

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390284

研究課題名（和文） MR1 拘束性 T 細胞を介した関節炎治療法の開発

研究課題名（英文） The role of MRI restricted T cells in arthritis

研究代表者 三宅 幸子 (MIYAKE SACHIKO)

(独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部・室長

研究者番号：50266045

研究成果の概要（和文）：

MR1 拘束性 T 細胞は、粘膜組織に多く存在し、その分化には MR1 分子、B 細胞、腸内細菌叢を必要とする自然リンパ球である。MR1 拘束性 T 細胞の存在しない MR1⁻マウスは、コラーゲン関節炎、抗体誘導関節炎が軽症化し、炎症増悪に関与すると考えられた。ヒト MR1 拘束性 T 細胞は、健常者で末梢血 $\alpha\beta$ T 細胞の数%を占め、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症患者末梢血でその頻度は減少しており、自己免疫病態に関与することが推定された。

研究成果の概要（英文）：

MHC-related molecule-1 (MR1)-restricted T cells are restricted by a nonpolymorphic MHC class 1b molecule, MR1, and express an invariant TCR α chain. MR1-restricted T cells are selected in the thymus in an MR1-dependent manner, but, interestingly, MR1-restricted T cells require B cells as well as commensal flora for their peripheral expansion. We demonstrated that MR1-restricted T cells contribute to the arthritis severity of CIA and CAIA, mostly by augmenting joint inflammation in the effector phase of arthritis. Furthermore, we showed that the frequency of MR1-restricted T cells in peripheral blood is reduced in patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：NKT 細胞、MR1、関節炎、免疫調節性細胞、腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

自己免疫は CD4⁺CD25⁺T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞などさまざまな免疫制御性細胞によってその発症が抑制されていることがわかってきた。我々は、これまで NKT 細胞に注目し、NKT 細胞を特異的に刺激して調節性サイトカインを選択的に産生させる

糖脂質による自己免疫治療の可能性を示してきた (*Nature 2001, Arthritis Rheum.2004* 他)。NKT 細胞は、CD1 拘束性のインバリアント V α 24i (マウスでは V α 14i) T 細胞受容体(TCR)を発現する細胞がほぼその代名詞として用いられており、我々も V α 14i NKT 細胞を特異的に刺激す

る抗原について研究をおこなってきた。一方、NK マーカーを発現する T 細胞には他にも存在し、異なるインバリエント TCR を発現する細胞も存在する。ヒトでは、CD4-CD8 の Double Negative (DN) T 細胞を解析する過程で、V α 24i NKT 細胞とともにインバリエント鎖をもつ T 細胞とし V α 7.2i TCR を発現する細胞が報告され、V α 24i NKT 細胞より高い頻度で存在することが推定されていた。その後、Lantz らによりマウスホモログである V α 19i T 細胞が、腸管粘膜固有層やパイエル板に多く存在する細胞として、Mucosal Associated Invariant T (MAIT)細胞として報告され、その発生が MHC class Ib 分子である Major Histocompatibility Molecule Related 1 (MR1) と腸内細菌に依存することが明らかにされた。これら MR1 拘束性 T 細胞 (ヒト V α 7.2i T 細胞、マウス V α 19i T 細胞) の生理的機能については不明であったが、V α 7.2i T 細胞は多発性硬化症の髄液や剖検脳に浸潤していることが報告され、自己免疫疾患に関与することが示唆された。そこで我々は、V α 7.2i TCR マウスホモログである V α 19i TCR トランスジェニック (Tg) マウスと、V α 19i T 細胞が存在しない MR1^{-/-}マウスを用いて、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炎 (EAE) を誘導し、V α 19i TCR Tg では EAE が抑制され、MR1^{-/-}では EAE が増悪することから、V α 19i T 細胞は EAE を抑制する働きがあることを明らかにし、V α 19i T 細胞の生理的機能の初めての報告をした (*Nat. Immunol.* 2006)。一方、V α 14iNKT 細胞は、EAE や NOD マウスにおける I 型糖尿病では病態抑止として機能するが、関節リウマチモデルにおいては病態悪化に関与することを明らかにしており (*Arthritis Rheum.* 2005)、V α 19i T 細胞について関節炎における機能を明らかにすることが重要であると考え、本申請にいたった。

2. 研究の目的

MR1 拘束性細胞の関節炎モデル病態における機能を明らかにする。またヒトでの MR1 拘束性細胞検出に必要な解析ツールを作製し、自己免疫病態における機能解析を行う。

3. 研究の方法

コラーゲン関節炎 (Collagen-induced arthritis: CIA) は MR1^{-/-}マウスを DBA/1J マウスに 10 回戻し交配を行ったマウスを使用した。CII を FCA と共に Day 0、21 に免疫し誘導し、抗体誘導関節炎は C57BL/6J(B6)マウスもしくは MR1^{-/-}マウスに抗 CII モノクローナル抗体カクテルを 2mg/mouse で静脈投与し二日後に LPS を腹腔内投与して誘導した。関節炎は、臨床症

状と病理所見にて評価を行った。CIA に対するリコール反応、ならびに血清中の CIA 誘導後抗 CII 抗体を ELISA 法にて測定した。ヒト MAIT 細胞の解析では、末梢血単核細胞を分離の後、MAIT 細胞の頻度、表面抗原をフローサイトメーターで解析した。MAIT 細胞は V α 7.2⁺CD161^{high} の $\alpha\beta$ T 細胞集団と定義した。セルソーターを用いて分離した MAIT 細胞や、MAIT 細胞を除去した末梢血単核細胞の各種刺激に対するサイトカイン産生を解析した。

4. 研究成果

CIA は、発症率、最大スコアともに、野生型 DBA/1J マウスに比較して MR1^{-/-}マウスで有意に高値であった。これは、同腹の野生型マウスをコントロールとして用いても同様の結果が得られた。病理所見でも、MR1^{-/-}マウスでは、関節炎がより顕著であった。CIA に対するリコール反応における IL-17 産生、血清中抗 CII 抗体価は B6 に比較して MR1^{-/-}で低値である傾向ハアツタガ、有意差はなかった。一方、CII カクテル抗体関節炎では MR1^{-/-}マウスにおいてコントロール B6 マウスと比較して関節炎が抑制された。関節局所における炎症性サイトカインの発現も、MR1^{-/-}マウスでは有意に低かった。

In vitro にて、V α 19iNKT 細胞をセルソーターを用いて分離し、各種サイトカイン存在下で抗 CD3 抗体刺激非存在下によるサイトカイン産生を検討したところ、IL-23 共存下で IL-17 産生が増強した。また、IL-1 β 存在下では増殖がみられた。MR1 拘束性 NKT 細胞は EAE に対して抑制的に働くが、コラーゲン関節炎ならびに抗体誘導関節炎の炎症増悪に関与する可能性が示唆された。関節炎では、IL-1 β を初めとした炎症性サイトカインが大量に産生されていることから、強い炎症局所では MR1 拘束性 T 細胞は炎症の増悪因子として機能すると考えられた。MR1 拘束性 T 細胞の生理的機能の解析や、ヒト自己免疫病態における役割について検討するため、この細胞を特定できる抗体の作製が必須であると考えられる。

MAIT 細胞については、末梢血 $\alpha\beta$ T 細胞において、健常者で数%をしめる単一の α 鎖を発現する細胞としては大きな細胞集団を形成することが明らかとなった。自己免疫疾患である多発性硬化症では、平均 2.32%、再発期 MS 患者で平均 0.73%であり、MS 患者では再発期、寛解期とも健常者と比べ有意に低値であり、疾患活動性と相関していた。関節リウマチ、全身性エリテマトーデスにおいても末梢血における頻度を比較すると、両疾患ともに MAIT 細胞の頻度は減少しており、とくに全身性エリテマトーデスにおいてその減少は著しかった。今後疾患活動性との相関ならびに機能解析を行う事が重要である。

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 10 件)

Dondji B, Deak E, Goldsmith-Pestana K, Perez-Jimenez E, Esteban M, Miyake S, Yamamura T, McMahon-Pratt D: Intra-dermal NKT cell activation during DNA priming in heterologous prime-boost vaccination enhances T cell responses and protection against Leishmania. **Eur J Immunol** 38:706-19, 2008 査読有

Doi Y, Oki S, Ozawa T, Hohjoh H, Miyake S, Yamamura T: Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. **Proc Natl Acad Sci USA** 105:8381-8386, 2008 査読有

Sekine C, Sugihara T, Miyake S, Hirai H, Yoshida M, Miyasaka N, Kohsaka H. Successful treatment of animal models of rheumatoid arthritis with small-molecule cyclin-dependent kinase inhibitors. **J Immunol** 180:1954-1961, 2008 査読有

Yokote H, Miyake S, Croxford JL, Oki S, Mizusawa H, Yamamura T. NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora. **Ame J Pathol** 173:1714-23, 2008 査読有

Araki M, Miyake S, Yamamura T: Synthetic glycolipid ligands for human iNKT cells as potential therapeutic agents for immunotherapy. **Curr Med Chem** 15(23):2337-2345, 2008 査読有

Miyake S, Yamamura T. Ghrelin: friend or foe for neuroinflammation. **Deicov Med** 8(41):64-67, 2009 査読無

Theil MM, Miyake S, Mizuno M, Tomi C, Croxford J, Hosoda H, Theil J, von Horsten S, Yokote H, Chiba A, Lin Y, Oki S, Akamizu T, Kanagawa K, Yamamura T: Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by Ghrelin. **J Immunol**. 83(4):2859-66, 2009 査読有

Fujita M, Otsuka T, Mizuno M, Tomi C, Yamamura T, Miyake S. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates experimental autoimmune encephalomyelitis via iNKT cell-dependent mechanism. **Ame J Pathol** 175(3):1116-23, 2009 査読有

Noto D, Takahashi K, Miyake S, Yamada M. In vitro differentiation of lineage-negative bone marrow cells into microglia-like cells. **Eur J Neurosci** 31:1155-63, 2010 査読有

Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T,

Yamamura T. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. **Proc Natl Acad Sci USA** 108(9):3701-3706, 2011 査読有

[学会発表] (計 29 件)

1. Miyake S, Mizuno M, Kaieda S, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Yamamura T: Activation of innate immunity breaks tolerance and induces autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. American College of Rheumatology 71th Annual Scientific Meeting, Washington, DC, November 13, 2006 (Arthritis Rheum. 58:S266, 2008)

2. Seta N, Komori A, Kimura N, Kaieda S, Okada Y, Miyake S, Kuwana A: A role of bone marrow-derived monocyte lineage cells in antibody-induced arthritis. American College of Rheumatology 71th Annual Scientific Meeting, Washington, DC, November 13, 2008 (Arthritis Rheum. 58:S508, 2008)

3. 八子徹、田島良亮、海江田信二郎、大木伸司、三宅幸子: MR1 拘束性 Va19iT 細胞のコーゲン誘導関節炎 (CIA) における機能解析. 第 52 回日本リウマチ学会、札幌、4 月 22 日、2008 (第 52 回日本リウマチ学会総会抄録集 p264)

4. 瀬田範行、海江田信二郎、岡田保典、三宅幸子、桑名正隆: 関節炎モデルの病態形成における骨髄由来細胞の関与の検討. 第 52 回日本リウマチ学会、札幌、4 月 22 日、2008 (第 52 回日本リウマチ学会総会抄録集 p382)

5. 田島良亮、八子徹、海江田信二郎、三宅幸子: MR1 拘束性 Va19iT 細胞の抗体誘導関節炎における機能解析. 第 52 回日本リウマチ学会、札幌、4 月 21 日、2008 (第 52 回日本リウマチ学会総会抄録集 p384)

6. 三宅幸子、横手裕明、宮崎雄生、Croxford J. L., 山村隆: iNKT 細胞を介した腸内フローラ変化による実験的自己免疫性脳脊髄炎. 第 36 回日本臨床免疫学会、東京、10 月 17 日、2008 (日本臨床免疫学会会誌 31 巻:292, 2008)

7. 宮崎雄生、三宅幸子、山村隆: ハプテン誘導性腸炎における mucosao associated invariant T 細胞の役割. 第 36 回日本臨床免疫学会、東京、10 月 17 日、2008 (日本臨床免疫学会会誌 31 巻:266, 2008)

8. 田島良亮、山村隆、宮崎雄生、市川大樹、三宅幸子: MR1 拘束性 Va19iT 細胞の抗体誘導関節炎における機能解析. 第 38 回日本免疫学会、京都、12 月 1 日、2008 (第 38 回日本免疫学会総会抄録集 p91)

9. 宮崎雄生、田島良亮、市川大樹、八子徹、三宅幸子、山村隆: 腸管免疫制御における mucosao associated invariant T 細胞の役割. 第 38 回日本免疫学会、京都、12 月 1 日、2008 (第 38 回日本免疫学会総会抄録集 p98)

10. Miyake S, Yokote H, Lin Y, Yamamura T. The role of regulatory cells in the regulation of EAE. 2nd German-Japanese Neuroimmunology Symposium, Eibsee, 10th, July 2009

11. Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D, Yamamura T, Miyake S: The role of MR1-restricted MAIT cells in the pathogenesis of arthritis. American College of Rheumatology 73rd Annual Scientific Meeting, Philadelphia, 10.19, 2009

12. 三宅幸子: 免疫制御細胞による自己免疫性疾患. 第53回日本リウマチ学会, 横浜, 4月24日, 2009 (第53回日本リウマチ学会総会抄録集 p122)

13. 宮崎雄生, 三宅幸子, 山村 隆: ヒト末梢血における mucosal associated invariant T 細胞に関する研究. 第37回日本臨床免疫学会総会, 東京, 11. 13, 2009

14. 宮崎雄生, 千葉麻子, 水野美歩, 任海千春, 市川大樹, Iraide Alloza, 山村 隆, Koen Vandebroek, 三宅幸子: 新規 celecoxib アナログは Th17, Th1 細胞の抑制を介して多発性硬化症, 関節リウマチのマウスモデルを抑制する. ワークショップ 18, 第39回日本免疫学会総会, 大坂, 12. 2, 2009

15. 市川大樹, 水野美歩, 大木伸司, 山村隆, 三宅幸子: T細胞アナジーに関連した E3 リガーゼ GRAIL の基質同定. 第39回日本免疫学会, 大坂, 12. 2, 2009

16. 千葉麻子, 宮崎雄生, 市川大樹, 山村隆, 三宅幸子: 炎症性関節炎における MR1 拘束性 MAIT 細胞の役割, 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 大坂, 12. 2, 2009

17. 宮崎雄生, 千葉麻子, 水野美歩, 任海千春, 市川大樹, Iraide Alloza, 山村 隆, Koen Vandebroek, 三宅幸子: 新規 celecoxib アナログは Th17, Th1 細胞の抑制を介して多発性硬化症, 関節リウマチのマウスモデルを抑制する. ワークショップ 18, 第39回日本免疫学会総会, 大坂, 12. 2, 2009

18. Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D, Yamamura T, Miyake S: The role of MR1-restricted MAIT cells in the pathogenesis of murines models of arthritis. 10th Annual Conference of FOCIS, Boston, June 24, 2010 (Clinical Immunology, 135S:S52, 2010)

19. Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D, Yamamura T, Miyake S: The role of MR1-restricted MAIT cells in the pathogenesis of arthritis. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug 24, 2010

20. Ogura H, Satoh M, Gilfillan S, Miyake S, Onoe K, Iwabuchi K: MR1-restricted NKT cells exhibit beneficial role for the development of atherosclerosis. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug 23, 2010

21. Noto D, Kazuya T, Yamamura T, Masahito Y,

Miyake S: In vitro differentiation of lineage-negative bone marrow cells and monocyte into microglia-like cells. 10th International Congress of Neuroimmunology, Barcelona, Nov15, 2010

22. Chiba A, Miyazaki Y, Ryohsuke T, Miho M, Tomi C, Ichikawa D, Iraide A, Yamamura T, Vandebroek K, Miyake S: Celecoxib analogue lacking COX-2 inhibitory activity suppresses inflammatory disorders by inhibiting inflammatory cytokines. 10th International Congress of Neuroimmunology, Barcelona, Nov15, 2010

23. Chiba A, Ryohsuke T, Miho M, Tomi C, Ichikawa D, Iraide A, Yamamura T, Vandebroek K, Miyake S: Celecoxib analogue lacking COX-2 inhibitory activity inhibits arthritis by suppressing IL-23 and inflammatory cytokines. American College of Rheumatology 73rd Annual Scientific Meeting, Atlanta, Georgia, November 7, 2010 (Arthritis Rheum. 62:S371, 2010)

24. Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D, Yamamura T, Miyake S: Mucosal associated invariant T cells contribute to the pathogenesis of arthritis. American College of Rheumatology 73rd Annual Scientific Meeting, Atlanta, Georgia, November 11, 2010 (Arthritis Rheum. 62:S938, 2010)

25. Miyake S. MAIT cells in autoimmunity Neuroimmunology Kyoto Conference 2010, Kyoto, August 18, 2010

26. 三宅幸子: NKT細胞と自己免疫. 第53回日本リウマチ学会, 横浜, 4月23日, 2010 (第54回日本リウマチ学会総会抄録集 p243)

27. 宮崎雄生, 三宅幸子, Olivier Lantz, 山村 隆: 多発性硬化症における Mucosal Associated Invariant T 細胞に関する研究. 第22回日本神経免疫学会学術集会, 東京, 3. 18, 2010

28. 能登大介, 高橋和也, 山村隆, 三宅幸子: 末梢血単球からミクログリアへの分化誘導法に関する検討. 第22回日本神経免疫学会学術集会, 東京, 3. 19, 2010

29. 千葉麻子, 三宅幸子: 関節リウマチなど関節炎における MR1 拘束性 MAIT 細胞の役割, 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会, 神戸, 4. 22, 2010 (第54回日本リウマチ学会総会抄録集 p500)

〔図書〕 (計2件)

Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T: Role of NKT cells in multiple sclerosis: In a quest to understand and overcome their highly efficient double edged swords. **Molecular Basis of Multiple Sclerosis. The Immune System Series "Results and Problems in Cell**

Differentiation” Gramm U, ed, Springer-Verlag, Heidelberg, 51:127-147, 2010

免疫学会編集担当者(榑木俊聡、河本宏、反町典子、高浜洋介、瀧伸介、三宅幸子、宮坂昌之): **からだをまもる免疫のふしぎ**. 日本免疫学会編,羊土社, 2008, P50-53

(2009 年度)

研究者番号 : 60462793

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ

http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_men/m_in dex.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 幸子 (MIYAKE SACHIKO)

独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部・室長

研究者番号 : 50266045

(2) 研究分担者

市川 大樹 (ICHIKAWA DAIJU)

独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部・研究員

(2008 年度)

研究者番号 : 60462793

(3) 連携研究者

市川 大樹 (ICHIKAWA DAIJU)

独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部・研究員