

MSとB細胞

T細胞だけであったことから、髄液中で抗原提示細胞に遭遇し、再度特異的に活性化されることが、T細胞がグリア境界膜を越える際に必要であると示唆された。

また、血管内皮細胞からの経路のほかに、脈絡叢を介した中枢神経系への侵入経路も提唱されている(図3:下段)。脈絡叢は上皮細胞と軟膜で形成される脈絡板に毛細血管が入った組織であり、髄液を産生する。また、くも膜下腔を巡回している免疫監視細胞が中枢神経系に入る主な場所でもある。細胞は毛細血管から上皮細胞を通過して脳室内に到達するが、脈絡叢血管内皮細胞や上皮細胞を通過する分子メカニズムはほとんどわかっていない。最近、CCR6陽性T細胞が脈絡叢から髄液内、炎症のない脳実質に至り、MS炎症の初期段階に重要な役割を果たすことが示唆された¹⁹⁾。CCR6を欠損したマウスではEAEの発症が完全に抑制され、ミエリン抗原特異的なCCR6陽性T細胞をCCR6欠損マウスに移入するとEAEが惹起された。そのうえ、EAEのピーク時に髄膜や脳実質に浸潤していた細胞は投与したCCR6陽性細胞ではなく、CCR6を欠損したレシピエントのT細胞であった。すなわち、初期の炎症のトリガーには自己反応性CCR6陽性T細胞が必要であり、その後CCR6に依存しないマクロファージやほかのT細胞などの細胞浸潤が起こって炎症の第2波が形成されると考えられた。脈絡叢にはCCR6のリガンドであるCCL20が多く発現しており、MSの第1回目のエ

ピソードである clinically isolated syndrome (CIS) 患者の髄液中で CCR6 発現細胞が多いことから、MS の初期病態形成に、脈絡叢から侵入した CCR6 陽性 T 細胞が関与していると提唱されている。CCR6 は Th17 細胞に主に発現するケモカイン受容体であることから、Th17 細胞が MS の炎症の開始に何らかの役割を果たしていることを示唆するデータではあるが、一方で CCR6 遺伝子欠損マウスで EAE がむしろ増悪したという報告もあり²⁰⁾、CCR6 陽性細胞の MS 病態への関与についてはさらなる研究を要する。

これまで、CSF 中のオリゴクロナルバンドの存在は、病態に免疫が介在する間接的な証拠と考えられてきたが、病態との関連についてはまだ解明されていない。

二次進行型 MS (secondary progressive MS ; SPMS) 患者の髄膜には、B 細胞や形質細胞に富んだ異所性リンパ濾胞 (ectopic lymphoid follicles) が認められ²¹⁾、B 細胞の増殖や免疫グロブリン産生の場となり得ることが考えられた。このリンパ濾胞は脳溝のくも膜下腔に比較的限局して存在し、皮質病

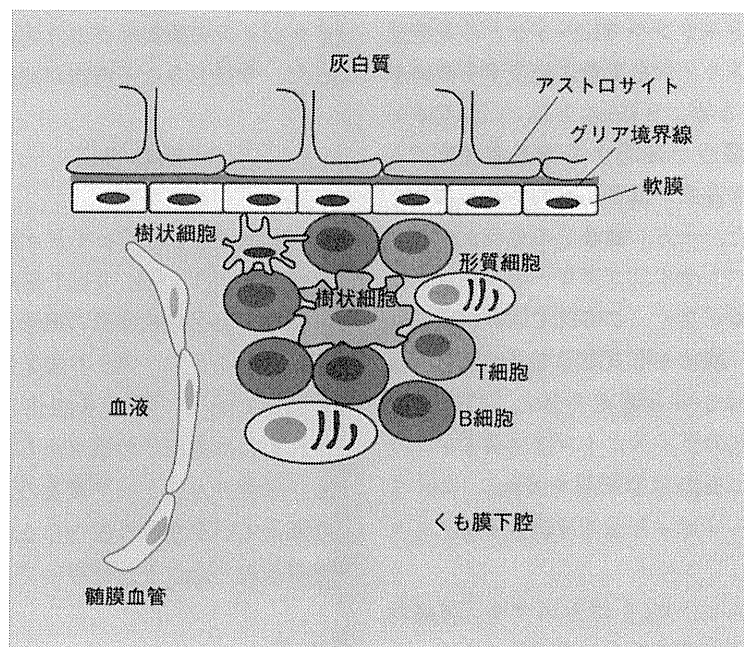


図4 異所性リンパ濾胞 (ectopic lymphoid follicles)

リンパ濾胞は、脳溝下の髄膜血管周囲に軟膜に接して存在する。濾胞樹状細胞はB細胞遊走因子であるCXCL13を産生し、濾胞内でネットワークを形成する。

変の重篤度や疾患活動性と関連したと報告されている(図4)。CXCL13は、B細胞のリンパ節への移動に関与するケモカインであり、さまざまな自己免疫疾患における異所性リンパ濾胞形成に重要な分子であるが、MS患者の髄膜内リンパ濾胞や活動性病変、髄液中で発現が上昇している。

また、B細胞がMS病態に関与する根拠として、リツキシマブの有効性が挙げられる。リツキシマブは抗CD20モノクローナル抗体であり、2つの臨床試験において、リツキシマブにより選択的にB細胞を除去すると、新規炎症病巣が早期にかつ有意に減少することが示された。Bar-Orらは、リツキシマブによるB細胞除去のT細胞への影響を解析し¹⁸⁾、MS患者のB細胞はIFN- γ などの刺激に対して、リンホトキシンやTNF- α などの炎症性サイトカインを多量に産生する傾向を有するが、B細胞を除くとCD4やCD8陽性T細胞からの炎症性サイトカイン産生が顕著に抑制されることを示した。一方、髄液中の免疫グロブリンレベルやオリゴクローナルバンドには影響がなく、この抗CD20抗体の効果は、抗体や形質細胞を標的にしたものではないと考えられた。以上より、B細胞のサイトカイン産生異常が非特異的に炎症性T細胞を刺激し、MS再発のトリガーとなる可能性が考えられる。

さらに、EAEにおいても、B細胞の関与を示唆する報告がある。ミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白(My-

elin oligodendrocyte glycoprotein; MOG)特異的T細胞受容体のトランスジェニックマウスは、Pöllingerらによって作製された初の再発寛解型EAEを自然発症するマウスであるが、炎症病巣にはCD4やCD8陽性T細胞に加えてB細胞浸潤が認められ、病気の進行はミエリン抗原反応性B細胞の増加と併行していた¹⁹⁾。興味深いことに、抗CD20抗体でB細胞を除去すると、血清中の抗MOG IgG1抗体が減少するとともに、EAEの発症が抑制された。これらのことから、自己反応性T細胞は自己反応性B細胞を増殖させ、抗MOG抗体の産生を誘導するとともに、自己反応性B細胞がMSの発症に関与する可能性が示された。これらの知見により、MS病態におけるT細胞-B細胞インタラクションの重要性がより明らかになった。今後さらなる報告が期待される。

おわりに

MSの病態をめぐって日々新たな報告がなされている。Th17細胞の発見によって自己免疫疾患の概念が大きく変わったように、MSの知見においても進歩があり、概念も変化している。われわれは免疫学の観点から病態を捉え、患者さんにとって最良の治療を常に考えていかなければならない。この稿がその一助になれば幸いである。

●文献

1) Bielekova B, Goodwin B, Richert N

- et al : Nat Med 6 : 1167-1175, 2000
- 2) Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC et al : PLoS Genet 4 : e1000024, 2008
- 3) Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM et al : J Exp Med 201 : 233-240, 2005
- 4) Haak S, Croxford AL, Kreyenborg K et al : J Clin Invest 119 : 61-69, 2009
- 5) Matuszevicius D, Kivisäkk P, He B et al : Mult Scler 5 : 101-104, 1995
- 6) Ishizu T, Osoegawa M, Mei FJ et al : Brain 128 (Pt 5) : 988-1002, 2005
- 7) Brucklacher-Waldert V, Stüerner K, Kolster M et al : Brain 132 (Pt 12) : 3329-3341, 2009
- 8) Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI et al : Ann Neurol 66 : 390-402, 2009
- 9) Segal BM, Constantinescu CS, Raychaudhuri A et al : Lancet Neurol 7 : 796-804, 2008
- 10) Comabella M, Lünemann JD, Río J et al : Brain 132 (Pt 12) : 3353-3365, 2009
- 11) Axtell RC, de Jong BA, Boniface K et al : Nat Med 16 : 406-412, 2010
- 12) Ransohoff RM : N Engl J Med 356 : 2622-2629, 2007
- 13) Neuwelt E, Abbott NJ, Abrey L et al : Lancet Neurol 7 : 84-96, 2008
- 14) Bartholomäus I, Kawakami N, Odoardi F et al : Nature 462 : 94-98, 2009
- 15) Reboldi A, Coisne C, Baumjohan D et al : Nat Immunol 10 : 514-523, 2009
- 16) Elhofy A, Depaolo RW, Lira SA et al : J Neuroimmunol 213 : 91-99, 2009
- 17) Magliozzi R, Howell O, Vora A et al : Brain 130 (Pt 4) : 1089-1104, 2007
- 18) Bar-Or A, Fawaz L, Fan B et al : Ann Neurol 67 : 452-461, 2010
- 19) Pöllinger B, Krishnamoorthy G, Berer K et al : J Exp Med 206 : 1303-1316, 2009



【テーマ②】

Th17細胞のケモカインレセプターの発現

はじめに

ナイーブT細胞は、特異的な抗原に遭遇し活性化されると、特徴的なサイトカインを産生する細胞集団へと分化する。これまで永年にわたってTh1とTh2細胞のバランスによって免疫現象の多くが説明されてきた。Th1細胞はIL-12存在下で誘導されIFN- γ を産生するT細胞であり、ウイルスなどの細胞内病原体を排除する。一方、Th2細胞はIL-4の存在下で誘導され、IL-4、IL-5、IL-13などのTh2サイトカインの産生を介して、B細胞増殖、IgE産生などを誘導し、寄生虫感染の排除において重要な役割を果たす。多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)などの臓器特異的自己免疫疾患はTh1優位であり、一方アレルギー疾患はTh2優位とされてきた。ところが、MSの動物モデルの解析から、IL-17を産生するT細胞が病態形成に重要な役割を果たしており、それがTh1やTh2細胞とは異なる分化経路をたどる細胞であることが証明され、Th17細胞と名付けられた。本稿では、Th17細胞のバイオマーカーとして重要な、ケモカインレセプターの発現について最近の基礎および臨床研究を概説する。

Th17細胞のケモカインレセプターの同定

ケモカインはサイトカインの一種で、G蛋白質共役受容体であるケモカインレセプター発現細胞を遊走・活性化させる作用をもち、免疫系細胞を「適材適所」に誘導する役割を果たしている。一般にナイーブCD4陽性T細胞は末梢リンパ節のT細胞領域へケモカインレセプターとしてCCR7を発現しているが、活性化とともにその発現を失い、エフェクター細胞に分化すると特有のケモカイン受容体を発現するようになる。これまでの報告ではTh1細胞に分化するとCCR5やCXCR3を、Th2細胞ならCCR4やCCR8、CRTh2を発現する傾向があり、T細胞の分化とケモカイン受容体の発現は協調して制御されていると考えられる。

Th17細胞が独立した分化経路をたどる細胞であるならば、Th1細胞やTh2細胞とは違った特有のケモカイン受容体を発現している可能性が考えられる。われわれは、メモリーCD4陽性T細胞を2種類のケモカインレセプターで分画し、おのおのの分画をセルソーターでソーティングしたのち、PMAとionomycinで刺激してサイトカイン産生能を比較した。その結果、CCR2陽性CCR5陰性T細胞をIL-17産生性T細胞として同定した¹⁾。われわれと同時期にAcosta-Rodriguezらが同様の手法により、末梢血中CCR6陽性CCR4陽性T細胞が、ヒトTh17細胞であると報告した²⁾。その後ヒト慢性炎症性疾患のIL-17産生性T細胞がしばしばIFN- γ を同時に産生することが報告され、そのようなポピュレーションも包含するかたちで、現在ではかえって1種類のケモカインレセプターCCR6を用いてTh17細胞のケモカインレセプターとするのが主流となっている。また、CCR6のリガンドとしては、MIP-3a(CCL20)が唯一のリガンドとして報告されている。

Th17細胞分化およびケモカインレセプター発現制御機構

Th1細胞やTh2細胞分化過程にIL-12やIL-4などのサイトカインが重要であることが知られていたことから、ナイーブT細胞からTh17細胞への分化を促進するサイトカインがマウスのT細胞を用いて探索された。その結果、TGF- β とIL-6が協調的にTh17細胞分化を促進することが判明した。ナイーブT細胞をTGF- β 存在下で培養するとFoxp3陽性の制御性T細胞(induced T regulatory cells; iTreg cells)が誘導され、ナイーブT細胞をTGF- β とIL-6共存下で培養すると、IL-17産生細胞が誘導された³⁾。こうして誘導されたIL-17産生性T細胞は、IFN- γ 、IL-4産生能を示さず、Th17細胞分化に必須の転写因子であるROR γ tを高度に発現し、Th17細胞であると考えられ

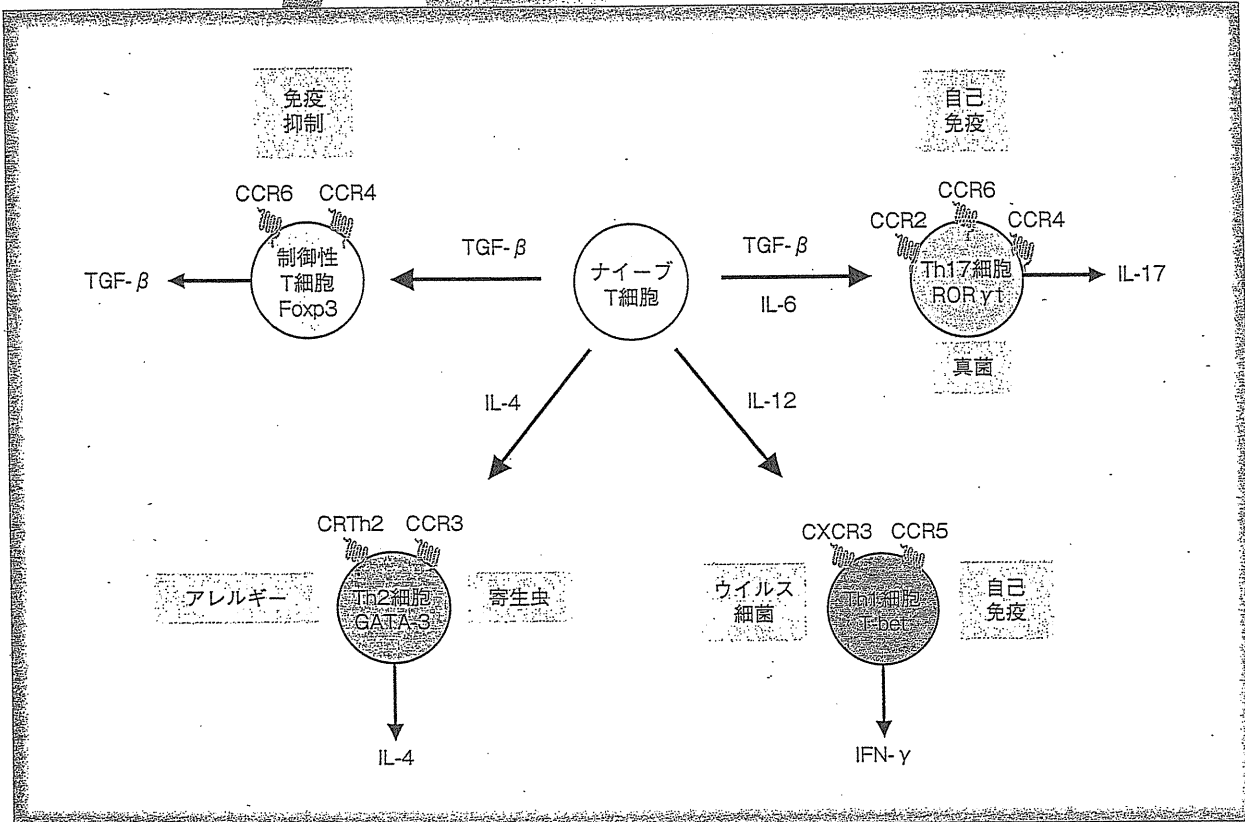


図1 T細胞サブセットのまとめ

T細胞サブセットの誘導に関与する因子およびT細胞サブセットが産生するサイトカイン、分化に必須の転写因子、ケモカインレセプターの関係を図示した。免疫寛容あるいは防御免疫における各種T細胞サブセットの役割および関与する免疫異常も図示している。

た⁴⁾。当初、Th17細胞の分化に必須であると考えられていたサイトカインIL-23は、Th17細胞の分化には必須ではなく、生体内での増殖あるいは高い炎症惹起能の獲得に重要であることが示されている。Th17細胞は、分化とともに、IL-17以外に、IL-17F、IL-21、IL-22、IL-26などのサイトカイン産生能を獲得する。マウスの研究に基づき、ヒトTh17細胞分化機構の探索も行われ、マウスとヒトでは若干違いがあり、TGF-βとIL-6の組み合わせでは、効率的にTh17細胞分化は誘導されず、TGF-βとIL-21によって誘導されると報告された⁵⁾。また、別の報告では、TGF-βとIL-1、IL-6およびIL-21あるいはIL-23が必要であるとする報

告もある。

Th17細胞におけるケモカイン受容体発現制御機構は完全には解明されていないが、いくつかの報告で、TGF-βがCCR6発現を誘導することが示されている^{6,7)}。ナイーブT細胞はほとんどCCR6を発現していないが、CCR6はTh17細胞だけでなく、制御性T細胞にも発現している。ナイーブT細胞をTGF-β存在下で培養すると、制御性T細胞への分化と、CCR6発現が誘導された。一方、TGF-βとIL-6、IL-1、TNF-αなどの炎症性サイトカイン共存下で培養すると、Th17細胞への分化とともに、TGF-βの容量依存性にCCR6発現が誘導された。以上より、T細胞分化過程でCCR6発現



は TGF- β 依存性に制御されていることが示唆される。図1にT細胞サブセットと分化に必要なサイトカイン、転写因子、発現するケモカインレセプターを示す。

ヒト慢性炎症性疾患における Th17細胞のケモカインレセプターの機能

Th17細胞は、種々の慢性炎症性疾患、自己免疫疾患において病態形成に関与するT細胞としての可能性が示唆されている。乾癬は原因不明の慢性炎症性角化性疾患であるが、特にTh17細胞やIL-23の関与が強いと考えられている。乾癬病巣においては、健常皮膚と比較して、有意に高いIL-17, IL-22, ROR γ t mRNAの発現が認められ、Th17細胞の集積が示唆される⁸⁾。

実際、フローサイトメトリーを用いて、乾癬病巣において末梢血あるいは健常皮膚と比較し非常に多くのTh17細胞が集積していることが示され、そのTh17細胞のほとんどがCCR6陽性である。乾癬病巣には正常の約7倍のCCL20、約4倍のCCR6 mRNAが発現しており、試験管内のmigration assayにおいてCCL20はIL-17産生細胞の移動を誘導した。これらのデータは、乾癬病巣におけるTh17細胞の集積が、病巣での(抗原提示細胞やケラチノサイトによる)CCL20によって誘導されることを示唆している。なお、乾癬病巣に似た病理学的変化(ケラチノサイトの過形成)の成立における、Th17細胞サイトカインIL-22の重要性が示唆されていた。最近、乾癬病巣でIFN- γ やIL-17産生能をもたない、IL-22のみ産生するT細胞が同定されTh22

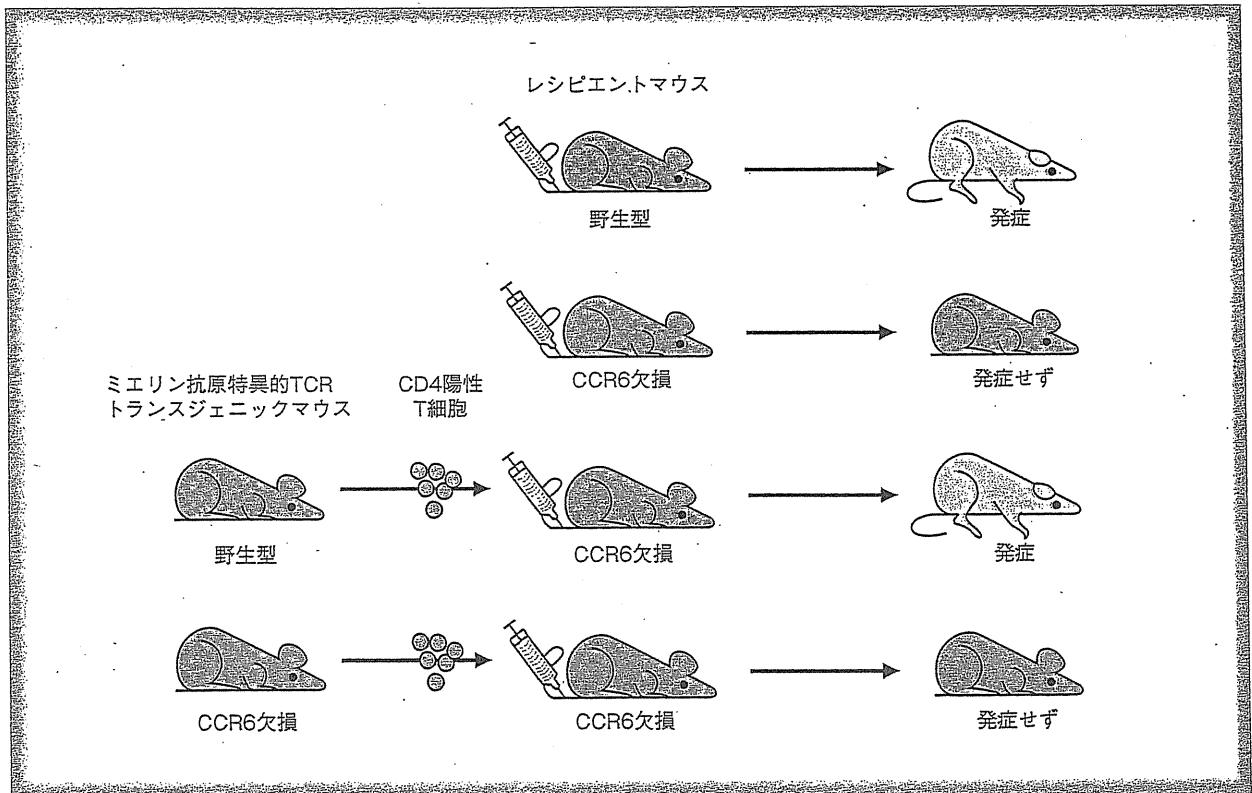


図2 EAE発症には、ミエリン抗原特異的T細胞上のCCR6発現が必要である

野生型あるいはCCR6欠損マウスより取り出したミエリン抗原特異的T細胞をCCR6欠損マウスにあらかじめ移入してEAEを誘導すると、野生型と異なり、CCR6欠損マウス由来のT細胞では、レシピエントマウスにEAEが発症しなかった。したがって、EAEの発症には、ミエリン抗原特異的T細胞におけるCCR6発現が必要であると示唆される。

【テーマ②】 Th17細胞のケモカインレセプターの発現

細胞と提唱されている。この細胞群も Th17細胞同様 CCR6陽性であり、かつCCR4陽性CCR10陽性であると報告されている⁹⁾。また、IL-12とIL-23の共通サブユニットに対する中和抗体は、大規模臨床試験において乾癬症状を有意に抑制することが示され、基礎研究の結果に基づく生物学的製剤による治療が実現することとなった¹⁰⁾。

炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease ; IBD)においては、全ゲノムの一塩基多型解析からIL-23受容体遺伝子変異がクローン病のリスクファクターであると報告され、IL-23の病態形成における重要性が示唆されていたが、近年のバイオプシー検体の試験管内培養で、IBD病巣検体は正常検体と比較して有意に高いIL-17産生を認め、病巣から分離したリンパ球においても、Th17細胞の増加が報告された。一方で、クローン病巣から分離されたリンパ球は高いIL-23産生能を示すものの、T細胞由来のサイトカインとしては、IL-17ではなく、IFN- γ 産生を誘導することが示唆されており、病態形成におけるTh1細胞の重要性も高いと考えられる。

MSは、慢性脱髄性中枢神経疾患であるが、髄鞘(ミエリン)蛋白を標的とする自己免疫疾患であると考えられている。MSの動物実験モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis ; EAE)においては、IL-23およびTh17細胞が、病態形成に重要な役割を果たすことが示されている。最近、EAEの病態形成におけるCCR6の重要性が報告された。CCR6欠損マウスにEAEを誘導したところ、野生型と異なり、発症しなかった。そこで、野生型あるいはCCR6欠損マウスよりミエリン抗原特異的T細胞を取り出し、CCR6欠損マウスにあらかじめ移入してEAEを誘導すると、野生型と異なり、CCR6欠損マウス由来のT細胞では、レシピエントマウスはEAEを発症しなかった(図2)¹¹⁾。このとき、野生型あるいはCCR6欠損マウス由来のT細胞によるIL-17産生量に違いはなく、CCR6欠損マウスにおけるTh17細胞分化には問題がなかった。したがって、末梢で活性化したミエリン抗原特異的Th17細胞が、

中枢神経系に侵入する際に、CCR6の働きが重要であると示唆される。そのメカニズムとして、中枢神経系脈絡叢の上皮細胞には恒常的にCCL20が高発現しており、非炎症状態の中枢神経系への免疫系細胞の侵入に重要である可能性が示された。EAE発症初期にTh17細胞がCCR6-CCL20シグナルを介して中枢神経系に侵入することが提唱されている。また、この結果は、Th17細胞の制御に、ケモカインレセプターシグナルの抑制が有効である可能性を示している。

おわりに

新たに確立されたT細胞分化系列であるTh17細胞は、高い炎症惹起能を有し、種々のヒト慢性炎症性疾患の病態形成に関与していることが示唆されている。Th17細胞が発現するケモカインレセプターは、基礎研究において非常に有用なバイオマーカーとなっているだけでなく、慢性炎症性疾患の診断への利用や、Th17細胞の制御を介する新規治療標的としての可能性も有している。

References

- 1) Sato W, Aranami T, Yamamura T : Cutting edge : Human Th17 cells are identified as bearing CCR2⁺CCR5⁻ phenotype. *J Immunol* 178 : 7525-7529, 2007
- 2) Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J et al : Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8 : 639-646, 2007
- 3) Bettelli E, Carrier Y, Gao W et al : Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441 : 235-238, 2006
- 4) Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L et al : The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 126 : 1121-1133, 2006
- 5) Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C et al : IL-21 and TGF- β are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 454 : 350-352, 2008
- 6) Manel N, Unutmaz D, Littman DR : The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming



growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t. *Nat Immunol* 9 : 641-649, 2008

- 7) Rivino L, Gruarin P, Häringer B et al : CCR6 is expressed on an IL-10-producing, autoreactive memory T cell population with context-dependent regulatory function. *J Exp Med* 207 : 565-577, 2010
- 8) Wilson NJ, Boniface K, Chan JR et al : Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8 : 950-957, 2007
- 9) Duhon T, Geiger R, Jarrossay D et al : Production of

interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 10 : 857-863, 2009

- 10) Krueger GG, Langley RG, Leonardi C et al : A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. *N Engl J Med* 356 : 580-592, 2007
- 11) Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D et al : C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* 10 : 514-523, 2009



基礎 2

炎症と T 細胞サブセット

荒浪利昌 山村 隆

あらなみ としまさ, やまむら たかし: 国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部

● はじめに

ナイーブ T 細胞は、特異的な抗原に遭遇し活性化されると、特徴的なサイトカインを産生する細胞集団へと分化する。永年にわたって信奉された Th1-Th2 モデルでは、T helper type 1 (Th1) 細胞と Th2 細胞という二極に分化した細胞集団によって、免疫現象の多くが説明されてきた。Th1 細胞はインターロイキン (IL)-12 の存在下で誘導されインターフェロン (IFN)- γ を産生する細胞であり、ウイルスなどの細胞内病原体を駆逐する。一方、Th2 細胞は IL-4 の存在下で誘導され、IL-4, IL-5, IL-13 などの Th2 サイトカインの産生を介して、B 細胞増殖、IgE 産生などを誘導し、寄生虫感染の排除において重要な役割を果たす。多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) などの臓器特異的自己免疫疾患では Th1 優位であり、一方、アレルギー疾患は Th2 優位とされてきた。ところが、MS の動物モデルの解析から、IL-17 を産生する T 細胞が病態形成に重要な役割を果たしており、それが Th1 や Th2 細胞とは異なる分化系列に属する細胞であることが証明され、Th17 細胞と名付けられた。本稿では、Th17 細胞を中心に、最近報告された新規 T 細胞サブセットの分化機構および炎症病態における役割を概説する。

● Th17 細胞の炎症における役割

IL-17 は 1993 年に活性化 T 細胞において同定されたサイトカインで、現在 IL-17 A から F まで 6 種類のファミリー分子が同定されている。IL-17 A および F が Th17 細胞から産生され、通常単に IL-17 という場合、IL-17 A を指す。IL-17 の生物学的活性は多岐にわたるが、中心的な作用は好中球の活性化と遊走を促進する作用と、TNF- α や MCP-1 などの炎症性サイトカイン/ケモカイン誘導作用である¹⁾。このような IL-17 に特徴的な、強力な自然免疫系細胞の動員・活性化作用は、慢性炎症において重要であると考えられる。Th17 細胞は IL-17 以外にも特徴的サイトカインとして、IL-21 や IL-22 を産生する。IL-22 は乾癬病態での働きが示唆されている²⁾。

Th17 細胞が疾患を惹起あるいは増悪させる可能性が、MS、関節リウマチ (RA)、炎症性腸疾患 (IBD)、乾癬や、その動物モデルで報告されている。実際、Th17 細胞の維持や増殖に必須である IL-23 の欠損マウスにおいて、MS や RA の動物モデルは発症せず、Th1 細胞の誘導に必須な IL-12 の欠損マウスでは重篤な病気が起こる^{3,4)}。乾癬患者の皮膚では、IL-17 や IL-23 の発現が上昇しており⁵⁾、IL-12 と IL-23 の共通サブユニットに対する中和抗体は、大規模臨床試験において乾癬症状を有意に抑制し

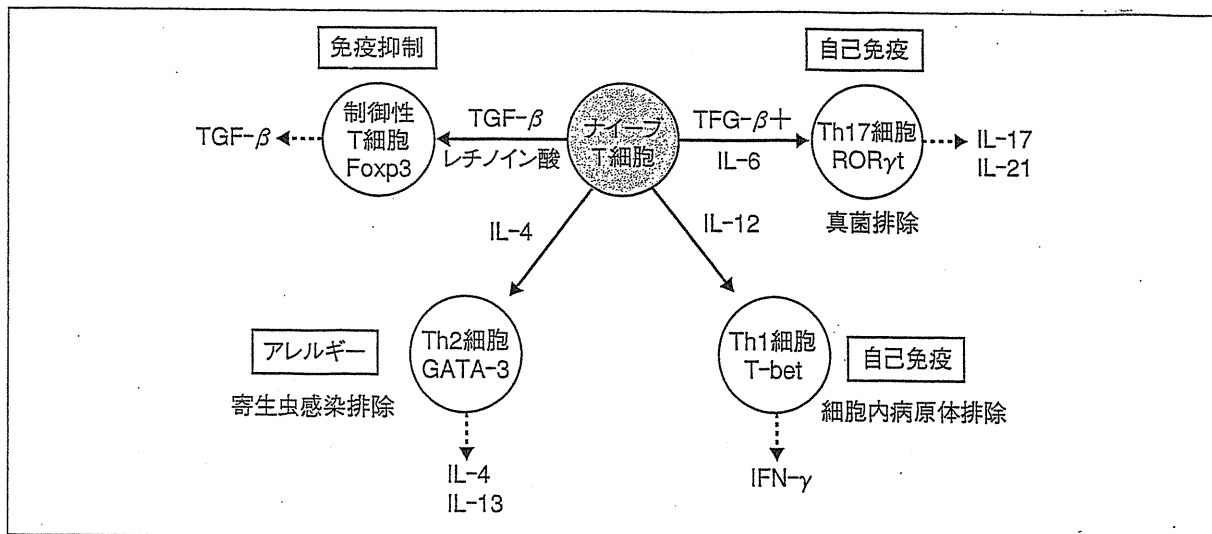


図 1 T 細胞サブセットのまとめ

T 細胞サブセットの誘導に関与する因子および T 細胞サブセットが産生するサイトカイン, 必須の転写因子の関係を図示した。

た⁶⁾。また, IBD 病巣から分離したリンパ球において, Th17 細胞の増加が認められ⁷⁾, 一塩基多型解析から IL-23 受容体の遺伝子変異がクローン病の危険因子であると報告されている⁸⁾。以上の結果から, 自己免疫性あるいは慢性炎症性疾患において, Th17 細胞が病態形成に重要な役割を果たしていることが推測されている。

● Th17 細胞分化制御機構

マウスでは, ナイーブ T 細胞を TGF-β 存在下で刺激すると制御性 T 細胞 (induced T regulatory cells : iTreg とよばれる) へ分化するが, IL-6 と TGF-β 存在下で刺激すると Th17 細胞へ分化する (図 1)⁹⁾。IL-6 の有無によって, Th17 細胞または iTreg への分化誘導が決定づけられることはきわめて重要である。Th1 細胞, Th2 細胞, および iTreg 細胞のそれぞれの分化には, T-bet, GATA-3, Foxp3 という転写因子が必須の役割を果たしていることが証明されていたが, Th17 細胞分化においては RORγt が必須の転写因子であることが判明した¹⁰⁾。このほかにも Th17 細胞分化に影響を与える因子として, ビタミン A 代謝産物であるレチノイン酸 (retinoic acid) は, TGF-β による Foxp3 発現を促進することで, iTreg 細胞への分化を促進し,

Th17 細胞分化を抑制する¹¹⁾。なお, 当初 Th17 細胞分化に重要と考えられた IL-23 は, 分化自体には関与せず, Th17 細胞の維持あるいは増殖に重要であると考えられている。

マウス Th17 細胞の研究にならない, ヒト Th17 細胞の特徴や分化機構に関する解析も盛んに行われている。Acosta-Rodriguez らとわれわれ^{12,13)} は, ヒト Th17 細胞が特異的に発現するケモカイン受容体の存在を明らかにした。なお, *in vitro* での Th17 細胞分化機構に関しては, マウスとヒトでの違いが報告されており, ヒト Th17 細胞研究におけるヒト材料を用いた独自の研究の重要性が示唆される。

● T 細胞サブセットの広がり, Th9 細胞

最近になって, ナイーブ T 細胞を TGF-β と IL-4 存在下で培養すると, IL-9 を産生する T 細胞が誘導されることが発見され, この IL-9 産生細胞を Th9 細胞と命名することが提唱された^{14,15)}。IL-9 は, 制御性 T 細胞と Th2 細胞が産生するサイトカインで, 肥満細胞の分化を促進する作用と, 好酸球を炎症局所へ遊走させる働きが報告されている。当初, この T 細胞サブセットは, 動物モデルの IBD および末梢神経炎を増悪させる可能性が示唆されたが, その後制御性 T 細胞機能の増強を介して中枢神経炎

症を軽減する働きも報告されており、その役割については今後の検討が必要であると考えられる。また、ヒト皮膚から分離されたメモリー T 細胞中に、IL-22 産生能を有し、IL-17 あるいは IFN- γ を産生しない T 細胞サブセットも報告されており、乾癬病態での重要性が注目されている¹⁶⁾。今後も新しい T 細胞サブセットが発見される可能性がある。

● まとめ

自己免疫および慢性炎症性疾患の病態研究では、Th17 細胞解析は最も重要な分野のひとつとなっている。自己免疫疾患の新規治療法の確立には、今後も T 細胞サブセットの分化機構研究が重要であると考えられる。

文献

- 1) Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004 ; 21 : 467-76.
- 2) Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, et al. Interleukin-22, a T (H) 17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007 ; 445 : 648-51.
- 3) Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003 ; 421 : 744-8.
- 4) Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003 ; 198 : 1951-7.
- 5) Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 950-7.
- 6) Krueger GG, Langley RG, Leonardi C, et al. A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. *N Engl J Med* 2007 ; 356 : 580-92.
- 7) Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, et al. Differential regulation of interleukin 17 and interferon $\{\gamma\}$ production in inflammatory bowel disease. *Gut* 2009 ; 58 : 1629-36.
- 8) Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006 ; 314 : 1461-3.
- 9) Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006 ; 441 : 235-8.
- 10) Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+T helper cells. *Cell* 2006 ; 126 : 1121-33.
- 11) Mucida D, Park Y, Kim G, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007 ; 317 : 256-60.
- 12) Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 639-46.
- 13) Sato W, Aranami T, Yamamura T. Cutting edge : Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+ CCR5- phenotype. *J Immunol* 2007 ; 178 : 7525-9.
- 14) Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 2008 ; 9 : 1341-6.
- 15) Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+IL-10+Foxp3 (-) effector T cells. *Nat Immunol* 2008 ; 9 : 1347-55.
- 16) Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, et al. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 2009 ; 10 : 857-63.



総説

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

荒浪利昌** 山村隆**

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

背景

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

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

OPN

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

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

** Toshimasa ARANAMI, M.D., Ph.D. & Takashi YAMAMURA, M.D., Ph.D.: 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部(〒187-8502 小平市小川東町4-1-1); Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, Kodaira 187-8502, JAPAN

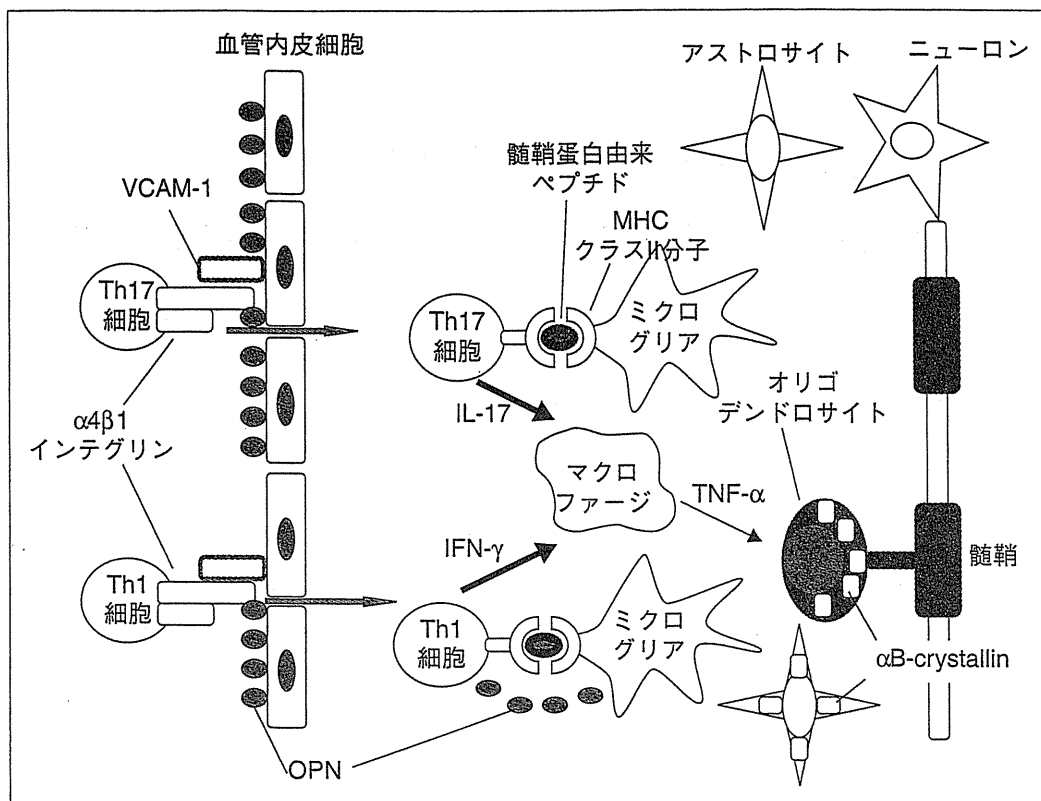


図1 MS病態形成に関する細胞および分子

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

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

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

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

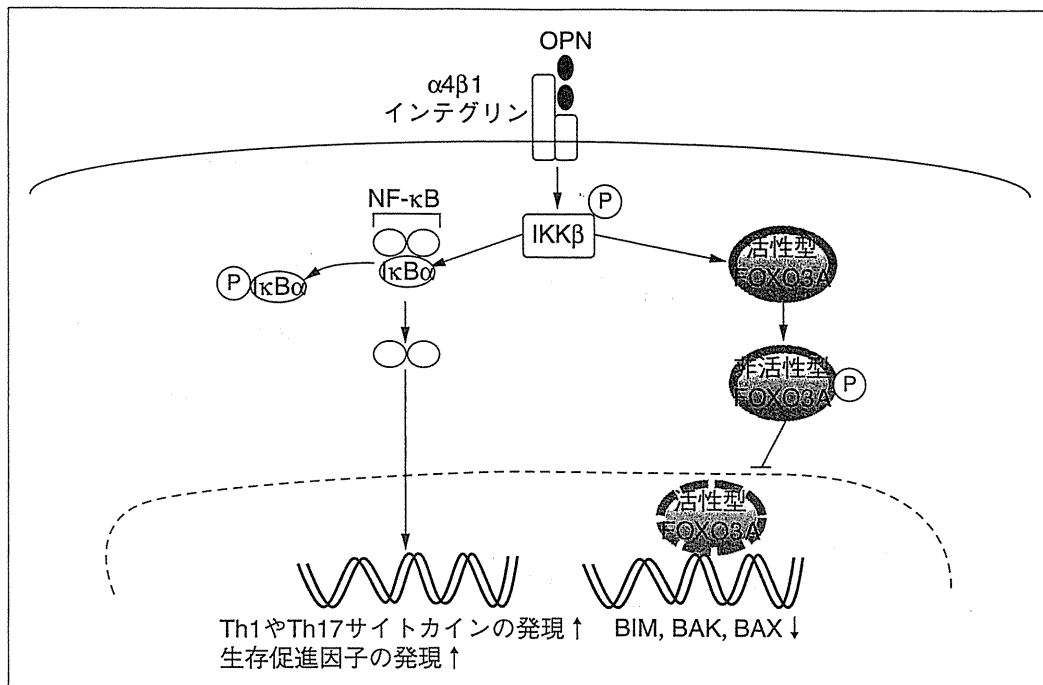


図2 OPNによって誘導される活性化T細胞内シグナル

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

ンパ節よりT細胞を分離し、試験管内で再度免疫原ペプチドで刺激した。その結果、OPN欠損マウス由来のT細胞では増殖反応およびIFN- γ 産生が減弱し、抑制性サイトカインIL-10産生が増強していることがわかった。すなわち、OPNは主としてTh1反応の増強を介して、EAEを増悪させることが判明したのである。その後Shinoharaらは、OPN発現の制御機構を解析し、活性化T細胞においては、OPN発現はT-betによって誘導されることを見出した⁹⁾。T-betはTh1細胞分化に必須の転写因子であることから、自己反応性Th1細胞への分化が起こる際に誘導されるT-betによってOPNが誘導され、Th1反応を増強させるという制御機構が示唆された。

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

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

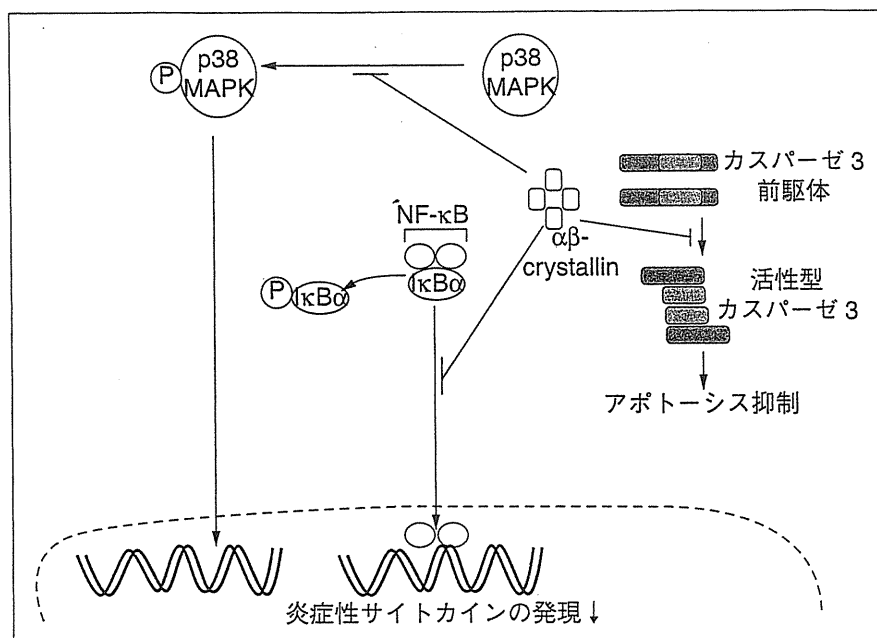


図3 αB-crystallinによって誘導される炎症シグナルの抑制

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

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

αB-crystallin (CRYAB)

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

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

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

結 語

MS病態では、Th17細胞、Th1細胞以外にもB

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

文 献

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

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

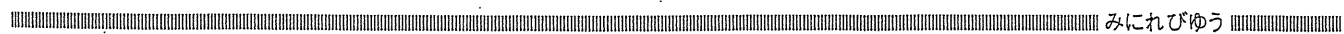
* * *



核内受容体を標的とした Th17 細胞制御と
自己免疫疾患

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)}。したがって病原性T細胞制御の観点から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。このような観点から、我々はMSの新規治療標的の同定を目的として、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患者で最も高い有意差をもって発現亢進を認めた遺伝子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)マウス由来の中枢神経浸潤T細胞でも発現の亢進が認められた。さらにT細胞のNR4A2発現レベルに相関して炎症性サイトカインの産生が変動し、一方NR4A2特異的siRNA処理によりpassive EAEモデルにおけるEAE病態が有意に抑制されたことから、NR4A2が病原性T細胞の機能亢進と病態形成に深く関わる可能性が示された⁴⁾。本稿では、自己免疫病態形成に関わるT細胞の炎症性サイトカイン産生におけるNR4A2の機能について、これまでに我々が明らかにした知見を中心に紹介する。

1. オーファン核内受容体 NR4A2

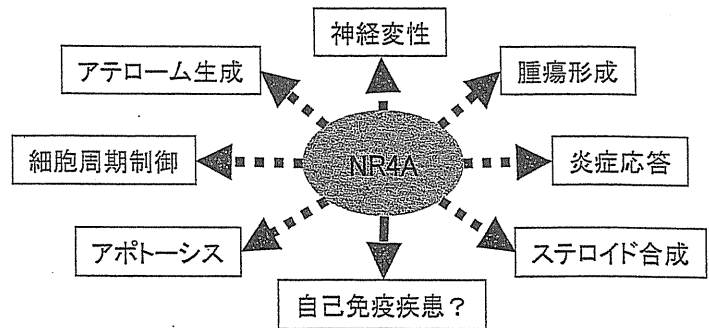
ヒトの核内受容体は48種類の異なる分子からなるファミリーをなしており、エストロゲン受容体、グルココルチコイド受容体や脂溶性ビタミン受容体などを含む^{5,6)}。病原性T細胞を構成するTh17細胞と核内受容体の関わりを考えた時、東の横綱はTh17細胞のマスター制御分子レチノイドオーファン受容体ROR γ /NR1F3⁷⁾で、西の横綱がリガンド依存性にTh17細胞機能抑制能をもつレチノイン酸受容体RAR α /NR1B1⁸⁾といったところであり、Th17細胞と核内受容体との関わりは予想以上に深いことを再認識させられる。さてNR4Aファミリー分子はNR4A1(NGFB-1/Nur77)、NR4A2(Nurr1)、NR4A3(NOR1)の3種からなる⁹⁾。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し、その一部には分子間の機能的オーバーラップが認められる。このなかでNR4A2の発現部位は主に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。免疫学との関連では、T細胞受容体の架橋や炎症性サイトカインなどの刺激により、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、核内受容体分子

間に共通の複数の機能ドメインからなる(図1)。このうち二つの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への結合に関わる。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。リガンドが結合した核内受容体ではAF2ドメインのコンフォメーションが変化し、末端のヘリックス12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。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も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示されている¹⁰⁾。NR4A2のヘリックス12は、リガンド非依存的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分かり、現在では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。

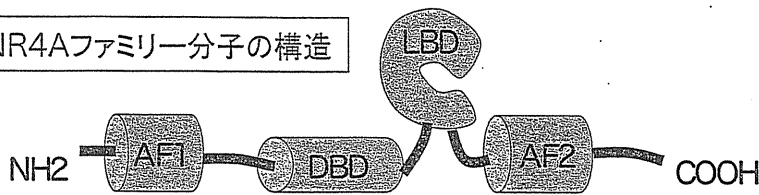
2. NR4A2の誘導因子と標的分子⁹⁾

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、実に様々な因子に応答して急速に発現が誘導される。これらの刺激で活性化されたNF- κ BあるいはCREBがプロモーターの転写活性化領域に結合することで、NR4A2遺伝子が発現されると考えられている。一方、NR4A2タンパク質はリガンド非依存的に認識配列に結合し、下流の遺伝子発現を誘導する(図2)。このようにNR4A2分子の機能制御は、主に誘導因子による転写誘導レベルで行われている。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(NGFL-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種が知られている。NR4A2の標的遺伝子として最も良く解析されている遺伝子の一つがチロシンヒドロキシラーゼ(TH)遺伝子であり、NR4A2依存的なドパミン(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。NR4A2を欠く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

分類名	別名
NR4A1	NGFI-B, Nur77
NR4A2	Nur1, NOT, RNR1
NR4A3	NOR1, MINOR



NR4Aファミリー分子の構造



AF1/2; activation function 1, 2
DBD; DNA binding domain
LBD; ligand binding domain

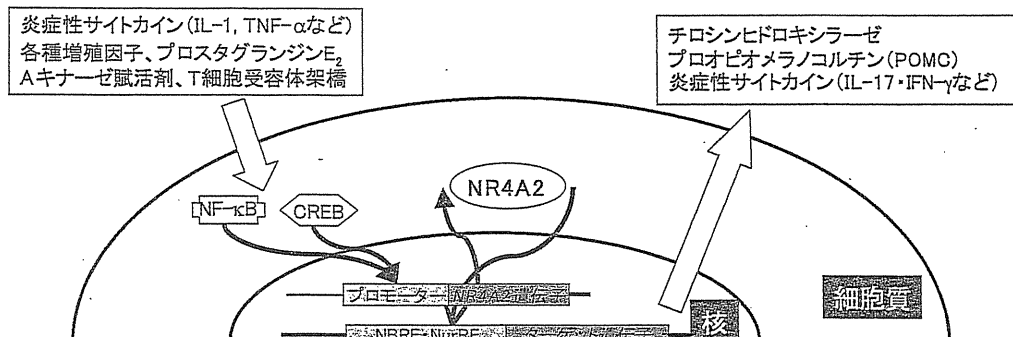


図1 NR4A 核内受容体ファミリー分子

NR4A ファミリー分子は3種の分子からなり、核内受容体分子に共通の構造を有する。生理的なりガンドは不明であるが、さまざまな生体応答に関わる。NR4A2は、プロスタグランジン、増殖因子、炎症性サイトカインやT細胞受容体架橋に応答して発現が誘導され、これは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、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。

れ¹⁰⁾、さらに家族性パーキンソン病の一部にNR4A2の遺伝子異常が見いだされたことから¹⁰⁾、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複数の標的遺伝子が報告されており、NR4A2は中枢神経機能制御のみならず、さまざまな領域に深く関わる可能性が示されている。

3. T細胞機能とNR4Aファミリー分子

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、および胸腺での「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¹³⁻¹⁶⁾。TCR刺激によるカルシウム流入に伴って活性化したMEF2は、NR4A1発現を介してT細胞アポトーシスを引き起こす。一方で、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。つまりMEF2と結合した転写抑制因子Cabin1は、MEF2とp300の結合を阻害するとともに、mSin3との結合を介してHDAC1/2をリクルートすることにより、MEF2によるNR4A1の誘導経路を遮断してアポトーシスを抑制と考えられている(挿絵参照)¹⁷⁾。一方、NR4A1欠損マウスの胸腺および末梢のT細胞アポトーシスには大きな異常はなく、胸腺などで共発現するNR4A2などの他の分子がNR4A1欠損

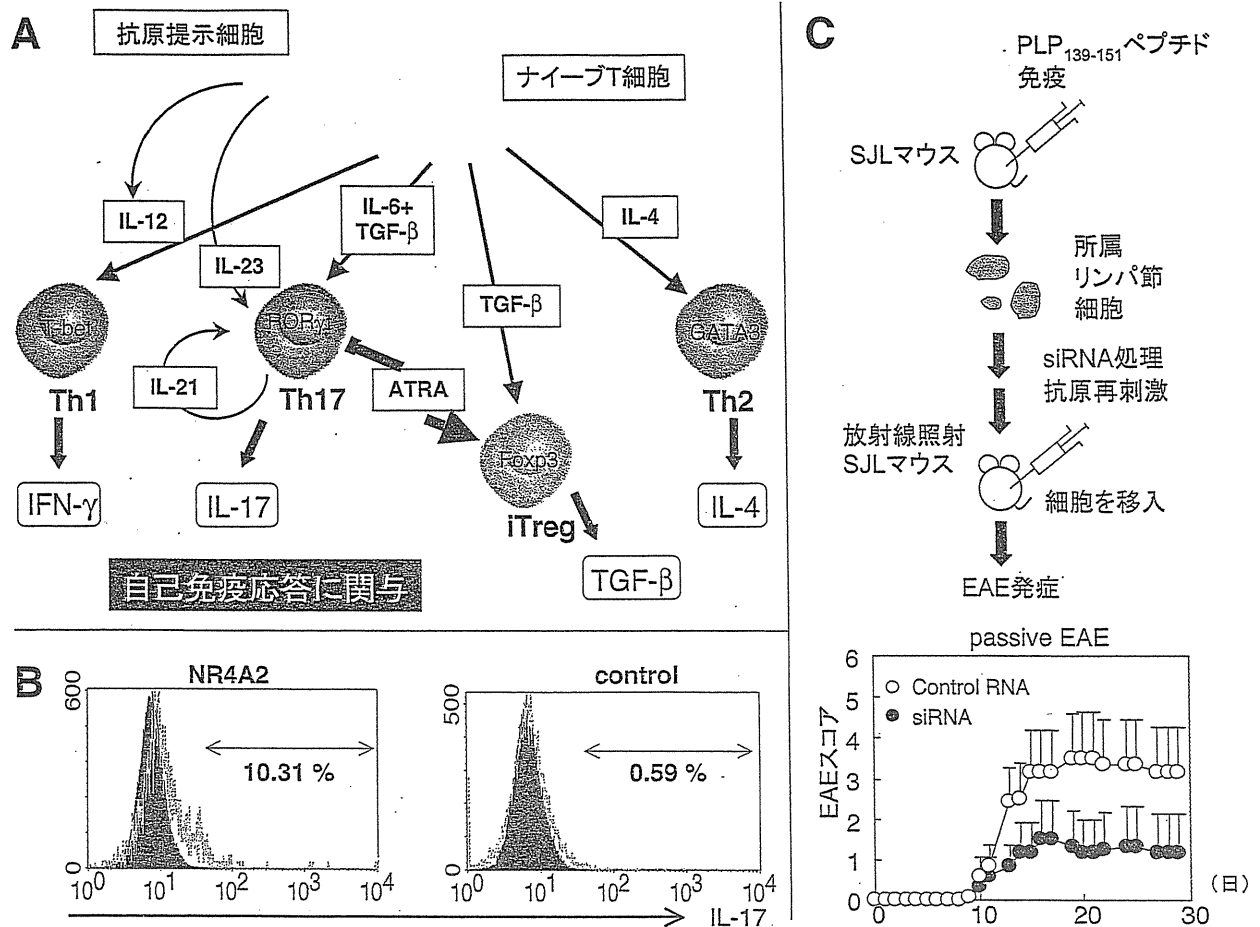


図2 自己免疫応答と Th17 細胞機能に対する NR4A2 の役割

(A) 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環境依存性にそれぞれ機能的に異なる T 細胞 (Th1/Th2/Th17/iTreg) へと分化する。自己免疫の観点からは、Th1 細胞と Th17 細胞の双方が自己免疫病態に関与と考えられており、双方の細胞機能を制御することが重要な課題である。

(B) NR4A2 遺伝子を IRES-GFP の上流に組み込んだレトロウイルスとコントロールウイルスを、それぞれマウス脾臓 CD4 陽性 T 細胞に感染させ、GFP 陽性細胞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。NR4A2 発現細胞 (GFP 陽性細胞) では、対照に比べて IL-17 の産生が増強している (0.59% vs 10.31%)。

(C) PLP₁₃₉₋₁₅₁ ペプチドを免疫した SJL マウスの所属リンパ節細胞に、NR4A2 特異的 siRNA あるいはコントロール RNA を遺伝子導入した。抗原ペプチド存在下で 3 日間培養して再刺激した細胞を、放射線照射した SJL マウスに移入し、EAE を誘導した。NR4A2 特異的 siRNA 処理群の EAE スコアは、コントロール群に比べて病態の軽症化が認められた。

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ものと予想される。一方、NR4A2 欠損マウスでは、中脳の下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 欠損マウスの表現型は NR4A1 や NR4A3 では補完できないことから、NR4A2 独自のユニークな機能の存在を強く示唆している。NR4A2 欠損マウスは、生後の長期維持が不可能なため、免疫系を含む成体の機能異常の解析は難しく、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。

4. 自己免疫疾患における NR4A2 の役割

MS などの自己免疫疾患では、炎症性 T 細胞が脳炎惹起に重要な役割を果たす。エフェクター CD4 陽性 T 細胞は、複数の機能的に異なる細胞群に分類されるが、以前より知られていた Th1 細胞、Th2 細胞に加えて、Th17 細胞¹⁸⁾ と制御性 T 細胞¹⁹⁾ の発見を契機に、より複雑さを増している (図 2)。MS の病態形成初期には、Th1 細胞や Th17 細胞に代表される自己反応性 T 細胞が決定的な役割を果たすと