

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

佐藤準一*

中枢神経系炎症性脱髄疾患である多発性硬化症(multiple sclerosis : MS)では、自己反応性 Th17 細胞や Th1 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、脱髄と軸索傷害を惹起する。現在 MS の臨床では、インターフェロン(IFN)- β などの免疫調節薬が投与されているが難治例も多く、新規の標的分子に対する画期的な創薬が待望されている。近年、ヒトゲノムの解読が完了し、個々の細胞における遺伝子や蛋白質の発現情報を網羅的に解析可能なポストゲノム時代が到来し、創薬研究の中心はゲノム創薬へとパラダイムシフトした。ヒトは大規模な分子ネットワークで精密に構築された複雑系であり、多くの難病がシステム固有の防御機構であるロバストネスの破綻に起因する。最近、われわれは公共の MS データをバイオインフォマティクスの分子ネットワーク解析ツールで再解析し、創薬標的分子を同定した。今後はゲノムワイドの分子ネットワーク解析が、MS の病態解明・治療薬開発のために重要な研究手段となると思われる。

はじめに

多発性硬化症(multiple sclerosis : MS)は、中枢神経系白質に炎症性脱髄巣が多発し、さまざまな神経症状が再発をくり返して進行する難病である。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 Th17 細胞や Th1 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、腫瘍壊死

〔キーワード〕
分子ネットワーク
創薬標的分子
システム生物学
多発性硬化症
Th17 細胞

* SATOH Jun-ichi/明治薬科大学薬学部生命創薬科学科 バイオインフォマティクス研究室

因子(tumor necrosis factor : TNF)- α 、一酸化窒素(nitric oxide : NO)などの炎症増強因子(proinflammatory mediators)の産生を誘導し、脱髄を惹起すると考えられている。回復期には髄鞘再生を認めるが、炎症が遷延化すると軸索傷害をきたして不可逆的機能障害が残存する。臨床では急性増悪期にステロイドパルス(intravenous methylprednisolone pulse : IVMP)をおこない、寛解期にインターフェロン(IFN)- β の継続的投与をおこなう方法が最も一般的な治療法として選択されているが、IFN- β ノンレスポナーも多い。MS は臨床経過から再発寛解型(relapsing-remitting MS : RRMS)、2次進行型(secondary-progressive MS : SPMS)、1次進行型(primary-progressive MS : PPMS)に分類され、病理学的には T 細胞浸潤、抗体沈着、オリゴデンドロサイトアポトーシスの所見により4型に分類されており、このよ

うな病態の不均一性(heterogeneity)が治療難航の一因となっている。現在まで、髄鞘や軸索の再生促進薬はなく、新規の標的分子に対する画期的な創薬が待望されている。

2003年にヒトゲノムの解読が完了し、個々の細胞における全遺伝子や蛋白質の発現を網羅的に解析可能なポストゲノム時代が到来し、創薬研究の中心はゲノム創薬へとパラダイムシフトした。網羅的発現解析を統合したオミックス研究により、がんや神経難病の診断バイオマーカーや治療標的分子が次々明らかになった。同時に薬理ゲノミクスの分野は急成長を遂げ、薬物応答性個人差がある程度予測可能となり、テーラメード医療(personalized medicine)の樹立に道が開かれた。システム生物学(systems biology)の観点からは、ヒトは大規模な分子ネットワークで精密に構築された複雑系であり、多くの難病がシステム固有の防御機構であるロバストネス(robustness)の破綻に起因すると考えられている。したがって難病の病態解明のためには、オミックス研究に直結したゲノムワイドの分子ネットワーク解析が重要な研究手段となる。

最近、われわれは公共のデータをバイオインフォマティクスの分子ネットワーク解析ツールで再解析し、MSの創薬標的分子を同定することができた⁴⁾。以下にわれわれの研究を中心に、MSの病態解明や治療標的探索を目的とした分子ネットワーク解析について概説する。

1. 分子ネットワークの解析方法

生体内では蛋白質は複雑なネットワークから成るシステムを構築している。したがって難病の病態解明のためには、個々の蛋白質の機能解析のみならず、蛋白質が構築している分子ネットワークやネットワークの構成要素であるパスウェイの同定が重要となる。一般的に蛋白質間相互作用(protein-protein interaction: PPI)には、単純な直接的結合関係のみならず、活性化、活性抑制、

運搬、酵素反応、複合体形成など多彩な相互作用様式が存在する。複雑多岐のオミックスデータに関連している分子ネットワークを解析するためには、精査された文献情報に裏づけられた専用の解析ツールを使う必要がある。すなわち、膨大な文献情報からさまざまな分子間相互作用を抽出し、信頼性の高い知識を整理してコンテンツとして収録した知識データベース(knowledgebase)を利用して、既知のどのネットワークやパスウェイに最も高い類似性を呈しているかについて、統計学的解析手法を用いて調べる方法である⁴⁾。Web上でフリーに利用できる代表的なknowledgebaseには、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (www.kegg.jp)、the Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER) classification system (www.pantherdb.org)、Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) (string.embl.de)などがある。とくにKEGGとPANTHERは、キュレーターとよばれる専門家によって精査された遺伝子や代謝物の情報を収録している。2011年4月現在、KEGG PATHWAYには392 reference pathwaysから構成される134,607パスウェイが収録されている。また利用価値の高いデータベースとして、DAVID Bioinformatics Resources (david.abcc.ncifcrf.gov)は、網羅的解析で同定した膨大な遺伝子セットのアノテーションを一括しておこなうために開発されたツールである。Functional Annotation ツールに目的の遺伝子セットを入力すると、統計学的な検定をおこなって、最も密接に関連しているKEGG pathwayを同定できる。PANTHERでも同様にreference setとの比較により、類似性の統計学的有意差を多重検定で評価できる。STRINGはKEGG、HPRD、BIND、IntActなどの網羅的PPI情報も統合して収録しており、PubMed アブストラクトからは自然言語処理(natural language processing)によるテキストマイニングを介して、分子間相互作用に関する

膨大な情報を収集している。

また分子ネットワーク解析のために樹立された有償ツールとしては、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA) (www.ingenuity.com) や KeyMolnet (Institute of Medicinal Molecular Design, Tokyo) (www.immd.co.jp) などがある。これらは精選された文献を専門家が精読して、分子間相互作用に関する信頼性の高い情報を収集しており、定期的にはアップデートされている。KeyMolnet は日本語入力にも対応しており、分子ネットワークの検索法として、結合・発現制御・複合体形成を包括的に調べる周辺検索 (neighboring search)、発現制御に関与する転写因子群を調べる共通上流検索 (common upstream search)、始点と終点間のネットワークを調べる始点終点検索 (N-points to N-points search)、複数の端点を始点として、最多数の始点を含む最小の分子ネットワークを調べる相互関係検索 (interrelation search) を選択できる。

2. MS 脳病巣プロテオーム解析からみた創薬標的分子

2008 年に Han らは 6 例の MS 凍結脳を用いて、病理学的にステージを確認した脳病巣から laser microdissection で採取したサンプルを SDS-PAGE で分離後に、蛋白質を抽出し、トリプシン消化ペプチド断片を質量分析で網羅的に解析した²⁾。病理学的ステージは、炎症性細胞浸潤と浮腫を主徴とする急性脱髄巣 (active plaque : AP)、炎症が脱髄巣辺縁部に限局している慢性活動性脱髄巣 (chronic active plaque : CAP)、炎症所見に乏しくアストログリアの瘢痕形成を主徴とする慢性非活動性脱髄巣 (chronic plaque : CP) に分類した。同時に 2 例の健常脳のプロテオームも解析した。その結果、AP から 1082、CAP から 1728、CP から 1514、合計 4324 種類の蛋白質を同定した。さらに INTERSECT プログラムを用いて、健常脳では検出されずかつ各ステージ特異的な蛋白質

を選び出し、AP 158、CAP 416、CP 236 種類からなるプロテオームデータを公開した²⁾。彼らは PROTEOME-3D を用いてアノテーションを解析し、CAP において血液凝固系蛋白質 SERPINA5 (protein C inhibitor)、F3 (tissue factor)、FN1、THBS1、VTN の発現を認めた。この所見にもとづいて、抗凝固薬である thrombin inhibitor hirudin および activated protein C を用いて、MS 動物モデルであるマウス自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) を治療した。どちらの抗凝固薬も、抗原特異的リンパ球の増殖と IL-17、TNF- α 産生を抑制した。以上の結果より、血液凝固系蛋白質が新規 MS 創薬標的分子となることが示唆された。しかしながら大多数を占める凝固系以外の蛋白質に関しては、MS 脳分子病態における意義は明らかにされなかった。

われわれは、Han らのデータのプロテオームに関する UniProt ID を、Entrez Gene ID および KEGG ID に変換して、KEGG、PANTHER、IPA、KeyMolnet に入力し、各ステージ特異的プロテオームを最も良く反映している分子ネットワークを同定した³⁾。KEGG では、CAP プロテオームと focal adhesion (hsa04510) ($p=5.21E-05$) (図 1) および extracellular matrix (ECM)-receptor interaction (hsa04512) ($p=1.25E-04$) との関連性を認めた。PANTHER では、CAP プロテオームと inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway ($p=2.63E-03$)、integrin signaling pathway ($p=3.55E-03$)、CP プロテオームと integrin signaling pathway ($p=4.33E-02$) との関連性を認めた。すなわち KEGG と PANTHER の解析から、MS 慢性病巣における ECM-integrin シグナル伝達系の中心的役割が示唆された。KEGG と PANTHER による解析では、AP プロテオームと密接に関連するパスウェイは検出されなかった。

一方 IPA では、AP プロテオームは cellular as-

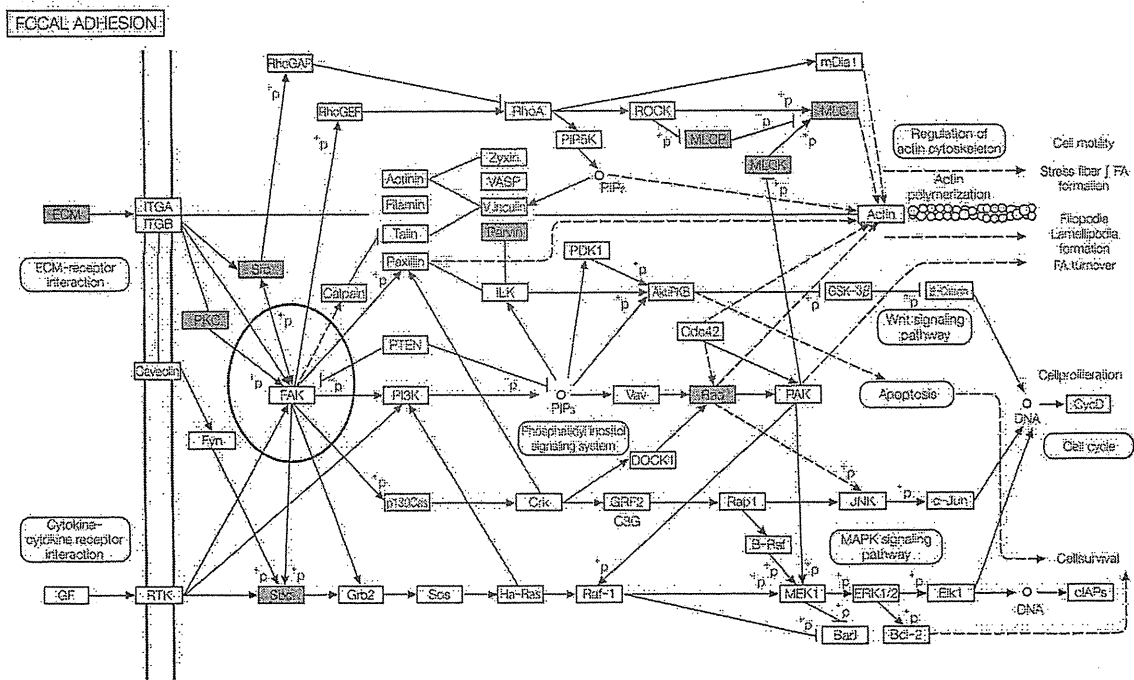


図 1. KEGG による MS 脳病巣 CAP プロテオームの分子ネットワーク解析

KEGG による解析では、MS 脳病巣 CAP プロテオーム (灰色) と focal adhesion (hsa04510 : COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3, FN1, LAMA1, MYLK, SHC3, PPP1CA, PARVA, PRKCB1, MYL7, RAC3, SPP1, SRC, THBS1, VTN : ECM 構成要素は ECM として一括) との関連性が示唆された。Focal adhesion kinase (FAK) が、ネットワークのハブ(楕円)となることがわかる。

assembly and organization, cancer, and cellular movement ($p = 1.00E-49$), CAP プロテオームは dermatological diseases and conditions, connective tissue disorders, and inflammatory disease ($p = 1.00E-47$), lipid metabolism, molecular transport, and small molecule biochemistry ($p = 1.00E-47$), CP プロテオームは cell cycle, cell morphology, and cell-to-cell signaling and interaction ($p = 1.00E-50$) との関連性を認めた。CAP プロテオームの dermatological diseases and conditions, connective tissue disorders, and inflammatory disease ネットワークは, BGN, CHI3L1, CNN2, COL1A1, COL1A2, COL6A2, COL6A3, CXCL11, ENTPDL, ERK, FBLN2, FERMT2, FN1, GBP1, HSPG2, Ifn gamma, INPP5D, Integrin, LAMA1, LUM, Mlc, MYL7, MYL6B, NES, P4HA1, Pak,

PARVA, POSTN, PRELP, SERPINA5, SERPINH1, Tgf beta, TGFBR3, THBS1, VTN から構成されており、ECM-integrin シグナル伝達系の関与を示唆している。最後に KeyMolnet を用いて、MS 関連 75 分子を始点、ステージ特異的プロテオームの各分子を終点として、始点終点検索で最短経路となるネットワーク解析した。AP プロテオームは IL-4 signaling pathway ($p = 1.79E-13$), CAP プロテオームは PI3K signaling pathway ($p = 7.25E-18$), CP プロテオームは IL-4 signaling pathway ($p = 1.04E-16$) と最も密接に関連していた。また CAP と CP は integrin signaling pathway ($p = 2.13E-12$ および $p = 2.57E-12$) との関連性も認めた。

以上のように、4 種類の異なるツール KEGG, PANTHER, IPA, KeyMolnet は、さまざまな独

自の分子ネットワークを抽出したが、共通して CAP, CP プロテームにおける ECM-integrin シグナル伝達系の中心的役割を示唆した³⁾。Integrin は複数の α , β サブユニットから構成される 24 種類のヘテロダイマー分子で、ECM のリガンドとしてはたらく。 $\beta 1$ integrin ファミリーは collagen, fibronectin, laminin と結合し、 αv integrin ファミリーは vitronectin と結合する。ECM-integrin 相互作用を介する outside-in, inside-out シグナルは、細胞骨格の動態制御を介する細胞接着、遊走、分化、増殖にとって必須である。MS 脳病巣プロテームで同定した fibronectin や vitronectin は、主として破綻した BBB を通過して脳実質に浸透した血漿成分に由来する。ECM, integrin が著増している慢性病巣においては髄鞘や軸索の再生が著しく乏しい。その理由として、グリア瘢痕に含まれている ECM 蛋白質自体が髄鞘や軸索の再生阻害因子としてはたらく可能性や、活性化マクロファージやミクログリアが産生する蛋白質分解酵素が ECM に結合して長期に保持され、髄鞘の崩壊が遷延化している可能性があげられている⁴⁾。また ECM-integrin シグナル伝達系は、リンパ球のホーミングや血管外遊出、アストログリアやミクログリアの活性化、オリゴデンドログリア前駆細胞の分化抑制を介して、脱髄と軸索傷害を増強する⁵⁾。

現在欧米において、MS 再発抑制のために、 $\alpha 4 \beta 1$ integrin (VLA4) に対するヒト化モノクロナール抗体 Natalizumab が臨床で用いられている。しかしながら、Natalizumab は進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy: PML) を惹起する危険性があり、より安全な薬の開発が必要である。分子ネットワークから創薬標的分子を探索する場合には、多数の分子からリレーションが集中しているハブ (hub) とよばれる中心分子を同定することが重要である。ハブの抑制薬または活性化薬は、ネットワークのロバストネスの維持に重大な影響を及ぼす。ECM-in-

tegrin シグナル伝達系は、炎症性脱髄遷延化の抑制薬の標的パスウェイであり、focal adhesion kinase (FAK) がハブとなる (図 1 楕円)。低分子化合物 TAE226 は、ECM による FAK の自己リン酸化を選択的に抑制し、*in vivo* モデル系では経口投与により腫瘍細胞の増殖と血管新生を抑制する⁶⁾。したがって TAE226 は FAK を分子標的とする MS 慢性炎症性脱髄抑制薬の候補となる可能性があり、EAE における前臨床試験の実施が待たれる。

3. Th17 細胞分化関連遺伝子トランスクリプトーム解析からみた創薬標的分子

1990 年代まで MS は、IFN- γ 投与で病態増悪を認めた過去の臨床試験の結果より、Th1 病であるとみなされてきた。現在では、病態形成で中心的役割を果たしているのは、転写因子 RAR-related orphan receptor C (RORC, ROR γt) を発現し、IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 を産生する Th17 細胞であるとの見解になった⁷⁾。Th17 細胞は、トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor: TGF)- β と IL-6, IL-21 の存在下でナイーブ T (Th0) 細胞から分化誘導される。Th17 細胞は、活動期 RRMS 患者の血液中では、非活動期や健常者に比較して 7 倍増加しており、これらの細胞は髄鞘抗原 myelin basic protein (MBP) に対して反応性を示す⁸⁾。Th17 細胞は、MS 脳では活動性病巣に集積している⁹⁾。IFN- β は、Th1 病には有効だが Th17 病には無効であり、MS の IFN- β ノンレスポンスでは血清 IL-17F が増加している¹⁰⁾。以上の所見をまとめると、Th17 細胞分化制御関連遺伝子は、MS の創薬標的分子となり得る。

われわれは、公共の遺伝子発現データベース Gene Expression Omnibus (GEO) に登録されている Huh らのトランスクリプトームデータセット (GSE27241) を再解析し、Th17 細胞分化制御遺伝

子の分子ネットワークを同定した。彼らは ROR γ t 欠損(knockout: KO)および野生型(wild-type: WT) C57BL/6 マウスのリンパ節と脾臓から細胞自動解析-分離装置(fluorescence activated cell sorter: FACS)で分離した CD4 $^+$ CD8 $^+$ CD19 $^-$ CD25 $^-$ CD44 low CD62L $^+$ ナイーブ T 細胞を、プレートコートした抗 CD3 ϵ 抗体と抗 CD28 抗体で刺激し、さらに IL-6, TGF- β , 抗 IFN- γ 抗体と抗 IL-4 抗体を添加した培地(Th17-inducing condition)で 48 時間培養して、Th17 細胞の分化を誘導した¹⁰。また培養系に dimethyl sulfoxide (DMSO) または DMSO に溶解した digoxin (DIG: 10 μ M) を添加し、Th17 細胞分化に対する抑制効果を調べた。GSE27241 は、各条件の細胞から RNA を精製し、Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) で解析し、robust multiarray average (RMA) 法で正規化したデータセットである(WT-DMSO, WT-DIG, KO-DMSO, KO-DIG 各 2 サンプル)。

われわれは Huh らのデータに関して、はじめに WT-DMSO 群と KO-DMSO 群を比較し、Th17-inducing condition において前者で 2 倍以上発現上昇した 57 遺伝子(Th17 細胞分化関連遺伝子群)を同定した(表 1)。つぎに WT-DIG 群と WT-DMSO 群を比較し、前者で 0.5 倍以下に発現低下した 12 遺伝子を同定した(DIG 応答性遺伝子群)(表 1 下線)。また 57 遺伝子を指標として階層クラスター解析をおこなったところ、WT-DMSO, KO-DMSO, WT-DIG, KO-DIG の各群はおのおのの独立したクラスターを形成し、WT-DIG 群は KO-DMSO 群に近接したクラスターに分類された(図 2)。DIG で発現抑制された 12 遺伝子のうち 11 遺伝子は、ほかの遺伝子から独立したクラスターを形成し、11 遺伝子を含む 16 遺伝子は転写が共調節(co-regulation)されている可能性がある(図 2 点線)。KeyMolnet の共通上流検索により、これらの 16 遺伝子に関連する分子ネットワークを解析したところ、TGF- β 受容

体シグナル伝達系で中心的な役割を果たしている転写因子 SMAD による発現調節の関与が最も強く示唆された($p=1.194E-060$)(図 3)。

TGF- β 受容体の活性化に伴ってリン酸化された SMAD2 と SMAD3 は、SMAD4 と複合体を形成して核へ運ばれ、種々のコアクチベーターやコリプレッサーと協調して、標的遺伝子の転写を制御する。SMAD2 は Th17 細胞の分化に必須であると報告されている¹²。DIG は、Huh らが 4812 種類の低分子化合物に関して、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 細胞の分化を抑制することが判明した化合物である¹³。また ROR γ t, ROR α と結合して Th17 細胞の分化を抑制する合成リガンド SR1001 も報告されている¹³。DIG は転写因子 SMAD が制御している分子ネットワーク上の Th17 細胞分化関連遺伝子群(表 1 下線)の発現を共抑制している可能性がある。SMAD 系転写因子は分子ネットワークのハブに位置し、MS における Th17 細胞分化制御薬の標的分子と成りうる。しかしながら、TGF- β 受容体シグナル系を全般的に抑制すると、induced Foxp3 $^+$ regulatory T (iTreg) 細胞の分化まで抑制してしまう可能性があること、SMAD 非依存性の Th17 細胞分化経路も存在すること¹⁰、SMAD2, SMAD3 は機能的に冗長にはたらくこと、SMAD3 それ自体は ROR γ t と結合してその活性を抑制し、Th17 細胞の分化を負に制御していること¹⁰などを考慮し、SMAD 系転写因子を選択的かつ部分的に抑制できるような新薬の開発が望ましい。

おわりに

膨大なオミックスデータに関与する分子ネットワークを手際よく解析するためには、精査された文献情報にもとづく解析ツールを使う必要がある。解析ツールはいまだ発展途上かつ日進月歩であり、現時点では、どのツールもサブライスパリアントや翻訳後修飾、細胞特異的発現、細胞内局在化、

表 1. Th17 細胞分化関連 57 遺伝子

Entrez Gene ID	Gene Symbol	Gene Name	Ratio
70337	<u>iyd</u>	iodotyrosine deiodinase	11.06
16171	<u>IL17A</u>	interleukin 17A	4.30
76142	<u>ppp1r14c</u>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14c	4.25
193740	<u>Hspa1a</u>	heat shock protein 1A	3.47
50929	<u>il22</u>	interleukin 22	3.39
15511	<u>Hspa1b</u>	heat shock protein 1B	3.38
56312	<u>nupr1</u>	nuclear protein 1	3.23
14538	<u>GCNT2</u>	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, 1-branching enzyme	2.79
74103	<u>Nebi</u>	nebulette	2.76
75573	<u>2310007L24Rik</u>	RIKEN cDNA: 2310007L24 gene	2.55
68549	<u>SGOL2</u>	shugoshin-like 2 (S. pombe)	2.53
237436	<u>GAS2L3</u>	growth arrest-specific 2, like 3	2.47
76131	<u>depdc1a</u>	DEP domain containing 1a	2.43
100043766	<u>Gm14057</u>	predicted gene 14057	2.37
14235	<u>FOXM1</u>	forkhead box M1	2.37
230098	<u>E130306D19Rik</u>	RIKEN cDNA: E130306D19 gene	2.30
171284	<u>Timd2</u>	T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 2	2.29
12235	<u>BUB1</u>	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (S. cerevisiae)	2.26
51944	<u>D2Ertd750e</u>	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 750, expressed	2.24
17863	<u>myb</u>	myeloblastosis oncogene	2.24
229841	<u>CENPE</u>	centromere protein E	2.22
270906	<u>PRR11</u>	proline rich 11	2.19
12316	<u>ASPM</u>	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)	2.18
108000	<u>CENPF</u>	centromere protein F	2.18
17345	<u>MKI67</u>	antigen identified by monoclonal antibody Kj 67	2.16
14432	<u>gap43</u>	growth associated protein 43	2.15
105988	<u>ESPL1</u>	extra spindle poles-like 1 (S. cerevisiae)	2.15
15366	<u>HMMR</u>	hyaluronan mediated motility receptor (RHAMM)	2.15
27053	<u>asn5</u>	asparagine synthetase 5	2.15
52276	<u>CDCA8</u>	cell division cycle associated 8	2.15
18005	<u>NEK2</u>	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2	2.15
72080	<u>2010317E24Rik</u>	RIKEN cDNA 2010317E24 gene	2.15
74107	<u>CEP55</u>	centrosomal protein 55	2.13
29817	<u>igfbp7</u>	insulin-like growth factor binding protein 7	2.13
71819	<u>KIF23</u>	kinesin family member 23	2.10
75317	<u>4930547N16Rik</u>	RIKEN cDNA 4930547N16 gene	2.10
12704	<u>CIT</u>	citron	2.10
72140	<u>CCDC123</u>	coiled-coil domain containing 123	2.08
234258	<u>Nei3</u>	nei like 3 (E. coli)	2.08
12442	<u>CCNB2</u>	cyclin B2	2.07
72119	<u>Tpx2</u>	TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis)	2.07
68743	<u>Anln</u>	anillin, actin binding protein	2.06
20419	<u>SHCBP1</u>	Shc SH2-domain binding protein 1	2.05
208084	<u>PIF1</u>	PIF1 5'-to-3' DNA helicase homolog (S. cerevisiae)	2.04
17279	<u>Melk</u>	maternal embryonic leucine zipper kinase	2.04
19348	<u>kif20a</u>	kinesin family member 20A	2.04
21335	<u>TACC3</u>	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	2.03
208628	<u>KNTC1</u>	kinetochore associated 1	2.02
19659	<u>Rbp1</u>	retinol binding protein 1, cellular	2.02
72155	<u>CENPN</u>	centromere protein N	2.02
257630	<u>Il17f</u>	interleukin 17F	2.02
215819	<u>nhs1</u>	NHS-like 1	2.02
54141	<u>SPAG5</u>	sperm associated antigen 5	2.01
12189	<u>BRCA1</u>	breast cancer 1	2.01
19362	<u>RAD51AP1</u>	RAD51 associated protein 1	2.01
110033	<u>Kif22</u>	kinesin family member 22	2.00
69534	<u>AVP11</u>	arginine vasopressin-induced 1	2.00

GSE27241 は ROR γ t 欠損 (knockout: KO) および野生型 (wild-type: WT) マウスナイーブ T 細胞を, Th17-inducing condition で 48 時間培養して Th17 細胞の分化を誘導し, 培養系に DMSO に溶解した digoxin (DIG) を添加した細胞のトランクリプトームデータである. GSE27241 に関して, はじめに WT-DMSO と KO-DMSO を比較し, Th17-inducing condition において前者で 2 倍以上発現上昇した Th17 細胞分化関連 57 遺伝子を同定した. つぎに WT-DIG と WT-DMSO を比較し, 前者で 0.5 倍以下に発現低下した DIG 応答性 12 遺伝子を同定した (下線).

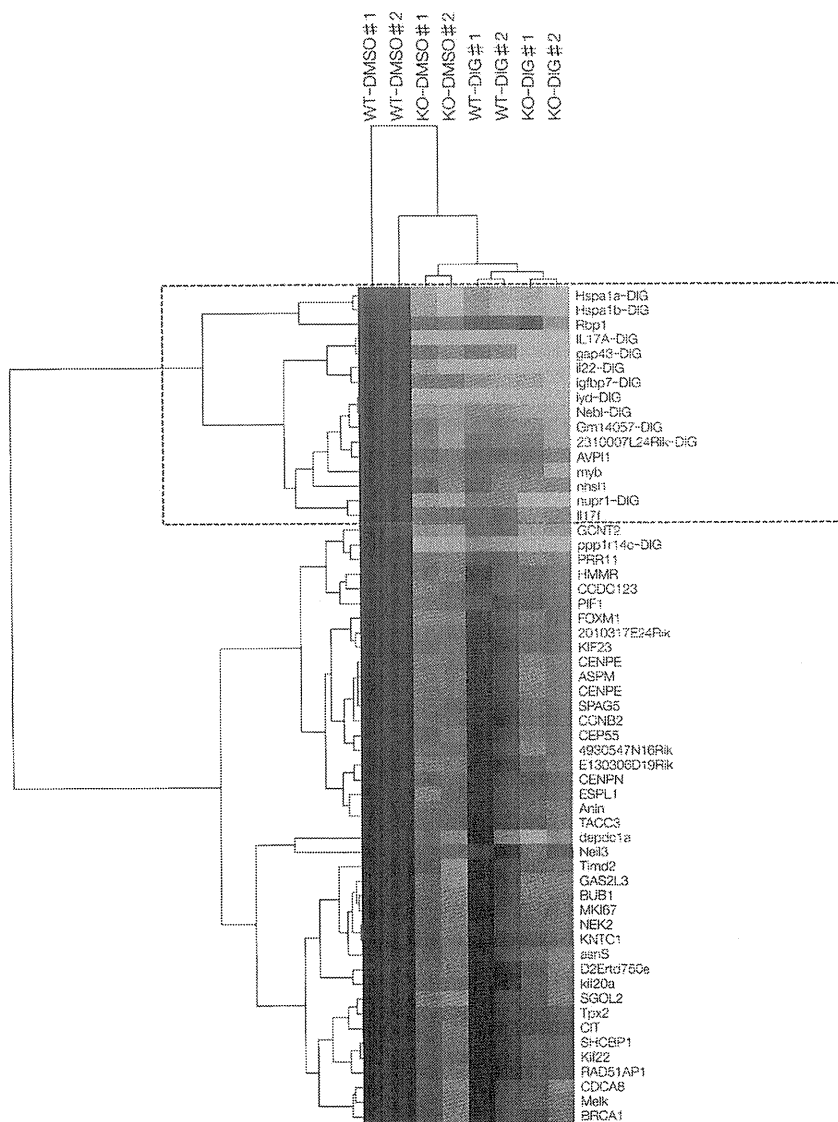


図 2. Th17 細胞分化関連 57 遺伝子の階層クラスター解析

GSE27241 は、ROR γ t 欠損(knockout: KO)および野生型(wild-type: WT)マウスナイーブ T 細胞を、Th17-inducing condition で 48 時間培養し、Th17 細胞の分化を誘導。培養系に DMSO に溶解した digoxin (DIG) を添加した細胞のトランクリプトームデータである。はじめに WT-DMSO と KO-DMSO を比較し、Th17 細胞分化関連 57 遺伝子を同定し、階層クラスター解析をおこなった。つぎに WT-DIG と WT-DMSO を比較し、DIG 応答性 12 遺伝子を同定した(図の遺伝子-DIG)。DIG 応答性 11 遺伝子は独立したクラスターを形成し、これらを含む 16 遺伝子は転写が共調節(co-regulation)されている可能性がある(点線)。

動的な特性に関しては十分対応できていない。しかしながら生命現象を複雑なシステムとして捉えるシステム生物学的観点からすると、分子ネット

ワークを詳細に解析することにより、はじめて論理的な仮説に基づけられた創薬標的分子を効率的に同定することができる。

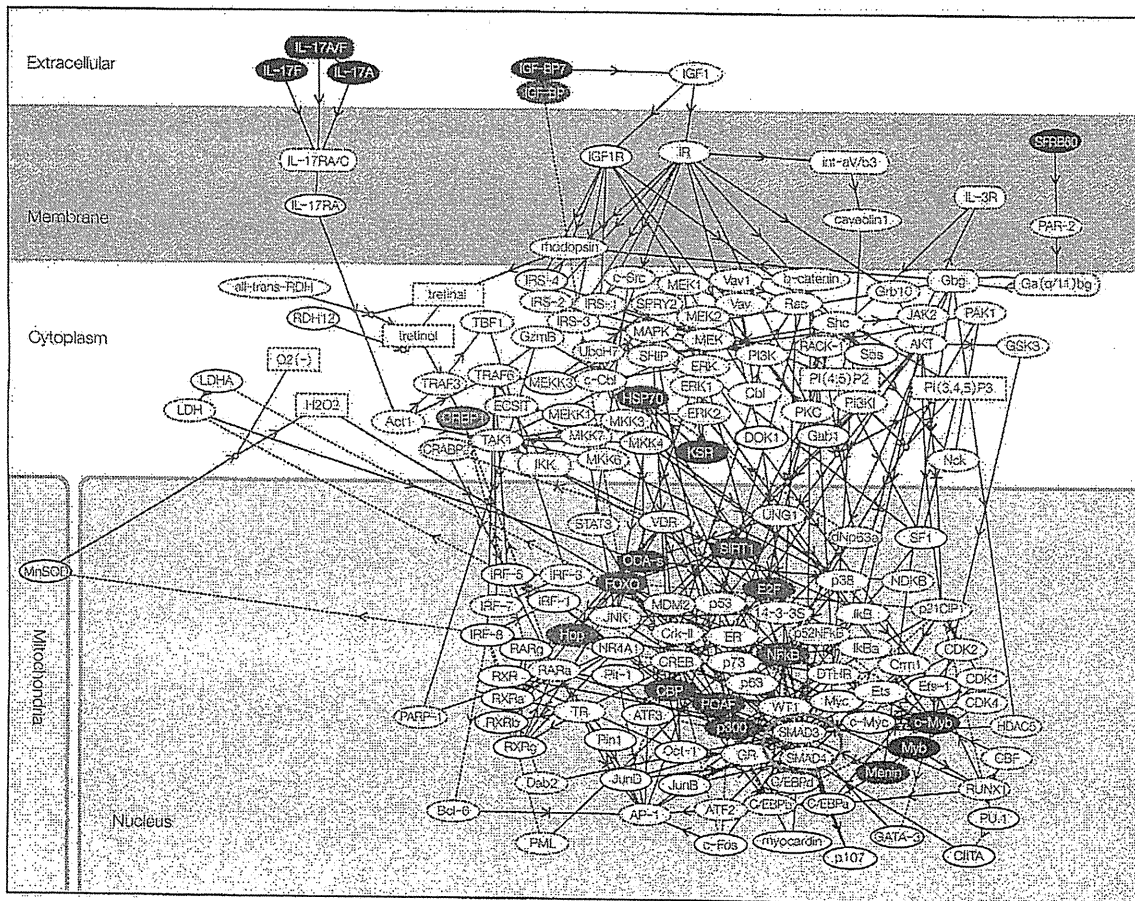


図 3. DIG 応答性 Th17 細胞分化関連遺伝子の分子ネットワーク解析

KeyMolnet 共通上流検索(コアコンテンツ:発現制御・直接結合・複合体形成)により, DIG 応答性 11 遺伝子のクラスターの 16 遺伝子(図 2)に関連する分子ネットワークを解析した. 転写因子 SMAD(楕円)による発現調節の関与が示唆された.

謝辞

本稿で紹介した研究は, 国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 山村隆部長, 明治薬科大学バイオインフォマティクス 天竺桂弘子助教との共同研究でなされ, 文部科学省基盤研究(C22500322)と私立大学戦略的研究基盤形成支援事業明治薬科大学バイオテクノロジーセンター研究事業(S0801043)および厚生労働科学難治性疾患克服研究事業(H21-難治一般-201: H22-難治一般-136)の補助を受けた.

文献

1) Satoh J: Bioinformatics approach to identifying

molecular biomarkers and networks in multiple sclerosis. *Clin Exp Neuroimmunol* 1: 127-140, 2010

2) Han MH *et al*: Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets. *Nature* 451: 1076-1081, 2008
 3) Satoh JI *et al*: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain-lesion proteome. *Mult Scler* 15: 531-541, 2009
 4) van Horssen J *et al*: The extracellular matrix in multiple sclerosis pathology. *J Neurochem* 103: 1293-1301, 2007
 5) Milner R *et al*: Fibronectin- and vitronectin-induced microglial activation and matrix metallo-

- proteinase-9 expression is mediated by integrins $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_5\beta_5$. *J Immunol* 178 : 8158-8167, 2007
- 6) Liu TJ *et al* : Inhibition of both focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor kinase suppresses glioma proliferation in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 6 : 1357-1367, 2007
 - 7) McFarland HF *et al* : Multiple sclerosis : a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 8 : 913-919, 2007
 - 8) Durelli L *et al* : T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon- β . *Ann Neurol* 65 : 499-509, 2009
 - 9) Tzartos JS *et al* : Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172 : 146-155, 2008
 - 10) Axtell RC *et al* : T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon- β in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med* 16 : 406-412, 2010
 - 11) Hub JR *et al* : Digoxin and its derivatives suppress Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t activity. *Nature* 472 : 486-490, 2011
 - 12) Malhotra N *et al* : SMAD2 is essential for TGF β -mediated Th17 cell generation. *J Biol Chem* 285 : 29044-29048, 2010
 - 13) Solt LA *et al* : Suppression of Th17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature* 472 : 491-494, 2011
 - 14) Lu L *et al* : Role of SMAD and non-SMAD signals in the development of Th17 and regulatory T cells. *J Immunol* 184 : 4295-4306, 2010
 - 15) Martinez GJ *et al* : Smad3 differentially regulates the induction of regulatory and inflammatory T cell differentiation. *J Biol Chem* 284 : 35283-35286, 2009

多発性硬化症・視神経脊髄炎に対する免疫療法

Immunotherapy for Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica

荒浪利昌

Toshimasa Aranami

多発性硬化症 (MS) は, 中枢神経系に広く病変が多発し, 髄鞘抗原特異的 T 細胞や B 細胞が介在する自己免疫疾患であると考えられており, 病原性細胞として Th1 細胞とともに Th17 細胞が注目されている。一方, 視神経と脊髄が冒される視神経脊髄炎 (NMO) には, 血中にアクアポリン 4 に対する自己抗体 (抗 AQP4 抗体) が存在し, 病態形成に関与すると考えられている。MS 治療の中心である IFN- β は, Th1 細胞の働きが亢進している病態では効果が期待されるが, Th17 細胞が優位な状況では無効である可能性がある。NMO に対する新たな免疫療法として, 抗 CD20 抗体などによる液性免疫を標的とする治療の有効性が示唆されている。



多発性硬化症, 視神経脊髄炎, 免疫療法

はじめに

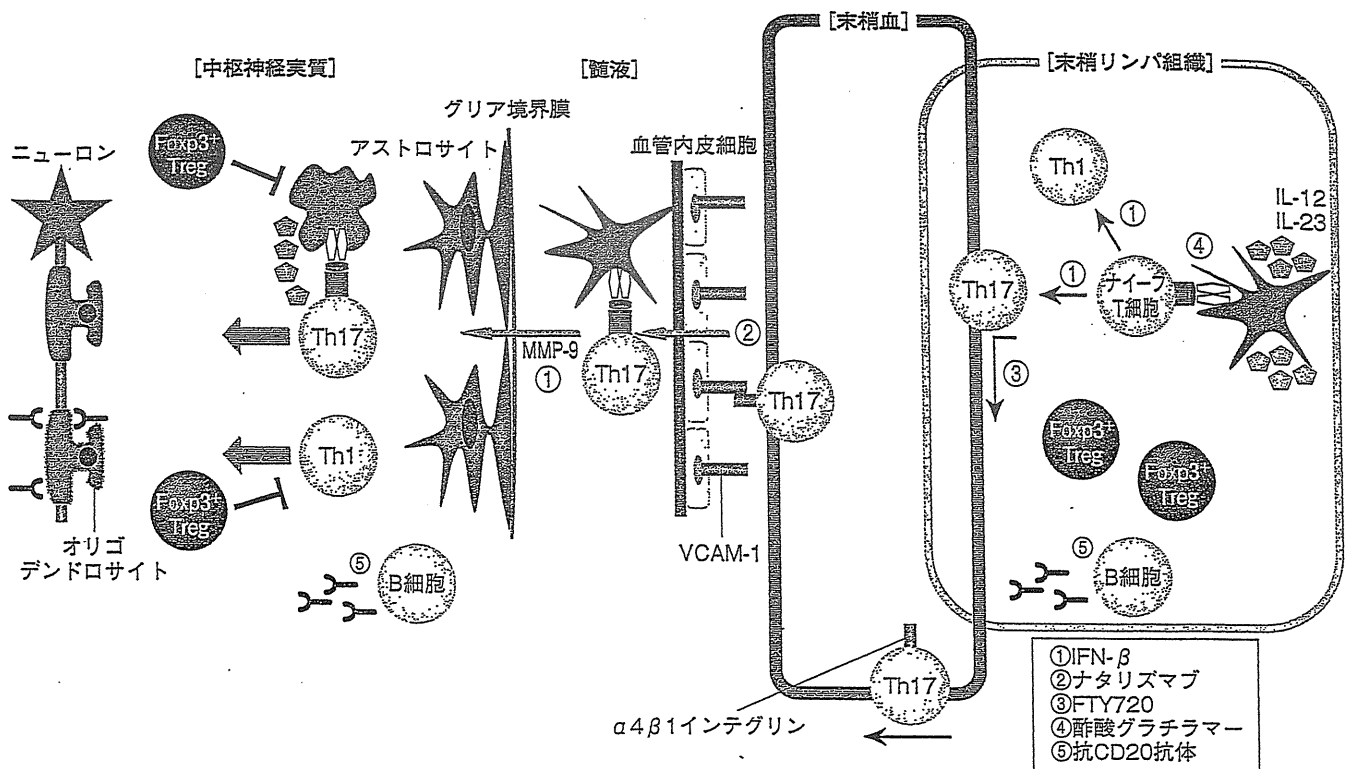
多発性硬化症 (multiple sclerosis ; MS) は, 髄鞘抗原特異的な T 細胞や B 細胞が髄鞘を傷害することにより脱髄病変が生じる中枢神経系の自己免疫疾患であると考えられている。病変は中枢神経系に広く分布し, 再発・寛解を繰り返し, 視力低下や運動麻痺などの症状が長期にわたる。一方, 視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica ; NMO) は, 病変が比較的視神経と脊髄に限局している。以前は MS の一病型と考えられていたが, 患者末梢血中にアクアポリン 4 (AQP4) という水チャネル分子に対する自己抗体 (抗 AQP4 抗体) が存在することが発見されて以来¹⁾, MS とは異なる病態であるとの考えが優勢である。本稿では, MS と NMO の免疫病態およびそれぞれに対する免疫療法の進歩を概説する。

I MS および NMO の病態

ヘルパー T (Th) 細胞は活性化とともに, 特定のサイトカイン産生細胞へと分化するが, 従来より自己免疫疾患においては Th1 細胞の過剰な働きが関与するとの考えが優勢であった。しかし近年, インターロイキン (IL) -17 を産生する T 細胞 (Th17 細胞) が新たな Th 細胞分画として提唱され, MS やその動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis ; EAE) への

関与が示唆されている²⁾。当初, Th17 細胞は, Th1 細胞とは異なる T 細胞分画であり, EAE 病態において Th1 細胞よりも高い病原性を有する分画として提唱されたが, 近年 IL-17 を産生している T 細胞が, 後に IFN- γ 産生細胞へと変化すること, いわゆる可塑性 (plasticity) を有することが示唆されている³⁾。また, MS の末梢血や髄液においても IL-17 産生細胞の増加が報告されている⁴⁾。その一方で, Th1 および Th17 細胞の分化あるいは病原性の獲得を抑制することが期待された IL-12 と IL-23 の中和抗体は, 乾癬には有効であったが, MS においては再発抑制効果を認めなかった⁵⁾。以上から, MS 病態における Th1 細胞および Th17 細胞の重要性については, いまだ結論は得られていない。また, MS 病態においては, CD4⁺Foxp3⁺ 制御性 T 細胞 (Treg) などの Treg 機能の減弱も報告されており⁶⁾, 病原性細胞と Treg のバランスにより, 再発寛解型 MS の病態が形成される可能性がある。

一方, NMO の免疫病態の特徴の 1 つは抗 AQP4 抗体の存在である。AQP4 分子は中枢神経系グリア細胞アストロサイトの足突起などに特に豊富に存在している。NMO 患者血清はアストロサイトを補体依存性に傷害し, EAE を誘導したマウスに NMO 患者 IgG を投与したところ, NMO に酷似した病理像が得られ, 臨床症状も増悪したことから, 抗 AQP4 抗体は NMO 病態マーカーと言うだけでなく, 病態形成に深く関わっているという考え方が有力である。当研究部の千原らは, NMO と MS, 健常者の末梢血 B 細胞分画の頻度を比較し, 他の 2 群と比べ, NMO において形質芽細胞 (プラズマブラスト) が有意に増加していることを見いだした。



■図1 MS病態と免疫療法

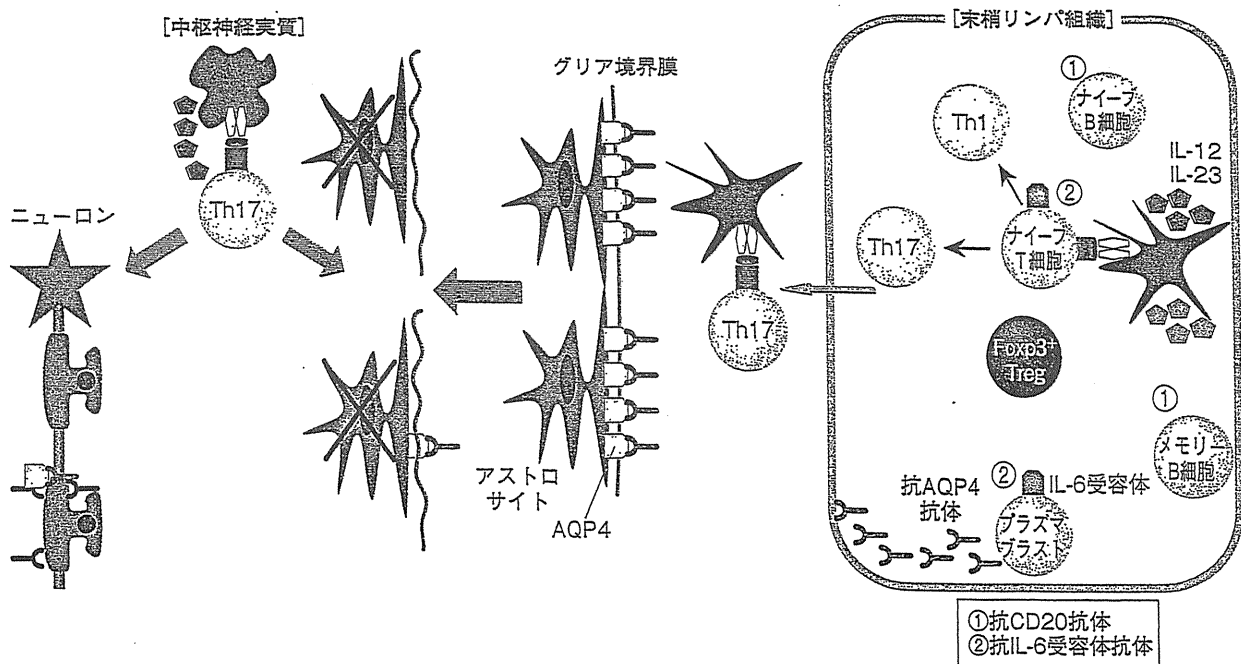
MS病態への関与が示唆される病原性細胞およびTregと免疫療法の想定される作用点(①~⑤)を示す。

さらに、プラズマブラストが末梢血中の主たる抗AQP4抗体産生細胞であり、プラズマブラストの生存および抗AQP4抗体産生にIL-6が重要である可能性を示した⁷⁾。また、脳病変がほとんどなく、脊髄と視神経のみが選択的に冒されるMSが本邦を含むアジア諸国に多く、以前はOSMS (opticospinal MS) と呼ばれていたが、OSMSの30~60%は抗AQP4抗体陽性であることが明らかとなり、その病態形成機構はNMOと類似していると考えられている。そのOSMSの髄液においてはIL-17, IL-8, G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) といったIL-17ファミリーとそれにより誘導されるサイトカインの増加が認められる⁸⁾。また、NMOの髄液ではマウスのTh17細胞分化に重要なサイトカインであるIL-6も増加している。これらの報告から、NMOの病態形成に液性免疫とともにTh17細胞やIL-6が関与している可能性が示唆される。

II MSとNMOの免疫療法

MSおよびNMOの急性増悪時の治療法としては、メチル

プレドニゾロンなどのステロイド大量点滴静注療法(パルス療法)や血漿交換療法が用いられる。それとともに、MSおよびNMOの治療においては、再発を予防する治療が長期的な神経機能的予後への影響を考慮するうえで最も重要である。IFN- β は再発寛解型MSの再発予防療法として最も広く用いられている。それとともにMS患者の10~50%がIFN- β ノンレスポンド(無効群)であると報告されている。IFN- β の効果発現機構として、Th1細胞やTh17細胞への分化の抑制、あるいは炎症性細胞浸潤に重要なMMP-9 (matrix metalloproteinase-9)の抑制など、様々な効果が指摘されている。近年、MS病態におけるIFN- β の治療効果発現機構について新たな知見があった。Axtellらは、髄鞘抗原特異的Th1細胞で誘導したEAEにはIFN- β が有効であり、逆に髄鞘抗原特異的Th17細胞で誘導したEAEはIFN- β 投与により症状の増悪が見られることを報告した。Th1細胞を移入して誘導したEAEでは、IFN- β 投与により脾臓でのIFN- γ 産生の減少と、抑制性サイトカインIL-10産生の著明な増加が認められた。このようなIL-10産生亢進はIFN- γ ノックアウトマウスでは観察されなかったことから、IFN- β が有効性を発揮するためにはIFN- γ シグナルが必要と考えられ



■図2 NMO病態と免疫療法

NMO病態への関与が示唆される病原性細胞およびTregとステロイド以外の免疫療法の想定される作用点(①~②)を示す。

た。一方、Th17介在性EAEでは、IFN-β投与により脾臓でのIL-17産生は低下するが、IL-10産生に変化がなく、脊髄でIL-17産生細胞がむしろ増加していたことから、IFN-γ産生の亢進がなければIFN-βによるIL-10産生誘導が生じず、治療効果が見られないと考えられた。さらに、IFN-βノンレスポンス中では、治療前の血清中IL-17FとIFN-β濃度がレスポンス(有効群)と比べて高い一群が存在し、マウスの実験系と同じく、Th17に偏倚している状態では、IFN-β治療が無効であることが示唆された⁹⁾。このように、MSの病態にはTh1に偏倚している状態とTh17に偏倚している状態が存在する可能性がある。前者にはIFN-β治療が有効であるが、後者ではむしろ病態を悪化させてしまう可能性があり、検討が必要である。

MSの再発抑制療法としては、その他にも各種免疫抑制剤のほか、MS病態に即した免疫修飾薬が欧米を中心に用いられている。(1)中枢神経系への免疫細胞の遊走を抑制する薬剤。(2)自己反応性T細胞による髄鞘抗原の認識を阻害する薬剤。(3)生体よりB細胞を除去する薬剤、などである。

(1)としては、ナタリズマブやFTY720がある。ナタリズマブはヒト化抗α4インテグリンモノクローナル抗体であり、免疫系細胞に広く発現するα4β1インテグリンとVCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1)という接着分子の結合を

阻害する働きがあり、中枢神経系への炎症性細胞浸潤を阻害する機能を有する。MSの再発率を有意に低下させ、欧米で再発寛解型MSの治療薬として使用されている。FTY720は、リンパ節や二次リンパ組織からのリンパ球の流出に必要なシグナルを阻害する新規化合物である。リンパ節からのリンパ球の流出には、スフィンゴシン1リン酸(S1P)がリンパ球上のS1P受容体に結合することが必要だが、FTY720は体内でリン酸化された後、S1P1受容体にアゴニストとして結合する。これによりS1P1受容体の細胞内へのinternalizationを誘導し、結果としてS1Pに結合できるS1P1受容体数が減少し、リンパ球はS1P不応性となる。その結果、T細胞はリンパ節に留められることになり、神経組織に浸潤するリンパ球が減少し、炎症も抑制されると考えられる¹⁰⁾。

(2)としては酢酸グラチラマー(copolymer-1)がある。これは髄鞘タンパク質の1つであるミエリン塩基性タンパク質(myelin basic protein; MBP)と同じ頻度で混合された4種類のアミノ酸のランダムポリマーである。酢酸グラチラマーはマウスおよびヒトの各種MHCクラスII分子に高いアフィニティーで結合することにより、MBPなどの髄鞘抗原がクラスII分子に結合することを競合的に阻害する。

(3)は抗CD20抗体であり、生体よりB細胞を除去することで、やはりMSの再発率を有意に低下させることが示され

ている (図1).

NMOの免疫療法に関して、MSとの違いはIFN- β に対する反応性である。NMO患者へのIFN- β 治療において、かえって重症化した例が報告されたため、現在ではNMOと判定されれば、IFN- β は使用しない。IFN- β がNMOに対して無効である原因は不明であるが、IFN- β 投与患者において、血清中BAFF (B cell-activating factor belonging to the TNF family) 濃度が上昇することが報告されている。BAFFはB細胞生存や分化を促進する因子として重要なため、NMOにおいては抗AQP4抗体産生など液性免疫を刺激して、症状の悪化を引き起こす可能性が考えられる¹¹⁾。NMOの再発抑制療法としては、現在、経口ステロイド剤が中心であるが、MS同様、抗CD20抗体によるB細胞除去療法が有効であると報告されている。これは、NMO病態における液性免疫の重要性と符合する結果である。また、当研究部では現在、前記の研究結果に基づき、NMOに対する抗IL-6受容体抗体療法の臨床研究を計画している (図2)。

おわりに

MSにはIFN- β が有効な一群と無効な一群が存在し、後者にはTh17細胞やIFN- β が病態形成に関与している可能性がある。また、NMOにおいてもTh17細胞と液性免疫の重要性が示唆されており、やはりIFN- β は無効である可能性が高い。以上より、MS、NMOの免疫療法においては、個々の患者における病態機序を検討したうえで、治療法を選択することが重要であると考えられる。

PROFILE 荒浪利昌

- 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所
- E-mail : aranami@ncnp.go.jp

1993年北海道大学医学部卒業。北海道大学大学院免疫科学研究所にて基礎免疫学を学ぶ。卒業後、国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部研究員として多発性硬化症の病態解析研究に従事。2006年より同研究部室長。

文献

- 1) Lennon VA, et al: Lancet (2004) 364: 2106-2112
- 2) Diveu C, et al: Curr Opin Immunol (2008) 20: 663-668
- 3) Hirota K, et al: Nat Immunol (2011) 12: 255-263
- 4) Durelli L, et al: Ann Neurol (2009) 65: 499-509
- 5) Segal BM, et al: Lancet Neurol (2008) 7: 796-804
- 6) Dominguez-Villar M, et al: Nat Med (2011) 17: 673-675
- 7) Chihara N, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2011) 108: 3701-3706
- 8) Ishizu T, et al: Brain (2005) 128: 988-1002
- 9) Axtell RC, et al: Nat Med (2010) 16: 406-412
- 10) Matloubian M, et al: Nature (2004) 427: 355-360
- 11) Krumbholz M, et al: Brain (2008) 131: 1455-1463



総説

多発性硬化症における α B-crystallinとosteopontinの関与*

荒浪利昌** 山村 隆**

Key Words : multiple sclerosis, osteopontin, α B-crystallin

背景

多発性硬化症(multiple sclerosis ; MS)は中枢神経系にT細胞, B細胞, マクロファージなどのリンパ球浸潤, 抗体沈着, 補体活性化などを伴う脱髄巣が多発し, 視力障害, 小脳失調, 運動麻痺, 感覚障害など多彩な神経症状を呈する慢性疾患である。MSの病因は不明であるが, 髄鞘蛋白反応性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。この病原性CD4陽性T細胞としては, IFN- γ 産生性Th1細胞や, 最近ではIL-17産生性Th17細胞も重要視されている¹⁾。MSの大部分は急性に発症し, 再発と寛解(時間的多発)を繰り返す。再発の誘因として, 感染症やストレスなどが想定されているが, 詳細なメカニズムは不明である。T細胞が産生するサイトカイン以外にもMS病態形成に関与が示唆されている因子として, α B-crystallin(CRYAB)やosteopontin(OPN)などがある(図1)。そのきっかけとなった研究が, 2001年にSteinmanらのグループによって報告された, MS病巣に発現する遺伝子産物の網羅的解析研究であった²⁾。MS死後脳病巣とコントロール脳標本から抽出したmRNAよりcDNAライブラリーを合成し, ハイスループレットシーケンサーを使用して, expressed sequence Tags(EST)を作製した。これにより, コントロールの脳標本に比べてMS病巣において発現が2.5倍以上の頻度で発現している54個の遺伝

子産物を同定した。そのうち最もMSでの発現頻度が高かったものがCRYABであり, OPNがトップ5であった。その後の研究で, これら2つの分子が, MSの再発や寛解の制御に関与する重要なメディエーターであることが示唆されている³⁾。

OPN

OPNは別名, SECRETED PHOSPHOPROTEIN 1(SPP1)あるいはEARLY T LYMPHOCYTE ACTIVATION 1(ETA1)とも呼ばれ, その存在は骨基質や細胞外マトリックスに認められるほか, 乳汁, 胎盤, 白血球などの正常組織, および腫瘍組織にも見出される。OPNはさまざまな分子との結合を介して, 接着分子, ケモカイン, サイトカイン様に働き, 多様な役割を果たすことが報告されている。骨組織においては, 骨芽細胞がOPNを産生し, 破骨細胞のピトロネクチン受容体と結合することにより骨吸収調節に関与する可能性が報告された⁴⁾。また, CD44に結合し, がん細胞の遊走や転移に関与することが示唆されている⁵⁾。さらに, 肝炎動物モデルにおいては, トロンピン切断型OPNが α 4 β 1や α 9 β 1インテグリンへの結合を介して, 炎症性細胞浸潤に関与していることが示されている⁶⁾。MSにおいては, T細胞に発現する α 4 β 1インテグリンに対する抗体が高い再発抑制効果があることが証明されており, 再発抑制薬として使用されている⁷⁾。抗 α 4 β 1インテグリン抗体は, α 4 β 1インテグリン

* Roles of osteopontin and α B-crystallin in the pathology of multiple sclerosis.

** Toshimasa ARANAMI, M.D., Ph.D. & Takashi YAMAMURA, M.D., Ph.D.: 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[☎187-8502 小平市小川東町4-1-1]; Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, Kodaira 187-8502, JAPAN

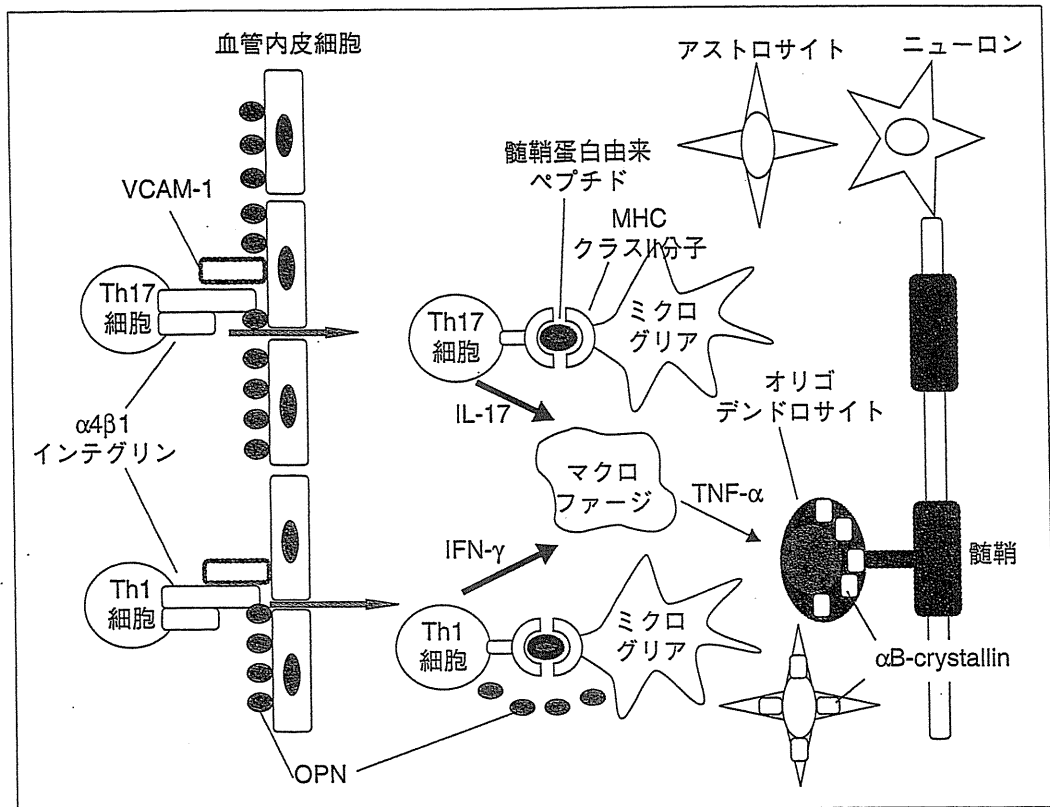


図1 MS病態形成に関する細胞および分子

活性化T細胞は血管内皮細胞が発現するVCAM-1やOPNと $\alpha 4\beta 1$ インテグリンを介して接着し、中枢神経実質に侵入する。ミクログリアやマクロファージなどの抗原提示細胞はクラスII分子に結合した髄鞘蛋白由来ペプチドを細胞表面に提示し、自己反応性Th1およびTh17細胞が活性化され、それぞれIFN- γ 、IL-17を産生する。これらのサイトカインは抗原提示細胞を活性化し、TNF- α などのサイトカイン産生を誘導する。また、抗原提示細胞はOPNを産生し、活性化T細胞の生存を促進する。種々の炎症性サイトカインによってオリゴデンドロサイトは障害され、細胞質に αB -crystallin発現が誘導される。 αB -crystallinはアストロサイトにも誘導され、これらの膠細胞のアポトーシスや炎症性サイトカイン産生を抑制する。

とそのリガンドであるvascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)およびOPNの結合をブロックすることにより、自己反応性T細胞が中枢神経系へ侵入するのをブロックすると考えられている。

MS病態におけるOPNの重要性を明らかにする目的で、動物実験モデルによる解析が行われた²⁾。MSの最も代表的な動物実験モデルは、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis ; EAE)である。これは、髄鞘蛋白由来のペプチドを結核死菌とともに不完全フロイントアジュバントに混ぜ、そのエマルジョンをマウスに免疫すると、約2週間で尾から下肢、体幹と上行する運動麻痺を発症するというものである。EAEを誘導したマウス脊髄におけるOPN蛋白の発現を解析したところ、発症急性期および再発期に、特に脱髄病巣部血管周囲のミクログリア

とニューロンに高度な発現が誘導されていることが免疫組織化学染色により見出された。ミクログリアは中枢神経系におけるマクロファージ様の貪食細胞であると考えられている。実際にMS病巣における発現も死後脳の免疫組織化学染色により解析され、大脳白質のMS病巣の微小血管内皮細胞、マクロファージ、星状膠細胞(アストロサイト)やミクログリアにも発現が認められた。また、OPN欠損マウスを作製し、野生型とOPN欠損マウスにEAEを誘導したところ、両方のマウスがEAEを発症したが、野生型マウスでは慢性進行型のEAEが誘導されたのに対して、OPN欠損マウスではピーク時の重症度が軽減されるなど、EAEの軽症化が認められた。このことは、OPNがEAE病態の重症化に関与していることを示唆した。そのメカニズムを明らかにするため、免疫したマウスの所属

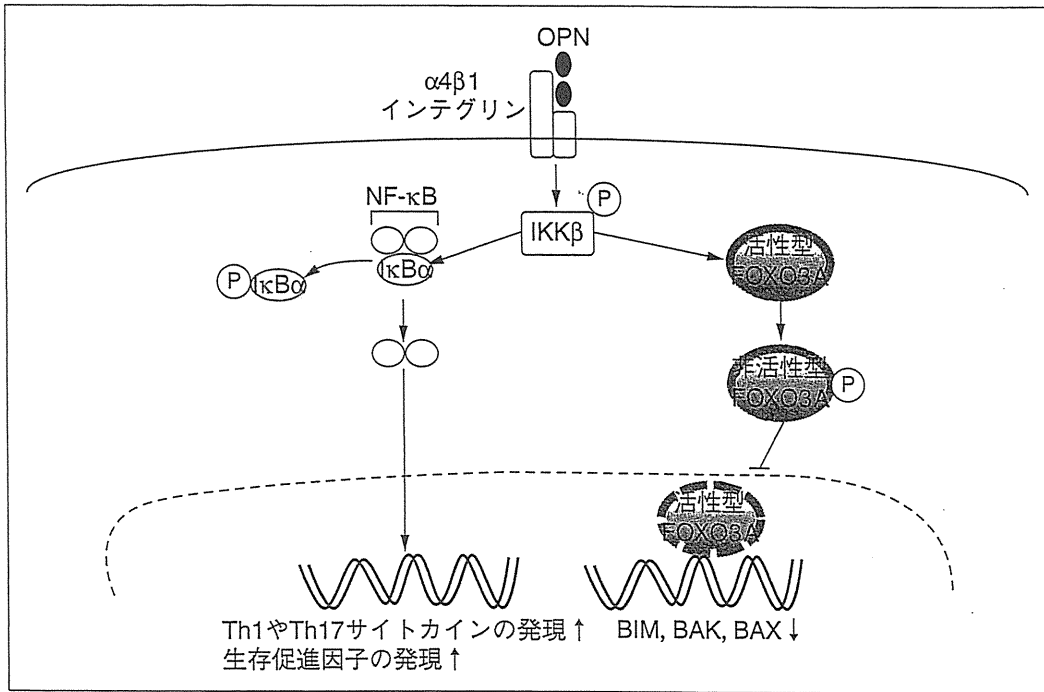


図2 OPNによって誘導される活性化T細胞内シグナル

OPNはIKK β をリン酸化を誘導し、これがI κ B α の分解を誘導する。I κ B α にマスクされていたNF- κ B (p50-RelA)の核内移行シグナルが露出し、核に移行し、Th1およびTh17サイトカイン発現および種々の生存促進遺伝子の発現が上昇する。一方、IKK β は活性化型FOXO3Aをリン酸化し不活性化FOXO3Aとする。これによりFOXO3Aは核内に移行出来ず、結果としてアポトーシス蛋白であるBIM, BAK, BAXの発現が低下し、アポトーシスが抑制される。

リンパ節よりT細胞を分離し、試験管内で再度免疫原ペプチドで刺激した。その結果、OPN欠損マウス由来のT細胞では増殖反応およびIFN- γ 産生が減弱し、抑制性サイトカインIL-10産生が増強していることがわかった。すなわち、OPNは主としてTh1反応の増強を介して、EAEを増悪させることが判明したのである。その後Shinoharaらは、OPN発現の制御機構を解析し、活性化T細胞においては、OPN発現はT-betによって誘導されることを見出した⁸⁾。T-betはTh1細胞分化に必須の転写因子であることから、自己反応性Th1細胞への分化が起こる際に誘導されるT-betによってOPNが誘導され、Th1反応を増強させるという制御機構が示唆された。

OPN欠損マウスにおけるEAEの結果から、OPNはEAE発症に必須ではないことが示唆されたが、再発や慢性的な炎症の進行における役割が示唆された。実際MS患者血清においても、再発時にOPN増加が認められることがわかった⁹⁾。再発過程におけるOPNの役割を明らかにする目的で、リコンビナントOPNを用いた実験がなされた¹⁰⁾。

この実験モデルでは、OPN欠損マウスにEAEを誘導すると、EAE発症後早期の軽症化が認められた。その時点でリコンビナントOPNを投与すると、いったん軽症化したマウスが再度重症化(再発)した。そしてその際、OPNによる活性化T細胞の生存促進効果が認められることがわかった。その分子メカニズムとしては、活性化T細胞においてOPNによりNF- κ Bが活性化され、同時にforkhead box O3A(FOXO3A)核内移行が抑制されていることがわかった(図2)。OPNはinhibitor of NF- κ B kinase β (I κ B kinase- β ; IKK β)の活性化を介してinhibitor of NF- κ B α (I κ B α)を分解する。I κ B α によりマスクされていたNF- κ B (p50-RelA)の核内移行シグナルが露出し、核に移行できるようになる。一方IKK β は、FOXO3Aを非活性化型にし、核内への移行を阻害し、アポトーシスを抑制する。さらに、OPNはアポトーシス促進分子であるBim, Bak, Baxの発現を抑制することも明らかとなった。これらの転写因子やアポトーシス関連分子に対する影響により、OPNは活性化T細胞のアポトーシスを抑制する

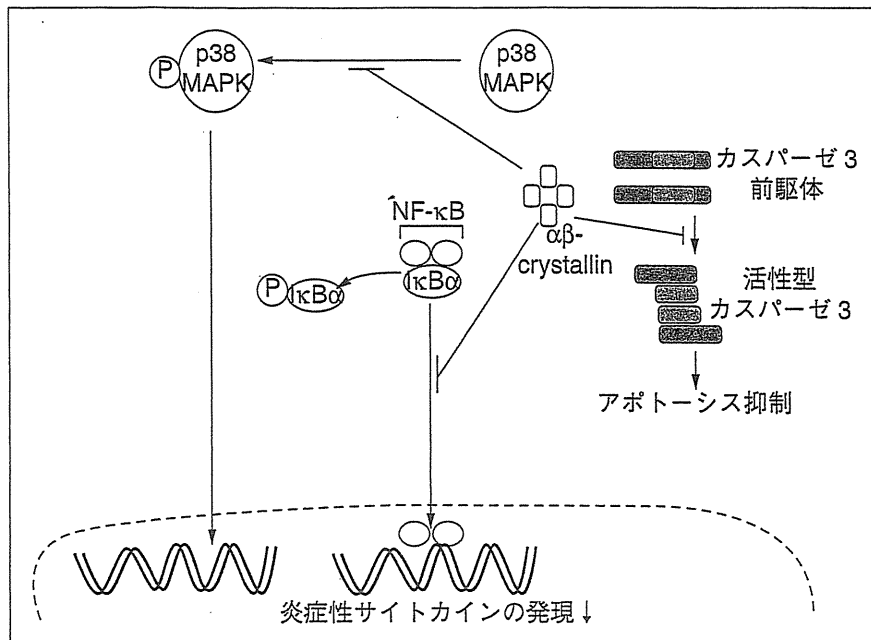


図3 α B-crystallinによって誘導される炎症シグナルの抑制
 α B-crystallinはカスパーゼ3前駆体から活性型カスパーゼ3への活性化を抑制し、アストロサイトのアポトーシスを抑制する。またCRYABは、NF- κ Bの活性化、核内移行を抑制し、炎症を促進するp38MAPキナーゼの活性化を抑制する。これらの働きにより、Th1, Th17反応において誘導されるさまざまな炎症性サイトカイン産生を抑制し、MS病態を寛解へと導く。

ことがわかった。以上より、OPNはサイトカイン産生、アポトーシス抑制など、自己反応性T細胞の病原性の増強を介して、MS再発病態の増悪に関与していると考えられる。

α B-crystallin (CRYAB)

Crystallin蛋白は、水晶体の可溶性蛋白質の90%を占め、 α , β , γ の3種類のcrystallin蛋白が含まれる。CRYABは、分子シャペロンであるsmall heat shock proteinファミリーに属し、水晶体、心臓、骨格筋などに発現が認められる¹¹⁾。van Noortらは、すべての髄鞘蛋白に対するヒト末梢血T細胞の増殖反応を解析した。その結果、CRYABがMS患者および健常者T細胞両方の増殖反応を誘導することを見出し、CRYABがMSの標的抗原の一つである可能性を指摘した¹²⁾。免疫組織化学染色により、CRYABが活動性MS病巣の稀突起膠細胞(オリゴデンドロサイト)および星状膠細胞の細胞質に発現が認められた¹³⁾。さらに、先に述べたMS病巣における遺伝子産物の網羅的解析において、最も高頻度に認められる遺伝子産物であることがわかり、CRYABのMS病態にお

ける重要性が高まった。そこで、SteinmanらはCRYABのMS病態形成における重要性を調べる目的で、CRYAB欠損マウスを作製し、EAEを誘導した。その結果、野生型マウスに比べ、CRYAB欠損マウスではEAEが重症化した¹⁴⁾。特に、臨床症状のピークおよび慢性時の症状の増悪が認められた。病理学的解析により、CRYAB欠損マウスでは、炎症性細胞浸潤と脱髄の増強が認められた。このような病理学的変化とアポトーシスの関連を調べる目的で、カスパーゼ3の免疫組織化学染色を行ったところ、CRYAB欠損マウスにおいては膠細胞でのカスパーゼ3の発現増強が認められた。また、CRYAB欠損マウスではこれに相応して、アポトーシス検出方法の一つであるTUNELL染色陽性膠細胞の頻度が高いことがわかった。このことは、CRYABがEAEにおいてアポトーシスを抑制することにより病態を抑制する働きがあることを示唆する。試験管内の実験系においては、まず免疫系細胞におけるCRYAB欠損の影響が調べられた。EAEを誘導したマウスの所属リンパ節T細胞を免疫原ペプチドで再刺激すると、CRYAB欠損マウス由来T細

胞は野生型に比べて、p38MAPキナーゼの活性化の亢進と大量のIL-2, IFN- γ , IL-17産生および高い増殖反応を示した。また、マクロファージをLPSで刺激する実験においては、CRYAB欠損マウス由来のマクロファージでは、野生型に比べて、p38MAPキナーゼの活性化の亢進とより大量の炎症性サイトカイン(IL-1, IL-6, IL-12 p40)産生が認められた。次に、星状膠細胞のアポトーシスおよび炎症性サイトカイン刺激に対する反応が調べられた。TNF- α によって星状膠細胞を刺激する系において、CRYAB欠損マウス由来の星状膠細胞では、I κ B α の発現低下とNF- κ Bの核内移行の促進が認められた。そして、再度TUNNEL陽性細胞の増加が認められた。以上より、CRYABは免疫系細胞(T細胞やマクロファージ)において、p38MAPキナーゼの活性化と炎症性サイトカイン産生を抑制するだけでなく、膠細胞に対してはアポトーシスを抑制するとともに、炎症に伴うNF- κ Bの活性化の抑制を介して炎症性サイトカイン産生を抑制し、EAEの症状を抑制する働きがあることが示唆される(図3)。さらに、再発寛解型MSの脳脊髄液中には、ほかの中樞神経疾患に比べて高濃度の抗CRYAB抗体が存在することが判明した。以上のような、EAE病態に対するCRYABの制御性機能をより明らかにする目的で、EAEを発症したマウスにリコンビナントCRYABを投与した。その結果、EAEの臨床症状は軽快し、自己反応性T細胞の増殖反応およびTh1, Th17サイトカイン産生は減弱した。したがって、CRYABは、EAE病態において寛解を誘導する働きがあると考えられる。MSにおいては中樞神経系での炎症に対して、CRYABが本来抑制的に働くはずが、それに対する自己抗体産生が誘導されることにより、CRYABの制御性機能が阻害されていると予想されている。最近、CRYABがマイクログリアを刺激し、TNF- α , CCL5, IL-13といったさまざまなサイトカイン、ケモカイン産生を誘導することが示された¹⁵⁾。これらのCRYABの機能は、免疫学的監視機能として炎症を収束させる方向に働くのではないかと考えられている。

結 語

MS病態では、Th17細胞、Th1細胞以外にもB

細胞、マクロファージ、CD25陽性制御性T細胞、NKT細胞やNK細胞など、さまざまな免疫系細胞のバランスの変化によって、再発と寛解の病態が形成されることが示唆されている¹⁶⁾。OPNとCRYABは、これら種々の免疫系細胞に働き、OPNは活性化T細胞の生存を維持し、NF- κ Bシグナルの増強を介して炎症性サイトカイン産生を増加させ再発を誘導するのに対して、CRYABはNF- κ Bシグナルを抑制し、膠細胞のアポトーシスを抑制することにより寛解を誘導することで、それぞれMS病態形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

文 献

- 1) Weiner HL. The challenge of multiple sclerosis : how do we cure a chronic heterogeneous disease? *Ann Neurol* 2009 ; 65 : 239.
- 2) Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, et al. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 2001 ; 294 : 1731.
- 3) Steinman L. A molecular trio in relapse and remission in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 2009 ; 9 : 440.
- 4) Reinholt FP, Hulthén K, Oldberg A, Heinegård D. Osteopontin—a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 4473.
- 5) Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 1996 ; 271 : 509.
- 6) Diao H, Kon S, Iwabuchi K, et al. Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity* 2004 ; 21 : 539.
- 7) Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, et al. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2003 ; 348 : 15.
- 8) Shinohara ML, Jansson M, Hwang ES, et al. T-bet-dependent expression of osteopontin contributes to T cell polarization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 17101.
- 9) Comabella M, Pericot I, Goertsches R, et al. Plasma osteopontin levels in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2005 ; 158 : 231.

- 10) Hur EM, Youssef S, Haws ME, et al. Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 74.
- 11) Dubin RA, Ally AH, Chung S, Piatigorsky J. Human alpha B-crystallin gene and preferential promoter function in lens. *Genomics* 1990 ; 7 : 594.
- 12) van Noort JM, van Sechel AC, Bajramovic JJ, et al. The small heat-shock protein alpha B-crystallin as candidate autoantigen in multiple sclerosis. *Nature* 1995 ; 375 : 798.
- 13) Bajramovic JJ, Lassmann H, van Noort JM. Expression of alphaB-crystallin in glia cells during lesional development in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1997 ; 78 : 143.
- 14) Ousman SS, Tomooka BH, van Noort JM, et al. Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature* 2007 ; 448 : 474.
- 15) van Noort JM, Bsibsi M, Gerritsen WH, et al. Alphas-crystallin is a target for adaptive immune responses and a trigger of innate responses in preactive multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010 ; 69 : 694.
- 16) Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T. Role of NK cells and invariant NKT cells in multiple sclerosis. *Results Probl Cell Differ* 2010 ; 51 : 127.

* * *