

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590087

研究課題名（和文） NR4A2 を介した IL-17 産生制御による新規自己免疫疾患治療法の開発

研究課題名（英文） NR4A2-mediated regulation of IL-17-producing T cells for novel therapeutic strategy of autoimmune diseases

研究代表者

大木 伸司 (OKI SHINJI)

独立行政法人 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・第三研究室長

研究者番号：50260328

研究成果の概要（和文）：

末梢血 T 細胞の網羅的遺伝子発現解析から、多発性硬化症(MS)患者で有意に発現亢進する遺伝子として見出した NR4A2 の機能解析を、MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を用いて進めた。その結果、NR4A2 が IL-17 産生性の病原性 T 細胞に選択的に発現し、その機能を制御する分子であること、また NR4A2 の発現あるいは機能制御により EAE 病態が改善できることが明らかとなった。EAE 病態形成における本分子の機能をさらに詳細に解析するために、ヘルパー T 細胞特異的 NR4A2 欠損マウスを新規に作製し、EAE 病態解析を開始した。

研究成果の概要（英文）：

We identified the orphan nuclear receptor NR4A2 as a most significantly upregulated gene in peripheral T cells obtained from MS patients by microarray analysis. Further analysis employing experimental autoimmune encepharomyelitis (EAE) revealed that NR4A2 expression is selectively associated with IL-17-producing pathogenic T cells and preventive intervention for NR4A2 function ameliorates EAE symptom.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：自己免疫疾患、核内受容体、Th17 細胞

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)は、自己抗原に対する過剰な免疫応答の結果として生じる典型的な自己免疫疾患として知られている。臨床の場では、主な MS 治療法としてステロイドやインターフェロンβな

どが用いられているが、既存の治療法が必ずしも十分とは言えず、長期にわたって徐々に病態が進行する MS の病態形成メカニズムに基づく治療アプローチの確立が急務であった。MS の初期の病態形成は、ミエリン抗原に対する自己免疫応答が引き金をひくと考

えられ、とくに抗原特異的に作用する T 細胞がその中心となるが、そのメカニズムの詳細は不明であった。最近になり、既存のエフェクター T 細胞とは異なる細胞群として、炎症性サイトカイン IL-17 を産生する Th17 細胞が新たに見出された。さらに種々の自己免疫疾患およびその動物モデルにおいて、自己免疫病態との強い相関が明らかとなったことから、病態形成に関わる T 細胞群として、Th17 細胞が注目を集めており、Th17 細胞の機能制御法の確立が、MS をはじめとする自己免疫疾患の新規治療アプローチの手がかりを与えることが期待されている。このような背景を踏まえて、MS 患者の T 細胞機能を詳細に解析することを目指して、患者由来末梢血 T 細胞の網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、MS 患者末梢血 T 細胞で選択的に発現が亢進する遺伝子群を同定し、その中で最も高い有意差を持って発現亢進を認めた遺伝子として、NR4A2 を同定した。オープン核内受容体である NR4A2 は、様々な生体応答への関与が示されているが、自己免疫疾患との関連は全く知られておらず、その機能の詳細は不明であった。

2. 研究の目的

近年、MS をはじめとする種々の自己免疫疾患における Th17 細胞の関与が注目されている。本研究では、MS 患者の T 細胞の特性を明らかにし、新たな治療アプローチを構築することを目的として、患者 T 細胞の網羅的遺伝子発現解析の結果として同定したオープン核内受容体 NR4A2 に着目して、研究を開始した。とくに、T 細胞における NR4A2 の高発現と自己免疫病態形成の間の相関を明らかにするには、病態との相関解析が必須である。そこで、MS の動物モデルとして用いられる実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を用いた動物モデル解析から、T 細胞における NR4A2 発現と病態形成との関連を明らかにし、NR4A2 を標的とした新規 MS 治療アプローチの可能性を探ることを目的に、研究を行った。

3. 研究の方法

① C57BL/6 マウスに、MOG35-55 ペプチドとアジュバントからなるエマルジョンを皮下注射することで免疫を行い、EAE を誘導した。EAE を発症したマウスから、経時的に脳・脊髄、末梢血、リンパ節および脾臓を採取し、フローサイトメーターを用いてヘルパー T 細胞を分離した。得られた T 細胞を、MOG35-55 ペプチドあるいは抗 CD3 抗体で刺激し、培養上清中の各種サイトカインを、ELISA 法、Cytometric beads array 法、定量 PCR 法などを用いて定量するとともに、T 細胞から抽出した total RNA を逆転写して得られた cDNA

を用いて、遺伝子発現解析を行った。また Cytokine Secretion Assay Kit を併用して IL-17 と IFN- γ の産生細胞をそれぞれ分離し、NR4A2 発現を定量した。各マウスから分離した脊髄をホルマリン固定し、スライス作製後へマトキシリン・エオジン(HE)染色および Luxol fast blue(LFB)染色を行った。

マウス NR4A2 の遺伝子配列を元に in silico のスクリーニングを行い、NR4A2 特異的 siRNA を新たに取得した。B6 マウスの脾臓およびリンパ節から、セルソーターを用いてナイーブ (CD4+CD44-CD25-CD62Lhigh) T 細胞を分離し、上記の NR4A2 特異的 siRNA を、Nucleofector (Amaxa 社・Lonza 社)を用いて遺伝子導入した後、IL-6(20 ng/ml)と TGF- β (2-3 ng/ml)存在下に CD3/CD28 抗体刺激を行い、培養上清中のサイトカイン産生を定量するとともに、各細胞から分離した RNA を用いて遺伝子発現解析を行った。

② B6 マウスに、MOG35-55 ペプチドを免疫して、EAE を誘導した。コラーゲンマトリクスに封入した NR4A2 特異的 siRNA を、免疫時あるいは免疫 10 日後 (EAE 発症時) にマウスに静脈投与して、EAE 病態抑制効果を評価した。脳・脊髄から分離した単核球の組成を定量するとともに、セルソーターを用いて分離した T 細胞を再刺激した後のサイトカイン産生能を定量し、各細胞から分離した RNA を用いて遺伝子発現解析を行った。

③ マウス NR4A2 遺伝子の開始コドンを含むエクソンを loxP 配列で挟んだターゲティングベクターを用いて floxed NR4A2 マウスを樹立した。得られたマウスを CD4-Cre マウスと交配してヘルパー T 細胞特異的 NR4A2 欠損 (NR4A2cKO) マウス系統を新規に樹立した。マウスに MOG35-55 ペプチドを免疫して EAE を誘導した。EAE マウスの各種臓器からフローサイトメーターを用いて CD4 陽性 T 細胞を分離した。分離した細胞を CD3/CD28 抗体刺激あるいは MOG/APC 刺激し、培養上清中の各種サイトカインを定量するとともに、各細胞から分離した RNA を用いて遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

① EAE の発症に伴い、中枢神経系(CNS)に浸潤した T 細胞および末梢血 T 細胞の NR4A2 発現が亢進した。NR4A2 発現は発症期 (~day10) に CNS 由来 T 細胞で先行し、遅れて末梢血 T 細胞では慢性期 (~day25) に認められたことから、NR4A2 発現が発症に伴う T 細胞のダイナミックな体内動態を反映している可能性が示された。興味深いことに、T 細胞の NR4A2 発現は、他の自己抗原 (interphotoreceptor binding protein; IRBP) 由来ペプチドの免疫後にも上昇したが、非自己抗原 (ovalbumin; OVA) では誘導されないため、T 細胞の NR4A2

発現は自己免疫応答特異的な現象であることが確認された。EAE を発症したマウスの中枢神経系に浸潤した T 細胞の多くは、IL-17 や IFN- γ を産生する細胞であったが、NR4A2 発現は IL-17 産生細胞に選択的に認められ、IFN- γ 産生との相関は認められなかった。同様の IL-17 産生細胞選択的な NR4A2 発現は、末梢血から分離した T 細胞でも認められた。NR4A2 特異的 siRNA 導入後に分化させた Th17 細胞では、ROR γ t 発現を維持したまま NR4A2 発現と IL-17 産生がほぼ完全に消失した。さらに siRNA 処理 T 細胞では、IL-17 産生に先行して誘導され、Th17 細胞分化に重要な役割を果たす IL-21 産生と IL-23 受容体発現が強く抑制された。これらの発現抑制は、培養系に IL-21 を添加することにより回復した。MOG35-55 ペプチド免疫時に、コラーゲンマトリクスに封入した NR4A2 特異的 siRNA を静脈投与した B6 マウスでは、EAE 病態が顕著に抑制され、このとき T 細胞の NR4A2 発現は、顕著に抑制された。さらに CNS 浸潤 T 細胞および所属リンパ節由来 T 細胞の、抗原特異的 IL-17 産生は、いずれも siRNA 処理群で有意に抑制されていた。よって、T 細胞の NR4A2 発現は、自己免疫応答に伴う IL-17 産生に必須の因子であり、NR4A2 の阻害により EAE 病態が改善できることが明らかとなった。

② NR4A2cKO マウスおよびその littermate に、MOG35-55 ペプチドを免疫して EAE を誘導すると、対照マウスで認められる EAE の発症は、NR4A2cKO マウスで強く抑制されることが明らかとなった。EAE 発症マウスの CNS への T 細胞浸潤は、対照マウスでは臨床スコアと相関して推移したが、NR4A2cKO マウスでは有意な浸潤 T 細胞の抑制が認められた。さらに、CNS に残存する T 細胞を回収し、刺激後の IL-17 産生を解析したところ、NR4A2cKO マウスでは IL-17 産生はほとんど検出できなかった。一方、EAE を誘導した NR4A2cKO マウスの観察をさらに続けると、免疫 4 週間後あたりから急激に EAE を発症し、臨床スコアとしては対照マウスと同程度であった。この時、CNS へ浸潤した T 細胞数の増加は認められないものの、NR4A2cKO マウスより分離した T 細胞の IL-17 産生は、強い抑制が見られた発症初期よりは有意に高値を示し、対照マウスとの間に差は認めなかった。In vitro において、IL-6+TGF- β 存在下で分化させた T 細胞の IL-17 産生は、NR4A2cKO マウス由来 T 細胞で有意に低下していた。一方、IL-1+IL-6+IL-23 存在下で分化させた T 細胞の IL-17 産生は、対照マウスと同程度に認められた。よって、NR4A2 依存性の異なる複数の IL-17 産生細胞が存在し、EAE 発症後の異なる時期に病態形成に関与する可能性が明らかとなった。

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. Oki S, Raveney BJE, Doi Y, Yamamura T Versatile orphan nuclear receptor NR4A2 as a promising molecular target for multiple sclerosis and other autoimmune diseases. Uehara Memorial Foundation Proceedings; Chembiomolecular Science: at the Frontier of Chemistry and Biology、査読無 (印刷中)

2. 大木 伸司

多発性硬化症における病原性 T 細胞のサイトカイン産生制御機構 生化学 (日本生化学会編)、査読無、82 745-750 (2010)

3. 大木 伸司

多発性硬化症の自己免疫病態と新規治療戦略 ファルマシア (日本薬学会編)、査読無、46 745-749 (2010)

4. 吉村 元、大木 伸司

Ustekinumab の有効性と疾患 Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology、査読無、4 57-60 (2010)

5. Klemann C, Raveney BJE, Klemann AK, Ozawa T, von Hörsten S, Shudo K, Oki S, Yamamura T

Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates EAE Am. J. Pathol.、査読有、174, 2234-45 (2009)

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944010610826>

[学会発表] (計 15 件)

1. Raveney BJE, Oki S, Yamamura T NR4A2 controls Th17-mediated autoimmunity Keystone Symposia 2011: Th17 Cells in Health and Disease (Q2), 2012.2.5, Keystone USA

2. Raveney BJE, Oki S, Yamamura T NR4A2, a nuclear receptor that controls pathogenic Th17 responses during autoimmune disease, is induced in T cells by target organ antigen presenting cells British Society of Immunology Congress 2011, 2011.12.5, Liverpool UK

3. Raveney BJE, Oki S, Yamamura T NR4A2, a nuclear receptor that controls pathogenic Th17 responses during autoimmune disease, is induced in T cells by target organ antigen presenting cells 第 40 回 日本免疫学会総会・学術集会, 2011.11.27, 千葉

4. 野口 真行、大木 伸司、山村 隆 T 細胞の Interleukin-9 産生に対するレチノイドの制御作用

第 22 回日本レチノイド研究会, 2011.11.11, 東京

5. 大木 伸司、ベン・レイバニー、山村 隆
Th17 細胞依存性自己免疫応答に対するオー
ファン核内受容体 NR4A2 の機能的連関
日本薬学会第 131 年会, 2011. 3. 31, 静岡
6. Oki S, Raveney BJE, Klemann C, Yamamura
T
AM80, a synthetic retinoid, ameliorates
Th17-mediated autoimmunity of the eye and
central nervous system
14th International Congress of Immunology,
2010. 8. 22, 神戸
7. Raveney BJE, Oki S, Yamamura T
Expression of the orphan nuclear receptor
NR4A2 is required for IL-17 production by
Th17 cells.
14th International Congress of Immunology,
2010. 8. 22, 神戸
8. Raveney BJE, Oki S, Yamamura T
Expression of the orphan nuclear receptor
NR4A2 is required for IL-17 production by
Th17 cells.
97th Annual Meeting of the American
Association of Immunologist, 2010. 5. 7,
Baltimore USA
9. 小口 翔、ベン・レイバニー、大木 伸司、
天竺桂弘子、佐藤 準一、山村 隆
合成レチノイド Am80 は Th17 依存性眼炎症を
抑制し Foxp3 陽性 T 細胞を誘導する
日本薬学会第 130 年会, 2010. 3. 28, 岡山
10. 大木 伸司、ベン・レイバニー、山村 隆
オーファン核内受容体 NR4A2 は IL-17 産生性
T 細胞と自己免疫応答に強く連関する
第 22 回日本神経免疫学会学術集会,
2010. 3. 17, 東京
11. Raveney BJE, Oki S, Yamamura T
Expression of the orphan nuclear receptor
NR4A2 is required for IL-17 production by
Th17 cells
第 39 回 日本免疫学会総会・学術集会,
2009. 12. 2, 大阪
12. 大木 伸司、ベン・レイバニー、山村 隆
AM80, a synthetic retinoid, ameliorates
Th17-mediated ocular autoimmunity and
promotes the infiltration of Foxp3+ T
cells into the eye
第 39 回 日本免疫学会総会・学術集会,
2009. 12. 2, 大阪
13. Raveney BJE, Oki S, Yamamura T
Expression of the orphan nuclear receptor
NR4A2 is required for IL-17 production by
Th17 cells
2nd European Congress of Immunology,
2009. 9. 13, Berlin Germany
14. Raveney BJE, Oki S, Yamamura T
Expression of the orphan nuclear receptor
NR4A2 is required for IL-17 production by
Th17 cells

9th Annual Conference of FOCIS, 2009. 6. 11,
San Fransisco USA

15. Oki S
Nuclear receptors as therapeutic targets
for multiple sclerosis
2nd Conference of Germany and Japan
Neuroimmunology, 2009. 6. 7, Eibsee Germany

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: IL-17 産生抑制物質及びそのスク
リーニング方法

発明者: 大木 伸司、北條 浩彦、三宅 幸子、
山村 隆

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 特願 2007-49768

出願年月日: 平成 19 年 2 月 28 日

国内外の別: 国内

名称: IL-17 に起因する炎症を改善する
ための医薬組成物

発明者: 大木 伸司、北條 浩彦、三宅 幸子、
山村 隆

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 特願 2009-501299

出願年月日: 平成 20 年 2 月 28 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大木 伸司 (OKI SHINJI)

(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・第三研究室長

研究者番号: 50260328

(2) 研究分担者

(0)

(3) 連携研究者

(0)