

令和元年6月18日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09706

研究課題名(和文) 多発性硬化症を統制する多能的特異的制御性T細胞による自己免疫ワクチンと慢性期治療

研究課題名(英文) Inverse vaccination for autoimmune diseases and therapy for their chronic progression by multi-functional antigen-specific regulatory cell governing multiple sclerosis

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：SJL/J マウスにおける実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の臨床経過は感作ペプチドの違いに起因する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)の誘導能の違いより規定される。DP-TregはEAEの経過中に経時的に惹起される各腫炎症性T細胞に対応して誘導され抗原刺激により維持される hybrid Tregを有し、組織修復能を発揮し、早期寛解・再発抑制・進行予防に寄与する。DP-Tregの誘導能の違いは感作ペプチドのN末端・C末端の長さ起因する functional avidityの違いと相関し、自己免疫疾患の治療や抗腫瘍免疫の適正化に貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫とは自己と非自己を区別し自己を防衛するシステムだが、その乱れで自己組織が障害される自己免疫疾患が生じる。病態解明の進歩により特定の分子を標的とした様々な薬剤が開発され画期的な効果を発揮しているものの、まだ完全に再発や進行を抑制できるものはなく、同じ標的をもつ他の疾患に応用できるとは限らない。今回我々は脳炎惹起性ペプチドを感作して多発性硬化症と類似の病態を惹起する実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)という動物モデルを利用し、ペプチドの長さを変更するだけで抗原特異的な制御性T細胞が誘導・維持され、EAEの再発・進行を完全に抑制できることを見だし、上記の欠点を補うことができるのではないと考えた。

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.

We can induce different clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in SJL/J mice with different encephalitogenic peptide, through different ability to induce CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> (DP) subset of regulatory T cells (Treg). DP-subset of Treg obtained high antigen-specificity within hybrid signatures, which was induced corresponding to multiple pathogenic T cells emerging at each phase of EAE and stabilized with proper antigen stimulation, and also exerted tissue repair capacity, resulting in complete inhibition of acute, relapse and progression of EAE.

The ability to induce DP-subset of Treg was correlated with the functional avidity of the sensitizing peptide, which was determined by the presence of its N- and C-terminal residues, and may contribute to the therapy for autoimmune diseases and also to optimization of anti-tumor immunity.

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 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 再発寛解維持 慢性進行抑制

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

免疫システムは自己・非自己の識別に基づき、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。自己免疫疾患は自己抗原の存在に起因するこれら諸因子のバランスの破綻により発症するが、その病態に関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、疾患関連因子を網羅しているわけではなく、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しう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、これまで感作法の变法や種・系統の交配でしか異なる経過の EAE が惹起できなかつたため、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充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進行化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ことで上述した現行の自己免疫疾患治療の問題点を解決する糸口と考えた。

これまでの研究で EAE の寛解維持を担うのは発症ピーク後に末梢リンパ節で誘導・維持され脳脊髄組織内に浸潤し維持される CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> 共陽性の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> 制御性 T 細胞 (=DP-Treg) であること、脳炎惹起性ペプチドのヒエラルキーの中で上位の優位ペプチドは抗原特異性が高く 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 が再発・再惹起しにくいということを証明した。

### 2. 研究の目的

上述の DP-Treg が他の subsets と異なり EAE 発症後に炎症細胞と入れ替わりに誘導・維持される機構や、組織障害後の抗原拡散を阻害し標的組織で抑制能を維持して EAE の再発・再惹起を阻止しさらに慢性進行性病態を制御しうる作用機構を、炎症性細胞や中枢神経組織との相互作用の関連で追求し、EAE の再発・寛解不全・慢性進行とその制御に関わるメカニズムを明らかにする。DP-Treg の誘導・維持はペプチド感作特異的で EAE の発症を必要としないこと、発症後でも可能なことから、自己抗原によって惹起される免疫システムそのものに着目した自己免疫疾患に対する予防的・治療的ワクチンと慢性期治療への応用を探求する。

### 3. 研究の方法

脳炎惹起性優位ペプチド感作による組織選択的な DP-Treg の誘導・維持を介した自己免疫ワクチンの適応と慢性化病態の制御機構に関し 3 つの観点から研究を進める。

#### A) DP-Treg の誘導・維持機構 (規定因子)

炎症性細胞の惹起と入れ替わりにピーク以降に誘導される機構

活性化状態と Treg 関連因子の維持、炎症性細胞との相関関係

#### B) DP-Treg の作用機構 (疾患抑制効果)

EAE における慢性期病態での関与

炎症性細胞への抗炎症作用と中枢神経組織細胞への障害修復作用

#### C) ペプチドワクチンへの応用

感作ペプチドの優位性の確認と普遍化

1) DP-Treg は発症ピーク後に誘導されることより、PLP136-150 または PLP139-151 で感作したリンパ節細胞を感作前(d0)・発症時(d10)・発症極期(d13)・寛解期(d20)・寛解維持期(d30)で経時的に採取、Treg の 4 分画における Foxp3, Tbet, ROR $\gamma$ t, GATA3 等の各 T 細胞のマスター転写因子の発現の推移を比較し、DP-Treg と 103SP-Treg において認められる抗原特異的 Treg と hybrid Treg の相関関係を確認、Th1 細胞や Th17 細胞などの炎症性 T 細胞との可塑性と安定性を経時的に評価する。(A- )。

2) DP-Treg を維持する要件を検討するため、PLP136-150 を感作して DP-Treg を誘導した後、a) APC 存在下で脳炎惹起性ペプチドによる刺激; b) 抗 CD3/抗 CD28 抗体を用いた TCR 刺激(ビーズまたは固相化)で表現型の変化を比較する。(A- )

- 3) Treg の4分画それぞれの遺伝子発現パターンを DNA-microarray 法によって比較し、大きな有意差の見られた遺伝子を siRNA で発現抑制し、DP-Treg の誘導や表現型・機能に与える影響を炎症存在下で調べる(B- )。
- 3) PLP136-150とPLP139-151のN末端とC末端長を調節したPLP136-151, PLP139-150を作成し、ペプチド特異的 T 細胞増殖反応を比較し、prism4 を用いて用量反応曲線で functional avidity を概算する(A- )。
- 4) 最上位優位ペプチド感作による单相型 EAE では発症後の寛解が迅速であり組織障害後に生じる抗原拡散が阻止されること、他のペプチド感作による EAE 発症後に最優位ペプチドを感作してもその抑制効果が認められることから、炎症機転の収束作用のみならず組織障害修復作用が想定される。発症期における中枢神経組織細胞と Treg 4 分画とを混合培養し、それらの表現型や機能の変化を比較する(B- )
- 5) EAE を惹起しない条件として、ペプチドを不完全フロイントアジュバントと混和して皮下注射した場合( = 感作)と腹腔内投与した場合( = 寛容)を比較し、EAE の惹起への影響や Treg subset の割合を比較する( C )。

#### 4 . 研究成果

1 ) EAE の臨床経過においては急性期・再発期・慢性期で主に関与する炎症性 T 細胞の種類が異なり(それぞれ ROR $\gamma$ t,陽性、Tbet 陽性、Eomes 陽性) DP-Treg の中でそれぞれの炎症性 T 細胞に対応する hybrid Treg がそれらの惹起に遅れて誘導されること、抗原特異性を有するのは hybrid Treg と炎症性 T 細胞のみであり、さらに hybrid Treg の誘導と維持には抗原特異性が重要であることが判明した( A : 図 1,2 )

図1

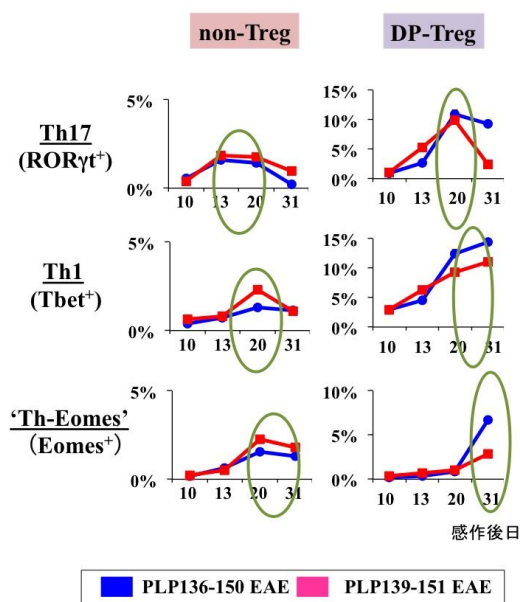
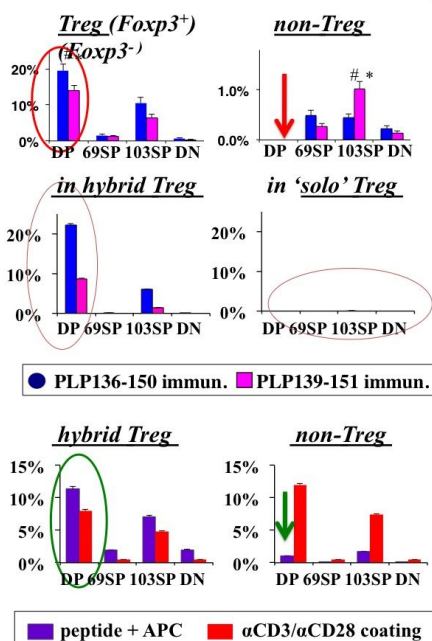


図2



2 ) DP-Treg の中で最も他のサブセットとの差が大きく発現量も高い遺伝子が preproenkephalin (PENK)であることが microarray での解析により判明した。siRNA を用いて PENK を除去したところ、最上位の優位ペプチドで惹起される進行性病態を伴わない单相型 EAE でも、DP-Treg は減少し、それ以外のペプチドで惹起される進行性病態を伴う再発型 EAE に匹敵する再発・再誘導への感受性が惹起されることが確認できた( B : 図 3 )

3 ) 感作ペプチドの N 末端と C 末端の長さを調節すると、DP-Treg の誘導能と相関してこの感受性が変化し、MHC とペプチドとの functional avidity が変化することが判明した(A : 図 4 )

4 ) 最上位の優位ペプチドで惹起される進行性病態を伴わない单相型 EAE では、それ以外のペプチドで惹起される進行性病態を伴う再発寛解型 EAE に比べ、オリゴデンドロサイトや中枢神経細胞が維持され、ミクログリアが組織修復に働く表現型にシフトしていることが明らかになった( B : 図 5 )

5 ) EAE を惹起する際にはペプチドを完全フロイントアジュバント( CFA )と混合して感作するが、ペプチドを不完全フロイントアジュバント( IFA )と混合した場合には EAE が惹起されないことを利用し、EAE を惹起せずに最上位の優位ペプチドで感作することでその後の追加免疫による EAE の発症や再発・進行性病態を抑制できることが確認できた。ペプチドを経口的に投与した場合も EAE を惹起しないが、この場合はペプチド特異的な抑制しか得られず、不完全フロイントアジュバントと混合して感作した場合のみ DP-Treg が誘導されて組織関連抗原特異的に抑制できることが判明した( C : 図 6 )

図3

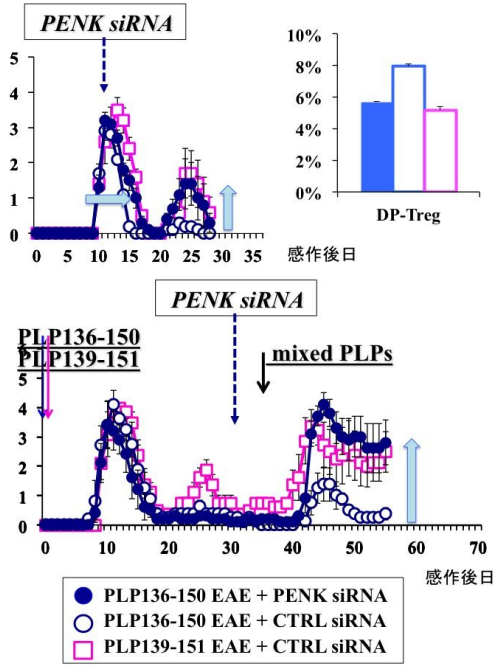


図4

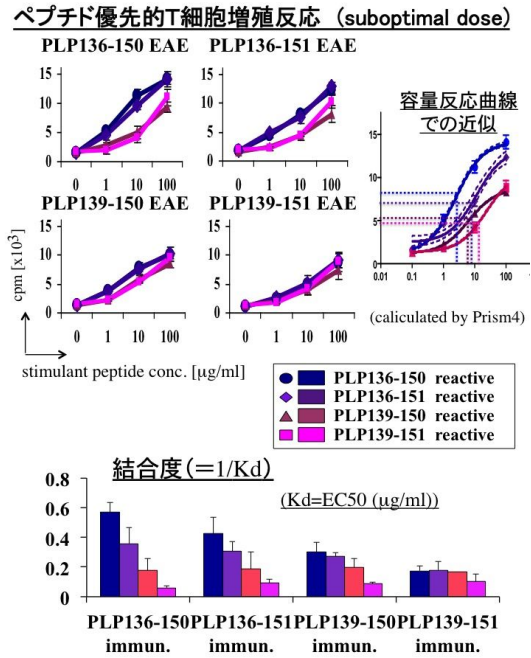


図5

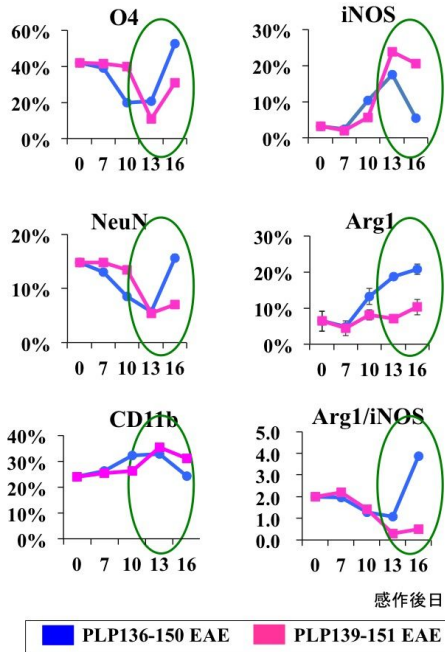
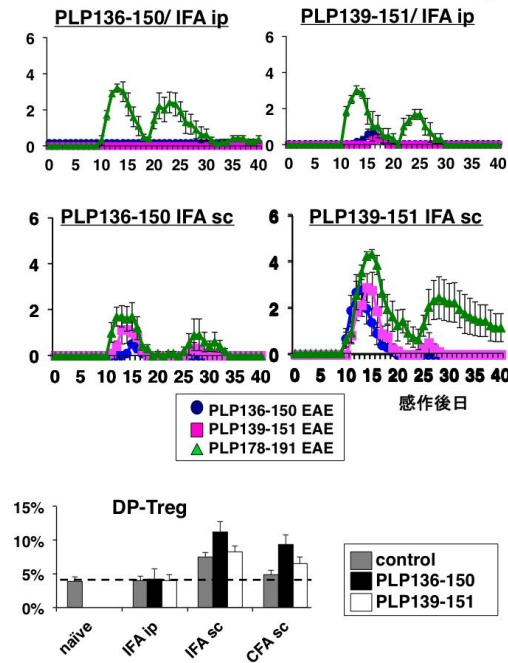


図6



(まとめ)

DP-Treg は EAE の急性期・慢性期に關する複数の病原性 T 細胞に対応した抗原特異性の高い hybrid Treg を有し、それらを逐次制御できる多機能的 Treg と考えられるが、これは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。

この疾患抗原特異的 Treg の誘導は抗原刺激で制御することができるため、維持す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、逆に不活性化すれば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

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 10 件)

Youwei Lin, Takashi Yamamura : Manipulating the stability of antigen-specific Treg by enhancing the functional avidity of the superior dominant peptide via its flanking residues harnesses autoimmunity with restricting the reactivity to disease-related antigens and promoting tissue repair capacity ; 第 47 回日本免疫学会学術集会、福岡、2018.12/10~12/12

Youwei Lin, Takashi Yamamura : Harnessing autoimmunity with superior dominant peptide to enhance the binding stability manipulate antigen-specific Tregs that restrict the disease-related antigens and promote tissue repair capacity; 14th International Congress of Neuroimmunology, Brisbane, Australia, 2018.8/27~8/31 (第14回国際神経免疫学会、ブリスベン、オーストラリア)

Youwei Lin, Takashi Yamamura : Inverse vaccination by superior dominant peptide inhibit the reactivity to disease-associated antigens and promote tissue-repair capacity in stabilized antigen-specific regulatory T cells to control of relapsing and progression of animal model of multiple sclerosis ; 第46回日本免疫学会学術集会、仙台、2017.12/12~12/14

Youwei Lin, Chandirasegaran Massilamany, Jayagopala Reddy, Takashi Yamamura : Sensitization of superior dominant peptide may eradicate relapsing and progressive multiple sclerosis by sequential induction of stabilized antigen-specific hybrid regulatory T cells reactive to disease-associated antigens with tissue-repair capacity ; 33rd European Congress of Treatment and Research in Multiple Sclerosis, Paris, France, 2017.10/25~10/28 (第33回ECTRIMS、パリ、フランス)

林 幼偉、山村 隆 : 自己免疫ワクチンによるMS治療 : superior dominant peptide による抗原特異的 Treg の組織反応性と組織修復能 : 第29回日本神経免疫学会、札幌、2017.10/6~10/7

Youwei Lin, Chandirasegaran Massilamany, Jayagopala Reddy, Takashi Yamamura : : SENSITIZATION OF SUPERIOR DOMINANT PEPTIDE MAY ERADICATE MULTIPLE SCLEROSIS THROUGHOUT BY SEQUENTIAL INDUCTION OF STABILIZED HYBRID REGULATORY T CELLS WITH DIVERSE ANTIGEN-SPECIFICITY AND TISSUE-REPAIR CAPACITY ; 23rd World Congress of Neurology, Kyoto, Japan, 2017.9/16~9/21 (第23回国際神経学会、京都、日本)

Youwei Lin, Takashi Yamamura : Inverse vaccination with superior dominant peptide may harness autoimmune diseases via sequential induction of stabilized hybrid regulatory T cells with antigen specificity and tissue repair capacity ; 第45回日本免疫学会学術集会、京都、2016.12/5~12/7

Youwei Lin, Chandirasegaran Massilamany, Jayagopala Reddy, Takashi Yamamura : Inverse vaccination with superior dominant peptide may eradicate multiple sclerosis via sequential induction of stabilized hybrid regulatory T cells with antigen specificity and tissue repair capacity ; 13th International Congress of Neuroimmunology, Jerusalem, Israel, 2016.9/26~9/29 (第13回国際神経免疫学会、エルサレム、イスラエル)

Youwei Lin, Takashi Yamamura : Antigen-specificity of superior dominant encephalitogenic peptide confers inductivity, stability, and hybrid signatures to CD69+CD103+ subset of Treg responsible for sustainable inhibition of CNS autoimmune diseases. ; 16th International Congress of Immunology, Melbourne, Australia, 2016.8/21~8/26 (第16回国際免疫学会、メルボルン、オーストラリア)

林 幼偉、山村 隆 : Dominant peptide therapy may conquer MS by turning antigen-specificity and stability to hybrid Treg. ; 第57回日本神経学会、神戸、2016.5/18~5/21

〔図書〕(計 1 件)

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〕

なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。