

平成21年4月10日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590995
 研究課題名（和文） TGF- β 陽性調節性T細胞を標的とした多発性硬化症の画期的治療法開発に関する研究
 研究課題名（英文） Novel therapeutic approach for multiple sclerosis using TGF- β -positive regulatory T cell

研究代表者
 越智 博文（OCHI HIROFUMI）
 九州大学・大学病院・講師
 研究者番号：20325442

研究成果の概要：

健常者の末梢血中における LAP 陽性 CD4+ T 細胞は 1%未満であり、極めて少数の細胞群であった。健常者と比較して多発性硬化症（multiple sclerosis：MS）患者における量的変化を明らかにすることはできなかった。また、MS 患者において病期による明らかな差異を見出すこともできなかった。末梢血 LAP 陽性 CD4+ T 細胞は極めて少数であり、*ex vivo* でサイトカイン産生能やサプレッサー機能解析を行うことは極めて困難であった。このことから、MS の病態制御に LAP 陽性 T 細胞を臨床応用する場合には、*in vitro* においてヒト LAP 陽性 T 細胞を効率良く誘導し、その機能維持を図ることが重要であると考えられた。

また、末梢血単球からの脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor：BDNF）産生低下が、MS の障害度進行に関与する可能性を指摘した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、多発性硬化症、免疫調節性細胞

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症（multiple sclerosis；MS）は中枢神経系に炎症性脱髄病巣が多発する難病で、中枢神経の髄鞘抗原に対する自己反応性 T 細胞による自己免疫疾患と考えられている。これまでの研究により、interferon（IFN）- γ などの炎症性サイトカインを産生する Th1 細胞が病態の悪化に関

与することが明らかとなっている。一方、生体内では自己反応性 T 細胞に拮抗的に作用し免疫寛容を維持する方向に作用する、免疫調節性細胞が存在することが知られ、MS のように再発と寛解を繰り返し、免疫調整の微妙なバランスの上に成り立っているような病態では、これら免疫調節性細胞を標的とした治療が有効と考えられる。

最近、我々はマウスに抗 CD3 抗体 (抗 T 細胞受容体抗体) を経口投与することで、腸管リンパ組織において latency-associated peptide (LAP) 陽性調節性 T 細胞 (regulatory T cell; Treg) を誘導・活性化できることを世界で初めて明らかにした (Ochi et al, Nat Med 2006)。この細胞は、transforming growth factor (TGF)- β の産生を介して免疫調節機能を発揮し、MS のマウス動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) の発症を抑制できる。LAP 陽性調節性 Treg 細胞は、特定の抗原によらず広く T 細胞抗原受容体を介した刺激で誘導・活性化されることから、自己免疫疾患の治療標的として有力な候補であると考えられる。

2. 研究の目的

ヒト MS でも、TGF- β が寛解維持 (Beck et al, Acta Neurol Scand. 1991; Hollifield et al, Autoimmunity 2003) や様々な免疫調整薬による治療効果発現に関与していることが示されており (Reinhold et al, J Neuroimmunol 2004; Mahon et al, J Neuroimmunol 2003; Aharoni et al, Proc Natl Acad Sci USA 1997; Nicoletti et al, Clin Exp Immunol 1998; Fukaura et al, J Clin Invest 1996)、MS 病態制御に TGF- β が深く関与していることが考えられる。このことより、TGF- β を介して免疫制御機能を発揮する LAP 陽性 Treg 細胞は MS の治療標的となりうると思われる。そこで本研究では、MS 病態制御における LAP 陽性 Treg 細胞の役割を明らかにし、その調節機能を応用することで MS の病態を制御することを最大の目的とする。このため本研究では、①経時のおよび各病期 (再発期と寛解期) において MS 患者の末梢血 LAP 陽性 T 細胞の割合を測定し、健常人のそれと比較することで LAP 陽性 T 細胞の量的変化がないか検討する。②サイトカイン産生プロファイリング (IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-10, TGF- β 産生能) とサプレッサー機能解析を行い、機能面での異常がないか検討する。以上より LAP 陽性 Treg 細胞が MS 寛解維持にどのように関与しているかを明らかにする。また、③マウス CD4+CD25-LAP 陰性 T 細胞を抗 CD3 抗体と TGF- β 存在下で培養することで LAP 陽性 T 細胞を誘導し、④誘導された LAP 陽性 T 細胞が EAE を抑制する調節性細胞として機能するか検討する。EAE の抑制効果が確認できれば、同療法 (抗 CD3-TGF- β -活性化リンパ球療法) のヒトへの応用を検討する。

3. 研究の方法

(1) MS 病態制御における LAP 陽性 T 細胞の役割

①MS 末梢血における LAP 陽性 T 細胞の量的変化

経時のおよび各病期 (再発期と寛解期) において、MS 患者の末梢血 LAP 陽性 T 細胞の割合を 4-color flow cytometry 法により測定し、健常人のそれと比較し、LAP 陽性 T 細胞の量的変化がないか検討した。T 細胞は CD4+, CD8+, CD4-CD8-細胞群に分けて検討し、また、CD4+LAP 陽性細胞は主として CD25+細胞群に属するため、更に CD25 分子の発現の有無によっても細分化し検討することとした。さらに、末梢血単球も TGF- β を発現・産生することから、単球系細胞についても LAP 陽性細胞の割合を検討した。

②ヒト LAP 陽性 T 細胞の機能解析

マウスの検討では、末梢血 LAP 陽性 CD4+ T 細胞は約 5% であり少数の細部群である。そのため、量的変化を明らかにしづらいことが予想される。また、マウスにおける経口抗 CD3 抗体の投与実験の結果より、その量的変化より機能的変化の方がより顕著であることが明らかとなっている。そこで、LAP 陽性 T 細胞の機能変化を明らかにするため、サイトカイン産生能 (IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-10, TGF- β 産生能) を ELISA 法にて検討した。また、co-culture system によりサプレッサー機能解析を行った。LAP 陽性 T 細胞は CD4+CD25+調節性 T 細胞を含み、この細胞集団は MS 患者で減少あるいは機能不全が報告されていることから、これらの解析は CD4+CD25-T 細胞と CD4+CD25+T 細胞に分けて行った。

(2) LAP 陽性 T 細胞の生存・機能維持に関与する神経栄養因子の特定

末梢血中の神経栄養因子を効率良く検出することで、T 細胞の機能維持に必要な神経栄養因子を特定することを試みた。グリア系細胞が、オートクリンの及びパラクリンのに神経栄養因子を分泌することから、末梢血液細胞でもオートクリンの及びパラクリンのに神経栄養因子が産生されている可能性がある。そこでまず、細胞から放出される神経栄養因子を迅速に捕獲固定化することで、細胞表面上の受容体への結合を阻害し、生理的条件に近い状態で末梢血液細胞の神経栄養因子産生能を検討した。

4. 研究成果

(1) MS 病態制御における LAP 陽性 T 細胞の役割

健常人および MS 患者末梢血における LAP 陽性 T 細胞の量的変化について flow cytometry 法により検討した。マウスでは、

末梢血 LAP 陽性 CD4+ T 細胞は約 5%であり少数の細胞群であるが (Ochi et al, Nat Med 2006)、ヒトではその割合は更に少なく 1%未満であった。健常人と比較して MS 患者における量的変化を明らかにすることはできなかった。また MS 患者において、病期による明らかな差異を見出すことはできなかった。

ヒト LAP 陽性 T 細胞は極めて少なく、*ex vivo* の実験系においてサイトカイン産生能やサプレッサー機能解析を行うことは極めて困難であった。このことから、MS の病態制御に LAP 陽性 T 細胞を臨床応用する場合には、*in vitro* においてヒト LAP 陽性 T 細胞を効率良く誘導することが重要であると考えられた。また、誘導された LAP 陽性 T 細胞の機能維持を図ることが重要であると考えられた。

(2) 他の自己免疫疾患における LAP 陽性 T 細胞の役割

Streptozotocin を投与することで AKR マウスに糖尿病を誘導することができ、1型糖尿病のモデルマウスとされる。この系に抗 CD3 抗体を経口投与すると、EAE と同様に LAP 陽性 T 細胞が誘導され、TGF- β 依存性に糖尿病惹起性 T 細胞の活性化を抑制し、糖尿病発症を抑制できることが明らかとなった。このことから、LAP 陽性 T 細胞を標的とした新規治療法は、MS のみならず広く自己免疫性疾患の治療に応用できることが考えられた。

(3) ELISA *in situ* 法の確立

末梢血中の神経栄養因子を効率良く検出することで、T 細胞の機能維持に必要な神経栄養因子を特定することを目的に、細胞から放出される神経栄養因子を効率よく検出するシステムとして ELISA *in situ* 法の開発を行った。これまでに、通常の ELISA 法により脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) の測定を行ってきたため、まずは BDNF をモデルとして、ELISA *in situ* 法を確立した。新たに確立したシステムでは、放出された BDNF が迅速に捕獲固定化されるため、培養細胞表面上の BDNF 受容体への結合、すなわち消費や分解が起こりにくく、生理的に近い条件で BDNF の産生分泌量を測定することが可能で、従来の ELISA 法より高感度であった。

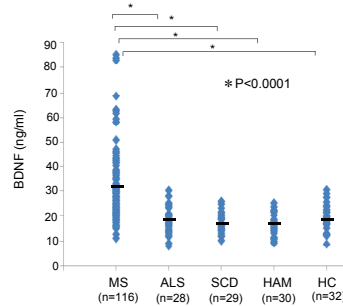
(4) MS 単球における BDNF 産生障害

各種神経疾患患者における血清 BDNF 値を通常の ELISA 法で測定し、MS 患者群の血清 BDNF 値が、健常対照群や他の神経疾患群 (筋萎縮性側索硬化症群 (ALS)、脊髄小脳変性症群 (SCD)、HTLV-1 関連脊髄症群 (HAM))

に比較して、有意に高値 ($p < 0.01$) であることを明らかにした。しかし罹病期間との関連でみると、MS 患者群は加齢・罹病期間とともに血清 BDNF 値が低下する傾向を示したのに対し、健常対照群では加齢とともに上昇する傾向を認めた。さらに、MS 患者では血清 BDNF 値の低下に伴い、身体機能障害 (EDSS) が進行する傾向にあった。また、血清 BDNF 値が中等度以上高値 (>50 ng/ml) である群は、検査時年齢が有意に若く ($p < 0.05$)、EDSS が有意に低かった ($p < 0.05$)。このことより、MS の病初期では血清 BDNF 値は高値であるが、病期の進行とともにその濃度が低下し、身体機能障害も進行することが考えられた。

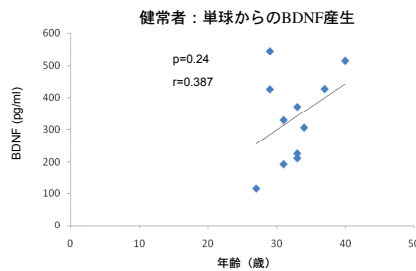
さらに、ELISA *in situ* 法により末梢血単球とリンパ球からの BDNF 分泌量を測定した。その結果、進行期 MS 患者における BDNF 産生低下は、リンパ球ではなく単球からの BDNF 産生低下に起因することが明らかとなった。

各種神経疾患における血清BDNF濃度

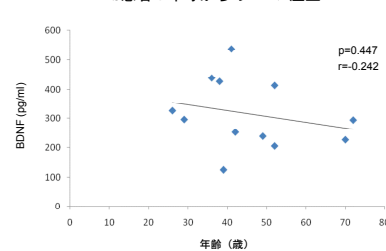


BDNF濃度 (ng/ml)	MS		
	<30	30~50	>50
n	70	35	11
年齢 (歳)	40.7 ± 10.4	41.7 ± 14.3	29.6 ± 7.2 **
罹病期間 (月)	134 ± 115	129 ± 125	68.8 ± 65.5 **
再発回数	6.2 ± 5.4	4.8 ± 4.0	2.1 ± 1.3
EDSS	3.6 ± 1.8	3.4 ± 2.5	2.3 ± 1.8 **

	MS	健常対照
n	116	32
年齢 (歳)	39.9 ± 11.9	34.4 ± 10.2
BDNF濃度 (ng/ml)	31.4 ± 14.4 **	19.5 ± 5.1



MS患者：単球からのBDNF産生



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件、全て査読あり)

1. Ishikawa H, Ochi H, Chen ML, Frenkel D, Maron R, Weiner HL. Inhibition of autoimmune diabetes by oral administration of anti-CD3 monoclonal antibody. *Diabetes*. 56(8):2103-9, 2007.
2. Matsuoka T, Matsushita T, Kawano Y, Osoegawa M, Ochi H, Ishizu T, Minohara M, Kikuchi H, Mihara F, Ohyagi Y, Kira J. Heterogeneity of aquaporin-4 autoimmunity and spinal cord lesions in multiple sclerosis in Japanese. *Brain* 130:1206-23, 2007.
3. Ochi H, Abraham M, Ishikawa H, Frenkel D, Yang K, Basso A, Wu H, Chen ML, Gandhi R, Miller A, Maron R, Weiner HL. New immunosuppressive approaches: oral administration of CD3-specific antibody to treat autoimmunity. *J Neurol Sci*. 274(1-2):9-12, 2008.
4. Matsuoka T, Matsushita T, Osoegawa M, Ochi H, Kawano Y, Mihara F, Ohyagi Y, Kira J. Heterogeneity and continuum of multiple sclerosis in Japanese according to magnetic resonance imaging findings. *J Neurol Sci*. 266(1-2):115-25, 2008.
5. Tanaka M, Ishizu T, Ochi H, Kawano Y, Ohyagi Y, Kira J. Intrathecal upregulation of IFN-gamma and MIP-1beta in juvenile muscular atrophy of the distal upper extremity. *J Neurol Sci*. 275(1-2):74-7, 2008.
6. Tanaka M, Matsushita T, Tateishi T, Ochi H, Kawano Y, Mei FJ, Minohara M, Murai H, Kira JI. Distinct CSF cytokine/chemokine profiles in atopic myelitis and other causes of myelitis. *Neurology*. 71(13):974-81, 2008.
7. Osoegawa M, Kira J, Fukazawa T, Fujihara K, Kikuchi S, Matsui M, Kohriyama T, Sobue G, Yamamura T, Itoyama Y, Saida T, Sakata K, Ochi H, Matsuoka T; Research Committee of Neuroimmunological Diseases. Temporal changes and geographical differences in multiple sclerosis phenotypes in Japanese: nationwide survey results over 30 years. *Mult Scler*. 15(2):159-73, 2009.
8. Doi H, Matsushita T, Isobe N, Matsuoka T, Minohara M, Ochi H, Kira J. Hypercomplementemia at relapse in patients with anti-aquaporin-4 antibody. *Mult Scler*. 15(3):304-10, 2009.
9. Matsushita T, Matsuoka T, Isobe N, Kawano Y, Minohara M, Shi N, Nishimura Y, Ochi H, Kira J. Association of the HLA-

DPB1*0501 allele with anti-aquaporin-4 antibody positivity in Japanese patients with idiopathic central nervous system demyelinating disorders. *Tissue Antigens*. 73(2):171-6, 2009.

〔学会発表〕(計5件)

1. 越智博文、吉良潤一、Weiner Howard. 腸管免疫と全身免疫のクロストークからみた実験的自己免疫性脳脊髄炎の制御. 第19回日本神経免疫学会学術集会. 2007.4. (金沢)
 2. Ochi H. New immunosuppressive approaches. European Charcot Foundation Symposium 2007. November 30, 2007. Fiuggi, Italy
 3. 越智博文、吉良潤一、Weiner Howard. 経口抗 CD3 抗体による実験的自己免疫性脳脊髄炎の抑制. 第48回日本神経学会総会. 2007.5. (名古屋)
 4. 吉村 怜、越智博文、松岡健、松下拓也、河野祐治、三野原元澄、吉良潤一. 通常型多発性硬化症の病態機序と治療 多発性硬化症(MS)病態への brain derived neurotrophic factor (BDNF)の関与. 第20回日本神経免疫学会学術集会. 2008.4. (新潟)
 5. 吉村 怜、越智博文、松岡健、松下拓也、河野祐治、三野原元澄、吉良潤一. 末梢免疫担当細胞における brain derived neurotrophic factor (BDNF) 産生能と多発性硬化症 (MS) 病態との関連. 第21回日本神経免疫学会学術集会. 2009.3. (大阪)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
越智 博文 (OCHI HIROFUMI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号: 20325442
 - (2) 研究分担者
該当なし
 - (3) 連携研究者
該当なし