

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591013

研究課題名（和文）

ケモカインCCL19/21を介した実験的自己免疫性脳脊髄炎発症機構の解明

研究課題名（英文） Role of chemokine CCL19/21 in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis

研究代表者

垣内 史堂 (Kakiuchi Terutaka)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：40126024

研究成果の概要：

神経難病の一つに多発性硬化症 (MS) がある。その動物モデルとなるのが、マウスの実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) である。われわれの研究室で見出された突然変異マウス-p1t マウス（ケモカイン CCL19/21 が不在）は、EAE を発症しにくいことを見出した。このケモカインの欠如で、EAE の原因となる Th17 細胞がみられず、これは樹状細胞（白血球の一つ）が IL-23 を分泌しないためであった。この結果は MS の治療法開発につながる可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：免疫学

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：実験的自己免疫性脳脊髄炎、Th17 細胞、ケモカイン、CCL19、CCL21、IL-23

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (MS) は神経難病の一つであり、その動物モデルが実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE) である。EAE の発症は神経組織の抗原に反応する Th1 細胞とされていたが、近年になって Th17 細胞が発症の主役であることが多数報告されるようになった。一方で、

われわれが見出し維持している突然変異マウス (p1t マウス) は、ケモカイン CCL19 と CCL21 の発現欠損がある。このマウスでは T 細胞と樹状細胞の二次リンパ組織における遊走と分布に異常があることは既に報告している。このマウスに EAE の発症を試みたところ、発症が強く抑制されていることが判明した。

2. 研究の目的

plt マウスが EAE を発症しにくいことについて、発症のどの段階に異常があり、それにケモカイン CCL19/21 がどのように関与しているのかを明らかにする。これによって、治療法が明らかでない MS の治療法開発に、新たな視点を導入することを目的とする。

3. 研究の方法

マウスは EAE を発症する C57BL/6 マウス (B6 マウス) と、これを背景にした plt マウスを用いる。また B6 マウスを背景にした CCR7 ノックアウトマウス (CCR7-KO マウス) は、ドイツの Martin Lipp 博士から譲渡された。plt マウスと CCR7-KO マウスは当大学の動物センターで繁殖した。

EAE の発症には、マウスに CFA アジュバントとともに Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) 由来のペプチド MOG35-55 を足蹠皮下に 1 回だけ免疫し、当日と 2 日後に Pertussis Toxin (PT) を静脈内に投与する。その後に EAE の症状を観察し、症状の程度を Clinical Score で表示する。

この免疫に反応した T 細胞の検討には、所属リンパ節 (膝窩リンパ節) の T 細胞を用いる。樹状細胞にはリンパ節あるいは脾臓の CD11c 陽性細胞を用いるが、骨髄細胞を GM-CSF とともに培養して得た細胞も用いた。

培養上清中のサイトカインの測定には、市販の ELISA 測定キットを用いた。また、細胞表面と細胞内分子の検出には、フローサイトメーターを用いた。

4. 研究成果

(1) plt マウスは EAE を発症しない。

野生型 B6 マウスに MOG35-55 を CFA アジュバントとともに免疫し、当日と 2 日後に PT を投与すると、免疫 14 日後から麻痺症状が認められ、28 日後に麻痺はピークになった。一方、plt マウスでは免疫後 42 日まで経過を観察したが、発症を認めなかった。

CCL19 と CCL21 のレセプターは CCR7 である。CCR7-KO マウスに EAE を誘導しても、やはり

発症しなかった。したがって、EAE の発症には CCR7 を介した CCL19 あるいは CCL21 のシグナルが必要であることがわかる。

EAE を発症しない原因として、EAE を発症する Th 細胞が誘導されても、CCL19 と CCL21 が存在しないために中枢神経系へ遊走できないためという可能性もあるが、EAE を発症した野生型マウスの T 細胞を移入すると、無処置の plt マウスでも発症した。逆に免疫した plt マウスの T 細胞を野生型マウスに移入しても、発症しなかった。すなわち、plt マウスで発症しないのは、EAE の発症に関わる Th 細胞が誘導されないためと考えられる。

(2) 反応した T 細胞の解析

MOG35-55 で免疫したマウス所属リンパ節細胞を用意し、in vitro で抗原刺激を行うと、野生型マウスと plt マウスのどちらのリンパ節細胞を用いても、ほぼ同じ増殖反応がみられた。すなわち、どちらのマウスでも Th 細胞は同程度に反応していると考えることができる。

一方、産生されるサイトカインをみると、IL-4 と IL-10 はほぼ同じ程度に産生されたが、IL-17 と IFN- γ の産生は野生型マウスに比べて plt マウスでは著明に低下していた。

IL-17 の産生には IL-6、TGF- β 、IL-23 が必要とされている。plt マウスの所属リンパ節細胞では、IL-6 と TGF- β の産生は低下していなかったが、IL-23 の産生は低下していた。IFN- γ の産生には IL-12 が必要であるが、IL-12 の産生も plt マウスの所属リンパ節で低下していた。したがって、plt マウスで IL-17 と IFN- γ の産生が著明に低下したのは、IL-23 と IL-12 の産生低下によると考えられる。

(3) 今回の条件下では、EAE の発症に Th1 細胞ではなく Th17 細胞が関与している。

IL-17 と IFN- γ の産生が低下していたことから予想されるように、plt マウスの所属リンパ節 Th 細胞では、細胞内 IL-17 陽性細胞と細胞内 IFN- γ 陽性細胞の頻度が明らかに低下していた。すなわち、plt マウスでは Th1 細胞と Th17 細胞が誘導されないことを示している。EAE の発症には Th17 細胞が関与して

いるという報告がここ3～4年続いているが、最近になってやはりTh1細胞も関与しているという報告もみられる。pltマウスでは、Th1細胞とTh17細胞誘導のどちらの低下がEAE発症不全につながっているだろうか。MOG35-55で免疫した野生型とpltマウスの所属リンパ節Th細胞を、in vitroでTh1またはTh17細胞をそれぞれ誘導する条件で刺激し、Th1細胞とTh17細胞がそれぞれ誘導されていることを確認した後、無処置の野生型マウスに移入し経過を見た。どちらのマウスから得たTh17細胞でもEAEの発症がみられたが、Th1細胞を移入したのではEAEの発症はみられなかった。すなわち、われわれの条件下では、EAEの発症にはTh17細胞が関与し、Th1細胞の関与は検出されなかった。したがって、pltマウスでEAEの発症がみられないのは、MOG35-55に免疫された後にTh17細胞が誘導されないためであろうと考えられる。

(4) Th17細胞の誘導にCCL19/CCL21が必要である。

ではpltマウスではTh17細胞の誘導がみられなかったが、CCL19/CCL21あるいは産生が低下していたIL-23を補えば回復するのだろうか。免疫後のpltマウス所属リンパ節Th細胞をin vitroでIL-23かCCL19/CCL21を作用させると、確かにTh17細胞が誘導された。また、CCL19を加えてTh17細胞を誘導するとき、抗IL-23抗体を加えると、Th17細胞の誘導が抑制されたことから、CCL19またはCCL21の作用でIL23が誘導され、その結果としてTh17細胞が誘導されると考えられる。

移入実験によって、CCL19/CCL21あるいはIL-23を補ってpltマウス所属リンパ節細胞から誘導したTh17細胞が、EAEを発症できることは確認した。

(5) 樹状細胞のIL-23産生にCCL19/CCL21が関与する。

IL-23を主として産生するのは樹状細胞である。骨髄細胞からin vitroで誘導した樹状細胞をCCL19/CCL21で刺激してみると、mRNAレベルでも蛋白質レベルでもIL-23が誘導された。所属リンパ節の樹状細胞を用いても同じ結果が得られた。

CCL19/CCL21がレセプターであるCCR7を介して刺激した結果であることも確かめられた。すなわち、CCR7-KOマウスの樹状細胞では、LPS刺激でIL-23を産生するものの、CCL19やCCL21の刺激ではIL-23を産生することはなかった。

(5) まとめと展望

以上の結果から、pltマウスにおいてEAEの発症がみられないのは、IL-23産生低下によってTh17細胞が誘導されないためであり、樹状細胞によるIL-23産生低下はCCL19とCCL21が発現されないためと結論することができる。

EAE発症はCCL19/CCL21あるいはIL-23の産生抑制で防ぐことができたが、発症後はどうであろうか。発症後にもIL-23あるいはCCL19やCCL21、さらにはCCR7の機能抑制でTh17細胞の補充を抑制できる可能性がある。発症後のEAEを抑制できれば、MSの治療法開発に向けてさらに進むことができるだろう。

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 5 件) 全て査読あり

(1) Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. Nakano H, Lin KL, Yanagita M, Charbonneau C, Cook DN, Kakiuchi T, Gunn MD. Nat Immunol. 2009, 10:394-402.

(2) Adiponectin stimulates IL-8 production by rheumatoid synovial fibroblasts. Kitahara K, Kusunoki N, Kakiuchi T, Suguro T, Kawai S. Biochem Biophys Res Commun. 2009, 378(2):218-223.

(3) Experimental scrapie in 'plt' mice: an assessment of the role of dendritic-cell migration in the pathogenesis of prion diseases. Levavasseur E, Metharom P, Dorban G, Nakano H, Kakiuchi T, Carnaud C, Sarradin

P, Aucouturier P.
J Gen Virol. 2007, 88:2353-2360.

(4) Enhancement of IFN-gamma production for Th1-cell therapy using negatively charged liposomes containing phosphatidylserine.

Yotsumoto S, Kakiuchi T, Aramaki Y.
Vaccine. 2007, 25:5256-5262.

(5) Chemokines CCL19 and CCL21 promote activation-induced cell death of antigen-responding T cells.

Yasuda T, Kuwabara T, Nakano H, Aritomi K, Onodera T, Lipp M, Takahama Y, Kakiuchi T.
Blood. 2007, 109:449-456.

[学会発表] (計 5 件)

(1) Tanaka Y, Ishikawa F, Kuwabara T, Kakiuchi T. CCL19/21 chemokines play a role in initiating immune response in the draining lymph node. 第38回日本免疫学会 2008年12月1~2日、国立京都国際会館

(2) Kuwabara T, Ishikawa F, Tanaka Y, Okada Y, Kakiuchi T. CC chemokine receptor 7-ligands are required for development of EAE through generating IL-23-dependent Th17 cells. 第38回日本免疫学会 2008年12月1~2日、国立京都国際会館

(3) Toyota H, Kuwabara T, Sudo K, Kakiuchi T, Mizuguchi J. MOG peptide-induced EAE is augmented in Thy28 transgenic mice. 第38回日本免疫学会 2008年12月1~2日、国立京都国際会館

(4) 桑原卓、石川文雄、田中ゆり子、岡田弥生、垣内史堂. ケモカイン CCL19 と CCL21 による自己反応性 T 細胞誘導機構の解析. 第19回日本生体防御学会 2008年7月10~12日、北大学術交流会館

(5) Tanaka Y, Taneichi M, Kakiuchi T, Uchida T. Mechanism of cross presentation induced by surface-linked liposomal antigen made using liposomes containing unsaturated fatty acids. 第37回日本免疫

学会 2007年11月20~22日、グランドプリンスホテル新高輪

[図書] (計 1 件)

(1) 垣内史堂、オーム社、図解 免疫学、2009年、295 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

垣内 史堂 (Kakiuchi Terutaka)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号：40126024

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

岩崎 泰雄 (Iwasaki Yasuo)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号：30130347

桑原 卓 (Kuwabara Taku)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：40385563