

フェクターとして、Treg, CD8⁺ T, $\gamma\delta$ T, NK, NKT はレギュレーターとして働いている(図1)。

1990年代まで、MSはIFN γ 投与で増悪を認めた臨床試験の結果(Panitch et al. *Neurology* 37: 1097-1102, 1987)より、Th1病と見なされて来た。現在では、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 細胞であると考えられている (Th17-mediated disease)(McFarland and Martin. *Nat Immunol* 8: 913-919, 2007)。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。活動期 RRMS 患者の血液中では、Th17 細胞が非活動期や健康者に比較して 7 倍増加しており、髄鞘抗原 myelin basic protein(MBP)に対して反応性を呈する (Durelli et al. *Ann Neurol* 65: 499-509, 2009)。Th17 細胞は MS 脳の活動性病巣に集積している (Tzartos et al. *Am J Pathol* 172: 146-155, 2008)。CCR6⁺ Th17 細胞は、脈絡叢上衣細胞上に発現している CCL20 を介して脳内へ侵入する (Rebolidi et al. *Nat Immunol* 10: 514-523, 2009)。IL-17 は脳血管内皮細胞の tight junction を開くことにより、BBB の通過性を高める (Kebir et al. *Nat Med* 13: 1173-1175, 2007)。浸潤細胞における Th17/Th1 比の高値が、脳における炎症の局在化を規定している (Stromnes et al. *Nat Med* 14: 337-342, 2008)。MS 治療薬インター

フェロンベータ(IFNB)は、Th1 病には有効だが、Th17 病には無効であり、RRMS 患者のうち IFNB ノンレスポンスでは血清 IL-17F が増加しているとの報告がある (Axtell et al. *Nat Med* 16: 406-412, 2010)。

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。DNA マイクロアレイは、スライドガラス基盤上に数万遺伝子の cDNA やオリゴヌクレオチドを高密度に固定したチップで、個々の細胞における全遺伝子発現情報(transcriptome)を包括的に解析出来るツールである。近年、マイクロアレイを用いた網羅的解析により、癌や神経難病のバイオマーカーや創薬の標的分子が次々明らかにされた。またマイクロアレイ解析は、臨床所見や画像のみでは鑑別困難な疾患の補助診断、腫瘍悪性度や予後の予測、薬物応答や副作用の予測、治療効果の判定にも幅広く応用され、テーラメイド医療(personalized medicine)の樹立に必須の研究手法となっている。

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、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(GSE27241)を用いて、バイオインフォマティクス手法を駆使して再解析し、Th17 細胞分化関連遺伝子群の網羅的解析およびその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

薬の開発につながると思われる。

B. 研究方法

Th17 細胞分化関連遺伝子群の網羅的解析には、GEO のトランスクリプトームデータセット GSE27241(Huh et al. Digoxin and its derivatives suppress Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t activity. Nature 472: 486-490, 2011)を用いた。彼らは ROR γ t 欠損 (KO)マウスおよび C57BL/6 wild-type(WT)マウスのリンパ節・脾臓から FACS で分離した CD4⁺ naïve T cells をプレートコートした anti-CD3 ϵ antibody, anti-CD28 antibody で刺激し、さらに Th17-inducing condition(IL-6, TGF β , anti-IFN γ antibody, anti-IL-4 antibody 添加培地)で 48 時間培養して Th17 細胞の分化を誘導した。培養の途中で DMSO または DMSO に溶解した digoxin(DIG; 10 μ M)を添加し、DIG の Th17 細胞分化抑制効果を調べた。GSE27241 は、これらの細胞から total RNA を精製し、Mouse Genome 430 2.0 Array(34,000 genes; Affymetrix)で遺伝子発現プロフィールを解析し、robust multiarray average(RMA)法で正規化したデータセットである (WT-DMSO x 2, WT-DIG x 2, KO-DMSO x 2, KO-DIG x 2 サンプル)。

このデータに関して、WT-DMSO 群と KO-DMSO 群を比較し、Th17-inducing conditionにおいて前者で2倍以上発現誘導された 57 遺伝子を同定した (Th17 differentiation-related genes)。この 57 遺伝子

に関して、Cluster 3.0 と TreeView を用いて、階層クラスター解析を行った。また WT-DIG 群と WT-DMSO 群を比較し、前者で 0.5 倍以下に発現が低下した遺伝子群を同定した (DIG-responsive genes)。57 遺伝子に関して生物情報統合プラットフォーム KeyMolnet(医薬分子設計研究所)と Ingenuity Pathways Analysis(IPA; Ingenuity Systems)を用いて、分子ネットワークを解析し、DAVID Bioinformatics Resources 6.7(NIAID, NIH)を用いて、アノテーションを解析した。

(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

Th17 細胞分化関連遺伝子群として 57 遺伝子を同定した(表 1)。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(表 1 アンダーライン)。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(図 2)。一方 IPA では”Cell cycle, Cellular Assembly and Organization, DNA Replication,

Recombination, and Repair” Network($p = 1E-60$)との関連性を認めた。DAVID による解析でも、GO:0022402~cell cycle process($p = 1.08E-16$ by Bonferroni)との関連性が示唆された。

57 遺伝子を指標とする階層クラスター解析では、WT-DMSO, KO-DMSO, WT-DIG, KO-DIG 群は別々のクラスターを形成し、WT-DIG 群は KO-DMSO 群に近い遺伝子発現プロフィールを呈した(図 3)。また DIG で発現抑制された遺伝子のうち 11 遺伝子は独立したクラスターを形成し、これらの遺伝子を含む 16 遺伝子は協調的に抑制された可能性がある(co-regulation; 図 3 の点線で囲んだグループ)。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。

D. 考察

本研究では、初めに GSE27241 を再解析し、Th17 細胞分化関連 57 遺伝子を同定した。次に DIG による Th17 分化抑制効果(Huh et al. Nature 472: 486-490, 2011)に関与している 12 遺伝子を明らかにし、共通上流の転写因子 SMAD3, SMAD4 を同定した。SMAD3, SMAD4 は TGF β 受容体下流シグナル伝達で中心的な役割を果たす転写因子である。SMAD3 欠損マウスは重篤な自己免疫疾患を発症しないが、SMAD2 は Th17 細胞の分化に必須であることが、報告されている(Martinez et al. J Biol Chem 285: 29039-29043,

2010; Malhotra et al. J Biol Chem 285: 29044-29048, 2010)。

また 57 遺伝子の分子ネットワークとして、SMAD, retinoid 受容体(RXR, RAR)による発現調節との強い関連性を認めたことは、TGF β が Th17 細胞の分化に必須であり、Th17 特異的マーカーが ROR γ t, ROR α であることを考慮すると非常に興味深い。SMAD3 は ROR γ t と結合して、その活性を抑制する(Martinez et al. J Biol Chem 284: 35283-35286, 2009)。DIG は Huh らが 4,812 種類の低分子化合物を ROR γ t 転写活性化抑制を指標にスクリーニングし、ROR γ t と結合して Th17 分化を抑制することが判明した化合物である(Huh et al. Nature 472: 486-490, 2011)。また ROR γ t, ROR α と結合して Th17 分化を抑制する合成リガンド SR1001 も報告されている(Solt et al. Nature 472: 491-494, 2011)。

本研究の結果は、DIG は SMAD 系 (SMAD3, SMAD4) を抑制することにより、IL-17A, IL-17F, IL-22, iodotyrosine deiodinase (Iyd), nebullette (Neb1), protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14c (ppp1c14c), nuclear protein 1 (nupr1) などの Th17 細胞分化関連遺伝子の発現を抑制する可能性を示唆している(佐藤. 炎症と免疫. 2011)。

E. 結論

GEO トランスクリプトームデータセット GSE27241 をバイオインフォマティクスの手法で解析し、Th17 細胞分化関連 57 遺伝子群と

中心的転写因子 SMAD3, SMAD4 を同定出来た。これらの遺伝子は Th17 を抑制する MS 治療薬の分子標的となりうる。

F.健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tabunoki H, Ode H, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, Mita K, Yamamoto K, Sato R, Ishii-Nozawa R, Satoh J: BmDJ-1 is a key regulator of oxidative modification in the development of the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS One* 6(3): e17683, 2011.
2. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Futamura N, Kobayashi M, Toyoshima I, Yoshioka T, Enomoto K, Arai N, Arima K: Immunohistochemical characterization of microglia in Nasu-Hakola disease brains. *Neuropathology* 31(4): 363-375, 2011.
3. Satoh J, Tabunoki H: Comprehensive analysis of human microRNA target networks. *BioData Mining* 4: e17, 2011.
4. Yoshino T, Tabunoki H, Sugiyama S, Ishii K, Kim SU, Satoh J: Non-phosphorylated FTY720 induces apoptosis of human microglia by activating SREBP2. *Cellular and Molecular Neurobiology* 31(7): 1009-1020, 2011.
5. Numasawa Y, Yamaura C, Ishihara S, Shintani S, Yamazaki M, Tabunoki H, Satoh J: Nasu-Hakola disease with a splicing mutation of TREM2 in a Japanese family. *European Journal of Neurology* 18(9): 1179-1183, 2011.
6. Nakamagoe K, Shioya A, Yamaguchi T, Takahashi H, Koide R, Monzen T, Satoh J, Tamaoka A. A Japanese case with Nasu-Hakola disease of DAP12 gene mutation exhibiting precuneus hypoperfusion. *Internal Medicine* 50(22): 2839-2844, 2011.
7. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K: Immunohistochemical characterization of gamma-secretase activating protein expression in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology* in press, 2011.
8. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Futamura N, Kobayashi M, Toyoshima I, Yoshioka T, Enomoto K, Arai N, Saito Y, Arima K: Phosphorylated Syk expression is enhanced in Nasu-Hakola disease brains. *Neuropathology* in press, 2011.
9. Satoh J: Molecular network of microRNA targets in Alzheimer's disease brains. *Experimental Neurology* in press, 2011.
10. Satoh J, Shimamura Y, Tabunoki H: Gene expression profile of THP-1 monocytes

following knockdown of DAP12, a causative gene for Nasu-Hakola disease. Cellular and Molecular Neurobiology in press, 2011.

11. 佐藤準一: 神経変性と神経炎症の分子ネットワーク解析. 脳内免疫システム: 明らかになる神経疾患との関わり. 細胞工学 30(10): 1028-1035, 2011.
12. 佐藤準一: 分子ネットワークからみた多発性硬化症の創薬標的分子. 特集 I 神経免疫の新展開. 炎症と免疫 19(6): 543-552, 2011.

著書

1. Satoh J: Molecular network analysis of target RNAs and interacting proteins of TDP-43, a causative gene for the neurodegenerative diseases ALS/FTLD. In Biomedical Engineering and Cognitive Neuroscience for Healthcare: Interdisciplinary Applications, ed by Wu J. IGI Global, Hershey, Pennsylvania, 2011, in press.
2. Satoh J: Human microRNA targetome indicates a specialized role of microRNAs in regulation of oncogenesis. In Systems Biology and Cancer, ed by Azumi AS. Springer, Netherlands, 2011, in press.
3. 佐藤準一: 2. 網羅的遺伝子発現解析からみた病因・病態. 第1章 多発性硬化症の病態と診断 K. 病因・病態をめぐって. アクチュアル脳・神経疾患の臨床.

最新アプローチ 多発性硬化症と視神経脊髄炎. 辻省次・吉良潤一編. 中山書店、2011, 印刷中.

2. 学会発表

国際学会

1. Satoh J, Tabunoki H, Arima K: Immunohistochemical characterization of microglia in Nasu-Hakola disease brains. 63rd Annual Meeting of American Academy of Neurology. Honolulu, 2011.4.12.
2. Satoh J, Tabunoki H: Molecular network analysis of microRNA targets suggests aberrant expression of cell cycle regulators in Alzheimer's disease brains. The 9th International Workshop on Advanced Genomics. Revolution of Genome Science. Tokyo, 2011.7.12.
3. Tabunoki H, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, Mita K, Satoh J: BmDJ-1 is a key regulator of oxidative modification in the development of the silkworm, *Bombyx mori*. Queenstown Molecular Biology Meetings 2011. Queenstown, New Zealand, 2011.8.30.
4. Tabunoki H, Shimada T, Mita K, Banno Y, Satoh J: BmDJ-1 is a key regulator of oxidative modification in the development of the silkworm, *Bombyx mori*. 2011 Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC,

2011.11.14.

国内学会

1. 天竺桂弘子、嶋田透、伴野豊、三田和英、佐藤令一、野澤玲子、佐藤準一: カイコ DJ-1 オルソログは NO により酸化される. 日本薬学会第 131 年会. 静岡、2011.3.28.
2. 佐藤準一、吉野隆、小口翔、天竺桂弘子: TDP-43 インターラクトームの分子ネットワーク解析. 日本薬学会第 131 年会. 静岡、2011.3.28.
3. 天竺桂弘子、嶋田透、伴野豊、三田和英、佐藤令一、野澤玲子、佐藤準一: カイコ DJ-1 オルソログは NO により酸化される. 第 52 回日本神経学会総会. 名古屋、2011.5.18.
4. 沼沢祥行、山浦千春、石原正一郎、新谷周三、山崎峰雄、天竺桂弘子、佐藤準一: 本邦初の TREM2 遺伝子変異による那須ハコラ病の一家系. 第 52 回日本神経学会総会. 名古屋、2011.5.20.
5. 佐藤準一、天竺桂弘子、石田剛、柳下三郎、陣内研二、二村直伸、小林道雄、豊島至、吉岡年明、榎本克彦、新井信隆、有馬邦正: 那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究. 第 52 回日本神経学会総会. 名古屋、2011.5.20.
6. 佐藤準一、天竺桂弘子、石田剛、柳下三郎、陣内研二、二村直伸、小林道雄、豊島至、吉岡年明、榎本克彦、新井信隆、有馬邦正: 那須ハコラ病脳ミクログリアの免疫組織化学的解析. 第 52 回日本神経病理学会総会. 京都、2011.6.4.
7. 佐藤準一: 神経難病の病態解明のための分子ネットワーク解析. Ingenuity Pathways Analysis ユーザーミーティング. 招待講演. 東京、2011.9.1.
8. 佐藤準一、天竺桂弘子、石田剛、有馬邦正: アルツハイマー病脳における GSAP の発現解析. 第 34 回日本神経科学大会. Neuro2011. 横浜、2011.9.15.
9. 佐藤準一、吉野隆、天竺桂弘子、杉山重夫、石井啓太郎、Seung U. Kim: FTY720 の SREBP2 活性化を介するヒトミクログリアのアポトーシス誘導. 第 23 回日本神経免疫学会学術集会 東京、2011.9.17.
10. 天竺桂弘子、嶋田透、伴野豊、三田和英、佐藤令一、佐藤準一: カイコ DJ-1 オルソログは NO により酸化される. 第 84 回日本生化学会大会. 京都、2011.9.22.
11. Satoh J, Tabunoki H: Molecular network analysis of microRNA targets suggests aberrant expression of cell cycle regulators in Alzheimer's disease brain. 日本バイオインフォマティクス学会 2011 年会. 神戸、2011.11.8.
12. 佐藤準一、吉野隆、天竺桂弘子、杉山重夫、石井啓太郎、Seung U. Kim: FTY720 は SREBP2 活性化を介してヒトミクログリアのアポトーシスを誘導する. 第 40 回日本免疫学会学術集会 幕張、2011.11.29.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録

- 該当なし
3. その他
なし

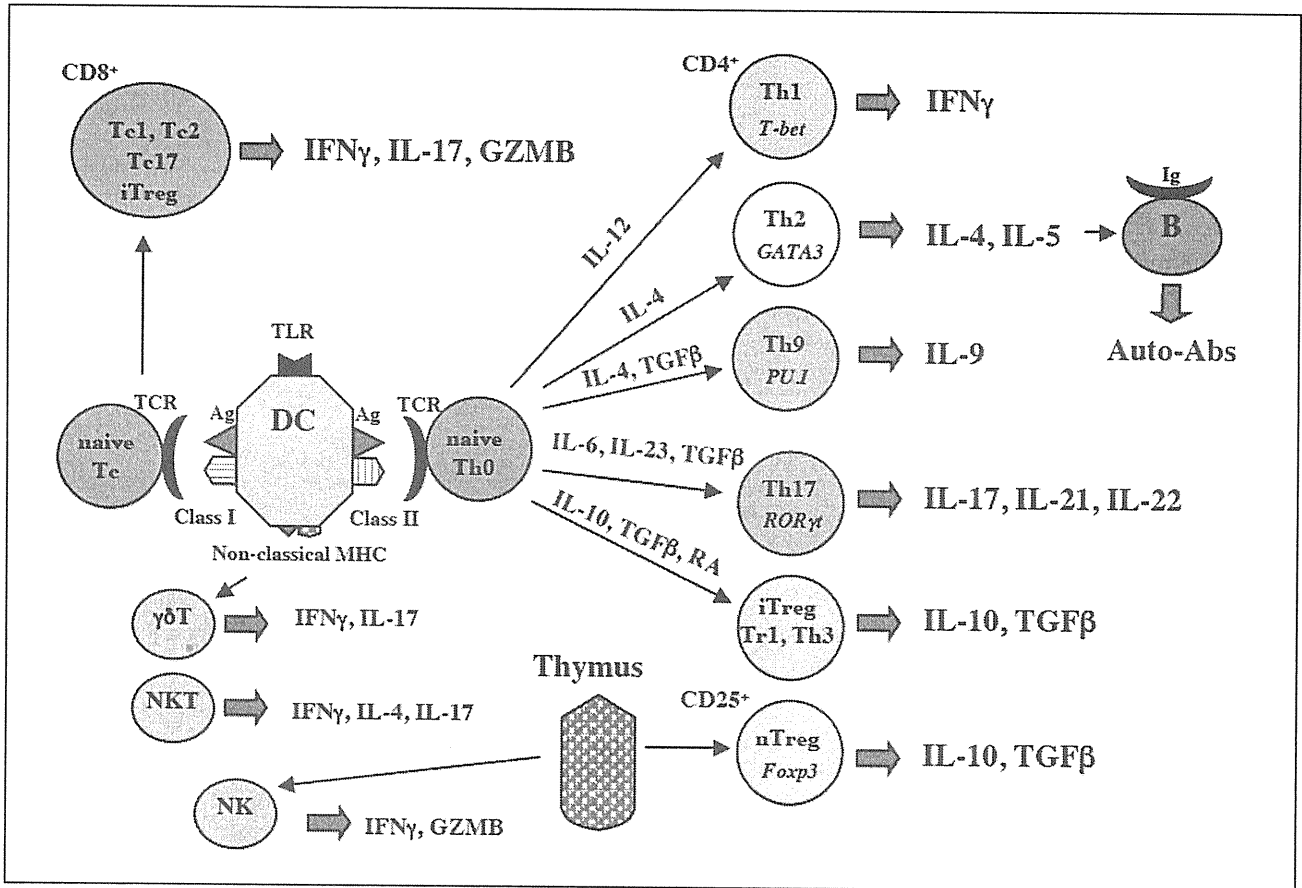


図 1. MS 病態形成に関与するリンパ球。イタリックは主要な転写因子を示す。

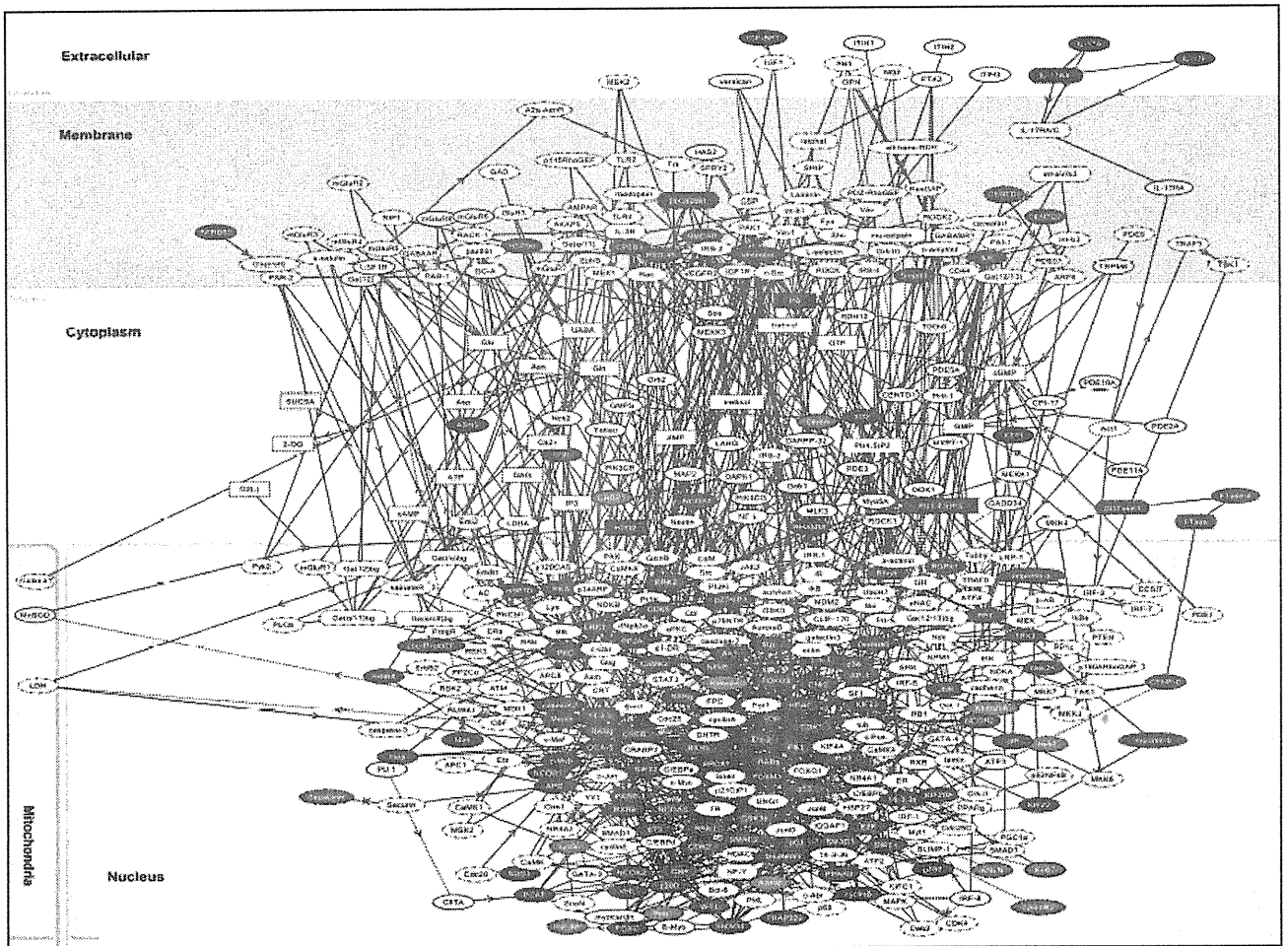


図 2. Th17 細胞分化関連 57 遺伝子の分子ネットワーク. KeyMolnet 共通上流検索法による Th17 細胞分化関連 57 遺伝子の分子ネットワークでは、455 分子と 1164 分子リレーションからなる複雑なネットワークが描出され、SMAD による発現調節($p = 3.063E-81$), PIN1 シグナル伝達系($p = 4.175E-45$), RXR による発現調節($p = 5.714E-42$), RAR による発現調節($p = 2.606E-39$)との関連性を認めた。

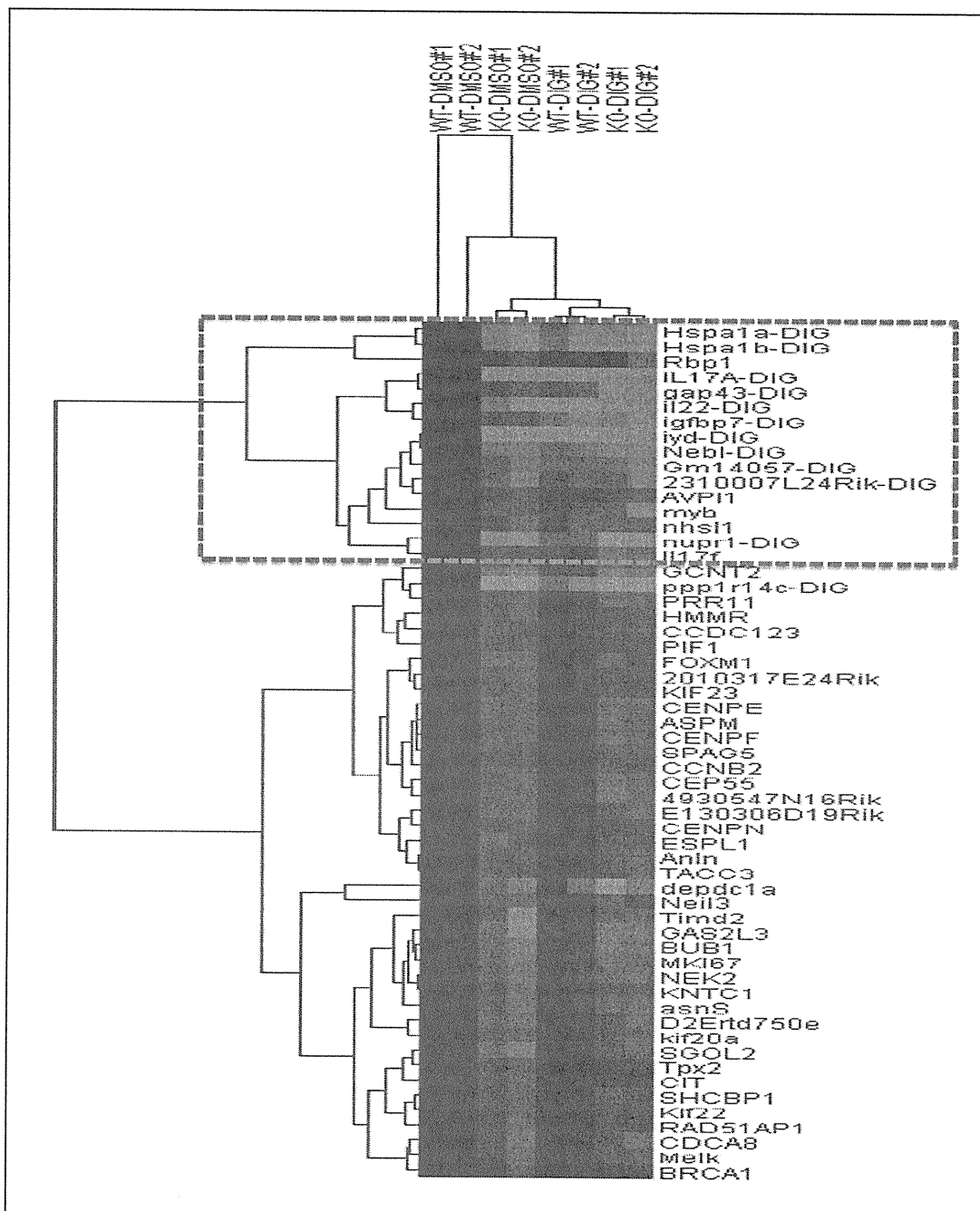


図 3. Th17 細胞分化関連 57 遺伝子の階層クラスター解析. WT-DMSO, KO-DMSO, WT-DIG, KO-DIG 群は別々のクラスターを形成し、WT-DIG 群は KO-DMSO 群に近い遺伝子発現プロファイルを呈した。また DIG で発現抑制された遺伝子(-DIG)のうち 11 遺伝子は独立したクラスターを形成し、これらの遺伝子を含む 16 遺伝子は協調的に抑制された可能性がある(co-regulation;点線で囲んだグループ)。

Table 1. The 57 Genes Involved in Th17 Cell Differentiation

Entrez Gene ID	Gene Symbol	Gene Name	Ratio
70337	<u>iyd</u>	iodotyrosine deiodinase	11.06223347
16171	<u>IL17A</u>	interleukin 17A	4.298263014
76142	<u>ppp1r14c</u>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14c	4.254875202
193740	<u>Hspa1a</u>	heat shock protein 1A	3.473340617
50929	<u>il22</u>	interleukin 22	3.387582011
15511	<u>Hspa1b</u>	heat shock protein 1B	3.383543197
56312	<u>nupr1</u>	nuclear protein 1	3.229920356
14538	<u>GCNT2</u>	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, I-branching enzyme	2.791072035
74103	<u>Nebi</u>	nebulette	2.763984916
75573	<u>2310007L24Rik</u>	RIKEN cDNA 2310007L24 gene	2.551437154
68549	<u>SGOL2</u>	shugoshin-like 2 (S. pombe)	2.525183151
237436	<u>GAS2L3</u>	growth arrest-specific 2 like 3	2.471572849
76131	<u>depd1a</u>	DEP domain containing 1a	2.429654461
100043766	<u>Gm14057</u>	predicted gene 14057	2.371808552
14235	<u>FOXM1</u>	forkhead box M1	2.369937783
230098	<u>E130306D19Rik</u>	RIKEN cDNA E130306D19 gene	2.296536876
171284	<u>Timd2</u>	T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 2	2.287974663
12235	<u>BUB1</u>	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (S. cerevisiae)	2.259761636
51944	<u>D2Ertd750e</u>	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 750, expressed	2.242307017
17863	<u>myb</u>	myeloblastosis oncogene	2.236202317
229841	<u>CENPE</u>	centromere protein E	2.222157964
270906	<u>PRR11</u>	proline rich 11	2.190160848
12316	<u>ASPM</u>	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)	2.184006425
108000	<u>CENPF</u>	centromere protein F	2.18322741
17345	<u>MIK167</u>	antigen identified by monoclonal antibody Ki 67	2.160891656
14432	<u>gap43</u>	growth associated protein 43	2.154627483
105988	<u>ESPL1</u>	extra spindle poles-like 1 (S. cerevisiae)	2.153552097
15366	<u>HMMR</u>	hyaluronan mediated motility receptor (RHAMM)	2.150866852
27053	<u>asnS</u>	asparagine synthetase	2.148103478
52276	<u>CDC48</u>	cell division cycle associated 8	2.147733334
18005	<u>NEK2</u>	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2	2.146396959
72080	<u>2010317E24Rik</u>	RIKEN cDNA 2010317E24 gene	2.145042335
74107	<u>CEP55</u>	centrosomal protein 55	2.127136942
29817	<u>igfbp7</u>	insulin-like growth factor binding protein 7	2.126443069
71819	<u>KIF23</u>	kinesin family member 23	2.09929744
75317	<u>4930547N16Rik</u>	RIKEN cDNA 4930547N16 gene	2.098269048
12704	<u>CIT</u>	citron	2.095044133
72140	<u>CCDC123</u>	coiled-coil domain containing 123	2.077777557
234258	<u>Nei3</u>	nei like 3 (E. coli)	2.076638686
12442	<u>CCNB2</u>	cyclin B2	2.073293563
72119	<u>Tpx2</u>	TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis)	2.066903204
68743	<u>Anln</u>	anillin, actin binding protein	2.056915386
20419	<u>SHCBP1</u>	Shc SH2-domain binding protein 1	2.04925992
208084	<u>PIF1</u>	PIF1 5'-to-3' DNA helicase homolog (S. cerevisiae)	2.042161782
17279	<u>Melk</u>	maternal embryonic leucine zipper kinase	2.042030628
19348	<u>kif20a</u>	kinesin family member 20A	2.037689335
21335	<u>TACC3</u>	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	2.032772363
208628	<u>KNTC1</u>	kinetochore associated 1	2.024060998
19659	<u>Rbp1</u>	retinol binding protein 1, cellular	2.021444032
72155	<u>CENPN</u>	centromere protein N	2.020969638
257630	<u>Il17f</u>	interleukin 17F	2.015995004
215819	<u>nhs1l</u>	NHS-like 1	2.015419623
54141	<u>SPAG5</u>	sperm associated antigen 5	2.014992713
12189	<u>BRCA1</u>	breast cancer 1	2.013037724
19362	<u>RAD51AP1</u>	RAD51 associated protein 1	2.010047342
110033	<u>Kif22</u>	kinesin family member 22	2.001955889
69534	<u>AVP11</u>	arginine vasopressin-induced 1	2.001736357

The set of 57 genes upregulated greater than 2-fold in T cells of wild-type mice compared with those of ROR γ t-deficient mice when cultured in Th17-inducing conditions. The 12 genes downregulated greater than 2-fold by treatment with digoxin are underlined.

表 1. Th17 細胞分化関連 57 遺伝子。アンダーラインは digoxin(DIG)で発現が抑制される遺伝子を示す。

Ⅲ.研究成果の刊行に関する一覧表

平成23年度 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	出版社名	出版年
		書籍名	出版地	ページ
佐藤和貴郎 山村 隆	多発性硬化症とTh17細胞	鈴木則宏, 祖父江元, 荒木信夫, 宇川義一, 川原信隆	中外医学社.	2012
		Annual Review 神経2012	東京	253-260
山村 隆	脱髄疾患	江藤文夫, 飯島節	南江堂	2011
		神経内科学テキスト 改訂第3版	東京	211-218
SatoH_I	Molecular network analysis of target RNAs and interacting proteins of TDP-43, a causative gene for the neurodegenerative diseases ALS/FTLD.	Wu J	IGI Global	2011
		Biomedical Engineering and Cognitive Neuroscience for Healthcare: Interdisciplinary Applications	Pennsylvania	in press
SatoH_I	Human microRNA targetome indicates a specialized role of microRNAs in regulation of oncogenesis.	Azumi AS	Springer	2011
		Systems Biology and Cancer	Netherlands	in press
佐藤 進一	アクアポリン-4(AQP-4).	山村隆	診断と治療社	2011
		多発性硬化症 (MS) 診療のすべて	東京	in press
佐藤 進一	多発性硬化症 (MS) の血液診断.	山村隆	診断と治療社	2011
		多発性硬化症 (MS) 診療のすべて	東京	in press
佐藤 進一	DNAマイクロアレイ.	山村隆	診断と治療社	2011
		多発性硬化症 (MS) 診療のすべて	東京	in press
佐藤 進一	網羅的遺伝子発現解析からみた病因・病態. 多発性硬化症の病態と診断. 病因・病態をめぐって.	辻省次・吉良潤一	中山書店	2011
		アクチュアル脳・神経疾患の臨床. 最新アプローチ 多発性硬化症と視神経脊髄炎	東京	in press

平成23年度研究成果に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Chiba A, Mizuno M, Tomi C, Tajima R, Alloza I, di Penta A, <u>Yamamura T</u> , Koen Vandebroek, <u>Miyake S</u>	A 4-trifluoromethyl analogue of celecoxib inhibits arthritis by suppressing innate immune cell activation.	Arthritis Res Ther	14	R9 (Epub)	2012
<u>Miyake S</u>	Mind over cytokines: Crosstalk and regulation between the neuroendocrine and immune systems	Clin Exp Neuroimmunol	3	1-15	2012
Chiba A, Tajima R, Tomi C, Miyazaki Y, <u>Yamamura T</u> , <u>Miyake S</u>	Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis.	Arthritis Rheum	64(1)	153-161	2012
Chihara N, <u>Aranami T</u> , Sato W, Miyazaki Y, <u>Miyake S</u> , <u>Okamoto T</u> , Ogawa M, Toda T, <u>Yamamura T</u> .	Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica.	Proc Natl Acad Sci USA	108	3701-06	2011
Sanvito L, Tomita A, Chihara N, Okamoto T, Lin Y, Ogawa M, Gran B, <u>Aranami T</u> , <u>Yamamura T</u> .	Increase of Ki-67+ natural killer cells in multiple sclerosis patients treated with interferon- β and interferon- β combined with low-dose oral steroids	J. Neuroimmunol.	236(1-2)	111-7	2011
Miyazaki Y, <u>Miyake S</u> , Chiba A, Lantz O, <u>Yamamura T</u>	Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis.	Int Immunol	23	529-535	2011
Ichikawa D, Mizuno M, <u>Yamamura T</u> , <u>Miyake S</u>	GRAIL(Gene related to anergy in lymphocytes) regulates cytoskeletal reorganization thorough ubiquitination and degradation of Arp2/3 subunit 5 and coronin 1A.	J Biol Chem	286	43465-74	2011
Yoshino T, Tabunoki H, Sugiyama S, Ishii K, Kim SU, <u>Satoh J</u> .	Non-phosphorylated FTY720 induces apoptosis of human microglia by activating SREBP2.	Cellular and Molecular Neurobiology	31 (7)	1009-1020	2011
<u>Satoh J</u> , Tabunoki H.	Comprehensive analysis of human microRNA target networks.	BioData Mining	4	e17	2011
<u>佐藤 準一</u>	神経変性と神経炎症の分子ネットワーク解析. 脳内免疫システム: 明らかになる神経疾患との関わり.	細胞工学	30 (10)	1028-1035	2011

佐藤準一	分子ネットワークからみた多発性硬化症の創薬標的分子. 特集I 神経免疫の新展開.	炎症と免疫	19 (6)	543-552	2011
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	30 (10)	1060-1063	2011
荒浪利昌、山村隆	多発性硬化症における α B-crystallinとosteopontinの関与	臨床免疫・アレルギー科	55	223-228	2011

IV.研究成果の刊行物・別刷

Annual Review 神經 2012

2012年1月25日 発行

中外医学社

1) 多発性硬化症と Th17 細胞

国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 佐藤和貴郎
同 部長 山村 隆

key words multiple sclerosis, Th17 cell, EAE, plasticity

要 旨

T細胞の介在する自己免疫応答は、多発性硬化症 (MS) の病態の理解に必須である。Th17細胞は新たに同定されたCD4陽性ヘルパーT細胞で、炎症促進作用をもつサイトカインIL-17産生能を有することを特徴とし、感染防御、アレルギー、および自己免疫疾患発症における役割について近年研究が進んでいる。Th17細胞の登場によりTh1細胞とTh2細胞のバランスでMSを理解するTh1/Th2パラダイムは崩れ、Th1細胞とTh17細胞の両者が炎症の促進に関与すると考えられている。一方、最近ではTh17細胞が制御性T細胞と共通の分化経路をもち、またTh1細胞への分化転換がみられるなど、Th17細胞の可塑性が話題になっている。

動 向

Th17細胞はIL-17を産生するCD4陽性ヘルパーT細胞で、近年Th1細胞やTh2細胞とは異なる分化経路を辿る細胞として同定された。MSにおける病原性については確立していないが、再発に伴って活動性が上がるという複数の報告がある。最近の話題として、Th17細胞が、環境によっては制御性T細胞やTh1細胞に形質転換する可塑性の問題がクローズアップされている。MSの

病態におけるTh17細胞の重要性が指摘される一方で、IFN β の治療反応性とTh17細胞活動性の負の関連が報告されている。多様なMSの病態を説明する免疫細胞の一つとして、Th17細胞を正しく評価し、治療方針の決定につなげていくことが求められている。

A. 多発性硬化症はTh1病か？

多発性硬化症 multiple sclerosis (MS) は、神経症状発現の時間的および空間的多発性を特徴とする中枢神経系の炎症性脱髄疾患である。発症から5年以内では大部分の症例が再発と寛解を繰り返す病型(再発・寛解型MS)を取るが、発症から5~10年経過すると、一部の症例では明確な再発を示さずに神経障害が蓄積・進行する(二次進行型MS)。また再発・寛解型MSの経過を取らずに、最初から進行経過を取る症例もある(一次進行型MS)。若年世代に好発し、性差(女性>男性)、人種差、地域差が認められ、欧米白人に多くアジア人には少ないことが知られている。しかし、我が国では、過去30年間に患者数の著増が認められ、現在14,000名を超す患者が特定疾患医療受給者として登録されている。

MSの病因はいまだ不明で、様々な病態を含む

疾患である可能性があるが、疾患感受性遺伝子の多くが免疫関連分子であることや、リンパ球を標的にした治療の有効性から、自己免疫機序は重要である¹⁾。再発・寛解型MSの時期はT細胞やB細胞の関与する獲得免疫系の役割が大きく、進行期になるとマクロファージや樹状細胞などによる自然免疫系の役割が大きいと考えられている²⁾。

CD4陽性ヘルパーT細胞 T helper (Th) は獲得免疫系の「司令塔」であり、MSの再発において中心的な役割を担う。Th細胞の分化については、ナイーブCD4陽性T細胞が抗原提示を受けて活性化しメモリーT細胞に分化する際に、周囲のサイトカイン環境により、Th1とTh2の二つの異なる表現型が誘導されるというモデルが1980年代末に提示された³⁾。すなわち、IL-12の影響下ではIFN γ を産生するTh1細胞が分化し、IL-4の影響下ではIL-4、IL-5、IL-13などを産生するTh2細胞が分化する。前者は主に細胞内感染病原体排除の役割を担い、後者は抗体産生やアレルギー反応に関わる。両者は互いに拮抗し、Th1-Th2のバランスが、様々な免疫応答や疾患発症を規定するという考えが、いわゆる「Th1-Th2パラダイム Th1-Th2 paradigm」である。このパラダイムでは、寄生虫・アレルギー性疾患ではTh2が優位になっているのに対し、MS、炎症性腸疾患、関節リウマチ、乾癬ではTh1優位な状態であると考えられた。MSは代表的なTh1病とされ、Th1とTh2のバランスをTh2に偏倚させることで軽快すると考えられた。MSがTh1病とされた根拠としては、MSの代表的な動物モデルEAE (experimental autoimmune encephalomyelitis; 実験的自己免疫性脳脊髄炎)において、Th1細胞を他の動物へ移入することによってEAEが誘導できることや、以前の臨床研究においてTh1応答を促進するIFN γ の投与がMSの病態を悪化させたことなどがあげられる。しかし、動物モデルEAEでは、IFN γ の投与が病気を

を軽減し、IFN γ 遺伝子欠損マウスでEAEが増悪することから、Th1-Th2パラダイムには大きな矛盾のあることが指摘されるようになった。

B. Th17細胞の登場

2003年にCuaらはMS/EAE = Th1病説の反証となる報告をした⁴⁾。Th1細胞を誘導するIL-12はp40とp35の二つのサブユニットから構成されるが、IL-12とp40を共有する別のサイトカインIL-23はもう一つのサブユニットとしてp19をもつ (p40-p19 heterodimer)。意外なことにIL-12を産生しないp35の遺伝子欠損マウスにおいてEAEは増悪し、IL-23を産生しないp19の遺伝子欠損マウスでEAEは消失した。すなわち、EAEを起こす脳炎惹起性の細胞はIL-12が誘導するTh1細胞ではなく、IL-23が誘導する細胞であることが示唆された。関節リウマチのモデルであるCIA (collagen induced arthritis) においても同様の結果が得られ、臓器特異的自己免疫疾患におけるIL-23の役割に注目が集まった。

IL-23が誘導するT細胞はIL-17AおよびIL-17Fを産生することが明らかにされていたが、IL-17A、IL-17Fは上皮細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞にあるIL-17受容体に結合してIL-6やTNF α 、GM-CSFなどのサイトカインや、ケモカインなどの産生を誘導し、好中球動員や炎症促進機能を有し、感染防御、アレルギー、自己免疫疾患発症に関わる⁵⁾。2006年には、IL-17産生T細胞が、ナイーブCD4陽性T細胞にIL-6とTGF- β を加えると誘導され、IFN γ やIL-4によって分化抑制がかかることが示された (図1)。さらにその後、固有に発現する転写因子としてTh1細胞がT-betを発現するのに対して、この細胞はROR γ tとROR α tを発現することが見出された。ここにIL-23依存性に誘導されるIL-17産生T細胞は、Th1・Th2細胞とは異なる分化経路を

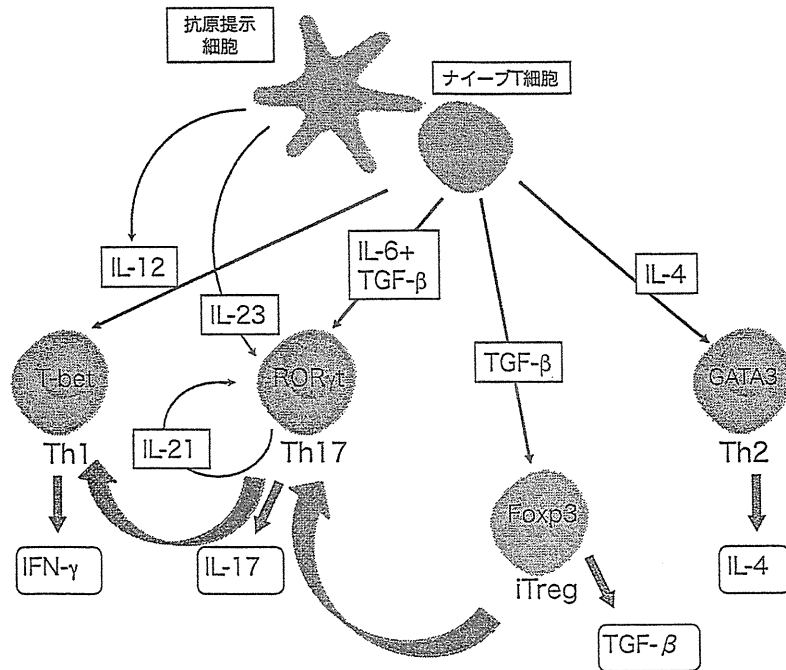


図1 ヘルパーT細胞の分化と機能

経た細胞として「Th17細胞」と名付けられた。なおIL-23はTh17細胞の分化誘導には必要ではなく、分化したTh17細胞の安定化と増殖に必要なと考えられた⁶⁾。

その後、Th17細胞の生物学的な研究が発展し、プロスタグランジンE2 (PGE2) による分化促進⁷⁾ や、レチノイン酸誘導体による分化抑制⁸⁾ がTh17細胞の分化に影響することが明らかにされた。また、Th17細胞がダイオキシンなどの化学物質の受容体であるアリル・ハイドロカーボン受容体 aryl-hydrocarbon receptor (AhR) を発現することも報告され、注目を集めている⁹⁾。なおIL-17の遺伝子欠損マウスにおけるEAEの改善は軽度である¹⁰⁾ が、その理由として、Th17細胞がIL-17AやIL-17F以外にもIL-21やIL-22, IL-26, IL-6, TNF- α を産生することが議論されている。

ヒトのTh17細胞については、施設間で分化・誘導の条件が異なり、見解の一致しない点がある

が、炎症性サイトカインの存在下に分化する点についてはマウスの場合と同様である。ヒトTh17細胞の特徴として、NK細胞、NKT細胞のマーカでもあるCD161を発現すること¹¹⁾、ケモカイン受容体CCR6を発現すること¹²⁾ が海外の研究で明らかにされた。

C. MSとTh17細胞

MSの病理組織を用いた検討では、MS病変にCD4陽性（およびCD8陽性の）IL-17陽性細胞が存在することが報告されている¹³⁾。MS患者におけるTh17細胞の活動性について、CD4陽性T細胞中におけるIL-17産生細胞の割合を末梢血と脳脊髄液 cerebrospinal fluid (CSF) で比較したところ¹⁴⁾、MSの再発期ではTh1細胞、Th17細胞ともにCSF中で割合が増加していた（ただし、絶対数においてTh17細胞はTh1細胞より一桁少ない）。他の神経疾患ではTh1細胞は増加してい