

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19526

研究課題名(和文) 腸内環境で誘導されるT細胞による多発性硬化症の病態制御に関する研究

研究課題名(英文) Regulation of Multiple Sclerosis Pathogenesis by Gut Environment-Induced T cells.

研究代表者

門脇 淳(Kadowaki, Atsushi)

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・研究生

研究者番号：00751025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症(Multiple Sclerosis; MS)の病態への腸内環境の関与が言われてきているが、その機序は分かっていない。本研究では、腸管ホーミングレセプターCCR9+CD4+メモリーT細胞(CCR9+Tm)に着目した。加齢と腸内細菌によってその頻度が変化するCCR9+Tmが、二次進行型MSでは減少しており、その炎症保護的フェノタイプが炎症性Th17に偏移していることを明らかにした。CCR9+Tmは、MSの炎症制御に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。CCR9+TmのSPMSの診断マーカーや治療標的としての応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Although alterations in gut microbiota in the pathogenesis of MS have recently been highlighted, the mechanism linking the altered gut environment with the remote central nervous system (CNS) pathology remains unclear. We focused on the gut-homing receptor CCR9+ CD4+ memory T cells (CCR9+Tm). We showed that CCR9+Tm cells, of which the frequency is influenced by normal aging and the gut microbiota, were reduced and that their immune-regulatory phenotype were deviated to inflammatory Th17 phenotype in patients with SPMS. CCR9+ Tm cells, which upregulated LAG-3 in the CSF, expressed high levels of C-MAF, and produced disease-protective cytokines (IL-4/IL-10). Thus, it appears that gut tropic CCR9+ Tm cells may play a critical role in the natural regulation of CNS autoimmunity, and that their reduced frequency and altered phenotype may at least partly account for the pathogenesis of SPMS. CCR9+ Tm cells may serve as potential diagnostic markers and therapeutic targets of SPMS.

研究分野：神経免疫

キーワード：多発性硬化症(MS) 二次進行型MS 腸内細菌 腸管ホーミングレセプターCCR9 CD4+メモリーT細胞

1. 研究開始当初の背景

中枢神経ミエリンに対する自己免疫疾患である多発性硬化症(Multiple Sclerosis ; MS)の患者数は日本で急増しており、腸内細菌の変化が重要な要因である可能性がある(文献①)。しかし腸内細菌の変化がどのように腸管から離れている中枢神経炎症に影響するか、その機序は十分に明らかになっていない。私はMSにおける炎症巣形成に中心的な役割を果たすCD4⁺T細胞をマウス腸において研究した。その結果、腸内細菌や食餌性アリアル炭化水素受容体リガンドなどの腸内環境によって誘導される腸特有のT細胞(制御性IEL)は、MS動物モデルである実験的自己免疫性脳炎(EAE)をLAG-3分子依存的に抑制することを見いだした(文献②)。腸内環境は、MSに伴う中枢神経炎症を抑制する特有のCD4⁺T細胞の産生のものであることが分かり、治療応用が期待された。

また、MSは疾患の再発・寛解を繰り返すRRMSから慢性的に神経症状が進行し、難治性の二次進行型MS(SPMS)へ進展するが、その際加齢が一つの因子であることは分かっているものの、腸内環境の関与は分っていない。また、SPMSに伴う末梢リンパ球の変化・病態への関与も良く分かっていない。

2. 研究の目的

腸内環境で誘導されるCD4⁺T細胞とMS病態との関連をヒト末梢血・髄液検体で研究するため、腸管免疫系特有のT細胞表面に発現する、小腸ホーミングレセプターCCR9に着目した(文献③)。ナイーブT細胞は腸管関連リンパ組織で活性化されるとCCR9を発現して全身を循環し、腸へとホーミングし、制御性IELを含む腸管T細胞となる。近年腸管T細胞が再循環される可能性も示唆された(文献④)。腸内環境と密接な関係にあるCCR9⁺CD4⁺T細胞のMS病態(RRMS, SPMS)制御のメカニズムを検討し、新たな治療への礎となる研究を目指した。

3. 研究の方法

CCR9⁺CD4⁺メモリーT細胞(CCR9⁺Tm)を解析するため、健常人(HC, N=17)、60歳以上の高齢健常人(Elderly Control, N=6)、RRMS(N=17)、SPMS(N=22)、視神経脊髄炎(NMO, N=12)、非炎症性神経疾患(NIND, N=17)の末梢血(PB)及び髄液(CSF)を用い、以下の解析を行った。

○フローサイトメーターを用いてCCR9⁺Tm(CD45RA-CD3+CD4+CCR9⁺)のPB中頻度(%CCR9)の測定。

○CCR9⁺Tmに発現する中枢神経遊走に重要なホーミングレセプターの解析。LAG-3の発現解析。

○セル・ソーターを用いてCCR9⁺Tmをソーティングし、CD4⁺T細胞フェノタイプ決定に重要な転写因子mRNA・タンパクの発現解析を行った。

○PBよりソーティングした細胞を培養し、培養上清中のサイトカインをBio-Plexシステムを用いて測定

さらに、腸内細菌とCCR9⁺Tmの関連性を調べるために、下記のマウス実験を行った。

○無菌マウスとSpecific pathogen free (SPF)マウスの末梢血%CCR9を測定

○抗生物質を口腔内投与したマウスの%CCR9を測定

○EAE誘導マウスにおけるCCR9⁺Tmの中枢神経への浸潤とLAG-3の発現解析

○CCR9⁺Tm細胞を変化させることでEAEの重症度が変化するかの検討

4. 研究成果

(1)まずPB中%CCR9をHC、RRMS、SPMSおよびNMOで比較した。HCと比較して、RRMSおよびNMOに有意な違いは見られなかったが、NIND・SPMSにおいて有意に減少していた。また、Elderly Controlで有意に減少していた(図1)。

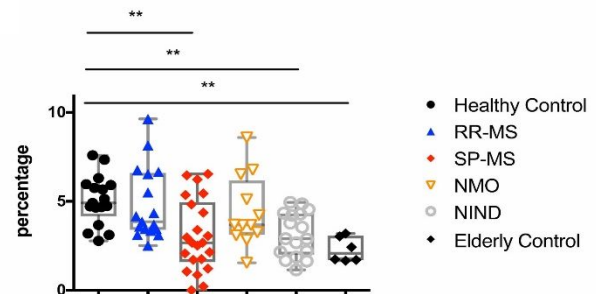


図1.末梢血中の%CCR9

%CCR9と年齢との相関を調べると、健常人全体では年齢の上昇につれて%CCR9が減少する負の相関が見られた。これに対して、SPMSでは年齢との相関は、統計的に有意ではなかった(図2)。SPMSの%CCR9とEDSSや罹病期間には有意な相関は無かった。

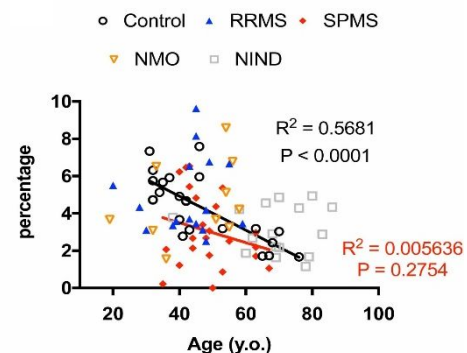


図2. %CCR9と年齢の相関

サブ解析にて腸内細菌の変化が報告されている神経変性疾患であるパーキンソン病(PD)において%CCR9を調べると、健常人より有意に増加していた。PD以外の神経変性疾患で

は%CCR9 の変化は見られなかった。

以上より、SPMS における%CCR9 の減少として加齢に加え、腸内環境など他の要因が関与している可能性が示された。

(2) CCR9⁺ Tm の CNS への遊走能を調べるため、HC、RRMS、SPMS および NMO での CCR9⁺ Tm の CCR6 および CXCR3 の発現をフローサイトメーターを用いて測定した。その結果、健康人および疾患群において CCR9⁺ Tm での CCR6 の発現が CCR9⁻ Tm より有意に高いことが分かった。CXCR3 の発現は、NMO の CCR9⁺ Tm でのみ有意に高いことが示された。CCR9⁺ Tm は、CCR6 依存的に CNS 炎症に遊走する可能性が示唆された。CCR9⁺ Tm の CNS 浸潤を調べるために、CSF 中の%CCR9 を調べた。その結果、健康人と比較して NMO では有意に CCR9⁺ Tm の浸潤が見られ、RRMS、SPMS でも傾向は見られたものの有意ではなかった。

また、制御性 IEL(文献②)に関連した免疫制御分子 LAG-3 の発現を再発時の RRMS と NMO で調べた。CCR9⁺ Tm は PB では LAG-3 を発現していないが、CSF では発現しており、CCR9⁻ Tm には PB・CSF ともに LAG-3 の発現は見られなかった。以上より、CCR9⁺ Tm は再発時の RRMS/NMO において CNS に浸潤し、部分的に LAG-3 を発現し、炎症を制御していることが示唆された(図3)。

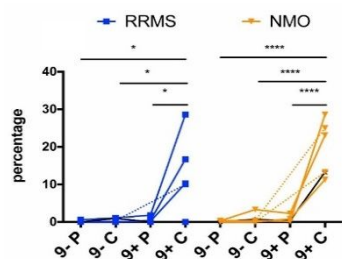


図3. 血中および髄液のLAG-3発現(%)
9+:CCR9⁺ Tm, 9-:CCR9⁻ Tm, P:PB, C:CSF

(3) CCR9⁺ Tm cells のフェノタイプを調べるために、フローサイトメーターを用いて健康人、RRMS、SPMS および NMO の PB から CCR9⁺ Tm cells を分離・回収し、mRNA の発現を quantitative RT-PCR により測定した。概して、CCR9⁻ Tm と比較して CCR9⁺ Tm では、IL-4 や IL-10 といった炎症保護的なサイトカイン産生に重要な MAF の発現が高いことが分かった。さらに炎症性フェノタイプである Th17 や Th1 に発現する RORC および TBX21 の発現は低いことがわかった。特記すべきことに、SPMS では RORC の発現が上昇していた。上記の転写因子について、細胞内染色を行い、タンパクレベルで転写因子の発現を測定した。その結果、CCR9⁻ Tm と比較して CCR9⁺ Tm では、健康人および SPMS でも C-MAF の発現が高く、T-BET の発現が低いことが分かった。さらに、RORγt は、健康人と比較して SPMS で上昇していることが分かった。以上より、CCR9⁺ Tm

は C-MAF を高く発現する制御性フェノタイプを持っているが、SPMS では Th17 に偏移していることが示唆された。

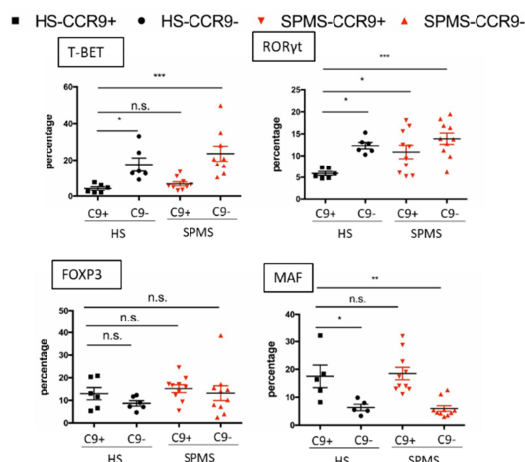


図4. T細胞の転写因子解析(%)

(4) SPMS における CCR9⁺ Tm のフェノタイプの変化をさらに調べるために、サイトカイン産生能を調べた。CCR9⁺ および CCR9⁻ Tm をフローサイトメーターによって分離回収し、CD3 および CD28 抗体で刺激培養した後、培養上清中のサイトカインを BioPlex を使用して測定した。まず健康人において、CCR9⁻ Tm と比べて CCR9⁺ Tm cells は、炎症抑制性のサイトカインである IL-4 および IL-10 を高産生することが分かった。さらに、CCR9⁺ Tm が産生するサイトカインを、健康人と SPMS で比べた。その際、CCR9⁺ Tm 特異的な偏移を調べるために、遺伝的背景、服用薬、実験条件の違いによるサイトカイン産生への影響をなるべく排除する目的で、それぞれの検体・サイトカイン毎に CCR9⁺ Tm の産生量を CCR9⁻ Tm cells 産生量で割った比(ratio)を算出した。その結果、SPMS の CCR9⁺ Tm が IL-17A を有意に高産生することが分かった。IFNγ の産生も高い傾向があった。以上より、SPMS において、CCR9⁺ Tm 特異的な IL-17A 高産生が見られた。

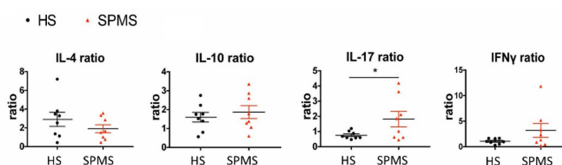


図5. CCR9⁺/CCR9⁻Tm サイトカイン産生量比

(5) 最後に腸内細菌の CCR9⁺ Tm への影響について、マウスを用いて調べた。ヒト CCR9⁺ Tm は、マウス CD44hiCD4+TCRβ+に相当するとした。まず、無菌マウスと SPF マウス PB 中の%CCR9 を比較した(図6)。その結果、無菌マウスで%CCR9 が有意に減少していることが分かった。また、マウスに経口的に抗生剤を

投与し対照群と比較したところ、抗生剤投与群で%CCR9 が有意に増加していた。これらの結果から、CCR9+ Tm は腸内細菌の変化による影響を受けることが示唆された。さらに EAE を誘導したマウスにおける CCR9+ Tm の CNS への浸潤を調べると、CCR9+ Tm cells は CNS へ浸潤し、LAG-3 を発現することが分かった。脾臓では、LAG-3 は発現していなかった。

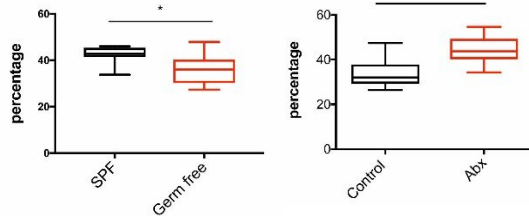


図6 マウス末梢血中%CCR9
(左) SPF, 無菌(Germ Free)マウス
(右) Abx : 抗生剤経口投与マウス

上記の如く CCR9+ Tm が増加した抗生剤投与群マウスにおいて、対照群と比較して EAE 病態が有意に軽減した。さらに末梢血中 CCR9+ Tm を増加させる目的で腸への CCR9+ Tm の遊走をブロックする抗体である MadCAM-1 抗体を投与し(文献⑤)、EAE 重症度を評価した。その結果、MadCAM-1 抗体投与群において、対照群と比較して、EAE 重症度が軽減することが分かった。これらの結果から、CCR9+ Tm による中枢神経炎症抑制能が示唆された。

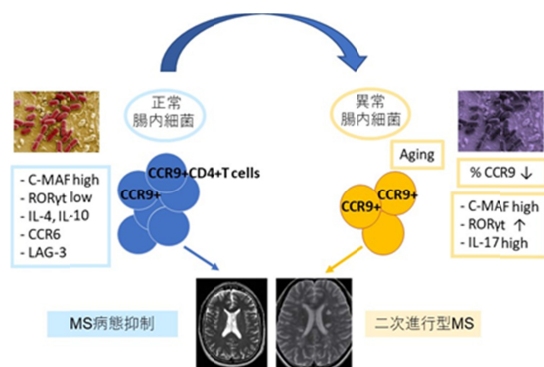


図7. 腸内環境の影響を受ける CCR9+ Tm cells の特性と MS 病態進行への関与

以上の結果から、腸内環境と年齢によって血中頻度やフェノタイプが変化する CCR9+ Tm の SPMS 病態への関与が示唆された(図7)。CCR9+Tm は SPMS の診断マーカーとなる可能性があり、MS およびその他の腸内環境の変化によって引き起こされる免疫疾患への治療標的となる可能性がある。現在論文投稿中である。

<引用文献>

- ① Sachiko Miyake et. al, Dysbiosis in the Gut Microbiota of Patients with Multiple Sclerosis, with a Striking

Depletion of Species Belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters. PloS ONE.10(9):e0137429

- ② Atsushi Kadowaki et. al, Gut environment-induced intraepithelial autoreactive CD4(+) T cells suppress central nervous system autoimmunity via LAG-3. *Nat Communications* 2016; 7: 11639.
- ③ Delphine Guy-Grand, Pierre Vassallie et al. *J. Exp. Med.* 2013; Vol.210 No. 9 1839-1854.
- ④ Angela M. Morton et. al, Endoscopic photoconversion reveals unexpectedly broad leukocyte trafficking to and from the gut. *PNAS* 2014; vol, 111 no. 18 6696-6701.
- ⑤ Barbara Cassani et. al, Gut-tropic T cells that Express Integrin $\alpha 4\beta 7$ and CCR9 are Required for Induction of Oral Immune Tolerance in Mice. *Gastroenterology*. 2011; 141(6): 2109-2118.

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1件)

Atsushi Kadowaki, New Developments in Neuroimmunology, Gut environment favors the induction of intraepithelial myelin-reactive CD4+ T cells that inhibit central nervous system autoimmunity through LAG-3, *Clinical & Experimental Neuroimmunology*, 査読有、VOL 8, 2017, p. 1-2, DOI: 10.1111/cen3.12377

〔学会発表〕(計4件)

- ① Atsushi Kadowaki, Ryoko Saga, Yowei Lin, Wakiro Sato, Takashi Yamamura, Potential Regulation of Multiple Sclerosis by Gut Homing CCR9+ TH cells, The 13th International Congress of NeuroImmunology 2016(国際学会)、2016年09月29日、Jerusalem
- ② Atsushi Kadowaki, Ryoko Saga, Yowei Lin, Wakiro Sato, Takashi Yamamura, CCR9+ CD4+ MEMORY T CELLS DEPENDENT ON GUT MICROBIOTA AND AGE ARE ALTERED IN SECONDARY PROGRESSIVE MULTIPLE SCLEROSIS, World Congress of Neurology - Kyoto, 2017 (国際学会), 2017年

- ③ Atsushi Kadowaki, Ryoko Saga, Yowei Lin, Wakiro Sato, Takashi Yamamura, Thinking About the Key Cells That Link Gut Environment to Multiple Sclerosis, 神経免疫学会（招待講演）、2017 年
- ④ Atsushi Kadowaki, Ryoko Saga, Yowei Lin, Wakiro Sato, Takashi Yamamura, CCR9+ CD4+ memory T cells dependent on gut microbiota and age are altered in secondary progressive multiple sclerosis, 日本免疫学会、2017 年

〔図書〕（計 1 件）

門脇 淳、山村 隆、他、腸管特異的 CD4+ T 細胞による中枢神経系自己免疫の制御、臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、67 巻、2017 年、pp. 197-202

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門脇 淳 (KADOWAKI, Atsushi)

国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・免疫研究部・研究生

研究者番号：00751025

(2) 研究協力者

佐賀 亮子 (SAGA, Ryoko)

林 偉幼 (LIN, Youwei)

佐藤 和貴郎 (SATO, Wakiro)

山村 隆 (YAMAMURA, Takashi)