

201122019B

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21年度～平成23年度
総合研究報告書

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21年度～平成23年度
総合研究報告書

研究代表者 山 村 隆

平成24年（2012年）3月

目次

I. 総合研究報告

■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（総合）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 P7

■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 P12

■多発性硬化症と視神経脊髄炎における腸管在住リンパ球に関する研究

独) 国立精神・神経医療研究センター 三宅 幸子 P16

■網羅的 RNA, miRNA 発現解析からみた MS 新規創薬標的分子

明治薬科大学 佐藤 準一 P20

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P35

IV. 研究成果の刊行物・別刷 P39

I .総合研究報告(研究代表者)

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。3年間の研究では、1) Th17細胞特異的分子の同定と新たな治療戦略の策定、2) 多発性硬化症（MS）患者におけるTh17細胞関与を証明する研究、3) 腸内細菌によるTh17細胞修飾の研究、4) 分子間ネットワーク解析によるMSの治療標的探索、を進めた。1) については、MS患者末梢血T細胞で発現亢進の見られる核内転写因子NR4A2がTh17細胞特異的に発現する転写因子であることを明らかにし、同分子がTh17細胞の炎症性サイトカイン産生に必須であること、NR4A2 siRNAによってMS動物モデルEAEの発症が強く抑制されることを示した。2) についてはMS患者髄液で増加するT細胞集団がTh17細胞であるという作業仮説を検証したが、研究の結果、二種類の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、患者髄液で特異的に増加していることを見出した。同細胞はマトリックスプロテナーゼ9やオステオポンチンを産生し、血液脳関門モデルにおいて脳表面の基底膜を通過する高い能力を有することを示した。Th17細胞の解析を出発点として、MSの病態や治療標的に関する重要な知見が得られた。

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

本研究の目的は大きく分けて、1) Th17細胞の性状を理解してTh17細胞を制御する方法を明らかにすること、2) MSにおけるTh17細胞の関与の有無を検証することに分けられる。前者については、Th17細胞の発現する転写因子の同定（担当：大木、佐藤）、Th17細胞機能のsiRNA阻害がMS動物モデルEAEに及ぼす影響（担当：大木）、および腸内細菌叢とTh17細胞および関連リンパ球の関係の解明（担当：三宅）などに関する研究を進めた。また後者については、MS患者の末梢血および髄液について、T細胞ケモカイン受容体発現パターンを比較し、MS患者髄液で特異的に増殖しているT細胞集団を明らかにすることを試みた。解析の結果、MS患者末梢血T細胞で発現の亢進している遺伝子NR4A2がTh17細胞特異的に発現する機能分子であり、NR4A2機能をsiRNAで阻害することによってEAEが抑制されること、Th17細胞にはNR4A2依存性細胞と非依存性細胞が存在することを証明した他、MSの髄液で増殖するリンパ球集団（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）を同定するなどの成果が挙げられた。

A. 研究目的

多発性硬化症（MS）の病態の本質を理解して合理的な治療・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。

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の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)。

(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

EAE を発症した脳浸潤リンパ球のサイトカイン発現パターンをフローサイトメーターで解析した結果、IL-17 産生細胞に選択的な NR4A2 発現が認められ、MS 病態モデルの臓器浸潤 T 細胞において IL-17 産生能と NR4A2 発現の強い相関が示された。

NR4A2 特異的 siRNA の導入後に Th17 細胞の分化誘導を試みたところ、ROR γ t 発現を維持したまま NR4A2 発現と IL-17 産生がほぼ完全に消失した。また IL-21 産生と IL-23 受容体発現が強く抑制されていたが、IL-21 の添加により IL-23 受容体と IL-17 の発現が回復した。

EAE 誘導操作 (MOG₃₅₋₅₅ ペプチド免疫) と同時に、コラーゲンマトリクスに封入した NR4A2 特異的 siRNA を静脈投与すると、末梢血 T 細胞の NR4A2 発現抑制を伴って EAE 病態が顕著に軽快した。以上の結果から、NR4A2 が Th17 細胞機能に必須の転写因子であり、MS などの炎症性疾患において格好の治療標的となることが示唆された。

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 の髄液で集族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、メタロプロテイナーゼ 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。

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事が期待される。

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。一方でマウスでは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. 研究発表

1. 論文発表

1. Theil MM, Miyake S, Mizuno M, Tomi C, Croxford J, Hosoda H, Theil J, von Horsten S, Yokote H, Chiba A, Lin Y, Oki S, Akamizu T, Kanagawa K, Yamamura T: Suppression of experimental

autoimmune encephalomyelitis by Ghrelin. *J Immunol.* 83(4):2859-66, 2009

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

3. 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

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

5. Sanvito L, Tomita A, Chihara N, Okamoto T, Lin Y, Ogawa M, Gran B, Aranami T, Yamamura T. 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* 236:111-117, 2011

6. 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

7. 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

8. 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

9. 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

10. 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

総説

- 1) 荒浪利昌、山村隆：多発性硬化症. 炎症・再生医学事典：216-218, 2009
- 2) 富田敦子、荒浪利昌、山村隆. MS の免疫病態のトピックス. *Brain Medical* 22 : 25-30, 2010.
- 3) 荒浪利昌、山村隆. 2010 年、炎症と T 細胞サブセット. *治療学* : 44 : 11-13, 2010.
- 4) 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, 2010.

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

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. 7th-11th, 2010

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

Oki S, Raveney B., T. Yamamura: Oral administration of the synthetic retinoid Am80 ameliorates Th17-mediated autoimmunity of the eye and central

nervous system. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug. 22nd-27th, 2010

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

Yamamura T., H. Yokote, J.L. Croxford, S. Oki, H. Mizusawa, S. Miyake: NKT cell-dependent amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by altering gut flora. The 5th international symposium on CD1/NKT cells, Kamakura Kanagawa, Mar. 26th, 2009

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

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

[国内学会]

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

大木伸司、ベンジャミン・レイバニー、吉村元、山村隆: オーファン核内受容体 NR4A2 は IL-17 産生性 T 細胞と自己免疫応答に強く連関する 第22回日本神経免疫学会学術集会(東京)、2010年3月17日

大木伸司、レイバニー・ベン、クレマン・クリスチャ

ン、首藤紘一、山村隆：実験的自己免疫性ブドウ膜炎（EAU）に対する合成レチノイド Am80 の病態抑制効果
第 21 回日本神経免疫学会学術集会（大阪） 2009 年 3 月 13 日

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

G. 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.総合研究報告(研究分担者)

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)は、自己抗原に対する過剰な免疫応答の結果として生じる典型的な自己免疫疾患である。近年、MSの病態形成に関わる細胞群としてTh17細胞が注目されており、Th17細胞の機能制御がMSをはじめとする自己免疫疾患の新規治療法開発につながることを期待されている。本研究では、治療標的分子の候補として、核内受容体分子であるレチノイン酸受容体RARとオーファン核内受容体NR4A2に着目し、Th17細胞機能および病態との関連を解析した。その結果、RARアゴニストである合成レチノイドAm80が強いTh17細胞分化抑制能を有すること、Am80の予防的あるいは治療的経口投与により、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)と実験的自己免疫性ブドウ膜炎(EAU)の病態制御が可能であることを明らかにした。さらにMS患者由来末梢血T細胞の網羅的遺伝子発現解析から、病原性Th17細胞の機能と密接に関わる分子として同定したNR4A2が、病原性Th17細胞の機能と極めて密接に相関し、NR4A2特異的siRNAのin vivo投与によりEAEが抑制できることを示した。さらに詳細な解析を目指して樹立したCD4陽性T細胞特異的NR4A2欠損(NR4A2cKO)マウスを用いた解析から、MOGペプチドを免疫してC57BL/6マウスに誘導するEAEの病態形成時に、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ことを明らかにした。

A. 研究目的

近年、多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)に代表される種々の自己免疫疾患におけるTh17細胞の機能が注目されている。本研究では、Th17細胞機能制御を介した自己免疫疾患治療薬候補としての合成レチノイドAm80の効果を、EAEとEAUという2種類のマウス自己免疫疾患モデルを用いて評価した。またMS患者T細胞の網羅的遺伝子発現解析よりTh17細胞機能との相関を明らかにしたNR4A2の、病態形成過程における役割をより詳細に解析するとともに、NR4A2の機能制御による新規自己免疫疾患治療法確立の可能性を探索した。2種類の核内受容体分子の自己免疫疾患形成における機能を解明するとともに、これら標的とした新規MS治療法開発を目指したデータ収集を行うことを目的とした。

B. 研究方法

① C57BL/6J(B6)マウス由来脾臓細胞より分離したナイーブT細胞(CD4+CD44-CD25-CD62Lhigh)を、Th17細胞誘導条件下(IL-6/TGF-β)で種々の合成レチノイド存在下にCD3/CD28抗体刺激を行い、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。MOG₃₅₋₅₅ペプチドあるいはhIRBP₁₋₂₀ペプチドと1mgの結核死菌をフロイントアジュバントと混合して作製したエマルジョンをB6マウスに皮下免疫後、さらにDay0とDay2に百日咳毒素を腹腔内投与することにより、EAEあるいはEAUを誘導した。0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC)に懸濁したAm80を、予防的あるいは治療的ブ

ロトコールド隔日経口投与(3mg/kg)して、病態抑制効果を比較した。それぞれの標的臓器より単核球を分離し、浸潤細胞の組成と再刺激後のサイトカイン産生能を測定するとともに、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。EAE発症マウスの中樞神経系(CNS)浸潤細胞由来のヘルパーT細胞からRNAを抽出し、GeneChip解析を行った。Am80投与群と非投与群の間で網羅的遺伝子発現解析を行い、Am80の病態抑制作用の分子メカニズムの解析を試みた。

②B6マウスにMOG₃₅₋₅₅ペプチドを免疫して誘導したEAE発症マウスの脳・脊髄、末梢血、リンパ節と脾臓から、フローサイトメーターを用いてヘルパーT細胞を分離した。得られた細胞を、Cytokine Secretion Assay Kitを併用してIL-17産生とIFN-γ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。B6マウス脾臓由来ナイーブT細胞に、Nucleofector(Amaxa社)を用いてNR4A2特異的siRNAを導入し、Th17細胞誘導条件下で培養後のサイトカイン産生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。カラーゲンマトリクスに封入したNR4A2特異的siRNAをEAEマウスに静脈投与して、病態抑制効果を評価した。

マウスNR4A2遺伝子の開始コドンを含むエクソンをloxP配列で挟んだターゲティングベクターを用いて作製したfloxedNR4A2マウスを、CD4-Creマウスと交配してNR4A2cKOマウス系統を樹立した。マウスにMOG₃₅₋₅₅ペプチドを免疫してEAEを誘導した。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マウスの各種臓器

からフローサイトメーターを用いて CD4 陽性 T 細胞を分離した。分離した細胞を CD3/CD28 抗体刺激あるいは MOG/APC 刺激し、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 細胞を、TGF- β 依存性 (IL-6+TGF- β) 条件下あるいは TGF- β 非依存性 (IL-1+IL-6+IL-23) 条件下で 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。

(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

① Am80 の経口投与により、予防的プロトコールおよび治療的プロトコールの双方で、EAE に対する病態改善効果が得られた。このとき CNS 浸潤 T 細胞の IL-17 産生と ROR γ t 発現は、Am80 投与により有意に減少したが、Foxp3 の発現増加は検出できなかった。Am80 の継続投与により CNS 浸潤 T 細胞の IL-17 産生と ROR γ t 発現は持続的に抑制されていたにもかかわらず、EAE 後期では Am80 の治療効果が減弱する傾向が認められた。このとき Am80 の投与群では、CNS 浸潤細胞の IL-10 産生が有意に抑制されており、Am80 の効果の消失に関わる可能性が考えられた。一方、EAU マウスでは、15 日目前後より有意な細胞浸潤が認められ、17 日目頃に細胞浸潤のピークを迎えた後、20 日目以降には浸潤細胞数が減少し、寛解した。Am80 の経口投与により、全観察期間を通じて眼球への細胞浸潤がほとんど消失し、総浸潤細胞数は対照群に比して 10% 以下に抑制された。Am80 投与後の眼球浸潤 CD4+T 細胞では、病態形成に伴う ROR γ t 発現が抑制され、Foxp3 発現の著明な増強が誘導された。Am80 を継続投与することで、EAE の場合と同様、臓器浸潤 T 細胞の IL-10 産生抑制が認められたが、全観察期間を通じて Am80 の病態抑制効果には大きな影響を認めず、本系における IL-10 の関与は大きくはないと考えられた。次に EAE 発症マウスの CNS より分離したヘルパー T 細胞から RNA を回収し、Am80 投与群と非投与群の間で GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。Am80 投与により、T 細胞のケモカイン受容体発現と接着分子発現が大きく変動することが明らかとなり、これらの変動が Am80 の病態抑制作用の分子基盤となっている可能性が考えられた。

② MOG 誘導性 EAE を発症したマウスの CNS では、相当数の IL-17 産生細胞および IFN- γ 産生細胞の浸潤が認められたが、IFN- γ 産生の有無にかかわらず IL-17 産

生細胞に選択的な NR4A2 発現が認められ、標的臓器浸潤 T 細胞の IL-17 産生能と NR4A2 発現の強い相関が示された。NR4A2 特異的 siRNA 導入後に分化させた Th17 細胞では、ROR γ t 発現を維持したまま NR4A2 発現と IL-17 産生がほぼ完全に消失した。さらに siRNA 処理 T 細胞では IL-21 産生と IL-23 受容体発現が強く抑制されており、IL-21 の添加により IL-23 受容体と IL-17 の発現が回復した。MOG₃₅₋₅₅ 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 を静脈投与することで、末梢血 T 細胞の NR4A2 発現抑制を伴って EAE 病態が顕著に軽快した。さらに CNS 浸潤細胞と所属リンパ節由来 T 細胞の IL-17 産生は、いずれも siRNA 処理群で有意に抑制されていた。

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た。CNS への細胞浸潤は、対照マウスよりは明らかに少ないものの、NR4A2cKO マウスでも有意に増加していた。しかし NR4A2cKO マウスの CNS から分離した T 細胞の IL-17 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。NR4A2cKO マウスでは、免疫後対照マウスより 2~3 週間遅れて臨床スコアとしては同程度の EAE を発症した。この時、CNS への細胞浸潤と、分離した T 細胞の IL-17 産生有意に認められ、対照マウスとの間に差は認めなかった。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、対照マウスよりむしろ高値を示す傾向にあった。In vitro で分化させた Th1 細胞 (IL-12) の抗原特異的 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 産生は、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。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

種々の自己免疫疾患モデルあるいはヒト自己免疫疾患において、Th17 細胞が病原性 T 細胞の主要な細胞集団であることが明らかにされている。よって、Th17 細胞分化の選択的抑制により、病態制御を可能にする新規治療法開発への道が開けると考えられる。

RAR α/β に選択的に作用し、APL 治療薬として臨床応用されている合成レチノイド Am80 は、顕著な Th17 細胞分化抑制効果を示し、Am80 の経口投与により EAE のみならず EAU でも顕著な病態改善効果を示した。興味深いことに、EAE では Am80 により浸潤 T 細胞の ROR γ t 発現が有意に減少する一方で、Foxp3 発現は増加しなかったのに対し、EAU では投与群の浸潤 T 細胞における Foxp3 の著しい発現亢進を認めた。さらにいずれのモデ

ルにおいても、Am80 の継続投与により臓器浸潤 T 細胞からの IL-10 産生が抑制されたが、EAE では病態後期の Am80 の効果の減弱が認められた一方で、EAU では実験期間を通じて Am80 による病態抑制効果の減弱は認めなかった。よって合成レチノイド Am80 は、複数の自己免疫疾患モデルに共通して Th17 細胞機能抑制による病態改善効果を示すことが明らかとなった。

一方、T 細胞の NR4A2 発現は IL-17 産生細胞に限局しており、NR4A2 特異的 siRNA 処理により *in vitro* で分化させた Th17 細胞の IL-17 産生は、IL-21 産生と IL-23 受容体発現の抑制を伴ってほぼ完全に消失し、NR4A2 が Th17 細胞分化過程に重要な役割を果たすことが示された。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。

NR4A2cKO マウスに EAE を誘導すると、抗原特異的 IL-17 産生と初期の E 発症が強く抑制され、NR4A2 が抗原特異的 IL-17 産生をとまなう EAE の初期病態形成に深く関わることが示された。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 産生が対照群と同程度であることから、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。さらに 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かった。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、想定しう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、*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。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 MS 患者における、各 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

本研究では、2 種類の核内受容体分子に着目し、EAE 病態における機能解明と治療効果の評価を行った。Am80 の経口投与により、Th17 細胞機能抑制を伴って EAE および EAU の病態改善効果が得られたことから、種々の自己免疫疾患に対する新規治療薬として適用できる可能性が示された。また NR4A2 は、自己免疫疾患と密接に関わる Th17 細胞機能に極めて重要な制御因子であり、その発現制御により EAE 病態の改善が得られることを示した。さらに NR4A2 依存性の異なる少なくとも 2 種類の IL-17 産生細胞が EAE の病態形成に関

わることを明らかにした。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. 研究発表

1. 論文発表

大木 伸司：多発性硬化症における病原性 T 細胞のサイトカイン産生制御機構、生化学(日本生化学会編)、第 82 巻 745-750 (2010)

大木 伸司：多発性硬化症の自己免疫病態と新規治療戦略、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)

Christian Klemann, Benjamin JE Raveney, Anna K Klemann, Tomoko Ozawa, Stephan von Hörsten, Koichi Shudo, Shinji Oki, Takashi Yamamura: Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates EAE
Am. J. Pathol. 174, 2234-45 (2009)

Michael-Mark Theil, Sachiko Miyake, J. Ludovic Croxford, Hiroaki Yokote, Hiroshi Hosoda, Julia Schween, Stephan von Hörsten, Asako Chiba, Youwei Lin, Shinji Oki, Takashi Akamizu, Kenji Kangawa, Takashi Yamamura: Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by ghrelin.
J. Immunol. 181, 2859-2866 (2009)

Christian Klemann., Benjamin JE Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura: Retinoid signals and Th17-mediated pathology.
Jpn. J. Clin. Immunol. 32 (1), 20-28 (2009)

Shinji Oki, Takashi Yamamura: Identification of a possible therapeutic target through pathogenic T cell analysis of multiple sclerosis.
Jpn. J. Clin. Immunol. 32 (4), 214-222 (2009)

2. 学会発表

[国際学会]

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
- 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. 7th-11th, 2010
- Raveney B., S. Oki, T. Yamamura: Expression of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for IL-17 production by Th17 cells.
14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug. 22nd-27th, 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
14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug. 22nd-27th, 2010
- Yamamura T., H. Yokote, J.L. Croxford, S. Oki, S. Miyake: NKT cell-dependent amelioration of EAE by altering gut flora. Keystone Symposia 2009: Multiple Sclerosis, Santa Fe NM, Jan. 25th, 2009
- Yamamura T., H. Yokote, J.L. Croxford, S. Oki, H. Mizusawa, S. Miyake: NKT cell-dependent amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by altering gut flora. The 5th international symposium on CD1/NKT cells, Kamakura Kanagawa, Mar. 26th, 2009
- Raveney B., S. Oki, T. Ozawa, T. Yamamura: Expression of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for IL-17 production by Th17 cells. 9th Annual Conference of FOCIS, San Francisco, Jun. 11th-14th, 2009
- Oki S: Nuclear receptors as therapeutic targets for multiple sclerosis. 2nd Conference of Germany and Japan Neuroimmunology Eibsee Germany, Jul. 7th-11th, 2009
- Raveney B., S. Oki, T. Ozawa, T. Yamamura: Expression of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for IL-17 production by Th17 cells. 2nd European Congress of Immunology, Berlin Germany, Sep. 13th-16th, 2009
- [国内学会]
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 の機能的関連 日本薬学会第131年会(静岡)、2011年3月28日
- 大木 伸司、ベンジャミン・レイバニー、吉村 元、山村 隆: オーファン核内受容体 NR4A2 は IL-17 産生性 T細胞と自己免疫応答に強く関連する 第22回日本神経免疫学会学術集会(東京)、2010年3月17日
- 小口 翔、ベン・レイバニー、大木 伸司、天竺桂弘子、佐藤 準一、山村 隆: 合成レチノイド Am80 は Th17 依存性眼炎症を抑制し Foxp3 陽性 T細胞を誘導する 日本薬学会第130年会(岡山) 2010年3月28日
- 大木 伸司、レイバニー・ベン、クレマン・クリスチャン、首藤 紘一、山村 隆: 実験的自己免疫性ブドウ膜炎(EAU)に対する合成レチノイド Am80 の病態抑制効果 第21回日本神経免疫学会学術集会(大阪) 2009年3月13日
- Oki S, B Raveney, T Yamamura: AM80, a synthetic retinoid, ameliorates Th17-mediated ocular autoimmunity and promotes the infiltration of Foxp3+ T cells into the eye 第39回日本免疫学会総会・学術集会(大阪) 2009年12月2日
- Raveney B, S. Oki, T Yamamura: Expression of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for IL-17 production by Th17 cells 第39回日本免疫学会総会・学術集会(大阪) 2009年12月2日
- Ichikawa D, M Mizuno, S. Oki, T Yamamura, S Miyake:

Identifiatiion of susutrates of GRAIL E3 ligase 第
39回日本免疫学会総会・学術集会（大阪） 2008年12
月2日

G. 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 両方の産生細胞を含み、ミエリン塩基性蛋白特異的に IFN- γ 及び IL-17 を産生した。更にメタロプロテイナーゼ 9 とオステオポンチン産生能を有し、*in vitro* グリアリミタンスモデルにおいて高い浸潤能を示した。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 IFN- γ /IL-17 double producer を含み、潜在的な髄鞘抗原反応性と血液脳関門破壊能を有する、MS 再発病態形成に重要な T 細胞サブセットであると考えられる。

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ヒト末梢血 IL-17 産生細胞を同定する手法を報告している¹⁾。本研究の目的は、このケモカイン受容体発現パターンによる T 細胞サブセットを区別する手法を用いて、MS 再発時の髄液に集積する T 細胞サブセットを同定することである。

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

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) 細胞培養：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、培養上清を回収した。また、これらの T 細胞サブセットを、CD3 陽性細胞を磁気ビーズを用いて除去した PBMC と共にミエリン塩基性蛋白（MBP）あるいはトリ卵白アルブミン（OVA）存在下で 1 週間培養し、培養上清を回収した。これらの培養上清に含まれる IFN- γ 及び IL-17 濃度を ELISA によって測定した。

- (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) 非炎症性神経疾患、炎症性神経疾患、再発時 MS の PBMC と髄液細胞の比較において、CCR2 陽性 CCR5 陽性亜分画が、MS においてのみ、髄液での頻度が末梢血より高いことが判明した。
- (2) CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞を PMA とイオノマイシンで刺激すると、全メモリー T 細胞の平均値と比較して、有意に高い IFN- γ 及び IL-17 産生を示した。また、細胞内サイトカイン染色において、IFN- γ /IL-17 double producer を含むことが判明した。
- (3) 活性化 CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の培養上清は zymography で解析したところ、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 活性を示さないことが判明した。また、活性化 CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞培養上清は、この T 細胞を除去したメモリー T 細胞の培養上清と比較して、有意にオステオポンチン濃度が高い事が判明した。
- (4) MBP 存在下で培養した MS 再発時末梢血由来 CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の培養上清は、IFN- γ と IL-17 を含み、特にコントロールの OVA

存在下での培養上清と比較して、有意に IFN- γ 濃度が高いことが判明した。一方、MS 再発期由来の CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞以外のメモリー T 細胞、MS 寛解期 CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞、および健常者 CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の培養上清中には有意なサイトカイン産生は認められなかった。

- (5) 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 細胞亜分画は IFN- γ /IL-17 double producer を含み、また他の T 細胞と比較して、MMP-9 およびオステオポンチン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 MBP 特異的な T 細胞を含むことが判明した。この T 細胞は、IFN- γ /IL-17 double producer を含み、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. 研究発表

原著論文

- 1) 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. 2011; 108(9):3701-6.
- 2) Increase of Ki-67+ natural killer cells in multiple sclerosis patients treated with interferon- β and interferon- β combined with low-dose oral steroids. Sanvito L, Tomita A, Chihara N, Okamoto T, Lin Y, Ogawa M, Gran B, Aranami T, Yamamura T. J Neuroimmunol. 2011 Jul;236(1-2):111-7.

総説

- 1) 荒浪利昌、山村隆：多発性硬化症。炎症・再生医学事典：216-218, 2009
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 荒浪利昌、山村隆。2010年、炎症とT細胞サブセット。治療学：44：11-13.
- 5) 荒浪利昌、山村隆。2010年、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.
- 6) 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

- 1) Tagawa A, Aranami T, Matsumoto M, Yamamura T: Aire-deficient Mice Develop Spontaneous Autoimmunity to the Central Nervous System Antigens. Annual meeting of Federation Of Clinical Immunology Societies (FOCIS). San Francisco, CA, USA. June 14 2009.
- 2) Aranami T, Sato, Yamamura T: α B-crystallin as an immunomodulator in MS. Second German-Japanese Neuroimmunology Symposium. Eibsee, Germany. July 11 2009
- 3) 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, August 21.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Aranami T, Sato, Yamamura T: T cell subsets identified with chemokine receptors in MS. MS Immunology Seminar. Nottingham, England. October 31 2010.
- 7) Interleukin 6 Signaling Enhances Anti-aquaporin 4 Autoantibody Production from Plasmablasts in

Neuromyelitis Optica. Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, Yamamura T, Annual Meeting of Federation of Clinical Immunology Societies, June 24, Washington DC, USA

8) 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

- 1) 佐藤和貴郎、荒浪利昌、山村隆：ケモカイン受容体の発現を用いた多発性硬化症患者におけるヒトTh17細胞の検討。第21回日本神経免疫学会学術集会，大阪，3.12, 2009
- 2) 佐藤和貴郎、荒浪利昌、富田敦子、岡本智子、小川雅文、山村隆：MMP9を高発現するCCR2陽性CCR5陽性細胞の多発性硬化症における重要性。第22回日本神経免疫学会学術集会，東京，3.18, 2010
- 3) 荒浪利昌、佐藤和貴郎、山村隆：多発性硬化症病巣に高発現する熱ショック蛋白 α B-crystallinによるCD28陰性Th1細胞偏倚の誘導。第21回日本神経免疫学会学術集会，大阪，3.12, 2009
- 4) 佐藤和貴郎、富田敦子、荒浪利昌、岡本智子、小川雅文、山村隆：MMP9を高発現するCCR2陽性CCR5陽性細胞の多発性硬化症における重要性。第37回日本臨床免疫学会総会，東京，11.3, 2009
- 5) 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

6) 視神経脊髄炎 (NMO) における plasmablastsの関与、千原 典夫、荒浪利昌、林 幼偉、岡本 智子、小川 雅文、戸田 達史、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

G. 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在住リンパ球に関する研究

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

新規 Natural Killer T (NKT)細胞集団である Mucosal Associated Invariant T (MAIT)細胞は、粘膜組織に多く存在し、その成熟に腸内細菌叢が関与することが知られている。多発性硬化症モデルにおいては病態抑制的に作用するが、関節炎モデルにおいては病態増悪に関与することを報告してきた。ひと MAIT 細胞は、その頻度がマウスに比して高いことが推測され解析が待たれていた。本研究では、ひと MAIT 細胞は、健康人末梢血の $\alpha\beta$ 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 細胞であることを明らかにした。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低下しており、MAIT 細胞はこれらの神経免疫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細胞受容体にインヴァリントな α 鎖 (マウス V α 19 J α 33、ヒト V α 7.2 J 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

健康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 7.2 J 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。その他個人情報の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

健康人においては、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、健康人末梢血の $\alpha\beta$ 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