

図 2. NGS を用いた腸内細菌叢解析法の概略

は桁違いの大量の菌種・遺伝子データを活用した腸内細菌叢研究を可能にした。図2にNGSを用いた腸内細菌叢の解析法の概略を示す。NGSによる解析では、16S 遺伝子 (1)、細菌叢メタゲノム (2)、分離培養された細菌株の個々のゲノム (3) の収集・解析が主要テーマとなる。

メタ 16S 解析では、16S 配列データのクラスタリングによって形成される operational taxonomic units (OTU) の各代表配列の 16S・菌種データベースへの相同検索による菌種の特異性、各 OTU を構成する 16S データ数から細菌叢の菌種 (OTU) 組成比が求められる。また、OTUs から作成できる系統樹を用いて細菌叢間にある全体的な構造類似性を UniFrac-主座標分析や UniFrac 距離解析により調べる事ができる<sup>18)</sup>。一方、NGS を用いたメタ 16S 解析には 16S 配列の polymerase chain reaction (PCR) 増幅におけるバイアスや NGS データに含まれるシーケンスエ

ラーに起因した改良すべき定量性の問題があったが、合成細菌叢を用いた解析法の評価と検討から、高い定量性をもったヒト腸内細菌叢のメタ 16S 解析法が開発されている<sup>19)</sup>。

メタゲノム解析では、細菌叢 DNA を直接 NGS でショットガンシーケンスをおこない、アセンブリステップなどを経て、ユニーク配列を得る。ついで、遺伝子予測プログラムを用いてメタゲノム配列中に遺伝子配列を同定する。これら遺伝子を機能や代謝系のデータベース [Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) や Clusters of Orthologous Groups (COG)] に相同検索することで、細菌叢が有する遺伝子や代謝系などの機能プロファイルを得ることができる。また、これらのデータを細菌叢間で比較することで細菌叢に特徴的な機能を抽出することができる。このほか、メタゲノムリードを分離培養株のゲノム (リファレンスゲノムデータベース) に相同検索 (マッ

表 1. ヒト腸内 (常在) 細菌叢のメタゲノム解析

年	論文の主たるテーマ	検体数	シーケンサー	非重複塩基数 (Gb)	およその遺伝子数	文献
2006	米国人腸内細菌叢のメタゲノム解析	2	ABI3730xl	0.08	5万	1)
2007	日本人腸内細菌叢のメタゲノム解析	13	ABI3730xl	0.8	66万	2)
2008	腸炎コソノシヤム (HMC) の発症					3)
2010	スペイン+デンマーク人腸内細菌叢のメタゲノム解析	124	Illumina	10.3	330万	14)
2012	米国人 (18 部位) 常在菌叢のメタゲノム解析	139	Illumina	17.7	490万	15)
	中国人のメタゲノムから? 型糖尿病のマーカ-の探索	145	Illumina	8.6	430万	16)
	アイルランド高齢者腸内細菌叢のメタゲノム解析	27	Illumina	2.2	250万	17)
2013	スウェーデン人腸内細菌叢のメタゲノム解析	145	Illumina	13.6	480万	18)
	ロシア人腸内細菌叢のメタゲノム解析	96	SOLID	3.4	—	19)
—	日本人腸内細菌叢のメタゲノム解析	167	454/Miseq/Ion PGM	10.8	460万	未発表

ピング) することで、菌種の特異性やメタ 16S 解析よりも定量的な高い菌種組成解析、その主成分分析 (principal component analysis: PCA) からは細菌叢間の構造比較が可能である。今日、3,000 以上のヒト常在菌株のゲノムデータ (<http://www.himpdacc.org/>) が収集・公開されており、今日、ヒト腸内細菌叢のメタゲノムデータの ~80% がこれらゲノムに有意にマップされる、さらなる個別ゲノムデータの収集がいまも進められている。なお、リファレンスゲノムが充実していないマウスなどの常在菌叢や他の環境細菌叢では、このマッピングによる菌種解析は有効でない。

メタ 16S 解析では機能解析はできないが、メタゲノム解析よりもサンプルあたりのコストが 1/10 程度と安価であり、多サンプルの菌種解析に適している。また、皮膚細菌叢のような微量の細菌叢 DNA の解析にも (PCR 増幅ステップがあるので) 対応できるという利点をもつ。

### 3 ヒト腸内細菌叢の大規模メタゲノム解析

上述した米国グループ (2006 年)<sup>1)</sup> とわが国の

HMGJ (2007 年)<sup>2)</sup> のヒト腸内細菌叢のメタゲノム解析では、まだ NGS が実用化されておらず、それぞれ 2 名と 13 名のサンプルがサンガー法を原理とした従来のキャピラリー式シーケンサーで解析された。その後、NGS が世界的に普及し、被験者・サンプル数や解析深度が著しく増大した (表 1)。IHC 設立後の 2010 年には MetaHIT が炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) の患者を含む 124 名の欧州人 (スペイン人+デンマーク人) の腸内細菌叢メタゲノムを公表した<sup>14)</sup>。2012 年には HMP による 139 名の米国人の腸内や皮膚、口腔などの 18 部位の常在菌叢<sup>15)</sup>、MetaHIT による糖尿病を含む 345 名の中国人<sup>16)</sup>、178 名の高齢者アイルランド人<sup>17)</sup> の腸内細菌叢がそれぞれ論文となった。さらに、2013 年には糖尿病を含む 145 名のスウェーデン人<sup>18)</sup> と 96 名のロシア人<sup>19)</sup> の腸内細菌叢が論文となった。われわれも 100 名以上の日本人腸内細菌叢の NGS によるメタゲノムデータの解析を進めており、これを含めた 1,000 人以上の腸内細菌叢データの予備解析からは、1,000 万程度のユニーク遺伝子が同定された (筆者ら、未発表)。この数はヒト遺伝子数 (約

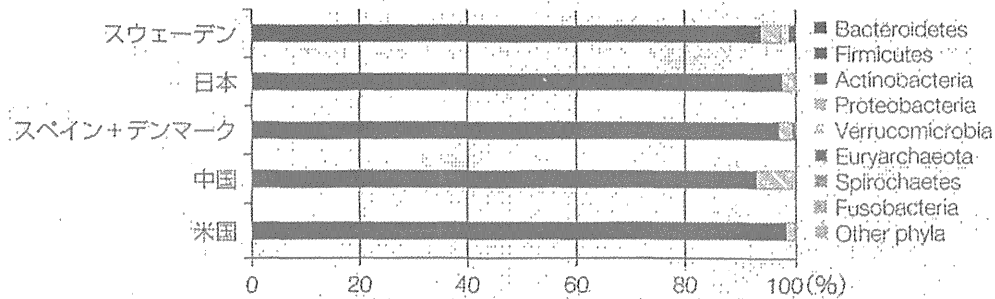


図 3. 国別の平均ヒト腸内細菌叢の菌種組成 (門レベル)

2.2 万) を遥かに凌駕しており、腸内細菌叢がヒトより遥かに多様な遺伝子をもっていることを示唆する。

#### 4 ヒト腸内細菌叢のマイクロバイオーム構造

腸内細菌叢を含めたヒト常在菌叢の 95% 以上は 4 つの門 (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria) の菌種で占められる。この菌種組成は個人や地域間、生息部位ごとで大きく異なる<sup>10,20</sup>。わが国と他の国の平均菌種組成 (門レベル) を比較したわれわれの解析から、わが国とスウェーデンでは Firmicutes が最優占菌種であるのに対して、米国や中国などでは Bacteroidetes が最優占菌種となった (図 3)。この結果は、腸内細菌叢の菌種組成は必ずしも宿主間の遺伝的距離に相関しないことを示唆する。また、これらの菌種組成は欧米や中国の高脂質/低炭水化物の食事と日本人の低脂質/高炭水化物の食事と相関するが、スウェーデンに Firmicutes が優占することを明確に説明できない。また、日本人だけに Actinobacteria が他国にくらべて多いことも特徴である。2011 年に、ヒト腸内細菌叢の菌種組成 (属レベル) が大きく三つのタイプ (エンテロタイプ) に分類できることが報告された<sup>20</sup>。Bacteroides (Type 1)、Prevotella (Type 2)、Ruminococcus (Type 3) の 3 属がそれぞれのタイプで優占菌種となる特徴をもつ。エンテロタイプは

人種や地域に関係なく、一様に分布していると考えられているが、最近のわれわれの解析から、日本人の多くは Type 3 であり、米国人や中国人の多くは Type 1 であることがわかった (筆者ら、未発表)。なお、Type 2 は南米やアフリカの原住民に多いタイプである。また、エンテロタイプは短期間の食事の変化にはほとんど影響を受けず、安定に保持される<sup>21</sup>。

腸内細菌叢の菌種組成は個人間や地域集団間で大きく異なるが (上述)、それらがコードする遺伝子 (機能) 組成はほとんど同じである<sup>22</sup>。われわれの日本人 100 名の解析からも同様の結果が得られている (図 4)。この事実は、菌種よりも遺伝子の機能が腸内細菌叢形成に大きく関与していることを意味する。上述した 4 門の優占種は、とくにヒト腸内での生息に適した遺伝子を獲得し、長い進化のなかで選択されてきたものと考えられる。

図 4 からわかるように、ヒト腸内細菌叢を特徴づける機能は、豊富に存在する炭水化物代謝系の遺伝子群である<sup>23</sup>。腸内細菌のおもなエネルギー源は、宿主の食事由来の多糖類であり、腸内細菌はこれらを代謝することでエネルギーを得ている。また、その代謝産物は酢酸や酪酸、ビタミンなどのヒト細胞に有用なものである。もう一つの特徴は、腸内細菌叢には鞭毛や化学走性などの運動にかかわる遺伝子群がきわめて少ないことである<sup>24</sup>。このことは宿主免疫系と関係し、これらをもたない細菌種の選択と優占化は、宿主と腸内

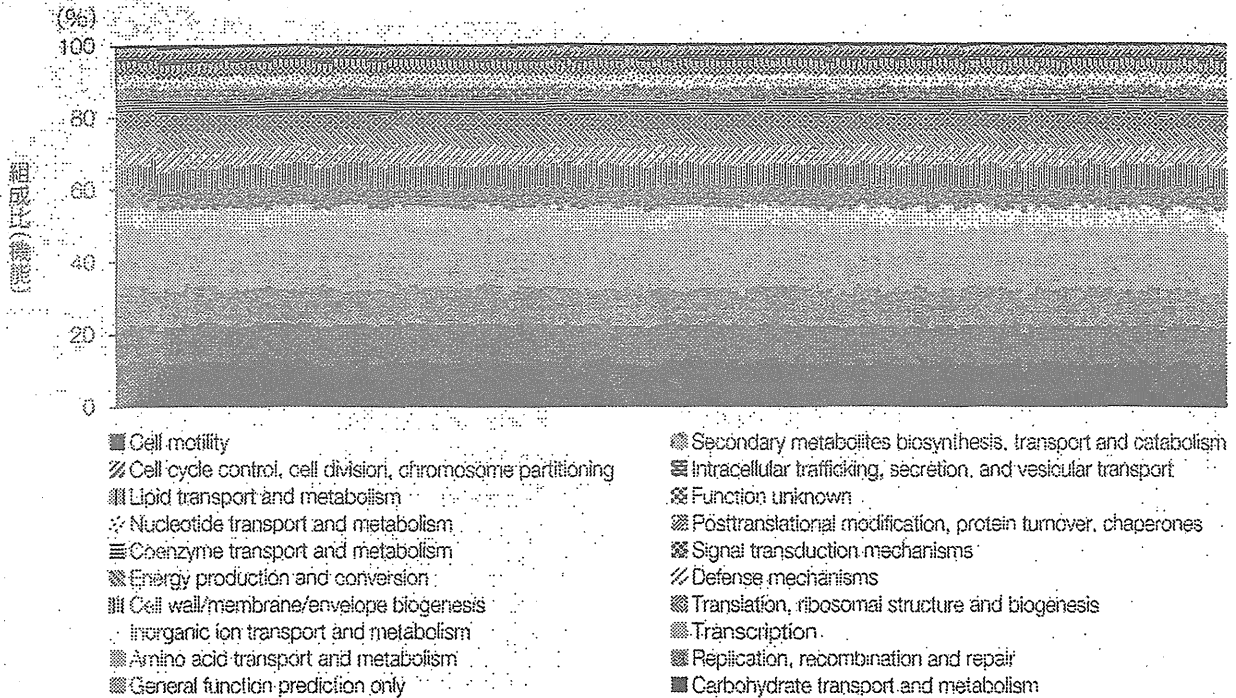


図 4. ヒト腸内細菌叢の遺伝子 (機能) 組成

横軸: 被験者 (100名の健康成人), メタゲノムデータ数: 100万以上/サンプル

細菌の両方にとって不利な炎症反応を最小限に抑える方向での進化があるようである。

### 5 ■ ヒト腸内細菌叢と疾患

ヒト腸内細菌叢はさまざまな疾患 (肥満<sup>22)23)</sup>, IBD<sup>24)</sup>, 糖尿病<sup>16)</sup>, 自閉症<sup>25)</sup>, アテローム性動脈硬化症<sup>26)</sup>など) と密接に関係し, 消化器系のみならず全身の代謝系や免疫系, 神経系 (脳機能) とリンクしている (表 2)。これらの疾患の腸内細菌叢の多くは, 健康者群とくらべて有意な菌種組成異常 (dysbiosis) を示す。たとえば, IBD の腸内細菌叢では Firmicutes と Bacteroidetes が健康者群にくらべて有意に減少し, Proteobacteria が相対的に増加する<sup>24)</sup>。また, 菌種数も有意に減少する (多様性の減少)。肥満では Firmicutes が増加し, Bacteroidetes が相対的に減少する<sup>22)</sup>。これらの細菌叢異常と宿主の生理状態は互いに影響し合うようである。たとえば, 遺伝子欠損で肥満症になったマウスの腸内細菌叢は dysbiosis を起こ

表 2. 腸内細菌叢との関連を示す疾患例

肥満
メタボリック症候群
炎症性腸疾患 (IBD)
過敏性腸症候群
アテローム性動脈硬化症
リウマチ性疾患
糖尿病 (1型, 2型)
アレルギー
セリアック病
大腸癌
肝臓癌
多発性硬化症
自閉症

す。ところが, この dysbiosis した腸内細菌叢を遺伝的に健全な無菌マウスに移植すると, そのマウスも肥満症となった<sup>22)</sup>。このほか, 乳児・幼児の成長期や女性の妊娠時でも腸内細菌叢が大きく変動する<sup>27)28)</sup>。これらのデータは, 腸内細菌叢が

これまでの想像を遥かに超えて、宿主の全身的な生理状態に直接的に影響することを強く示唆するものである。

### おわりに

NGSの驚異的な進歩により、今後も細菌叢の解析コストは低くなりスピードもさらに加速すると考えられる。よって、これまでの数百名規模の解析から今後は数万人規模のコホート研究も予想され、これらの研究からは想像を超えた腸内細菌叢の生理機能の新たな発見が期待される。そして、得られる知見は、これまでのヒト遺伝子産物をターゲットとした創薬概念とは違った、非自己である常在菌叢をターゲットあるいは活用した新たな治療法や予防法、診断法の開発につながると期待される。

### 文献

- 1) Gill SR, Pop M, Deboy RT *et al* : Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312 : 1355-1359, 2006
- 2) Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T *et al* : Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* 14 : 169-181, 2007
- 3) Mullard A : Microbiology : the inside story. *Nature* 453 : 578-580, 2008
- 4) Fukuda S, Toh H, Hase K *et al* : Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469 : 543-547, 2011
- 5) Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS *et al* : Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* 22 : 292-298, 2012
- 6) Castellarin M, Warren RL, Freeman JD *et al* : *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res* 22 : 299-306, 2012
- 7) Round JL, Mazmanian SK : Inducible Foxp3 regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl*

- Acad Sci U.S.A* 107 : 12204-12209, 2010
- 8) Ivanov IL, Atarashi K, Manel N *et al* : Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139 : 485-498, 2009
- 9) Atarashi K, Tanoue T, Oshima K *et al* : Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature* 500 : 232-236, 2013
- 10) Hayashi A, Sato T, Kamoda N *et al* : A single strain of *Clostridium butyricum* induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. *Cell Host Microbe* 13 : 711-722, 2013
- 11) Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S *et al* : Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504 : 446-450, 2013
- 12) Hamady M, Lozupone C, Knight R : Fast UniFrac : facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. *ISME J* 4 : 17-27, 2010
- 13) Kim SW, Suda W, Kim S *et al* : Robustness of gut microbiota of healthy adult in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. *DNA Res* 20 : 241-253, 2013
- 14) Qin J, Li R, Rase J *et al* : A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464 : 59-65, 2010
- 15) Human Microbiome Project Consortium : Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486 : 207-214, 2012
- 16) Qin J, Li Y, Cai Z *et al* : A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490 : 55-60, 2012
- 17) Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S *et al* : Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 488 : 178-184, 2012
- 18) Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I *et al* : Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 498 : 99-103, 2013
- 19) Tyakht AV, Kostyukova ES, Popenko AS *et al* : Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nat Commun* 4 : 2469, 2013

- 20) Arumugam M, Rase J, Pelletier E *et al* : Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473 : 174-180, 2011
- 21) Wu GD, Chen J, Hoffmann C *et al* : Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334 : 105-108, 2011
- 22) Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T *et al* : A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457 : 480-484, 2009
- 23) Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J *et al* : Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500 : 541-546, 2013
- 24) Frank DN, St Amand AL, Feldman RA *et al* : Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 : 13780-13785, 2007
- 25) Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V *et al* : Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* 16 : 444-453, 2010
- 26) Koren O, Spor A, Felin J *et al* : Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 : 4592-4598, 2011
- 27) Koenig JE, Spor A, Scalfone N *et al* : Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 : 4578-4585, 2011
- 28) Koren O, Goodrich JK, Cullender TC *et al* : Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell* 150 : 470-480, 2012

# ヒト常在菌叢のメタゲノム解析

Metagenomics of the human microbiome

人体には約1,000種の細菌(常在菌)が数百兆個生息している。常在菌の住処は口腔、皮膚、消化器系、泌尿器系など全身にわたり、それぞれの部位には固有の細菌集団(常在菌叢)が形成されている。この5~6年間に、培養に頼らないメタゲノム解析法の開発、網羅的な解析を可能にした次世代シーケンサー(NGS)の著しい進歩、国際コンソーシアムの始動などにより、大量データに基づいた包括的なヒト常在菌叢研究が大きく進展した。

## ● ヒト常在菌叢解析の全体プロセス

NGSを用いた腸内細菌(常在菌)叢解析の概略を図1に示す。①16S遺伝子による菌種・菌種組成解析、②メタゲノムによる遺伝子解析、③分離培養された細菌株の個別ゲノム解析、の3つが柱となっている。

①メタ16S解析:構成細菌種の16SrRNA遺伝子の可変領域を共通PCRプライマーで一括増幅して得られた16Sアンプリコンの配列データをNGSで取得する。16S配列データは菌種特定や菌種組成(OTU解析)、細菌叢の系統樹間比較(UniFrac距離解析)などの菌叢構造に関するデータ取得に用いる。菌叢構造は個人間や年齢、生息部位間で大きく異なるが、ヒト常在菌叢はおもに4つの門(Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria)に属する菌種で優占されている<sup>1)</sup>。

②疾患のメタ16S解析:疾患患者群の細菌叢は健康なヒトとの比較において、その菌種組成や菌種数が有意に異なり、細菌叢異常(dysbiosis)を示す。関連する疾患は炎症性腸疾患、肥満、糖尿病、大腸癌、動脈硬化症、自閉症など全身にかかわる<sup>2)</sup>。これらのデータはこれまでの想像を超えて、腸内細菌叢が宿主の生理状態に大きく影響することを強く示唆する。さらに、細菌叢自体が疾患発症の直接要因であることが示され、一方で健康なヒト糞便が再発性の感染症の治療にきわめて有効であることも報告されている<sup>3)</sup>。

③メタゲノム解析:細菌叢DNAを直接NGSによりシーケンシングして大量のゲノム配列を取得し、情報学的に同定された遺伝子配列をCOG(Clusters of Orthologous Groups)やKEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)などの遺伝子機能データベースに照会することで、細菌叢の機能や代謝系情報を収集する。今日では1つのプロジェクト(100被験者以上)で数百万のエ

## Related words

メタゲノム, 常在菌叢, 細菌叢異常

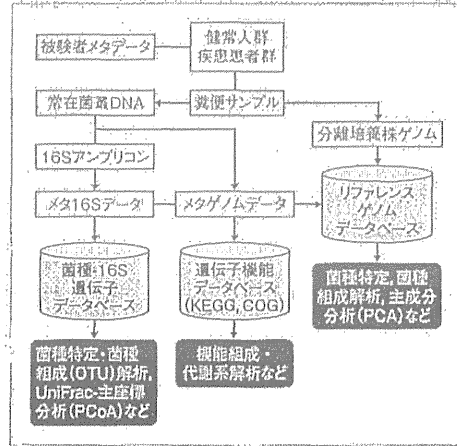


図1 ヒト腸内細菌叢マイクロバイオームの解析概略

ニック遺伝子が同定可能となっている。これまでに解析された1,000名以上(日本人を含む)の腸内細菌叢サンプルからは、合計1,000万以上のユニーク遺伝子が同定されている(著者ら、未発表)。この遺伝子数はヒト遺伝子数をはるかに凌駕する。今日、食事や年齢、人種あるいは地域に相関する(特徴的な)遺伝子/機能・代謝系の大規模な解明が進められている。また、2型糖尿病ではヒト遺伝子よりも高い予測能・診断能がある細菌遺伝子や菌種マーカーがみつかわっている<sup>4)</sup>。

④ヒト常在菌ゲノムデータベース:現在までに6,000株以上が分離され、そのゲノム配列がデータベース化されている(<http://www.hmpdacc.org/>)。このリファレンスゲノムは、メタ16Sやメタゲノムデータが由来する細菌種の特異性、定量的な高い菌種組成解析、健康-疾患細菌叢間の相違解明(主成分解析など)、細菌叢に特徴的な菌種や遺伝子の検出などに有効である。

- 1) Human Microbiome Project Consortium: *Nature*, 486: 207, 2012.
- 2) Clemente, J. C. et al.: *Cell*, 148: 1258, 2012.
- 3) van Nood, E. et al.: *N. Engl. J. Med.*, 368: 407, 2013.
- 4) Qin, J. et al.: *Nature*, 490: 55, 2012.

■服部正平/東京大学大学院新領域創成科学研究科附属オーミクス情報センター

ゲノム解析学/細菌学・ウイルス学

## 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)<sup>1)</sup> 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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。

## 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、グリオーシス、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、MOG<sub>35-55</sub>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<sup>4)</sup>。

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- $\beta$ 、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- $\beta$ 、ウステキヌマブなどがある。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

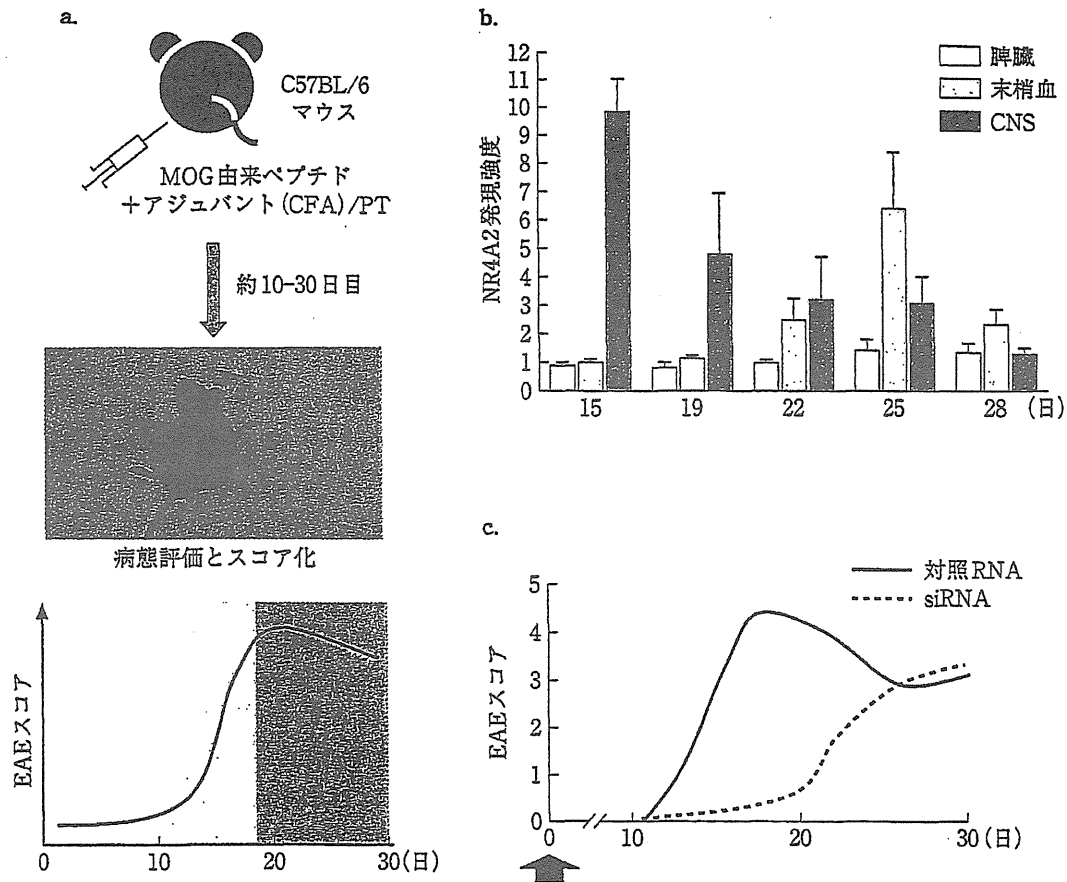


図1 EAE病態形成におけるNR4A2発現T細胞の役割

- a. C57BL/6(B6)マウスに、MOG<sub>35-55</sub>ペプチドを免疫することで单相型持続性のEAEが誘導できる。B6マウスは様々な遺伝子改変マウスの背景系統であることから、MOG<sub>35-55</sub>ペプチドとの組み合わせによるEAEが最も頻用される。CFA: 完全フロイントアジュバント, PT: 百日咳毒素。
- b. EAE発症に伴って、まずCNS浸潤T細胞で、次に末梢血T細胞でNR4A2の発現亢進を認めた一方、脾臓由来T細胞では、NR4A2の発現亢進を認めなかった。
- c. MOG<sub>35-55</sub>ペプチド免疫時に、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を静脈投与したところ、顕著なEAE病態の抑制が認められた。免疫10日後の投与でも、EAE病態は抑制された(データ示さず)。

てEAEの増悪を導く反面、それぞれ血液脳関門の安定効果、髄鞘再生・神経保護効果も有する。またサイトカイン類も、EAE発症時に免疫系と神経系の双方に作用する場合があります。データの解釈に慎重を期す必要がある。例えば、TNF中和抗体はEAE病態を有意に抑制する一方でMSをむしろ増悪させる。最初の報告を注意深く読むと、TNF中和抗体は受動EAEのみ有効であること、TNF欠損マウスのEAEでは発症が遅れるものの発症率への効果は低いことを読み取ることができ、十分なデータの検証によりこのような事態は回避できると思われる。

例外的にその作用機序がいまだ謎に包まれているのがIFN- $\gamma$ である。EAEとMSでは正反対の効果を示す典型的な例であるが、原因の究明は状況を十分説明できる段階には至っていない<sup>45)</sup>。

## 2. MS/EAEとNR4A2陽性Th17細胞

脳脊髄炎の惹起過程において、炎症の遷延化を引き起こす自己反応性の病原性T細胞の役割は極めて重要である。抗原刺激を受けたナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞は、周囲のサイトカイン環境によって複数の機能的に異なるエフェクターT細胞

胞に分化するが、このうち感染免疫の重要な担い手であるTh1細胞とTh17細胞は、MSなどの自己免疫疾患を引き起こす病原性T細胞ともなりうる。マウスEAEの研究から、IL-12あるいはIL-23の欠損マウスのEAE解析から<sup>9)</sup>、IL-23を分化誘導因子とするTh17細胞が主な病原性T細胞であることが示されている。更にTh17細胞のマスター転写因子として知られているROR $\gamma$ tの欠損によりEAE病態は改善するが<sup>7)</sup>、ROR $\gamma$ tはLTiやILC3などの細胞群の分化を制御することでリンパ組織の構築にも関わるため、ROR $\gamma$ t欠損マウスを用いた場合、この点にも留意が必要である。MSの病態形成過程にもTh17細胞をはじめとするT細胞の関与が予想されるが<sup>8)</sup>、高い可塑性を有するTh17細胞のサイトカイン産生は、炎症局所において容易にIL-17からIFN- $\gamma$ へとシフトするため<sup>9)</sup>、IL-17産生を指標としてTh17細胞を解析する場合、最初から対象となる細胞をとらえそこなってしまう可能性がある。

このような背景を踏まえ、私たちはMS患者が保持していることが予想される病原性T細胞(=Th17細胞?)を標的として、患者末梢血を用いた解析を行った。すなわちDNAマイクロアレイ法を用いて、寛解期の再発寛解型MS患者末梢血より分離したT細胞を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、健常者に比較して患者で発現亢進する遺伝子の一つとして、核内受容体分子NR4A2を同定した<sup>10)</sup>。NR4A2と自己免疫疾患との関連はほとんど未知であったが、転写因子としても働くNR4A2と自己免疫病態形成との関連を更に詳細に解析するために、以後EAEに移行して研究を進めた。B6マウスにMOG<sub>35-55</sub>ペプチドを免疫して誘導されるEAEにおいて、CNS浸潤細胞で先行し、末梢血T細胞がこれに続くNR4A2の発現亢進を認めた(図1-b)。興味深いことに、所属リンパ節や脾臓のT細胞では、NR4A2の発現亢進は認められなかった。よってT細胞が標的臓器に集積する過程でNR4A2発現が増加し、EAE病態を引き起こした自己反応性T細胞が、その後末梢血に移行して一定期間維持されるものと考えられた<sup>11)</sup>。

またNR4A2の発現はIL-17産生ヘルパーT細胞に限局しており、更に自己抗原を免疫したときのみ誘導されたことから、NR4A2が自己反応性のTh17細胞を同定するための有用なマーカー分子となる可能性が示された。

### 3. RNA干渉法によるNR4A2の阻害によるTh17細胞機能とEAE病態の抑制

上記の解析から、NR4A2が自己反応性のTh17細胞に選択的に発現すること、EAE発症時にはこのNR4A2発現Th17細胞が、経時的にCNSから末梢血へと分布することが明らかとなった。そこで次に、Th17細胞機能に対するNR4A2発現の意義を解明するために、NR4A2特異的siRNAを新たに設計し、まずナイーブT細胞をIL-6/TGF- $\beta$ 存在下に刺激して得られるTh17細胞の分化におけるNR4A2の作用を調べた。NR4A2特異的siRNA処理により、Th17細胞のIL-17産生はほぼ完全に阻害され、NR4A2が*in vitro*におけるTh17細胞の分化に必須の因子であることが明らかとなった。NR4A2遺伝子の相同性は種間で極めて高く、用いたNR4A2特異的siRNAの配列はヒト・マウス間で完全に一致していたことから、ヒト末梢血を用いて同様の阻害実験を行った。健常人あるいはMS患者の末梢血を用いたIL-17産生細胞の分化は、やはりsiRNA処理により有意に抑制され、NR4A2がヒトTh17細胞分化の鍵因子であることがわかった。更にTh17細胞の分化過程においては、c-mafの選択的発現、IL-21産生によるオートクリンな増殖、IL-23受容体発現によるTh17細胞の形質の安定化などが必要とされている<sup>12)</sup>が、NR4A2特異的siRNA処理により、*in vitro*で分化させたマウスTh17細胞におけるこれらの遺伝子発現はすべて消失した。更にsiRNA処理後に培養系にIL-21を添加すると、IL-17産生が回復することから、NR4A2によるTh17細胞の分化制御の機序としてIL-21の産生制御が重要であることが示された<sup>13)</sup>。

NR4A2が*in vitro*におけるTh17細胞分化の鍵因子であることが示されたことから、次に

NR4A2 特異的 siRNA の *in vivo* 投与による EAE 病態の抑制効果を解析した。市販のコラーゲンマトリクスに封入して安定化させた siRNA を、抗原免疫時に同時に静脈投与して EAE を観察したところ、顕著な病態の抑制が得られた(図 1-c)。更に抗原免疫 10 日後に siRNA を投与した場合も EAE 病態の抑制効果が認められ、*in vivo* における NR4A2 発現の抑制により、EAE が制御可能であることが示された。以上より、NR4A2 の発現制御により EAE 病態がコントロールできることが明らかとなった。

### おわりに

MS の動物モデルとしての EAE を用いた研究の一例として、オーファン核内受容体 NR4A2 と Th17 細胞の連関、および自己免疫病態形成との関わりを解析した著者らの研究を紹介した。今後、疾患活動性をモニターするバイオマーカーおよび MS の治療標的としての NR4A2 の活用を図るべく、引き続き研究を進めていく必要がある。著者らの研究のように、MS 由来のデータを手がかりに、EAE を用いてより詳細な解析を進め、得られた結果をヒトで再検証するという作業を繰り返していくことは、MS の動物モデルとしての EAE の価値を最大限に高めるうえで極めて重要である。EAE 単独の解析から導きだされたデータ・結論と、実際の MS 病態との齟齬を極小とするためには最善の方法といえるだろう。ただ、‘MS 解析から得られたデー

タを EAE で再現し、一方で EAE 解析から得られたデータを可能なかぎり MS で再検証する’ことは、基礎研究の典型ともいえる EAE 研究と、臨床の俎上にある MS 研究を両輪とする車をまっすぐに走らせることにほかならず、時に困難を伴う場合もありうる。研究グループ内の意思疎通を保ち、万全な研究協力体制を構築することも重要である。

最初の EAE の報告がなされてからはや 80 年近くが経ったが、EAE 研究においても日進月歩は続いており、例えば最近 NMO の動物モデルが本特集 II-5 の稿に紹介されている。一方、EAE は主に再発寛解型の MS 病態解析に用いられてきており、進行型病態の動物モデルとして用いられた例はほとんどない。これは再発寛解型病態が EAE の守備範囲にある一方で、進行型病態が再発寛解型病態とは質的に全く異なる病態である可能性を想起させる。実際のところ、EAE に相当する動物モデルがない進行型病態の研究は、疾患そのものの理解と治療法開発の両面において再発寛解型病態より著しく遅れている<sup>14)</sup>。unmet medical needs としての進行型病態の解明に、動物モデルがどのように寄与できるかを考えていくことが、EAE 研究に残された大きな課題の一つといえるだろう。適切な動物モデルの積極的な探索が進み、多様な MS 病態の理解と、対応する治療法の開発が更に進展することを期待したい。

### ■ 文 献

- 1) Sawcer S, et al: Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476(7359): 214-219, 2011.
- 2) Baxter AG: The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 7(11): 904-912, 2007.
- 3) Oki S: Towards understanding the role of orphan nuclear receptor NR4A2 in Th17 cell-mediated central nervous system autoimmunity: An experimental approach using an animal model of multiple sclerosis. *Clin Exp Neuroimmunol* 5: 137-148, 2014.
- 4) Constantinescu CS, et al: Experimental autoimmune encephalomyelitis(EAE) as a model for multiple sclerosis(MS). *Br J Pharmacol* 164(4): 1079-1106, 2011.
- 5) Steinman L, Zamvil SS: Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends Immunol* 26(11): 565-571, 2005.
- 6) Cua DJ, et al: Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune

- inflammation of the brain. *Nature* 421(6924): 744-748, 2003.
- 7) Ivanov, et al: The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126(6): 1121-1133, 2006.
  - 8) Constantinescu CS, Gran B: The essential role of T cells in multiple sclerosis: a reappraisal. *Biomed J* 37(2): 34-40, 2014.
  - 9) Hirota K, et al: Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* 12(3): 255-263, 2011.
  - 10) Satoh J, et al: Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 18(3): 537-550, 2005.
  - 11) Doi Y, et al: Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(24): 8381-8386, 2008.
  - 12) Bauquet AT, et al: The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol* 10(2): 167-175, 2009.
  - 13) Raveney BJ, et al: Nuclear receptor NR4A2 orchestrates Th17 cell-mediated autoimmune inflammation via IL-21 signalling. *PLoS One* 8(2): e56595, 2013.
  - 14) Koch MW, et al: Treatment trials in progressive MS—current challenges and future directions. *Nat Rev Neurol* 9(9): 496-503, 2013.

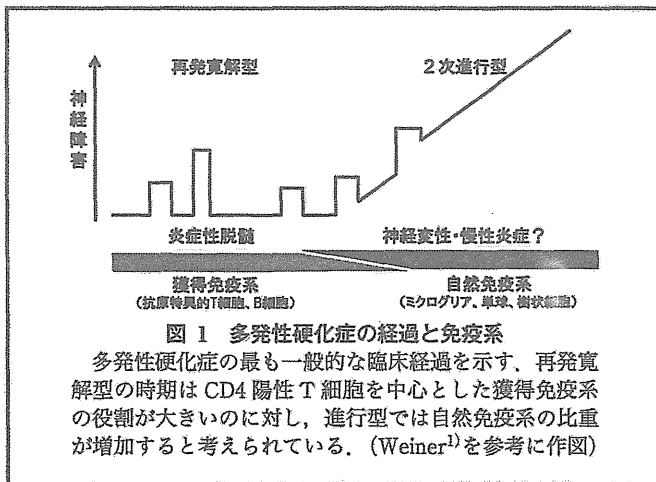
# 免疫動態

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

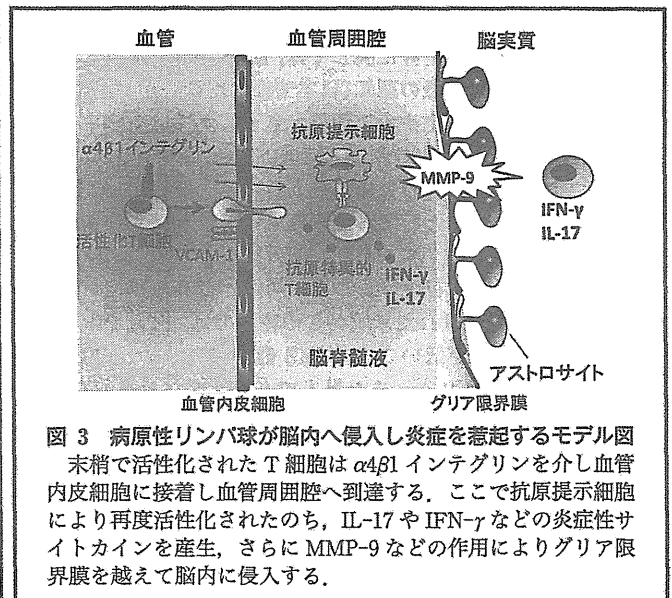
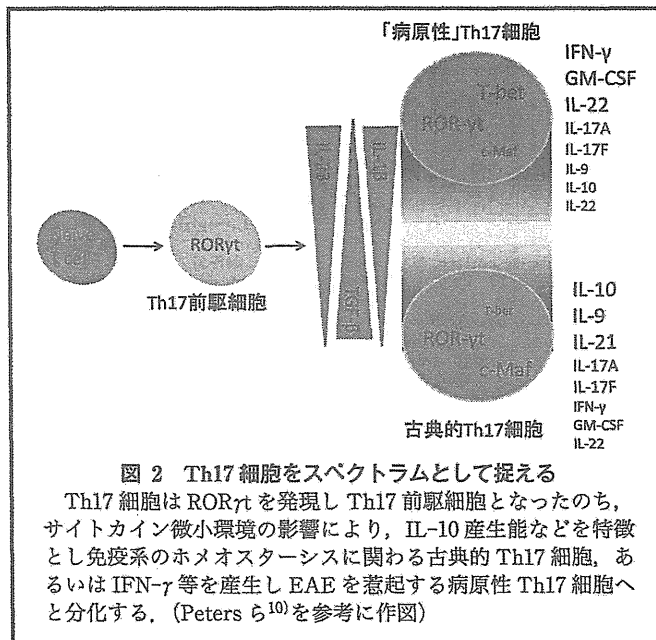
中心で、「進行期」は自然免疫系の関与が優位となり、炎症より神経変性が目立つというモデルが提案されている (図 1)<sup>1)</sup>。このうち前者の「再発期」については近年理解が進み、再発抑制効果をもつ複数の免疫治療薬が臨床現場で用いられるようになった。一方、進行性の病態については未知の部分が多く「神経変性」や「慢性炎症」をキーワードに研究が進行中であるが、再発を抑制し疾患活動性を抑制することの意義は認識されている。疫学的に興味深いことは、従来アジア人に少なかった MS がわずかに数十年の間にわが国で確実に増加している点である。昨今の腸内細菌・腸管免疫系の研究の進歩により、食生活を含む環境因子と 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。



## 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/免疫研究部長  
やまむら たかし 同 部長



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<sup>2)</sup>。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- $\gamma$ )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<sup>3)</sup>。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- $\alpha$ 、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- $\beta$ の作用により分化誘導され、特異的な転写因子ROR $\gamma$ 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<sup>4)</sup>。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<sup>5)</sup>。

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<sup>6)</sup>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<sup>7)</sup>。一方、一般的にはTh1細胞が産生するIFN- $\gamma$ 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- $\gamma$ 産生性の細胞に分化転換し中枢神経に浸潤していた<sup>8)</sup>。また、再発期MS患者の末梢血中にはIFN- $\gamma$ 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<sup>9)</sup>。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)<sup>10)</sup>。そのモデルではpre-Th17細胞の誘導後、TGF- $\beta$ の作用が持続する場合はIL-10などを産生し、腸管免疫系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 $\beta$ が作用するとGM-CSFやIFN- $\gamma$ 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<sup>11)</sup>。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- $\beta$ 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

1219

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- $\beta$  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- $\beta$  投与により悪化することを示し、IFN- $\beta$  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<sup>12)</sup>。

### 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  $\alpha 4\beta 1$  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。リンパ球が脳内へ到達する前に立ちどかる最後の壁が、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<sup>13)</sup>。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 が軽症化した<sup>14)</sup>。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 が軽症化した<sup>15)</sup>。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<sup>16)</sup>。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<sup>17)</sup>。MAIT 細胞の T 細胞受容体の  $\alpha$  鎖は Va7.2 のみ、iNKT 細胞では Va24 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<sup>18)</sup>。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<sup>19)</sup>。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<sup>20)</sup>。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  $\alpha$ -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- $\gamma$  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<sup>21)</sup>。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<sup>22)</sup>。もっとも発現の高いグループの中に  $\alpha B$  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  $\alpha 4\beta 1$  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 患者髄液中での増加がみられ、再発への関与が疑われる。抗  $\alpha 4$  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  $\alpha$ 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<sup>23)</sup>。

## 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<sup>24)</sup>。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<sup>25)</sup>。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- $\beta$  は液性免疫を活性化することが知られているが、IFN- $\beta$  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<sup>26)</sup>。BAFF は B 細胞の生存や分化を促進する因子であり、IFN- $\beta$  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 $\alpha$ 19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat Immunol.* 2006 ; 7 : 987-94.
- 20) Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, et al. MHCII 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- $\beta$  increases BAFF levels in multiple sclerosis : implications for B cell autoimmunity. *Brain.* 2008 ; 131 : 1455-63.

