

図2 NR4A2の誘導因子とターゲット分子

NR4A2は、脂肪酸、プロスタグランジン、カルシウム、増殖因子、ペプチドホルモン、神経伝達分子など、あるいはストレスや物理刺激に応答して発現が誘導され、いずれもNF-κBあるいはCREBの活性化を介すると考えられている。一方、このようにして発現したNR4A2分子は、NGFI-B response element (NBRE), Nur-responsive element (NurRE), DR5などの特定の配列を認識してターゲット遺伝子の発現を誘導する。これまでにチロシンヒドロキシラーゼを筆頭に、複数のターゲット遺伝子が報告されている。

NGFI-B response element (NBRE; 単量体あるいは2量体のNR4A分子が結合), ②NBRE類似的AAAT(G/A)(C/T)CAの逆向き繰り返し配列からなるNur-responsive element (NurRE; プロオピオメラノコルチン (POMC) プロモーターに存在), ③DR5配列 [レチノイドX受容体 (RXR) とのヘテロダイマー形成による] の3種の配列が知られている。NR4A2の標的分子としてもっともよく解析されているのが、ドパミン (DA) 生成に必須の酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) である。TH遺伝子プロモーターのNBREを介して、NR4A2依存的なDAの産生が誘導される一方、NR4A2欠損マウスでは中脳黒質のDA産生ニューロンの形成が障害される⁷⁾。さらに、家族性パーキンソン病の一部にNR4A2の遺伝子異常が認められる⁸⁾ことから、NR4A2はTH発現に必須の因子であると考えられている。ほかにも個別の解析から、NR4A2のターゲットとしてneuropilin-1, vasoactive intestinal peptide (VIP), aldosterone合成酵素, アロマターゼ, オステオポンチン, オステオカルシンなどが報告されており、NR4A2は中枢神

経機能のみならず、骨代謝の機能制御にもかかわる可能性がある。さらに、in silicoの解析の結果からは、多くの遺伝子にNBRE配列が存在することが示されている⁹⁾が、機能的な解析は今後の課題といえる。

免疫系における NR4Aファミリー分子の機能

免疫系におけるNR4Aファミリー分子の機能に関しては、T細胞アポトーシス誘導、および胸腺における「負の選択」におけるNR4A1分子の機能が、とくに詳細に解析されている^{10)~13)}。すなわち、TCR刺激によりカルシウム依存性に活性化したMEF2がNR4A1の発現をひき起こし、T細胞アポトーシスを誘導する。おそらくこの経路は、NR4A1分子とBcl2分子との分子間相互作用を介した制御を受けていると考えられている。そして、Cabin1がMEF2にHDACをリクルートすることにより、この経路を遮断してアポトーシスを抑制する。一方、NR4A1単独欠損マウスの表現型は、胸腺あるいは末梢のT細胞アポトー

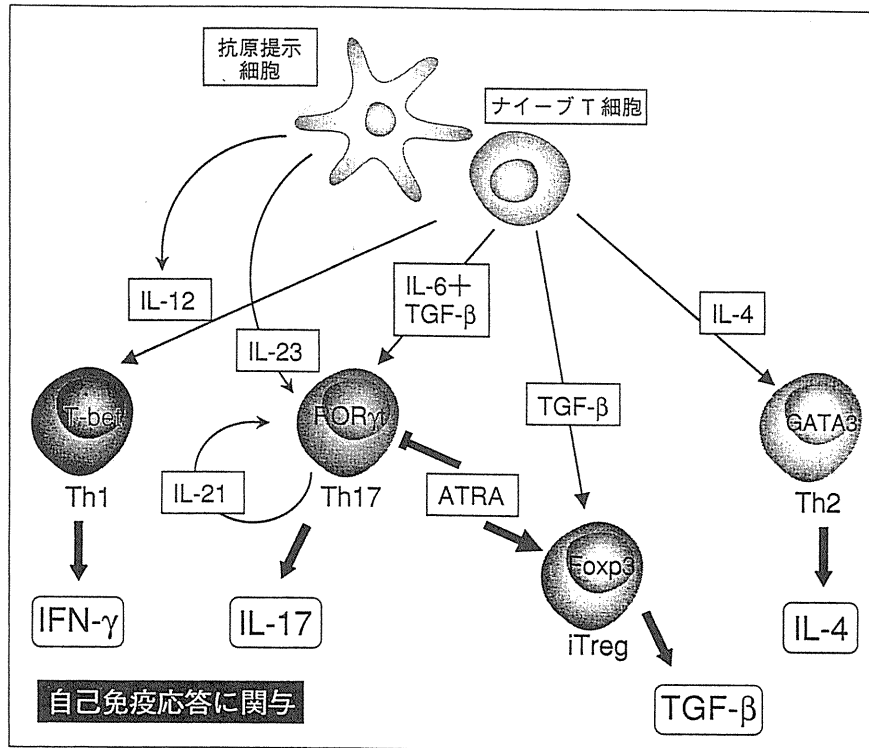


図3 ヘルパー T 細胞の分化と機能

ナイーブ T 細胞が抗原提示細胞上の抗原を認識すると、種々のサイトカイン依存性にそれぞれ機能的に異なるエフェクター T 細胞へと分化することが知られている。以前は感染免疫などにかかわる Th1 細胞と、アレルギー反応などにかかわる Th2 細胞の二極対立の構図により説明されていたが、近年の Th17 細胞と制御性 T 細胞 (Treg 細胞) の発見に伴い、各エフェクター T 細胞の複雑な分化制御機構が次々と明らかになりつつある。自己免疫の観点からは、IFN- γ 産生性の Th1 細胞と、IL-17 産生性の Th17 細胞はいずれも自己免疫病態をひき起こす病原性 T 細胞集団であると考えられており、双方の細胞機能を制御することが重要な課題となっている。

シスに関して、野生型マウスとの間に大きな違いはなく、胸腺での発現パターンなどから推測するに NR4A3 などの他の NR4A ファミリー分子が、NR4A1 欠損を補完することにより、強い表現型の発現を抑制していると考えられる。一方、NR4A2 欠損マウスでは、中脳の DA 産生ニューロンの欠損が著しく、胎児は生後すぐに死亡するため、免疫系を含む成体の機能異常に関する解析は乏しい。興味深いことに NR4A2 欠損マウスの表現型は、NR4A2 の機能が他の NR4A1 や NR4A3 では補完できないことを意味しており、NR4A2 が他の NR4A ファミリー分子とは異なる独自の機能を有する可能性を予想させる。

NR4A2 と自己免疫疾患

MS では、Th1 細胞や Th17 細胞などの炎症性 T 細胞が脳炎惹起に重要な役割を果たす。ヘルパー

T 細胞の分化機構は Th17 細胞¹⁴⁾ と制御性 T 細胞¹⁵⁾ の発見を契機に、以前にも増して複雑になりつつある (図 3)。MS の病態形成には自己反応性 T 細胞が決定的な役割を果たすと考えられており、このような病原性 T 細胞の包括的な機能解析は、新規治療ターゲットの絞り込みに有効な手段である。このような観点からわれわれは、DNA マイクロアレイによる MS 患者末梢血 T 細胞の遺伝子発現解析を通じて、MS で健常者に比較して発現亢進する遺伝子群の同定を試み、その結果、もっとも有意な発現差異を認めた分子として NR4A2 を同定した³⁾。NR4A2 分子は核内受容体型の転写因子であるが、T 細胞における機能は不明な点が多かったため、MS のマウスモデルである EAE を併用してさらなる病態との関連を解析した⁴⁾。

C57BL/6 マウスに MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを免疫する

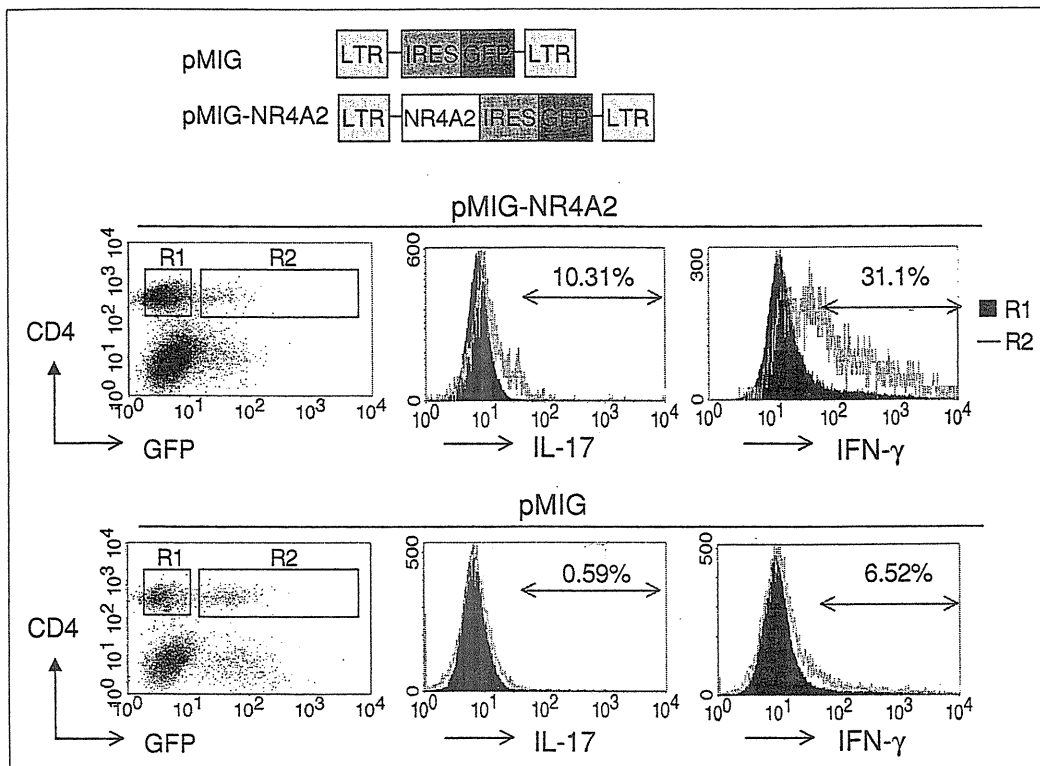


図4 NR4A2を介した炎症性サイトカイン産生増強

T細胞の炎症性サイトカイン産生に対するNR4A2分子の機能を解析するため、NR4A2遺伝子を組み込んだレトロウイルス、あるいはコントロールウイルスを用意し、マウス脾臓CD4陽性T細胞に感染させた。GFPの発現を指標に感染細胞を同定し、再試激後の炎症性サイトカイン産生を、細胞内サイトカイン染色法を用いて比較した。GFP陰性細胞群(R1)では図の上下でサイトカイン産生レベルに大きな差はないが、GFP陽性細胞群(R2)では、コントロール群(下段)に比べてNR4A2発現群(上段)における炎症性サイトカインの産生がいずれも増強している(IL-17; 0.59% vs. 10.31%, IFN- γ ; 6.52% vs. 31.1%)。

ことによりEAEを誘導し、脳脊髄(CNS)浸潤細胞、末梢血、所属リンパ節細胞、脾臓細胞から分離したT細胞のNR4A2の発現レベルを、定量PCR法により比較すると、CNS浸潤T細胞および末梢血T細胞で、選択的なNR4A2の発現亢進が認められた。さらに、CNS浸潤T細胞を再刺激した後のサイトカイン産生を細胞内サイトカイン染色により検討したところ、約30%がIL-17産生細胞であることが判明し、CNSへの顕著なTh17細胞の集積が確認できた。IL-17はMS/EAEの発症に重要な炎症性サイトカインの一種であることから、NR4A2とT細胞のIL-17産生との間になんらかの相関がある可能性を考えて、さらに検討を加えた。次に、NR4A2の発現亢進が炎症性サイトカイン産生に与える影響を調べるため、IL-17遺伝子、あるいはIFN- γ 遺伝子のプロモーター領域を含むレポーター遺伝子をそれぞれ構築し、EL4細胞にトランスフェクションすること

によりルシフェラーゼアッセイを試みた。その結果、NR4A発現プラスミドの同時導入により、それぞれルシフェラーゼ活性が有意に増強した。さらにNR4A2のcDNAをコードするレトロウイルスを用いて、脾臓T細胞にNR4A2分子を過剰発現させると、TCR刺激後のIL-17およびIFN- γ 産生が選択的に亢進した(図4)。以上の結果から、T細胞においてNR4A2の発現が亢進することで、炎症性サイトカインの産生が増強することが示された。次に、NR4A2のMS治療ターゲットとしての可能性を探るため、NR4A2の発現を抑制することで、炎症性サイトカインの産生が低下するかどうかを、あらたにNR4A2特異的siRNAを新規に設計して検討した。ヒトおよびマウスのNR4A2遺伝子のDNA配列は非常によく保存されており、設計したsiRNAはヒトおよびマウスのいずれにも適用可能であったことから、まず健康人の末梢血CD4陽性T細胞をsiRNA処理し、

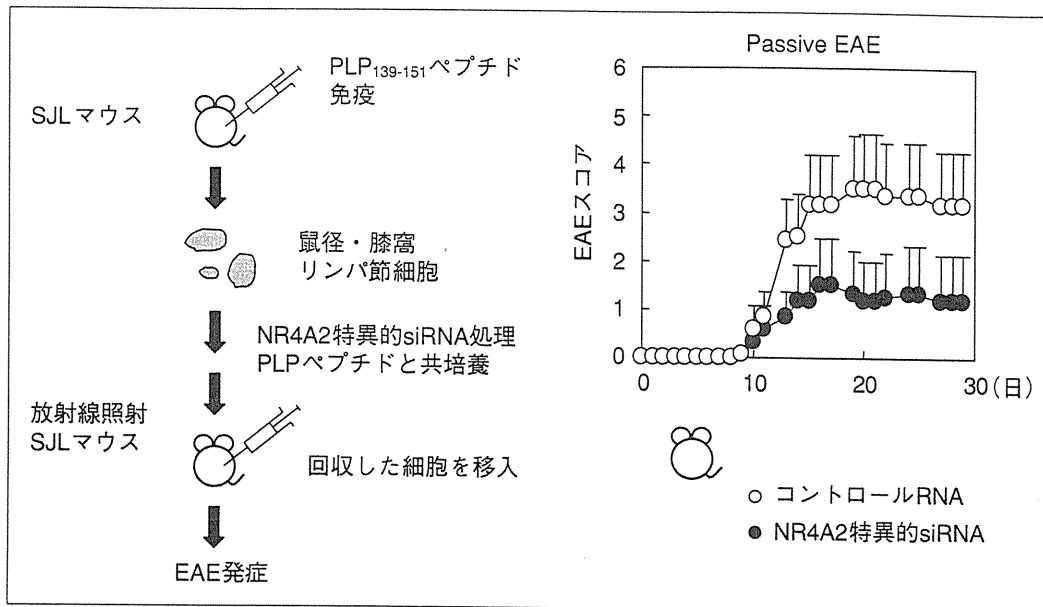


図5 Passive EAEにおけるNR4A2特異的siRNAの効果

PLP₁₃₉₋₁₅₁ペプチドを免疫後10日目のSJLマウスより、鼠径リンパ節細胞および膝窩リンパ節細胞を分離し、NR4A2特異的siRNAあるいはコントロールRNAを遺伝子導入した。さらに、PLP₁₃₉₋₁₅₁ペプチド存在下*in vitro*で3日間培養した細胞を回収し、放射線照射した未処理SJLマウスに移入した。レシピエントに誘導されるEAEスコアを比較した結果、コントロールRNA処理群ではEAEが誘導されたのに対し、NR4A2特異的siRNA処理群のEAEスコアは軽度の病態で移行したことから、本siRNA処理により病態抑制効果を誘導できることが示された。

NR4A2の発現を選択的に抑制したときの炎症性サイトカイン産生を調べた。その結果、NR4A2特異的siRNA処理したT細胞では、刺激後のIL-17産生およびIFN- γ 産生が、いずれも有意に抑制されていた。次に、MS患者の末梢血CD4陽性T細胞を用いて同様の検討を行ったところ、患者T細胞の炎症性サイトカイン産生も、NR4A2特異的siRNA処理により有意に減少することが明らかとなった。さらに、siRNAによるNR4A2の発現抑制がCNSの病態形成に及ぼす効果を、ミエリン抗原を免疫することで誘導される病原性T細胞を未処理マウスに移入する誘導EAEモデルを用いて検討した。分離したT細胞を*in vitro*で抗原刺激する際に、特異的siRNAを作用させてNR4A2発現を抑制すると、対照RNA処理したT細胞の移入群に比べて、移入後のEAEは有意に軽症化することが明らかとなった(図5)。これらの結果は、NR4A2の発現あるいは機能制御を介して自己免疫病態が制御できることを示しており、NR4A2がMSをはじめとする自己免疫疾患の治療ターゲットとなりうる可能性が示唆される。

疾患治療ターゲットとしてのNR4Aファミリー分子

まず、核酸医薬の臨床応用を考えた場合、siRNAを用いた製剤の臨床応用はいままで限定的であり、RNA自身の*in vivo*での安定性に加えて効果的なドラッグデリバリーシステム(DDS)の構築など多くの課題を抱えている現状のため、今回のsiRNAそのものを用いたアプローチが臨床応用に耐えられるか否かについては今後の検討課題である。一方、たとえばNR4A2特異的に作用する低分子化合物のスクリーニングを通じて、効果的なNR4A2阻害剤を探索していくことにより、新規自己免疫疾患治療薬のシードが見出される可能性は十分にあると考えられる。核内受容体の約半数はいまだリガンドが未知のオーファン受容体であり、最近ではPPAR- α の合成リガンドであるフィブラート系化合物の高脂血症改善作用や、PPAR- γ の合成リガンドであるチアゾリジン系化合物の糖尿病治療作用などが次々と示されており、核内受容体の新規リガンドの探索は創薬の観点からも非常に重要な研究領域である。

NR4A2ファミリー分子が関与する可能性が示されている疾患としては、パーキンソン病、統合失調症、双極性うつ病、動脈硬化症、アルツハイマー病、関節リウマチ、癌などのさまざまな難治性疾患が含まれているため、NR4A2ファミリー分子に対する作動性小分子化合物の開発も、新規治療薬開発の観点からもきわめて魅力的であるといえる。とくにNR4A2は、THの発現と中脳DA作動性ニューロンの発生に深く関与すること、および一部の家族性パーキンソン病家系にNR4A2変異が見出されたことから、主にパーキンソン病の治療ターゲットとしての期待が高まっているが、今後MSの新規治療ターゲットとしても有望であろうと思われる。さらに病原性T細胞と、これらが産生するIL-17やIFN- γ などの炎症性サイトカインは、MSに限らず種々の自己免疫疾患への関与が示されているため、NR4A2をターゲットとした治療アプローチがさらなる広がりをみせる可能性が示唆される。

おわりに

多発性硬化症(multiple sclerosis ; MS)の病態解明を目的とした研究の過程でわれわれが新たに見出したオーファン核内受容体NR4A2の免疫系、とくに活性化T細胞の炎症性サイトカイン産生における機能と、引き続き中枢神経系(CNS)の炎症病態形成における役割について概説した。これまでの研究から、種々の核内受容体が免疫系の制御に深くかかわることが明らかとなり、たとえばレチノイン酸および合成RARアゴニストが、Th17細胞分化の抑制と制御性T細胞の誘導を介して効果的な自己免疫疾患の抑制作用を示すことなどはその一例である¹⁶⁾¹⁷⁾。カルシニューリン/NF-ATの機能解明という基礎免疫の発展に伴って、シクロスポリンやタクロリムスなどの免疫抑制剤が臨床応用されていったことが記憶に新しいが、核内受容体をターゲットとした自己免疫疾患治療法の探索研究についても、同様の発展を期待したいところである。

文 献

1) Aranami T, Yamamura T. Th17 cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int*

2008 ; 57 : 115.

- 2) McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis : a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 913.
- 3) Satoh J, Nakanishi M, Koike F, et al. Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 2005 ; 18 : 537.
- 4) Doi Y, Oki S, Ozawa T, et al. Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 8381.
- 5) Maxwell MA, Muscat GE. The NR4A subgroup : immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal* 2006 ; 4 : e002.
- 6) Wang Z, Benoit G, Liu J, et al. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 2003 ; 423 : 555.
- 7) Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, et al. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 1997 ; 276 : 248.
- 8) Le WD, Xu P, Jankovic J, et al. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet* 2003 ; 33 : 85.
- 9) Zhao Y, Liu Y, Zheng D, et al. Alpha 1-antichymotrypsin/Serpina3 is a novel target of orphan nuclear receptor Nur77 drug abuse in China. *FEBS J* 2008 ; 275 : 1025.
- 10) Calnan BJ, Szychowski S, Chan FK, et al. A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity* 1995 ; 3 : 273.
- 11) Cheng LE, Chan FK, Cado D, et al. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J* 1997 ; 16 : 1865.
- 12) Liu ZG, Smith SW, McLaughlin KA, et al. Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature* 1994 ; 367 : 281.
- 13) Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, et al. Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis

- of T-cell hybridomas. *Nature* 1994 ; 367 : 277.
- 14) Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 2009 ; 8 : 8.
- 15) Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008 ; 133 : 775.
- 16) Klemann C, Raveney BJ, Klemann AK, et al. Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates EAE. *Am J Pathol*. In press 2009.
- 17) Mucida D, Park Y, Kim G, et al. Reciprocal Th17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007 ; 317 : 256.

* * *

のHTLV-1キャリアの拡散が予測され、本年の全国調査でも、全国のキャリアの中で首都圏、大阪圏在住者の比率の増大が認められている。妊婦検診などの対策を全国レベルで検討する時期が来ていると考えられる。

【講演 II】

自己免疫疾患の診断と治療における核内受容体の可能性

国立精神・神経センター神経研究所・免疫研究部 室長 大木 伸 司

自己免疫疾患は、何らかの理由により自己に向けられた免疫応答により、様々な臓器が障害される疾患の総称である。自己免疫疾患の多くは、明確な治療方針が確立していない難治性疾患に分類されており、多発性硬化症 (multiple sclerosis; 以下 MS) もその一つである。MSは、主に中枢神経系が障害される自己免疫疾患で、患者の脳や脊髄には散在する炎症性病変と脱髄が多数認められる。一般に罹病期間は長期にわたり、増悪と寛解を繰り返しながら徐々に進行する場合が多いが、発症時には持続的な麻痺や視力低下が生じ、患者のQOLの低下は極めて深刻である。元来日本人には少ない疾患とされてきたが、過去30年間で登録患者数が約20倍と急激に増加している (現在国内で約1万人強)。治療法としては、IFN- β 、抗炎症ステロイド、免疫抑制剤、血漿交換などの選択肢があるが、いずれも対症療法的な色合いが濃く、発症メカニズムに基づいた治療法の確立が切望されている。



大木伸司 先生

MSの病態形成は、自己反応性エフェクターT細胞による髄鞘の破壊と、これに続く炎症の遷延化による神経伝導障害による。エフェクターT細胞にはIFN- γ 産生性のTh1細胞とIL-4産生性のTh2細胞があり、従来MS発症に関わる病原性T細胞の本体はTh1細胞と考えられてきたが、最近になりこれらの細胞群とは機能的に異なるエフェクターT細胞として見いだされたTh17細胞と、これが産生する炎症性サイトカインIL-17が、MS発症に深く関わることが明らかとなってきた。Th17細胞のマーカー遺伝子としてオーファン核内受容体ROR γ tが同定され、all-trans レチノイン酸 (ATRA) によるTh17細胞の機能制御が示されるなど、Th17細胞と核内受容体との生理的な関わりが、近年一段とクローズアップされてきている。

演者らもレチノイドによるTh17細胞の機能制御の研究をすすめていたが、動物実験レベルで機能制御に必要なATRAが比較的少量であることに難点を見出していた。臨床応用を考えて、より非活性の高い合成レチノイドに活路を見いだすべく模索を重ねた結果、首藤博士と東医歯大・影近博士らが合成したAm80 (タミバロテン) にたどり着いた。予想どおりAm80は、MSのマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) に対し、ATRAよりはるかに少ない量を経口投与することで発症を有意に抑制した。さらにこの時、Am80投与マウスではTh17細胞機能が選択的に抑制されており、EAE抑制とよく相関した。本邦においてAm80は、急性前骨髄球性白血病の治療薬として認可されており、適応拡大を図ることにより比較的速やかにMS治療薬として応用可能と考えられる。特に急性期のMSに対する効果が期待できるため、当センターにおいて臨床試験のための準備がすすめられている。

一方、演者らの研究室では、MS患者の末梢血T細胞を用いたDNAマイクロアレイ解析を施行し、新たなMS治療標的候補分子としてのNR4A2の同定に成功した。EAEマウスのT細胞でもNR4A2がヒトの場合と同様の挙動を示すことから、演者らはNR4A2がMSの発症に直接関わる可能性を予想した。はたしてEAEマウスの中枢神経系に浸潤した病原性T細胞は、IL-17をはじめとする炎症性サイトカインとNR4A2を共発現することを明らかとし、その後の一連の解析からNR4A2がMS/EAE発症に関わる炎症性サイトカインの制御因子であることを示した。リガンド結合能を欠くNR4A2は構成的に活性化型であり、リガンド応答性の核内受容体と異なりその機能制御は主に遺伝子発現レベルでなされている。よってNR4A2の機能制御には、NR4A2遺伝子の発現抑制あるいはNR4A2タンパク質の機能抑制が有効であると考えられる。実際に演者らは、small interfering RNA (siRNA) 処理により病原性T細胞のNR4A2発現を抑制すると、EAEが軽快することを明らかにした。NR4A2には、通常のリガンドとは質的に異なる制御性小分子が複数報告されているため、これらの化合物の構造から今後新たなMS治療薬の探索が可能であると思われる。演者らの研究室では、NR4A2を標的としたMS治療薬の創薬研究が進行中である。

核内受容体の約半数はリガンドが未知のオーファン受容体であるが、最近では合成PPARリガンドが高脂血症改善薬や糖尿病治療薬として臨床応用されるなど、核内受容体をターゲットとした創薬

は、今にもまして魅力的な研究領域になっていくものと予想される。また Th17 細胞は、MS にとどまらず関節リウマチ、1 型糖尿病、乾癬など多様な自己免疫疾患との関連が示されているため、本稿で紹介した 2 つの核内受容体分子を標的とした治療戦略が、将来他の自己免疫疾患にも波及していく可能性に大きな期待を抱いている。

【感想】

紹介

日本国際医学協会理事 首藤 紘一

本日はアナリストの山本義彦先生にお話を伺います。先生は 1963 年に東京大学薬学部を卒業後、帝人株式会社に入社されました。1984 年にハーバードビジネススクールで上級経営学を修められ、その 2 年後 1986 年に 23 年間いらした同社を退職いたしました。その後証券業界に転じられ、フルデンシャル・ベーチェ証券会社、ソロモンブラザーズ・アジア証券会社、現在は日興コーディアル証券首席アナリストとして活躍されています。ご存知の方もいらっしゃると思いますが、日本経済新聞人気アナリスト調査において、1996 年～2002 年まで医薬品部門 1 位、1996 年企業総合 1 位であり、証券業界で最も頼りにされているアナリストのお一人でございます。

資本市場から見たヘルスケア産業

日興コーディアル証券（株） 首席アナリスト 山本 義彦

最大のヘルスケア産業は医療機関であります。株式会社による事業運営が認められていませんので、資本市場との係わり合いは限定されています。資本市場から見て最大のヘルスケア産業は売上規模 8 兆円の医薬品製造業です。本日は製薬産業の姿を御紹介しつつ、国民のために先生方のお力を拝借すべく僅かばかりの提言をさせていただきます。



日本の医薬品産業は主として公的保険制度の枠内で行っているため国の政策から大きな影響を受けます。成長の切掛けとなったのは 1961 年の国民皆保険制度施行でした。60 年に 1 千億円に過ぎなかった国内医療用医薬品生産額は 80 年には 3 兆円に達します。年率 18.5% で成長したことになります。83 年の吉村厚生事務次官による医療費増大論が成長の転換点となりました。2000 年の生産金額は 5.1 兆円、年率 2.7% の成長率へ鈍化しました。しかし、75 年の資本自由化、76 年の物質特許制度施行により製薬産業の研究開発力は著しい改善を見ました。08 年の売上世界上位 50 位までに占める日本発の医薬品は 10 製品に及んでいることが証明していますし、規模の格差はあるにしても、少なくとも収益構造においては日本大手と欧米大手との格差はほとんどなくなりました。

医学の進歩に伴う相次ぐ画期的医薬品の登場によって世界の製薬産業は発展を続けましたが、世界の医薬品市場にも大きな変化が現れました。85 年の世界市場規模 790 億ドルに占める日米欧のシェ

特集：疾患の制御—臨床から免疫へ—
総 説

多発性硬化症の病態解析から治療標的の同定へ

大木 伸司, 山村 隆

Identification of a possible therapeutic target through pathogenic T cell analysis of multiple sclerosis

Shinji OKI Ph. D., Takashi YAMAMURA M. D./Ph. D.

Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP

(Received May 28, 2009)

summary

Multiple sclerosis is an autoimmune disease affecting the central nervous system (CNS), in which Th17 and Th1 cells are involved. Comprehensive gene expression profiling analysis employing DNA microarray showed that NR4A2, an orphan nuclear receptor, is strongly upregulated in the peripheral blood T cells derived from MS patients. Further analysis revealed that NR4A2 plays a pivotal role for mediating production of inflammatory cytokines from pathogenic T cells. In experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of MS, NR4A2 was selectively upregulated in the CNS-infiltrating T cells and the peripheral blood T cells. Intriguingly, a forced expression of NR4A2 augmented promoter activities of IL-17 and IFN- γ genes, leading to an excessive production of these cytokines by splenic T cells. In contrast, treatment with siRNA specific for NR4A2 resulted in a significant reduction in the production of IL-17 and IFN- γ . Furthermore, treatment with NR4A2-specific siRNA reduced the ability of encephalitogenic T cells to adoptively transfer EAE in recipient mice. These results imply that NR4A2 is an essential transcription factor for triggering the inflammatory cascade in MS/EAE and may serve as a novel therapeutic target of the diseases.

Key words——多発性硬化症, NR4A2, 核内受容体, IL-17, Th17 細胞

抄 録

多発性硬化症 (Multiple Sclerosis; MS) は中枢神経系の脱髄疾患であり, その本態は自己反応性 T 細胞を含む免疫担当細胞を介した組織障害である. 長らく自己免疫疾患に関わる病原性 T 細胞の本体は, IFN- γ 産生性の Th1 細胞と考えられてきたが, 最近なって Th1 細胞や Th2 細胞とは機能的に異なる新たなエフェクター細胞 T 集団として, より強力な炎症惹起能を有する IL-17 を産生する Th17 が, 強力な自己免疫疾患誘導性を有する病原性 T 細胞集団であることが示された. 我々は, 自己免疫病態形成に関わる病原性 T 細胞の機能解析を目的として, 寛解期 MS 患者由来の末梢血 T 細胞を対象に, DNA マイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子発現解析を施行し, 新たな MS 治療標的候補分子として, オーフエン核内受容体 NR4A2 を同定した. RNAi 法を用いた T 細胞の NR4A2 発現抑制により, 炎症性サイトカイン産生抑制と, 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis; EAE) の軽快が認められた. 本稿では, NR4A2 をターゲットとした分子標的薬による新規 MS 治療法開発の可能性について紹介する.

はじめに

多発性硬化症 (Multiple Sclerosis; 以下 MS) は, 中枢神経系の脱髄を主徴とし, Th1 細胞や Th17 細胞などのエフェクター T 細胞をはじめとする免疫担当細胞の機能亢進による組織障害が病態形成に深く関わる典型的な炎症性自己免疫疾患である^{1,2)}. よって免疫異常制御の観点から MS の病態を理解

することは, 本疾患の予防や治療への根本的な道を開くことにつながると考えられる. 現在臨床で利用されているインターフェロン・ベータ (IFN- β), 抗炎症性ステロイドおよび免疫抑制剤などの MS 治療薬や, 臨床導入の途上にある薬剤として 4 種のアミノ酸からなるコポリマーであるコパキソン, 抗 VLA-4 抗体製剤タイサブリ, およびスフィンゴシン 1 リン酸受容体を標的とした FTY720 (Fingolimod) などはいずれも, 上記の発想に基づいて見いだされてきたものである. このように近年の著し

い基礎免疫学の進歩により、慢性炎症を伴う自己免疫疾患の制御薬、あるいは治療薬候補分子が多数見出されてきているが、一方で視神経脊髄型 MS (NMO, Devic 病) では、IFN- β 投与により病態が増悪する例が見られるなど、それぞれの治療薬に対する MS 患者の反応性は症例ごとに大きく異なるという現状がある。このことは、MS の新規治療法を開発するためには、MS 病態の多様性に十分配慮した新たな免疫学的なアプローチが求められていることを意味しており、これは MS 患者サンプルを用いた網羅的解析の中で多様性に関わる項目を適当に相殺し、その中から普遍的な治療標的を探るという手法により克服可能であると考えられる。以上のような観点から我々は、MS の新規治療標的の同定を目的として、DNA マイクロアレイによる MS 患者末梢血 T 細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、健常者に比較して MS 患者 T 細胞で発現が変動する一連の遺伝子群の同定に成功した³⁾。そのなかで、MS 患者で最も有意な発現亢進を認めた遺伝子の一つとして同定したオーファン核内受容体 NR4A2 は、MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis : 以下 EAE) マウス由来の中中枢神経浸潤 T 細胞でも認められた。T 細胞の NR4A2 発現を変動させると、各種炎症性サイトカインの産生が相関して増減し、NR4A2 特異的 siRNA 処理により、passive EAE モデルにおける EAE の発症が有意に抑制されたことから、NR4A2 が MS などの自己免疫疾患の新規治療ターゲットになりうる可能性が示された⁴⁾。本稿では、MS/EAE の病態形成における NR4A2 の挙動と、炎症性サイトカイン産生制御を介した MS の新規治療法確立の可能性について紹介する。

オーファン核内受容体 NR4A2 とは？

核内受容体は、エストロゲン受容体やグルココルチコイド受容体などを含む分子ファミリーをなしており、ヒトの場合 48 種類の異なる分子が知られている^{5,6)}。実は本稿の中心となる Th17 細胞と核内受容体との関わりは思いのほか深く、今や Th17 細胞のマーカー分子として知られているレチノイドオーファン受容体 ROR γ t/NR1F3⁷⁾、リガンド依存性に Th17 細胞機能制御能を有するレチノイン酸受容体 RAR α /NR1B1⁸⁾、NF-AT 阻害により IL-17 などの産生制御に関わるプロテインキナーゼ C 基質 EAR2/NR2F6⁹⁾ などは、いずれもこのファミリー

に含まれる分子である。一方、NR4A ファミリー分子は NR4A1, NR4A2, NR4A3 の 3 種からなり、他の核内受容体と同様、NGFB-1/Nur77 (= NR4A1), Nurr1 (= NR4A2), NOR1 (= NR4A3) などの別名でも知られている¹⁰⁾。NR4A ファミリー分子は図 1 に示すような様々な生体応答に関与することが示されており、その機能の一部にはファミリー分子間の機能的オーバーラップが認められる。NR4A ファミリー分子のうち NR4A2 の発現部位は比較的中枢神経系に集中しており、なかでも中脳腹側、脳幹や脊髄に強い発現を認める。免疫系においては、T 細胞受容体の架橋や炎症性サイトカインなど刺激により、T 細胞で一過性に発現誘導される immediate early gene として知られている。NR4A ファミリー分子は、複数の機能ドメインからなる構造が、他の核内受容体分子との間で比較的良好に保存されている (図 1)。2 つの Zn フィンガーからなる N 末側の DNA 結合ドメイン (DBD) は、受容体間で非常に良く保存されており、標的分子プロモーター内の応答配列に対する特異的結合に関わる。C 末側に位置するリガンド結合ドメイン (LBD) は、各核内受容体分子間での多様性が高く、通常それぞれ異なるリガンドを認識する。一般に核内受容体は、リガンドを結合することで受容体の AF2 ドメインのコンフォメーションが変化し、ヘリックス 12 (H12) が活性型の配向をとると、コリプレッサーを遊離してコアクチベーターと会合するようになり転写活性化能を獲得する。一方、リガンドが未知の核内受容体はオーファン受容体と呼ばれ、NR4A ファミリー分子もこの中に含まれる。LBD の構造解析の結果、NR4A2 の LBD はかさ高い芳香環や疎水性の側鎖を持つアミノ酸に覆われており、典型的なリガンド結合ポケットがないことが明らかとなっている¹¹⁾。さらに NR4A2 の H12 は、リガンドの存在とは無関係に活性型受容体類似のコンフォメーションをとることが示され、リガンド非依存的に転写活性化能を有するものと考えられている。

NR4A2 の誘導因子と標的分子¹⁰⁾

NR4A2 は、脂肪酸、プロスタグランジン、カルシウム、増殖因子、ペプチドホルモン、神経伝達分子など様々な因子に応答して速やかに発現が誘導される。これらの刺激はいずれも NF- κ B あるいは CREB の活性化を誘導し、NR4A2 遺伝子プロモ-

NR4A核内受容体スーパーファミリー

分類名	別名
NR4A1	NGFI-B, Nur77
NR4A2	Nurr1, NOT, RNR1
NR4A3	NOR1, MINOR

いずれも生理的リガンドは不明

↓
オーファン受容体

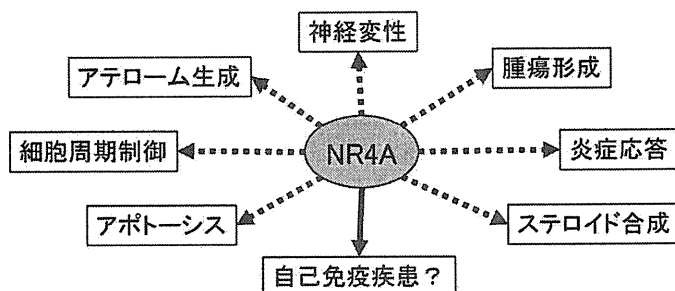
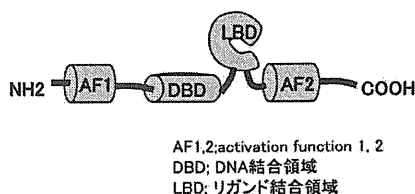


図1 NR4A 核内受容体ファミリー分子

哺乳動物の NR4A 核内受容体ファミリー分子は、NR4A1 (NGFI-B/Nur77)、NR4A2 (Nurr1)、NR4A3 (NOR1) の3種の分子からなり、ファミリー分子に共通の構造 (AF1/2, DBD, LBD) を有する核内受容体分子である。いずれも生理的リガンドは不明であるが、図に示すようなさまざまな生体応答に関与することが知られている。免疫系との関連では、遺伝子欠損マウスを用いた解析から、NR4A1 と NR4A3 が胸腺細胞のアポトーシスに関与することが示されており、いわゆる「負の選択」の過程で重要な役割を果たしているものと考えられる。一方、NR4A2 欠損マウスではドパミン産生ニューロンの分化が著しく阻害されるが、胸腺細胞分化は比較的正常に保たれることが示されており、NR4A1/NR4A3 と NR4A2 の機能的な相違をうかがわせる知見であるといえる。

ターの転写活性化領域に結合することで、遺伝子発現を引き起こすと考えられている。一方、発現した NR4A2 分子は、リガンド非依存的に特定の DNA 配列を認識して下流の遺伝子発現を誘導する (図2)。したがって NR4A2 分子の機能制御は、主に種々の誘導因子による転写誘導レベルで行われていると考えられる。NR4A ファミリー分子の認識配列としては、①(A/T) AAAGGTCA 配列からなる NBRE (NGFI-B response element; 単量体あるいは二量体の NR4A 分子が結合)、②NBRE 類似の AAAT (G/A) (C/T) CA の逆向き繰り返し配列からなる NurRE (Nur-responsive element; プロオピオメラノコルチン (POMC) プロモーターに存在)、③DR5 配列 (レチノイド X 受容体 (RXR) とのヘテロダイマー形成による) の3種の配列が知られている。NR4A2 のターゲットとして最も良く解析されているのが、ドパミン (DA) 生成に必須の酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) 遺伝子であり、NR4A2 依存的な DA の産生は、TH 遺伝子プロモーターに存在する NBRE を介して誘導される。一方、NR4A2 欠損マウスでは中脳黒質のドパミン産生ニューロンの形成が障害される¹²⁾。さらに家族性パーキンソン病の一部に NR4A2 の遺伝子異

常が認められる¹³⁾ことも明らかとなり、TH 発現における NR4A2 の重要性が再認識されている。他にも NR4A2 の標的探索を目指した個別の解析から、Neuropilin-1, vasoactive intestinal peptide (VIP), aldosterone 合成酵素, アロマトラーゼ, オステオポンチン, オステオカルシンなどがターゲットとして報告されており、NR4A2 は中枢神経機能のみならず、骨代謝の機能制御にも深く関わる可能性が示されている。NR4A2 分子の機能が、さらなる広がりを見せる予感を感じさせる。

免疫系における NR4A ファミリー分子の機能

免疫系における NR4A ファミリー分子の機能に関しては、T 細胞アポトーシス誘導、および胸腺における「負の選択」における NR4A1 分子の機能が、とくに詳細に解析されている^{14~17)}。すなわち、TCR 刺激によりカルシウム依存性に活性化した MEF2 が NR4A1 の発現を引き起こし、T 細胞アポトーシスを誘導する。おそらくこの経路は、NR4A1 分子と Bcl2 分子との分子間相互作用を介した制御を受ける。そして転写抑制因子 Cabin1 が、mSin3 と HDAC1/2 をリクルートすることにより、あるいは MEF2 と p300 の結合を阻害すること

NR4A2の上流と下流

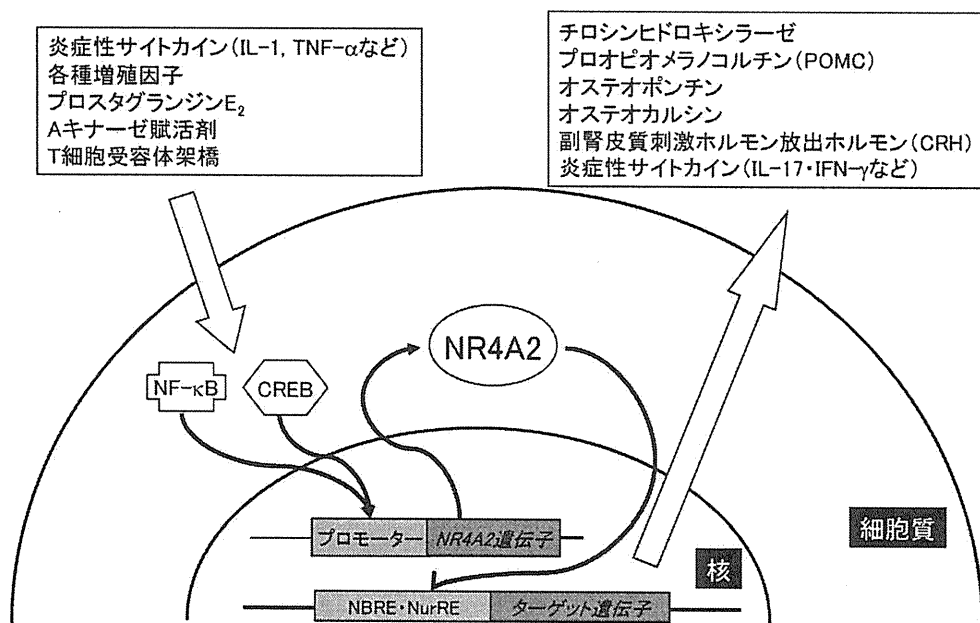


図2 NR4A2の誘導因子とターゲット分子

NR4A2は、脂肪酸、プロスタグランジン、カルシウム、増殖因子、ペプチドホルモン、神経伝達分子など、あるいはストレスや物理刺激にตอบสนองして発現が誘導され、いずれもNF- κ BあるいはCREBの活性化を介すると考えられている。一方、このようにして発現したNR4A2分子は、多様な会合分子と複合体を形成し、NBRE(NGFI-B response element), NurRE(Nur-responsive element), DR5などの特定の配列を認識してターゲット遺伝子の発現を誘導する。これまでにチロシンヒドロキシラーゼを筆頭に、複数のターゲット遺伝子が報告されている(本文参照)。

により、MEF2によるNR4A1の誘導経路を遮断してアポトーシスを抑制すると考えられている¹⁸⁾。一方、NR4A1欠損マウスの表現系は、胸腺あるいは末梢のT細胞アポトーシスに関して大きな異常はなく、NR4A1が単独でこの経路を制御しているのではないと思われる。おそらく他の分子がNR4A1欠損を補完することにより、強い表現系の発現を抑制していることが予想され、胸腺での発現パターンなどから推測するに、その候補の一つは別のNR4Aファミリー分子NR4A3である。一方、NR4A2欠損マウスでは、中脳のドパミン産生ニューロンの欠損が著しく、胎児は生後すぐに死亡する。このNR4A2欠損マウスの表現系は、NR4A2の機能が他のNR4A1やNR4A3では補完できないことを意味しており、NR4A2が他のNR4Aファミリー分子とは異なる独自の機能を有することを強く示唆している。NR4A2欠損マウスは、生後の長期維持が極めて難しいため、免疫系を含む成体の機能異常に関する解析はほとんどなく、コンディショナル欠損マウスなどを用いた解析が待たれる。

NR4A2と自己免疫疾患

上にも述べたように、多発性硬化症(以下MS)では、Th1細胞やTh17細胞などの炎症性T細胞が脳炎惹起に重要な役割を果たす。CD4陽性ナイーブT細胞は複数の機能的に異なるエフェクターヘルパーT細胞に分化するが、その分化機構は、以前より知られていたTh1細胞、Th2細胞に加えて、Th17細胞¹⁹⁾と制御性T細胞²⁰⁾が発見されたことをきっかけに、格段に複雑になりつつある(図3)。MSの病態形成初期には自己反応性T細胞が決定的な役割を果たすと考えられており、このような病原性T細胞の網羅的な機能解析は、新規治療ターゲットの絞り込みに有効な手段であると思われる。このような観点から我々は、DNAマイクロアレイによるMS患者末梢血T細胞の遺伝子発現解析を通じて、MSで健常者に比較して発現亢進する遺伝子群の同定を試み、その結果、最も有意な発現差異を認めた分子としてNR4A2を同定した³⁾。NR4A2分子は核内受容体型の転写因子であるが、T細胞における機能は他のNR4Aファミリー分子とセットで解析されることが多く、個別の機能については不明

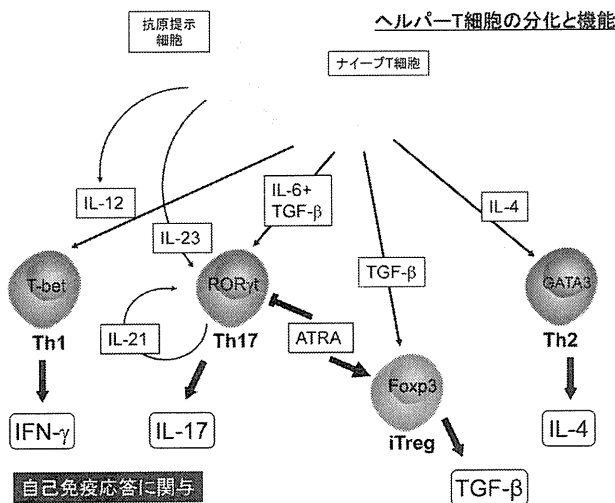


図3 ヘルパー T 細胞の分化と機能

ナイーブ T 細胞が抗原提示細胞場の抗原を認識すると、種々のサイトカイン依存性にそれぞれ機能的に異なるエフェクター T 細胞へと分化することが知られている。以前は感染免疫などに関わる Th1 細胞と、アレルギー反応などに関わる Th2 細胞の二極対立の構図により説明されていたが、近年の Th17 細胞と制御性 T 細胞 (Treg 細胞) の発見にともない、各エフェクター T 細胞の複雑な分化制御機構が次々と明らかになりつつある。自己免疫の観点からは、IFN- γ 産生性の Th1 細胞と、IL-17 産生性の Th17 細胞はいずれも自己免疫病態を引き起こす病原性 T 細胞集団であると考えられており、双方の細胞機能をコントロールできる新たな制御法の確立が重要な課題となっている。

な点が多かったため、MS のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (以下 EAE) を併用してさらなる病態との関連を解析した⁴⁾。

C57BL/6 マウスに MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを免疫することにより誘導した EAE モデルにおいて、脳脊髄 (CNS) 浸潤細胞、末梢血、所属リンパ節細胞、脾臓細胞から分離した T 細胞の NR4A2 の発現レベルを、定量 PCR 法により比較し、CNS 浸潤 T 細胞および末梢血 T 細胞で、選択的な NR4A2 の発現亢進を認めた。さらに再試験後の CNS 浸潤 T 細胞のサイトカイン産生を調べたところ、約 30% の細胞が IL-17 を産生することが判明し、CNS への顕著な Th17 細胞の集積が認められた。IL-17 は MS/EAE の発症に重要な炎症性サイトカインの一種であり、我々は NR4A2 と T 細胞の IL-17 産生との間に何らかの相関がある可能性を考えて、さらに検討を加えた。まず NR4A2 の発現亢進が炎症性サイトカイン産生に与える影響を調べるため、IL-17 遺伝子、あるいは IFN- γ 遺伝子のプロモーター領域を含むレポーター遺伝子を培養細胞に導入して、ルシフェラーゼアッセイを試みた。その結果、NR4A 発現プラスミドの添加により、それぞれルシフェ

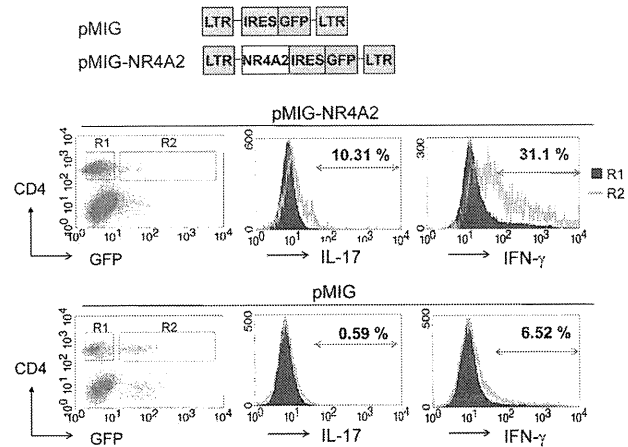


図4 NR4A2 を介した炎症性サイトカイン産生増強

T 細胞の炎症性サイトカイン産生に対する NR4A2 分子の機能を解析するため、NR4A2 遺伝子を組み込んだレトロウイルス、あるいはコントロールウイルスを用意し、マウス脾臓 CD4 陽性 T 細胞に感染させた。eGFP の発現を指標に感染細胞を同定し、再試験後の炎症性サイトカイン産生を、細胞内サイトカイン染色法を用いて比較した。GFP 陰性群 (R1) では図の上下でサイトカイン産生レベルに大きな差は認められないが、GFP 陽性群 (R2) では、コントロール細胞 (下段) に比べて NR4A2 遺伝子導入細胞 (上段) における炎症性サイトカインの産生がいずれも増強した (IL-17; 0.59% vs 10.31%, IFN- γ ; 6.52% vs 31.1%)。

ラーゼ活性が有意に増強した。さらに NR4A2 の cDNA をコードするレトロウイルスを用いて、脾臓 T 細胞に NR4A2 分子を過剰発現させると、TCR 刺激後の IL-17 および IFN- γ 産生が選択的に亢進した (図 4)。以上の結果から、T 細胞における NR4A2 の発現亢進により、炎症性サイトカインの産生が増強することが明らかとなった。次に NR4A2 の MS 治療ターゲットとしての可能性を探るため、NR4A2 の発現を抑制することで、炎症性サイトカインの産生が低下するかどうかを、あらたに設計した NR4A2 特異的 siRNA を用いて検討した。ヒトおよびマウスの NR4A2 遺伝子の DNA 配列は非常に良く保存されており、我々が設計した siRNA はヒトおよびマウスのいずれにも適用可能であったことから、まず健常人の末梢血 CD4 陽性 T 細胞を siRNA 処理し、NR4A2 の発現を選択的に抑制したときの炎症性サイトカイン産生を調べた。その結果、NR4A2 特異的 siRNA 処理した T 細胞では、刺激後の IL-17 産生および IFN- γ 産生が、いずれも有意に抑制されていた。次に MS 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞を用いて同様の検討を行ったところ、患者 T 細胞の炎症性サイトカイン産生も、NR4A2 特異的 siRNA 処理により有意に減少することが明らかとなった。さらに siRNA による

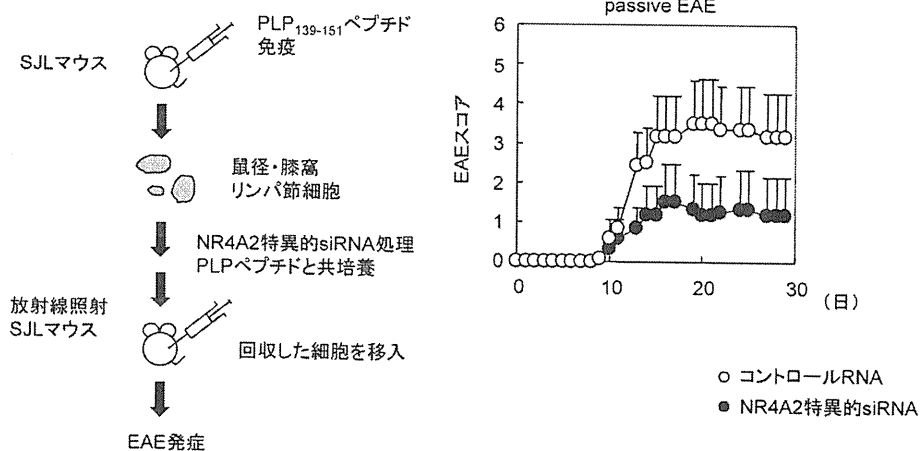


図5 passive EAEにおけるNR4A2特異的siRNAの効果

PLP₁₃₉₋₁₅₁ ペプチドを免疫後10日目のSJLマウスより、鼠径リンパ節細胞および膝窩リンパ節細胞を分離し、NR4A2特異的siRNAあるいはコントロールRNAを遺伝子導入した。さらにPLP₁₃₉₋₁₅₁ ペプチド存在下 *in vitro* で3日間培養した細胞を回収し、放射線照射した未処理SJLマウスに移入することで、レシビエントマウスにEAEを誘導した。各処理群のEAEスコアを比較した結果、コントロールRNA処理群で誘導されたEAEの臨床スコアに対し、NR4A2特異的siRNA処理群のEAE臨床スコアは低下し、観察期間を通じて軽度の病態で推移した。NR4A2特異的siRNA処理により、EAE病態が抑制できることが示された。

NR4A2の発現抑制が中枢神経系の病態形成に及ぼす効果を、ミエリン抗原(プロテオリピッドプロテイン; PLP)を免疫することでSJLマウスに誘導される病原性T細胞を、ナイーブSJLマウスに移入するpassive EAEモデルを用いて検討した。分離したT細胞を *in vitro* で抗原刺激する際に、NR4A2特異的siRNAで処理すると、対照RNA処理したT細胞の移入群に比して、移入後のEAEは有意に軽症化することが明らかとなった(図5)。これらの結果は、NR4A2の発現あるいは機能制御を介して自己免疫病態が制御できることを示しており、NR4A2がMSをはじめとする自己免疫疾患の治療ターゲットとなりうる可能性を示すものと考えている。

疾患治療ターゲットとしてのNR4Aファミリー分子の可能性

核内受容体の約半数はいまだリガンドが未知のオーファン受容体であり、個々の機能は、その多くが不明のままである。仮に欠損マウスの表現系解析から機能の一端を明らかにしても、その機能を制御できるリガンドの同定なしには、さらなる応用研究への展開は一般には難しい。しかしながらPPARなど一部の核内受容体分子に関しては、代謝制御における重要な生理機能が次々と明らかとなってきている。さらにその結果、高脂血症改善作用を有するPPAR- α の合成リガンドであるフィブラート系化

合物や、糖尿病治療作用を有するPPAR- γ の合成リガンドであるチアゾリジン系化合物など、臨床応用上も重要な小分子化合物の同定が次々となされており、核内受容体の新規リガンドの探索は創薬の観点からも非常に重要な研究領域であるといえる。免疫応答制御の分野に限ってみても、種々の核内受容体が免疫系、特にTh17細胞の制御に深く関与することが明らかとなっている。例えば天然型レチノイン酸および合成RARアゴニストが、Th17細胞分化の抑制と制御性T細胞の誘導を介して効果的な自己免疫疾患の抑制作用を示すことなどが明らかになっており^{8,21)}、合成RARアゴニストを用いた新規自己免疫疾患治療法の開発も、将来有望な研究分野であるといえる。

一方で、上で示したNR4A2特異的siRNAを用いた核酸医薬の臨床応用を考えた場合、一般的にsiRNAを用いた製剤の臨床応用はいまだ限定的であり、RNA自身の *in vivo* での安定性に加えて効果的なドラッグデリバリーシステム(DDS)の構築が難しいなど多くの課題を抱えている現状がある。局所的な投与による応用可能性はあるとしても、本siRNAそのものを用いたアプローチがMS治療薬としての臨床応用に展開可能かどうかについては今後のさらなる検討が必要である。この他には、小分子化合物を用いたNR4A2の機能制御が考えられる。NR4A2のリガンド結合領域は不活性化されていると考えられているが、本来のリガンド結

合領域以外の領域と相互作用することでNR4A2の機能制御能をもつ特異的な低分子化合物をスクリーニングすることにより、効果的なNR4A2阻害剤を探索することができれば、新規自己免疫疾患治療薬のシードが見出される可能性は十分にあると考えられる。例えば、抗癌剤として用いられている6-メルカプトプリン(6-MP)には、NR4A2の活性化能があることが示されており²²⁾、類縁分子の中に求める小分子化合物が見出される可能性もある。実際にNR4A2ファミリー分子の関与の可能性が示唆されている疾患としては、パーキンソン病、統合失調症、双極性うつ病、動脈硬化症、アルツハイマー病、関節リウマチ、癌などのさまざまな難治性疾患があり、例えば炎症性の関節炎の場合、メトトレキサート処理により滑膜組織におけるNR4A2の発現が低下し、このNR4A2の発現低下に相関して疾患活動性も減少することが示されている²³⁾。またNR4A2は、THの発現と中脳ドパミン作動性ニューロンの発生に深く関与すること、および一部の家族性パーキンソン病家系にNR4A2変異が見出されたことから、パーキンソン病の治療ターゲットとしての期待も高まっている。実際、パーキンソン病治療薬候補としてNR4A2賦活化小分子化合物の同定がなされており、今後これらの小分子化合物の誘導体を、MSの新規治療薬として転用するアプローチは有望であろうと思われる。さらにもし求める小分子化合物が得られれば、自己免疫誘導病原性T細胞と、これらが産生するIL-17やIFN- γ などの炎症性サイトカインは、種々の自己免疫疾患への関与が考えられるため、NR4A2をターゲットとした治療アプローチが、MSのみならず他の自己免疫疾患へとさらなる広がりをもたせる可能性がある。

生体内恒常性センサーとしてのNR4A2分子の可能性

MSの病態形成に遺伝的背景が関与することは論を待たないが、元々本邦では比較的稀な疾患とされてきたMSの患者数がここ30年間で約20倍に増加していることは、患者を取り巻く生活環境の急激な近代化にともなう環境要因の変化が、MS患者数の増加に関連している可能性を示唆している²⁴⁾。我々は以前より、我が国における食生活の欧米化にともなう腸管免疫環境の変調がMSの発症増加と関連する、という仮説の下、MSにおける病原性T細胞の成立における腸管関連リンパ組織の関連を解析

してきた。そのなかで、中枢神経疾患であるEAEの感受性が、腸管に集積し腸内細菌叢と密接に関わるMR1拘束性NKT細胞により制御されることを報告し、様々な要因で変化する腸内細菌叢の構成が腸管免疫応答、ひいては自己免疫感受性に及ぼす影響を明らかにした²⁵⁾。さらに非吸収性抗生物質を経口投与することで腸内細菌叢を変動させることで、EAE感受性が大きく変動することも見出している²⁶⁾。Germ-freeマウスでは腸管免疫系が発達しないことから、腸内細菌叢が腸管免疫応答制御を介して自己免疫疾患感受性を規定する因子である可能性は高い。一方、このような観点からNR4A2は、T細胞受容体刺激によりT細胞で発現誘導されるのみならず、脂肪酸、プロスタグランジン、カルシウム、増殖因子、ペプチドホルモン、神経伝達分子など様々な生体因子に反応してNF- κ B依存性あるいはCREB依存性に発現が誘導される。NR4A2は生体応答をモニターする、極めて鋭敏なセンサー分子として機能しているのである。興味深いことに、ストレス負荷や運動による物理刺激など、一見誘導メカニズムが簡単には想像できないような複雑な刺激に対しても、速やかなNR4A2の発現誘導がおきることが知られている。心的ストレスや過剰な運動とこれに伴う疲労は、MSの重要な再発誘導因子、あるいは増悪因子と考えられており、非本来的なNR4A2の発現誘導が、この過程に何らかのかたちで関与することは十分に考えられる。とくにNR4A2が、元々中枢神経系の機能に関わる分子であることを考えると、ストレスで発現する神経系由来の何らかのNR4A2の誘導因子が、T細胞のNR4A2発現をも同時に誘導してしまうことにより、不要な免疫応答につながる可能性も考えられる。今後さらなる研究が必要な分野であるといえるだろう。

おわりに

MSの病態解明を目的とした研究の過程で我々が新たに見出したオーファン核内受容体NR4A2の免疫系、とくに活性化T細胞の炎症性サイトカイン産生における機能と、引き続き中枢神経系の炎症病態形成における役割について概説した。最近になり、グリア細胞に発現したNR4A2がコリプレッサーと会合することで、炎症によるドパミン産生ニューロン死を抑制する可能性が示された²⁷⁾。NR4A2にはさまざまな会合分子が存在するため、

極めて多様な機能を可能にする NR4A2 複合体の成り立ちを明らかにし、個々の機能に関わる会合分子の解析をすすめていく必要があるだろう。NR4A2 分子は病態時に末梢血中の発現レベルが亢進することから、疾患活動性をモニターするバイオマーカーとしての応用可能性も残されている。今後、MS の病態研究から見出した NR4A2 を、新規 MS 治療ターゲットに格上げしていくためのトランスレーショナルリサーチを引き続き展開していきたいと考えている。NR4A2 が、広く他の自己免疫疾患へも適用可能なターゲットとして臨床応用される日を願っている。

文 献

- 1) Aranami T, Yamamura T. : Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int.* **57**(2) : 115–120, 2008.
- 2) McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis : a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol.* **8**(9) : 913–919, 2007.
- 3) Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, et al. : Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis.* **18**(3) : 537–550, 2005.
- 4) Doi Y, Oki S, Ozawa T, Hohjoh H, Miyake S, Yamamura T. : Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**(24) : 8381–8386, 2008, Epub 2008 Jun 11.
- 5) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell.* **97**(2) : 161–163, 1999.
- 6) Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H, Laudet V. : The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci.* **116**(Pt 4) : 585–586, 2003.
- 7) Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. : The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell.* **126**(6) : 1121–1133, 2006.
- 8) Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science.* **317**(5835) : 256–260, 2007, Epub 2007 Jun 14.
- 9) Hermann-Kleiter N, Gruber T, Lutz-Nicoladoni C, Thuille N, Fresser F, Labi V, et al. : The nuclear orphan receptor NR2F6 suppresses lymphocyte activation and T helper 17-dependent autoimmunity. *Immunity.* **29**(2) : 205–216, 2008.
- 10) Maxwell MA, Muscat GE. : The NR4A subgroup : immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal.* **4** : e002., 2006, Epub 2006 Feb 8.
- 11) Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, Aarnisalo P, Liu X, et al. : Structure and function of Nurrl identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature.* **423**(6939) : 555–560, 2003.
- 12) Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T. : Dopamine neuron agenesis in Nurrl-deficient mice. *Science.* **276**(5310) : 248–250, 1997.
- 13) Le WD, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel SH, Smith RG, et al. : Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet.* **33**(1) : 85–89, 2003, Epub 2002 Dec 23.
- 14) Calnan BJ, Szychowski S, Chan FK, Cado D, Winoto A. : A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity.* **3**(3) : 273–282, 1995.
- 15) Cheng LE, Chan FK, Cado D, Winoto A. : Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *Embo J.* **16**(8) : 1865–1875, 1997.
- 16) Liu ZG, Smith SW, McLaughlin KA, Schwartz LM, Osborne BA. : Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature.* **367**(6460) : 281–184, 1994.
- 17) Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, Winoto A. : Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature.* **367**(6460) : 277–281, 1994.
- 18) Youn HD, Liu JO. : Cabin1 represses MEF2-dependent Nur77 expression and T cell apoptosis by controlling association of histone deacetylases and acetylases with MEF2. *Immunity.* **13**(1) : 85–94, 2000.
- 19) Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. : IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* **8** : 8, 2009.
- 20) Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. : Regulatory T cells and immune tolerance.

- Cell*. **133**(5) : 775–787, 2008.
- 21) Klemann C, Raveney BJE, Klemann AK, Ozawa T, von Hörsten S, Shudo K, et al. : Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates EAE. *AmJPathol*. 2009 ; in press.
- 22) Ordentlich P, Yan Y, Zhou S, Heyman RA. : Identification of the antineoplastic agent 6-mercaptopurine as an activator of the orphan nuclear hormone receptor Nurr1. *J Biol Chem*. **278**(27) : 24791–24799, 2003, Epub 2003 Apr 22.
- 23) Ralph JA, McEvoy AN, Kane D, Bresnihan B, FitzGerald O, Murphy EP. : Modulation of orphan nuclear receptor NURR1 expression by methotrexate in human inflammatory joint disease involves adenosine A2A receptor-mediated responses. *J Immunol*. **175**(1) : 555–565, 2005.
- 24) Chakravarti A, Little P. : Nature, nurture and human disease. *Nature*. **421**(6921) : 412–414, 2003.
- 25) Croxford JL, Miyake S, Huang YY, Shimamura M, Yamamura T. : Invariant V (alpha) 19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat Immunol*. **7**(9) : 987–994, 2006, Epub 2006 Jul 30.
- 26) Yokote H, Miyake S, Croxford JL, Oki S, Mizusawa H, Yamamura T. : NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora. *Am J Pathol*. **173**(6) : 1714–1723, 2008, Epub 2008 Oct 30.
- 27) Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, et al. : A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell*. **137**(1) : 47–59, 2009.

