFN- γ 産生は、NR4A2 欠損により変化しなかったが、TGF- β 存在条件下 (IL-6+TGF- β) で分化させた Th17 細胞の抗原特異的 IL-17 産生が、NR4A2 欠損 T 細胞で有意に低下していた。興味深いことに、TGF- β 非存在条件 (IL-1+IL-6+IL-23) で分化させた IL-17 産生細胞の抗原特異的 IL-17 産生は、NR4A2 の有無によらず、同程度に認められた。よって、*in vitro* における IL-17 産生細胞誘導条件のうち、TGF- β 依存性の経路のみが NR4A2 依存性であることが明らかとなった。

2. 多発性硬化症脳脊髄液浸潤 T 細胞の解析

非炎症性神経疾患、炎症性神経疾患、再発時 MS の

PBMC と髄液細胞を比較した結果、メモリー CD4⁺ T 細胞中 CCR2+CCR5+亜分画は、MS の髄液で集簇していることが判明した。

CCR2-CCR5+亜分画も同様の結果を示したが、この細胞は対照疾患においても髄液で高頻度に認められることが確認され、MS 病態との関わりが強いのは CCR2+CCR5+細胞であることが明らかになった。

CCR2+CCR5+T 細胞を PMA とイオノマイシンで刺激すると、他のメモリー T 細胞に比較して、有意に高い IFN- γ と IL-17 を産生した。また、細胞内サイトカイン染色の結果、IFN- γ /IL-17 double producer を含むことが判明した。

CCR2+CCR5+T 細胞を活性化した後回収した培養上清には、マトロプロテイナーゼ 9 (MMP-9) 活性が含まれ、有意にオステオポンチン濃度が高い事が判明した。また CCR2+CCR5+T 細胞は、その他の T 細胞と比較して、*in vitro* の血液脳関門モデルにおいて浸潤能が有意に高いことが判明した。

3. Th17 細胞特異的遺伝子ネットワーク解析

Th17 細胞分化関連遺伝子群として 57 遺伝子を同定した。そのうち 12 遺伝子の発現が DIG 投与により 0.5-fold 以下に抑制された。57 遺伝子に関して、KeyMolnet 共通上流検索法による分子ネットワークでは、455 分子と 1164 分子リレーションからなる複雑なネットワークが描出され、SMAD による発現調節 ($p = 3.063E-81$), PIN1 シグナル伝達系 ($p = 4.175E-45$), RXR による発現調節 ($p = 5.714E-42$), RAR による発現調節 ($p = 2.606E-39$) との関連性を認めた。また KeyMolnet 共通上流検索法により、16 遺伝子の共通上流転写因子として、SMAD3, SMAD4 を同定した。

4. MAIT 細胞解析

健常人においては、抗 V α 7.2 抗体陽性の MAIT 細胞は末梢血の $\alpha\beta$ T 細胞の数%以上 (4.872% \pm 2.864SD, $n=16$) を占め、主に CD8 陽性もしくは CD4 陰性 CD8 陰性の double negative 細胞であった。多発性硬化症では 2.622% (\pm 2.864SD, $n=24$)、視神経脊髄炎患者末梢血においては 2.622% (\pm 2.864SD, $n=24$) であり、その頻度は有意差をもって減少していた。MAIT 細胞は、IL-12, IL-18 存在下で IFN- γ を産生した。ケモカイン受容体では、CCR5, CCR6 を発現していた。

D. 考察

Th17 細胞は 2005 年にマウスで同定されてから、その炎症惹起能や自己免疫・アレルギー疾患との関係に注目が集まり、数多くの研究が発表されている。Th17 細胞

胞が特異的に発現する転写因子としては ROR γ t や AhR が知られており、それぞれを標的とする創薬研究が進められている。我々は、これまでに多発性硬化症患者 T 細胞の遺伝子発現解析研究で同定した疾患関連分子 NR4A2 が、Th17 細胞において特異的に発現し、Th17 細胞のサイトカイン産生に関わる重要な機能分子であることを明らかにした。この研究成果は新たな治療標的を提供し、今後の創薬につながることを期待される。

一方、T 細胞の NR4A2 発現を阻害する conditioned knockout マウスの解析により、Th17 細胞には NR4A2 発現に完全に依存するものと、そうでないものの 2 種類が存在することも明らかになった。今後、ヒト Th17 細胞の解析も含めて、NR4A2 の炎症病態における関わりを詳細に解析する予定である。

Th17 細胞には好中球を動員して強い組織障害を誘導し、血液脳関門を容易に通過する能力も示唆されている。我々の作業仮説は、Th17 細胞が多発性硬化症患者髄液で選択的に増加しているというシンプルなものであったが、この妥当性を検証するために、ケモカイン受容体の発現パターンを系統的に解析した。

Th17 細胞は CCR2+CCR5⁻細胞集団、および CCR4+CCR6+細胞集団に含まれることが従来の研究で明らかになっているが、患者血液と髄液を対応した研究において、これらの Th17 細胞集団が髄液に動員されているという証拠は得られなかった。代わりに、CCR2+CCR5⁺の T 細胞集団が MS の髄液で特異的に増加していることを見いだした。

最近 Farbes ら (2010) は、T 細胞の中で CCR2-CCR5⁻細胞、CCR2-CCR5⁺細胞、CCR2+CCR5⁺細胞の順番に分化段階が進んでおり、CCR2+CCR5⁺細胞はサイトカイン産生能に優れ、多種類のケモカインに反応し、また細胞死が誘導されにくい高度に分化したエフェクターメモリー T 細胞であると報告している。我々の観察結果は、MS の髄液で高度に分化したエフェクターメモリー T 細胞が増加していることを意味しているが、この細胞集団の特徴として血液脳関門を破壊する MMP-9 発現や炎症惹起性サイトカイン osteopontin の発現を、世界ではじめて明らかにしたものである。

E. 結論

Th17細胞を出発点として、MSの病態や治療標的に関する重要な知見が得られた。NR4A2分子はTh17細胞の重要な機能分子であり、治療標的として興味深い。一方、マウスではNR4A2に非依存性のTh17細胞が存在することも明らかになった。今後は患者リンパ球の解析を進めて、多発性硬化症病態におけるTh17細胞関与の実態を明らかにする必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 108(9):3701-3706, 2011

2) Miyazaki Y, Miyake S, Chiba A, Lantz O, Yamamura T: Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int Immunol* 23(9):529-535, 2011

3) Chiba A, Tajima R, Tomi C, Miyazaki Y, Yamamura T, Miyake S: Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum* 64(1):153-61, 2011

4) Ichikawa D, Mizuno M, Yamamura T, Miyake S: Gene related to anergy in lymphocytes (GRAIL) regulates cytoskeletal reorganization thorough ubiquitination and degradation of Arp2/3-5 and coronin A. *J Biol Chem* 286(50):43465-74, 2011

5) Chiba A, Mizuno M, Tomi C, Tajima R, Alloza I, di Penta A, Yamamura T, Koen Vandebroek, Miyake S: A 4-trifluoromethyl analogue of celecoxib inhibits arthritis by suppressing innate immune cell activation. *Arthritis Res Ther* 14(1):R9, 2012

2. 学会発表

国際学会

Raveney B., S. Oki, T. Yamamura: NR4A2 controls Th17-mediated autoimmunity. Keystone Symposia 2011: Th17 Cells in Health and Disease (Q2), Keystone, Feb. 5th-10th, 2012

Raveney B., S. Oki, T. Yamamura: NR4A2, a nuclear receptor that controls pathogenic Th17 responses during autoimmune disease, is induced in T cells by target organ antigen presenting cells
British Society of Immunology Congress 2011, Liverpool, Dec. 5th-8th, 2011

[国内学会]

Raveney B., S. Oki, T. Yamamura: NR4A2, a nuclear receptor that controls pathogenic Th17 responses during autoimmune disease, is induced in T cells by target organ antigen presenting cells 第40回日本免疫学会総会・学術集会(千葉)、2011年11月27日

野口真行、大木伸司、山村隆: T細胞の Interleukin-9 産生に対するレチノイドの制御作用 第22回日本レチノイド研究会(東京)、2011年11月11日

大木伸司、ベン・レイバニー、山村隆: Th17 細胞依存性自己免疫応答に対するオーファン核内受容体 NR4A2 の機能的連関 日本薬学会第131年会(静岡)、2011年3月28日

山村隆、荒浪利昌、大木伸司、三宅幸子: 多発性硬化症: 自己免疫病仮説の再検証. 第39回日本臨床免疫学会総会・学術集会6学会合同特別シンポジウム、東京、9.16, 2011

林幼偉、三宅幸子、山村隆: EAE の寛解維持機構: 'armoured' Treg の誘導. 第23回日本神経免疫学会総会・学術集会、東京、9.15, 2011

能登大介、三宅幸子、高橋和也、山村隆、山田正仁: マウス及びヒトにおける末梢血単球からミクログリアへの分化誘導. 第23回日本神経免疫学会総会・学術集会、東京、9.17, 2011

富田敦子、佐藤和貴郎、市川大樹、林幼偉、岸田日帯、三宅幸子、小川雅文、岡本智子、村田美穂、黒岩義之、荒浪利昌、山村隆: メタロプロテイナーゼとオステオポンチンを高発現する CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の MS 病態への関与. 第23回日本神経免疫学会総会・学術集会、東京、9.17, 2011

千葉麻子、田村直人、松平欄、高崎芳成、山村隆、三宅幸子: 膠原病における Mucosal-associated invariant T 細胞の解析. 第40回日本免疫学会総会・学術集会、千葉、11.27, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

II. 分担研究報告

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 独) 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・室長

研究要旨

多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) 患者由来末梢血 T 細胞の網羅的遺伝子発現解析から、MS 患者 T 細胞で選択的に発現亢進し、病原性 Th17 細胞の機能と密接に関わるオーファン核内受容体 NR4A2 を同定し、その機能解析を進めてきた。今回、新たに作製した CD4 陽性 T 細胞特異的 NR4A2 欠損 (NR4A2cKO) マウスにおける実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) 感受性と、病態形成時の細胞応答の解析を行った。NR4A2cKO マウスでは抗原特異的 IL-17 産生と初期の EAE 発症が強く抑制され、NR4A2 が初期の EAE 病態に深く関わるということが分かった。興味深いことに NR4A2cKO マウスはより後期に EAE を発症し、対照群に匹敵する臨床スコアと IL-17 産生を認めたことから、EAE 後期では NR4A2 非依存性の IL-17 産生と EAE 病態の誘導がおきると考えられた。In vitro の解析から、TGF- β 存在下で分化誘導した T 細胞の IL-17 産生は NR4A2 依存性であり、一方で TGF- β 非存在下で分化誘導した T 細胞の IL-17 産生は NR4A2 欠損の影響を受けなかった。したがって、EAE 病態形成時に、NR4A2 依存性の異なる少なくとも 2 種類の IL-17 産生細胞が誘導され、それぞれ時期を異にして EAE の病態形成に関わるということが明らかとなった。

A. 研究目的

これまで、MS の病原性に関わる自己反応性 T 細胞の機能解明と、その制御法の確立を目的として行った網羅的遺伝子発現解析の結果、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 Th17 細胞の機能制御に密接に関わることを明らかにしてきた。今回、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) 発症に関わる病原性 T 細胞の機能に対する NR4A2 の役割をより詳細に解析するため、新たに CD4 陽性 T 細胞特異的 NR4A2 欠損 (NR4A2cKO) マウスを作製し、EAE の病態形成と病原性 Th17 細胞機能に対する NR4A2 の役割の解明を試みた。

B. 研究方法

マウス NR4A2 遺伝子の、開始コドンを含むエクソンの上流と下流に loxP 配列を含む遺伝子断片をそれぞれ挿入して作製したターゲットベクターを、C57BL/6 (B6) マウス由来の ES 細胞に遺伝子導入した。陽性クローン

をブラストシストにマイクロインジェクションして得たキメラマウスから floxed NR4A2 マウスを取得し、CD4-Cre マウスと交配することで NR4A2cKO マウス系統を樹立した。すべての実験で、対照マウスとして floxed NR4A2 ホモマウスを用いた。マウスに MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを免疫して EAE を誘導した後、経時的に観察し病態スコアを定量化した。各マウスから分離した脊髄をホルマリン固定し、スライス作製後ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および Luxol fast blue (LFB) 染色を行った。

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たソーティングにより CD4 陽性 T 細胞を分離した。脳・脊髄は、それぞれコラゲナーゼ・DNase I 処理後、パーコール密度勾配遠心法で分離した単核球からソーティングを行った。分離した細胞に対して、CD3/CD28 抗体刺激あるいは MOG/APC 刺激を行い、培養上清中の各種サイトカインを定量するとともに、各細胞から分離した RNA を用いて遺伝子発現

解析を行った。マウス脾臓およびリンパ節から分離したナイーブ T 細胞 (CD4⁺CD44⁻CD25⁻CD62L^{hi}) を各種サイトカイン存在下に CD3/CD28 抗体刺激あるいは MOG/APC 刺激を行い IL-17 産生細胞へ分化させ、同様にサイトカインの定量と遺伝子発現解析を行った。MOG 抗原特異的 T 細胞応答の解析には、MOG 抗原特異的 T 細胞受容体トランスジェニック (2D2) マウスを NR4A2cKO マウスと交配して得た NR4A2cKO/2D2tg マウスを用いた。In vitro の IL-17 産生細胞誘導は、TGF-β 依存性 (IL-6+TGF-β) 条件あるいは TGF-β 非依存性 (IL-1+IL-6+IL-23) 条件をそれぞれ用いた。

(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

MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを免疫して EAE を誘導した floxed NR4A2 ホモマウスは、野生型 B6 マウスと同程度の EAE の病態形成が認められ、loxP 遺伝子断片挿入による影響は認められなかった。一方、MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを免疫して EAE を誘導した NR4A2cKO マウスでは、初期の EAE の発症が強く抑制され、NR4A2 が初期の EAE 病態形成に深く関与することが示された NR4A2cKO マウスの中樞神経系 (CNS) を組織学的に解析すると、対照マウスよりは明らかに少ないものの、NR4A2cKO マウスでも EAE 発症初期に有意な T 細胞浸潤を認めた。ところが MOG ペプチドで再刺激を行うと、NR4A2cKO マウスの CNS から分離した T 細胞の IL-17 産生と GM-CSF 産生は有意に低下しており、代わりに IFN-γ 産生の亢進が認められた。興味深いことに、EAE を誘導した NR4A2cKO マウスの観察を続けると、対照マウスより 2~3 週間遅れて臨床スコアとしては同程度の EAE の発症が認められた。この時、CNS への細胞浸潤は少ないながらも有意に認められ、対照マウスとの間に差は認めなかった。同様に CNS から分離した T 細胞の

MOG ペプチド刺激による IL-17 産生は対照群と同程度に認められ、IFN-γ 産生は引き続き対照群より高い傾向にあった。興味深いことに、NR4A2cKO マウスの後期の GM-CSF 産生は、初期に比べて強く誘導されており、対照マウスよりさらに高値を示す傾向にあった。従って、EAE 病態の後期では、NR4A2 非依存性の IL-17 産生細胞が出現し、初期病態とは異なる病態形成が進行していることが明らかとなった。NR4A2cKO マウスの EAE 解析から、NR4A2 依存性の異なる IL-17 産生細胞の存在が示唆されたため、新たに樹立した NR4A2cKO/2D2tg マウスを用いてさらなる解析を試みた。In vitro で分化誘導した NR4A2 欠損 Th1 細胞 (IL-12) の抗原特異的 IFN-γ 産生は、対照 T 細胞とほぼ同程度に検出されたことから、Th1 細胞の IFN-γ 産生は NR4A2 非依存性であり、EAE 発症時に見られる IFN-γ 産生亢進は、Th1 細胞以外の細胞機能の変動によるものと考えられた。次に、TGF-β 存在条件下 (IL-6+TGF-β) で分化させた Th17 細胞の抗原特異的 IL-17 産生は、NR4A2 欠損 T 細胞で有意に低下していた。一方、TGF-β 非存在条件下 (IL-1+IL-6+IL-23) で分化させた IL-17 産生細胞の抗原特異的 IL-17 産生は、NR4A2 の有無によらず、同程度に認められた。興味深いことに、TGF-β 非存在条件 (IL-1+IL-6+IL-23) にさらに TGF-β を添加すると、対照 T 細胞ではさらなる IL-17 産生の亢進が認められるが、NR4A2 欠損 T 細胞を用いると TGF-β 非存在条件 (IL-1+IL-6+IL-23) からのさらなる亢進は認められなかった。よって、in vitro における IL-17 産生細胞誘導条件のうち、TGF-β 依存性の経路のみが NR4A2 依存性であることが明らかとなった。

D. 考察

これまで、MS の病原性に関わる自己反応性 T 細胞の機能解明と、その制御法の確立を目的として行った網羅的遺伝子発現解析の結果、MS 患者由来末梢血 T 細胞で選択的に発現亢進し、活性化 Th17 細胞の機能制御に密接に関わるオーファン核内受容体 NR4A2 分子の、EAE 病態形成における機能をより詳細に解析する

ため、新たに NR4A2cKO マウスを作製し、詳細な解析を行った。MOG ペプチドを免疫することで誘導した EAE 病態の解析から、NR4A2cKO マウスでは抗原特異的 IL-17 産生と初期の EAE 発症が強く抑制されることが明らかとなり、NR4A2 が抗原特異的 IL-17 産生をとともう EAE の初期病態形成に深く関わることを示された。興味深いことに NR4A2cKO マウスで誘導後期に発症する EAE では、臨床スコアおよび抗原特異的 IL-17 産生が対照群と比べて遜色なく認められることから、EAE 後期では NR4A2 非依存性の IL-17 産生を伴う病態が出現することが明らかとなった。これまで単相性の病型を示す B6 マウスの MOG 誘導性 EAE では、想定するさまざまな病原性 T 細胞群の時空間的な挙動を解析することは極めて困難であったが、本研究では、NR4A2cKO マウスの EAE 病態の解析から NR4A2 依存性の異なる少なくとも 2 種類の IL-17 産生細胞が存在し、各細胞がそれぞれ異なるタイミングで CNS に浸潤し、EAE 病態の形成に寄与していることを初めて明らかにした。B6 マウスの MOG 誘導性 EAE では、GM-CSF が主なエフェクターサイトカインであることが最近の報告から明らかにされているが、CNS 浸潤 T 細胞の抗原特異的 GM-CSF 産生は、実際の EAE 病態と良く相関しており、異なるタイミングで出現するこれらの病原性 T 細胞が産生する GM-CSF が、B6 マウスの MOG 誘導性 EAE で、持続的かつ単相性の病型を可能するものと考えられた。さらに *in vitro* の解析から、TGF- β 存在下で分化誘導した T 細胞の IL-17 産生は NR4A2 依存性である一方、TGF- β 非存在下で分化誘導した T 細胞の IL-17 産生は NR4A2 欠損の影響を受けないことが明らかとなった。よって、*in vivo* および *in vitro* の双方において、NR4A2 依存性の異なる少なくとも 2 種類の IL-17 産生細胞が存在することが明らかとなった。

今後、*in vivo* と *in vitro* におけるこれらの IL-17 産生細胞の相関を明らかにするとともに、時空間的に多様な病型を示すことが知られている MS 患者における、各々の T 細胞の関与を明らかにする必要があると考えられた。

E. 結論

NR4A2 依存性を指標として、少なくとも 2 種類の IL-17 産生細胞が EAE の病態形成に関与しており、NR4A2 は病原性 Th17 細胞を標的とした新たな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 なし

2. 学会発表

[国際学会]

Raveney B., S. Oki, T. Yamamura:

NR4A2, a nuclear receptor that controls pathogenic Th17 responses during autoimmune disease, is induced in T cells by target organ antigen presenting cells
British Society of Immunology Congress 2011, Liverpool, Dec. 5th-8th, 2011

Raveney B., S. Oki, T. Yamamura:

NR4A2 controls Th17-mediated autoimmunity
Keystone Symposia 2011: Th17 Cells in Health and Disease (Q2), Keystone, Feb. 5th-10th, 2012

[国内学会]

大木 伸司、ベン・レイバニー、山村 隆：
Th17 細胞依存性自己免疫応答に対するオーファン核内受容体 NR4A2 の機能的連関
日本薬学会第 131 年会、Mar. 28th-31th, 2011

野口 真行、大木 伸司、山村 隆：T 細胞の Interleukin-9 産生に対するレチノイドの制御作用
第 22 回日本レチノイド研究会、Nov. 11th-12th, 2011

Raveney B., S. Oki, T. Yamamura : NR4A2, a

nuclear receptor that controls pathogenic Th17 responses during autoimmune disease, is induced in T cells by target organ antigen presenting cells 第40回日本免疫学会総会・学術集会、Nov. 27th-29th, 2011

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

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 細胞が介在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バイオマーカーとして、末梢血と髄液浸潤細胞のフェノタイプ解析を行い、再発期の MS 髄液には、CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞サブセットが集積することを見出した。この T 細胞サブセットは、IFN- γ 及び IL-17 の産生能を有することが分かった。今年度我々は正常ヒトアストロサイトと中枢神経実質基底膜成分ラミニンにより、*in vitro* グリアリミタンスモデルを作成し、CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の潜在的な中枢神経系への浸潤能を解析した。その結果、CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞は、他の T 細胞と比較して、*in vitro* グリアリミタンスモデルの浸潤能が有意に高いことが判明した。以上より、MS 増悪時に髄液で増加する CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞は潜在的な血液脳関門破壊能を有し、MS 再発病態形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

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 細胞が介在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バイオマーカーとして T 細胞サブセットを同定する手法を報告している¹⁾。我々は昨年、4 種類のケモカイン受容体を指標として T 細胞亜分画を区別し、再発時 MS 髄液で CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞が増加することを報告した。MS の病態形成においては、血液脳関門の破綻、とくに基底膜とアストロサイト突起から成るグリアリミタンスの破綻が、重要なステップであると示唆されている。今回我々は、正常ヒトアストロサイトと中枢神経実質基底膜成分ラミニンにより、*in vitro* グリアリミタンスモデルを作成し、CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の浸潤能を解析した。

B. 研究方法

- (1) 対象：年齢、性別のマッチした MS 患者 12 名、非炎症性中枢神経疾患 6 名、炎症性神経疾患（髄膜炎、脳

炎など）患者 4 名、健常者 11 名である。

- (2) フローサイトメトリー：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。また、フローサイトメトリーセルソーターを用いて、CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞およびそれ以外の T 細胞をソーティングした。
- (3) Zymography：CCR2 陽性 CCR5 陽性亜分画およびメモリー T 細胞分画より CCR2 陽性 CCR5 陽性亜分画を除去した T 細胞を PMA とイオノマイシンで 24 時間刺激し、培養上清を type IV コラーゲンを含む SDS-PAGE 上で電気泳動したのち、37 度で一晩インキュベートし、最後にゲルをクマシーブルー染色する。
- (4) *in vitro* グリアリミタンスモデル：transwell インサート上面を、ラミニン 1 あるいはラミニン 2 でコートした後、インサートを反転

し、インサート下面にアストロサイトを捲き、一晚静置する (*in vitro* グリアリミタンスモデル)。精製 T 細胞分画を、*in vitro* グリアリミタンスモデルの upper well に捲き、8 時間後、lower well に移動した T 細胞数をフローサイトメトリーにより計数した。

(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) 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。非炎症性神経疾患に加えて、他の炎症性神経疾患も解析したが、末梢血と髄液での頻度に有意差は認められなかった。
- (2) 活性化 CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の培養上清はメタロプロテイナーゼ 9 (MMP-9) 活性を有するが、メモリー T 細胞より CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞を除去した T 細胞の培養上清は、MMP-9 活性を示さなかった。
- (3) CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞は、それ以外の他の T 細胞と比較して、*in vitro* グリアリミタンスモデルにおける浸潤能が有意に高いことが判明した。

D. 考察

MS 患者では CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞が再発期 MS の髄液中で選択的に増加していることが判明した。この T 細胞亜分画

が、他の T 細胞と比較して、MMP-9 産生能が高いことが分かった。MMP-9 はグリアリミタンスの破壊に重要なメディエーターであることが示唆されている。そこで、*in vitro* グリアリミタンスモデルを用いた中枢神経への潜在的浸潤能の解析の結果、CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞が他の T 細胞亜分画と比較して、高い浸潤能を有することが判明した。CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の高い浸潤能には、高い MMP-9 産生能が関与していると考えられる。

E. 結論

MS 増悪時に髄液中で増加する CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞は潜在的な血液脳関門破壊能を有し、MS 再発病態形成に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

荒浪利昌、「多発性硬化症・視神経脊髄炎に対する免疫療法」細胞工学 Vol. 30, No. 10, p1060-1063, 2011 年 10 月号

国際学会

T Cells Expressing Matrix Metalloproteinase-9 and Osteopontin in Multiple Sclerosis. Wakiro Sato, Atsuko Tomita, Daiju Ichikawa, Youei Lin, Hitaru Kishida, Sachiko Miyake, Masafumi Ogawa, Tomoko Okamoto, Miho Murata, Yoshiyuki Kuroiwa, Toshimasa Aranami, Takashi Yamamura, Annual Meeting of Federation of Clinical Immunology Societies, June 24, 2011, Washington DC, USA

国内学会

メタロプロテイナーゼ 9 とオステオポンチンを高発現する CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の MS 病態への関与、富田敦子、佐藤和貴郎、市川大樹、林幼偉、岸田日帯、

三宅幸子、小川雅文、岡本智子、村田美穂、黒岩義之、荒浪利昌、山村隆、第 23 回日本神経免疫学会学術集会、平成 23 年 9 月 17 日、東京京王プラザホテル

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

I. 参考文献

(1) J Immunol. 2007:7525-9. Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5- phenotype. Sato W, Aranami T, Yamamura T.

多発性硬化症と視神経脊髄炎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
研究協力者 千葉 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 研究員

研究要旨

腸管などの粘膜組織に多く存在する新規 Natural Killer T (NKT)細胞集団である Mucosal Associated Invariant T (MAIT)細胞の多発性硬化症と視神経脊髄炎における役割を検討した。MAIT細胞は、健常人末梢血の $\alpha\beta$ T細胞の数%~10%を占める大きな細胞集団であり、主にCD8陽性もしくはCD4陰性CD8陰性のdouble negative細胞であった。ケモカイン受容体は、CCR5, CCR6を発現し、IL-12, IL-18存在下でIFN- γ を産生した。多発性硬化症ならびに視神経脊髄炎患者末梢血においてはその頻度が減少しており、MAIT細胞はMSの病態に関与する重要な細胞集団であると考えられた。今後は多発性硬化症病態における役割を中心とした解析が重要である。

A. 研究目的

Mucosal associated invariant T (MAIT)細胞は、MR1分子に拘束されT細胞受容体にインバリアントな α 鎖（マウスV α 19J α 33、ヒトV α 7.2J α 33）を発現するT細胞である。我々はMAIT細胞を欠損するMR1^{-/-}マウスを用い、コラーゲン関節炎ならびに抗体誘導関節炎が軽症化する一方、実験的自己免疫性脳脊髄炎は悪化することを報告し、MAIT細胞は自己免疫病態の増悪にも抑制にも関与しうる可能性を示してきた。本研究では、多発性硬化症ならびに視神経脊髄炎におけるMAIT細胞の動態を明らかにし、病態における関連を明らかにする。

B. 研究方法

健常人ならびに多発性硬化症ならびに視神経脊髄炎患者末梢血のMAIT細胞の頻度を抗V α 7.2抗体にて染色後にFlowcytometerを用いて解析する。また、Cell sorterを用いて、末梢血の抗V α 7.2抗体陽性細胞のsingle cell sortingを行い、invariant V α 7.2J α 33を発現するMAIT細胞かどうかを検討する。MAIT細胞のケモカイン受容体の発現をFlowcytometerを用いて解析する。MAIT細胞のサイトカイン産生について、細胞内染色を行

いFlowcytometerを用いて解析する。

（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。その他個人情報管理を含めて国立精神・神経センターの倫理規定に従った。

C. 研究結果

健常人においては、抗V α 7.2抗体陽性のMAIT細胞は末梢血の $\alpha\beta$ T細胞の数%以上(4.872% \pm 2.864SD, n=16)を占め、主にCD8陽性もしくはCD4陰性CD8陰性のdouble negative細胞であった。多発性硬化症では2.622%(\pm 2.864SD, n=24)、視神経脊髄炎患者末梢血においては2.622%(\pm 2.864SD, n=24)であり、その頻度が有意差をもって減少していた。MAIT細胞は、IL-12, IL-18存在下でIFN- γ を産生した。ケモカイン受容体は、CCR5, CCR6を発現していた。

D. 考察

MAIT細胞は、健常人末梢血の $\alpha\beta$ T細胞の数%以上を占める大きな細胞集団であった。多発性硬化症ならびに視神経脊髄炎患者末梢血においては、その頻度が有意差をもって減少し

ていた。他の自己免疫疾患と比較すると、関節リウマチでは軽度低下、全身性エリテマトーデスでは著明に減少していた。また、MAIT細胞は、T細胞受容体からの刺激非存在下においても、IL-12, IL-18といったサイトカイン刺激に反応がみられ、病態下でのサイトカイン産生、病態における役割についての解析が重要と考えられた。

E. 結論

MAIT細胞の頻度は、多発性硬化症ならびに視神経脊髄炎患者末梢血において減少していた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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* 108(9):3701-3706, 2011

2) Miyazaki Y, Miyake S, Chiba A, Lantz O, Yamamura T: Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int Immunol* 23(9):529-535, 2011

3) Chiba A, Tajima R, Tomi C, Miyazaki Y, Yamamura T, Miyake S: Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum* 64(1):153-61, 2011

4) Ichikawa D, Mizuno M, Yamamura T, Miyake S: Gene related to anergy in lymphocytes (GRAIL) regulates cytoskeletal reorganization through ubiquitination and degradation of Arp2/3-5 and coronin A. *J Biol Chem* 286(50):43465-74, 2011

5) Chiba A, Mizuno M, Tomi C, Tajima R, Alloza I, di Penta A, Yamamura T, Koen Vandenberg,

Miyake S: A 4-trifluoromethyl analogue of celecoxib inhibits arthritis by suppressing innate immune cell activation. *Arthritis Res Ther* 14(1):R9, 2012

2. 学会発表

1) Miyake S. Innate lymphocytes in autoimmune diseases. Autoimmunity Congress Asia. Singapore, 18 November, 2011

2) 三宅幸子：自己免疫疾患における MAIT 細胞. 第 39 回日本臨床免疫学会総会・学術集会 6 学会合同特別シンポジウム、東京、9 月 16 日、2011

3) 三宅幸子：腸管免疫の視点から：腸管リンパ球と多発性硬化症. 第 23 回日本神経免疫学会総会、東京、9 月 17 日、2011

4) 千葉麻子、三宅幸子：マスト細胞の活性阻害を介した関節炎の抑制. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会、神戸、7. 19, 2011

5) 千葉麻子、田村直人、松平欄、頭山尚子、高崎芳成、山村隆、三宅幸子：膠原病における Mucosal-associated invariant T 細胞の解析. 第 39 回日本臨床免疫学会総会・学術集会、東京、9. 17, 2011

6) 山村隆、荒浪利昌、大木伸司、三宅幸子、：多発性硬化症：自己免疫病仮説の再検証. 第 39 回日本臨床免疫学会総会・学術集会 6 学会合同特別シンポジウム、東京、9. 16, 2011

7) 林幼偉、三宅幸子、山村隆：EAE の寛解維持機構：'armoured' Treg の誘導. 第 23 回日本神経免疫学会総会・学術集会、東京、9. 15, 2011

8) 能登大介、三宅幸子、高橋和也、山村隆、山田正仁：マウス及びヒトにおける末梢血単球からミクログリアへの分化誘導. 第 23 回日本神経免疫学会総会・学術集会、東京、9. 17,

2011

9) 富田敦子、佐藤和貴郎、市川大樹、林幼偉、岸田日帯、三宅幸子、小川雅文、岡本智子、村田美穂、黒岩義之、荒浪利昌、山村隆：メタロプロテイナーゼとオステオポンチンを高発現する CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の MS 病態への関与. 第 23 回日本神経免疫学会総会・学術集会、東京、9.17, 2011

10) 千葉麻子、田村直人、松平欄、高崎芳成、山村隆、三宅幸子：膠原病における Mucosal-associated invariant T 細胞の解析. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、千葉、11.27, 2011

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.

Th17 細胞分化関連遺伝子群の網羅的解析

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 多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)では、遺伝的要因と環境因子の複雑な相互作用を背景に出現した活性化自己反応性 CD4⁺ T helper type 1(Th1)細胞や Th17 細胞が、血液脳関門を通過して脳や脊髄に浸潤し、マクロファージやミクログリアを活性化して、TNF α , NO などの炎症増強因子の産生を誘導し、脱髄を惹起すると考えられている。MS の病態形成で中心的役割を果たしているのは、転写因子 ROR γ t を発現し、IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 を産生する Th17 細胞である。Th17 細胞は、IL-6 と TGF β の存在下で Th0 細胞から分化誘導される。IL-23, IL-1 β , IL-21, IL-7 は、Th17 の分化や増殖を協調的に促進する。Th17 細胞は活動期再発寛解型 MS 患者の血液中で増加し、脳病巣に集積している。MS 治療薬 interferon- β は、Th1 病には有効だが、Th17 病には無効であるとの報告がある。従って Th17 細胞分化を制御する分子機構を解明出来れば、MS 新規治療薬の創製につながる。本研究では、ROR γ t 欠損マウス T 細胞の Th17 細胞分化誘導培養条件下における遺伝子発現データを用いて、バイオインフォマティクス手法を駆使して、Th17 細胞分化関連遺伝子群の網羅的解析および分子ネットワークの同定を試みた。本研究の成果は、Th17 細胞を標的とする MS 治療法の開発につながると思われる。

A. 研究目的

MS では遺伝的要因と環境因子の複雑な相互作用を背景に出現した活性化自己反応性 CD4⁺ T helper type 1(Th1)細胞や Th17 細胞が、血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)を通過して脳や脊髄に浸潤し、マクロファージやミクログリアを活性化して、TNF α 、一酸化窒素(nitric oxide; NO)などの炎症増強因子の産生を誘導し、脱髄を惹起すると考えられている。MS は臨床経過から

relapsing-remitting MS(RRMS), secondary progressive MS(SPMS), primary progressive MS(PPMS)に分類され、病理学的には T 細胞浸潤、抗体補体沈着、オリゴデンドロサイトアポトーシスの所見により 4 タイプに分類されており(Lucchinetti et al. *Ann Neurol* 47: 707-717, 2000), 多様性(heterogeneity)を呈する。病態形成に関与するリンパ球には、Th1, Th17, Th9, Treg, CD8⁺ T, γ δ T, NK, NKT, B があり、Th1, Th17, Th9, CD8⁺ T, γ δ T はエ