

現プロフィールを解析した。KeyMolnet の周辺検索法を用いて、FTY720 投与により2倍以上上昇した遺伝子の分子ネットワークを解析した。

3. GSE26484 の再解析

GSE26484 は3名の血清 Sema4A 高値 MS 患者(MSH)、3名の血清 Sema4A 低値 MS 患者(MSL)、4名の血清 Sema4A 低値健常者(HS)の末梢血リンパ球から抽出した RNA を、HG-133 Plus 2.0 アレイ(Affymetrix; 38,500 genes)で解析、MAS5 で正規化したデータセットである。MSH, MSL, HS 間で one-way ANOVA で有意な差異を認め($p < 0.05$)、かつ MSH/MSL および MSH/HS が3倍以上発現差異を呈する遺伝子群を抽出し、Sema4-related genes(SRG)と定義した。Cluster 3.0, TreeView を用いて、階層的クラスタ解析を行い、Ingenuity Pathways Analysis(IPA: Ingenuity Systems)を用いて、SRG の分子ネットワークを解析した。

(倫理面への配慮)

GSE14386, GSE26464 は公開された公共データで、HMO6 は既存の培養細胞株であり、使用に当たり倫理的な問題はない。

C. 研究結果

1. T 細胞活性化に対する IFNB の治療効果

T 細胞活性化系トランスクリプトームデータ GSE14386 で IFNB により有意に変動した遺伝子(40 in MAS5; 58 in RMA)を同定した。MAS5 40 遺伝子のうち 32 遺伝子は RMA 58 遺伝子とオーバーラップしていた。58 遺伝子中

47 遺伝子は発現上昇、11 遺伝子(MMP9, CXCL5, IL9, IL1A など)は発現低下を示した。35 遺伝子は INTERFEROME でも IRGs として同定され、30 遺伝子には IFN 応答プロモーターが存在した。58 遺伝子の分子ネットワークは、共通上流転写因子として IRF, NF- κ B の関与が示唆された(図 1)。

2. HMO6 に対する FTY720 のアポトーシス誘導

FTY720 は 10 μ M 以上の濃度で6時間以内に HMO6 に対してアポトーシス(PARP 切断と caspase-3 活性化)を誘導した。HMO6 を 10 μ M FTY720 または等量の DMSO に2時間暴露し、遺伝子発現プロフィールを解析した。FTY720 により2倍以上発現上昇した30 遺伝子には、コレステロール代謝系転写因子 sterol regulatory element binding transcription factor(SREBP)により制御される遺伝子群(SREBP-responsive genes; INSIG1, HMGCS1, LDLR, HMGCR, MVK)が集積していた。INSIG1 と LDLR の発現上昇は real-time RT-PCR で確認出来た。発現上昇した30 遺伝子の分子ネットワークを KeyMolnet で解析すると、SREBP による発現調節系($p = 1.029E-021$)の関与が示唆された(図 2)。

FTY720 は HMO6 において SREBP2 を活性化し、SREBP2 60-kDa fragment(active form) を検出出来た。また simvastatin(HMG-CoA reductase inhibitor)前投与は SREBP2 を活性化し、FTY720 によるアポトーシスを増強した。HMO6 で SREBP2 の N 末端タンパクを強制発現させると PARP 切断と caspase-3 活性化を誘導した。

3. 血清 Sema4A 高値 MS 患者末梢血リンパ球の遺伝子発現プロフィール

初めに MSH, MSL, HS 間で有意な差異を認める 3729 遺伝子を抽出した。次に MSH/MSL および MSH/HS が 3 倍以上発現上昇している 127 遺伝子と MSH/MSL および MSH/HS が 3 倍以上発現低下している 158 遺伝子を抽出し、このうち annotation が明確な発現上昇 86 遺伝子と発現低下 108 遺伝子を SRG として同定した。発現低下 108 遺伝子は、KeyMolnet では Transcriptional regulation by p53 ($p = 2.225E-308$), IPA では Cell Cycle, Cellular Assembly and Organization, DNA Replication, Recombination, and Repair ($p = 1E-53$)との関連を認め、p53 が中心分子 hub として位置していた(図 3b)。

Top30 発現上昇遺伝子と発現低下遺伝子を指標に施行した階層クラスター解析では、MSH 群は MSL/HS 群から分離され、NECAB1, GNA11, ADAM19, MECR, HSDL2 が両者の明確な識別に有用なマーカーと考えられた。

D. 考察

1. T 細胞活性化に対する IFNB の治療効果: IL-9 の発現抑制

T 細胞活性化系で IFNB により発現上昇する遺伝子のほとんどは、IFN 応答プロモーターを有する IRGs である。一方、発現低下遺伝子には ISRE が存在しなかった。IFNB は活性化 T 細胞の BBB 通過に必要な MMPs, 各種 chemokines や proinflammatory cytokine IL-9 の発現を抑制することにより、MS で治療効果を呈している可能性がある。

2. 培養ヒトミクログリアに対する FTY720 のアポトーシス誘導機序: SREBP2 の活性化

FTY720 は経口投与で、血液脳関門を通過する。しかしながら FTY720 は 10 μ M 以上の濃度で、ヒトミクログリアに対して、リン酸化非依存性、受容体非依存性にアポトーシスを誘導することがわかった。臨床では 100 分の 1 程度の濃度(nM order)で、治療効果(免疫調節作用)を呈する。FTY720 は主として肝ミクロゾーム酵素 CYP4F2 により代謝されるので(Jin Y et al. Drug Metab Dispos 39: 191-198, 2011), 薬物代謝系に SNP に基づく個人差があれば、血中濃度が危険領域まで上昇しうる。本研究の結果から、FTY720 による SREBP2 の活性化とアポトーシスのリンクが示唆された。Caspase-7 は、SREBP-1, SREBP-2 の標的遺伝子であることが報告されている(Gibot L et al. Biochem J 420: 473-483, 2009)ので、FTY720 によるアポトーシス誘導機序として、コレステロールホメオステシスの攪乱を介するカスパーゼの活性化が考えられる(Yoshino et al. Cell Mol Neurobiol 31: 1009-1020, 2011)。

3. 血清 Sema4A 高値活動性 MS 患者末梢血リンパ球の分子ネットワーク: 転写因子 p53 系の機能異常

本研究では、血清 Sema4A 高値 MS 患者末梢血リンパ球トランスクリプトームデータセット (GSE26484) を再解析し、転写因子 p53(TP53)を中心とするネットワークの発現低下を認めた。p53 は標的遺伝子の発現誘導を介して、細胞周期・アポトーシス・DNA 修復を制御するゲノムの守護神((guardian of the genome)である。MS 末梢血リンパ球では、

ataxia telangiectasia mutated (ATM)が恒常的に活性化し、check point kinase-2 (CHK2)によるp53リン酸化亢進を介して、放射線照射によるアポトーシスに抵抗性を示す(Deng X et al. *Ann Neurol* 58: 577-584, 2005)。またMS末梢血リンパ球では、histone deacetylase 3 (HDAC3)の構成的発現が亢進し、HDAC3 inhibitor trichostatin A (TSA)によるアポトーシスに抵抗性を示す(Zhang F et al. *PLoS One* 6: e16795, 2011)。p53の機能的な異常は、MSにおける自己反応性T細胞排除の障害につながる可能性がある。

E. 結論

DNA マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現データに関して、特に分子ネットワークを詳細に解析することにより、いくつかのMS新規創薬標的分子の候補(IL-9, SREBP2, p53)を同定出来た。ゲノムワイドの分子ネットワーク解析は、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Satoh J, Obayashi S, Misawa T, Sumiyoshi K, Oosumi K, Tabunoki H: Protein microarray analysis identifies human cellular prion protein interactors. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 35(1): 16-35, 2009.
2. Obayashi S, Tabunoki H, Kim SU, Satoh J: Gene expression profiling of human neural progenitor cells following the serum-induced astrocyte differentiation. *Cellular and Molecular Neurobiology* 29(3): 423-438, 2009.
3. Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. *Multiple Sclerosis* 15(5): 531-541, 2009.
4. Satoh J, Tabunoki H, Arima K: Molecular network analysis suggests aberrant CREB-mediated gene regulation in the Alzheimer disease hippocampus. *Disease Markers* 27(5): 239-252, 2009.
5. Sumiyoshi K, Obasashi S, Tabunoki H, Arima K, Satoh J: Protein microarray analysis identifies cyclic nucleotide phosphodiesterase as an interactor of Nogo-A. *Neuropathology* 30(1): 7-14, 2010.
6. Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H, Wakana T, Kim SU: Stable expression of neurogenin 1 induces LGR5, a novel stem cell marker, in an immortalized human neural stem cell line HB1.F3. *Cellular and Molecular Neurobiology* 30(3): 415-426, 2010.
7. Satoh J: Bioinformatics approach to identifying molecular biomarkers and networks in multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 1(3): 127-140, 2010.
8. Satoh J: MicroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: Aberrant

- microRNA expression in Alzheimer disease brains. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 114(3): 269-275, 2010.
9. Shiina Y, Arima K, Tabunoki H, Satoh J: TDP-43 dimerizes in human cells in culture. *Cellular and Molecular Neurobiology* 30(4): 641-652, 2010.
 10. Shioya M, Obayashi S, Tabunoki H, Arima K, Saito Y, Ishida T, Satoh J: Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neuron navigator-3. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 36(4): 320-330, 2010.
 11. Tabunoki H, Ode H, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, Mita K, Yamamoto K, Sato R, Ishii-Nozawa R, Satoh J: BmDJ-1 is a key regulator of oxidative modification in the development of the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS One* 6(3): e17683, 2011.
 12. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Futamura N, Kobayashi M, Toyoshima I, Yoshioka T, Enomoto K, Arai N, Arima K: Immunohistochemical characterization of microglia in Nasu-Hakola disease brains. *Neuropathology* 31(4): 363-375, 2011.
 13. Satoh J, Tabunoki H: Comprehensive analysis of human microRNA target networks. *BioData Mining* 4: e17, 2011.
 14. Yoshino T, Tabunoki H, Sugiyama S, Ishii K, Kim SU, Satoh J: Non-phosphorylated FTY720 induces apoptosis of human microglia by activating SREBP2. *Cellular and Molecular Neurobiology* 31(7): 1009-1020, 2011.
 15. Numasawa Y, Yamaura C, Ishihara S, Shintani S, Yamazaki M, Tabunoki H, Satoh J: Nasu-Hakola disease with a splicing mutation of TREM2 in a Japanese family. *European Journal of Neurology* 18(9): 1179-1183, 2011.
 16. Nakamagoe K, Shioya A, Yamaguchi T, Takahashi H, Koide R, Monzen T, Satoh J, Tamaoka A. A Japanese case with Nasu-Hakola disease of DAP12 gene mutation exhibiting precuneus hypoperfusion. *Internal Medicine* 50(22): 2839-2844, 2011.
 17. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K: Immunohistochemical characterization of gamma-secretase activating protein expression in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology* in press, 2011.
 18. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Futamura N, Kobayashi M, Toyoshima I, Yoshioka T, Enomoto K, Arai N, Saito Y, Arima K: Phosphorylated Syk expression is enhanced in Nasu-Hakola disease brains.

Neuropathology in press, 2011.

19. Satoh J: Molecular network of microRNA targets in Alzheimer's disease brains. *Experimental Neurology* in press, 2011.
20. Satoh J, Shimamura Y, Tabunoki H: Gene expression profile of THP-1 monocytes following knockdown of DAP12, a causative gene for Nasu-Hakola disease. *Cellular and Molecular Neurobiology* in press, 2011.
21. 佐藤準一: ゲノムワイド解析により同定された多発性硬化症のリスクアレル. *Medical Briefs in Brain & Nerve* 17(1): 10-11, 2009.
22. 佐藤準一: 多発性硬化症病変分子のネットワーク解析. ヒト免疫疾患研究の新展開-From clinic to bench. *日本臨床免疫学会会誌* 33(4): 182-188, 2010.
23. 佐藤準一: 神経変性と神経炎症の分子ネットワーク解析. 脳内免疫システム: 明らかになる神経疾患との関わり. *細胞工学* 30(10): 1028-1035, 2011.
24. 佐藤準一: 分子ネットワークからみた多発性硬化症の創薬標的分子. 特集 I 神経免疫の新展開. *炎症と免疫* 19(6): 543-552, 2011.

著書

1. Satoh J: Molecular network analysis of target RNAs and interacting proteins of TDP-43, a causative gene for the neurodegenerative diseases ALS/FTLD. In *Biomedical Engineering and Cognitive*

Neuroscience for Healthcare: Interdisciplinary Applications, ed by Wu J. IGI Global, Hershey, Pennsylvania, 2011, in press.

2. Satoh J: Human microRNA targetome indicates a specialized role of microRNAs in regulation of oncogenesis. In *Systems Biology and Cancer*, ed by Azumi AS. Springer, Netherlands, 2011, in press.
3. 佐藤準一: プロトアレイによるタンパク質インターラクトーム解析. 創薬研究のためのタンパク質・プロテオミクス解析技術. 小田吉哉・長野光司編. 羊土社. 75-80, 2010.
4. 佐藤準一: アクアポリン-4(AQP-4). 多発性硬化症(MS)診療のすべて. 山村隆編. 診断と治療社, 2011, 印刷中.
5. 佐藤準一: 多発性硬化症(MS)の血液診断. 多発性硬化症(MS)診療のすべて. 山村隆編. 診断と治療社, 2011, 印刷中.
6. 佐藤準一: DNA マイクロアレイ. 多発性硬化症(MS)診療のすべて. 山村隆編. 診断と治療社, 2011, 印刷中.
7. 佐藤準一: 2. 網羅的遺伝子発現解析からみた病因・病態. 第1章 多発性硬化症の病態と診断 K. 病因・病態をめぐって. *アクチュアル脳・神経疾患の臨床. 最新アプローチ 多発性硬化症と視神経脊髄炎*. 辻省次・吉良潤一編. 中山書店, 2011, 印刷中.

2. 学会発表

国際学会

1. Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. 61st Annual Meeting of American Academy of Neurology. Seattle, 2009. 4.28.
2. Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H, Yamamura T: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. The 8th International Workshop on Advanced Genomics. Tokyo 2009.6.17.
3. Satoh J: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. Second German-Japanese Neuroimmunology Symposium. Invited Lecture. Eibsee, 2009. 7.11.
4. Satoh J: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. Progress in MS Research Conference. MS Research Australia. Invited Lecture. Sydney, 2009. 10.15.
5. Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H: Molecular network analysis suggests aberrant CREB-mediated gene regulation in the Alzheimer's disease hippocampus. The 20th International Conference on Genome Informatics. GIW2009. Yokohama, 2009.12.14.
6. Satoh J, Tabunoki H, Kim SU, Ishida T, Jinnai K, Arima K: Immunopathogenesis of Nasu-Hakola disease brain lesions. 14th International Congress of Immunology. Kobe, 2010.8.23.
7. Satoh J, Tabunoki H, Kim SU, Ishida T, Jinnai K, Arima K: Immunopathogenesis of brain lesions of Nasu-Hakola disease. 10th International Congress of Neuroimmunology. Barcelona, 2010.10.27.
8. Satoh J, Tabunoki H, Arima K: Immunohistochemical characterization of microglia in Nasu-Hakola disease brains. 63rd Annual Meeting of American Academy of Neurology. Honolulu, 2011.4.12.
9. Satoh J, Tabunoki H: Molecular network analysis of microRNA targets suggests aberrant expression of cell cycle regulators in Alzheimer's disease brains. The 9th International Workshop on Advanced Genomics. Revolution of Genome Science. Tokyo, 2011.7.12.
10. Tabunoki H, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, Mita K, Satoh J: BmDJ-1 is a key regulator of oxidative modification in the development of the silkworm, *Bombyx mori*. Queenstown Molecular Biology Meetings 2011. Queenstown, New Zealand, 2011.8.30.
11. Tabunoki H, Shimada T, Mita K, Banno Y, Satoh J: BmDJ-1 is a key regulator of oxidative modification in the development

of the silkworm, *Bombyx mori*. 2011 Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC, 2011.11.14.

国内学会

1. 佐藤準一、天竺桂弘子、山村隆:MS脳病巣プロテオームの分子ネットワーク解析. 第50回日本神経学会総会. 仙台、2009. 5.20.
2. 佐藤準一、椎名有葵、天竺桂弘子、有馬邦正:ヒト培養細胞・脳組織におけるTDP-43のダイマー形成. 第50回日本神経病理学会学術研究会. 高松、2009. 6.5.
3. Satoh J, Shiina Y, Tabunoki H: Constitutive dimer formation of TDP-43 in human cell lines. 第32回日本神経科学大会. Neuro2009. 名古屋、2009. 9.16.
4. 佐藤準一:脳病巣の分子ネットワークから見た神経疾患の病態解析. 多発性硬化症とアルツハイマー病. 第10回神奈川免疫性脳・神経疾患研究会. 特別講演. 横浜、2009. 10.2.
5. 尾出洋章、天竺桂弘子、嶋田透、伴野豊、三田和英、佐藤令一、佐藤準一: カイコDJ-1のcDNAクローニングと細胞分布. 第82回日本生化学会大会. 神戸、2009.10.23.
6. 佐藤準一:多発性硬化症病変発現分子のネットワーク解析. 第37回日本臨床免疫学会総会. シンポジウム2ヒト免疫疾患研究の新展開-from clinic to bench. 招待講演. 東京、2009.11.13.
7. 佐藤準一:多発性硬化症病変発現分子のネットワーク解析. 第37回日本臨床免疫学会総会. シンポジウム2ヒト免疫疾患研究の新展開-from clinic to bench. 招待講演. 東京、2009.11.13.
8. 佐藤準一: 那須ハコヲ病の臨床病理遺伝学的研究. 平成21年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究推進事業研究成果発表会. 東京 2010.3.12.
9. 佐藤準一、藤本幸太、吉野隆、天竺桂弘子:遺伝子発現プロフィールから見たT細胞活性化に対するIFNbetaの効果. 第22回日本神経免疫学会学術集会. 東京、2010. 3.18.
10. 吉野隆、天竺桂弘子、杉山重夫、石井啓太郎、Seung U. Kim, 佐藤準一:培養ヒトミクログリアにおけるFTY720のアポトーシス誘導能. 日本薬学会第130年会. 岡山、2010.3.28.
11. 小口翔、Raveney BJE, 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、2010.3.28.
12. 天竺桂弘子、尾出洋章、嶋田透、伴野豊、三田和英、佐藤令一、佐藤準一:カイコDJ-1の抗酸化作用. 日本薬学会第130年会. 岡山、2010.3.30.
13. 佐藤準一、塩谷真央、尾林信哉、天竺桂弘子、石田剛、有馬邦正:アルツハイマー病脳で発現低下しているmiR-29aの標

- 的遺伝子 neuron navigator 3. 第 51 回日本神経病理学会学術研究会. 東京、2010.4.24.
14. 佐藤準一、天竺桂弘子、有馬邦正、陣内研二: 那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究. 第 51 回日本神経学会総会. 東京、2010.5.20.
 15. 高橋広行、中馬越清隆、塩谷彩子、佐藤準一、玉岡 晃: DAPI2 遺伝子変異を認めた那須ハコラ病の36歳男性例. 第 193 回日本神経学会関東・甲信越地方会. 東京、2010.6.5.
 16. 佐藤準一: 脳疾患における microRNA 発現の網羅的解析. 第 122 回日本薬理学会関東部会シンポジウム. 再生医療および中枢性機能疾患における神経分化制御とエピジェネティクス. 静岡、2010.6.5.
 17. 佐藤準一、塩谷真央、天竺桂弘子、尾林信哉、有馬邦正、齋藤祐子、石田剛: アルツハイマー病脳で発現低下している miR-29a の標的遺伝子 NAV3. 第 33 回日本神経科学大会. Neuro2010. 神戸、2010.9.2.
 18. Satoh J, Tabunoki H: Comprehensive analysis of human microRNA target networks. The 2010 Annual conference of the Japanese Society for Bioinformatics. Fukuoka, 2010.12.14.
 19. 佐藤準一: FTY720 のヒトミクログリアに対するアポトーシス誘導能. 平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業免疫修飾薬による多発性硬化症の治療成績向上を実現する探索的研究班. 平成 22 年度班会議. 東京、2010.12.17.
 20. 天竺桂弘子、嶋田透、伴野豊、三田和英、佐藤令一、野澤玲子、佐藤準一: カイコ DJ-1 オルソログは NO により酸化される. 日本薬学会第 131 年会. 静岡、2011.3.28.
 21. 佐藤準一、吉野隆、小口翔、天竺桂弘子: TDP-43 インターラクトームの分子ネットワーク解析. 日本薬学会第 131 年会. 静岡、2011.3.28.
 22. 天竺桂弘子、嶋田透、伴野豊、三田和英、佐藤令一、野澤玲子、佐藤準一: カイコ DJ-1 オルソログは NO により酸化される. 第 52 回日本神経学会総会. 名古屋、2011.5.18.
 23. 沼沢祥行、山浦千春、石原正一郎、新谷周三、山崎峰雄、天竺桂弘子、佐藤準一: 本邦初の TREM2 遺伝子変異による那須ハコラ病の一家系. 第 52 回日本神経学会総会. 名古屋、2011.5.20.
 24. 佐藤準一、天竺桂弘子、石田剛、柳下三郎、陣内研二、二村直伸、小林道雄、豊島至、吉岡年明、榎本克彦、新井信隆、有馬邦正: 那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究. 第 52 回日本神経学会総会. 名古屋、2011.5.20.
 25. 佐藤準一、天竺桂弘子、石田剛、柳下三郎、陣内研二、二村直伸、小林道雄、豊島至、吉岡年明、榎本克彦、新井信隆、有馬邦正: 那須ハコラ病脳ミクログリアの

- 免疫組織化学的解析. 第 52 回日本神経病理会総会. 京都、2011.6.4.
26. 佐藤準一: 神経難病の病態解明のための分子ネットワーク解析. Ingenuity Pathways Analysis ユーザーミーティング. 招待講演. 東京、2011.9.1.
27. 佐藤準一、天竺桂弘子、石田剛、有馬邦正: アルツハイマー病脳における GSAP の発現解析. 第 34 回日本神経科学大会. Neuro2011. 横浜、2011.9.15.
28. 佐藤準一、吉野隆、天竺桂弘子、杉山重夫、石井啓太郎、Seung U. Kim : FTY720 の SREBP2 活性化を介するヒトミクログリアのアポトーシス誘導. 第 23 回日本神経免疫学会学術集会 東京、2011.9.17.
29. 天竺桂弘子、嶋田透、伴野豊、三田和英、佐藤令一、佐藤準一: カイコ DJ-1 オルソログは NO により酸化される. 第 84 回日本生化学会大会. 京都、2011.9.22.
30. Satoh J, Tabunoki H: Molecular network analysis of microRNA targets suggests aberrant expression of cell cycle regulators in Alzheimer's disease brain. 日本バイオインフォマティクス学会 2011 年会. 神戸、2011.11.8.
31. 佐藤準一、吉野隆、天竺桂弘子、杉山重夫、石井啓太郎、Seung U. Kim: FTY720 は SREBP2 活性化を介してヒトミクログリアのアポトーシスを誘導する. 第 40 回日本免疫学会学術集会 幕張、2011.11.29.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
なし

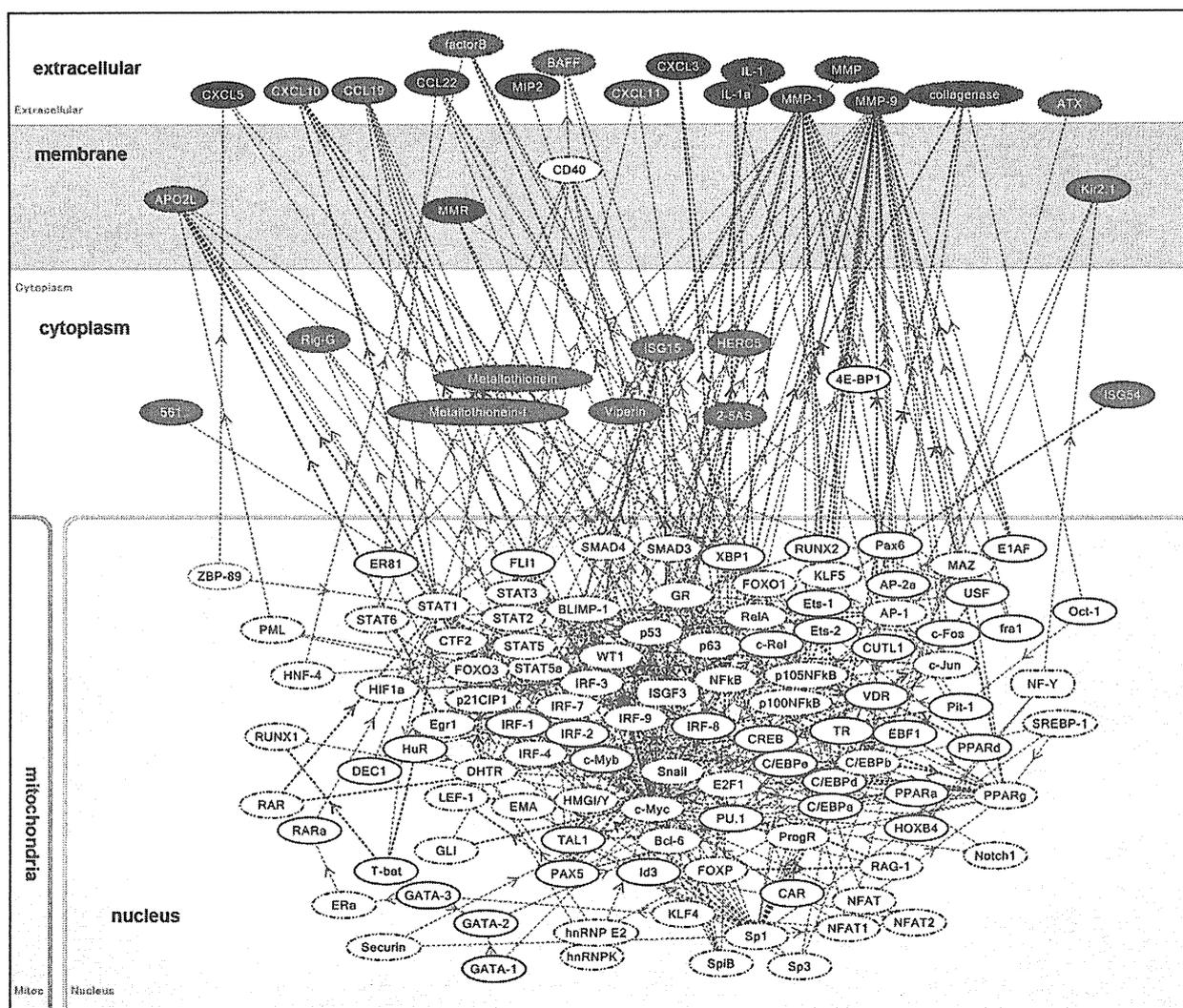


図 1. T 細胞活性化系で IFNB により変動した遺伝子群の分子ネットワーク。

T 細胞活性化系トランスクリプトームデータ GSE14386 で IFNB により有意に変動した 58 遺伝子を同定した。58 遺伝子中 47 遺伝子は発現上昇、11 遺伝子は発現低下を示した。KeyMolnet の共通上流解析法による 58 遺伝子の分子ネットワーク解析では、共通上流転写因子として IRF, NF-κB の関与が示唆された。

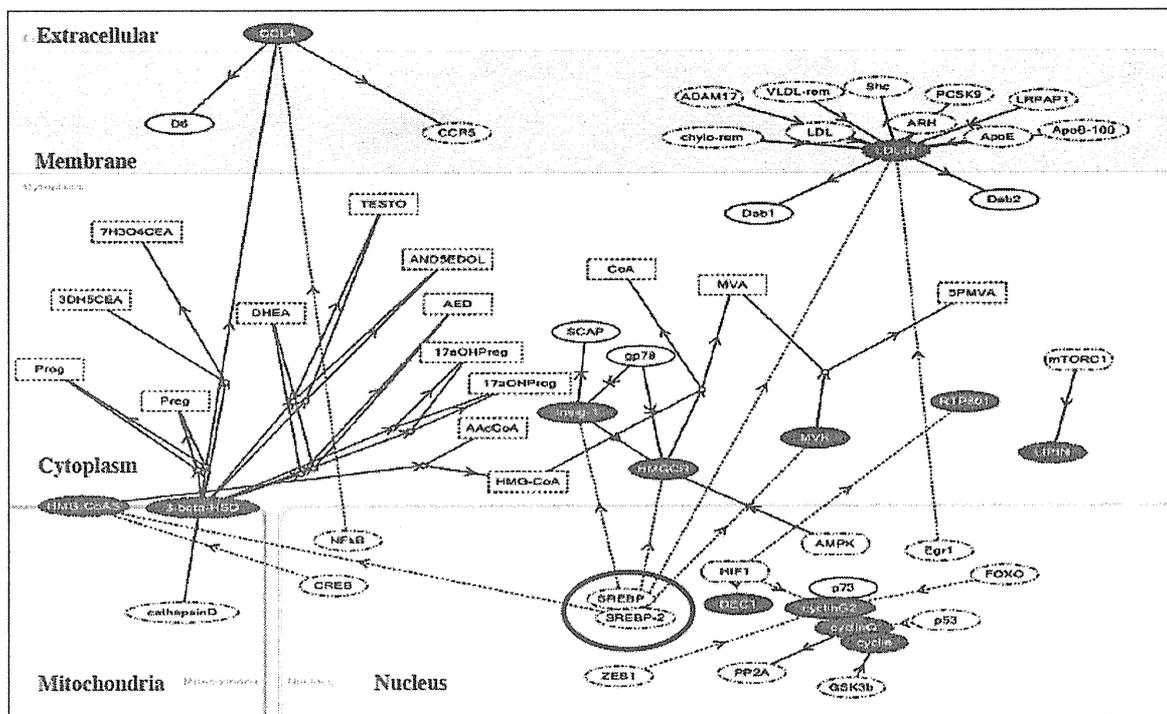


図 2. FTY720 で発現上昇した遺伝子群の分子ネットワーク。

HMO6 を 10 μ M FTY720 or DMSO に 2 時間暴露後に、total RNA を抽出、Human Gene 1.0 ST array で遺伝子発現プロファイルを解析した。FTY720 で 2 倍以上発現上昇した遺伝子群に関して、分子ネットワークを KeyMolnet の周辺検索法で解析した。SREBP による発現調節系の関与が示唆された ($p = 1.029E-021$)。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書（総合）

核内転写因子標的医薬の薬効評価研究

研究分担者 氏名 大木 伸司

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疾病研究第六部 職名 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。次に最近、IL-9 産生性の炎症性 Th9 細胞の移入により EAE を誘導できることが示された。そこで Th9 細胞の IL-9 産生に対する RAR アゴニストの効果を解析し、自己免疫疾患治療薬としての種々の RAR アゴニストの可能性を、さらに詳細に検討した。その結果、ATRA を含む RAR アゴニストは、極めて有効に T 細胞の IL-9 産生を抑制できることが明らかとなった。さらに Th9 細胞の移入により誘導した EAE は、ATRA の腹腔内投与により有意に軽症化し、新しい RAR アゴニストの自己免疫応答抑制作用を明らかにした。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関連し、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。以上の結果から、これら 2 種類の核内受容体は、自己免疫疾患に対する有望な新規治療標的となりうる可能性が示された。

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、まず 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。次に新たな炎症性 T 細胞として同定された Th9 細胞の IL-9 産生に対する RAR アゴニストの効果を検証し、RAR アゴニストの新たな免疫応答制御能を明らかにすることを目指した。さらに 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

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⁻CD62L^{high}) 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プロトコールで隔日経口投与 (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。

B6 マウス由来脾臓由来 T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体刺激し、天然型レチノイド all-trans レチノイン酸 (ATRA)、合成レチノイド Am80 を含む 7 種類の RAR アゴニストを添加し、培養液中に産生された IL-9 を測定した。ナイーブ T 細胞 (CD4+CD44⁻CD25⁻CD62L^{high}) を IL-4 と TGF- β の共存下 (Th9 細胞誘導条件) で抗 CD3/CD28 抗体刺激し、Th9 細胞への分化過程における IL-9 産生と制御性 T (Treg) 細胞マーカーである Foxp3 発現の経時変化に対するレチノイドの効果を、フローサイトメーターを用いて測定した。培養後の T 細胞から抽出した RNA を用いた定量 PCR により、Foxp3 と GATA-3 の発現をそれぞれ定量した。In vitro で分化させた Th1 細胞、

Th2 細胞および Th9 細胞を、resting 後 Th1 細胞、Th2 細胞および Th9 細胞分化条件で再刺激し、それぞれ IFN- γ 、IL-4 および IL-9 の産生を測定した。In vitro で分化させた Th9 細胞および Treg 細胞を、抗 CD3 抗体存在下にナイーブ CD4 陽性 T 細胞および放射線照射脾臓細胞と共培養して、細胞増殖抑制能を比較した。Am80 あるいは RAR アンタゴニスト LE540 を腹腔内投与した B6 マウスの脾臓から CD4 陽性細胞を分離し、抗 CD3/CD28 抗体刺激後の IL-9 産生を比較した。MOG 抗原特異的 T 細胞受容体トランスジェニック (2D2) マウス脾臓から分離したナイーブ CD4 陽性 T 細胞を、IL-4 と TGF- β の共存下に抗 CD3/CD28 抗体刺激し、Th9 細胞を分化させた。Resting 後再刺激した細胞 (5×10^6 cells/mouse) を、未処理 B6 マウスに経静脈移入し、EAE の発症を誘導した。T 細胞移入時よりマウスに ATRA を腹腔内投与し、臨床スコアを測定した。B6 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。コ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。

(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

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。

ATRA、Am80 を含む 7 種類の RAR アゴニスト (100 nM) は、T 細胞の IL-9 産生を非常に強く抑制した。同様に、Th9 細胞分化誘導条件下で培養したナイーブ T 細胞に対しても、RAR アゴニストは強力な IL-9 産生抑制効果 (IC₅₀=100pM 前後) を示した。この時 Th9 細胞の細胞増殖は、RAR アゴニストにより同様に強く抑制された。Th9 細胞誘導条件下で培養したナイーブ T 細胞は、3 日目に一過性に発現した Foxp3 が 4 日目に消失するとともに高い IL-9 産生を示した。5 日目に Foxp3 発現・IL-9 産生ともに減少した。ATRA 添加群では Foxp3 発現の消失が見られず、同時に IL-9 産生も起こらなかった。培養後の細胞では、ATRA 濃度依存的 Foxp3 遺伝子と GATA-3 遺伝子の発現誘導が認められた。Th9 細胞は、Treg 細胞よりは弱いものの有意な細胞増殖抑制能を示した。In vitro で分化させた Th1 細胞と Th2 細胞では、IL-4 と TGF- β の共存下で有意な IL-9 産生を認め、これは ATRA の共存によりいずれも抑制された。RAR アンタゴニスト LE540 を腹腔内投与した B6 マウスの脾臓 CD4 陽性細胞の IL-9 産生は、対照群に比べて有意に亢進した。一方、Am80 を投与したマウスから分離した脾臓 CD4 陽性細胞では、刺激後の IL-9 産生が有意に抑制された。In vitro で Th9 細胞へと分化させた 2D2 マウス由来 CD4 陽性 T 細胞を移入した B6 マウスは、移入 14 日目頃から EAE を発症した。移入時より ATRA を腹腔内投与した B6 マウスの EAE は、対照群に比べて有意に軽症化した。

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。

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。

最近、in vitroでIL-4とTGF- β の共存下で分化誘導されるTh9細胞を、未処理マウスに移入することによってEAEが発症することが示され、新たな病原性T細胞として注目されている。検証した全てのRARアゴニストは、脾臓由来CD4陽性T細胞のIL-9産生を非常に強く抑制した。ナイーブCD4陽性T細胞からTh9細胞への分化においては、ATRAは強力な細胞増殖抑制を伴って極めて低濃度から効果を示した(IC50=100pM前後)。他のエフェクターT細胞分化条件での細胞増殖は、同濃度のATRA添加により全く変化しないことから、ATRAはTh9細胞分化に対して、選択的で極めて強力な抑制効果を有することが明らかとなった。Th9細胞への分化過程において、一過性のFoxp3発現の後に高いIL-9産生が認められた。さらにATRAはFoxp3の発現を維持し、IL-9産生を抑えた。ATRA存在下にFoxp3発現を維持した細胞は、有意な細胞増殖抑制能を有し、一部Treg細胞と機能を共有する細胞群に変化していた。IL-9は、IL-4とTGF- β の共存下でナイーブT細胞のみならずTh1細胞やTh2細胞から産生され、生体内ではより広汎な産生細胞の存在が予想される。ATRAは調べたすべての条件でIL-9産生を抑制したことから、極めて有効かつ普遍的なIL-9抑制能を有する。RARアンタゴニストの投与により脾臓細胞のIL-9産生が亢進したことから、生理的濃度のATRAが生体内IL-9産生を制御している可能性が示された。2D2マウス由来のTh9細胞を移入することで誘導したEAEが、ATRAの腹腔内投与により有意に軽症化したことから、RARアゴニストは、病原性T細胞を形成するTh1細胞、Th17細胞に加えてTh9細胞を介した病態にも有効である可能性が示された。

一方、T細胞のNR4A2発現はIL-17産生細胞に局限しており、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。

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。ATRAやAm80を含むRARアゴニストは、T細胞のIL-9産生を極めて有効に抑制し、Treg細胞様の細胞群へと分化誘導する。RARアゴニストは、病原性T細胞を形成すると思われるTh9細胞を介した病態にも有効であると考えられた。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。以上より、これら2種類の核内受容体分子は、新たな自己免疫疾患治療法開発につながる重要な標的分子の候補と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

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 Immunologists, 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

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：Identification of substrates of GRAIL E3 ligase 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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

『免疫修飾薬による多発性硬化症の治療成績向上を実現する探索的研究』
-NKT 細胞亜群間の炎症に対する機能について；生活習慣病をモデルとして

研究分担者 岩渕和也 北里大学医学部免疫学 教授
研究協力者 佐藤 雅 北里大学医学部免疫学 助教

研究要旨

ナチュラルキラーT (NKT)細胞亜群の応答を修飾することにより，種々の臓器特異的自己免疫・炎症の進展を制御することが可能である。分担者は，モデルとして動脈硬化症と内臓脂肪症候群を用い，MHC-related protein 1 (MR1) および CD1d 拘束性 NKT 細胞のそれぞれの病巣進展過程への関与について解析した。動脈硬化症モデルについては MR1/ apolipoprotein E 二重欠損マウスを交配により樹立し， apoE 欠損マウスとの間で病巣進展について比較した。その結果， MR1 拘束性 NKT 細胞は， CD1d 拘束性亜群とは逆に，抗動脈硬化性に機能することを見出した。また，内臓脂肪症候群の進展についても CD1d 拘束性亜群が促進的， MR1 拘束性亜群が抑制的であることが示された。促進的な CD1d 拘束性亜群としては type II NKT 細胞が主として考えられた。

A. 研究目的

我々は CD1d 欠損 (Δ) マウスを用いて CD1d 拘束性 NKT 細胞が動脈硬化症の進展を促進することを以前報告し¹⁾，他の研究室からもまた同様な報告がなされた²⁻⁶⁾。一方， $\beta 2m^{\Delta}$ 骨髄細胞をドナー，低比重リポタンパク受容体欠損マウス ($Ldlr^{\Delta}$) をホストにした放射線骨髄キメラ [$\beta 2m \rightarrow Ldlr^{\Delta}$] に動脈硬化症を誘導した実験 ([$\beta 2m \rightarrow Ldlr^{\Delta}$] では，野生型骨髄で $Ldlr^{\Delta}$ を再建したキメラ [$WT \rightarrow Ldlr^{\Delta}$] よりも動脈硬化症の病巣面積が大であった) から，自然 T 細胞中に動脈硬化症の進展に対して抑制的である細胞の存在が推測されていた (Ogura H, 未発表)。

研究班代表の山村博士が多発性硬化症の軽症化に関与する細胞として明らかにした MR1 拘束性 NKT 細胞 (MAIT) ⁷⁾ が，動脈硬化症の進展に対しても抑制細胞として機能している可能性が考えられた。そこで MR1/apoE 二重欠損 (double knockout: DKO) マウスを交配により作出し，apoE 単独欠損 (single knockout: SKO)

マウスと，それぞれの動脈硬化症の進展を比較することで，動脈硬化症における MR1 欠損 (= MAIT 欠損) の病巣進展に対する効果とそのメカニズムについて検討した。

また，同様な脂肪組織の炎症が背景に存在する内臓脂肪症候群に関しても，NKT 細胞が関与する可能性が考えられた。食餌誘導性肥満 (diet-induced obesity; DIO) をモデルに，CD1d・MR1 拘束性 NKT 細胞の欠損が DIO の進展にどのような影響を与えるかを解析した。

B. 研究方法

1. マウスと in vivo 実験

<動脈硬化症>

動脈硬化症自然発症モデルである apoE SKO と，さらに MR1 も欠損した DKO の 2 系統のマウスに，それぞれ標準脂肪含有食 (Standard Fat Diet; SFD: 脂肪含量 4.3%)，あるいは高脂肪食 (High Fat Diet; HFD: 脂肪含量 32%) を 8 週から 5 週間給餌し，13 週齢でサンプリングを行った。大動脈弁直上から連続凍結切片を作製

し、Oil red O 染色後、動脈硬化症病巣の面積を Scion Image ソフトウェアにて定量し、病巣面積を比較した。

<内臓脂肪症候群>

体重経時変化と臓器体重

WT および NKT 細胞欠損マウス ($J\alpha 18^{-/-}$, $CD1d^{-/-}$) の各系統のマウスに HFD または SFD を 18 週間給餌、体重を毎週測定した¹⁰。

臓器重量比較と組織学的検索

肝臓と内臓脂肪については臓器採取時に秤量し、凍結・パラフィン切片を作製した。それぞれ、HE 染色、Oil-red-O 染色を行い、脂肪沈着量や細胞周囲径を定量化した。

経腹腔耐糖能試験/インスリン耐性試験

肥満マウスの耐糖能・インスリン耐性の評価のために、経腹腔耐糖能試験 (IPGTT) やインスリン耐性試験 (ITT) を行った¹⁰。IPGTT は 0, 30, 60, 120 分と経時的に尾静脈より血液を採取、血糖値を測定した。ITT は 3 時間半前より絶食させ、IPGTT と同間隔で血液を採取、血糖値を測定した (インスリン 7.5 μ L/生理食塩水 10mL を 0.01ml/g 体重で腹腔注射後)。各実験は♂・♀両方で、各 n = 3~5 匹で複数回行ない、統計解析は Tukey-Kramer test により $p < 0.05$ を有意とした。

MR1 拘束性 NKT 細胞亜群欠損と DIO

WT マウス (あるいは $J\alpha 18^{-/-}$) と MR1 拘束性 NKT 細胞亜群欠損の $MR1^{-/-}$ マウスに HFD を、対照群として SFD を、29~33 週間給餌し、1 と同様に体重、組織像を解析した。統計解析は Student's-*t* test により $p < 0.05$ を有意とした。

2. NKT 細胞のフローサイトメトリー解析

SKO および DKO の CD1d 拘束性 NKT 細胞の動態を調べる目的で、若齢及び成熟マウスの肝臓・脾臓の CD1d 拘束性の type I, II NKT の割合を算出した。さらに、NKT 細胞活性化を調べる目的で CD69 陽性細胞の割合を算出した。なお NKT 細胞は、 α -galactosylceramide (GC)

負荷 $CD1d\text{-dimer}^+/\text{TCR}^+$ の分画を Type I NKT 細胞、 $NK1.1^+/\text{TCR}\beta^+$ の分画を total NKT 細胞とし、type II NKT 細胞は、[total NKT 細胞(%) - [type I NKT 細胞(%)] により算出した。

3. サイトカイン産生

サイトカイン産生は脾細胞 ($2 \times 10^5/\text{well}$) を α -GC 20, 200 ng/ml にて 24 時間刺激した培養上清中の濃度を、フローサイトメトリーにて測定した (FlowCytomix™, Bender MedSystem)。

4. 病巣中の invariant TCR α 鎖の検出

動脈硬化症病巣中の invariant NKT (iNKT) 及び MAIT V α 鎖の存在を調べるために、PCR による検出を試みた。マウスの大動脈を採取、抽出した RNA を cDNA に変換した後、V $\alpha 14$ $J\alpha 18$, V $\alpha 19$ $J\alpha 33$ の発現を nested PCR を用いてそれぞれ調べた。配列は次の通りである^{1, 8, 9}。
V $\alpha 14$ L; 5'-ATGAAAAGCGCCTGAGTGCC-3'
C α rev; 5'-CAGGAGGATTCGGAGTCCCA-3'
V $\alpha 14$; 5'-TAAGCACAGCACGCTGCACA-3'
 $J\alpha 18$; 5'-CAATCAGCTGAGTCCCAGCT-3'
mAV19; 5'-CTTTCCTGAGCCGCTCGAA-3'
C α rev; 5'-CAGGAGGATTCGGAGTCCCA-3'
V $\alpha 19$; 5'-GCTTCTGACAGAGCTCCAG-3'
 $J\alpha 33$; 5'-CTTGGTCCCAGAGCCCC-3'

5. 血液生化学

マウス血清の全コレステロール (total-CHO), 高密度リポタンパク質コレステロール (HDL), トリグリセリド (TG), アラニルロイシルアミノトランスフェラーゼ (ALT) は Fuji ドライケムシステム (Fuji Film) にて測定した。

6. 倫理面への配慮

動物実験は、北海道大学・北里大学それぞれの動物実験委員会の審議を経たのち、許可を得てから実施した (それぞれ、#08-265 と #2010/11-188)。

C. 研究結果

1. 動脈硬化病巣面積の比較

大動脈弁輪部病理組織を見ると、SFD・HFD 給餌群のいずれでも DKO で病巣が大きく、面

積の比較でも、DKO で有意に大きいことが判明した(図 1).

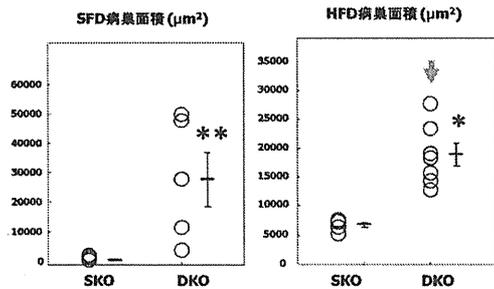


図 1. 各系統マウスにおける動脈硬化病巣 SFD (左)・HFD (右) 給餌の SKO・DKO マウスの病巣面積比較 (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$).

2. 脾臓・肝臓における NKT 細胞の動態
 動脈硬化巣解析時における脾臓と肝臓の NKT 細胞の割合は、DKO では両臓器ともに type I NKT (=iNKT)細胞の有意な減少が認められた(図 2A). 肝臓では、type I NKT 細胞の減少に起因すると考えられる total NKT 細胞の減少も認められた. この NKT 細胞減少のメカニズムを解析するために、若齢と成熟マウスで NKT 細胞数、活性化、NKT 細胞のサイトカイン産生を比較した. その結果、若齢マウスでは肝臓・脾臓において iNKT 細胞数は SKO と DKO では差がない(図 2 B)が、DKO で有意な活性化を認め(図 2 D; CD69⁺↑), α-GC 刺激による IFN-γ, IL-4 等のサイトカイン産生が亢進していた(図 3 A). 一方、成熟マウスでは、NKT 細胞は激減(図 2 C), CD69⁺も低下(図 2 E), α-GC 刺激による IFN-γ や IL-4 などの産生も有意に低下していた(図 3 E).

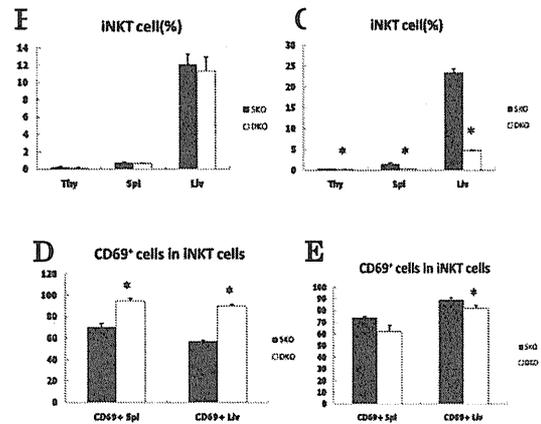
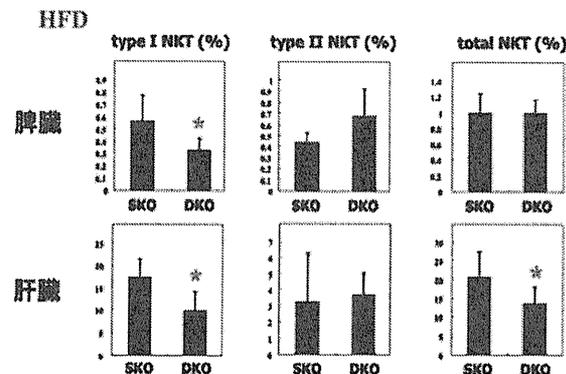


図 2. 各系統における NKT 細胞動態 A) 病巣解析のための採材時の各系統の肝・脾臓における NKT 細胞亜群の割合 B) 若齢マウスの iNKT の割合 C) 成熟マウスの iNKT の割合 D) 若齢マウスの iNKT の CD69⁺の割合 E) 成熟マウスの iNKT の CD69⁺の割合(* $p < 0.05$)

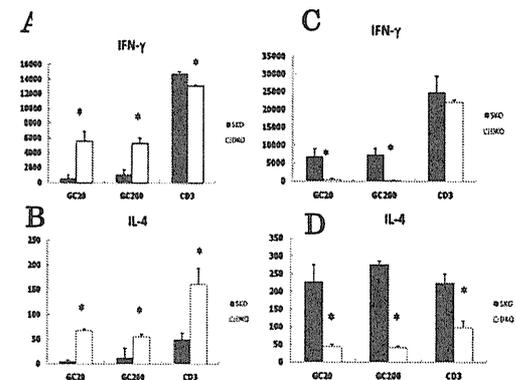


図 3. 各系統マウスのサイトカイン産生 A)若齢マウスにおけるα-GC 刺激 IFN-γ B)若齢マウスにおけるα-GC 刺激 IL-4 産生 C)成熟マウスにおけるα-GC 刺激 IFN-γ D)成熟マウスにおけるα-GC 刺激 IL-4 産生(* $p < 0.05$)

3. 動脈硬化病巣における NKT 細胞の存在

SKO 大動脈の PCR では、Vα14Ja18,

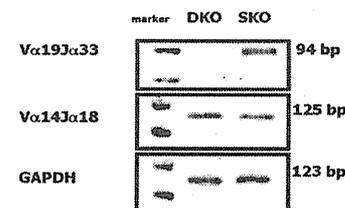


図 4.大動脈標品の RT-PCR 結果