

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461301

研究課題名(和文) 多発性硬化症の寛解維持を担う多能的制御性T細胞の誘導と自己免疫ワクチンへの適応

研究課題名(英文) induction of multi-functional regulatory T cell involved in maintenance of multiple sclerosis : application for vaccination of autoimmune diseases

研究代表者

林 幼偉 (Lin, Youwei)

国立研究開発法人国立精神・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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：SJL/J マウスでは遺伝的素因によらず感作ペプチドの違いのみで異なる経過のEAEが惹起できる。EAEの寛解維持を担うのはCD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>共陽性CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性T細胞(=DP-Treg)であり、脳炎惹起性ペプチドの中で上位の優位ペプチドはEAEを惹起しやすいが、抗原特異的Tregの多くを有するDP-Tregを誘導しやすくEAEの再発・再誘導を惹起しにくい。DP-Tregは複数の病原性T細胞に対応するhybrid Tregを有し、抗原刺激によりIL6Rを低値で維持して安定するが、EAEを発症せずとも誘導でき、抑制効果はペプチド特異的な免疫寛容と異なり組織選択的である。

研究成果の概要(英文)：Targeted monoclonal antibodies improved therapeutic efficacy in some autoimmune diseases, but it is insufficient for complete inhibition.

Focused on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), we demonstrated that sensitization of superior dominant peptide sustained remission by inducing CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> (DP) subset of regulatory T cells (Treg). DP-subset of Treg was the most potent one, and possessed multiple hybrid signatures corresponding to each phase of EAE, stabilized with retention of the IL6R expression low. DP-subset obtained high antigen-specificity within hybrid signatures and IL6R<sup>low</sup> fraction, which required proper antigen stimulation for their maintenance. By limiting to its own, sensitization of superior dominant peptide could suppress the reactivity to other encephalitogenic peptides tissue-specifically, unlike tolerance-induction that inhibited just peptide-specifically. Such suppression was available even under EAE-undeveloped condition and in EAE-established mice.

研究分野：神経免疫学、免疫学

キーワード：制御性T細胞 抗原特異性 優位エピートープ 脳炎惹起性ペプチド 実験的自己免疫性脳脊髄炎 多発性硬化症 自己免疫ワクチン 再発と寛解

## 1. 研究開始当初の背景

免疫システムは多種多様な炎症性因子や制御性因子が存在して緻密なネットワークを形成している。自己免疫疾患はこれら諸因子のバランスの破綻により発症するが、その病態に關与する因子のパターンは疾患によって異なる。また多くの自己免疫疾患が慢性に経過するが、そのメカニズムについてはまだ詳細が明らかになっていない。

昨今の炎症性細胞を標的とした分子標的薬は顕著な有効性を証明し画期的な治療法として恩恵をもたらしているが、疾患活動性を完全に阻止するには至らない。また関連因子のパターンが異なる疾患には必ずしも有効とは限らずむしろ悪化することもあり、重篤な副作用のリスクもある。一方制御性細胞を利用する治療は特定の炎症性細胞だけを標的とせず過剰な炎症を抑制するという点で有望ではあるが、環境や経過により性質と機能が変化するという可塑性や非特異的な抑制による癌や感染症への影響が懸念されるなどの問題がある。

自己免疫疾患の一つである多発性硬化症 (MS) は中枢神経系に脱髄病変を生じ中枢神経症状の再発・寛解を繰り返す『再発寛解型』の時期を経てから次第に髄鞘回復不良を経て寛解しなくなり軸索障害も伴い慢性的に増悪する『進行型』に移行するという特徴的な経過をとる難病である。その代表的モデルとされている実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) は脳炎惹起性ペプチドの感作で比較的容易に惹起できるため、病態研究において免疫学の発展にも深く関与してきた歴史がある。EAE では単相型・再発寛解型・慢性型など MS の過程のそれぞれに応じた臨床経過が誘導できるようになっているが、感作するペプチドが動物種や系統に依存し遺伝的に一律であると考えられており、これまで感作法の変法や種・系統の交配でしか異なる経過の EAE が惹起できなかったため、必ずしも MS の臨床経過を同一系統で再現できず、遺伝的素因に依らない再発や慢性化の機構に関する解析は不十分と言わざるを得ない。

我々は再発型 EAE のモデルとされる SJL/J マウスにおいては複数の脳炎惹起性ペプチドが同定されていることに注目し、感作ペプチドの違いのみで経過の異なる EAE が惹起でき、この臨床経過の違いがペプチドの追加感作による慢性期にも維持されることを発見し、遺伝的素因に左右されない再発・寛解・慢性化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 (再発型と単相型) 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・進行抑制に対する適切な治療手段の開発に応用する。

## 3. 研究の方法

1) 再発型 EAE のモデルとされる SJL/J マウスにおける複数の脳炎惹起性ペプチドの内、PLP136-150, PLP139-151, PLP178-191 を感作して惹起した EAE の臨床経過を比較する。またその急性期症状が軽快・寛解したあとさらに同一または別のペプチドで追加免疫を施し、臨床経過を比較する。

2) 再発寛解型 EAE と単相寛解型 EAE マウスのリンパ節細胞・脳浸潤細胞を経時的に比較し、寛解・維持に關わる細胞を同定し、その特徴を明らかにする。

3) EAE における臨床経過の相違をもたらす PLP136-150 と PLP139-151 の違いを構造的に解析すべく、脊髄ホモジネートおよび各脳炎惹起性ペプチドを感作したマウスのリンパ節細胞における各脳炎惹起性ペプチドへの増殖反応性を比較する。また低用量の感作により脳炎惹起性を評価し、1) と同様に追加免疫を施し、臨床経過を比較、2) で同定した細胞の頻度を比較する。

4) 当初の計画では想定していなかった PLP139-151 ペプチド特異的 MHC クラス II デキストラマーの入手により、再発寛解型 EAE と単相寛解型 EAE の経過における CD4 陽性 T 細胞の抗原特異性を評価する。

5) 4) で得られた抗原特異性の特徴と 2) で得られた細胞の特徴との相関関係を調べる。

6) 1) での初回感作を追加免疫の前処置として捉え、EAE を惹起しない条件として CFA (完全フロイントアジュバント：結核死菌を含む) ではなく IFA (不完全フロイントアジュバント：結核死菌を含まない) をペプチドと感作した条件、または皮下投与による感作ではなく腹腔内に投与した寛容誘導の条件で前処置した場合にその後の EAE が 1) と同様の経過を示すかどうかを比較し、さらに 2) で同定した細胞の頻度を比較する。

## 4. 研究成果

1) PLP139-151 や PLP178-191 感作によって惹起される EAE は確かに再発寛解型であり、その寛解後にどのペプチドで追加免疫しても EAE が再惹起されたが、PLP139-151 と配列が重複する PLP136-150 感作によって惹起される EAE は一切再発しない単相性寛解型を示し (図 1a)、さらに寛解後にどのペプチドで追加免疫しても再惹起されず寛解を長期に維持するという大きな違いを呈した (図 1b)。

2) PLP136-150 による単相型 EAE と PLP139-151 による再発型 EAE を比較すると、寛解期ではいずれの EAE においても CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> 制御性 T 細胞 (Treg) の頻度が増加するものの、以後は単相性 EAE では維持されるのに対し再発型 EAE では維持されないこと (図 2a) この細胞を除去すれば単相型 EAE においても寛解が維持されず再発し追加感作によって再惹起されることが確認でき、さらに Treg の中でも CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> 分画の動態が重要であることが判明した (図 2b)。

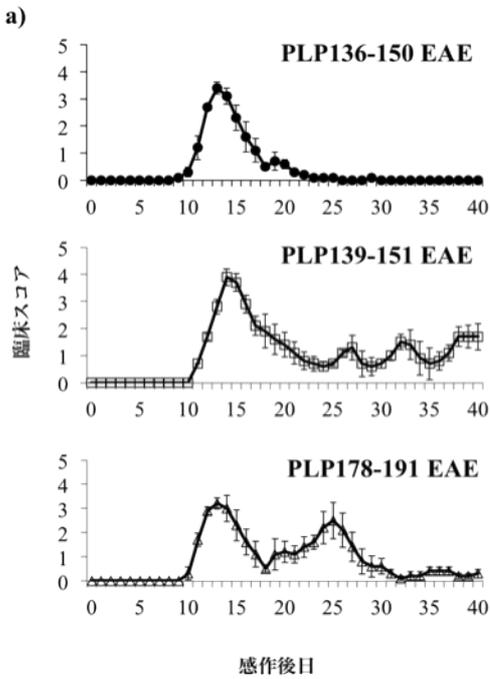


図 1

らに DP-Treg における hybrid Treg や IL-6R 陰性群の頻度は単相型 EAE で誘導される場合に多く、再発型 EAE で誘導される場合には少ないことも明らかになった。

図 2

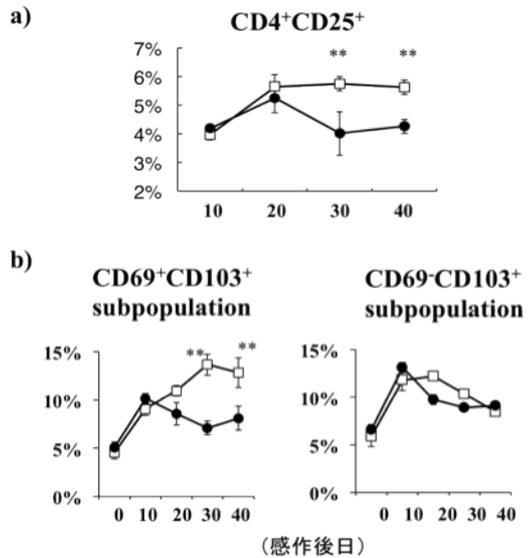
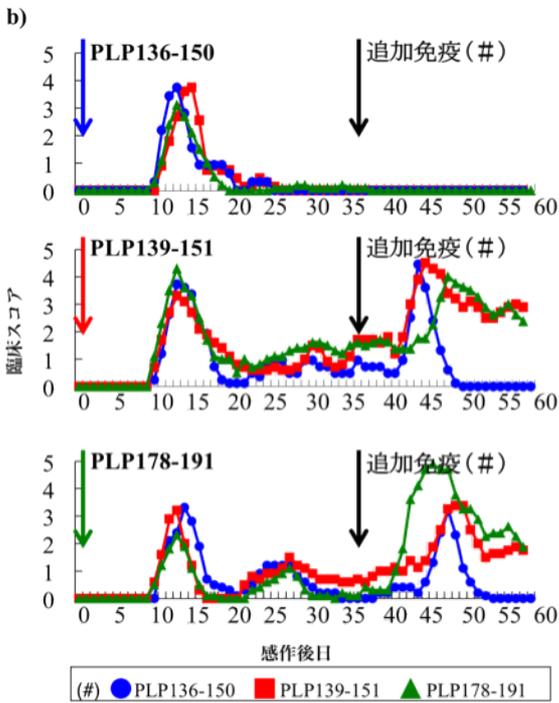


図 1



この CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>分画 (=DP-Treg) は制御活性が最も強く、CTLA4, ICOS, GITR, Helios, LAP, LAG3, 4-1BB, OX40 などの Treg 関連分子の多くで発現が高いことが確認され、Treg の中心的なサブセットであることが確認できた (図 3a)。また各ヘルパー T 細胞のマスター遺伝子である転写因子の発現を比較すると、DP-Treg では Foxp3<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup>, Foxp3<sup>+</sup>Tbet<sup>+</sup>, Foxp3<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup> といういわゆる hybrid Treg が多く含まれていた。さらに DP-Treg は EAE の寛解期以降も IL-6R の発現低下を維持しており、炎症環境下でも主要な Treg 関連因子を高く維持できることが判明した (図 3b)。さ

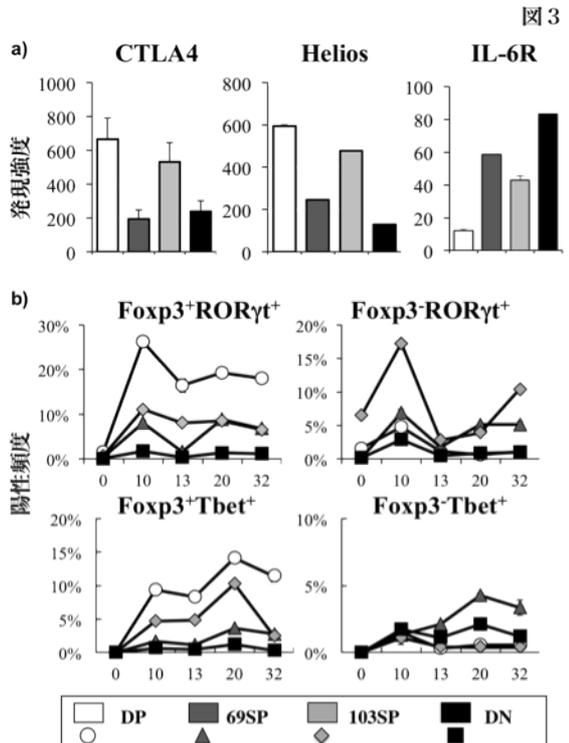
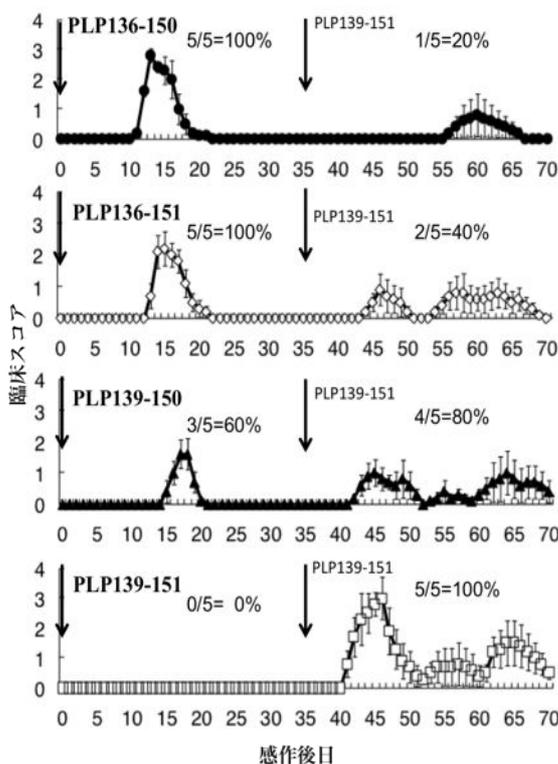


図 3

3) 脊髄ホモジネートの感作実験によれば SJL/J マウスにおいては PLP136-150 も PLP139-151 も反応性を有しており共に優位エピトープであるが、PLP136-150 への反応性の方が優位に高かった。さらに SJL/J マウスにおける複数の脳炎惹起性ペプチドをそれぞれ感作した場合、優位エピトープペプチド

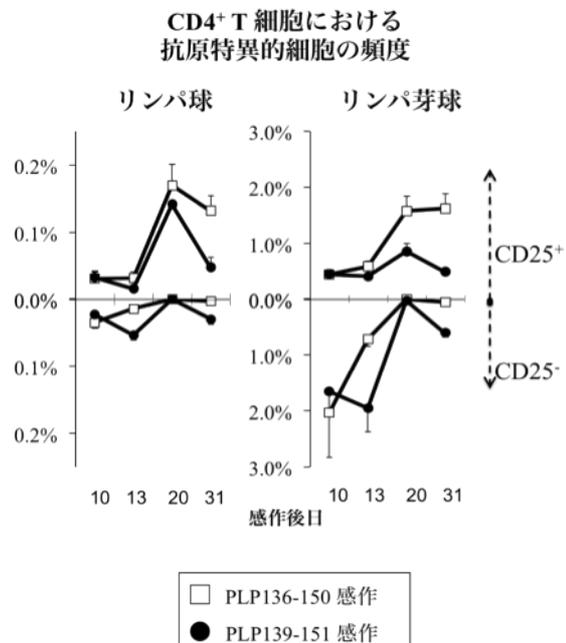
で感作したマウスの細胞は優位エピートープのみに反応するが、潜在的エピートープペプチドで感作したマウスの細胞は感作ペプチド以外に優位エピートープにも反応することが示され、優位エピートープは反応性の特異性が高いペプチドであることが推定され、特に PLP136-150 ではその傾向が顕著であった。すなわち、PLP136-150 は優位エピートープの中でより上位に位置する可能性があることになる。実際、両者の中間にあたる PLP136-151、PLP139-150 の 2 つのペプチドを作成し、通常の 1/10 の低用量で感作して比較したところ、PLP136-150 は EAE を惹起したが PLP139-151 は惹起できず、脳炎惹起性のヒエラルキーは PLP136-150 > PLP136-151 > PLP139-150 > PLP139-151 の順になることが分かった。このとき各ペプチドで感作した T 細胞の増殖反応を比較すると PLP136-150 > PLP136-151 > PLP139-150 > PLP139-151 の順に反応性が高くまた特異性が高いことがわかった。このことより優位エピートープのヒエラルキーの中で PLP136-150 は上位であり、PLP139-151 は下位であると推定される。またペプチドの追加感作による EAE の再惹起を試みたところ、その発症しやすさは上記のヒエラルキーの逆になり、脳炎惹起性が高いほど再惹起能が低下するという逆相関の関係を証明した(図 4)。このとき DP-Treg は PLP136-150 > PLP136-151 > PLP139-150 > PLP139-151 の順に増加しており、この脳炎惹起性のヒエラルキーと EAE の再惹起能への抵抗性との逆相関に DP-Treg の誘導能がリンクしていることが確認できた。

図 4



4) 脳炎惹起性ペプチドのヒエラルキーと DP-Treg の誘導能とが相関していることから、PLP139-151 特異的 I-A<sup>b</sup> デキストラマーを用い、EAE の臨床経過における CD4<sup>+</sup>T 細胞の抗原特異性を評価した。いずれの EAE でも抗原特異性は発症期ではほとんどが CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>もしくは CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> のエフェクター細胞 (Teff) に限局し、寛解期ではほぼ CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> の Treg に同定され、抗原特異性のシフトが認められたが、それ以降は PLP136-150 感作による単相型 EAE では抗原特異性シフトが維持されるのに対し、PLP139-151 感作による再発型 EAE では維持されず Teff において抗原特異性が復活していた(図 5)。

図 5



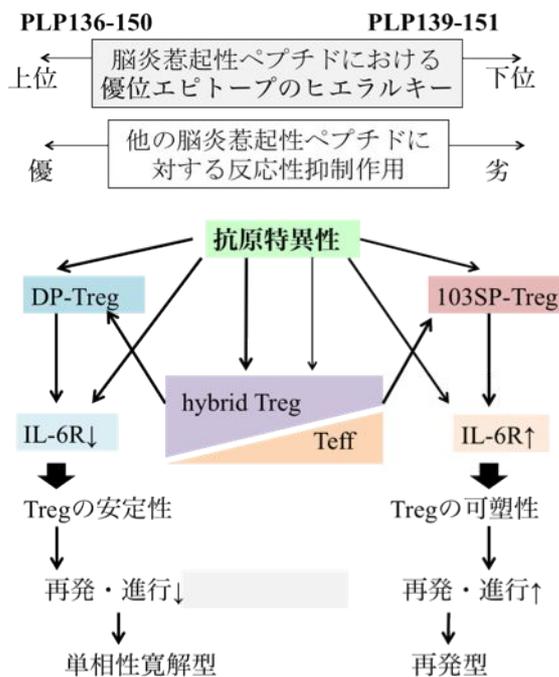
5) さらに抗原特異性は Treg の中で Foxp3 単独陽性の Treg には認められず、hybrid Treg のみに存在しており、4 分画の中では DP-Treg において最も多く検出され、しかもその IL6R 陰性群で同定された。実際に hybrid Treg の維持には抗原刺激が必要であり、抗 CD3/抗 CD28 抗体による T 細胞受容体刺激だけでは条件次第では Teff が誘導される場合があることを突き止めた。これらのことから、優位エピートープの中で上位である PLP136-150 は脳炎惹起性が高いペプチドであり、抗原刺激により寛解期以降で抗原特異性の高い hybrid Treg を多く有し IL-6R の低発現を維持する DP-Treg を誘導することが判明した。つまり抗原刺激による抗原特異性を軸にして hybrid Treg 対 Teff、IL-6R<sup>high</sup> 対 IL-6R<sup>low</sup>、DP-Treg 対 103SP-Treg の相関関係が想定できた(図 6)。

6) 予防・治療手段として考えた場合、DP-Treg を優先的に誘導できるのは優位エピートープの中で上位のペプチドを免疫して惹

起した EAE の寛解期以降であることがネックとなる。従って EAE を発症させずに誘導しうる条件をさらに検証した。ペプチドを通常の CFA とではなく IFA と混和して感作した場合には EAE が惹起できないが、この状況でも DP-Treg のが関与し、PLP136-150/IFA で前処置したものは追加感作による EAE が著明に抑制され、PLP139-151/IFA で前処置したものではほとんど抑制されなかった。

またペプチドの投与経路の違いを調べるために EAE を惹起する皮下投与による感作ではなく腹腔内投与により寛容誘導しておいてから追加感作を施したところ、この PLP136-150 寛容誘導では PLP136-150 惹起の EAE と PLP139-151 惹起の EAE は阻止されたが PLP178-191 惹起の EAE には全く影響しておらずペプチド特異的であり、しかも DP-Treg が誘導されていなかった。つまり EAE の発症に依らずとも PLP136-150 感作による EAE の疑似効果によって DP-Treg 誘導能が左右され、ペプチド非特異的に抑制効果を発揮できることを示している。実際 PLP136-150 感作後ではコラーゲン誘導関節炎(CIA)への抑制効果も認められるが、EAE で見られるような反応を阻止するほどの顕著ではないため、感作ペプチドの種類によってターゲットの炎症組織に選択性が生じるものと推定される。

図6



(まとめ)

脳炎惹起性ペプチドのヒエラルキーの中で優位エピトープの最上位にあるペプチドは抗原特異性が高く EAE を惹起しやすいが、安定型の抗原特異的 Treg の多くを有する DP-Treg を誘導・維持しやすく、EAE が再発・再惹起しにくいことを証明した。

DP-Treg は EAE の急性期・慢性期に関与す

る複数の病原性 T 細胞に対応した hybrid Treg を有し制御できる多機能的 Treg と考えられるが、ペプチド特異的な免疫寛容と異なり脳炎惹起性ペプチドのスペクトラムを広くカバーするため、疾患選択的統御が可能になると推察される。

この方法によれば感染症に対するワクチンに準えた自己免疫へのペプチドワクチンの問題が解決できるかもしれない、腫瘍治療におけるペプチド療法への応用も想定される。

## 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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

Youwei Lin, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura; Dominancy of encephalitogenic peptide itself directs sustainable remission of a model of multiple sclerosis, through later expansion of 'armoured' effector regulatory T cells: possibility of vaccination for autoimmune disease. [第 15 回国際免疫学会: 2013 年 8 月 27 日(ミラノ、ドイツ)]  
林 幼偉, 三宅 幸子, 山村 隆: 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の寛解維持を担う 'armoured Treg' の誘導: dominant epitope によるペプチドワクチンへの可能性 [第 41 回日本臨床免疫学会: 2013 年 11 月 27 日(下関海峡メッセ: 山口県下関市)] \* 優秀演題ポスター賞

Youwei Lin, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura: 'Superior' dominant peptide itself shut down the reactivation of an animal model of multiple sclerosis through later activation of antigen-specific regulatory cells: application for inverse vaccine. [第 12 回国際神経免疫学会: 2014 年 11 月 11 日(マインツ、ドイツ)]

Youwei Lin, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura: Inverse vaccination for autoimmune diseases by sensitization of superior dominant peptide through efficient induction of functionally stable regulatory T cells possessing high antigen-specificity. [第 43 回日本免疫学会学術集会: 2014 年 12 月 10 日(京都国際会議場: 京都府京都市)] \* ベストプレゼンテーション賞

[図書](計 3 件)

林 幼偉: 「実験的自己免疫脳脊髄炎: 免疫学と治療のクロストーク」, 日本臨床免疫学会会誌 .37 巻 3 号 p146-153, 2014 年 6 月

林 幼偉、山村 隆：免疫性神経疾患「多発性硬化症の動物モデル」、日本臨床社、73巻増刊号 p73-80、2015年9月  
林 幼偉、山村 隆：特集I(免疫寛容と免疫抑制):「Superior dominant peptideを用いた抗原特異性の高い安定型制御性T細胞の誘導を介した inverse vaccinationによる自己免疫疾患の治療」、臨床免疫・アレルギー科、65巻4号 p281-289、科学評論社、2016年4月

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 幼偉 (LIN YOUWEI)

国立研究開発法人 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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし