

201442019A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患等克服研究事業

(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業))

二次進行型多発性硬化症に対する革新的な医薬品の開発を

促進させる研究

(H26-委託 (難) 一般-019)

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 山村 隆

平成 27 年 (2015 年) 3 月

本報告書は、厚生労働省の平成 26 年度厚生労働科学研究委託事業（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）））による委託業務として、独立行政法人国立精神・神経医療研究センター総長樋口輝彦が実施した平成 26 年度「二次進行型多発性硬化症に対する革新的な医薬品の開発を促進させる研究」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患等克服研究事業

(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業))

二次進行型多発性硬化症に対する革新的な医薬品の開発を

促進させる研究

(H26-委託 (難) 一般-019)

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 山村 隆

平成 27 年 (2015 年) 3 月

## 目 次

I. 委託業務成果報告（総括）		
■二次進行型多発性硬化症に対する革新的な医薬品の開発を促進 させる研究	山村 隆	P1
II. 委託業務成果報告（業務項目）		
■二次進行型 MS の新たな動物モデル創出と新規治療標的分子の探索	大木 伸司	P5
■二次進行型 MS におけるドラッグリポジショニングに関する研究	佐藤 和貴郎	P8
■二次進行型 MS における腸内細菌叢解析	服部 正平	P10
■二次進行型 MS における自然リンパ球およびグリア細胞を標的とする 治療法探索	三宅 幸子	P12
■ネットワーク解析による新規治療標的の探索研究	佐藤 準一	P16
III. 学会等発表実績		P23
IV. 研究成果の刊行物・別刷		P27

# 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費  
(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)))  
委託業務成果報告 (総括)

二次進行型多発性硬化症に対する革新的な医薬品の開発を促進させる研究

業務主任者 山村 隆  
(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 部長

**研究要旨**

多発性硬化症 (MS) は通常再発寛解型 (relapsing-remitting type; RRMS) として発症するが、発病後 5 年以上経過すると、かなりの症例が明確な再発症状を示さないままに徐々に進行する病態を呈する。これが二次進行型多発性硬化症 (SPMS) であり、SPMS に対する確立した治療法はないのが現状である。未治療の RRMS では発症後 10 年以内に 50% が SPMS になり、25 年以内に 90% が SPMS になるともいわれる。現状ではインターフェロン $\beta$  やステロイドによる治療が試みられているが、神経変性の進行を抑制できず、高度の脳萎縮、高次脳機能障害、起立歩行障害などを呈して車椅子生活を余儀なくされるケースが多い。我々が新規に樹立した NR4A2 欠損マウスでは、MS の動物モデルとされる実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の初期病態がほぼ完全に抑制された一方で、新たな病態が遅れて出現した。この後期病態の成立機序およびヒト MS との関連をより詳細に解析した結果、NR4A2 欠損マウスの後期 EAE は Th17 細胞非依存性であり、中枢神経系へ浸潤した T 細胞が特定のマーカー遺伝子を選択的に発現していた。新たに作製した本マーカー遺伝子に対する siRNA の *in vivo* 投与により、後期 EAE 病態が有意に改善したことから、このマーカー遺伝子の発現が後期 EAE の病態形成に密接に関わる事が示された。SPMS 患者末梢血で、対応するヒトのマーカー遺伝子を発現する T 細胞が増加していることから、SPMS の新規モデル動物としての NR4A2 欠損マウスの EAE の樹立に成功したと考えている。今後、本マウスの EAE を詳細に解析する事により、病態形成機序の解明や新規治療法の開発が飛躍的に進展することが期待される。

**担当責任者**

大木 伸司

(独) 国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所疾病研究第六部 室長

佐藤和貴郎

(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

服部 正平

東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授

三宅 幸子

順天堂大学医学部免疫学講座 教授

佐藤 準一

明治薬科大学薬学部生命創薬科学科 教授

**A. 研究目的**

多発性硬化症 (MS) は通常再発寛解型 (relapsing-remitting type; RRMS) として発症するが、発病後 5 年以上経過すると、かなりの症例が明確な再発症状を示さないままに徐々に進行する病態を呈する。これが二次進行型多発性硬化症 (SPMS) であり、SPMS に対する確立した治療法はないのが現状である。病因の解明に基づく新しい治療法開発が切望されているが、実際には病態形成機序の解明すら十分に進んでいるとはいえ、これには適当な動物モデルが確立されていないことも関連の研究が進まない大きな要因のひとつと考えられる。本研究では、進行型 MS の病態解明と新規治療法の開発に有用な、新しい進

行型 MS の動物モデルの作製、およびこれを用いた SPMS 病態形成機序の解明を目的として研究を進めた。

## B. 研究方法

ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) 由来ペプチド (MOG35-55) あるいはプロテオリピッドプロテイン (PLP) 由来ペプチド (PLP139-151) をフロイント完全アジュバントと混合して得たエマルジョンを、C57BL/6J (B6) マウスの皮下に免疫することで、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導した。病態マウスから末梢血、リンパ節と脾臓を回収し、分散後フローサイトメーターを用いて T 細胞を分取した。標的臓器 (脳・脊髄あるいは眼球)、は、それぞれコラゲナーゼ・DNase I 処理後にパーコール密度勾配遠心法で単核球を分離し、フローサイトメーターを用いて T 細胞を分取した。T 細胞から RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法を用いて遺伝子発現解析を行った。T 細胞を刺激培養した後の上清中のサイトカイン産生を、ELISA 法、細胞内サイトカイン染色法などを用いて定量した。定法に従って NR4A2 遺伝子内に loxP 配列を挿入して得られた flox マウスを、CD4-Cre マウスと交配して NR4A2cKO マウスを得た。得られた NR4A2cKO マウス、および対照として non-Cre の littermate を用いて実験を行った。後期 EAE 病態に関わる病原性 T 細胞が選択的に発現するマーカー遺伝子に対して、新規に siRNA をデザインし、十分な抑制効果を示す siRNA を取得した。得られた siRNA をコラーゲンマトリクスに封入して安定化させ、EAE を誘導したマウスに静脈投与して、病態抑制効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、ヒトを対象とする医学系研究に対する倫理指針に基づいて作成した実験計画書をセンター内の倫理委員会提出し、その承認を受けた上で研究を行った。インフォームドコンセントを得た上で、患者あるいは健常人の末梢血を採取した。また本研究においては、あらかじめ当研究所の動物実験規

定に沿って作成した実験計画書を提出し、実験動物委員会の承認を受けた実験方法に従って、研究を進めた。

## C. 研究結果

### NR4A2cKO の EAE の臨床経過

B6 背景の NR4A2cKO マウスに MOG35-55 を免疫して、EAE を誘導したところ、対照マウスで見られる誘導初期の EAE 病態 (~day 25) が NR4A2cKO マウスでは著しく減弱し、IL-17 産生も強く抑制されていたことから、ヘルパー T 細胞の NR4A2 発現が、自己反応性 Th17 細胞の誘導と EAE 病態の形成に極めて重要な分子であることが明らかとなった。EAE の初期病態が減弱した NR4A2cKO マウスの観察をそのまま続けると、誘導後 25 日目前後から EAE 様の病態を急激に発症することが分かった。NR4A2cKO マウスで認められるこの EAE 様病態は、対照マウスの EAE 病態と臨床上区別することが困難であったことから、以後この病態を後期 EAE 病態として、急性期病態とは独立した病態として解析を進めることとした。後期 EAE 病態下では、CNS への有意な T 細胞浸潤を認めたものの、病態と関連した浸潤 T 細胞数の変動は認められないことから、浸潤 T 細胞数の観点からこの急激な病態形成を説明することは困難であると考えられた。またこの T 細胞は、再刺激後に IL-17 産生を産生せず、Th17 細胞とは異なる T 細胞群と考えられた。

### 後期 EAE 病態下で CNS に浸潤する T 細胞の解析

この後期 EAE 病態下で CNS に浸潤する T 細胞の性状をさらに解析するために、野生型マウスおよび NR4A2cKO マウスに MOG ペプチドを免疫し、それぞれ初期および後期病態の形成時に CNS に浸潤した T 細胞を分離回収し、GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析を試みた。その結果、NR4A2cKO マウスの後期 EAE 病態発症時に CNS に浸潤した T 細胞において、ある特定の遺伝子発現の亢進を認めた。CNS 浸潤 T 細胞におけるこの遺伝子の発現は、野生型マウスの EAE でも後期病態期に亢進していた。引き続きフロ

一サイトメーターを用いた同 T 細胞の解析より、この遺伝子の発現がタンパク質レベルでも亢進している事を確認した。

#### siRNA を用いた後期 EAE 病態制御の試み

後期 EAE 病態に関わる病原性 T 細胞が選択的に発現するこのマーカー遺伝子に対して、siRNA のデザインを試み、in vitro で十分な抑制効果を示す siRNA を取得した。得られた siRNA をコラーゲンマトリクスに封入して安定化させ、後期 EAE 病態を発症した NR4A2cKO マウスに静脈投与して、病態抑制効果の有無を検討した。その結果、siRNA 投与群では有意な後期 EAE 病態の抑制が得られた。以上の結果から、同定したマーカー遺伝子が、後期 EAE 病態の制御に深く関与しており、その発現および機能を制御する事で、この後期 EAE 病態の制御が可能である事が示された。

#### 後期 EAE 病態とヒト MS 病態の関連の解析

NR4A2 は元々、RRMS 患者末梢血において発現亢進する遺伝子として我々が見いだした分子であり、その後の EAE を用いた解析から、自己免疫疾患に深く関わる Th17 細胞の重要な機能制御分子である事を報告するに至った。一方、上記の解析から後期 EAE 病態に対する Th17 細胞の関与は認められず、マーカー遺伝子を発現する別の T 細胞が病態形成に関わる事が明らかとなった。したがって、マーカー遺伝子陽性 T 細胞により引き起こされる後期 EAE 病態と、ヒト MS 病態との関連を明らかにするために、MS 患者あるいは健常人より提供された末梢血における、ヒトのマーカー遺伝子陽性 T 細胞の挙動を解析した。その結果、RRMS 患者末梢血中のマーカー遺伝子陽性 T 細胞は、健常人と同程度で、いずれも低値に留まった。一方、SPMS 患者の末梢血においては、マーカー遺伝子を発現する T 細胞が増加しており、健常人および RRMS 患者と有意な差を認めた。以上の結果から、このマーカー遺伝子を発現する T 細胞が増加は SPMS 病態と密接に関わる可能性が示され、NR4A2 マウスで認められる後期 EAE 病態は、SPMS の新規

動物モデルとして有用であることが示された。

#### **D. 考察**

RRMS 患者の T 細胞で発現が亢進する因子 NR4A2 の、病原性 Th17 細胞の機能制御と EAE 病態形成への関与を明らかにしたことをきっかけとして作製した NR4A2cKO マウスの EAE では、RRMS に相当すると考えられる Th17 細胞依存性の初期病態が強く抑制される一方で、後期 EAE を発症することが明らかとなった。後期 EAE 病態下で CNS に浸潤する T 細胞はある特定のマーカー遺伝子を発現するユニークな細胞で、このマーカー遺伝子の発現は、後期 EAE 病態形成において中心的な機能を有する事が示された。さらに、対応するヒトのマーカー遺伝子を発現する T 細胞が、SPMS 患者の末梢血で選択的に亢進していた事から、NR4A2 マウスの後期 EAE 病態は、SPMS の新規動物モデルとして有用であると考えられた。今回の解析から、一見单相型の病態を示す B6 マウスの EAE は、RRMS に対応し NR4A2 依存性の初期病態と、SPMS に対応し NR4A2 非依存性の後期病態からなる事が明らかとなった。初期病態が維持される野生型マウスでは、後期病態を独立して観察することは不可能なため、今回新たに樹立した NR4A2cKO マウスを用いた後期 EAE は、これまでほぼ手つかずであった SPMS の病態形成機序およびこれに基づく新規治療法の開発をすすめる上で、極めて有用な病態モデルを提供すると考えられる。

#### **E. 結論**

新規に樹立した NR4A2 欠損マウスの EAE ではユニークなマーカー遺伝子を発現する T 細胞群が病態形成に関与し、その病態が SPMS 病態に対応する可能性が示された。SPMS の病態解明および治療法開発をすすめる上で、NR4A2 欠損マウスの後期 EAE は極めて有望な動物モデルと考えられる。



## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Niino, M. et al. Apathy/depression, but not subjective fatigue, is related with cognitive dysfunction in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol* 2014 Jan 6; 14 (1)3.

Nakamura, M. et al. Differential effects of fingolimod on B-cell populations in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis J* 20: 1371-1380, 2014

Araki, M., T. Matsuoka, K. Miyamoto, S. Kusunoki, T. Okamoto, M. Murata, S. Miyake, T. Aranami, and T. Yamamura: Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica: A pilot study. *Neurology* 82: 1302-1306, 2014

Yamamura, T.: How do T cells mediate central nervous system inflammation? *Clin Exp Neuroimmunol* 5: 17, 2014

大木伸司, 山村 隆: 多発性硬化症の動物モデル. *日本臨床* 72: 1935-1940, 2014

佐藤和貴郎, 山村 隆: 免疫動態. 多発性硬化症のパラダイムシフト -病態から治療まで. *Clinical Neuroscience* 32: 1218-1221, 2014

### 2. 学会発表

山村 隆: 多発性硬化症に対する免疫介入試験におけるヒト免疫応答解析. シンポジウム「ヒト免疫研究法の進展開 New strategy for human immunology research」. 第42回日本臨床免疫学会総会. 東京. 9.25, 2014

山村 隆: 免疫性神経疾患と Precision Medicine. 6学会合同シンポジウム 免疫疾患のB細胞と自己抗体: 病態解明から新規治療応用まで. 第42回日本臨床免疫学会総会.

東京. 9.26, 2014

Yamamura, T. : Plasmablasts secreting autoantibodies in the pathogenesis of neuromyelitis optica. Concurrent symposia. Autoantibodies in neurological autoimmune disorders. Mainz, Germany, 11.13, 2014

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

発明の名称: 進行型免疫性脱髄疾患治療剤  
出願人: (独) 国立精神・神経医療研究センター

発明者: 大木 伸司、北條 浩彦、山村 隆  
出願番号: 特願2014-135630  
出願日: 平成26年7月1日

発明の名称: 進行型免疫性脱髄疾患治療剤  
出願人: (独) (国立精神・神経医療研究センター)

発明者: 大木 伸司、山村 隆  
出願番号: 特願2015-6142  
出願日: 平成27年1月15日

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

## 委託業務成果報告（業務項目）

## 二次進行型 MS の新たな動物モデル創出と新規治療標的分子の探索

担当責任者 大木 伸司

(独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第六部 室長

### 研究要旨

中枢神経系の炎症背脱髄疾患である多発性硬化症 (MS) は、髄鞘抗原に対する過剰な免疫応答に起因する自己免疫疾患である。MS の病型には多様性があり、初発患者のほとんどが、増悪と寛解を繰り返す再発寛解型 MS (RRMS) として発症するが、罹患期間が延びるにつれて RRMS 患者の半数近くが、寛解を経ることなく病態が徐々に悪化する二次進行型 MS (SPMS) へ移行する。適当な動物モデルが確立されていないこともあり、SPMS の病因の解明は著しく遅れており、SPMS に対して有効な治療法はないに等しい。我々は、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を用いた解析から、RRMS 患者の T 細胞で発現が亢進する因子として見いだした NR4A2 が、病原性 Th17 細胞の機能制御と EAE 病態の形成に関与することを以前より示してきた。今回、新規に樹立した NR4A2 欠損マウスでは、初期の EAE 病態がほぼ完全に抑制された一方で、新たな病態が遅れて出現することを見いだした。SPMS を含む既存の MS 病態を理解する上で、NR4A2 欠損マウスの後期 EAE は極めて有望な動物モデルと考えられる。

### A. 研究目的

中枢神経系の炎症背脱髄疾患である多発性硬化症 (MS) は、髄鞘抗原に対する過剰な免疫応答に起因する自己免疫疾患である。MS の病型には多様性があり、初発患者のほとんどが、増悪と寛解を繰り返す再発寛解型 MS (RRMS) として発症するが、罹患期間が延びるにつれて RRMS 患者の半数近くが、寛解を経ることなく病態が徐々に悪化する二次進行型 MS (SPMS) へ移行する。RRMS に対する治療薬の選択肢が急速に広がる一方で、SPMS に対して有効な治療法はないに等しい。病因の解明に基づく新しい治療法開発が切望されているが、適当な動物モデルが確立されていないことも関連の研究が進展しない大きな要因のひとつと考えられる。本研究では、進行型 MS の病態解明と新規治療法の開発を目指して、新しい進行型 MS の動物モデルの作製を目的として研究を進めた。

### B. 研究方法

ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) 由来ペプチド (MOG35-55) あるいはプロテオリピッドプロテイン (PLP) 由来ペプチド (PLP139-151) をフロイント完全アジュバントと混合して得たエマルジョンを、C57BL/6J (B6) マウス、SJL/J マウスあるいは NR4A2cKO マウスの皮下に免疫することで、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導した。病態マウスから末梢血、リンパ節と脾臓を回収し、分散後フローサイトメーターを用いて T 細胞を分取した。標的臓器 (脳・脊髄あるいは眼球)、は、それぞれコラゲナーゼ・DNase I 処理後にパーコール密度勾配遠心法で単核球を分離し、フローサイトメーターを用いて T 細胞を分取した。T 細胞から RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法を用いて遺伝子発現解析を行った。T 細胞を刺激培養した後の上清中のサイトカイン産生を、ELISA 法、細胞内サイトカイン染色法などを用いて定量した。コラーゲンマトリクスに封入して安定化させた NR4A2 特異的 siRNA を、EAE を誘導した B6 マ

ウスに静脈投与して、病態抑制効果を検討した。定法に従って NR4A2 遺伝子内に loxP 配列を挿入して得られた flox マウスを、CD4-Cre マウスと交配して NR4A2cKO マウスを得た。得られた NR4AcKO マウス、および対照として non-Cre の littermate を用いて実験を行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては、あらかじめ当研究所の動物実験規定に沿って作成した実験計画書を提出し、実験動物委員会の承認を受けた方法に従って、実験を行った。

## C. 研究結果

### NR4A2cKO マウスの作製

定法に従って、NR4A2cKO マウスを得た。具体的には、NR4A2 遺伝子を含む BAC クローンを用いてベクターを構築した。NR4A2 遺伝子のエクソン 3 (開始コドンを含む) とエクソン 4 をはさむ位置に loxP 配列をそれぞれ挿入した。得られたターゲットベクターをエレクトロポレーションにて導入し、薬剤選択後に得られたクローンに対して PCR スクリーニングを行い、陽性クローンを得た。得られた ES 細胞クローンをマイクロインジェクションし、キメラマウスを取得した。ジャームライントランスミッションが確認できた個体を用いて交配を行い、ヘテロマウスを得た。Flp マウスと交配してゲノム中の薬剤耐性カセットを除去後、得られた個体を CD4<sup>-</sup> Cre マウスと交配することで NR4A2cKO マウスを得た。さらに得られた NR4A2cKO マウスを用いて、SJL/J マウスへの戻し交配を 10 世代繰り返し、SJL/J 背景の NR4A2 cKO マウスを得た。

### NR4A2cKO の EAE の臨床経過

B6 背景の NR4A2cKO マウスに MOG35-55 を免疫して、EAE を誘導した。その結果、NR4A2cKO マウスでは、対照マウスで見られる誘導初期の EAE 病態 (~day 25) が著しく減弱することが明らかとなった。この時、中枢神経系

(CNS) に浸潤した T 細胞数を比較すると、NR4A2cKO マウスでは対照マウスの約半分にまで減少していた。さらにこの CNS 由来 T 細胞

を再刺激した際に産生される IL-17 を比較すると、対照マウスで見られる高い IL-17 産生が、NR4A2cKO マウスでは強く抑制されていることが分かった。以上より、ヘルパー T 細胞の NR4A2 発現が、自己反応性 Th17 細胞の誘導と、これによる EAE 病態の形成に極めて重要な分子であることが明らかとなった。

EAE の初期病態の減弱を認めた NR4A2cKO マウスの観察をそのまま続けると、day 25 以降に急激な EAE 様病態を発症することが明らかとなった。NR4A2cKO マウスで選択的に認められるこの EAE 様病態は、対照マウスの EAE 病態と極めて類似しており、臨床上区別することが極めて困難であったことから、以後この病態を後期 EAE 病態として、急性期病態と区別して表記することにした。不思議なことに後期 EAE 病態下で CNS に浸潤した細胞数は、EAE 病態が強く抑制されていた期間の細胞数と同程度であり、病態形成に相関した浸潤細胞数の増加は認められなかった。さらに後期 EAE 病態下の CNS 由来 T 細胞を再刺激しても IL-17 産生は認められず、残存する T 細胞は Th17 細胞とは異なる T 細胞群であることが明らかとなった。

SJL/J マウスに PLP139-151 を免疫すると、EAE の再発寛解型病態に類似した病態を示すことが知られている。戻し交配により作製した SJL 背景の NR4A2cKO マウスに PLP139-151 を免疫して EAE を誘導すると、対照マウスで認められる再発寛解型病態がほぼ完全に抑制され、約 60 日目までの観察において、B6 背景の NR4A2cKO マウスで認められた様な後期 EAE 病態に類似する病態の形成を認めなかった。以上より、B6 背景の NR4A2cKO マウスで観察される後期 EAE は、B6 背景のマウスに MOG35-55 を免疫することによってのみ誘導される、極めてユニークな病態であることが明らかとなった。

## D. 考察

これまで EAE を用いたさまざまな解析から示してきた通り、RRMS 患者の T 細胞で発現が亢進する因子 NR4A2 が、病原性 Th17 細胞の機能

制御と EAE 病態の形成に関与することが、NR4A2cKO マウスの EAE を用いた解析からも確認された。予想外なことに、B6 背景の NR4A2cKO マウスでは、初期病態が強く抑制される一方で、後期 EAE を発症した。再発寛解型病態を示す SJL 背景の NR4A2cKO マウスではこのような後期 EAE 病態が観察されなかったことから、B6 マウスの初期 EAE 病態と SJL マウスの再発寛解型 EAE は、NR4A2 依存性の Th17 細胞の自己免疫応答に起因する病態であり、RRMS 病態と密接に関わるイベントであると考えられた。一方、今回の解析から、一見单相型の病態を示す B6 マウスの EAE では、NR4A2 非依存性の後期病態が形成されることが、NR4A2cKO マウスを用いた解析から示された。今後、この後期 EAE が、ヒト MS のどのような病態に対応するのかを明らかにすることによって、全く新しい MS の動物モデルの樹立が可能となる。初期病態が維持される野生型マウスでは、後期病態は覆い隠されてしまい、独立して観察することは不可能なため、NR4A2cKO マウスを用いた EAE は、CNS に形成される未知の炎症性自己免疫性病態の解析を可能にする、極めてユニークな病態モデルを提供すると考えられる

## E. 結論

新規に樹立した NR4A2 欠損マウスでは、初期の EAE 病態がほぼ完全に抑制された一方で、新たな病態が遅れて出現することを見いだした。SPMS を含む既存の MS 病態を理解する上で、NR4A2 欠損マウスの後期 EAE は極めて有望な動物モデルと考えられる。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Shinji Oki; Towards understanding the role of orphan nuclear receptor NR4A2 in Th17 cell-mediated CNS autoimmunity: An experimental approach employing an animal model of multiple sclerosis. Clin. Exp.

Neuroimmunol. 5, 137-148 (2014) The Japanese Society for Neuroimmunology

大木 伸司、山村 隆; 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 - 日本臨床 (日本臨床社) 第 72 巻 第 11 号 1935-1940, (2014)

### 2. 学会発表

Ben Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura: NR4A2 modulation during autoimmune inflammation of the central nervous system reduces pathogenic T cell responses and ameliorates clinical disease. The 12th International Congress of Neuroimmunology, Mainz Germany, Nov. 11th- 14th, 2014

Ben Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura: NR4A2 controls pathogenic 'switched' Th17 cells in the CNS during autoimmune inflammation. 第 43 回 日本免疫学会総会・学術集会 京都 12 月 10 日-12 日 2014 年

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

発明の名称：進行型免疫性脱髄疾患治療剤  
出願人：(独) 国立精神・神経医療研究センター

発明者：大木 伸司、北條 浩彦、山村 隆  
出願番号：特願 2014-135630  
出願日：平成 26 年 7 月 1 日

発明の名称：進行型免疫性脱髄疾患治療剤  
出願人：(独) (国立精神・神経医療研究センター)

発明者：大木 伸司、山村 隆  
出願番号：特願 2015-6142  
出願日：平成 27 年 1 月 15 日

2. 実用新案登録 特になし

3. その他 特になし

## 二次進行型 MS におけるドラッグリポジショニングに関する研究

担当責任者 佐藤 和貴郎  
(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

### 研究要旨

多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) は中枢神経系を標的とする自己免疫疾患と考えられ、病態に関して解明すべき課題は多い。MS の再発病態に重要なヘルパーT細胞について、ケモカイン受容体の多重発現解析を行った。MS では CCR5 陽性細胞、とくに CCR5 陽性 CCR6 陽性細胞が増加していた。同細胞は刺激によりインターフェロン $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) およびインターロイキン 17 (IL-17) を産生するなど病原性 Th17 細胞の特徴を有し、免疫抑制剤の排出能をもつ P 糖蛋白質を高発現し、薬剤抵抗性の分画と考えられた。

### A. 研究目的

多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) では、CD4 陽性 T 細胞の病原性、なかでも Th1 細胞と Th17 細胞の両者の特徴をもつ病原性 T 細胞が重要である。Th1 細胞は CCR5、CXCR3 を、Th17 細胞は CCR6 を高発現するなど Th 細胞は特徴的なケモカイン受容体を発現する。MS 患者におけるケモカイン受容体多重陽性細胞の頻度を調べることにより、疾患と関連する分画を同定できる可能性がある。さらに、その分画の機能解析を行い、疾患への関与、「病原性」を付与する因子について検討する。また、ステロイドや免疫抑制剤の排出に関わる P 糖蛋白質の発現解析を行い、薬剤抵抗性因子について調べる。

### B. 研究方法

対象は、当センター病院に通院中の McDonald の診断基準を満たす MS 患者 15 名 (再発寛解型 13 名、進行型 2 名、男性 6 名、女性 9 名、41 歳 $\pm$ 11 歳)。対照は年齢性別をマッチさせた健常者および、非免疫性の神経疾患、免疫性神経疾患 (慢性炎症性脱髄性多発神経炎: CIDP) 患者。末梢血中の T 細胞における多重陽性細胞の頻度について解析を行い、比較検討した。

(倫理面への配慮) 本研究は当センターの倫理委員会にて承認の上行われた。

### C. 研究結果

MS 患者では末梢血中の CCR5+CCR6+ (以下 5+6+) および CCR5+CXCR3+ (以下 5+3+) メモリー Th 細胞の頻度が健常者や CIDP 患者と比べ、有意に ( $p < 0.05$ ) 上昇していた。5+6+Th 細胞は、刺激により IFN $\gamma$  および IL-17 の両者を産生する、転写因子 ROR $\gamma$  と T-bet を発現するなど、「病原性」Th17 細胞として知られている特徴を持っていた。またこれらの細胞は、P 糖蛋白質発現細胞を高頻度に含んでいた。

### D. 考察

MS 患者末梢血における 5+6+ および 5+3+Th 細胞の増加は疾患における同細胞の病原性を反映している可能性がある。また薬剤抵抗性を付与する細胞である可能性がある。脳脊髄液中の同細胞について現在解析中である。

### E. 結論

MS 病態における CCR5+CCR6+Th 細胞および CCR5+CXCR3+Th 細胞の重要性が示唆された。

### F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 佐藤和貴郎 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 *Peripheral Nerve* 25(2), 238-242, 2014
2. 佐藤和貴郎 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 *Jpn. J. Clin. Immunol* 37(2), 83-89, 2014
3. Wakiro Sato Chemokine receptors on T cells in multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 5(2), 162-174, 2014
4. Wakiro Sato et al. CCR2+CCR5+ T Cells Producing Matrix Metalloproteinase-9 and Osteopontin in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *J. of Immunol* 189: 5057-5065, 2012

### 2. 学会発表

1. 佐藤和貴郎 CIDP における T細胞ケモカイン受容体の解析 シンポジウム4「免疫介在性末梢神経障害の診断と治療」第25回日本末梢神経学会, 京都, 8.30, 2014
2. Wakiro Sato et al chemokine receptor expressions on T cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy Mainz, 11,12,2014

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

## 二次進行型 MS における腸内細菌叢解析

担当責任者 服部正平 東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授

### 研究要旨

多発性硬化症 (Multiple sclerosis, MS) は慢性的な中枢神経系の脱髄疾患であり、欧米では非常に多く近年日本及びアジア諸国においても患者数が急増している。MS の原因としては遺伝的な要因と環境的な要因が知られており、T 細胞に腸内細菌叢が影響を及ぼし様々な自己免疫性疾患に重要な役割をしていることが示唆されている。本研究では、環境要因としての MS 患者の腸内 (糞便) 細菌叢を解析し、これら MS 群のデータと健常者腸内細菌叢データとの比較解析から、MS 腸内細菌叢の特徴解明を行った。

### A. 研究目的

本研究は、MS 患者群の腸内細菌叢の菌種及び遺伝子組成を解析し、健常者群との比較による MS 腸内細菌叢の特徴及び本疾患におけるバイオマーカーあるいは発症に関わる細菌種・遺伝子・代謝系を解明し、MS 発症と腸内細菌叢の関係を明らかにすることを目的とする。

### B. 研究方法

MS 患者群及び成人健常者群の糞便から調製した腸内細菌叢 DNA について、次世代シーケンサー (ロシュ社 454 やライフテクノロジー社 Ion PGM 等) を用いて、16S リボソーム RNA 遺伝子 (16S) 及びメタゲノムデータを収集する。得られた 16S データの OTU クラスタリング及びデータベースへの類似度検索により、各細菌叢の菌種と菌種組成比を解明し、また、系統樹を作成する。さらに、MS 群と健常者群間の上記 16S データの比較解析により、MS 群に有意に増減する菌種の特定等を行う。また、MS 群と健常者群の系統樹の比較解析 (UniFrac 距離解析) により菌叢全体構造の両群間類似性を評価する。さらに、両群間のメタゲノムデータを比較することにより、両群間で有意に増減する遺伝子あるいは代謝系等の情報を得て、両群間の細菌叢機能の相違

を評価する。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した腸内細菌叢検体については、研究代表者の機関等における生命倫理審査会の承認を得ている。

### C. 研究結果

これまでに 20 名の MS 被験者の糞便及び腸内細菌叢を採取した。これらの検体から 454GS を用いて計 141,549 リード (7,080 ± 825 リード/被験者) の 16S データを収集した。この MS データから計 6 万リード (3,000 リード/MS 被験者) と 40 名の健常者から得た 12 万リード (3,000 リード/健常者) を用いて OTU (菌種) 数、UniFrac 距離、菌種組成の比較解析を行った。その結果、OTU (菌種) 数は MS 群と健常者群間において有意な差はみられなかった。一方、UniFrac 距離解析では両群の腸内細菌叢の全体構造が統計学的に有意に異なっていることを見いだした ( $P < 0.05$ )。そこで、門、属、種レベルでの両群間に違いを生じる菌種の探索を行った。門レベルでは優占する Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria の 4 門の組成比は両群間に統計学的有意さはなかった。しかし、属レベルにおいて Bacteroides, Faecalibacterium, Anaerostipes, Roseburia



の4属がMS群で有意に減少していた。さらに、種レベルにおいて、M群で有意に減少している12菌種と有意に増加している10菌種を検出した。MS群で有意に減少していた12菌種の多くは減少していた4属に含まれていた。

#### D. 考察

炎症性腸疾患（IBD）等の疾患患者の腸内細菌叢は、健常者との比較において細菌叢構造の異常（dysbiosis）を示すことが知られている。MS群の腸内細菌叢のOTU（菌種）数は健常者群との間で有意な違いはなかったが、UniFrac 距離解析は明らかな両群間の違いを示した。また、両群間で特徴的に増減する菌種を検出した。これらの結果は、MS腸内細菌叢は中程度の細菌叢の構造異常（dysbiosis）をもつことが示唆された。とくに、検出されたMS群において有意に増減していた22菌種の特徴はMS発症の機構解明に有用であると考えられる。

#### E. 結論

大量の16S配列データを用いた細菌叢解析から、MS腸内細菌叢は健常者群との比較において、菌叢構造が有意に異なっていることを明らかにした。このことはMS発症に腸内細菌叢のdysbiosisが関与することを強く示唆するものである。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kawamoto S 他: Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* 41: 152-65 (2014).
2. Narushima S 他: Characterization of the 17 strains of regulatory T cell-inducing human-derived Clostridia. *Gut Microbes* 5: 1-7 (2014).

3. Said HS 他: Dysbiosis of Salivary Microbiota in Inflammatory Bowel Disease and Its Association With Oral Immunological Biomarkers. *DNA Res.* 21: 15-25 (2014).

##### 2. 学会発表

なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 二次進行型 MS における自然リンパ球およびグリア細胞を標的とする治療法探索

担当責任者 三宅 幸子 順天堂大学医学部免疫学講座 教授

研究要旨: ミクログリアは単球/マクロファージ系に属する中枢神経系の自然免疫細胞であり、中枢神経系の発達に関わるとともに、神経保護作用、抗炎症作用を有し、中枢神経系のホメオスタシスの維持に寄与している。一方で炎症性反応や神経変性過程に関与し、多発性硬化症の病態、特に 2 次進行型の病態に重要な役割を担っていると考えられる。microRNA は 18~25 塩基長の non-coding RNA で、標的 mRNA の相補的配列と結合し、その発現を抑制することで細胞の様々な機能を調節している。約 700 種類の microRNA 阻害剤をスクリーニングし、LN<sup>-</sup>細胞のミクログリア様細胞への分化を抑制する数種類の microRNA 阻害剤を発見した。さらにそれらの microRNA を加えて培養したところ、miR-101 は LN<sup>-</sup>細胞のミクログリア様細胞への分化を促進した。さらに、miR-101 はミクログリアからの IL-6 産生をコントロールに比べて上昇させた。miR-101 は、ミクログリアの分化および機能を調節している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

ミクログリアは単球/マクロファージ系に属する中枢神経系の自然免疫細胞であり、中枢神経系の発達に関わるとともに、神経保護作用、抗炎症作用を有し、中枢神経系のホメオスタシスの維持に寄与している。一方で炎症性反応や神経変性過程に関与し、多発性硬化症の病態、特に 2 次進行型の病態に重要な役割を担っていると考えられる。

microRNA は 18~25 塩基長の non-coding RNA で、標的 mRNA の相補的配列と結合し、その発現を抑制することで細胞の様々な機能を調節していることから注目されている。本研究では、ミクログリアの分化や機能調節に関与する microRNA について検討した。

### B. 研究方法

C57/BL6J マウス由来のミクログリア・アストロサイト混合培養から CD11b beads を用

いてミクログリアを除去し、アストロサイト単独培養を作成した。その上に EGFP-ACTB マウスの Lineage Negative (LN<sup>-</sup>) 細胞を播種すると、TRM2 陽性のミクログリア様細胞を誘導した。

誘導中に microRNA 阻害剤を加えて 7 日間培養後した後に、形態および表面マーカー、サイトカイン産生について解析した。

### C. 研究結果

約 700 種類の microRNA 阻害剤をマウス LN<sup>-</sup>細胞に導入してアストロサイトと共培養したところ、LN<sup>-</sup>細胞のミクログリア様細胞への分化を抑制する数種類の microRNA 阻害剤を発見した。さらにそれらの microRNA を加えて培養したところ、miR-101 が microRNA で阻害剤とは反対に LN<sup>-</sup>細胞のミクログリア様細胞への分化が促進された。miR-101 を加えた培養上清中の IL-6 はコン

トロールに比べて上昇していた。この microRNA が LN 細胞のミクログリア様細胞への分化および活性化を調節している可能性が示唆された。

#### D. 考察

microRNA は、様々な細胞の機能調節に重要であることが報告されている。ミクログリア様細胞への分化には、miR-101 が関与していた。今回は *in vitro* の解析なので、今後は *in vivo* での解析が必要であろう。miR-101 は、ミクログリアのサイトカイン産生にも影響を与えた。今後は、どのようなサイトカイン産生に関与するのか、他のどのような機能に関与するのか、また標的となる mRNA は何かについて検討をすすめることが重要である。

#### E. 結論

miR-101 は LN 細胞からミクログリア様細胞への分化を促進し、ミクログリアのサイトカイン産生調節に関与することが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Araki M, Matsuoka T, Miyamoto K, Kusunoki S, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Aranami T, Yamamura T. Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica: A pilot study. *Neurology*, 82(15):1302-1306, 2014

2) Kamachi F, Harada N, Usui Y, Sakanishi T, Ishii N, Okumura K, Miyake S, Akiba H.

OX40 ligand regulates splenic CD8(-) dendritic cell-induced Th2 responses *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*. 444(2):235-40, 2014

3) Nakamura M, Matsuoka T, Chihara N, Miyake S, Sato W, Araki M, Okamoto T, Lin Y, Ogawa M, Murata M, Aranami T, Yamamura T. Differential effects of fingolimod on B-cell populations in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 20(10):1371-80, 2014

##### 2. 学会発表

1) Kadowaki A, Miyake S, Chiba A, Yamamura T. Myelin Reactive T cells in the Gut Regulate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). FOCIS 2014, Chicago, USA, 6.26, 2014

2) Noto D, Araki M, Sato W, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Yamamura T. First-in-Human Phase 1 Study of Invariant NKT Cell Ligand OCH. FOCIS 2014, Chicago, USA, 6.26, 2014

3) Nakamura T, Matsuoka T, Araki M, Sato W, Lin Y, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Aranami T, Yamamura T. An Increased Proportion of IL-6-dependent Plasmablasts Characterizes Interferon beta-resistant Patients with Relapsing-remitting Multiple Sclerosis. FOCIS 2014, Chicago, USA, 6.26, 2014

4) Noto D, Araki M, Sato W, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Yamamura T. First-in-Human Phase 1 Study of Invariant NKT Cell Ligand OCH.

MSBOSTON2014, Boston, USA, 9.11, 2014

5) Matsuoka T, Chiba A, Aranami T, Nakamura M, Sato W, Miyake S, Yamamura T. The increase of CD56 high NK cells and activate Treg-cells in patient with neuromyelitis optica after treatment with anti-IL-6R antibody tocilizumab.

MSBOSTON2014, Boston, USA, 9.12, 2014

6) Chihara N, Aranami T, Oki S, Matsuoka T, Murata M, Toda T, Miyake S, Yamamura T. Plasmablasts as AQP4-Ab producers in the pathogenesis of neuromyelitis optica. MSBOSTON2014, Boston, USA, 9.12, 2014

7) Kadowaki A, Miyake S, Chiba A, Yamamura T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by gut resident T cells. 12th International Congress of Neuroimmunology, Mainz, Germany, 11.12, 2014

8) 三宅幸子, 千葉麻子. NKT 細胞による自己免疫疾患の制御. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会 東京 4.25.2014

9) 林絵利, 千葉麻子, 多田久里守, 山路健, 田村直人, 高崎芳成, 三宅幸子. 強直性脊椎炎患者における免疫細胞の解析. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会 東京 4.26.2014

10) 荒木学, 佐藤和貴郎, 岡本智子, 村田美穂, 三宅幸子, 山村隆. 多発性硬化症を対象とした免疫修飾薬 OCH の医師主導治験. 第 55 回日本神経学会学術大会 福岡 5.22.2014

11) 荒木学, 松岡貴子, 宮本勝一, 楠進, 岡本智子, 村田美穂, 三宅幸子, 荒浪利昌, 山村隆. 視神経脊髄炎に対する抗 IL-6 受容体抗体トシリズマブ治療の有効性の検討. 第 55 回日本神経学会学術大会 福岡 5.22.2014

12) 門脇淳, 三宅幸子, 千葉麻子, 山村隆. 腸管のミエリン反応性 T 細胞は実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を制御する. 第 55 回日本神経学会学術大会 福岡 5.23.2014

13) 中村雅一, 松岡貴子, 荒木学, 林幼偉, 佐藤和貴郎, 岡本智子, 村田美穂, 下地啓五, 佐藤典子, 三宅幸子, 荒浪利昌, 山村隆. 再発寛解型多発性硬化症病態における IL-6 依存性プラズマブラストの関与. 第 55 回日本神経学会学術大会 福岡 5.24.2014

14) 門脇淳, 三宅幸子, 千葉麻子, 山村隆. 腸管ミエリン反応性 T 細胞は実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を LAG-3 によって制御する. 第 26 回日本神経免疫学会学術集会 金沢 9.4.2014

15) 能登大介, 荒木学, 佐藤和貴郎, 岡本智子, 村田美穂, 三宅幸子, 山村隆. 多発性硬化症を対象とした免疫修飾薬 OCH の医師主導治験. 第 26 回日本神経免疫学会学術集会 金沢 9.5.2014

16) 門脇淳, 三宅幸子, 千葉麻子, 佐賀亮子, 山村隆. 腸管 T 細胞による自己免疫制御. 第 42 回日本臨床免疫学会総会 新宿 9.26.2014