

9. Hamady, M., Walker, J.J., Harris, J.K., Gold, N.J. and Knight, R. 2008, Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex, *Nat. Methods*, **5**, 235–7.
10. Kim, S.W., Suda, W., Kim, S., et al. 2013, Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing, *DNA Res.*, **20**, 241–53.
11. Starke, E.M., et al. 2006, Technology development to explore the relationship between oral health and the oral microbial community, *BMC Oral Health*, **6**(Suppl. 1), S10.
12. Avila, M., Ojcius, D.M. and Yilmaz, O. 2009, The oral microbiota: living with a permanent guest, *DNA Cell Biol.*, **28**, 405–11.
13. Dewhirst, F.E., Chen, T., Izard, J., et al. 2010, The human oral microbiome, *J. Bacteriol.*, **192**, 5002–17.
14. Curtis, M.A., Zenobia, C. and Darveau, R.P. 2011, The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease, *Cell Host Microbe.*, **10**, 302–6.
15. Jose, F.A. and Heyman, M.B. 2008, Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **46**, 124–33.
16. Femiano, F., Lanza, A., Buonaiuto, C., Perillo, L., Dell'Ermo, A. and Cirillo, N. 2009, Pyostomatitis vegetans: a review of the literature, *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.*, **14**, E114–117.
17. Rowland, M., Fleming, P. and Bourke, B. 2010, Looking in the mouth for Crohn's disease, *Inflamm. Bowel Dis.*, **16**, 332–7.
18. Veloso, F.T. 2011, Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: do they influence treatment and outcome? *World J. Gastroenterol.*, **17**, 2702–7.
19. Vavricka, S.R., Brun, L., Ballabeni, P., et al. 2011, Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the Swiss inflammatory bowel disease cohort, *Am. J. Gastroenterol.*, **106**, 110–9.
20. Singhal, S., Dian, D., Keshavarzian, A., Fogg, L., Fields, J.Z. and Farhadi, A. 2011, The role of oral hygiene in inflammatory bowel disease, *Dig. Dis. Sci.*, **56**, 170–5.
21. Xavier, R.J. and Podolsky, D.K. 2007, Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease, *Nature*, **448**, 427–34.
22. Cho, J.H. 2008, The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease, *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 458–66.
23. Peterson, D.A., Frank, D.N., Pace, N.R. and Gordon, J.I. 2008, Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases, *Cell Host Microbe*, **3**, 417–27.
24. Maloy, K.J. and Powrie, F. 2011, Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease, *Nature*, **474**, 298–306.
25. Khor, B., Gardet, A. and Xavier, R.J. 2011, Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease, *Nature*, **474**, 307–17.
26. Maynard, C.L., Elson, C.O., Hatton, R.D. and Weaver, C.T. 2012, Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system, *Nature*, **489**, 231–41.
27. Greenberg, G.R. 2004, Antibiotics should be used as first-line therapy for Crohn's disease, *Inflamm. Bowel Dis.*, **10**, 318–20.
28. Sellon, R.K., Tonkonogy, S., Schultz, M., et al. 1998, Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice, *Infect. Immun.*, **66**, 5224–31.
29. Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., et al. 2006, Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach, *Gut*, **55**, 205–11.
30. Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., et al. 2007, Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum, *ISME J.*, **1**, 403–18.
31. Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N. and Pace, N.R. 2007, Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 13780–5.
32. Dicksved, J., Halfvarson, J., Rosenquist, M., et al. 2008, Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease, *ISME J.*, **2**, 716–27.
33. Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., et al. 2008, Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 16731–6.
34. Qin, J., Li, R., Raes, J., et al. 2010, A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing, *Nature*, **464**, 59–65.
35. Morita, H., Kuwahara, T., Ohshima, K., et al. 2007, An improved DNA isolation method for metagenomic analysis of the microbial flora of the human intestine, *Microbes Environ.*, **22**, 214–22.
36. Lozupone, C., Hamady, M. and Knight, R. 2006, UniFrac—an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context, *BMC Bioinformatics*, **7**, 371.
37. Gotelli, N.J. and Colwell, R.K. 2011, Estimating species richness, In: Magurran, A.E. and McGill, B.J. (eds.), *Frontiers in measuring biodiversity*. Oxford University Press: Oxford, UK, pp. 39–54.
38. Colwell, R.K. 2009, Biodiversity: concepts, patterns, and measurement, In: Levin, S.A., et al. (eds.), *The Princeton guide to ecology*. Princeton University Press: New Jersey, USA, pp. 257–63.
39. Hattori, M. and Taylor, T.D. 2009, The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology, *DNA Res.*, **16**, 1–12.
40. Kunin, V., Engelbrektson, A., Ochman, H. and Hugenholtz, P. 2010, Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates, *Environ. Microbiol.*, **12**, 118–23.
41. Keijser, B.J., Zaura, E., Huse, S.M., et al. 2008, Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults, *J. Dent. Res.*, **87**, 1016–20.
42. Nasidze, I., Li, J., Quinque, D., Tang, K. and Stoneking, M. 2009, Global diversity in the human salivary microbiome, *Genome Res.*, **19**, 636–43.

43. Diaz, P.I., Dupuy, A.K., Abusleme, L., et al. 2012, Using high throughput sequencing to explore the biodiversity in oral bacterial communities, *Mol. Oral Microbiol.*, **27**, 182–201.
44. Yamanaka, W., Takeshita, T., Shibata, Y., et al. 2012, Compositional stability of a salivary bacterial population against supragingival microbiota shift following periodontal therapy, *PLoS ONE*, **7**, e42806.
45. Yang, F., Zeng, X., Ning, K., et al. 2012, Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations, *ISME J.*, **6**, 1–10.
46. Paju, S., Pussinen, P.J., Suominen-Taipale, L., Hyvönen, M., Knuutila, M. and Könönen, E. 2009, Detection of multiple pathogenic species in saliva is associated with periodontal infection in adults, *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 235–8.
47. Mager, D.L., Haffajee, A.D., Devlin, P.M., Norris, C.M., Posner, M.R. and Goodson, J.M. 2005, The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects, *J. Transl. Med.*, **3**, 27.
48. Farrell, J.J., Zhang, L., Zhou, H., et al. 2012, Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer, *Gut*, **61**, 582–8.
49. Koren, O., Spor, A., Felin, J., et al. 2011, Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **108**(Suppl. 1), 4592–8.
50. Poveda-Roda, R., Jiménez, Y., Carbonell, E., Gavaldá, C., Margaix-Muñoz, M.M. and Sarrión-Pérez, G. 2008, Bacteremia originating in the oral cavity. A review, *Med. Oral. Patol. Oral Cir. Bucal.*, **13**, E355–362.
51. Parahitiyawa, N.B., Jin, L.J., Leung, W.K., Yam, W.C. and Samaranayake, L.P. 2009, Microbiology of odontogenic bacteremia: beyond endocarditis, *Clin. Microbiol. Rev.*, **22**, 46–64, Table of Contents.
52. Alauze, C., Marchandin, H. and Lozniewski, A. 2010, New insights into *Prevotella* diversity and medical microbiology, *Future Microbiol.*, **5**, 1695–718.
53. Oakley, B.B., Fiedler, T.L., Marrazzo, J.M. and Fredricks, D.N. 2008, Diversity of human vaginal bacterial communities and associations with clinically defined bacterial vaginosis, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 4898–909.
54. Yang, L., Lu, X., Nossa, C.W., Franco, F., Peek, R.M. and Pei, Z. 2009, Inflammation and intestinal metaplasia of the distal esophagus are associated with alterations in the microbiome, *Gastroenterology*, **137**, 588–97.
55. Li, X.X., Wong, G.L., To, K.F., et al. 2009, Bacterial microbiota profiling in gastritis without *Helicobacter pylori* infection or non-steroidal anti-inflammatory drug use, *PLoS ONE*, **4**, e7985.
56. Darveau, R.P. 2010, Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis, *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 481–90.
57. Farnaud, S.J., Kosti, O., Getting, S.J. and Renshaw, D. 2010, Saliva: physiology and diagnostic potential in health and disease, *ScientificWorldJournal*, **10**, 434–56.
58. Szczeklik, K., Owczarek, D., Pytko-Polonczyk, J., Kesek, B. and Mach, T.H. 2012, Proinflammatory cytokines in the saliva of patients with active and non-active Crohn's disease, *Pol. Arch. Med. Wewn.*, **122**, 200–8.
59. Rathnayake, N., Akerman, S., Klinge, B., et al. 2013, Salivary biomarkers for detection of systemic diseases, *PLoS ONE*, **8**, e61356.
60. Savage, N.W., Barnard, K., Shirlaw, P.J., et al. 2004, Serum and salivary IgA antibody responses to *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in orofacial granulomatosis and Crohn's disease, *Clin. Exp. Immunol.*, **135**, 483–9.
61. Wiesner, J. and Vilcinskis, A. 2010, Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system, *Virulence*, **1**, 440–64.
62. Surna, A., Kubilius, R., Sakalauskiene, J., et al. 2009, Lysozyme and microbiota in relation to gingivitis and periodontitis, *Med. Sci. Monit.*, **15**, CR66–73.
63. Abraham, B.P. and Thirumurthi, S. 2009, Clinical significance of inflammatory markers, *Curr. Gastroenterol. Rep.*, **11**, 360–7.
64. Ellison, R.T. 3rd and Giehl, T.J. 1991, Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme, *J. Clin. Invest.*, **88**, 1080–91.
65. Melmed, G.Y. and Targan, S.R. 2010, Future biologic targets for IBD: potentials and pitfalls, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **7**, 110–7.
66. Koenig, J.E., Spor, A., Scalfone, N., et al. 2011, Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **108**(Suppl. 1), 4578–85.

慢性炎症性脱髄性神経炎 (CIDP) における T細胞ケモカイン受容体の解析*

佐藤和貴郎

Key Words: chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (慢性炎症性脱髄性神経炎 (CIDP)), chemokine receptors (ケモカイン受容体), C-C chemokine receptor type 5 (CCR5), Th17 cell (Th17細胞)

Peripheral Nerve 2014; 25(2): 238-242

はじめに

慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: CIDP) は、運動、感覚障害を呈する末梢神経の後天性の炎症性脱髄疾患である¹⁾。根本原因は不明であるが自己免疫機序の関与が想定されている。慢性進行性あるいは再発と寛解を繰り返す経過をとることが多い。運動神経や感覚神経の障害により歩行が困難になるなど、患者のADLが大きく低下しうる疾患である。

CIDPの病態メカニズムについては、動物モデル等の検討から、T細胞を中心とする細胞性免疫およびB細胞による抗体産生等を含む液性免疫の両者が病態に関与すると考えられている²⁾。免疫治療としてステロイド治療や、大量ガンマグロブリン療法 (IVIG)、血液浄化療法が行われ、いずれかの治療が奏効する場合が多い。しかし治療反応性は患者ごとに差が大きく、また治療効果の予測は難しい。CIDPは経過や予後についても多様性が高く、その理由の一つとして背景となる免疫学的病態が異なる可能性が考えられている。CIDPはいくつかの臨床病型に分類されている。一般的に左右対称性などを特徴とする典型的CIDP (typical CIDP) と非典型的CIDP (atypical CIDP) に二分される。非典型的CIDPの病型の代表はMADSAM (multifocal acquired demyelinating sensory

and motor neuropathy) である。現在の診療における問題点として、標準治療に抵抗性の患者や副作用や合併症により免疫治療が十分行えない患者に対する代替治療に乏しい点、また治療効果を予測する、あるいは病態・病勢を反映するバイオマーカーに乏しい点が挙げられる。

CD4陽性T細胞とT細胞免疫学の進歩

CIDPの病態機序については、病理組織による検討などから以下の機序が想定されている。髄鞘抗原を標的とする自己反応性のT細胞が、血液神経関門を越えて末梢神経組織内に侵入し、局所で活性化されて各種炎症性サイトカインの放出やマクロファージの活性化等のメカニズムを介し、末梢神経脱髄が誘導されるというモデルである。しかし、浸潤するT細胞の詳細な表現型など、未解明な部分が少なくない²⁾。

近年、CD4陽性T細胞 (ヘルパーT細胞: Th細胞) についての基礎研究が進み、Th細胞が以前考えられていたより多様なサブセットから構成されることが明らかとなった (図1)。炎症性サイトカイン等の産生を誘導し免疫反応を促進するサブセットがある一方で、逆に炎症や免疫反応の制御・終息に重要なサブセットが存在している。前者の代表がTh1細胞やTh2細胞、Th17細胞であり、後者が制御性T細胞 (Regulatory T cell: Treg) である。ナイーブ

* Analysis of T cell chemokine receptor expression of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP).
Wakiro SATO: (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 [〒187-8502 小平市小川東町4-1-1] Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo

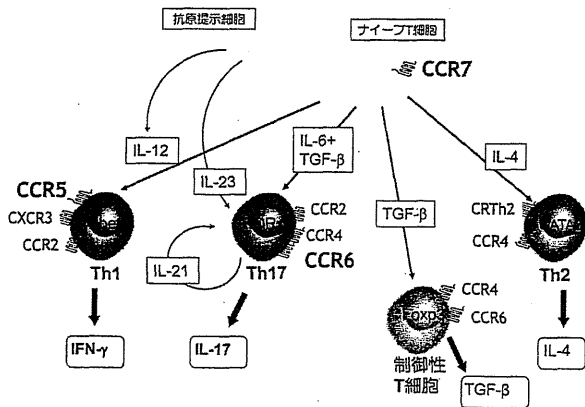


図1. CD4陽性メモリーT細胞の分化とケモカイン受容体
 ナイーブT細胞が抗原提示細胞により抗原提示を受け活性化するとき、種々のサイトカインの影響により、それぞれ異なるエフェクターT細胞へと分化する。各エフェクター細胞はそれぞれ特徴的なサイトカイン産生パターン、転写因子やケモカイン受容体の発現パターンを示す。

T細胞はサイトカインなどの影響下に、転写因子を発現しつつ、特定のサイトカインを産生し、免疫反応を誘導（あるいは制御）するサブセットに分化する。細菌やウイルス、寄生虫などの多様な病原体に対して「適材適所」に免疫反応を誘導する仕組みと考えられる。例えば、結核などの細胞内寄生菌に対する免疫応答時に誘導されやすいTh1細胞はインターフェロン γ (IFN γ) を産生する。一方、寄生虫感染時に誘導されるのが、インターロイキン4 (IL-4) やIL-10を産生するTh2細胞である。約10年前、好中球誘導能などをもつIL-17の産生を特徴とする「Th17細胞」と呼ばれるサブセットが新たに見いだされた³⁾。Th17細胞は関節リウマチや多発性硬化症などの自己免疫疾患の動物モデルにおいて、Th1細胞を凌駕する病原性をもつことが証明され、自己免疫疾患での役割に注目が集まった。

ところで、リンパ球の体内動態の制御に関わるサイトカインが知られ、ケモカインと呼ばれている。ケモカインは多くの種類が知られているが、ケモカインがリガンドとして、細胞膜上のケモカイン受容体に結合することにより、細胞の生体内での移動がコントロールされる。ケモカインシグナルは細胞の遊走だけでなく、リンパ球の活性化にも関与する⁴⁾。T細胞が各サブセットに分化する時、発現するケモカイン受

容体の種類が変化する。ナイーブT細胞はCCR7を発現しているが、活性化しエフェクター細胞になるとCCR7の発現が消失し、代わりにCCR2やCCR5などの炎症性ケモカイン受容体を発現する。ケモカイン受容体の発現パターンはTh細胞のサブセットごとに異なっている。これはケモカインが産生される炎症の「現場」に「必要な」細胞が遊走する目的に適っている⁵⁾。具体的にはTh1細胞ではCXCR3やCCR5が、Th17細胞ではCCR6やCCR4の発現が高いと報告されている^{6,7)}。ただし各サブセットと個々の受容体の対応は、一対一対応ではない。例えばCCR4はTh2細胞や制御性T細胞 (Treg) に発現しやすいが、Th1細胞には基本的に発現しない。しかしながら、このような対応があるために、ケモカイン受容体の発現パターンを目安としてTh細胞のサブセットをある程度推定することができる。その後検討が進み、最近ではTh17細胞は機能的に異なる細胞集団から構成されることがわかってきた。すなわち、IL-17産生性の細胞は、他のサイトカイン産生のパターンや発現する転写因子に多様性がみられ、同じTh17細胞でも、自己免疫疾患モデルにおける病原性が大きく異なることが

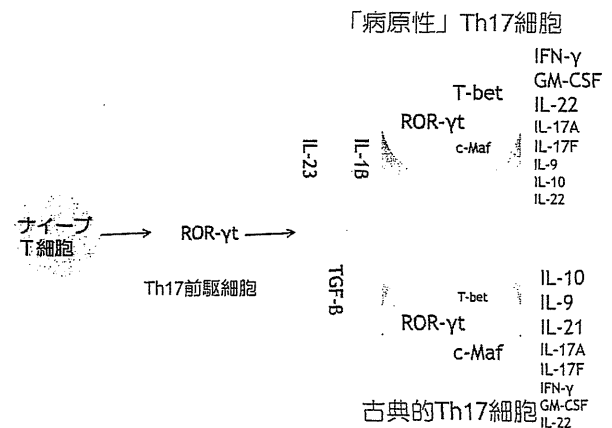


図2. Th17細胞をスペクトラムとして捉える
 ナイーブT細胞は、転写因子ROR-gTを発現するTh17前駆細胞に分化したのち、周囲のサイトカイン環境により多様なTh17細胞へと分化する。IL-23やIL-1 β の多い環境ではIFN-gやGM-CSFの産生などを特徴とする「病原性」T細胞へと分化し、腸管などのTGF- β のリッチな環境ではIL-10などの産生を特徴とする古典的Th17細胞となるというモデルが提案されている。(Current Opinion in Immunology 2011; 23: 702-706より引用改変)

わかったのである^{8,9)}。様々な知見をもとに、Th17細胞を「病原性」から「制御性」まで広くスペクトラムとしてとらえる考え方が提出されている¹⁰⁾(図2)。

我々の研究部では、ヒトTh1細胞、Th17細胞の発現するケモカイン受容体の解析を行っている。複数のケモカイン受容体を発現する細胞が、単一の受容体を発現する細胞と機能的に異なる細胞であることを見出し報告した。CCR2陽性細胞のうちCCR5陽性の細胞はIFN γ の産生能が高いのに対し、CCR5陰性の細胞はIL-17の産生能が高く、前者がTh1細胞を、後者がTh17細胞を多く含む細胞集団であることがわかった¹¹⁾。また、多発性硬化症患者の再発期髄液のリンパ球に発現するケモカイン受容体を解析した結果、CCR2陽性かつCCR5陽性の細胞が疾患特異的に末梢血と比べ増加していた。解析の結果、この細胞が脳内へ侵入しやすい機能を有することがわかり、再発をトリガーする重要な細胞である可能性があることを報告した¹²⁾。ケモカイン多重陽性細胞についての基礎的な研究から、二つの受容体が重合体を形成しうること、またケモカインシグナルの相乗効果 (synergy) が見られる可能性が指摘されている^{13,14)}。

CIDPにおけるTh1/Th17細胞の役割

CIDPにおけるTh1/Th17細胞の関与については、末梢神経病理あるいは脳脊髄液の解析などが行われている (図3)。生検組織を用いた

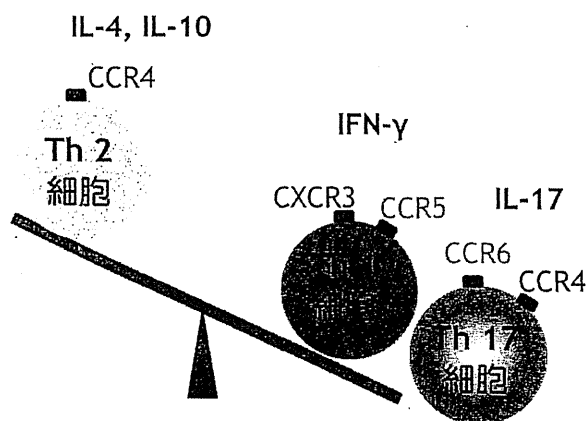


図3. CIDPにおけるTh1細胞・Th17細胞の関与
末梢神経病理や末梢血リンパ球、脳脊髄液リンパ球の解析により、CIDPではTh2細胞よりもTh1細胞やTh17細胞の病態への関与が大きいと考えられる。

検討では、Th1細胞での発現が高いCXCR3の高発現が報告されている。また、CXCR3のリガンドであるIP-10の組織での高発現や脳脊髄液中での増加が報告されている¹⁵⁾。髄鞘ペプチドPMP-2に反応するIFN γ 産生細胞が患者の末梢血中で増加しており¹⁶⁾、Th1細胞の病態への関与が示唆される。一方でTh17細胞については、末梢血および脳脊髄液中でのIL-17の増加や^{17,18)}、IL-17産生細胞の増加が報告されている¹⁹⁾。このように、Th1細胞やTh17細胞がCIDPの病態に関係することは指摘されているが、多様性を有するTh17細胞の「病原性」を考慮に入れた解析はまだ十分には行われていない。

ケモカイン受容体の多重染色によるCIDP病態の検討

われわれの研究室では、免疫性ニューロパチー患者を対象に、リンパ球のケモカイン受容体陽性細胞の発現を調べている。これによりある疾患に関して重要なケモカイン受容体発現細胞が見いだされる可能性がある。具体的な方法は、末梢血から末梢血単核球細胞を分離し、フローサイトメトリーを用い、CD4およびCD8陽性T細胞について、メモリー (CD45RA)、CCR5、CCR6、Foxp3 (制御性T細胞のマーカー) の発現を調べ患者において有意な変化を認める細胞分画がないか検討を行っている (図4)。

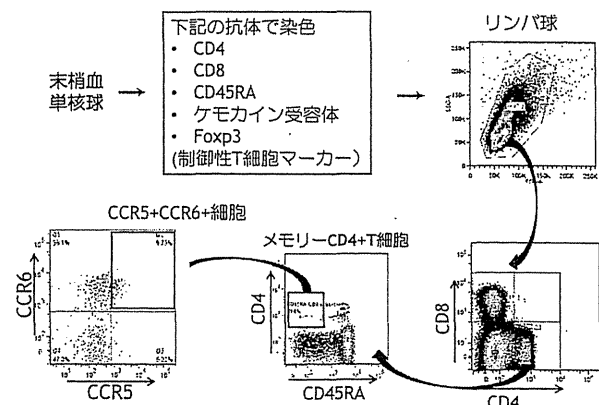


図4. ケモカイン受容体発現細胞の頻度解析
末梢血からリンパ球を分離し、T細胞におけるケモカイン受容体の発現や制御性T細胞のマーカーであるFoxp3の発現をフローサイトメーターで調べた。代表的な解析例を示す。ドットは個々の細胞を表す。このようにしてCCR5陽性CCR6陽性細胞の頻度を算出した。

またTh1細胞やTh17細胞と関連するケモカイン受容体をより詳細に調べるために、CCR5、CCR6に加えCXCR3およびCCR4の発現も同時に測定する検討も行っている。

これまでに、Typical CIDP患者のリンパ球に関していくつかの興味深い結果が得られている。CD4陽性、CD8陽性、Foxp3陽性CD4+T細胞、CCR6陽性CD4+T細胞の頻度については、CIDP患者と健常者で差は見られなかったが、CIDP患者では、CCR5とCCR6の両者を同時に発現する細胞（CCR5+CCR6+細胞）の頻度が健常者に比べて有意に高かった（図5）。CCR5+CCR6+細胞のうちFoxp3+細胞の頻度については差が見られないことから、Foxp3-CCR5+CCR6+の頻度がCIDP患者において高いことが分かった。また、CD8+CCR5+CCR6+細胞の頻度については健常者とCIDP患者の間で有意な差は見られないことから、CD4+細胞すなわちTh細胞に特異的な現象であることがわかった。CXCR3、CCR4、CCR5、CCR6の4種のケモカイン受容体の発現を同時に調べた検討では、それぞれのケモカイン受容体単独陽性細胞の頻度については健常者とCIDP患者の間で有意な差は見られなかった。興味深いことに、CCR5+CCR6+細胞の頻度については、前述の結果と逆に、CIDP患者において有意に低下していた。その理由として考えられるのは、二つの染色方法の違いである。すなわち最初の染色では、細胞内にあるFoxp3を染色するために細胞膜を抗体が通過できるようにDetergentを用いており、そのため細胞内のケモカイン受容体も染色されたと考えられる。一方あとの染色では、細胞膜の受容体のみを染色した。両者の結果を総合すると、CIDP患者では細胞内のCCR5が増加し、細胞表面（細胞膜上）のCCR5は減少していると考えられる。実際、CCR5はCCL5などのケモカインが結合すると細胞内へ受容体が内在化（Internalization）することが報告されている²⁰⁾。我々はCCR5陽性細胞をセル・ソーターを用いて分離し、活性化させる実験を行い、活性化に伴い細胞膜上のCCR5の発現が低下することを確認した。従ってCIDP患者では、細胞内を含むCCR5陽性（かつCCR6陽性細胞）が増加しているが、活性化により細

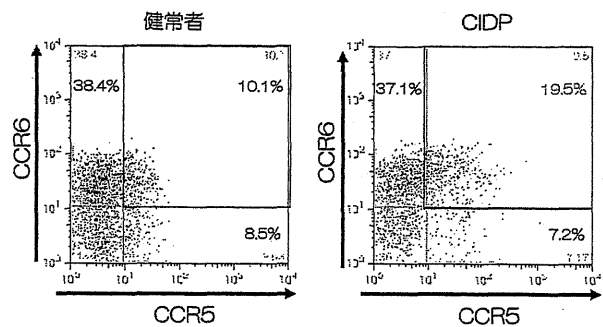


図5. メモリーCD4+T細胞におけるCCR5とCCR6の発現

メモリーCD4陽性T細胞のCCR5とCCR6の発現を示したフローサイトメーターの解析結果を示す。健常者（左）とCIDP患者（右）の代表例を示した。CIDP患者において、CCR5+CCR6+細胞の割合が健常者よりも高いことが分かる。

胞膜上のCCR5は低下し細胞内のCCR5が増加していると考えられた。患者血清中のケモカイン濃度を定量すると、CCL5（RANTES）の濃度がCIDP患者では健常者と比較して有意に高いことが分かった²¹⁾。CCL5はCCR5のもっとも強力なリガンドである。すなわちCIDP患者の生体内でCCL5によるCCR5陽性細胞の活性化が起こっている可能性が考えられた。

このCCR5+CCR6+細胞が「病原性」を有するか否かについて、前述のKuchrooらのモデルに基づいて機能解析を行った¹¹⁾。細胞内サイトカイン染色の結果から、CCR5+CCR6+T細胞はIFN γ とIL-17の両者を同時に産生する細胞を多く含むことがわかった。またCCR5+CCR6+細胞を活性化させ、サイトカイン産生能を評価したところ、メモリーCD4陽性細胞全体やCCR5-CCR6+細胞と比較し、IFN γ 、IL-17、GM-CSF、IL-21の産生が高いことがわかった。転写因子の発現を調べたところ、T-bet、RORCの高発現、c-mafの低発現を認めた。これらのサイトカイン産生および転写因子発現パターンは、Kuchrooらが提唱しているTh17細胞の中でも病原性の高い細胞集団の特徴とかなりオーバーラップする。すなわち、CIDP患者末梢血で増加しているCCR5+CCR6+細胞は病原性Th17細胞である可能性が高い。

まとめ

今回、複数のケモカイン受容体を発現しているヘルパーT細胞の解析により、CIDP患者に

において、CCR5+CCR6+細胞の末梢血中での頻度が有意に変化していることがわかった。具体的には、CIDP患者の末梢血では、CCR5+CCR6+細胞が健常者と比較して減少していた。CIDP患者のリンパ球では、細胞表面のCCR5の発現が減少しているのに対し、細胞内のCCR5が増加しており、CCR5+CCR6+細胞が患者の生体内で活性化している可能性が考えられた。CCR5+CCR6+T細胞のサイトカイン産生・転写因子発現パターンは、Th17細胞の中でも病原性の高い細胞集団の特徴とよく一致した。以上からCIDPでは、病原性Th17細胞の関与が示唆された。今後、疾患活動性との関連やTh17細胞を標的とした治療の可能性等について検討していく必要がある。

文 献

- 1) Latov N. Diagnosis and treatment of chronic acquired demyelinating polyneuropathies. *Nature Reviews Neurology* 2014; 10: 435-446.
- 2) Dalakas MC. Advances in the diagnosis, pathogenesis and treatment of CIDP. *Nature Reviews Neurology* 2011; 7: 507-517.
- 3) Korn T, Bettelli E, Oukka M, *et al.* IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* 2009; 27: 485-517.
- 4) Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2001; 2: 95-101.
- 5) Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 2000; 177: 134-140.
- 6) 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: 639-646.
- 7) Singh SP, Zhang HH, Foley JF, *et al.* Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J Immunol* 2008; 180: 214-221.
- 8) Lee Y, Awasthi A, Yosef N, *et al.* Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat immunol* 2012; 13: 991-999.
- 9) Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, *et al.* Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature* 2010; 467: 967-971.
- 10) Peters A, Lee Y, Kuchroo VK. The many faces of Th17 cells. *Cur Opin Immunol* 2011; 23: 702-706.
- 11) Sato W, Aranami T, Yamamura T. Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5-phenotype. *J Immunol* 2007; 178: 7525-7529.
- 12) Sato W, Tomita A, Ichikawa D, *et al.* CCR+CCR5+ T cells produce matrix metalloproteinase-9 and osteopontin in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Immunol* 2012; 189: 5057-5065.
- 13) Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, *et al.* Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *EMBO J* 2001; 20: 2497-2507.
- 14) Gouwy M, Schiraldi M, Struyf S, *et al.* Possible mechanisms involved in chemokine synergy fine tuning the inflammatory response. *Immunology Lett* 2012; 145: 10-14.
- 15) Kieseier BC, Tani M, Mahad D, *et al.* Chemokines and chemokine receptors in inflammatory demyelinating neuropathies: a central role for IP-10. *Brain* 2002; 125: 823-834.
- 16) Csurhes PA, Sullivan AA, Green K, *et al.* T cell reactivity to P0, P2, PMP-22, and myelin basic protein in patients with Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2005; 76: 1431-1439.
- 17) Mei FJ, Ishizu T, Murai H, *et al.* Th1 shift in CIDP versus Th2 shift in vasculitic neuropathy in CSF. *Journal of the neurological sciences* 2005; 228: 75-85.
- 18) Madia F, Frisullo G, Nociti V, *et al.* pSTAT1, pSTAT3, and T-bet as markers of disease activity in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2009; 14: 107-117.
- 19) Chi LJ, Xu WH, Zhang ZW, *et al.* Distribution of Th17 cells and Th1 cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2010; 15: 345-356.
- 20) Fox JM, Letellier E, Oliphant CJ, *et al.* TLR2-dependent pathway of heterologous down-modulation for the CC chemokine receptors 1, 2, and 5 in human blood monocytes. *Blood* 2011; 117: 1851-1860.
- 21) Lin YL, Mettling C, Portalès P, *et al.* The chemokine CCL5 regulates the *in vivo* cell surface expression of its receptor, CCR5. *Aids* 2008; 22: 430-432.

特集：Human Immunology：疾患理解から治療へ 総説

多発性硬化症における脳脊髄液 T 細胞ケモカイン受容体解析

佐藤和貴郎

Chemokine receptor expression of T cells in the cerebrospinal fluid of relapsing multiple sclerosis

Wakiro SATO

National Institute of Neuroscience, Department of Immunology, National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP)

(Accepted February 13, 2014)

summary

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune-mediated chronic demyelinating disease of the central nervous system. The role of CD4+ T helper T cells in the pathogenesis of this disease is established. CD4+ T cells comprise various Th subsets, including Th1 and Th17 cells. The contribution of each T cell subset to MS pathology is not fully elucidated. As each Th subset have characteristic chemokine receptor expression patterns, we compared the frequency of various inflammatory chemokine receptor positive Th cells in peripheral blood with those from cerebrospinal fluid (CSF) for each MS patient. CCR2+CCR5+CD4+ T cells were selectively enriched in the CSF of MS patients but not in other neurological diseases. Peripheral CCR2+CCR5+CD4+ T cells produced both IFN- γ and IL-17, expressed Matrix Metalloproteinase-9 (MMP9) and Osteopontin, and transmigrated in an in vitro blood brain barrier model more efficiently than other Th cells, suggesting a BBB-invading mechanism and an important role in the relapse of MS. This study illustrates the potential of method in which examining the combination of chemokine receptors could reveal a Th subset with disease-relevant function.

Key words—multiple sclerosis; Th17 cells; CCR2; osteopontin; MMP-9

抄 録

多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) は中枢神経系の慢性炎症性脱髄を特徴とする臓器特異的自己免疫疾患である。再発期と寛解期があり、再発には T 細胞が重要な役割を果たしている。中でも IFN- γ を産生する Th1 細胞とともに IL-17 の産生を特徴とする Th17 細胞の病原性が近年注目されている。Th1 細胞や Th17 細胞などのヘルパー T 細胞サブセットはそれぞれ特徴的なケモカイン受容体を発現する。Th1 細胞は CXCR3 や CCR5 陽性、Th17 細胞は CCR2 陽性 CCR5 陰性および CCR4 陽性 CCR6 陽性を特徴とする。再発寛解型 MS 患者の CD4+T 細胞における CCR2, CCR4, CCR5, CCR6 の発現をフローサイトメトリーで調べたところ、末梢血 CD4+ T 細胞における各分画の頻度は健康者あるいは疾患コントロールと比較し有意な増加や減少を認めなかった。しかし再発期 MS 患者の脳脊髄液では CCR2+CCR5+ 細胞の頻度が末梢血中の頻度と比較し疾患特異的に増加していた。同細胞は活性化により IFN- γ と IL-17 の両者を産生、また血液脳関門の破綻に関わる Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) の高発現や炎症惹起蛋白 Osteopontin (OPN) の高発現、さらに血液脳関門モデルの高い通過能をもっていた。このことから再発時に「先兵」として中枢神経系に浸潤しやすい細胞と考えられた。複数のケモカイン受容体の発現パターンを調べるにより、疾患に関連する重要なリンパ球分画を同定できる可能性がある。

はじめに

多発性硬化症 (MS) は代表的な中枢神経系の慢性炎症性脱髄疾患である¹⁾。病変が脳・脊髄・視神経の様々な部位に (空間的多発)、時期を違えて繰り返す (時間的多発) 起こる点が特徴的である。中枢神経系を構成する有髄神経は髄鞘 (ミエリン) に

覆われているが、髄鞘の脱落を「脱髄」と呼び、MS 病理の重要な所見として 19 世紀に記載された。しかし近年、軸索障害や神経変性など神経細胞の障害が発症早期から起こることも明らかとなっている²⁾。疫学的には、女性に多く 20-30 歳代に発症のピークをもち、欧米白人に多くアジア人には少ないが、特定疾患受給者数の推移をみると過去 30-40 年間で本邦の患者数は急増しており現在約 2 万人の患者がいると推定される。

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター (NCNP) 神経研究所免疫研究部

MSの臨床的経過には多様性があり、「良性MS」と呼ばれる予後のよい一群の患者も存在するが、最も一般的な経過は、発症後しばらくは再発と寛解を繰り返す「再発寛解型」で、その後5-20年程度の年数を経て再発頻度は減少するが歩行障害など神経障害が徐々に進行する「二次進行型」に移行するパターンである。その免疫学的病態についてハーバード大のWeiner教授は、「再発期」には獲得免疫系による自己免疫性の炎症性脱髄が中心的な役割を果たし、「進行期」には自然免疫系の関与が優位となり炎症より神経変性が目立つというモデルを提案している³⁾(図1)。進行期の病態は未解明の部分が多いが、「再発時」にCD4陽性ヘルパーT細胞が決定的な役割を果たすことは、MSの代表的な動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE)の多くの知見や、ゲノムワイド疾患関連遺伝子解析(GWAS)の結果⁴⁾、さらにT細胞に対する分子標的療法が再発抑制に有効であることなど、多方面から支持されている。MSは従来「Th1/Th2バランス」がTh1優位に傾いて発症する「Th1病」と考えられてきたが、Th17細胞の発見後、Th17細胞のMSにおける「病原性」について、近年活発な研究が行われてきた。著者らの研究室ではMS患者の脳脊髄液中のT細胞ケモカイン受容体発現に着目した解析を行い、再発に重要な役割を果たすと考えられる一群のヘルパーCD4+T細胞を同定した⁵⁾。本総説では、MSとTh17細胞に関する最近の知見を交えつつ、主に同研究について紹介する。

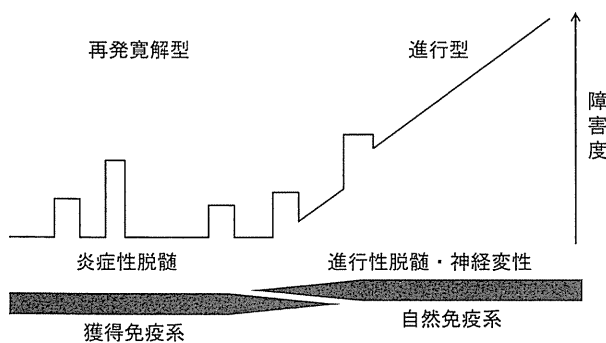


図1 多発性硬化症の経過と自己免疫病態

多発性硬化症の最も一般的な臨床経過を示す。再発寛解型の時期はCD4+T細胞を中心とした獲得免疫系の役割が大きいものに対し、進行型では、自然免疫系の役割が重要と考えられている。再発にはCD4+T細胞が関与することが、さまざまな観点から支持され、CD4+T細胞をターゲットにした治療薬の開発が進められてきた。

ヘルパーT細胞のケモカイン受容体

ケモカインシステムは、サイトカインの一種であるケモカインが対応するケモカイン受容体発現細胞に結合し、細胞内シグナル伝達を通して細胞遊走のみならず、細胞活性化や増殖など、さまざまな機能修飾を行う生体に不可欠な情報伝達系である⁶⁾。CD4+T細胞は分化の過程でケモカイン受容体の発現を変化させることが知られている。ナイーブCD4陽性T細胞はCCR7陽性でリンパ節中に存在するが、抗原提示細胞による活性化とともにCCR7の発現を失い、エフェクターとなる。またメモリーCD4+T細胞は、CCR7陽性のCentral MemoryとCCR7陰性のEffector Memoryに二分できる⁷⁾。Th0細胞がTh1細胞やTh2細胞などサブセットに分化するとき、炎症性ケモカイン受容体を発現する(図2)。その際、それぞれのサブセットごとに発現する受容体が異なる。例えばTh1細胞はCXCR3やCCR5を発現しやすく、Th2細胞はCCR4やCRTh2を発現する傾向がある^{8,9)}。2005年頃、Th1・Th2細胞から独立した系列の細胞集団としてTh17細胞の存在がマウスで確認されたが、当初Th17細胞を特徴づけるケモカイン受容体は明らかではなかった。著者らはCCR2とCCR5の二つのケモカイン受容体の発現を調べ、CCR2陽性かつCCR5陽性細胞がIFN γ の産生能が高いのに対し、IL-17産生能が高い分画がCCR2陽性かつCCR5陰性の分画に存在することを見出した。同細胞はTh17の増殖や維持に重要なIL-23の受容体を高発現し、転写因子T-betの発現が低いなど、Th1細胞と異なる特徴を示し、ヒトTh17細胞のマーカーとなりうると考えられた¹⁰⁾。ほぼ同時期に別のグループからTh17細胞がCCR6陽性CCR4陽性分画に存在することが報告された¹¹⁾。複数の研究をまとめると、Th17細胞に限定的に発現するケモカイン受容体は存在しないが、CCR6陽性細胞の中にTh17細胞が含まれることは確実である¹²⁾。実際、CCR2陽性CCR5陰性細胞の大部分はCCR6陽性分画に含まれる。その後研究が進み、Th17細胞は自己免疫病態に対する「病原性」が不均一な集団であることがわかってきた。マウスとヒトでは異なる部分もあるが、IL-23やIL-1 β など炎症性サイトカインの関与により、生理的なTh17細胞とは異なるIL-17産生細胞が誘導される。すなわち、T-betを発現しIL-17とともにIFN- γ やGranulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-

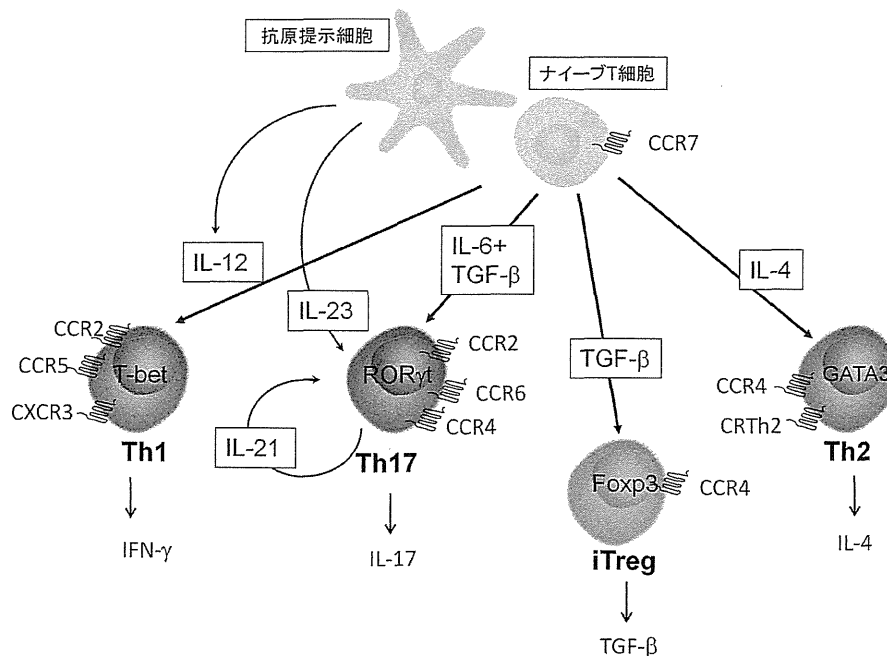


図2 ヘルパー CD4+T 細胞の分化とケモカイン受容体の発現

ナイーブ CD4+T 細胞が各サブタイプへ分化する際、ケモカイン受容体の発現が変化する。各サブタイプごとに発現しやすいケモカイン受容体は決まっている。ただし厳密な対応があるわけではなく、重複も多い。

CSF) の産生が高く、EAE 誘導能が高い Th17 細胞であり、「病原性」Th17 細胞と呼ばれている¹³⁻¹⁵⁾。最近ヒトの「病原性」Th17 細胞について興味深い報告があった¹⁶⁾。CCR6 陽性 CXCR3 陽性 CCR4 陰性細胞の一部にトランスポーター MDR-1 (ABCB1, P-glycoprotein) を発現する細胞があり、その遺伝子発現はマウスの「病原性」Th17 細胞の遺伝子発現とよく一致した。同細胞はクローン病の病変部に集積しており、またステロイドに抵抗性の細胞であると報告している。

Th17 研究と MS 病態

MS の病態における Th17 細胞の役割について、様々な報告がある。以下に代表的な研究を紹介する。MS の中枢神経病理組織の検討では、CD4 陽性および CD8 陽性 IL-17 陽性細胞が病変部に存在することが示されている¹⁷⁾。また CD4 陽性 T 細胞中におけるサイトカイン産生細胞の割合について末梢血と脳脊髄液 (cerebrospinal fluid: CSF) とを比較した検討では、再発期 MS では Th1 細胞、Th17 細胞の両者が CSF 中での割合が増加していた¹⁸⁾。ただし絶対数については CSF 中の Th17 細胞は Th1 細胞より一桁程度少なかった。また、再発期 MS 患者の CSF から Th1 細胞ラインと Th17 細胞ラインを樹立して解析したところ、Th17 細胞ラインは Th1 細胞ライ

ンよりも、接着因子 MCAM/CD146 の発現・活性化能・増殖能が高く、病原性が強い可能性が示唆された。

MS の再発時、脳炎惹起性の T 細胞が血液脳関門 (Blood Brain Barrier: BBB) を通過し脳実質内へ浸潤する段階が重要である¹⁹⁾。将来 MS になる可能性をもつ CIS (clinically isolated syndrome) 患者の CSF を用いた検討で、Th17 細胞を含む CCR6 陽性 T 細胞の頻度が CSF 中では末梢血に比べて増加し、CCR6 のリガンド CCL20 が脈絡叢に発現していることから、Th17 細胞が脈絡叢から脳内に浸潤するとしている²⁰⁾。in vitro BBB モデルを用いた別の解析で、IL-17 産生 IL-22 産生細胞が、Th1 細胞や IL-22 陰性細胞より BBB モデルの通過能が有意に高いことが示された。この IL-22 産生性 Th17 細胞は、細胞障害性因子 GranzymeB を有し、血管内皮細胞を障害・浸潤する能力が高かった²¹⁾。また別の研究では抗原提示細胞の役割について検討を行い、BBB モデルを通過した単球が Th17 細胞の分化・誘導能を獲得するとしている²²⁾。このように、Th17 細胞は MS 病態に関与し、Th1 細胞に勝る BBB 通過能を有する可能性が示されている。しかし、上述したように、CSF 中の Th17 細胞数は Th1 細胞より少ないこと、髄鞘抗原特異的 Th1 細胞が MS 患者で検出できること、IFN- γ で MS が悪化することなどが

ら Th1 細胞の関与は確実で、むしろ Th17 細胞単独での病原性についてはいまだ明確ではないといえる。

MS における T 細胞ケモカイン受容体

著者らは、MS 病態における Th17 細胞の役割を検討する目的で、Th1 細胞や Th17 細胞の同定に役立つ 4 種の炎症性ケモカイン受容体、CCR2, CCR4, CCR5, CCR6 の発現を個々の細胞についてフローサイトメーターで調べ、どのようなケモカイン受容体の組み合わせが疾患と関連して増加あるいは減少しているかを調べた (図 3 A)。例えば「CCR2+CCR4-CCR5+CCR6- 細胞」について、メモリー CD4 陽性 T 細胞を分母としてその頻度をもとめ、健常コントロールと MS 患者とを比較した。再発期や寛解期の MS 患者の末梢血中の個々の分画の頻度は、健常コントロールや疾患コントロールと比較し有意な差はみられなかった (図 3 B)。MS の再発期、脳に侵入するリンパ球が脳脊髄液中に集積していると考えられる。そこで、再発寛解型 MS 患者の再発入院時の CSF と末梢血の T 細胞ケモカイン受容体発現を調べ、CSF 中に増加している分画がないか検討を行った (図 4)。既報告通り、CCR5 陽性細胞はコントロール疾患も含め、CSF 中に集積を認めた²³⁾。これは同細胞が生理的に中枢神経系の免疫監視 (サーベイランス) を行っているためと考えられる。一方 Th17 細胞を含む CCR2+CCR5-, CCR4+CCR6+, あるいは CCR6+ 細胞の頻度は脳脊髄液中に有意な増加は認めず、既報告²⁰⁾ とは異なる結果であった。ところが、コントロールの疾患では増加が見られないが MS 患者で増加している分画が 1 つだけみつけた。CCR2+CCR5+ 分画である。疾患特異的に増加していることから、再発に関わる可能性が考えられた。

CCR2+CCR5+ 細胞の血液脳関門通過能

CCR2+CCR5+ 細胞のサイトカイン産生能については、IFN- γ , IL-17 の両者を産生することが産生蛋白の ELISA による解析で明らかとなり、細胞内サイトカイン染色の結果、IL-17 産生細胞の大部分は IFN- γ を産生する二重産生細胞であった。すなわち CCR2+CCR5+ 細胞は Th1, Th17 細胞の両者を含むと考えられたが、同細胞をさらに CCR6 の有無で分けて解析したところ、MS 患者の CSF 中に増加していたのは CCR6 陰性、すなわち Th17 細胞以外の細胞であった。サイトカイン産生能や転写因子の解析

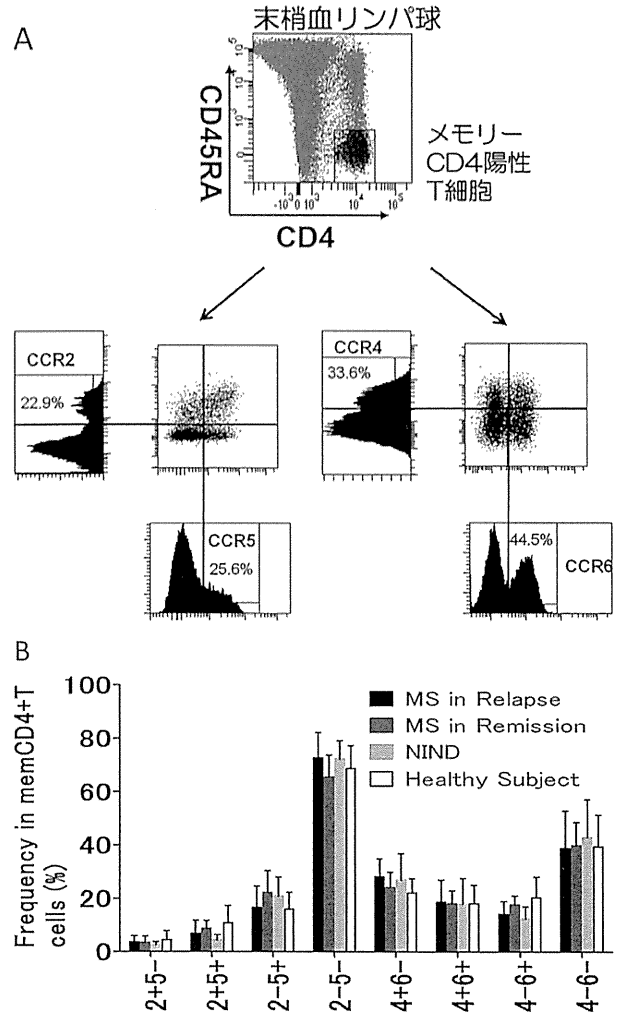


図 3 末梢血ケモカイン受容体陽性細胞の頻度 (文献 5 より引用改変)

- A 健常者の末梢血を採取し、メモリー CD4+T 細胞における CCR2, CCR4, CCR5, CCR6 の発現をフローサイトメトリーを用いて測定した。
 B 末梢血中の各ケモカイン受容体陽性細胞の頻度は疾患や再発の有無によらず、変化しない。CCR を省略し例えば CCR2+CCR5- は「2+5-」と表示した。
 MS in Relapse: 再発時 MS, MS in Remission: 寛解期 MS, NIND: 非炎症性神経疾患, Healthy Subject: 健常者

から同細胞が Th1 細胞の特徴をもつ細胞であることがわかった。すなわち、MS の再発期、CSF 中に集積しているのは CCR2+CCR5+CCR6-Th1 細胞であると考えられた。MS における自己抗原の候補である髄鞘蛋白ミエリン塩基性蛋白 (Myelin Basic Protein: MBP) に対する反応性を調べたところ、再発期 MS 患者から得られた CCR2+CCR5+Th 細胞でのみ、MBP 反応性に IFN- γ を有意に多く産生することが分かった。しかし IL-17 については反応性の産生を認めず、再発と関連するのは Th17 細胞ではなく Th1 細胞であることを示唆する結果であった。

既述のように MS の再発には、末梢血中のリンパ

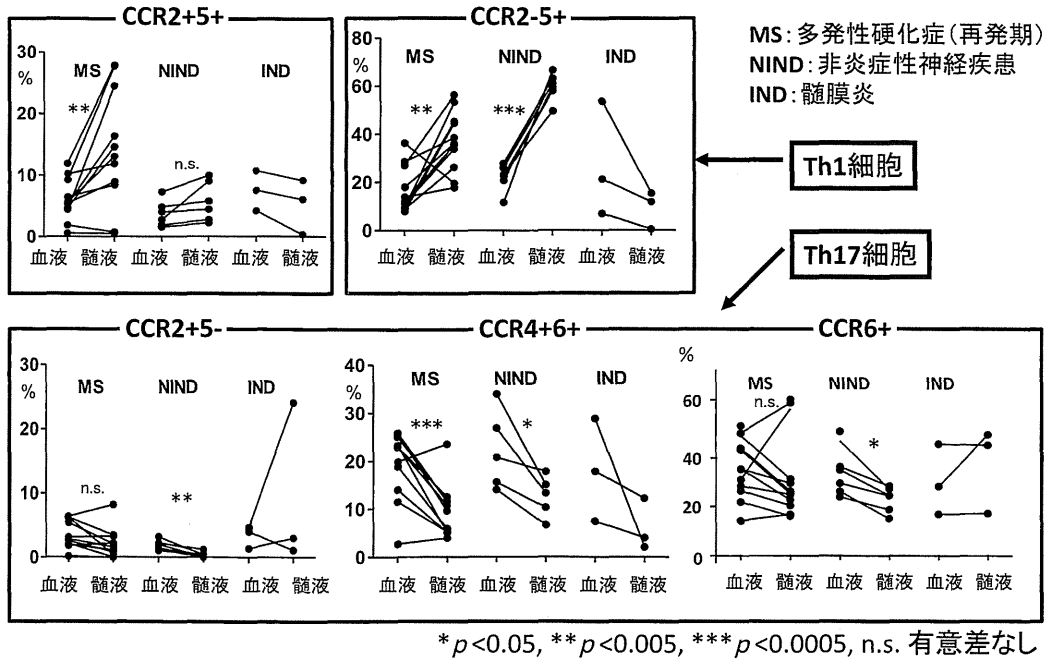


図4 脳脊髄液と末梢血におけるケモカイン受容体陽性細胞の頻度比較 (文献5より引用改変)

再発期 MS 患者から得られた脳脊髄液と末梢血のメモリー CD4+T 細胞中におけるケモカイン受容体陽性細胞をフローサイトメトリーで測定し、脳脊髄液中と末梢血中の頻度を比較した。同一患者のデータを線で分けて示す。

球が BBB を通過し脳内に侵入するメカニズムが重要である¹⁹⁾。そこで、BBB 通過に関連する因子についての検討を行った。BBB は二枚の基底膜-血管内皮細胞およびアストロサイトのグリア限界膜からなる (図 5 A)。その構成成分 Type IV コラーゲンの分解酵素である Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) は、BBB の破綻に重要な役割を果たすことが知られている。MMP-9 は MS の再発期に脳脊髄液中で増加し IFN- β 治療により減少することが報告されている^{24, 25)}。CCR2+CCR5+T 細胞は活性化すると、MMP-9 の高発現を示し、高いコラーゲン分解能を持つこともわかった。Osteopontin (OPN) は炎症に関わる多機能性蛋白で、MS 病巣での高発現や EAE における強い炎症惹起能が示されている²⁶⁾。CCR2+CCR5+ 細胞は活性化により OPN の高発現を認めた。

CSF 中に集積している同細胞が、中枢神経実質に浸潤するためには、アストロサイトの足突起が形成するグリア限界膜を通過する必要がある。そこで、グリア限界膜に発現するラミニンとアストロサイト培養細胞からなる BBB モデルを作成しトランスウェルを用いて細胞遊走能を評価した。活性化した同細胞は、他の分画の細胞と比較し有意に BBB 通過能が高いことが分かった。

以上から、CCR2+CCR5+Th 細胞は MS の再発時

に脳脊髄液中に集積しているだけでなく、血液脳関門を通過しやすく、再発の際に真っ先に脳内に侵入して炎症を誘導する能力を持った細胞であることが推察された (図 5 B)。

考 察

CCR2+CCR5+ 細胞のように2つのケモカイン受容体を同時に発現している細胞は、単独の受容体発現細胞と質的に異なる細胞である可能性がある。

Zhang らは CCR5 陽性細胞が繰り返し刺激を受けると CCR2 陽性となり、CCR2+CCR5+T 細胞となるモデルを提出している²⁷⁾。同細胞は T 細胞受容体刺激に対する高い感受性を持ち、サイトカイン産生能・遊走能・生存能 (アポトーシス抵抗性) に優れた細胞であると報告している。これらの特徴は、再発を繰り返す MS という慢性疾患において繰り返し自己反応性に活性化して炎症近傍に集積してくる CCR2+CCR5+ 細胞の特徴として矛盾しない。

ケモカイン受容体は一般に二量体 (dimer) や Oligomer を作るが CCR2 と CCR5 がヘテロ複合体を作ることで、ヘテロ複合体はホモ複合体と比較してケモカインに対する感受性が高いことがすでに 2001 年に報告されている²⁸⁾。下流のシグナル伝達が、ヘテロ複合体では異なることなど知見が蓄積されてきており²⁹⁾、ケモカイン阻害療法が効果を発揮するた

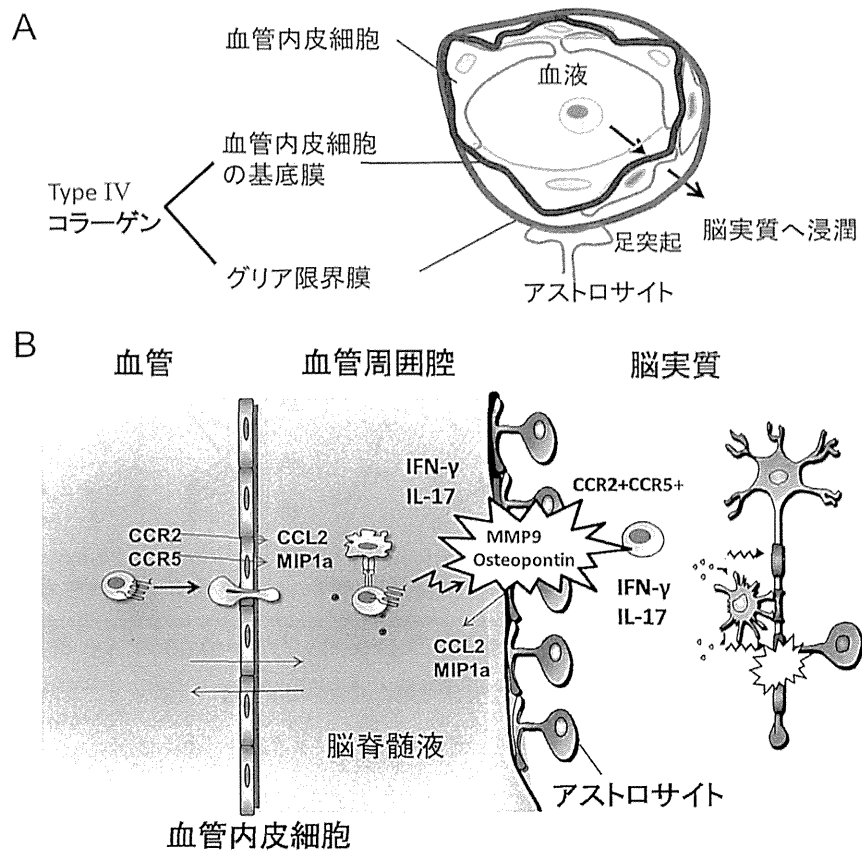


図5 血液脳関門と病原性リンパ球の侵入モデル

A 血液脳関門の模式図

血液脳関門の主たる構成細胞として、血管内皮細胞、アストロサイト、周皮細胞が重要である（周皮細胞については省略）。内皮細胞の基底膜とアストロサイトのグリア限界膜の二枚の基底膜がバリア機能を構成する。脳脊髄液は二枚の基底膜の「あいだ」にある。したがって脳脊髄液中のリンパ球は、血管内皮細胞をすでに通過した細胞で、これが脳実質内に入るためにはグリア限界膜を通過しなければならない。

B CCR2+CCR5+CD4+T細胞の脳実質への侵入についてのモデル

CCR2+CCR5+細胞は、ケモカインの作用により脳脊髄液に集積し、血液脳関門で抗原提示細胞による抗原提示と活性化を受けると、IFN- γ やIL-17を産生するとともに、コラーゲンを分解するMMP-9や炎症惹起作用をもつOsteopontinを産生する。これらが血液脳関門に作用し、他のT細胞に先駆けて脳実質内に侵入することが想定される。

めには、ヘテロ受容体を標的とした治療戦略が必要である可能性が考えられる。

おわりに

再発寛解型MSの再発時にCSF中に集積している細胞として、CCR2+CCR5+T細胞を同定した。CCR2+CCR5+細胞はBBBを通過する分子メカニズムを有し、BBBモデルの通過能に優れており、再発時に重要な役割を果たす細胞であることが推察された。T細胞の複数のケモカイン受容体発現を調べる手法により、他の自己免疫疾患において病態に関わるT細胞分画を同定できる可能性がある。疾患のバイオマーカーとして、また治療ターゲットとして、「ケモカイン多重陽性」細胞の研究が有用である可能性があり、今後の発展が期待される。

文 献

- 1) McFarland, H.F., et al.: Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol.* **8**: 913-919, 2007.
- 2) Trapp, B.D., et al.: Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci.* **31**: 247-269, 2008.
- 3) Weiner, H.L.: The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease? *Ann Neurol.* **65**: 239-248, 2009.
- 4) Sawcer, S., et al.: Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature.* **476**: 214-219, 2011.
- 5) Sato, W., et al.: CCR2+CCR5+ T cells produce matrix metalloproteinase-9 and osteopontin in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Immunol.* **189**: 5057-5065, 2012.

- 6) Mackay, C.R.: Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol.* **2**: 95–101, 2001.
- 7) Sallusto, F., et al.: Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* **401**: 708–712, 1999.
- 8) Sallusto, F., et al.: Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev.* **177**: 134–140, 2000.
- 9) Nagata, K., et al.: Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo. *J Immunol.* **162**: 1278–1286, 1999.
- 10) Sato, W., et al.: Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5- phenotype. *J Immunol.* **178**: 7525–7529, 2007.
- 11) Acosta-Rodriguez, EV., et al.: Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* **8**: 639–646, 2007.
- 12) Singh, S.P., et al.: Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J Immunol.* **180**: 214–221, 2008.
- 13) Lee, Y., et al.: Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol.* **13**: 991–999, 2012.
- 14) Ghoreschi, K., et al.: Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature.* **467**: 967–971, 2010.
- 15) Peters, A., et al.: The many faces of Th17 cells. *Cur Opin Immunol.* **23**: 702–706, 2011.
- 16) Ramesh, R., et al.: Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J Exp Med.* **211**: 89–104, 2014.
- 17) Tzartos, J.S., et al.: Interleukin-17 Production in Central Nervous System-Infiltrating T Cells and Glial Cells Is Associated with Active Disease in Multiple Sclerosis. *Am J Pathol.* **172**: 146–155, 2007.
- 18) Brucklacher-Waldert, V., et al.: Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain.* **132**: 3329–3341, 2009.
- 19) Engelhardt, B.: T cell migration into the central nervous system during health and disease: Different molecular keys allow access to different central nervous system compartments. *Clin Exp Neuromunol.* **1**: 79–93, 2010.
- 20) Reboldi, A., et al.: CC 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.
- 21) Kebir, H., et al.: Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med.* **13**: 1173–1175, 2007.
- 22) Ifergan, I., et al.: The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain.* **131**: 785–799, 2008.
- 23) Sorensen, T.L., et al.: Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest.* **103**: 807–815, 1999.
- 24) Leppert, D., et al.: Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. *Brain.* **121** (Pt 12): 2327–2334, 1998.
- 25) Stuve, O., et al.: Interferon beta-1b decreases the migration of T lymphocytes in vitro: effects on matrix metalloproteinase-9. *Ann Neurol.* **40**: 853–863, 1996.
- 26) Chabas, D., et al.: The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science.* **294**: 1731–1735, 2001.
- 27) Zhang, H.H., et al.: CCR2 identifies a stable population of human effector memory CD4+ T cells equipped for rapid recall response. *J Immunol.* **185**: 6646–6663, 2010.
- 28) Mellado, M., et al.: Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *EMBO J.* **20**: 2497–2507, 2001.
- 29) Gouwy, M., et al.: Possible mechanisms involved in chemokine synergy fine tuning the inflammatory response. *Immunology Lett.* **145**: 10–14, 2012.

免疫動態

佐藤 和貴郎 山村 隆

はじめに

多発性硬化症 (multiple sclerosis ; MS) は、病変が脳・脊髄・視神経の様々な部位に (空間的多発) 繰り返し (時間的多発) おこることを特徴とする炎症性脱髄性疾患である。臨床的経過から、大きく「再発と寛解を繰り返す病態」と「進行性の病態」の二つに分類できる。免疫学的病態について、「再発期」には獲得免疫系による自己免疫性の炎症性脱髄が

中心で、「進行期」は自然免疫系の関与が優位となり、炎症より神経変性が目立つというモデルが提案されている (図 1)¹⁾。このうち前者の「再発期」については近年理解が進み、再発抑制効果をもつ複数の免疫治療薬が臨床現場で用いられるようになった。一方、進行性の病態については未知の部分が多く「神経変性」や「慢性炎症」をキーワードに研究が進行中であるが、再発を抑制し疾患活動性を抑制することの意義は認識されている。疫学的に興味深いことは、従来アジア人に少なかった MS がわずか数十年の間にわが国で確実に増加している点である。昨今の腸内細菌・腸管免疫系の研究の進歩により、食生活を含む環境因子と MS の関連性が明らかとなりつつある。本稿では、MS の代表的な動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) の知見を述べながら、MS の病態に関与する免疫学的機序について概説する。

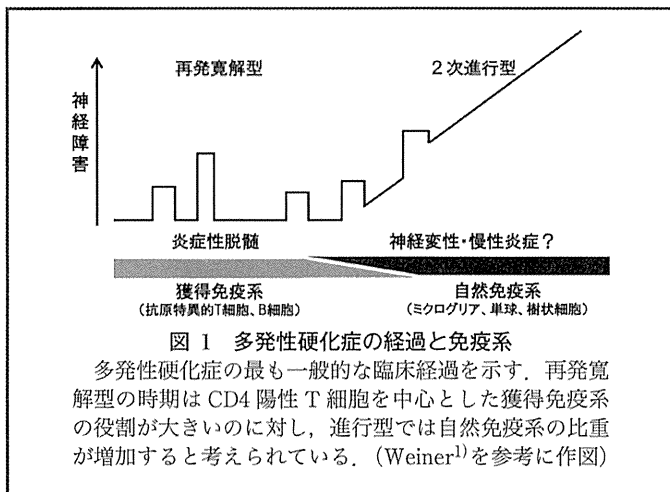


図 1 多発性硬化症の経過と免疫系

多発性硬化症の最も一般的な臨床経過を示す。再発寛解型の時期は CD4 陽性 T 細胞を中心とした獲得免疫系の役割が大きいのに対し、進行型では自然免疫系の比重が増加すると考えられている。(Weiner¹⁾を参考に作図)

MS 発症の遺伝的背景

MS の一卵性双生児における同胞発症率は約 30% とさ

さとう わきろう (独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所/免疫研究部室長
やまむら たかし 同部長

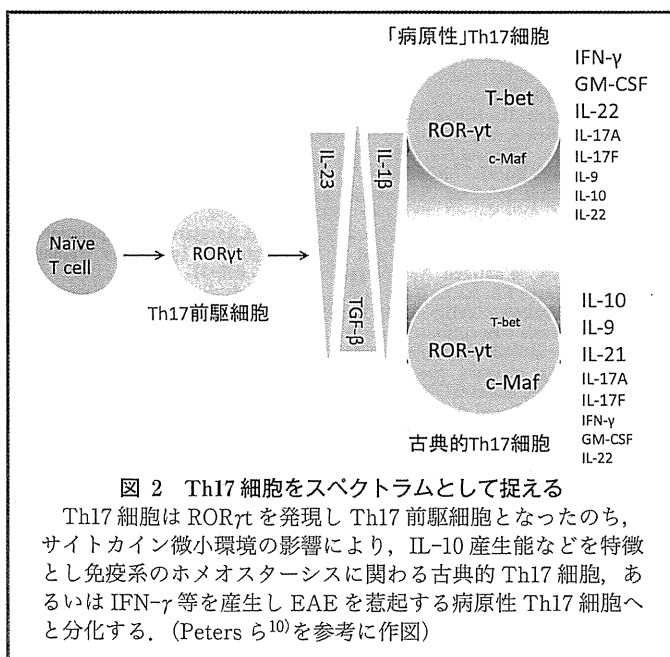


図 2 Th17 細胞をスペクトラムとして捉える

Th17 細胞は RORγt を発現し Th17 前駆細胞となったのち、サイトカイン微小環境の影響により、IL-10 産生能などを特徴とし免疫系のホメオスタシスに関わる古典的 Th17 細胞、あるいは IFN-γ 等を産生し EAE を惹起する病原性 Th17 細胞へと分化する。(Peters ら¹⁰⁾を参考に作図)

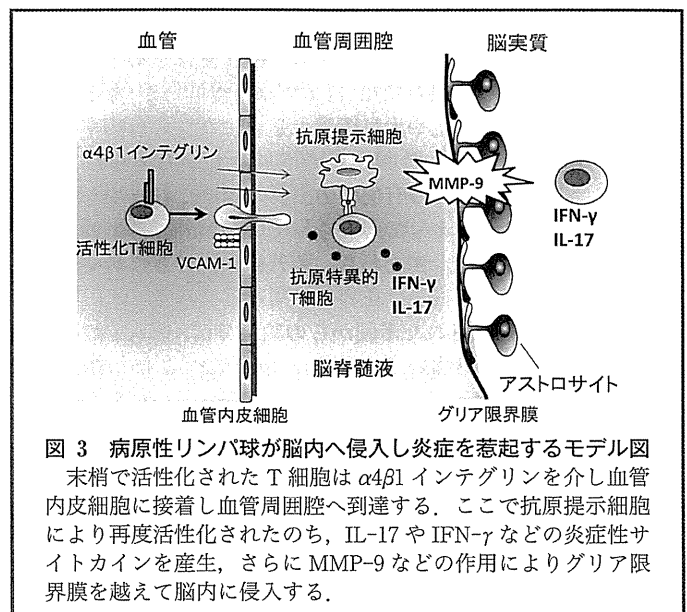


図 3 病原性リンパ球が脳内へ侵入し炎症を惹起するモデル図

末梢で活性化された T 細胞は α4β1 インテグリンを介し血管内皮細胞に接着し血管周囲腔へ到達する。ここで抗原提示細胞により再度活性化されたのち、IL-17 や IFN-γ などの炎症性サイトカインを産生、さらに MMP-9 などの作用によりグリア境界膜を越えて脳内に侵入する。

れ、発症には遺伝的背景が関与する。2011年に欧米人MS患者を対象とした疾患感受性遺伝子ゲノムワイド関連解析(GWAS)の結果が報告された²⁾。Major histocompatibility complex(MHC)クラスI・II分子、インターロイキン(IL)-2受容体、IL-7受容体の関与が再確認され、新たに29の新規感受性遺伝子が示された。その多くが1型糖尿病や炎症性腸疾患、関節リウマチと同様CD4陽性ヘルパーT細胞(helper T cells: Th cells)の機能に関わる遺伝子であった。すなわち獲得免疫系による自己免疫機序の重要性が改めて認識された。ただ、この研究は欧米白人の再発寛解型MS患者を対象にコモンバリエーションについて調べたものであり、レアバリエーションの関与やMSの多様性に寄与する遺伝子については今後の課題である。またアジアなど異なる地域の患者での検証が待たれる。

再発に関わる病原性T細胞は何か

MS研究はEAE研究とともに発展してきた。EAEはマウスなどの実験動物にミエリン塩基性タンパク(MBP)などの髄鞘抗原をアジュバント(免疫応答の増強剤)とともに接種(免疫)して中枢神経炎症を誘導する動物モデルである(active EAE)。髄鞘抗原に特異的に反応するCD4陽性Th細胞を動物に注射する方法でも神経炎症が誘導されることから(passive EAE)、病原性T細胞はTh細胞であるといえる。MS患者においてもミエリン塩基性タンパクに対し特異的に反応するT細胞が患者末梢血中に検出される。また、MS患者の中枢神経病理では、病変部に特定の限られた種類のT細胞クローンが集簇している。これはT細胞が抗原特異性をもつこと、すなわち特定の抗原を標的とするT細胞が病変部を形成していることを意味し、MS自己免疫説の重要なポイントである。なお、MSの病変部位で認められるT細胞の標的抗原は証明されていない。

Th17細胞の登場と研究の展開

1990年代以降、Th細胞はTh1/Th2細胞に二分されるドグマが支配的で、EAEを誘導するTh細胞はインターフェロンガンマ(IFN- γ)産生性のTh1細胞であると信じられてきたが、矛盾する結果も報告されていた。2003年、Cuaらの論文はこの問題に対し解決への道筋を与えた³⁾。Th1細胞の分化に重要なIL-12の欠損マウスでもEAEが誘導されたことから、EAEの誘導にはTh1細胞は必ずしも必要ではないことが示された。しかしIL-12に類似するIL-23の欠損マウスではEAEが発症しないことが示され、IL-23に注目が集まった。解析の結果、IL-23はTh細胞からのIL-17産生を介しIL-6、TNF- α 、GM-CSFなどの炎症性サイトカインを誘導することが示された。2006年に

は、IL-17産生T細胞がナイーブCD4陽性T細胞からIL-6とTGF- β の作用により分化誘導され、特異的な転写因子ROR γ tが同定され、Th1、Th2とは異なる第三のTh、Th17細胞として認知され、EAE/MSの発症のキーとなる細胞として注目された⁴⁾。髄鞘抗原特異的なTh17細胞とTh1細胞を比較すると、Th17細胞がTh1細胞よりも少ない細胞数でEAEをおこすと報告されたため、Th17細胞の病原性が広く認知された。しかし、意外にもIL-17遺伝子欠損マウスにおけるEAEの改善は軽度であることから、IL-17の作用が決定的ではないことも分かった⁵⁾。

Th17細胞に関する検討が進むとTh17細胞は一つの均一な細胞集団というより、「多様性」と「可塑性」をもつ細胞と捉えられるようになった。Th17細胞と免疫寛容の維持に重要な制御性T細胞(Treg)との関係について、FoxP3陽性細胞がTh17細胞に分化転換して(conversion)病原性細胞となりうること⁶⁾や、IL-17を産生しつつも抑制能を維持しているFoxP3陽性Tregの存在が報告された⁷⁾。一方、一般的にはTh1細胞が産生するIFN- γ の産生能を有するTh17細胞の存在も報告されている。マウスを用いた検討でEAEを発症する過程でIL-17A産生性の細胞がIFN- γ 産生性の細胞に分化転換し中枢神経に浸潤していた⁸⁾。また、再発期MS患者の末梢血中にはIFN- γ とIL-17の両者を同時に産生する細胞(Th1/Th17細胞)が増加しており、同細胞は血液脳関門(blood brain barrier: BBB)モデルを通過する能力が高いとの報告もある⁹⁾。様々な結果にもとづき、KuchrooらはTh17細胞をスペクトラムとして捉えることを提唱している(図2)¹⁰⁾。そのモデルではpre-Th17細胞の誘導後、TGF- β の作用が持続する場合はIL-10などを産生し、腸管免疫系のホメオスタシスに寄与する細胞(非病原性細胞)になるが、IL-23やIL-1 β が作用するとGM-CSFやIFN- γ 産生性の病原性タイプに分化しEAE誘導能を獲得するとされる。

Th17細胞の「発見」を契機として新たなThサブセットが次々と報告されている。IL-9産生を特徴とするTh9やIL-22産生が特徴的なTh22などである。興味深いことに、ThサブタイプによりEAEの病変分布が異なるという複数の報告がある。一例をあげると、in vitroで誘導されたTh17、Th1、Th2、Th9細胞をマウスに注射してEAEを誘導したところ、それぞれのEAEの発症様式や病変分布が異なっていた¹¹⁾。MSの病変分布には多様性が認められるが、Th細胞のサブタイプとMSの病変分布に何らかの関連がある可能性が考えられる。それと関連して、MSの再発予防薬として頻用されるIFN- β には無効例や悪化例があることが知られ、とくに視神経と脊髄に主病変をもつ視神経脊髄炎(neuromyelitis optica: NMO)では悪化例が

多く使用禁忌となっている。SteinmanらはTh1細胞で誘導したEAEはIFN- β 投与により軽減するのに対し、Th17細胞で誘導したEAEは逆にIFN- β 投与により悪化することを示し、IFN- β はTh17細胞の介在する自己免疫病態には無効ないし増悪因子となる可能性を指摘している¹²⁾。

リンパ球の中樞神経系への移行

病原性リンパ球が脳内へ到達するプロセスは以下のように考えられている。まず、リンパ節で活性化を受けたのち、リンパ節を出て血管内に移行する。次に、脳血管内皮細胞を越えて脳脊髄液中に移動する。その後、脳内へ侵入し神経炎症を惹起するという流れである(図3)。病原性リンパ球の移動をブロックするとEAE/MSの病態を制御することができる。リンパ球が二次リンパ節から移出する際に必要なSIP1受容体の発現を低下させる薬剤fingolimodはEAEを軽減しMSの再発を抑制する。T細胞が脳の血管内皮細胞に接着するのに必要な $\alpha4\beta1$ インテグリンに対する阻害抗体natalizumabもEAE/MSに対し治療効果をもつ。fingolimodおよびnatalizumabはMSの再発予防薬として臨床現場で使用されている。リンパ球が脳内に到達する前に立ちはだかる最後の壁が、アストロサイトの足突起で構成されるグリア境界膜である。ラットのEAEの髄膜血管をライブイメージングにより詳細に観察した研究がある¹³⁾。活性化T細胞は抗原特異性に関係なく血管周囲腔へ到達するが、脳実質に到達できたのは抗原特異的T細胞に限られていた。脳脊髄液中で抗原提示細胞に遭遇し再度活性化されることが、T細胞がグリア境界膜を越えるために必要であると結論づけている。なおリンパ球の移動には、ケモカインシステムや、膜を構成する基底膜を変性させるマトリックス・メタロプロテアーゼ9(MMP-9)などのタンパク分解酵素も重要である。

腸内細菌と腸管免疫系

従来アジア人には少なかったMSがわずか一世代の間にわが国で著増していることから、環境因子の変化が疾患感受性を高めたと考えられる。MSの発症に関与する環境因子として、これまで精神的ストレス、高緯度地域、ビタミンD不足、喫煙、Epstein-Barr(EB)virus感染などの関与が報告されてきた。しかし、これらのリスクだけで発症頻度の増加を説明することは困難である。近年、腸管免疫に関する研究が進歩し、MS病態への関与について検討が始まっている。非吸収性の抗生物質経口投与により全身の免疫系には影響を与えずマウスの腸内細菌の組成を変化させたところ、EAEが軽減化した¹⁴⁾。また、マウスの腸管の

常在菌であるsegmented filamentous bacteriaがTh17細胞誘導能をもち、この細菌がないマウスではやはりEAEが軽減化した¹⁵⁾。自然発症で再発寛解型の脳脊髄炎を示す遺伝子改変マウスを用いた研究で、無菌環境下では脳脊髄炎が発症せず、腸内細菌を定着させると再び自然発症すると報告された¹⁶⁾。従って、MSにおいて腸管免疫系が発症や経過に影響を与える可能性が示唆される。

自然リンパ球の役割

近年自然免疫と獲得免疫の橋渡しの細胞として、両者の特徴を兼ね備えるinnate lymphocyte(自然リンパ球:ILCs)に注目が集まっている。Natural killer(NK)細胞の他、mucosal associated invariant T(MAIT細胞)やiNKT細胞(invariant NKT細胞)が代表的なILCである。MS患者のNK細胞は寛解期にはIL-5を産生し、髄鞘抗原反応性T細胞に対し抑制的に働くことが報告されている¹⁷⁾。MAIT細胞のT細胞受容体の α 鎖はV α 7.2のみ、iNKT細胞ではV α 24と固定されており、抗原受容体の多様性が乏しい(invariant)特徴がある。MAIT細胞は腸管に多いことから名づけられた経緯があるが、血中にも数%以上認められる。MAIT細胞はMSの病変部位で検出されるほか、患者の末梢血中での頻度低下が認められ病態と関連し変化する¹⁸⁾。EAEに対して抑制的な効果をもつことからMS病態に対し制御性の機能が示唆される¹⁹⁾。長らく未知であった抗原がビタミンB2の代謝物質であり腸内細菌が産生に関与することが最近報告された²⁰⁾。iNKT細胞は糖脂質を抗原として認識し、抗原として同定された α -galactoceramideは強いサイトカイン産生能を誘導するが、改変体であるOCHはIFN- γ などのTh1サイトカインの産生は低く、IL-4などのTh2サイトカインを優位に産生しEAEを軽減する効果をもつ²¹⁾。OCHは経口投与でのMS病態の改善効果が期待され、現在筆者の施設で医師主導の臨床試験が進行中である。

炎症惹起性および炎症制御性分子

2001年、Steinmanらのグループにより再発寛解型MSの病巣に発現する遺伝子産物の網羅的解析の結果が報告された²²⁾。もっとも発現の高いグループの中に α B crystallinとオステオポンチン(osteopontin:OPN)が含まれ、病態への関与が検討された。OPNは色々な分子と結合し多様な機能を発揮する炎症惹起性分子であるが、T細胞上の $\alpha4\beta1$ インテグリンに結合するとT細胞活性化と抗アポトーシス作用を発揮する。再発時MS患者髄液での増加がみられ、再発への関与が疑われる。抗 $\alpha4$ インテグリン抗体natalizumabの作用機序の一つはOPNによるT細胞活

性化抑制であると考えられる。一方 α B crystallin は寛解状態との関連が注目されている。低分子量熱ショックタンパク質 (small heat shock proteins : small HSP) の一つであるが、同タンパクを欠損したマウスでは EAE が重症化し、同タンパクを投与すると臨床症状は軽快した。その分子メカニズムとしては、神経細胞やグリア細胞のアポトーシス抑制および炎症性サイトカイン抑制作用が考えられている²³⁾。

B 細胞の関与

MS 患者の髄液では、IgG 産生が亢進していること (IgG index の上昇) や髄腔内特異的な抗体の存在 (オリゴクローナルバンド : oligoclonal band : OCB) が知られ、B 細胞の関与が示唆されてきた。病理学的にも MS の脳病変が 4 種類に分類されるなかで、T 細胞・マクロファージ浸潤とともに IgG や補体成分の沈着を認める病変パターンが最も一般的であると報告されている²⁴⁾。また、B 細胞のマーカーである CD20 に対するモノクローナル抗体 rituximab が再発・寛解型 MS に有効であることが報告されている。rituximab は CD20 陰性の形質芽細胞や形質細胞には作用せず、また髄液 IgG 濃度低下や OCB 消失は伴わなかったことから、効果発現には B 細胞の抗原提示能やサイトカイン産生能の関与が推定されている。一部の 2 次進行型 MS の病理において髄膜リンパ濾胞様構造が認められる²⁵⁾。濾胞内には胚中心様構造もあることから、親和性成熟を伴う B 細胞クローン増殖が髄腔内でおこり、進行性の病態に関与している可能性が示唆される。IFN- β は液性免疫を活性化することが知られているが、IFN- β 投与 MS 患者の血清中の BAFF (B cell-activating factor belonging to the TNF family) 濃度の上昇が報告されている²⁶⁾。BAFF は B 細胞の生存や分化を促進する因子であり、IFN- β で悪化する病態には BAFF を介した B 細胞活性化が関与している可能性がある。

むすび

以上、主として MS の再発病態と Th 細胞の関与に焦点を当て解説した。MS の進行性の病態には未知の部分が多いが、自然免疫系の役割が注目され現在精力的に検討が進められている。また、古くから神経系・内分泌系・免疫系は生体の恒常性維持のためのシステムとして互いに密接に関連することが知られている。例えばステロイドはストレスホルモンであり、リンパ球は神経伝達物質の受容体を発現している。システムバイオロジーの一環として臓器連関が注目されており、今後の展開が期待される。

文献

- 1) Weiner HL. The challenge of multiple sclerosis : how do we cure a chronic heterogeneous disease ? *Ann Neurol.* 2009 ; 65 : 239-48.
- 2) Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature.* 2011 ; 476 : 214-9.
- 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) Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol.* 2009 ; 27 : 485-517.
- 5) Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, et al. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 2005 ; 237 : 123-30.
- 6) Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, et al. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol.* 2009 ; 10 : 1000-7.
- 7) Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, et al. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood.* 2009 ; 113 : 4240-9.
- 8) Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol.* 2011 ; 12 : 255-63.
- 9) Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2009 ; 66 : 390-402.
- 10) Peters A, Lee Y, Kuchroo VK. The many faces of Th17 cells. *Curr Opin Immunol.* 2011 ; 23 : 702-6.
- 11) Jager A, Dardalhon V, Sobel RA, et al. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol.* 2009 ; 183 : 7169-77.
- 12) Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, et al. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med.* 2010 ; 16 : 406-12.
- 13) Bartholomäus I, Kawakami N, Odoardi F, et al. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature.* 2009 ; 462 : 94-8.
- 14) Yokote H, Miyake S, Croxford JL, et al. NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora. *Am J Pathol.* 2008 ; 173 : 1714-23.
- 15) Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell.* 2009 ; 139 : 485-98.
- 16) Berer K, Mues M, Koutrolos M, et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature.* 2011 ; 479 : 538-41.
- 17) Takahashi K, Miyake S, Kondo T, et al. Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2001 ; 107 : 23-9.
- 18) Miyazaki Y, Miyake S, Chiba A, et al. Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int Immunol.* 2011 ; 23 : 529-35.
- 19) Croxford, JL, Miyake S, Huang YY, et al. Invariant V α 19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat Immunol.* 2006 ; 7 : 987-94.
- 20) Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, et al. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature.* 2012 ; 491 : 717-23.
- 21) Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature.* 2001 ; 413 : 531-4.
- 22) Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, et al. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science.* 2001 ; 294 : 1731-5.
- 23) Steinman L. Immunology of relapse and remission in multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2014 ; 32 : 257-81.
- 24) Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, et al. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol.* 1996 ; 6 : 259-74.
- 25) Magliozzi R, Howell O, Vora A, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain.* 2007 ; 130 : 1089-104.
- 26) Krumbholz M, Faber H, Steinmeyer F, et al. Interferon- β increases BAFF levels in multiple sclerosis : implications for B cell autoimmunity. *Brain.* 2008 ; 131 : 1455-63.

II. 基礎研究の進歩

多発性硬化症の動物モデル

—横断的アプローチによる病態解明と治療標的の探索—

大木 伸司 山村 隆

Experimental animal model of multiple sclerosis

—Transverse investigation of MS pathogenesis for therapeutic intervention—

Shinji Oki, Takashi Yamamura

Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system (CNS) in which autoreactive T cells ignites downstream pathogenic cascades. The orphan nuclear receptor, NR4A2, is identified to be a selectively upregulated gene in peripheral blood T cells from relapsing–remitting MS patients. Furthermore, selective upregulation of NR4A2 is observed in peripheral blood T cells and CNS-infiltrating T cells upon immunization with myelin peptide in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Intriguingly, IL-17-producing helper T cells exclusively express NR4A2, suggesting that NR4A2 expression represents a pathogenic T cells in autoimmunity. In addition, a NR4A2 blockade by RNA interference ameliorated EAE, implying the intrinsic roles of NR4A2 in MS/EAE, and could serve as a novel therapeutic target of the diseases.

Key words: multiple sclerosis, EAE, NR4A2, Th17 cell, IL-21

はじめに

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) は、中枢神経系 (CNS) の神経伝導障害に基づく疾患で、病原性 T 細胞の機能亢進に起因する髄鞘の障害が病態形成と密接に関わる。MS のゲノムワイド連鎖解析 (GWAS)¹⁾ において、T 細胞の機能制御遺伝子群との相関が明確に示されたことは、自己免疫疾患としての MS の理解を深め、免疫機能の異常の是正に基づく、MS の予防や治療への道を開いた。例えばリンパ節からのリンパ球の移出を抑制するスフィンゴシン 1 リン酸受容体アンタゴニストのフィンゴリモド、血管内

皮へのリンパ球の接着を阻害し、実質組織への細胞浸潤を抑制する抗 VLA-4 抗体製剤のナタリズマブ、改変ペプチド抗原あるいはミエリン塩基性タンパク質のデコイとして病原性 T 細胞の機能を抑制するペプチド製剤グラチラマー酢酸塩などは、病原性リンパ球の機能抑制を目的に開発されてきた MS 治療薬である。

実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) は、MS の病態解明や新規治療法の評価など、MS という疾患を理解するうえで極めて重要な動物モデルとして長い歴史をもつ²⁾。特に EAE は、自己免疫疾患としての MS の研究に欠かせない実験モデルであるが、上記の GWAS 解析の結果は、ミ

エリン抗原を免疫することで病原性T細胞を能動的に惹起し、病態を誘導するEAEのアプローチに一定の根拠を与えたといえる。その一方で、EAEがMS病態のすべての側面を再現できるわけではないことはいうまでもなく、EAEに由来するデータをいかにMS病態に反映させていくかは、MS研究に携わる研究者の手にほぼ完全に委ねられている。例えば、'EAE'をキーワードとしたPubMedサーチによる7,000報を超える報告の中には、EAEを*in vivo*での一般的な免疫応答の指標として用いている報告が数多く含まれる。MS病態に関連するとは限らないEAE単独の研究報告の解釈には注意が必要であり、数多の論文の中からMSの理解に真に有用な情報を、的確に選別することが重要である。

近年の新規MSの治療薬、あるいは治療薬候補の広がりには目を見張るものがあるが、その背景には新しいMSの病態形成メカニズムの解明があり、EAE研究が少なからぬ貢献をしていることは論を待たない。以前に著者らは、MS患者末梢血T細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、MS患者T細胞で発現亢進するオーファン核内受容体NR4A2を見いだした。引き続きEAEを用いたより詳細な解析から、NR4A2発現T細胞が自己反応性のTh17細胞であることや、NR4A2の機能を抑えることでEAE病態が著しく改善することなどが明らかとなった。

本稿では、MS病態を理解するうえでのEAEの有用性を、著者らがたどった研究の道筋に沿って紹介する³⁾。

1. MSの動物モデルとしてのEAE

—何が'わかり'何が'わからない'のか—

EAEの病態においては、炎症、脱髄、軸索障害、グリオシス、炎症寛解、髄鞘再生など多くの免疫学的・神経病理学的過程を観察することができ、MSの様々な側面を反映しうる有用な動物モデルである。更に、用いる動物種、系統、誘導法などの組み合わせにより、単相型、再発寛解型、持続型などの多様な病型のEAEが誘導可能であり、介入研究の場合は、治療の

タイミング、回数、投与量などの様々なバリエーションにも対応しうる。例えば様々な遺伝子改変マウスの背景系統であるC57BL/6(B6)マウスに、MOG₃₅₋₅₅ペプチドを免疫することで誘導されるactive EAEは、EAE研究の領域で最も頻用されるモデルの一つであるが(図1-a)、特異な単相型の病態が、多様なMS病型とどのように対応するのかについて、いまだに多くの議論がある。このほかに、病原性T細胞の解析に有用なモデルとして、*in vivo*で誘導したミエリン抗原特異的T細胞を未処理マウスに移入して誘導するpassive EAEがある。このように長い歴史に裏打ちされたEAEは、MSの様々な側面を反映した解析を可能にする一方で、MS特有の現象などに対しては、一転して無力さを露呈する。例えば、遺伝学的に均一なマウスEAEは、データのばらつきを最小限にとどめられる反面、ヒトの遺伝的背景を反映したMS病態の多様性の解析には不向きである。またナタリズマブ投与例で発症が報告された進行性多巣性白質脳症の原因となるJCウイルスや、MS病態との関連が示唆されているEBウイルスなどには種特異性があるため、EAEを用いた予測や評価は不可能である⁴⁾。

これまでに、EAEにおいて治療効果が検証され、MSの治療に使われるようになった薬剤として、IFN- β 、グラチラマー酢酸塩やナタリズマブなどのほか、フィンゴリモド、ミトキサントロン、アザチオプリン、ラキニモドなどが挙げられる一方で、EAEを改善したもののMSには無効だった薬剤としては、アナキンラ、TGF- β 、ウステクヌマブなどがある。経口寛容療法、T細胞ワクチン、改変ペプチド抗原などのEAEでは効果が認められた免疫療法も、MSでは奏効が得られていない。EAE研究では、一つあるいはごく少数のパラメーターが指標となることがほとんどであるが、*in vivo*の介入研究では評価の指標をできるかぎり広くとることが望ましい。例えばマクロファージの除去によりEAEが改善する一方で、発症後の神経・髄鞘の再生が抑制される。またプロスタグランジンE2やオステオポンチンは、病原性T細胞を活性化し