

機関番号：82611

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591014

研究課題名（和文）多発性硬化症におけるIL-17産生性T細胞の病原性および治療標的に関する研究

研究課題名（英文）Elucidation of pathogenesis of interleukin-17-producing T cells in multiple sclerosis

研究代表者 荒浪 利昌（ARANAMI TOSHIMASA）

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 組織培養研究室長

研究者番号：60435724

研究成果の概要（和文）：

多発性硬化症（MS）は、T細胞が介在する、自己免疫性脱髄疾患であると考えられている。近年インターロイキン17（IL-17）を産生するT細胞（Th17細胞）が、種々の自己免疫疾患動物モデルの病原性細胞であると報告されている。しかし、MS病態へのTh17細胞の関与については、いまだ詳細は不明である。本研究の目的は、MSのTh17細胞の抗原特異性および病巣への浸潤を解析し、MS病態への関与を明らかにすることにある。

研究成果の概要（英文）：

Using simultaneous staining of four chemokine receptors, we identified a unique T cell population increased in the cerebrospinal fluid of patients with relapsing multiple sclerosis. CCR2+CCR5+ T cells were selectively enriched in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients but not of patients with other inflammatory and non-inflammatory neurological diseases. We found that CCR2+CCR5+ T cells from peripheral blood of multiple sclerosis patients in relapse specifically responded to myelin basic protein and produced both interferon- γ and interleukin-17. Of note, we demonstrated that the CCR2+CCR5+ population possesses a distinct ability to produce matrix metalloproteinase-9 and osteopontin, both of which are thought to be crucial for the invasion into the parenchyma. We propose that the CCR2+CCR5+ T cells may play a role in triggering brain autoimmune inflammation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：神経内科

科研費の分科・細目：神経免疫学

キーワード：多発性硬化症、T細胞分化、インターロイキン17

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (MS) は、T 細胞が介在する、自己免疫性脱髄疾患であると考えられている。近年インターロイキン 17 (IL-17) を産生する T 細胞 (Th17 細胞) が、種々の自己免疫疾患動物モデルの病原性細胞であると報告されている。MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) においても、Th17 細胞が高い病原性を有することが示されている。しかし、MS 病態への Th17 細胞の関与については、いまだ詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MS の Th17 細胞の抗原特異性および病巣への浸潤を解析し、MS 病態への関与を明らかにすることにある。

3. 研究の方法

(1) 対象：年齢、性別のマッチした MS 患者 12 名、非炎症性中枢神経疾患 6 名、炎症性神経疾患 (髄膜炎、脳炎など) 患者 4 名、健常者 11 名である。

(2) T 細胞サブセット頻度の解析：PBMC、あるいは髄液細胞を CCR2 と CCR5、または CCR4 と CCR6 の 4 種類のケモカイン受容体に対する蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメトリーを用いてメモリーCD4 陽性 T 細胞に占めるケモカイン受容体発現細胞の頻度を測定した。

(3) 抗原特異性の検討：再発期 MS 患者あるいは健常者の末梢血より CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞、またはこれを除いた T 細胞、メモリー T 細胞をフローサイトメトリーセルソータ

ーを用いて精製分離した。また、PBMC よりメモリーCD4 陽性細胞を除去した細胞から、さらに CD3 陽性および CD56 陽性細胞をフローサイトメトリーで除去し、抗原提示細胞として用いた。卵白アルブミン (OVA) あるいはミエリン塩基性蛋白 (MBP) 存在下で、T 細胞サブセットと放射線照射した抗原提示細胞を 5 日間共培養し、培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA 法で測定した。

(4) 浸潤能の検討：(3)と同様に細胞を分離し、抗 CD3/CD28 抗体で刺激後に、上層に基底膜成分およびアストロサイトを敷いた transwell の通過能を比較した。

4. 研究成果

(1) 末梢血に比べ、MS 再発時の髄液においては、CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の頻度の有意な増加が認められた。非炎症性および炎症性中枢神経疾患患者では CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の髄液中での増加が認められず、CCR2 陽性 CCR5 陽性細胞が MS で選択的に増加していることが判明した。

(2) 再発期 MS 患者では、CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞は MBP に特異的に反応し、著明な IFN- γ 産生を示した。MBP に対する IL-17 産生は、CCR2 陽性 CCR5 陽性細胞と、これを除いた分画の両方でみられた。また健常者ではどの分画においても MBP 特異的な反応はみられなかった。

(3) CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞は、他の T 細胞サブセットに比べ、刺激に際して、マトリックスメタロプロテイナーゼ 9 を有意に

大量に産生した。また、試験管内実験モデルにおいて、他の T 細胞サブセットよりも下層に移動した細胞数が有意に多く、高い浸潤能を持つ事が分かった。

(4) 生成した CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞を PMA とイオノマイシンで刺激し、MS 再発病態に関与すると考えられているオステオポンチンの産生を調べたところ、他の T 細胞サブセットに比べ、CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の産生量が有意に高いことが分かった。

(5) 結論：再発期 MS の髄液で増加する CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞は、MS 抗原特異的な細胞を多く含み、かつ浸潤能が高く、MS 病態において重要な役割を果たしていると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. 佐藤和貴郎、荒浪利昌、山村隆、ヒト Th17 細胞におけるケモカインレセプターの発現、臨床免疫・アレルギー科、査読なし、2008 年、49 巻、89-94
2. Aranami, T., and T. Yamamura, Th17 cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS), Allergol. Int. 査読なし、2008 年、57 巻、115-120
3. 荒浪利昌、山村隆、炎症と T 細胞サブセット、治療学、査読なし、2010 年、44 巻、11-13
4. 富田敦子、荒浪利昌、山村隆、MS の免疫病態のトピックス、Brain Medical、査読なし、2010 年、22 巻、25-30
5. 荒浪利昌、山村隆、Th17 細胞のケモカインレセプターの発現、Frontiers in

Rheumatology & Clinical Immunology、査読なし、2010 年、4 巻、28-32

[学会発表] (計 14 件)

1. 佐藤和貴郎、富田敦子、荒浪利昌、岡本智子、小川雅文、山村隆、MMP9 を高発現する CCR2 陽性 CCR5 陽性細胞の多発性硬化症における重要性、第 22 回日本神経免疫学会、2009 年 3 月 3 日、東京 (日経ホール)
2. 佐藤和貴郎、富田敦子、荒浪利昌、岡本智子、小川雅文、山村隆、MMP9 を高発現する CCR2 陽性 CCR5 陽性細胞の多発性硬化症における重要性、第 37 回日本臨床免疫学会、2009 年 11 月 3 日、東京 (東京ステーションコンファレンス)
3. Wakiro Sato, Atsuko Tomita, Youwei Lin, Masafumi Ogawa, Tomoko Okamoto, Miho Murata, Toshimasa Aranami and Takashi Yamamura, CCR2+ CCR5+ CD4+ T cells enriched in cerebrospinal fluid of relapsing multiple sclerosis patients strongly express matrix metalloproteinase-9 and osteopontin, 14th International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 23 日、神戸 (神戸コンベンションセンター)
4. Aranami T., Sato W, Yamamura T, T cell subsets identified with chemokine receptors in MS, MS Immunology Seminar, 2010 年 10 月 31 日、ノッチングム、英国 (National College for School Leadership)
5. 佐藤和貴郎、富田敦子、荒浪利昌、山村隆、多発性硬化症病態における MMP9 陽性 CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の重要性、第 51 回神経学会総会、2010 年 5 月 21 日、東京 (東京国際フォーラム)

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ：

http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_men/aranami.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒浪 利昌 (ARANAMI TOSHIMASA)

(独) 国立精神・神経医療研究センター神経
研究所免疫研究部組織培養研究室長)

研究者番号：60435724