

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 11 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790950

研究課題名（和文） 関節炎における MAIT 細胞の役割の解明

研究課題名（英文） Mucosal-associated invariant T cells in the pathogenesis of arthritis.

研究代表者

千葉 麻子 (CHIBA ASAKO)

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 非常勤研究員

研究者番号：40532726

研究成果の概要（和文）：Mucosal-Associated Invariant T細胞(MAIT細胞)は炎症を増幅することにより関節炎悪化に作用することを2種類の関節炎動物モデルを用いて明らかにした。さらにMAIT細胞はT細胞受容体刺激だけでなくIL-1 β やIL-23などのサイトカイン刺激により活性化することを示した。これらの結果より、MAIT細胞は環境に応じて異なる機能を発揮し関節炎モデルにおいては病態増悪に作用すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We revealed that Mucosal-Associated Invariant T cells (MAIT cells) promote inflammation and exacerbate arthritis by using two mouse models of arthritis. We also demonstrated that MAIT cells became activated upon stimulation with IL-1 β or IL-23 even in the absence of T cell receptor stimuli. These results indicate that MAIT cells may exert different functions depending on the pathologic condition and contribute to augment disease in arthritis models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
H22年度	1,400,000	420,000	1,820,000
H23年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：関節炎 自然リンパ球 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは炎症性滑膜炎を主座とした全身性自己免疫疾患である。進行性の滑膜炎は関節軟骨や骨を侵し、関節に重篤な変形や機能障害を引き起こす。昨今サイトカインを

標的とした生物学的製剤が開発され関節リウマチの治療法は飛躍的に発展した。しかしながら完全に関節炎を制御するまでに至らず、関節リウマチの病因解明とより根本的な治療法の開発が望まれている。関節リウマチなどの関節炎の病態初期にはT細胞などの

獲得免疫反応の異常が主体をなし、その結果マクロファージや好中球などの自然免疫系、滑膜細胞や破骨細胞の活性化が引き起こされると考えられている。近年 T 細胞には regulatory T 細胞や iNKT 細胞など様々なサブセットが存在することが明らかとなり、それぞれの免疫調節機能に注目があつまっている。これまでに我々は iNKT 細胞に調節性サイトカインを産生させる糖脂質をマウスに投与して関節炎を抑制し、iNKT 細胞を介した関節炎治療の可能性を見出した (*Arthritis Rheum.* 2004)。さらに iNKT 細胞がマウス関節炎の病態増悪に関与していることを明らかにし、関節炎における iNKT 細胞制御の重要性を確認した (*Arthritis Rheum.* 2005)。NK マーカーと T 細胞受容体両方を発現する NKT 細胞には iNKT 細胞以外にもその存在が明らかとなつてきている。その一つが腸管粘膜固有層やパイエル板に多く存在する細胞として報告された Mucosal-Associated Invariant T (MAIT) 細胞である (Treiner ら *Nature* 2003)。MAIT 細胞は MHC class Ib 分子に属する Major histocompatibility molecule related 1 (MR1) 分子に拘束され、T 細胞受容体 (TCR) にインバリアントな V α 鎖 (マウス V α 19、ヒト V α 7.2) を発現する T 細胞サブセットである。MAIT 細胞は iNKT 細胞と同様に様々なサイトカインを産生する能力を有すると考えられている。最近ヒト末梢血 Double Negative T 細胞のおよそ 40%、CD8 β 陽性 T 細胞の 8% が V α 7.2 陽性 T 細胞であることが報告され、末梢血単核球の 0.2%程を占める iNKT 細胞に比べて遥かに高い頻度で存在することが明らかとなった (Martin ら *PLoS Biology* 2009)。

2. 研究の目的

これまで我々は iNKT 細胞の存在が関節リウマチモデルで病態の悪化に関与することを明らかにしてきた。MAIT 細胞は特にヒトにおいて iNKT 細胞より高い頻度で存在することが報告され、MAIT 細胞の関節炎病態での役割を解明することは重要な課題である。そこで、以下の目的を主軸に研究を進めた。

- (1) マウス関節炎病態における MAIT 細胞の役割の解明
- (2) マウス MAIT 細胞活性化機序の解明
- (3) MAIT 細胞検出方法の確立 (ヒトおよびマウス MAIT-T 細胞 TCR に対する抗体の作製)

3. 研究の方法

- (1) マウス関節炎病態における MAIT 細胞の役割の解明。

関節リウマチの動物実験モデルには、II 型コラーゲンを免疫して発症を誘導するコラーゲン誘導関節炎 (Collagen-induced arthritis: CIA) と抗体投与により関節炎を誘導する抗体誘導関節炎 (II 型コラーゲン抗体誘導関節炎) などがある。CIA の病態形成には T 細胞や B 細胞などの獲得免疫系が不可欠であるが、抗体誘導関節炎は T・B リンパ球欠損マウスにも発症しマクロファージ・補体などの自然免疫や滑膜細胞・破骨細胞が病気の主体を占める。この 2 種の関節炎モデルを MAIT 細胞欠損マウス (MR1 ノックアウトマウス) に誘導し野生型マウスと比較することで MAIT 細胞の関節炎病態における役割を検証した。

① CIA に対する MAIT 細胞の役割の検証。
MR1 ノックアウトマウスは C57BL/6 バックグラウンドであるため DBA/1J マウスと 10 代交配して得られた MR1^{-/-}DBA/1J マウスと同腹 MR1^{+/+}DBA/1J マウスに CIA を誘導した。CIA を誘導したマウスの臨床経過・病理組織所見・血清中 II 型コラーゲン抗体価および *in vitro* での II 型コラーゲン再刺激への T 細胞反応について野生型と MR1 ノックアウトマウスで比較した。

② 抗体誘導関節炎に対する MAIT 細胞の役割の検証。
MR1 ノックアウトマウスと同腹の野生型マウスに抗 II 型コラーゲン抗体と LPS を投与し、臨床経過・病理組織所見について比較検討した。MR1 ノックアウトに V α 19TgCD1d ノックアウトマウス由来の MAIT 細胞を養子移入し臨床経過・病理像への影響を調べた。

(2) マウス MAIT 細胞活性化機序の解明。

① 肝臓単核球の TCR 刺激に対するサイトカイン産生能を MR1 ノックアウトマウスと野生型マウスで比較した。

② V α 19TgCD1d ノックアウトマウスの MAIT 細胞をセルソーターを用いて単離し、様々なサイトカイン存在下で培養し、産生サイトカインおよび増殖反応を調べた。

(3) MAIT 細胞検出方法の確立 (ヒトおよびマウス MAIT 細胞 TCR に対する抗体の作製)

① マウス MAIT 細胞ハイブリドーマ・ヒト MAIT 細胞より TCR V α 鎖と V β 鎖のクローニング。

② バキュロウィルス発現システムを用いた *Bombix mori* による組み換え蛋白の合成。V α 鎖と V β 鎖のヘテロダイマー化及び精製。

③ 動物への MAIT 細胞 TCR 組み換え

蛋白の投与。

④ 免疫動物の脾細胞融合。

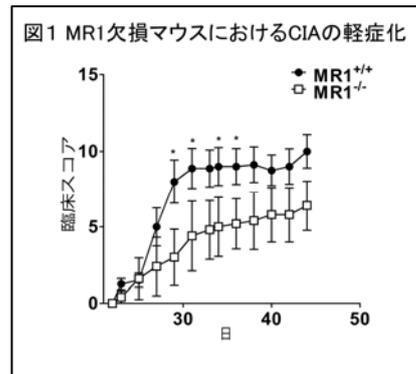
⑤ 抗体産生ハイブリドーマの選択。

⑥ ハイブリドーマのクローン化、抗体産生。

4. 研究成果

(1) マウス関節炎病態における MAIT 細胞の役割の解明。

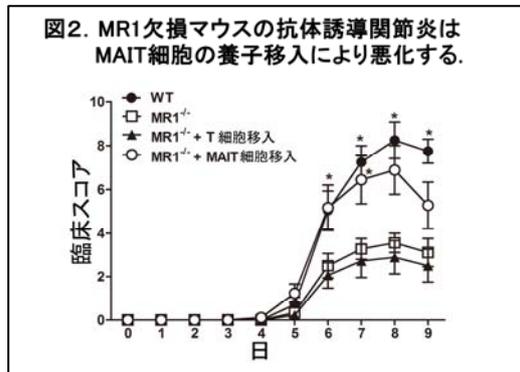
① CIA に対する MAIT 細胞の役割の検証。
MR1^{-/-}DBA/1J マウスに誘導した CIA は MR1^{+/+}DBA/1J マウスに比較して、軽症化することが臨床経過(図 1)および関節病理組織所見より明らかとなった。しかし、血清中の II 型コラーゲンに対する抗体価はグループ間で優位な差はみられなかった。また CIA マウスのリンパ節細胞を II 型コラーゲンで再刺激し細胞増殖と IFN γ および IL-17 産生量についても比較したが差は認めなかった。



② 抗体誘導関節炎における MAIT 細胞の役割の検証。

MAIT 細胞の欠損により CIA は軽症化した。II 型コラーゲンに対する T 細胞・B 細胞の反応には差がみられなかったことから、MAIT 細胞は関節炎の炎症期に強く作用している可能性が考えられた。そこで、抗 II 型抗体と LPS を投与して誘導する抗体誘導関節炎を MR1 ノックアウトと野生型マウスで比較した。MR1 ノックアウトマウスで抗体誘導関節炎が軽症化したことより、MAIT 細胞

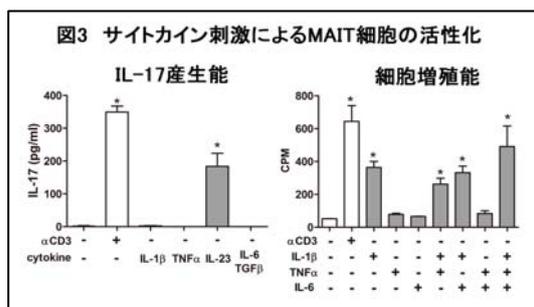
は関節炎の炎症増幅に関与していることが示された。MAIT 細胞が関節炎増悪に働くことを示すため、MR1 ノックアウトマウスに MAIT 細胞を養子移入し抗体誘導関節炎を誘導すると、野生型マウスと同等の強い関節炎を発症した (図 2)。



(2) マウス MAIT 細胞の活性化機序の解明。

① 臍単核球を抗 CD 3 抗体で刺激培養し、培養液上清中の IFN γ と IL-17 濃度を ELISA にて測定した。V α 19TgCD1d ノックアウトマウスより MAIT 細胞をセルソーターで単離し、抗 CD3 抗体で刺激すると IL-17 の産生が見られた。

② CD3 抗体の刺激に様々なサイトカインを添加した培養条件で MAIT 細胞の IL-17 産生量を比較すると、IL-23 により IL-17 産生が増幅されることが明らかとなった。更に IL-23 のみの刺激でも MAIT 細胞は IL-17 を産生した。細胞増殖能に対するサイトカインの影響を検証してみると、IL-1 β 刺激により MAIT 細胞が増殖することが明らかとなった。



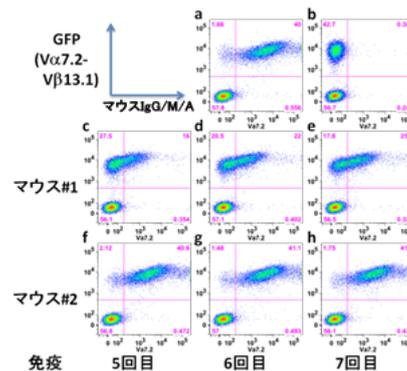
研究成果 (1) (2) より、マウス関節炎モデルにおいて MAIT 細胞は炎症の増幅に作用することにより関節炎の悪化に関与することが示された。マウス MAIT 細胞は IL-1 β や IL-23 などのサイトカイン刺激で増殖し IL-17 を産生することから、感染症や関節炎などの強い炎症下では、サイトカイン刺激で活性化しその増幅に働くと考えられる。

(3) MAIT 細胞検出方法の確立 (ヒトおよびマウス MAIT 細胞 TCR に対する抗体の作製)

MAIT 細胞 TCR の合成・精製(目的①・②)はヒトおよびマウスともに完了している。

③ ヒト MAIT 細胞 TCR 組み換え蛋白を Balb/C マウス 2 匹に免疫し、血清中の抗体産生を V α 7.2 発現(GFP 陽性)CHO 細胞およびヒト末梢血単核球を用いて検証した(図 4 c-h)。ポジティブコントロールとして抗 V α 7.2 抗体(バイオレジェンド)を用い (図 4 a)、2 次抗体には APC 抗マウス IgG/M/A 抗体を用いた。10000 倍希釈の血清で V α 7.2 に対する反応が見られた。

図4マウス血清中抗V α 7.2抗体のスクリーニング



④ ~⑥これらのマウスの脾細胞 を用いハイブリドーマを作製し、抗体産生ハイブリドーマを選択した。クローン化を試みたが、その過程で抗体産生能が失われた。インバリアン

ト T 細胞受容体に対する抗体産生ハイブリドマの樹立は極めて困難なことが iNKT 細胞の例からも明らかである。引き続きヒトおよびマウス MAIT 細胞 TCR 蛋白の免疫〜ハイブリドマ作製を試みる方針である。

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 4 件)

1. **Chiba A**, Mizuno M, Tomi C, Tajima R, Alloza I, di Penta A, Yamamura T, Vandebroek K, Miyake S. A 4-trifluoromethyl analogue of celecoxib inhibits arthritis by suppressing innate immune cell activation. *Arthritis Res Ther.* 2012, 14: R9 doi:10.1186/ar3683 査読有
2. **Chiba A**, Tajima R, Tomi C, Miyazaki Y, Yamamura T, Miyake S. Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012, 64: 153-161. DOI: 10.1002/art.33314 査読有
3. Cohen NR, Tatituri RV, Rivera A, Watts GF, Kim EY, **Chiba A**, Fuchs BB, Mylonakis E, Besra GS, Levits SM, Brigl M, Brenner MB. Innate recognition of cell wall β -glucans drives invariant natural killer T cell responses against fungi. *Cell Host Microbe*, 2011, 10: 437-45 DOI 10.1016/j.chom.2011.09.011 査読有
4. Miyazaki Y, Miyake S, **Chiba A**, Lantz O, Yamamura T. Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int. Immunol.*, 2011, 23: 529-535. doi: 10.1093/intimm/dxr047 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. (発表者) 千葉麻子 田村直人 林絵里 松平蘭 頭山尚子 高崎芳成 三宅幸子 (標題) 自己免疫疾患患者における Mucosal-associated invariant T 細胞の解析 (学会名) 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (発表年月日) 2012 年 4 月 26 日 (発表場所) グランドプリンスホテル新高輪(港区)

2. (発表者) 千葉麻子 田村直人 松平蘭 高崎芳成 山村隆三宅幸子 (標題) 膠原病における Mucosal-associated invariant T 細胞の解析. (学会名) 第 40 回日本免疫学会総会 (発表年月日) 2011 年 11 月 27 日 (発表場所) 幕張メッセ(千葉市)

3. (発表者) 千葉麻子 田村直人 松平蘭 頭山尚子 高崎芳成 山村隆 三宅幸子 (標題) 膠原病における Mucosal-associated invariant T 細胞の解析. (学会名) 第 39 回日本臨床免疫学会総会 (発表年月日) 2011 年 9 月 17 日 (発表場所) 京王プラザホテル(新宿区)

4. (発表者) 千葉麻子、三宅幸子 (標題) マスト細胞の活性阻害を介した関節炎の抑制. (学会名) 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (発表年月日) 2011 年 7 月 19 日 (発表場所) 神戸ポートピアホテル(神戸市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

免疫研究部ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 麻子 (CHIBA ASAKO)

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 研究員
研究者番号 : 40532726

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし