

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790855

研究課題名（和文） 多発性硬化症モデルの予後に関連する再発・寛解維持の制御機構  
～自己免疫ワクチン研究課題名（英文） Regulation in maintenance of remission involving the prognosis of  
a model of Multiple Sclerosis

研究代表者

林 幼偉 (LIN YOUWEI)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所免疫研究部・併任研究員

研究者番号：80392439

研究成果の概要（和文）：

脳炎惹起性ペプチドを感作することで多発性硬化症（MS）の多彩な経過に類似した動物モデル(EAE)が作成可能である。SJL/J マウスでは再発型 EAE を惹起する PLP139-151 と単相型 EAE を惹起する PLP136-150 がオーバーラップしていることから、遺伝的素因に依らないで寛解を維持する因子として、①脳炎惹起性ペプチド自体のヒエラルキー：優位性が高いペプチドほどそれぞれで惹起した EAE は再発・再誘導されにくいという逆相関があること、②末梢リンパ節に寛解期以降で誘導される CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞(Treg)：高値で維持され、最も制御能の高い CD69CD103 共陽性の分画(DP-Treg)を多く含むことを突き止めた。さらにこの DP-Treg は病態形成に深く関わる Th17 との類似点もありながら IL-6R が低く維持されて Treg の性質を保ったまま適材適所で制御性機能を発揮できると推定された。またこの Treg は症状が起こらない条件でも誘導でき、ワクチンのように発症を抑制することも示した。

研究成果の概要（英文）：

Immunization with several encephalitogenic myelin peptides causes experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), resembling variety types of multiple sclerosis (MS).

Noting that immunizing SJL/J mice with overlapping myelin proteolipid protein (PLP) residues 136-150 and 139-151 could induce quite different diseases; monophasic EAE by PLP136-150 and relapsing EAE by PLP139-151, we found the non-genetic factors to maintain remission of EAE as follows: A) the hierarchy of the encephalitogenic peptide itself, which means that the more dominant peptide possessed the capacity to develop acute EAE, the less relapse and re-induction of EAE were occurred, and B) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells (Treg) induced in the lymphnodes during remission phase, which is characterized by maintenance at high level and by content of the highly potent Treg expressing both CD69 and CD103(=DP-Treg). This DP-Treg can keep the property of Treg due to the low expression of IL-6R, nevertheless it shares some signatures with Th17, a pathogenic cause of EAE and MS, and may conduct regulatory function in situ.

Furthermore, such regulation could be observed even under non-inflammatory condition, indicating the possibility of a potent and a safe autoimmune vaccination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経病態免疫学、制御性 T 細胞、実験的自己免疫性脳脊髄炎、ペプチド優位性

### 1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症（以下MS）は中枢神経系に脱髄病変を生じ、症状の再発・寛解を繰り返し進行する神経難病であり、代表的な動物モデルとしては主に脳炎惹起性ペプチドの感作で誘導される実験的自己免疫性脳脊髄炎（以下EAE）が研究され、現在では单相型・再発寛解型・慢性型などMSの多彩な経過に類似した様々なモデルが作成されている。しかし感作ペプチドは動物種や系統に依存していることから、動物種や系統と感作方法が同じであればEAEの臨床経過も一律であると思われており、後天的要因に左右されやすいMSの病態を必ずしも反映しないのではないかという意見があった。

我々は脳炎惹起性ペプチドが複数同定されている SJL/J マウスにおいては感作ペプチドの違いによって全く異なる臨床経過をとることを発見し、遺伝的素因によらない再発寛解の機構を解明する糸口と考えた。

### 2. 研究の目的

同一の遺伝子的背景をもつ動物モデル：SJL/J で見られる EAE の臨床経過の違い（再発型と单相型）を解析することで、遺伝的素因によらない EAE における寛解維持の機構を解明し、MS における再発抑制の適切な治療手段の開発に応用する。

### 3. 研究の方法

1) PLP139-151 によって惹起される再発寛解型 EAE と PLP136-150 によって惹起される单相型 EAE の経過に対しさらに同一または別のペプチドで追加免疫を行い、寛解・維持が持続するかどうかを見る。

2) 再発寛解型 EAE と单相型 EAE の経過を経時的に比較し、寛解・維持に関わる抑制性の細胞を同定する。その細胞の特徴を明らかにする。

3) 寛解・維持に関わる細胞が炎症性細胞とどういう関係にあり EAE の経過に関与するかを解明する。

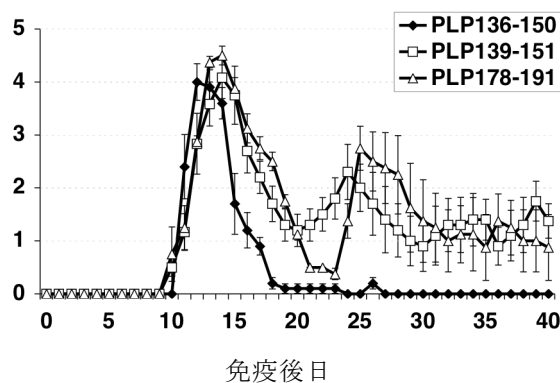
4) 再発寛解型 EAE と单相型 EAE を惹起するペプチドがオーバーラップしていることより、それらから N 末端や C 末端を除去した関連ペプチドを複数作成し、再発・再誘導への感受性を比較し、さらに 2) で同定した細胞群の誘導性と相関するか検討する。

5) EAE を惹起する条件（ペプチド+完全フ

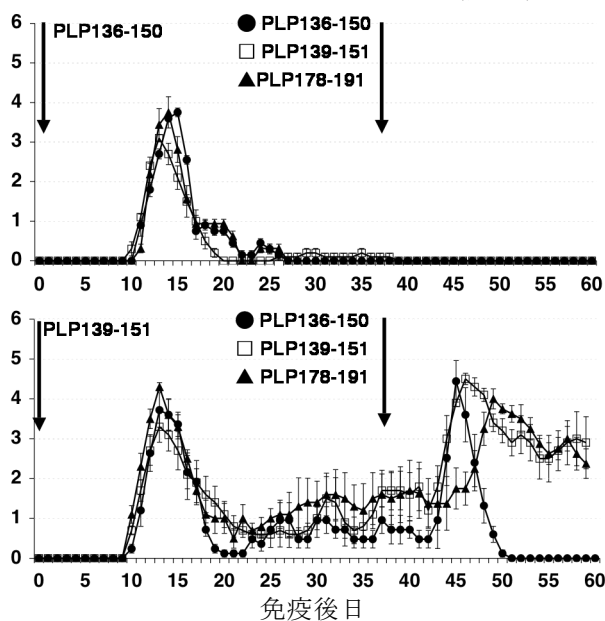
ロイントアジュバント：CFA）でなく惹起しない条件（ペプチド+不完全フロイントアジュバント：IFA）でペプチドを感作してから追加免疫で EAE をおこし再誘導への感受性を比較する。

### 4. 研究成果

1) まず再発寛解型のモデルとして広く使用されている PLP139-151 による EAE がさらに寛解後にどのペプチドで追加免疫しても再誘導されるのに対し、これと重複する PLP136-150 によって誘導される EAE は一切再発しない单相型で（図 1a）、さらに寛解後にどのペプチドで追加免疫しても再誘導されず寛解を長期に維持するという大きな違いを示すことを見いだした（図 1b）。

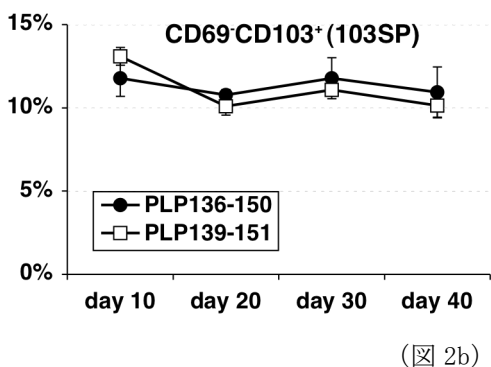
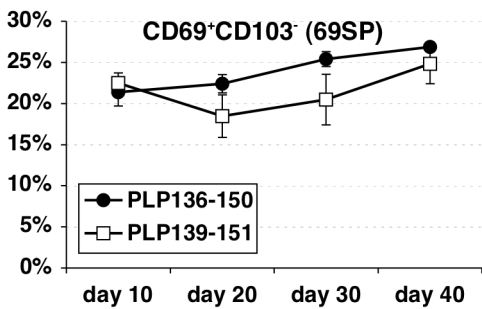
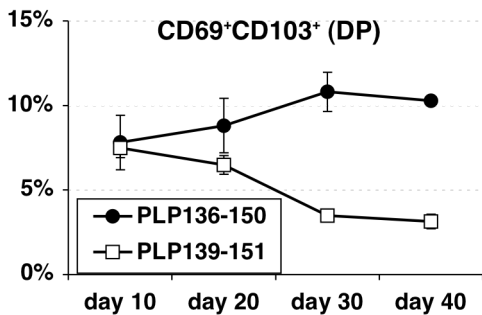
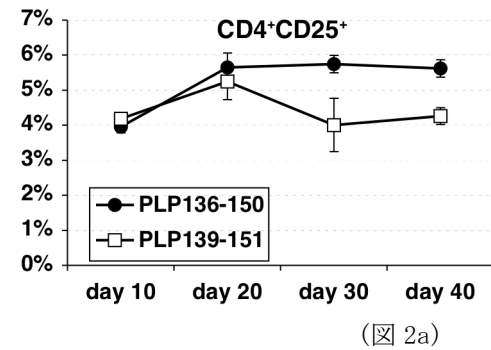


(図 1a)

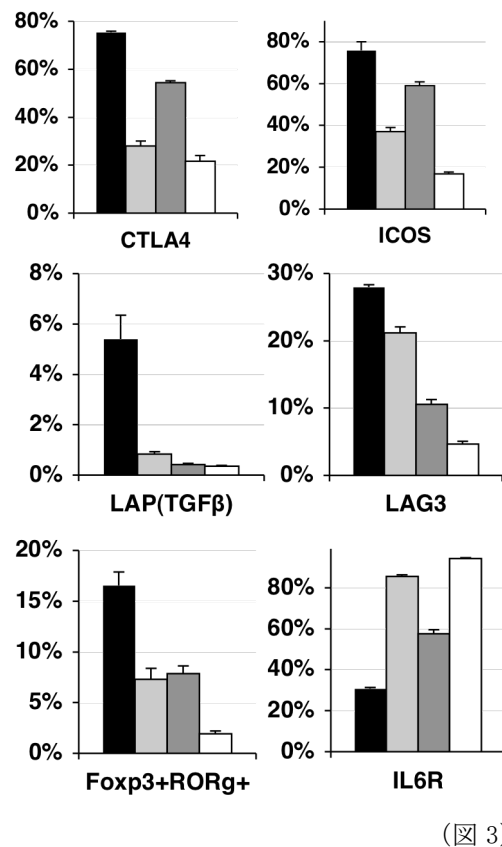


(図 1b)

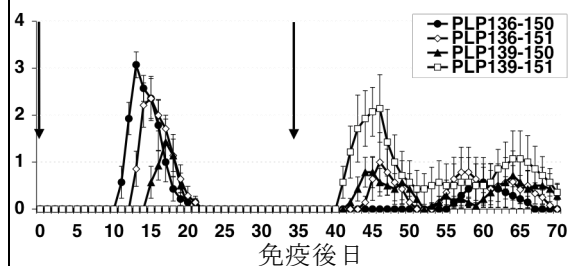
2) 次に各 EAE の経過で経時的に細胞を採取して比較し、上記の違いが末梢リンパ節に寛解期以降で誘導される CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞(Treg)が長期に高値で維持されるか否かという量的な動態の違い (図 2a) と、最も制御能の高い CD69CD103<sup>+</sup> 共陽性の分画 (DP-Treg) を多く含むか否かという質的な違い (図 2b) によることを発見した。



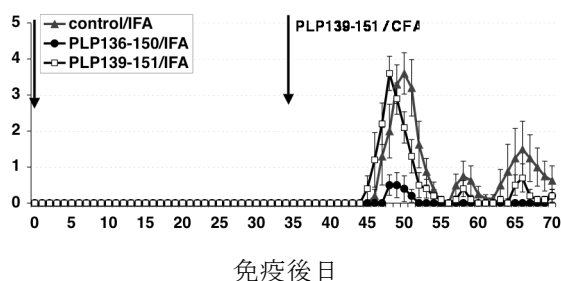
3) そしてこの DP-Treg は特に CTLA4, ICOS, LAG3, FR4 OX40, 4-1BB などの主要な Treg 関連分子の発現が他の分画より圧倒的に高い性質をもちながら Foxp3 と RORγt を共発現し IL17 も少量産生する特殊な一群であり、EAE の発症・増悪の本態である炎症性 Th17 細胞との関係で注目すべき群であると思われた。さらにこの DP-Treg は IL10 や LAP も特異的に産生し、CCR5 や CCR6 などが高く CD62L や CCR7 が低いエフェクター細胞でありながらかつ IL-6R が低い炎症性 Th17 細胞に転化しにくく、Treg としての性質を保ったまま炎症性細胞と共に移動して適材適所で抑制性機能を発揮できることが判明した。



4) また脳炎惹起性ペプチドにはヒエラルキーがあり優位性が高いペプチドほどそれで誘導した EAE はむしろ再発・再誘導されにくいという逆相関があり (図 4)、上記の DP-Treg の誘導能とも相関することを明らかにした。



5) この再誘導への抵抗性はEAEを惹起しない条件でも保持されることも確認しており(図5)、副作用の少ない効果的な自己免疫ワクチンへの布石と考えた(例。EAEを惹起する条件(ペプチド+CFA)が生ワクチン; EAEを惹起しない条件(ペプチド+IFA)が不活性ワクチン)。



(図5)

## 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2件)

- ① 林 幼偉、山村 隆: 誘導型制御性T細胞の特徴; 臨床免疫アレルギー科: 2007; 48-5: 483-490 (査読なし)
- ② 林 幼偉. 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の寛解維持に関わる制御機構; Neuroimmunology (日本神経免疫学会機関誌): 2008; 16-2: 183-189 (査読なし)

[学会発表] (計3件)

- ① 林 幼偉、三宅幸子、山村 隆: EAEの寛解を維持する機能的制御性T細胞の誘導に相関する脳炎惹起性ペプチドの優位性. 第50回日本神経学会(仙台) 2009年5月20日
- ② Youwei Lin, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura. Dominancy of encephalitogenic peptide itself directs sustainable regulation of a model of multiple sclerosis, through induction of 'armoured' regulatory T cells. 第14回国際免疫学会(神戸) 2010年8月23, 24日
- ③ Youwei Lin, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura. Dominancy of encephalitogenic peptide itself directs sustainable regulation of a model of multiple sclerosis, through induction of 'armoured' regulatory T cells. 第10回国際神経免疫学会(バルセロナ) 2010年10月26日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 幼偉 (LIN YOUWEI)

(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・兼任研究員

研究者番号: 80392439