

(文献17より改変)

考えられており、このような病原性T細胞の遺伝子発現解析は、新規治療標的の探索に有効な手段である。我々は、DNAマイクロアレイを用いたMS患者末梢血T細胞の網羅的遺伝子発現解析を通じて、MS由来T細胞で発現が変動している遺伝子群を解析し、NR4A2を含む興味深い遺伝子群を同定した³⁾。エフェクターT細胞におけるNR4A2の機能をより詳細に探るため、以後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）におけるNR4A2の挙動を追うこととした⁴⁾。

EAEは、中枢神経系に発現するミエリン・オリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG）やプロテオリピッドタンパク質（PLP）、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）などに由来する脳炎惹起性ペプチドをマウスに免疫することで発症が誘導できる。MOG₃₅₋₅₅ペプチドを免疫することによりEAEを発症したC57BL/6マウスからT細胞を分離し、NR4A2の発現レベルを定量PCR法により比較したところ、中枢神経系浸潤T細胞および末梢血T細胞で、選択的なNR4A2の発現亢進が検出された。中枢神経系浸潤T細胞のなかの約3割がIL-17産生細胞であったことから、NR4A2とIL-17産生との間に何らかの関連がある可能性を予想してさらに検討を加えた。まずNR4A2の発現亢進が、T細胞の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遺伝子プロモーターを含むレポーター遺伝子をマウスT細胞株であるEL4細胞に導入してルシフェラーゼアッセイを試みたところ、NR4Aの共発現によりルシフェラーゼ活性が有意に増強した。さらにレトロウ

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産生が選択的に亢進した（図2）。次にあらたに設計したNR4A2特異的siRNAを用いて、ヒトT細胞の炎症性サイトカイン産生に与える影響を検討した。健康人由来末梢血CD4陽性T細胞をsiRNA処理した後抗CD3抗体で活性化して炎症性サイトカイン産生を調べた結果、NR4A2特異的siRNA処理したT細胞におけるIL-17産生は有意に抑制された。本siRNAは、MS患者由来末梢血CD4陽性T細胞の炎症性サイトカイン産生に対しても抑制的に作用することが明らかとなった。一連の結果から、T細胞におけるNR4A2発現量と炎症性サイトカインの産生に正の相関があることが示された。本siRNAの配列は、ヒト・マウス間で完全に保存されていたことから、EAEマウスにおける病原性T細胞の機能に対するsiRNAの効果を検討した。PLP₁₃₉₋₁₅₁ペプチドをSJLマウスに免疫して得られた抗原特異的T細胞を、放射線照射によりT細胞を除去したSJLマウスに移入するpassive EAEモデルにおいて、*in vitro*で抗原刺激したT細胞をNR4A2特異的siRNAで処理すると、移入後のEAEは有意に軽症化した（図2C）。これらの結果は、NR4A2が病原性に深く関わるTh17細胞機能と関連していることを示しており、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のではないかと考えている。

5. 自己免疫疾患治療標的としての核内受容体

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。一連の結果は、NR4A2がMS治療標的候補であることを示しているが、有効なリガンド化合物の創製なしには、さらなる臨床応用研究への展開は難しい。PPARなどの核内受容体においては、代謝制御因子としての生理機能が次々と明らかとなったことを皮切りに、高脂血症改善作用を有するフィブラート系PPAR- α 作動薬や、糖尿病治療作用を有するチアゾリジン系PPAR- γ 作動薬などの臨床応用が実現しており、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。免疫系、特にTh17細胞の制御に限ってみても、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に自己免疫応答を抑制することなどが明らかとなっており^{8,20}、新規自己免疫疾患治療法としての合成RARアゴニストも注目を集めている。病原性T細胞と炎症性サイトカインの制御法の確立は、MSに限らず幅広い自己免疫疾患への展開が期待できるため、今後、NR4A2を標的とした治療戦略の実現に向けて研究を進めていく予定である。

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発見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役割を中心に紹介した。本文でも述べたように、Th17細胞には様々な核内受容体の関与が示されているが、これは他のエフェクターT細胞との際だった違いであり、複数の核内受容体が複雑に関わり合いながらTh17細胞を制御していると思われる。特にTh17細胞機能に対するNR4A2の作用は全くといっていいほど分かっておらず、その分子機構を明らかにすることが急務であると思われる。

- 1) Aranami, T. & Yamamura, T. (2008) *Allergol. Int.*, 57, 115-120.
- 2) McFarland, H.F. & Martin, R. (2007) *Nat. Immunol.*, 8, 913-919.
- 3) Satoh, J., Nakanishi, M., Koike, F., Miyake, S., Yamamoto, T., Kawai, M., Kikuchi, S., Nomura, K., Yokoyama, K., Ota, K., Kanda, T., Fukazawa, T., & Yamamura, T. (2005) *Neurobiol. Dis.*, 18, 537-550.
- 4) Doi, Y., Oki, S., Ozawa, T., Hohjoh, H., Miyake, S., & Yama-

- mura, T. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 105, 8381-8386. Epub 2008 Jun 8311.
- 5) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. (1999) *Cell*, 97, 161-163.
- 6) Robinson-Rechavi, M., Escriva Garcia, H., & Laudet, V. (2003) *J. Cell Sci.*, 116, 585-586.
- 7) Ivanov, II, McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D.J., & Littman, D.R. (2006) *Cell*, 126, 1121-1133.
- 8) Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., & Cheroutre, H. (2007) *Science*, 317, 256-260. Epub 2007 Jun 2014.
- 9) Maxwell, M.A. & Muscat, G.E. (2006) *Nucl. Recept. Signal.*, 4, e002. Epub 2006 Feb 2008.
- 10) Wang, Z., Benoit, G., Liu, J., Prasad, S., Aarnisalo, P., Liu, X., Xu, H., Walker, N.P., & Perlmann, T. (2003) *Nature*, 423, 555-560.
- 11) Zetterstrom, R.H., Solomin, L., Jansson, L., Hoffer, B.J., Olson, L., & Perlmann, T. (1997) *Science*, 276, 248-250.
- 12) Le, W.D., Xu, P., Jankovic, J., Jiang, H., Appel, S.H., Smith, R.G., & Vassilatis, D.K. (2003) *Nat. Genet.*, 33, 85-89. Epub 2002 Dec 2023.
- 13) Calnan, B.J., Szychowski, S., Chan, F.K., Cado, D., & Winoto, A. (1995) *Immunity*, 3, 273-282.
- 14) Cheng, L.E., Chan, F.K., Cado, D., & Winoto, A. (1997) *Embo J.*, 16, 1865-1875.
- 15) Liu, Z.G., Smith, S.W., McLaughlin, K.A., Schwartz, L.M., & Osborne, B.A. (1994) *Nature*, 367, 281-284.
- 16) Woronicz, J.D., Calnan, B., Ngo, V., & Winoto, A. (1994) *Nature*, 367, 277-281.
- 17) Youn, H.D. & Liu, J.O. (2000) *Immunity*, 13, 85-94.
- 18) Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K. (2009) *Annu. Rev. Immunol.*, 8, 8.
- 19) Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008) *Cell*, 133, 775-787.
- 20) Klemann, C., Raveney, B.J.E., Klemann, A.K., Ozawa, T., von Hörsten, S., Shudo, K., Oki, S., & Yamamura, T. (2009) *Am. J. Pathol.*, 174, 2234.

大木 伸司

((独)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所
免疫研究部)

Manipulation of Th17-mediated autoimmunity by targeting nuclear receptors
Shinji Oki (Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan)

多発性硬化症の病態解析から 新規治療法の開発へ

大木伸司

Shinji OKI

(独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部

はじめに

多発性硬化症(multiple sclerosis ; MS)は、中枢神経系の脱髄を主因とする炎症性自己免疫疾患であり、エフェクターT細胞の自己応答性獲得による軸索の組織障害と、これに伴う電導障害が病態に深く関わっている。^{1,2)} よって免疫制御破綻の観点から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と期待される。現在用いられているMS治療薬には、インターフェロン・ベータ(IFN- β)、抗炎症性ステロイドや免疫抑制剤などがあり、いずれもある程度の効果は得られているものの対症療法的な色合いも濃く、その作用機序の多くは不明なままである。

一方、我が国において治験の途上にある薬剤として、ペプチド製剤コパキソン(glatiramer acetate)、抗VLA-4抗体製剤タイサブリ、スフィンゴシン1リン酸受容体作動薬FTY 720(fingolimod)などがある。コパキソンは4種のアミノ酸からなるランダムコポリマー*で、いわゆる改変ペプチド抗原(altered peptide ligand ; APL)のように、抗原特異的なT細胞応答の修飾効果を狙っている。また、タイサブリは病原性リンパ球と血管内皮細胞とのVLA-4を介した接着を抑えることで、FTY 720は二次リンパ組織からの病原性リンパ球の流出を抑えることで、中枢神経系への炎症細胞浸潤を抑制する効果が期待されている。これらの薬剤は、近年の基礎免疫学の進歩により得られた、科学的な根拠に基づく次世代のMS治療薬候補といえる。このように、病原性リ

ンパ球の機能制御を標的とした新規MS治療法の探索は有望な研究対象であり、本稿では私たちが進めてきた代表的な試みを、以下に紹介する。

2 エフェクターT細胞の分化と自己免疫疾患

自己抗原反応性を獲得した炎症性エフェクターT細胞が中枢神経系に浸潤し、これを障害することでMS病態が形成される。これまで、ナイーブT細胞から抗原依存性に分化したエフェクターT細胞には、主にIFN- γ を産生するTh1細胞とIL-4を産生するTh2細胞があり、Th1細胞は自己免疫病態に促進的に作用する一方、Th2細胞は病態抑制に関わると言われてきた。ところが近年の研究の進展により、炎症性サイトカインであるIL-17を産生するTh17細胞と、各エフェクターT細胞の機能を抑制する制御性T細胞が発見され、^{3,4)} 実はTh17細胞がTh1細胞をしのぐ強力な病原性T細胞であることが明らかとなった(図1)。よって最近では、このTh17細胞の機能制御が有効な自己免疫疾患制御法につながると期待されており、大いに注目を集めている。以下に紹介する私たちの研究は、具体的な方法こそ違いますが、いずれもこのような発想に基づいて展開されている。

1. iNKT細胞を標的としたMS治療戦略

iNKT(invariant natural killer T)細胞は、NK細胞とT細胞の表現型を共有する極めてユニークな細胞であり、活性化するとIFN- γ やIL-4などのサイトカインを短時間に大量に産生するため、体内の免疫応答バランスの調節細胞と考えられている。⁵⁾ また、多様性に富むT細胞受容体(TCR)を発現する通常のT細胞と異なり、iNKT細胞のTCRは

* ランダムコポリマーについての用語解説は、781頁参照。

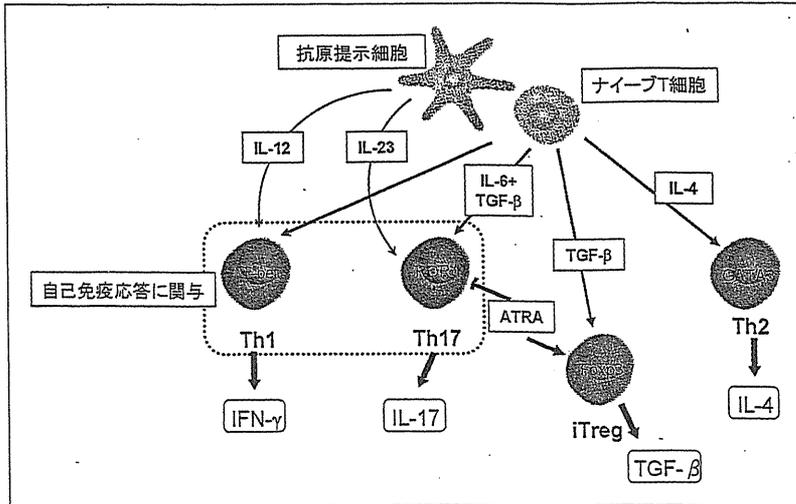


図1 ヘルパーT細胞の分化と機能

自己免疫応答の観点からは、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。

1つの α 鎖が2~3種類の β 鎖と複合体を形成し、MHC類縁分子であるCD1d上に提示された特定の糖脂質を抗原として認識する。強力な外来性の糖脂質抗原としては α -ガラクトシルセラミド(α -GalCer)があるが、私たちは α -GalCerのスフィンゴシン鎖を短縮した改変糖脂質抗原OCHが、IFN- γ 産生を誘導することなくIL-4を産生させることで、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)やコラーゲン誘導性関節炎(CIA)などのマウス自己免疫疾患モデルに対して病態抑制効果を発揮することを見いだした。^{6,7)} さらに、 α -GalCerがIFN- γ とIL-4の産生をともに誘導する一方で、OCHが選択的にIL-4産生を誘導する分子機序に興味を持ち、そのメカニズムの解明を試みた。

実験を始めてまず分かったことは、 α -GalCerから徐々にスフィンゴシン鎖を短縮していくと、CD1d分子からの解離がより速やかになるということであった。そしてスフィンゴシン鎖が短くなると、iNKT細胞からのIL-4産生はあまり変わらないが、IFN- γ 産生が著しく減少した。また、iNKT細胞からのIFN- γ 産生はNF- κ Bファミリー分子c-Relの発現に依存しており、c-Rel発現にはより持続的な刺激が必要であることから、OCHはこれらの理由によりIL-4を選択的に誘導するものと結論付けた。⁸⁾ さらに、 α -GalCer刺激後のiNKT細胞

に発現したCD40Lを介して活性化した樹状細胞が産生するIL-12は、NK細胞などの周辺細胞からの二次的なIFN- γ 産生を誘導するのに対し、OCHはNKT細胞のCD40L発現を誘導しなかった。

一方、CpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN)などのTLRリガンドの存在下では、樹状細胞のIL-12産生とNK細胞のIFN- γ 産生が底上げされ、OCHによる選択的IL-4産生誘導効果は消失したことから、OCHの作用は生体の感染や炎症の状態に応じて変動することが示された(図2)。⁹⁾ CD1d分子には多型がなく、iNKT細胞を標的とした糖脂質療法は臨床応用上大きな利点を有しているが、その一方で望ましいサイトカイン産生のみを誘導すべく、生体の自然免疫応答状態を正確に把握することが重要と考えられた。引き続き進められた一連の研究により、現在当センターでMSを対象としたOCHの治療が開始されるに至っている。

2. レチノイン酸受容体を標的とした治療戦略

前述のとおり、近年Th17細胞機能制御を介した新規MS治療法の開発に期待が寄せられているが、最近ビタミンAの活性代謝産物であるall-transレチノイン酸(ATRA)が、Th17細胞分化を強力に抑制することが示された。¹⁰⁾ しかしATRAには極めて多様な生理機能があるうえ、脂肪組織などに容易に蓄積し血中濃度が速やかに低下することや、受

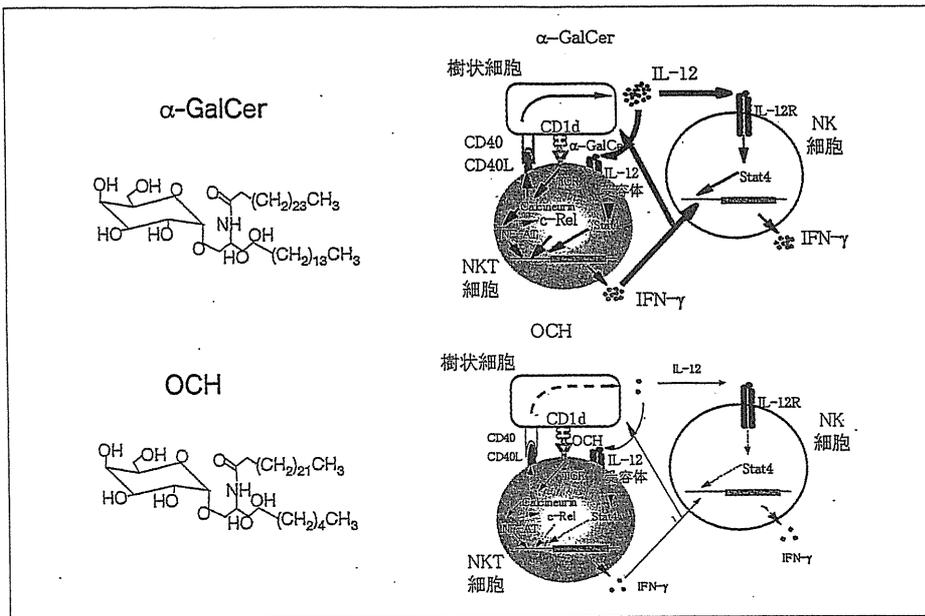


図2 NKT細胞に対する α GalCerとOCHの作用機序と選択的なサイトカイン産生
 α -GalCerとOCHの作用の違いは、NKT細胞に対する直接作用にとどまらず、周辺細胞を介した二次的な細胞応答にまで及ぶと考えられる。

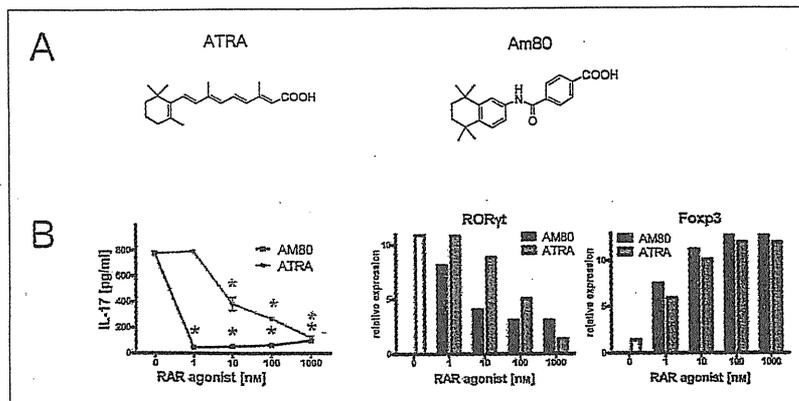


図3 Th17細胞依存性自己免疫応答に対するレチノイドの効果

A；レチノイン酸(ATRA)及びAm80の構造。B；ATRAあるいはAm80存在下にTh17細胞分化を誘導すると、Th17細胞マーカーROR γ tの発現とIL-17産生が顕著に抑制され、制御性T細胞マーカーFoxp3が相対的に増加する。Am80の作用は、相対的にATRAより強い。

容体選択性を欠くことによる副作用の可能性が、ATRAの臨床応用の拡大を阻んでいる。EAEの抑制に、比較的大量のATRAを腹腔内投与しないと効果が得られないことも分かっていた。

私たちは、比活性と受容体選択性に優れた合成レチノイドの中から、急性前骨髄球性白血病(APL)治療薬として我が国で承認されている合成レチノイドAm80(タミパロテン)が、ATRAをしのぐTh17細胞制御効果を有することを見いだした。¹¹⁾ マウス

脾臓由来ナイーブT細胞をTh17細胞分化条件下(IL-6+TGF- β)で抗CD3抗体刺激すると、数日以内に高いIL-17産生が誘導できる。ここにAm80あるいはATRAを添加すると、Th17細胞マーカー遺伝子であるROR γ t発現とIL-17産生が濃度依存的に抑制され、制御性T細胞マーカーであるFoxp3の発現が誘導された。Am80は、いずれの指標においてもATRAより強い効果を示した(図3)。EAEマウスにAm80を隔日経口投与する

と、発症前後の投与開始のいずれでも発症が有意に抑制された。このとき、自己抗原特異的な IL-17 産生が有意に抑制され、中枢神経系への Th 17 細胞の浸潤も低下していたことから、MS 治療薬候補としての期待が高まっている。¹²⁾

ところが、Am 80 を連投した EAE マウスでは、徐々に病態抑制効果が減弱する傾向が認められたため、その原因を探ることにした。予想に反して、Am 80 の連投により病態抑制効果が減弱した EAE マウスでも IL-17 産生は依然として抑制されており、病態抑制効果の消失は IL-17 産生抑制の解除によるものではなかった。実は Am 80 の長期投与により、免疫抑制性サイトカインである IL-10 の産生が有意に低下していた。IL-10 は、EAE 病態の回復期に働く重要な制御性サイトカインであることから、IL-10 の産生低下が病態抑制解除の原因である可能性が考えられ、Am-80 は IL-17 の関与が大きい急性期の病態への適用が望ましいと思われた。合成レチノイド Am 80 は、副作用のリスクだけでなく医薬品としての体内動態も ATRA より優れており、APL の治療薬として使用されていることから、適用拡大による有望な新規 MS 治療薬候補であると思われた。

3. オーフアン核内受容体 NR 4 A 2 の機能解析へ

以前に私たちが、DNA マイクロアレイを用いた MS 患者末梢血 T 細胞の網羅的遺伝子発現解析¹³⁾により同定したオーフアン核内受容体 NR 4 A 2 は、Nurr1 としても知られる核内受容体分子の 1

つであり、NGFB-I/Nur77 (= NR 4 A 1), NOR1 (= NR 4 A 3) とともに NR 4 A ファミリーに属する。¹⁴⁾ NR 4 A ファミリー分子は様々な生体応答に関わり、免疫系においては、T 細胞で一過性に発現誘導される即時型遺伝子 (immediate early gene ; IEGs) として知られる以外、その機能の詳細は不明であった。NR 4 A ファミリー分子はオーフアン受容体であり、リガンド非依存的に転写活性化能を有するため、その機能は主に転写レベルで制御されると考えられる。さらに、NR 4 A 2 欠損マウスでは NR 4 A 1 や NR 4 A 3 と異なり、中脳のドーパミン産生ニューロンの形成不全により胎児は生後すぐに死亡することからも、機能の独自性が強くうかがわれる。EAE マウスの T 細胞でも NR 4 A 2 の発現が亢進することが分かったため、このモデルを用いて病態との関連を解析することにした。

EAE マウスの中枢神経系には IL-17 産生性の炎症性 T 細胞が多数浸潤することから、T 細胞の NR 4 A 2 発現と IL-17 産生との相関を検討した。レポーター解析や遺伝子導入実験から、NR 4 A 2 が発現すると IL-17 遺伝子の転写及び IL-17 産生が有意に亢進することが分かった。一方、RNA 干渉法により NR 4 A 2 発現を抑制すると、IL-17 産生は有意に抑制された。さらに、SJL マウスにプロテオリピッドプロテイン (PLP) 由来ペプチドを免疫して誘導した自己反応性 T 細胞を、siRNA 処理してからペプチドで再刺激し、ナイーブマウスに移入して

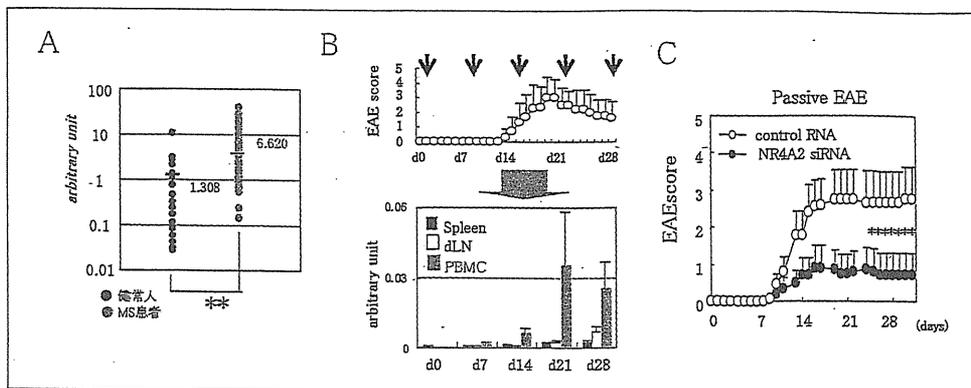


図4 Th 17 細胞依存性自己免疫応答における NR 4 A 2 の機能

A: MS 患者末梢血 T 細胞では、有意な NR 4 A 2 発現の亢進を認める (定量 PCR 法)。B: EAE マウスの末梢血 T 細胞でも、病態に相関した NR 4 A 2 の発現上昇が認められる。C: PLP ペプチド免疫 10 日後の SJL マウスより分離した所属リンパ節細胞に、NR 4 A 2 特異的 siRNA あるいはコントロール RNA を遺伝子導入した後、PLP ペプチドで再刺激して得られた細胞を、放射線照射したナイーブ SJL マウスに移入して EAE を誘導した。

EAEを発症させる(passive EAEモデル)と、対照T細胞に比べてT細胞の病原性が有意に低下した(図4)¹⁵⁾ NR4A2の発現制御あるいは機能制御によりMS病態が制御できる可能性が示された。

RNA干渉法を用いた核酸医薬の臨床応用には多くの課題があり、現行の治験も局所投与にとどまっているが、今回用いたsiRNAの配列はヒト・マウス間で完全に保存されており、両種のT細胞にも効果があったことから、siRNAの臨床応用につながる技術基盤の底上げを期待したい。

NR4A2のリガンド結合領域は不活性化されていると予想されるが、実は抗がん剤として用いられている6-メルカプトプリンにはNR4A2の転写活性増強能が報告されていることなどからも、活性を制御する小分子化合物を探索していく価値は十分にある。興味深いことに、NR4A2はT細胞における抗原刺激や種々の生体因子による刺激をのみならず、ストレス負荷や運動に伴う物理刺激などでも誘導される。心的ストレスや過剰な運動とこれに伴う過労は典型的なMSの増悪因子であり、本来無関係な刺激がT細胞のNR4A2発現を誘導し、結果的に自己免疫疾患の引き金となる可能性があるのではないだろうか。今後の研究を通じて、このような神経と免疫の関わりが明らかとなれば興味深い。

3 おわりに

私たちは、主に病原性T細胞の機能制御を標的とした新規MS治療戦略の探索を対象に研究を進めているが、これには3つの理由がある。第一に、自己免疫病であるMSの根治療法の確立には、主病因である病原性T細胞の機能制御を標的とするのが本筋だと考えるからである。あるいは、そのようなアプローチが根治療法への唯一の道ではないかとい

う気さえている。第二に、免疫学が現在のように急速に発展し、結果として様々な抗体医薬が続々と臨床応用されていく中で、免疫担当細胞そのものを標的とした治療法を臨床応用の組上にのせたいという強い思いがある。このような観点から、タイサブリやFTY720にも大きく期待をしている。

そして第三の理由としては、このようなアプローチによって確立されるMSの治療法は、恐らく免疫応答の制御の破綻が背景に潜む他の複数の自己免疫疾患に(少なくとも部分的には)適用できるのではないかと期待するからである。自己免疫疾患の多くは比較的新な難病であり、個別の疾患を対象とした治療法開発は、人的あるいは資金的な制約から簡単には進まない現状があることから、共通する病因を探りあてることに極めて大きなメリットがある。もちろん個別の疾患には特有の病因があり、あらゆる自己免疫疾患に普遍的に適用できる方法は望めないが、できる限り幅広い適用範囲を持つ画期的な治療法を目指して、研究を進めていきたいと考えている。

文 献

- 1) Aranami T., Yamamura T., *Allergol. Int.*, 57, 115-120 (2008).
- 2) McFarland H. F., Martin R., *Nat. Immunol.*, 8, 913-919 (2007).
- 3) Korn T. et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 8, 8 (2009).
- 4) Sakaguchi S. et al., *Cell*, 133, 775-787 (2008).
- 5) Kronenberg M., *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 877-900 (2005).
- 6) Chiba A. et al., *Arthritis Rheum.*, 50, 305-313 (2004).
- 7) Miyamoto K. et al., *Nature*, 413, 531-534 (2001).
- 8) Oki S. et al., *J. Clin. Invest.*, 113, 1631-1640 (2004).
- 9) Oki S. et al., *Int. Immunol.*, 17, 1619-1629 (2005).
- 10) Mucida D. et al., *Science*, 317, 256-260 (2007).
- 11) Klemann C. et al., *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 32, 20-28 (2009).
- 12) Klemann C. et al., *Am. J. Pathol.*, 174, 2234 (2009).
- 13) Satoh J. et al., *Neurobiol. Dis.*, 18, 537-550 (2005).
- 14) Maxwell M. A., Muscat G. E., *Nucl. Recept. Signal*, 4, e 002 (2006).
- 15) Doi Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105, 8381-8386 (2008).

総 説

特集：ヒト免疫疾患研究の新展開—From clinic to bench

多発性硬化症病変分子のネットワーク解析

佐藤 準一

Molecular Network Analysis of Multiple Sclerosis Brain Lesion Proteome

Jun-ichi SATOH

Department of Bioinformatics, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan

(Received April 4, 2010)

summary

A recent proteomics study of multiple sclerosis (MS) brain lesion-specific proteome profiling clearly revealed a pivotal role of coagulation cascade proteins in chronic active demyelination (Han MH et al. *Nature* 451 : 1076-1081, 2008). However, among thousands of proteins identified, nearly all of remaining proteins were left behind to be characterized in terms of their implications in MS brain lesion development. By the systems biology approach using four different pathway analysis tools of bioinformatics, we studied molecular networks and pathways of the proteome dataset of acute plaque (AP), chronic active plaque (CAP), and chronic plaque (CP). The database search on KEGG and PANTHER indicated the relevance of extracellular matrix (ECM)-mediated focal adhesion and integrin signaling to CAP and CP proteome. IPA identified the network constructed with a wide range of ECM components as one of the networks highly relevant to CAP proteome. KeyMolnet disclosed a central role of the complex interaction among diverse cytokine signaling pathways in brain lesion development at all disease stages, as well as a role of integrin signaling in CAP and CP. Although four distinct platforms produced diverse results, they commonly suggested a role of ECM and integrin signaling in development of chronic lesions of MS. These observations indicate that the selective blockade of the interaction between ECM and integrins would be a rational approach for designing inhibitors of chronic inflammatory demyelination in MS brain lesions.

Key words—KeyMolnet; molecular network; multiple sclerosis; proteome; systems biology

抄 録

多発性硬化症 (multiple sclerosis ; MS) は、中枢神経系白質に炎症性脱髄巣が多発し、様々な神経症状が再発を繰り返す難病である。MS では、自己反応性 Th1 細胞や Th17 細胞が血液脳関門を通過して脳や脊髄に浸潤し、マクローファージやミクログリアを活性化して、脱髄を惹起する。炎症が遷延化すると軸索傷害を来して不可逆的機能障害が残存する。現在まで、髄鞘や軸索の再生に有効な治療薬は開発されていない。最近、MS 脳病巣の網羅的プロテオーム解析データが報告された (Han MH et al. *Nature* 451 : 1076-1081, 2008)。Han らはステージを確認した病巣から laser microdissection で分離したサンプルを質量分析で解析して、4324 種類のタンパク質を同定した。彼らは慢性活動性脱髄巣 (chronic active plaque ; CAP) における血液凝固系の亢進を見出し、抗凝固薬を用いて MS 動物モデル自己免疫性脳脊髄炎の治療に成功した。しかしながら、凝固系以外の多くのタンパク質に関しては、MS 脳分子病態における意義は明らかではない。われわれは、Han らのデータセットを分子ネットワーク解析ツール KEGG, PANTHER, IPA, KeyMolnet を用いて再解析し、MS 脳病巣プロテオームの主要分子ネットワークを調べた。その結果、CAP における extracellular matrix (ECM)-integrin ネットワークの中心的役割を発見した。すなわちシステム生物学の観点からは、ECM-integrin シグナル伝達系は、MS における炎症性脱髄遷延化抑制のための創薬標的のパスウェイとなる可能性がある。

1. はじめに

多発性硬化症 (multiple sclerosis ; MS) は、中枢

神経系白質に炎症性脱髄巣が多発し、様々な神経症状が再発を繰り返して進行する難病である。MS では、遺伝的要因と環境因子の複雑な相互作用を背景に出現した活性化自己反応性 Th1 細胞や Th17 細胞が、血液脳関門 (blood-brain barrier ; BBB) を

通過して脳や脊髄に浸潤し、マクロファージやミクログリアを活性化して、TNF α などの proinflammatory mediator の産生を誘導し、脱髄を惹起すると考えられている¹⁾。回復期には髄鞘再生を認めるが、炎症が遷延化すると軸索傷害を来して不可逆的機能障害が残存する。MS では、急性増悪期に intravenous methylprednisolone pulse (IVMP) を行い、寛解期に IFN β の継続的投与を行う方法が、最も一般的な治療法として選択されている。しかし IFN β に対する nonresponder や副作用のため投与出来ない症例も存在する。MS は臨床経過から再発寛解型 (relapsing-remitting MS ; RRMS), 2 次進行型 (secondary-progressive MS ; SPMS), 1 次進行型 (primary-progressive MS ; PPMS) に分類され、病理学的には T 細胞浸潤、抗体沈着、オリゴデンドロサイトアポトーシスの所見により 4 型に分類されており、このような不均一性 (heterogeneity) の存在も治療難航の一因となっている²⁾。現在まで、髄鞘や軸索の再生を促進する治療薬はなく、新規の標的分子に対する画期的な創薬が待望されている。

2003 年に全ヒトゲノムの解読が完了し、個々の細胞における全遺伝子やタンパク質の発現情報をルーチンに解析可能なポストゲノム時代が到来し、創薬研究の中心はゲノム創薬へとパラダイムシフトした。このようなオミックス研究により、癌や神経難病の診断バイオマーカーや治療標的分子が次々明らかにされた。さらに薬理ゲノミクスの分野は急成長を遂げ、薬物応答性個人差をある程度予測可能となり、テーラメイド医療 (personalized medicine) の樹立に道が開かれた。またシステム生物学 (systems biology) の観点からは、ヒトは大規模な分子ネットワークで精密に構築された複雑系であり、多くの難病がシステムの持つロバストネスの破綻に起因すると考えられている³⁾。従って難病の病態解明のためには、オミックス解析に直結したゲノムワイドの分子ネットワーク解析が必須の研究手段となりつつある⁴⁾。

最近、MS 脳病巣の網羅的プロテオーム解析データが報告された⁵⁾。この研究では、種々のステージの MS 脳病巣から 4324 種類のタンパク質を同定した。彼らはその中から慢性活動性脱髄巣における血液凝固系の亢進を見出した。その所見に基づき、抗凝固薬を用いて、MS 動物モデルである自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomye-

litis ; EAE) の治療に成功し、膨大なプロテオミクスデータから新規創薬標的候補を同定出来た。しかしながら、大多数を占める凝固系以外のタンパク質に関しては、MS 脳分子病態における意義は明らかされていない。われわれは彼らのデータセットを利用して、分子ネットワーク解析ツール KEGG, Panther, KeyMolnet, IPA を用いて再解析し、MS 脳病巣プロテオームの主要分子ネットワークを調べ、システム生物学の観点から創薬標的の探索を試みた⁶⁾。

II. MS 脳病巣の網羅的プロテオーム解析

2008 年、Han らは 6 例の MS 凍結脳を用いて、病理学的にステージを確認した脳病巣から laser microdissection で採取したサンプルを SDS-PAGE で分離後に、タンパク質を抽出し、トリプシン消化ペプチド断片を質量分析で解析した⁵⁾。ステージは、炎症性細胞浸潤と浮腫を主徴とする急性脱髄巣 (active plaque ; AP), 脱髄巣辺縁部に炎症が局限している慢性活動性脱髄巣 (chronic active plaque ; CAP), 炎症所見に乏しくアストログリアの瘢痕形成を主徴とする慢性非活動性脱髄巣 (chronic plaque ; CP) に分類した。同時に 2 例の健常脳に関しても質量分析で解析した。その結果、AP から 1082, CAP から 1728, CP から 1514, 合計 4324 種類のタンパク質を同定した。さらに INTERSECT プログラムを用いて、健常脳では検出されずかつステージ特異的なタンパク質を選び出し、AP 158, CAP 416, CP 236 種類のタンパク質データを公開した。彼らは PROTEOME-3D を用いてアノテーションを調べた結果、CAP において血液凝固系タンパク質 protein C inhibitor, tissue factor, thrombospondin 1, fibronectin 1, vitronectin の発現を認めた。この所見に基づいて、抗凝固薬である thrombin inhibitor hirudin および activated protein C を用いて、MS 動物モデルである PLP139-151 ペプチド誘導性 SJL/J マウス EAE を治療した。どちらの抗凝固薬も、脾細胞やリンパ節細胞の増殖と IL-17, TNF α 産生を抑制した。以上の結果より、血液凝固系タンパク質は新規創薬標的分子となることが明らかになった。しかしながらどのような経緯で、膨大なプロテオミクスデータから上記 5 種類のタンパク質を選出し、焦点を絞ったのかに関しては記載がない。また大多数を占める凝固系以外のタンパク質に関しては、MS 脳分子病態における意義は明らかされていない。

III. MS 脳病巣プロテオームデータの分子ネットワーク解析

生体では、タンパク質は複雑なシステムを構築しているため、病態の解明には個々のタンパク質の機能解析のみならず、タンパク質が構築する分子ネットワークやパスウェイの同定も重要である。タンパク質間相互作用 (protein-protein interaction; PPI) には、単純な直接的結合関係のみならず、活性化、抑制、運搬、酵素反応、複合体形成など多彩な相互作用様式が存在する。複雑多岐のオミックスデータに関連している分子ネットワークを解析するためには、精査された文献情報に裏付けられた専用の解析ツールを使う必要がある。すなわち、膨大な文献情報から様々な分子間相互作用を抽出し、信頼性の高い知識を整理してコンテンツとして収録したデータベース (knowledgebase) を利用して、既知のどのネットワークやパスウェイに最も高い類似性を呈しているかについて調べる方法である。Web 上でフリーに利用出来る代表的な knowledgebase としては、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (www.kegg.jp)⁷⁾, the Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER) classification system (www.pantherdb.org)⁸⁾, Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) (string.embl.de)⁹⁾ などがある。特に KEGG と PANTHER は、curator と呼ばれる専門家によって精査された遺伝子や代謝物などの情報を統合しており、2010年4月現在、KEGG PATHWAY には 352 reference pathways から構成される 104,520 パスウェイが登録されており、search objects in pathways ボックスに目的分子の KEGG ID を入力することにより、該当するパスウェイを検索出来る。PANTHER では reference set との比較により、類似性に関する統計学的有意差を多重検定で評価出来る。STRING では KEGG, HPRD, BIND, IntAct の情報も統合して収録しており、PubMed アブストラクトからは自然言語処理 (natural language processing) によるテキストマイニングを介して、分子間相互作用に関する情報を収集している。有償ツールとしては、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA) (www.ingenuity.com) や KeyMolnet (Institute of Medicinal Molecular Design, Tokyo) (www.immd.co.jp) などがある。どちらも専門家

が精選された文献を精読して、信頼性の高い分子間相互作用に関する情報を収集しており、定期的にアップデートされている。KeyMolnet は日本語入力にも対応しており、結合・発現制御・複合体形成を包括的に調べる周辺検索 (neighboring search), 発現制御に関与する転写因子群を調べる共通上流検索 (common upstream search), 始点と終点間のネットワークを調べる始点終点検索 (N-points to N-points search), 複数の端点を始点として、最多数の始点を含む最小の分子ネットワークを調べる相互関係検索 (interrelation search) を、検索法として選択出来る¹⁰⁾。

著者らは、Han らの MS 脳病巣 AP 158, CAP 416, CP 236 プロテオームデータ⁵⁾ に該当する UniProt ID を、Entrez Gene ID および KEGG ID に変換して、KEGG, PANTHER, IPA, KeyMolnet に入力し、それぞれのステージ特異的プロテオームデータを最も良く反映している分子ネットワークを同定した⁶⁾。ID 変換には UniProt (www.uniprot.org) と KEGG Identifiers を用いたが、DAVID Bioinformatics Resources (david.abcc.ncifcrf.gov)¹¹⁾ の Gene ID conversion ツールを利用しても、Entrez Gene ID への一括変換は容易に行える。なお DAVID はプロテオミクスデータのアノテーション解析の際にも非常に有用なツールである¹²⁾。

KEGG による解析では、CAP プロテオームと focal adhesion (hsa04510), cell communication (hsa01430), ECM-receptor interaction (hsa04512), CP プロテオームと focal adhesion (hsa04510) との関連性が示唆された。CAP プロテオームの focal adhesion (hsa04510) は、COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3, FN1, LAMA1, MYLK, SHC3, PPP1CA, PARVA, PRKCB1, MYL7, RAC3, SPP1, SRC, THBS1, VTN から構成され、CP プロテオームの focal adhesion (hsa04510) は、COL4A2, COL6A1, CRK, FYN, ITGA6, LAMB2, LAMC1, PIK3CA, ZYX から構成されていた。PANTHER による解析では、CAP プロテオームと inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway ($p=2.63E-03$), integrin signaling pathway ($p=3.55E-03$) (図 1), CP プロテオームと integrin signaling pathway ($p=4.33E-02$) との関連性が検出された。すなわち KEGG と PANTHER の解析から、MS 慢性病巣における ECM-integrin シグナル伝達系の中心的役割

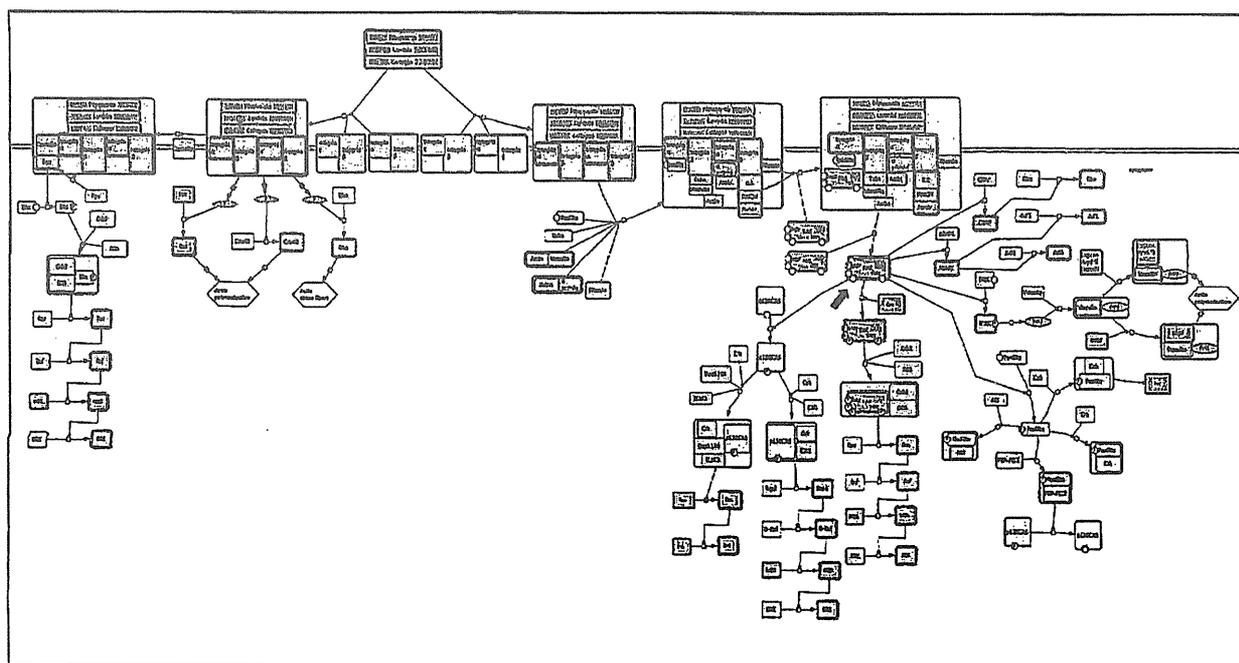


図1 PANTHERによるMS脳病巣CAPプロテオームの分子ネットワーク解析

MS脳病巣CAPプロテオームのPANTHERによる解析では、integrin signaling pathwayとの関連性が示唆された ($p=3.55E-03$)。Reference pathway上の分子とヒットしたタンパク質を濃いシャドウで示す。Focal adhesion kinase (FAK)が、ネットワークのハブ(矢印)となることわかる。文献6)より改変。

が示唆された。KEGGとPANTHERの解析では、APプロテオームと密接に関連するパスウェイは検出されなかった。

一方IPA core analysisによる解析では、APプロテオームはcellular assembly and organization, cancer, and cellular movement ($p=1.00E-49$)、CAPプロテオームはdermatological diseases and conditions, connective tissue disorders, and inflammatory disease ($p=1.00E-47$)、lipid metabolism, molecular transport, and small molecule biochemistry ($p=1.00E-47$)、CPプロテオームはcell cycle, cell morphology, and cell-to-cell signaling and interaction ($p=1.00E-50$)との関連性を認めた。CAPプロテオームのdermatological diseases and conditions, connective tissue disorders, and inflammatory diseaseネットワークは、BGN, CHI3L1, CNN2, COL1A1, COL1A2, COL6A2, COL6A3, CXCL11, ENTPD1, ERK, FBLN2, FERMT2, FN1, GBP1, HSPG2, Ifn gamma, INPP5D, Integrin, LAMA1, LUM, Mlc, MYL7, MYL6B, NES, P4HA1, Pak, PARVA, POSTN, PRELP, SERPINA5, SERPINH1, Tgf beta, TGFBR3, THBS1, VTNから構成されており、ECM-integrin相互作用の関与を強く示唆している。最後にKeyMolnetに収録されているMS関連

75分子を始点、ステージ特異的プロテオームの各分子を終点として、最短経路で始点終点検索を施行したところ、非常に複雑な分子ネットワークが抽出された⁶⁾。APプロテオームはIL-4 signaling pathway ($p=1.79E-13$)、CAPプロテオームはPI3K signaling pathway ($p=7.25E-18$)、CPプロテオームはIL-4 signaling pathway ($p=1.04E-16$)と最も密接に関連していた。またCAPとCPはintegrin signaling pathwayとの関連性も認め ($p=2.13E-12$ および $p=2.57E-12$)、他にも様々なサイトカインシグナル伝達系との関連性も見られた。

IV. MS脳病巣プロテオームネットワークの創薬標的分子

上述のように、MS脳病巣網羅的プロテオームデータセット⁵⁾に関して、4種類の異なる分子ネットワーク解析ツールKEGG, PANTHER, IPA, KeyMolnetは、様々な独自の分子ネットワークを抽出したが、共通してCAP, CPにおけるECM-integrinシグナル伝達系の中心的役割が示唆された⁶⁾。さらにCAPプロテオームデータをSTRINGで解析したところ、描画された複雑な分子ネットワーク中に、ECMのクラスターを同定することが出来た(図2)。

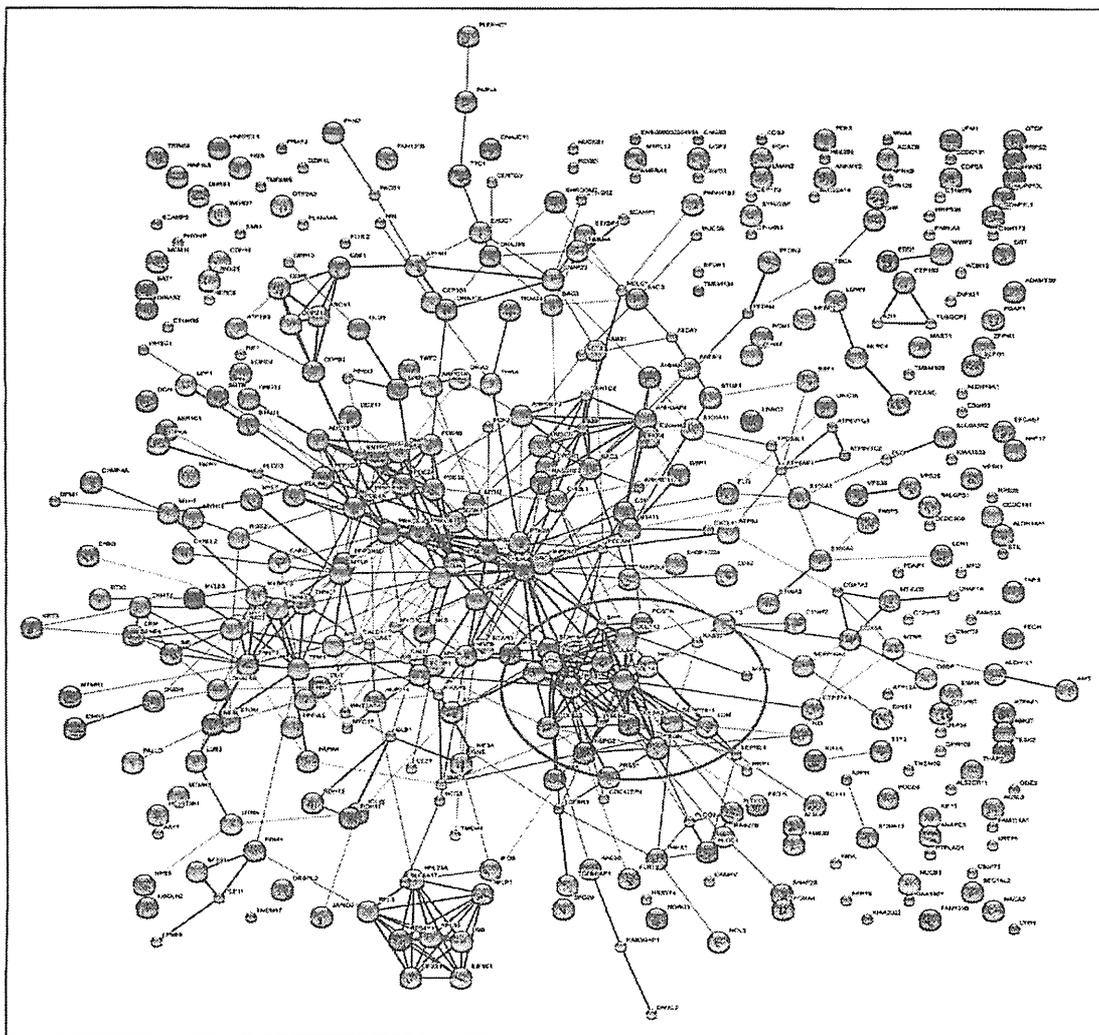


図2 STRINGによるMS脳病巣CAPプロテオームの分子ネットワーク解析

MS脳病巣CAPプロテオームのSTRINGによる解析では、複雑な分子ネットワーク中にECMのクラスター(赤楕円)が存在するのがわかる。

Integrinは複数の α , β サブユニットから構成される24種類のヘテロダイマータンパク質であり、細胞外基質ECMのリガンドである。例えば $\beta 1$ integrinファミリーはcollagen, fibronectin, lamininと結合し、 αv integrinファミリーはvitronectinと結合する。細胞骨格動態制御を介する細胞の接着、遊走、分化、増殖には、ECM-integrin間の相互作用を介するoutside-in, inside-outシグナルが必須である¹³⁾。MS脳病巣に集積を認めたfibronectinやvitronectinは、主として破綻したBBBを通過して脳実質に浸透した血漿成分に由来する。ECM, integrinが著増している慢性病巣において髄鞘や軸索の再生が乏しい理由として、グリア瘢痕に含まれているECMタンパク質が再生阻害因子として働く可能性や、活性化マクロファージやミクログリアが産生

する種々のタンパク質分解酵素がECMに結合して長期に保持され、髄鞘崩壊が遷延化している可能性が挙げられている^{14,15)}。またECM-integrin間の相互作用は、リンパ球のホーミングや血管外遊出、アストログリア・ミクログリアの活性化、オリゴデンドログリア前駆細胞の分化の抑制を介して、脱髄と軸索傷害を増強する^{16,17)}。

MSにおける臨床試験では、 $\alpha 4 \beta 1$ integrin (VLA4) に対するヒト化モノクローナル抗体natalizumabが再発抑制に著効を呈した。しかしながら、natalizumabは進行性多巣性白質脳症(progressive multifocal leukoencephalopathy; PML)を惹起するので、より安全な治療薬の登場が待望されている¹⁸⁾。分子ネットワークから創薬標的分子を探索する場合は、ハブ(hub)と呼ばれる、多くの分子が

らのリレーションが集中しているネットワークの中心分子を同定することが重要である。ハブの抑制薬または活性化薬は、ネットワーク全体すなわちシステムの維持に多大な影響をもたらす¹⁹⁾。システム生物学の観点からは、ECM-integrin シグナル伝達系は、MS における炎症性脱髄遷延化抑制のための創薬標的パスイとなる可能性がある。PANTHER による CAP プロテオームの解析で同定された integrin signaling pathway においては、focal adhesion kinase (FAK) がハブとなることが明らかである (図 1 矢印)。低分子化合物 TAE226 は、ECM による FAK の自己リン酸化を選択的に抑制し、in vivo モデル系で経口投与により腫瘍細胞の増殖と血管新生を抑制する²⁰⁾。従って分子ネットワークから見ると、TAE226 は FAK を分子標的とする MS 慢性炎症性脱髄抑制薬候補となる可能性があり、EAE における前臨床試験の実施が待たれる。

V. おわりに

ポストゲノム時代の膨大なオミックスデータに関する分子ネットワーク解析のためには、精査された文献情報 (knowledgebase) に基づく解析ツールを使う必要がある。解析ツールは未だ発展途上・日進日歩であり、現時点では、どのツールもスプライスバリエーションや翻訳後修飾、細胞・組織特異的発現、細胞内局在化、動的な特性に関しては十分対応出来ていない。しかしながら生体をシステムとして捉える見方から、分子ネットワークを解析することにより、初めて論理的な仮説に裏付けられた創薬標的分子・分子ネットワークを効率的に同定することが出来る。

謝辞：本稿で紹介した研究は、国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部山村隆部長、明治薬科大学バイオインフォマティクス天竺桂弘子助教との共同研究でなされ、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業明治薬科大学ハイテクリサーチセンター研究事業 (S0801043) と厚生労働科学難治性疾患克服研究事業 (H21-難治一般-201) の補助を受けた。

文 献

- 1) McFarland HF, Martin R. : Multiple sclerosis : a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 8 : 913-919, 2007.
- 2) Lassmann H, et al. : The immunopathology of multiple sclerosis : an overview. *Brain Pathol* 17 : 210-218, 2007.
- 3) Kitano H. : A robustness-based approach to systems-oriented drug design. *Nat Rev Drug Discov* 6 : 202-210, 2007.
- 4) Quintana FJ, et al. : Systems biology approaches for the study of multiple sclerosis. *J Cell Mol Med* 12 : 1087-1093, 2008.
- 5) Han MH, et al. : Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets. *Nature* 451 : 1076-1081, 2008.
- 6) Satoh JI, et al. : Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain-lesion proteome. *Mult Scler* 15 : 531-541, 2009.
- 7) Kanehisa M, et al. : KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Res* 38 : D355-D360, 2010.
- 8) Mi H, et al. : PANTHER version 7 : improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. *Nucleic Acids Res* 38 : D204-D210, 2010.
- 9) Jensen LJ, et al. : STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res* 37 : D412-D416, 2009.
- 10) Sato H, et al. : New approaches to mechanism analysis for drug discovery using DNA microarray data combined with KeyMolnet. *Curr Drug Discov Technol* 2 : 89-98, 2005.
- 11) Huang da W, et al. : Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4 : 44-57, 2009.
- 12) Satoh J, et al. : Protein microarray analysis identifies human cellular prion protein interactors. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35 : 16-35, 2009.
- 13) Luo BH, et al. : Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 25 : 619-647, 2007.
- 14) Sobel RA. : The extracellular matrix in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 57 : 205-217, 1998.
- 15) van Horssen J, et al. : The extracellular matrix in multiple sclerosis pathology. *J Neurochem* 103 : 1293-1301, 2007.
- 16) Sisková Z, et al. : Fibronectin impedes “myelin” sheet-directed flow in oligodendrocytes : a

- role for a beta 1 integrin-mediated PKC signaling pathway in vesicular trafficking. *Mol Cell Neurosci* 33 : 150-159, 2006.
- 17) Milner R, et al. : Fibronectin- and vitronectin-induced microglial activation and matrix metalloproteinase-9 expression is mediated by integrins $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_5$. *J Immunol* 178 : 8158-67, 2007.
- 18) Clifford DB, et al. : Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis : lessons from 28 cases. *Lancet Neurol* 9 : 438-446, 2010.
- 19) Albert R, et al. : Error and attack tolerance of complex networks. *Nature* 406 : 378-382, 2000.
- 20) Liu TJ, et al. : Inhibition of both focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor kinase suppresses glioma proliferation in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 6 : 1357-1367, 2007.

Cutting Edge

ustekinumabの有効性と疾患

吉村 元

国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部

大木伸司

国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部室長

はじめに

従来、多発性硬化症や炎症性腸疾患などの自己免疫疾患に関与する自己反応性T細胞集団としては1型ヘルパーT細胞(Th1細胞)の重要性がいわれてきた。しかし、近年IL-17産生性ヘルパーT細胞(Th17細胞)が新たなヘルパーT細胞サブセットとして同定され、Th1細胞よりもTh17細胞のほうがより高い自己免疫疾患惹起性を有することが明らかとなった。ustekinumabはTh1細胞とTh17細胞の分化や増殖に重要な役割を果たすIL-12とIL-23に共通するp40サブユニットに対する中和抗体であり、Th1、Th17細胞が関与する自己免疫疾患に対する効果が期待されている。本稿では、ustekinumabの各種自己免疫疾患に対する有効性について諸外国の臨床試験の結果を紹介するとともに、これらの疾患とIL-12/IL-23とのかかわりについて概説する。

IL-12とIL-23

IL-12とIL-23は、ともにToll様受容体刺激などに反応して樹状細胞やマクロファージといった抗原提示細胞から産生されるサイトカインである。IL-12は、抗原刺激時にナイーブT細胞に作用して、IFN- γ 産生性のTh1細胞に分化させる。一方、IL-23はナイーブT細胞から分化したTh17細胞に作用して、これを安定化、維持する機能がある(図1)。IL-12とIL-23はいず

れも2つのサブユニットからなるヘテロダイマーで、共通するp40サブユニットにp35(IL-12)あるいはp19(IL-23)が会合している(図2)。ヒト免疫グロブリントランスジェニックマウスから作られた完全ヒト化IgG1 κ 抗体であるustekinumabは、p40サブユニットに対する中和抗体であることから、Th1細胞のみならずTh17細胞の増殖や機能も抑制すると考えられ、これらのT細胞サブセットが病態に関与する自己免疫疾患に対する有効性が期待される。

クローン病に対するustekinumabの効果

活動性クローン病患者の回腸生検検体においてはIL-23とIL-17A、IL-6の発現が増加しており、便中のIL-17濃度も増加している。また、IL-23受容体(IL-23R)の遺伝子多型がクローン病の疾患感受性と強く関連していることも明らかとなっている。さらに、クローン病患者の腸管に存在する炎症性T細胞はIL-17と同時にIFN- γ も産生しており、Th1細胞とTh17細胞の表現型を共有していることから¹⁾、Th17細胞だけでなくTh1細胞の機能も制御することができるp40サブユニットを治療標的とすることで、より効果的なクローン病の治療効果が期待できる。

これらの基礎研究の結果に基づいて、2000年から2002年にかけて活動性クローン病患者79名に対するATB-874(ヒト抗体ファージディスプレイライブラリー

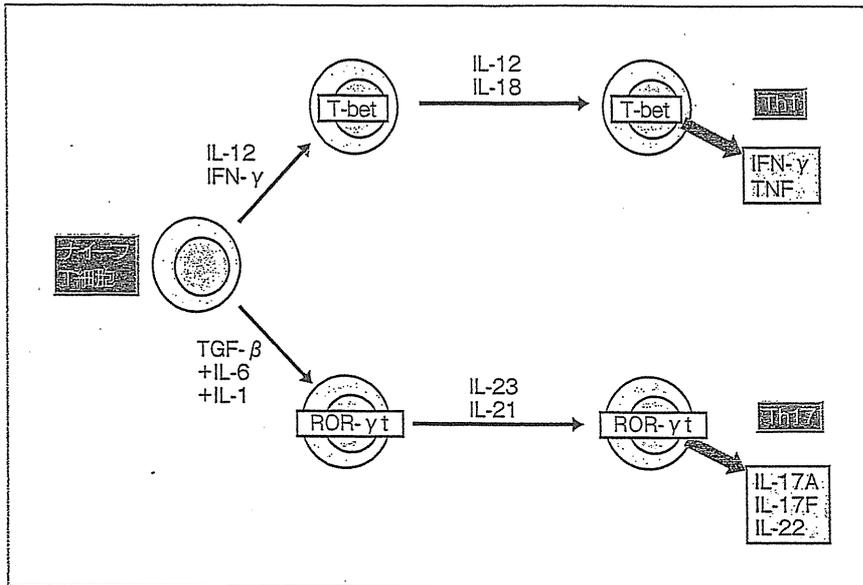


図1 Th1細胞とTh17細胞の分化
黒字はサイトカイン，黄字は各T細胞サブセットに特異的な転写因子。

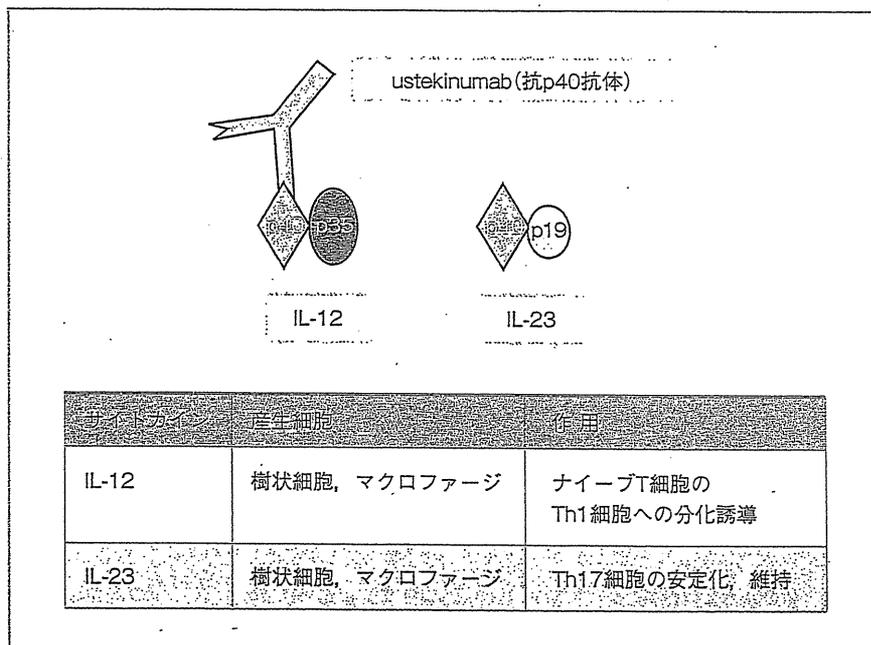


図2 IL-12とIL-23の構造・作用とustekinumab

から分離，最適化された完全ヒト化抗p40(IgG1λ)抗体，ustekinumabとは異なる)の臨床試験が行われた²⁾。その結果，ATB-874投与群において疾患活動性の有意な低下が認められ，主な副作用としてはATB-874投与群において皮下注射部位の局所反応が高率にみら

れた以外はプラセボ群と差はなかった。また，中等症から重症のクローン病患者に対するustekinumabの臨床試験においても同様に有効性が証明され，さらにこの試験ではTNF阻害薬の無効な患者に対してもustekinumabが有効である可能性が示唆された³⁾。

尋常性乾癬に対する ustekinumab の効果

IL-23をマウスに皮内注射すると乾癬様の病変を生じることから、乾癬の病態形成にはIL-23がかかわると考えられた。さらに、乾癬患者の皮膚病巣ではp40とp19の発現が増加しており、IL-12BとIL-23Rの遺伝子多型が乾癬の発症リスクと相関していることが明らかとなっている。

これらを根拠として、2003年から2005年にかけて尋常性乾癬に対するustekinumabの第II相臨床試験が行われた⁴⁾。320名の中等症から重症の尋常性乾癬患者を用量別に4群のustekinumab投与群とプラセボ群に無作為に割り付け、32週間のフォローアップを行ったところ、いずれの用量のustekinumab投与群においても、乾癬病巣の範囲や重症度において有意な改善を認めた。なお、ustekinumab投与により重篤な副作用の発生率の上昇は認めなかった。また、ABT-874も第II相臨床試験において尋常性乾癬に対する有効性が示されている⁵⁾。さらにこれらの効果は、現在尋常性乾癬に対して使用可能なTNF阻害薬(アダリムマブ、エタネルセプト、インフリキシマブ)や、ヒトLFA-3/IgG1融合蛋白(alefacept)、抗CD11aモノクローナル抗体(efalizumab)と比べても遜色なく有効なものであった。

多発性硬化症に対する ustekinumab の効果

多発性硬化症(Multiple Sclerosis; 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; EAE)においては、p35欠損マウスがEAE感受性であるのに対して、p40欠損マウスとp19欠損マウスがEAE耐性であることから⁶⁾、病態の成立にはIL-12よりもむしろIL-23が重要であることが明らかとなっている。さらに、p40に対する抗体がEAEの病態抑制に有効であることも示されている⁷⁾。ヒトにおいてもMSの急性期脱髄巣で

IL-6とIL-17の転写産物が増加しており、免疫組織化学的にp40とp19が検出されており、MSの病態形成にIL-23が関与する可能性が示されている。

以上のような事実に基づいて、2004年から2006年にかけて再発寛解型MSに対するustekinumabの第II相臨床試験が行われた⁸⁾。249名のMS患者を用量別に4群のustekinumab投与群とプラセボ群に無作為に割り付け、37週間のフォローアップを行った。しかし、いずれの用量のustekinumab投与群においても、一次エンドポイントであるMRI T1強調画像での新たなガドリニウム造影病変の出現数はプラセボ群と変わらなかった。なお、ustekinumab投与による重篤な副作用はおおむね認めなかった。

動物モデルでは有効であったにもかかわらず、今回の臨床試験でustekinumabの有効性を見出せなかった理由についてはいくつかの考察がなされている^{9,10)}。ひとつは対象患者の問題である。EAEにおいてはIL-23は病態の誘導には必須であるが、病態の維持にはあまり関与しないと考えられており、p40に対する抗体も病初期に投与されて効果を得ている。本臨床試験には罹病期間が長く後遺症の重い患者も含まれており、このためにustekinumabの有効性がみえにくくなった可能性がある。この場合、病初期のMS患者のみを対象とした臨床試験を行えば、有効性が見出せる可能性がある。もうひとつは、EAEとMSの根本的な病態の違いにその理由を求めるものである。すなわち、中枢神経の外部での免疫によって誘導されるEAEとは異なり、MSでは中枢神経内部での免疫反応が主体であるため、MSの病態抑制には投与された中和抗体が十分に中枢神経内に到達する必要がある。しかし、本臨床試験では血液脳関門の破綻を示唆するガドリニウム造影病変を患者の半数未満にしか認めず、抗体が中枢神経内に到達できなかった可能性がある。この場合には、抗体を血液脳関門を越えてMS病巣に効率よく到達させる方法の開発が必要となる。また、Th1細胞とTh17細胞の分化は互いに拮抗する可能性があるため、ustekinumab投与によって本当にTh1細胞とTh17細胞の両者の機能を抑制できたのかにつ

いても再検討する必要がある。

まとめ

諸外国の臨床試験の結果から、現在のところ ustekinumab はクローン病と尋常性乾癬に対しては有効であると考えられる。また、基礎研究の結果も合わせると、これらの疾患の病態に IL-12/IL-23 が関与していることはほぼ確実である。一方、MS に対しては ustekinumab の有効性が示されなかったが、本当にすべての MS 患者に対して無効であるのかに関しては、MS の病態への IL-12/IL-23 の関与の有無を含めて、現時点では慎重に判断する必要がある。

いずれにしても、これまでの臨床試験の結果から ustekinumab は安全性の高い薬剤であることがわかっており、将来的には多くの自己免疫疾患患者に対して大きな福音となる可能性のある薬剤である。今後は関節リウマチ (RA) など、IL-12/IL-23 の病態への関与が予想されているほかの自己免疫疾患に対する有効性についても検討されることが望まれる。

References

- 1) Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V et al : Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 204 : 1849-1861, 2007
- 2) Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L et al : Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 351 : 2069-2079, 2004
- 3) Sandborn WJ, Feagan BG, Fedorak RN et al : A randomized trial of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 135 : 1130-1141, 2008
- 4) 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
- 5) Kimball AB, Gordon KB, Langley RG et al : Safety and efficacy of ABT-874, a fully human interleukin 12/23 monoclonal antibody, in the treatment of moderate to severe chronic plaque psoriasis. Results of a randomized, placebo-controlled, phase 2 trial. *Arch Dermatol* 144 : 200-207, 2008
- 6) 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* 421 : 744-748, 2003
- 7) 't Hart BA, Brok HP, Remarque E et al : Suppression of ongoing disease in a nonhuman primate model of multiple sclerosis by a human-anti-human IL-12p40 antibody. *J Immunol* 175 : 4761-4768, 2005
- 8) Segal BM, Constantinescu CS, Raychaudhuri A et al : Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis : a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomized, dose-ranging study. *Lancet Neurol* 7 : 796-804, 2008
- 9) Longbrake EE, Racke MK : Why did IL-12/IL-23 antibody therapy fail in multiple sclerosis? *Expert Rev Neurother* 9 : 319-321, 2009
- 10) Steinman L : Mixed results with modulation of T_H17 cells in human autoimmune diseases. *Nat Immunol* 11 : 41-44, 2010

病態と治療

神経疾患と炎症

— 多発性硬化症を中心に —

千原典夫* 山村 隆**

要 旨

慢性炎症の役割がさまざまな神経疾患で推察されている。中でも多発性硬化症で代表される免疫性神経疾患では、T細胞やB細胞の介在する炎症病態がかなり詳細に解析されている。神経組織は血液組織関門により保護されているが、一方では神経細胞には十分な自己再生能がなく、その障害機序の解明と治療法の開発にはさまざまな因子を考慮しなければならない。本稿では多発性硬化症を中心に、炎症の介在する神経障害の機序や治療戦略について、最新の知見を紹介する。

はじめに

慢性炎症の介在する神経疾患の病態では、神経組織が血液脳関門 (blood-brain barrier) や血液神経関門 (blood-nerve barrier) に守られていること、神経系で免疫機能を担うグリア細胞が他の臓器の免疫担当細胞とは異なる性質を示すこと、および神経変性過程が十分に理解されていないことなどに配慮する必要がある。本稿では代表的な慢性炎症性神経疾患として多発性硬化症 (MS) を取り上げ、最近の知見を解説する。

多発性硬化症 (MS)

MS は中枢神経内に多発性の炎症性病変を生じる疾患で、若年の女性に発症する傾向が強い。臨床的には永年にわたって再発と寛解を繰り返すが、徐々に神経変性が進行して車椅子生活を余儀なくされるケースもまれではない。我が国の患者数は 30 年前には 1,000 人程度であったが、現在では 12,000 人以上に増加し、近年の増加傾向が明らかである。MS は中枢神経系髄鞘に由来するミエリン抗原 (ミエリン塩基性タンパク質など) に反応する T細胞や B細胞が関与する自己免疫疾患である。

* 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所
免疫研究部

** 同 部長

キーワード：多発性硬化症 (MS)，
抗原特異的 T細胞，ミクログリア，
血液脳関門，神経変性

1. MS の病態に関する新しいモデル

1) 病変の始まり

MS の病変は脳室周囲、深部大脳白質、大脳皮質などに散在し、その大きさは顕微鏡で

ようやく観察できるレベルから、小指大、こぶし大までさまざまである。個々の病変の形成過程に関してはいまだ明らかでない部分が多いが、神経病理学の専門家は最近、初期の軽微な組織破壊と、それに引き続いて起こるミエリン抗原特異的T細胞の活性化による髄鞘破壊の2ステップに分けて考えることを提唱している(図1)¹⁾。

従来はT細胞浸潤および髄鞘崩壊が最も早期の病理的な変化とされていたが、2004年に Prineas らは、ミクログリアの活性化を伴うオリゴデンドロサイトのアポトーシス様細胞死が、髄鞘の崩壊する前に起こったと判断せざるを得ない症例を報告し、議論を巻き起こした²⁾。彼らの論文では、炎症細胞は血管周囲には認められたが、病変部にはほとんど存在しなかった。病変はたとえるなら、低酸素によって惹起される組織破壊像(脳梗塞病変)に極めて類似していた。興味あることに、同じような組織破壊像を示したMS病変において、他の研究者はミクログリアに発現した一酸化窒素合成酵素(iNOS)やミエロペルオキシダーゼ(MPO)を介したNOや活性酸素産生によってミトコンドリア障害が生じる可能性を指摘した³⁾。これらの病理学的な観察に基づいて、MSの病変は、まず血管周囲の炎症性細胞などから何らかの炎症性物質が中枢神経系内で放出され、その間接的作用によってミクログリアが過剰に活性化し、オリゴデンドロサイトのミトコンドリア障害を誘導して初期病変を作り、それに続いて破壊されたミエリン断片に反応した抗原特異的T細胞の活性化と大規模の髄鞘破壊が生じるという2ステップモデルが提唱されている。しかし、ミクログリアを活性化する原因はほかにもフィブリン、Toll-like receptor (TLR)のリガンド、感染など諸説あり、このモデルの妥当性についてはさらなる検証が必要と思われる。

2. 血液脳関門に関する研究の進歩

血液脳関門が存在するために、末梢で活性化された炎症細胞は中枢神経系の実質に容易には侵入することができない。血液脳関門は血管内皮とグリア境界膜(glia limitans)の2層構造からなり、グリア境界膜はアストロサイトの足突起と基底膜から構成される。炎症細胞が血管から血液脳関門を越えて中枢神経系に侵入する過程は、血流の中で血管内皮に接着し血管外のperivascular space(概念的にはくも膜下腔と同義)へ侵入する過程と、グリア境界膜を破壊して中枢神経実質に侵入する過程に分けられる。最初の過程ではリンパ球が血管内皮に接着するプロセスが必須であり、その際にはT細胞の発現する接着分子 $\alpha_4\beta_1$ インテグリン(VLA-4)と血管内皮の発現するVCAM-1の相互作用が重要である⁴⁾。また後の過程では、T細胞やその他の炎症細胞によって産生されるサイトカインやマトリックスメタロプロテアーゼが決定的な役割を果たす⁵⁾。

近年 Bartholomäus らは、二光子励起顕微鏡を用いて髄膜血管表面を移動するT細胞を観察し、ミエリン抗原特異的T細胞のみならず、中枢神経内には存在しない抗原(卵白アルブミン)に特異的なT細胞も血管内からくも膜下腔へ遊走することを示した。この結果は、活性化T細胞であれば、抗原特異性には関係なく血管外へ遊走することを意味する⁶⁾。しかし、ミエリン抗原特異的T細胞だけがグリア境界膜を越え、卵白アルブミン特異的T細胞は越えなかった。この理由として、ミエリン抗原特異的T細胞はくも膜下腔においてミエリン抗原によって再度活性化され、サイトカインやケモカインを産生するのに対して、卵白アルブミン特異的T細胞は抗原がないため再活性化されないからであることが分かった。実際、卵白アルブミンを人為的にくも膜下腔に添加すると、卵白アルブミン特異的T