

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07038

研究課題名(和文) T細胞機能修飾による多発性硬化症の新規治療法の創生

研究課題名(英文) New therapeutic strategy for multiple sclerosis modifying pathogenetic T cell differentiation

研究代表者

坂本 明美 (Sakamoto, Akemi)

千葉大学・バイオメディカル研究センター・准教授

研究者番号：90359597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症の動物モデルとして汎用されている実験的自己免疫性脳脊髄膜炎(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE)の系を用いて以下の結果を得た。1) EAE誘導後の神経疾患の発症、増悪、症状継続に関わる転写因子Xの発見。2) 転写因子Xが疾患特異的CD4T細胞の分化に関わり、欠損マウスでは疾患特異的CD4T細胞が検出されないこと。3) 転写因子Xに結合して機能を阻害する低分子化合物を4種発見した。これらは多発性硬化症の新規治療法創生に繋がる成果と考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性硬化症は再発を繰り返し、歩行障害、視力障害などの重篤な機能障害をきたす難治性慢性炎症性疾患である。さらに本国でも患者数が増加しており、完全寛解できる治療法の確立は喫緊の課題である。現在、ステロイド剤、血漿交換などが一部症例に有効であること、またインターフェロンが再発予防に有効であることから、免疫学的な異常が病態に関わることが示唆されるが、詳細な発症機序は明らかにされていない。疾患発症、増悪に関わる免疫応答を標的とした新規治療法が開発できれば有用性は計り知れない。

研究成果の概要(英文)：Multiple sclerosis is serious inflammatory neurological disease and number of patients is increasing in Japan. To establishment of new therapies, we searched transcription factors (TF) which affect neurological symptom of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of multiple sclerosis. We found TFX played vital roles because TFX flox/flox CD4Cre mice did not develop EAE. TFX was critical TF for development of pathogenetic CD4 T cells in neurological organs. Furthermore, TFX inhibition induced recovery of neurological symptoms. We searched inhibitors of TFX among small chemical drug library and found 29 chemical drugs classified 4 groups. These results could be useful for establishment of novel therapeutic method for multiple sclerosis.

研究分野：免疫学

キーワード：実験的自己免疫性脳脊髄膜炎 リンパ球 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症は再発を繰り返し、歩行障害、視力障害などの重篤な機能障害をきたす難治性慢性炎症性疾患であるため、完全寛解できる治療法の確立は喫緊の課題である。現在、ステロイド剤、血漿交換などが一部症例に有効であること、またインターフェロンが再発予防に有効であることから、免疫学的な異常が病態に関わることが示唆されるが、詳細な発症機序は明らかにされていない。近年リンパ球が神経系に浸潤する機構に関する研究をもとに新規治療法の開発が進められている。しかしながら、疾患発症、増悪に関わる免疫応答を標的とした治療法の開発はなされていない。

本研究では T 細胞の機能分化に関わる転写因子が疾患の発症および病態悪化に関与している可能性を確認するとともに、治療ターゲットになりうるかを明らかにする。さらに関与メカニズムの詳細を明らかにすることは、EAE の病態を解明するうえで重要な課題である。さらに疾患関与転写因子の機能を調整し、T 細胞の分化を制御する方法が確立できれば新規治療法の創出に繋がる。

2. 研究の目的

多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄膜炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis 以下、EAE と記載) の系を用いて、以下を解析する。

- (1) EAE マウスモデルの神経症状発症および病態介入に関わる分子の探索
- (2) 1 で得られた分子の機能メカニズムを明らかにする
- (3) 1 で得られた分子の機能阻害剤候補探索およびその有用性・安全性評価を行う
- (4) ドラッグデリバリの方法を応用して、より有効に治療できる投与方法を開発する

3. 研究の方法

- (1) EAE マウスモデルの発症および病態介入に関わる分子の探索

免疫応答に関わる転写因子の T 細胞特異的欠損マウスに T 細胞依存的 (B 細胞非依存的) EAE を誘導し神経症状を観察することで、発症に関わる転写因子を探索する。さらに、治療への有用性を評価するために EAE 発症後に転写因子の機能を抑えて神経症状が改善するか観察する。

- (2) 得られた分子の機能メカニズムの解析

組織学的解析

本研究で用いた EAE モデルは尾の下垂、後肢麻痺が高頻度に発症し、これらは腰髄の炎症病変に起因すると考えられる。腰髄の HE 染色で細胞浸潤を評価するとともにクリューバ パレラ染色で脱髄の状況の評価する。

リンパ球の機能解析

EAE を誘導したマウスの脊髄神経、脾臓、所属リンパ節から血球細胞を分離して、フローサイトメータを用いてリンパ球の表現型、サイトカイン産生を比較する。

さらに得られた転写因子が制御するとされる因子とのダブル欠損マウスを作製して、転写因子の機能する分子機構を明らかにする。

- (3) 機能阻害剤候補探索およびその有用性・安全性の評価

低分子化合物ライブラリより提供された試薬を用いて、転写因子の阻害剤候補を探索する。培養系にて転写因子の標的遺伝子の発現に影響を与える薬剤を調べる。得られた薬剤が転写因子に結合するかを蛍光偏光法にて確認する。

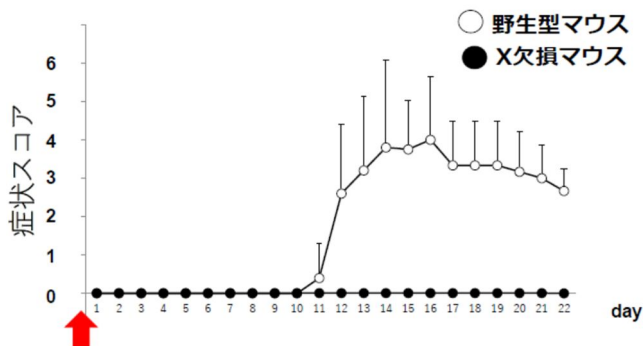
- (4) ドラッグデリバリの方法を応用したより有効な投与方法の開発

ICG リポソームを作製してマウスに投与し、経時的に IVIS を用いて検出臓器を解析する。リポソーム化した転写因子阻害剤を EAE 発症マウスに投与して有効性を確認する。

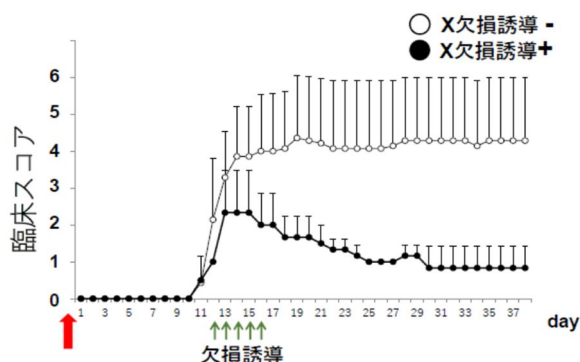
4. 研究成果

- (1) EAE マウスモデルの発症に関わる分子の探索

複数の転写因子欠損マウスで EAE を誘導して発症に関わる因子を探索した結果、転写因子 X の T 細胞特異的欠損マウスでは EAE の神経症状が発症しないことを確認した (図: 転写因子 X 欠損マウスに EAE を誘導 (赤矢印) したのちの神経症状の経過を示す。野生型では神経症状が発症したが、欠損マウスでは発症しなかった)。さらに下肢麻痺などの神経症状発症直後に転写因子の機能を阻害すると



神経症状が回復することを明らかにした（図：EAE を誘導し（赤矢印）神経症状が発症し始めたのちに X 遺伝子の欠損を誘導した。欠損を誘導しなかった場合は神経症状が悪化・継続したが、X 遺伝子の欠損を誘導したマウス群では神経症状が速やかに回復した）。しかしながら、神経症状が発症したのち 10 日後に機能を阻害しても症状回復は認めなかった。転写因子 X は傷害された神経の回復を促すというよりは EAE の免疫応答に関与していることが示唆された。



(2) メカニズムの解析

組織学的解析

腰髄の HE 染色の解析から、EAE の誘導早期に転写因子 X 欠損マウスで脱髄ばかりでなくリンパ球浸潤も認められなかった。転写因子 X がリンパ球の分化や組織浸潤能に影響していることが示唆された。

リンパ球の機能解析

IL-17 や IFN γ 産生能を脾臓、所属リンパ節から分離した細胞で解析した結果、同様の割合で産生が確認された。しかしながら神経浸潤 T 細胞では転写因子 X 欠損マウスではサイトカイン産生細胞は認めなかった。

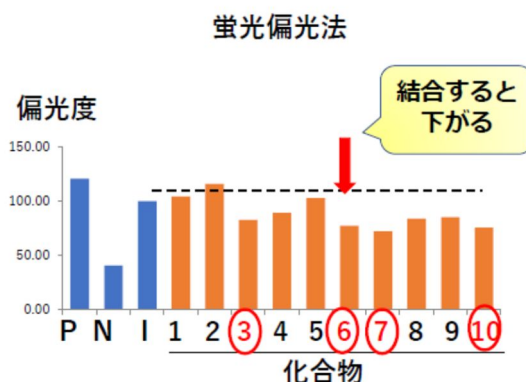
細胞浸潤に関わるケモカイン受容体 CXCR3 や CCR6 などの発現はどの部位の T 細胞においても同様に観察された。

神経浸潤細胞において病因 T 細胞と考えられている PD1 陽性 CD4T 細胞が転写因子 X 欠損マウスでは認められず、転写因子 X はこの細胞の分化に関与していることが示唆された。

さらに転写因子 Y とのダブル欠損マウスを用いて EAE の発症と病因 T 細胞の分化とを解析した結果、野生型と同様に発症し、細胞分化も認めた。このことから、転写因子 X-Y 軸が EAE の病態誘導に関与していることが明らかになった。

(3) 機能阻害剤候補探索およびその有用性・安全性の評価

低分子化合物ライブラリより提供を受けた試薬を用いて、転写因子 X の標的遺伝子の発現に影響を与える化合物を検索した。さらに転写因子 X と結合することを蛍光偏光法を用いて確認した（図：蛍光偏光法における偏光度の結果を示す。転写因子 X と結合すると偏光度は低下する。P: 化合物を添加していない陽性コントロール、N: 蛍光物質を添加していない陰性コントロール、I: 既存の阻害薬添加、1-10 候補化合物添加）。その結果既存の阻害剤よりもより転写因子 X と結合し機能を抑制する阻害薬を 4 グループ 29 化合物見つけることができた。これらの化合物は培養系における細胞死などの評価では安全性が確認された。しかしながら、マウスに投与できる容量の提供は難しく、マウスでの安全性、EAE への有用性は解析できなかった。



(4) ドラッグデリバリの方法を応用したより有効な投与方法の開発

リポソーム化した ICG を野生型マウスに経静脈的もしくは腹腔内に投与した結果、脾臓、肝臓などに投与後 7 日でも検出され、長期間の薬剤保持と有効性維持が可能と考える。しかしながら、EAE 発症時に投与したリポソーム化した転写因子 X は症状改善に至らず、無効だった。神経への移行性が関与している可能性が考えられた。

以上本研究より以下の結果を得た。

- 1) EAE の発症および症状悪化・継続に関わる転写因子 X を見出した。
- 2) 転写因子 X は病原 T 細胞の分化に必要な因子であり、その分子機構の一つに転写因子 Y を抑制することで病原 T 細胞の分化に関与することが明らかになった。
- 3) 転写因子 X の機能を阻害する低分子化合物を見出した。
- 4) リポソーム化した薬剤は少なくとも 1 週間は薬剤を脾臓、肝臓に保持可能なことを明らかにした。

本研究得られた結果および低分子化合物は多発性硬化症の新規治療法創出に繋がると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ohara Y, Fujimura L, Sakamoto A, Teratake Y, Hiraoka S, Koseki H, Saito T, Terui K, Mitsunaga T, Nakata M, Yoshida H, Hatano M.	4. 巻 1(1)
2. 論文標題 Genetic background-dependent abnormalities of the enteric nervous system and intestinal function in Kif26a-deficient mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-82785-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Zhang K, Sakamoto A, Chang L, Qu Y, Wang S, Pu Y, Tan Y, Wang X, Fujita Y, Ishima T, Hatano M, Hashimoto K.	4. 巻 Epub ahead of print]
2. 論文標題 Splenic NKG2D confers resilience versus susceptibility in mice after chronic social defeat stress: beneficial effects of (R) ketamine.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur Arch Psychiatry and Clin Neurosci	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00406-019-01092-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Zang K, Chun Y, Chang L, Sakamoto A, Suzuki T, Fujita Y, Youge Q, Siming W, Yoayu P, Yunfei T, Xingming W, Ishima T, Shirayama Y, Hatano M, Tanaka K, Hashimoto K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Essential role of microglial transforming growth factor- β 1 in antidepressant actions of α -ketamine and the novel antidepressant TGF- β 1.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 32-43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s1398-020-0733-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ogasawara T, Kohashi Y, Hatano M, Ikari J, Taniguchi T, Tsuruoka N, Watanabe-Takano H, Fujimura L, Sakamoto A, Hirata H, Fukushima Y, Fukuda T, Kurasawa K, Tatsumi K, Tokuhisa T, Arima M,	4. 巻 -
2. 論文標題 TH2 response governed by Bcl6 function in naturally occurring memory phenotype CD4+ T cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Immunol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2018.00750.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Chikada H, Ida K, Ando E, Inagaki Y, Sakamoto A, Kamiya A.	4. 巻 98
2. 論文標題 Establishment and analyses of a mouse model that regulates sex-related differences in drug metabolism in the liver.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1500-1511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-018-0088-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oami T, Watanabe E, Hatano M, Teratake Y, Fujimura L, Sakamoto A, Ito C, Toshimori K, Swanson PE, Oda S.	4. 巻 50(4)
2. 論文標題 Blocking Liver Autophagy Accelerates Apoptosis and Mitochondrial Injury in Hepatocytes and Reduces Time to Mortality in a Murine Sepsis Model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Shock.	6. 最初と最後の頁 427-434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000001040.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimazui T, Nakada TA, Fujimura L, Sakamoto A, Hatano M, Oda S.	4. 巻 50(6)
2. 論文標題 Development of Noninvasive In Vivo Approach to Assess Vascular Permeability in Inflammation Using Fluorescence Imaging.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 729-734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000001075.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 中嶋利典、坂本明美、藤村理紗、清宮航、文田貴志、大森智瑛、幡野雅彦
2. 発表標題 腸管炎症における制御性T細胞の役割とオートファジーの関与
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清宮航、藤村理紗、坂本明美、中嶋利典、文田貴志、幡野雅彦
2. 発表標題 Ncx KOマウスを用いたプロボリスの腸管バリア機能改善に及ぼす効果の検討
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lisa Fujimura, Akemi Sakamoto, Takashi Fumita, Masahiko Hatano
2. 発表標題 Role of enteric neuron in eosinophil induction
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笈田 諭, 齋藤 武, 坂本 明美, 照井 慶太, 中田 光政, 小松 秀吾, 原田 和明, 秦 佳孝, 勝海 大輔, 古金 遼也, 藤村理紗, 幡野 雅彦, 吉田 英生
2. 発表標題 胆道閉鎖症の病態形成における制御性T細胞の意義
3. 学会等名 第45回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Lisa Fujimura, Akemi Sakamoto, Masahiko Hatano
2. 発表標題 Roles of enteric neurons in gut mucosal immunity
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoru Oita, Takeshi Saito, Akemi Sakamoto, Keita Terui, Shugo Komatsu, Kazuaki Harada, Yoshitaka Shinno, Lisa Fujimura, Masahiko Hatano, Hideo Yoshida
2. 発表標題 Analysis of the frequency and function of regulatory T-cell using human blood samples in biliary atresia.
3. 学会等名 The Pacific Association of Pediatric Surgeons 52nd Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学 バイオメディカル研究センター www.m.chiba-u.ac.jp/dept/biomed/ 千葉大学大学院医学研究院 疾患生命医学 www.m.chiba-u.ac.jp/dept/shikkanseimei/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	幡野 雅彦 (Hatano Masahiko) (20208523)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	藤村 理紗 (Fujimura Lisa) (30376363)	千葉大学・バイオメディカル研究センター・助教 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------