

機関番号：13101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590991

研究課題名 (和文) 粘膜免疫から多発性硬化症の病態制御因子を探索する

研究課題名 (英文) Possible pathomechanism of multiple sclerosis from the perspective of abnormal mucosal immune responses

研究代表者

河内 泉 (KAWACHI IZUMI)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：40432083

研究成果の概要 (和文)：多発性硬化症 (MS) はクローン病とともに本邦で有病率が増加している疾患であり、その発症機序には衛生状態改善をはじめとした環境要因の関与 (衛生仮説) が提唱されている。MS末梢血にはIL-17を産生する特異なdouble negative T (DNT) 細胞分画が存在していること、DNT分画は $\gamma\delta$ T細胞をはじめとしたinnate T (iT) 細胞を多く含み、自然免疫と獲得免疫を橋渡しする鍵となる分画であること、iT細胞群には粘膜集積性の高い細胞系列が存在することから、衛生環境の最前線にある「粘膜」の免疫機構はMSの発症を修飾している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The prevalence of multiple sclerosis (MS) and Crohn's disease have increased since 1960s in Japan. The 'hygiene hypothesis' has been proposed for immunopathogenesis of MS. The distinct population of double negative T cells (DNT) expressing IL-17 was identified in patients with MS. As most of DNT cells are composed of innate T cells including $\gamma\delta$ T cells and IL-17-expressing cells are most abundant at steady state in gut-associated tissues, we suspect that the production of IL-17 derived from mucosal associated cells including not only T_H -17 *per se* but also innate T cells might be critical elements contributing to MS.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

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：中枢神経系脱髄疾患、多発性硬化症、視神経脊髄炎、粘膜免疫、innate T 細胞、interleukin-17、衛生仮説

1. 研究開始当初の背景

(1) 多発性硬化症 (MS) は、中枢神経系に活性化ミエリン反応性リンパ球が浸潤する中枢神経系自己免疫疾患である。昨今、アトピー性皮膚炎、サルコイドーシス、クローン病と同様に、飛躍的に有病率が急増している疾患である。発症機序には遺伝的要因や環境要因が考えられているが、①疫学調査、②一卵

性双生児内で疾患動態が一致しない事実、③本症のモデル動物であるミエリン塩基性蛋白特異的T細胞受容体トランスジェニックマウス脳脊髄炎では specific pathogen free 下で疾患誘導されず、conventional condition でのみ自然発症が誘導されること (コロニー依存性) から、発症機序には環境要因が必須であると考えられる。以上から、衛生状態の

改善をはじめとした環境要因により、腸管の巨大な「常在細菌叢プールが変化」し、結果、全身の約7割のリンパ球が集積している「粘膜」での免疫応答が影響を受け、中枢神経系自己免疫疾患の発症及び病態を修飾する可能性（衛生仮説）が提唱されているが、いまだその詳細な病態は明らかにされていない。

(2) Innate T (*i*T) 細胞は semi-invariant T 細胞受容体 (TCR) 鎖を有し、多様性の少ない抗原を認識することで、瞬時に独自の機能を発揮する一群の細胞である。マウスでは、①TCR V α 14 を有す CD1d 拘束性 NKT (NKT/V α 14*i*T)、②TCR V α 19 を有す MR1 拘束性 mucosal associated invariant T (MAIT/V α 19*i*T) 細胞がその代表であり、自然免疫と獲得免疫の橋渡しをすることで免疫バランス制御機能を有する可能性が示唆されている。これまでに研究代表者らは *i*T 細胞の一つ MAIT/V α 19*i*T を解析し、以下の知見を明らかにしてきた (Nature 2003;422:164)(J Immunol 2006; 176:1618)。MAIT/V α 19*i*T は、ヒトで多く、野生型マウスで少ないことから、マウスを使用した機能解析が困難であった。そこで新たに TCR V α 19*i* トランスジェニックマウス (V α 19*i*) を作成し、TCR C α ノックアウトマウス (C α ^{-/-}) (内在性 TCR α を除去するため)、MR1 ノックアウトマウス (MR1^{-/-}) と多重交配させ、V α 19iC α ^{-/-}MR1^{-/-}マウス (MR1 拘束性 V α 19*i*T 細胞なし) と V α 19iC α ^{-/-}MR1^{+/+}マウス (MR1 拘束性 V α 19*i*T 細胞あり) を直接比較する系を用いることで、MR1 拘束性 V α 19*i*T の特徴を描出した。第一に、MAIT/V α 19*i*T は、腸管 lamina propria に多数局在し、double negative T (DNT) もしくは CD4^{low} 分画に属す活性メモリー細胞で、TCR 刺激により IL-4, IL-5, IL-10 を産生するユニークな *i*T 細胞であることを示した (J Immunol 2006; 176:1618)。第二に、骨髄キメラマウスより、MR1 発現骨髄由来細胞が V α 19*i*T の胸腺での選択に必須であることを、間接的な分子生物的手法だけではなく、直接的な functional assay で確認した。第三に germ-free マウスの解析から MAIT/V α 19*i*T の生存維持には腸管正常細菌叢が必須であることがわかっているが、その詳細な反応機構を解明した。すなわち、MAIT/V α 19*i*T は腸管正常細菌叢を認識する際、自己の細胞に存在する MR1 分子を介することで増殖維持されることを見出した。

我々の基礎的な MAIT/V α 19*i*T の機能解析をもとに、Yamamura らのグループは MAIT/V α 19*i*T のヒトホモログ MAIT/V α 7.2*i*T が MS 病変局所に浸潤していること (Int Immunol 2003;16:223)、実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) において、MAIT/V α 19*i*T が ICOS 分子を介して B 細胞

の IL-10 産生能を変化させ、EAE を発症抑制する可能性を提示した (Nat Immunol 2006;9:987)。同報告は野生型マウスで存在が確認されていない肝臓由来のトランスジェニック MAIT/V α 19*i*T 細胞を移入実験に使用している等の問題点はあるものの、MS の発症病態に MAIT 細胞が関与する可能性を提示した示唆に富む報告である。

以上の研究から、MR1 拘束性 MAIT/V α 19*i*T や $\gamma\delta$ T 細胞をはじめとした *i*T 細胞が、腸管粘膜で常在細菌叢の変化によりたくみに表現型 (免疫制御/免疫賦活) を変え、獲得免疫に関わる様々なリンパ球系列機能を制御/賦活の両方向へ修飾し、MS の自己免疫病態を制御/誘発する可能性が想定される。このように MS の発症病態の理解には「自然免疫 (粘膜免疫/常在細菌叢プール・*i*T 及び樹状細胞) - 獲得免疫のパラダイム」を読み解く必要があると考える。

2. 研究の目的

粘膜に多数局在し、自然免疫と獲得免疫の橋渡しをする MAIT/V α 19*i*T 細胞をはじめとした *i*T 細胞に着目し、その免疫調節、修飾機構について解析し、MS 発症における本細胞の関与を検討、及び MS の「衛生仮説」を実証することを目的とする。

3. 研究の方法

MS、その他の炎症性神経疾患患者、健康者からの末梢血から単核球 (PBMC) を分離し、フローサイトメーター (FACS) を使用し、CD3, CD4, CD8, IFN- γ , IL-4, IL-17, Foxp3, 各種ケモカイン受容体分子の描出を試みた。また、FACS sorting により各分画に分けた後、T-bet, ROR γ t 分子の発現を real time RT-PCR 法にて確認した。さらに CD3 ligation 及び IL-23 刺激にて各分画のサイトカイン産生能を検討した。DNT 分画の描出には CD3^{pos}CD4^{neg}CD8^{neg} 細胞群を使用した。

4. 研究成果

(1) MS 末梢血では健康者と比較して、CD4 陽性分画の IL-17 産生細胞頻度に差を見出すことができなかった (図)。

(2) MS の DNT 分画では IL-17 産生細胞は有意に高値であった (図)。

(3) MS の疾患活動性による違いを検討してみると、MS 再発期では IL-17 産生細胞および IFN- γ 産生細胞両者の頻度が寛解期に比較して増加しており、MS 再発期の DNT 分画には double producer (IFN- γ ⁺/IL-17⁺) が存在している可能性が示唆された (図)。

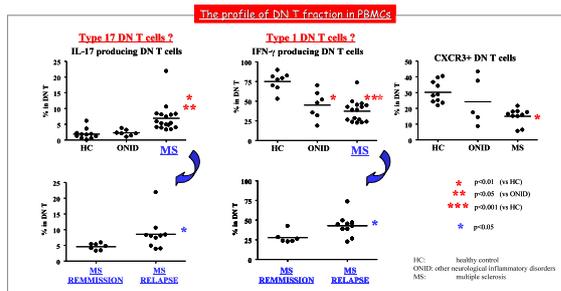
(4) T_H-17 系列のマスターレギュレーター分子である ROR γ t 分子の発現が MS の DNT 分画で有意に高値であった。

(5) MS の標的臓器である脊髄で、IL-17 およ

び IFN- γ 産生細胞が浸潤していた。

以上より、MS 末梢血には「IL-17 を産生する特異な DNT 細胞分画」が存在することを新たに見出した。DNT 分画は MAIT 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞をはじめとした iT 細胞を多く含む分画であり、さらに iT 細胞群には粘膜集積性の高い細胞系列が存在することから、MS と粘膜免疫の関係性の一端を見ている可能性が示唆された。

図



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 28 件)

- ① Kawachi I, 4 名中 3 番: No relapse of neuromyelitis optica during drug-induced B⁻lymphopenia with hypogammaglobulinemia. *Neurology* 2010;75:1745-7. 査読有
- ② Kawachi I, Saji E, Toyoshima Y, Dalmat J, Nishizawa M: Treatment-responsive opsoclonus-ataxia associated with ovarian teratoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81:581-2. 査読有
- ③ Kawachi I, 7 名中 1 番: Potential role of cellular immunity in neuromyelitis optica. *J Neuroimmunol* 2010; 228:138.
- ④ Kawachi I, 3 名中 2 番: Diagnosis and management of paraneoplastic neurological syndromes. *Brain Nerve* 2010;62:319-30.
- ⑤ Kawachi I, 7 名中 1 番: Humoral and cellular immune responses in neuromyelitis optica. *Rinsho Shinkeigaku* 2010;50:873-4.
- ⑥ 河内泉, 西澤正豊: 膠原病に伴う神経・筋障害: 診断と治療の進歩. 肥厚性硬膜炎. *日本内科学会雑誌* 2010;99:1821-9.
- ⑦ Toyoshima Y, 6 名中 3 名: Involvement of Onuf's nucleus in Machado-Joseph disease: a morphometric and immunohistochemical study. *Acta neuropathol* 2010;120:439-48. 査読有
- ⑧ Toyoshima Y, 19 名中 4 名: Sporadic four-repeat tauopathy with frontotemporal lobar degeneration, Parkinsonism, and motor neuron disease: a distinct clinicopathological and biochemical disease entity. *Acta Neuropathol* 2010;120:21-32. 査読有
- ⑨ Kawachi I, 18 名中 2 番: Pathological and immunological profiles of a limited form of neuromyelitis optica with myelitis. *Neurology* 2009;73:1628-37. 査読有
- ⑩ Kawachi I, Kondo T. T lymphocytes: Helpers. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCE (ELS)* 2009. 査読有
- ⑪ Kawachi I, 13 名中 6 番: Sporadic amyotrophic lateral sclerosis of long duration is associated with relatively mild TDP-43 pathology. *Acta Neuropathol.* 2009;117:45-53. 査読有
- ⑫ 西澤正豊, 河内泉. 多発性硬化症のゲノム解析. *医学のあゆみ* 2009;230:616-619.
- ⑬ Toyoshima Y, 9 名中 3 番: Cerebellar involvement in progressive supranuclear palsy: a clinicopathological study. *Mov Disord* 2009;24:1312-8. 査読有
- ⑭ Toyoshima Y, 8 名中 3 番: Depletion of medullary serotonergic neurons in patients with multiple system atrophy who succumbed to sudden death. *Brain* 2009;132:1810-9. 査読有
- ⑮ Toyoshima Y, 11 名中 3 番: Selective occurrence of TDP-43-immunoreactive inclusions in the lower motor neurons in Machado-Joseph disease. *Acta Neuropathol* 2009;118:553-60. 査読有
- ⑯ Toyoshima Y, 7 名中 3 番: Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: widespread multisystem degeneration with TDP-43 pathology in a patient after long-term survival on a respirator. *Neuropathology* 2009;29:689-96. 査読有
- ⑰ Kawachi I, 6 名中 4 番: Patients with limbic encephalitis associated with anti-voltage-gated potassium channel antibodies who presented with insomnia and hand tremor. *Rinsho Shinkeigaku* 2008;48:338-42. 査読有
- ⑱ 河内泉: 傍腫瘍性神経症候群: 診断と治療の進歩. *日本内科学会雑誌*. 2008;97:63-69.

- ⑱ Kawachi I, 4名中1番: The distinct lineage: Double negative T cells expressing IL -17 in multiple sclerosis. J of Neuroimmunol 2008;203:163.
- ⑳ Toyoshima Y, 9名中4番: Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: two pathological patterns shown by analysis of distribution of TDP-43-immunoreactive neuronal and glial cytoplasmic inclusions. Acta Neuropathol 2008;116:169-82. 査読有

[学会発表] (計 48 件)

- ① Kawachi I, 5名中1番: Potential role of cellular immunity in neuromyelitis optica. Keystone symposia "Genetics, Immunology and Repair in Multiple Sclerosis". Taos, USA. 2011年2月.
- ② Kawachi I, Toyoshima Y, Yanagawa K, Saji E, Kakita A, Takahashi H, Nishizawa M. Potential role of cellular immunity in neuromyelitis optica. The 10th International Congress of Neuroimmunology. Sitges (Barcelona), Spain. 2010年10月.
- ③ Kawachi I, Yanagawa K, Saji E, Nishizawa M. Humoral and cellular immunity in neuromyelitis optica. 第40回日本免疫学会, the 14th. International Congress of Immunology 合同学会, 神戸, 2010年8月.
- ④ Kawachi I: Humoral and cellular immune responses in neuromyelitis optica. 第51回日本神経学会総会, シンポジウム招待講演 2010年5月.
- ⑤ Saji E, Toyoshima Y, Yanagawa K, Nishizawa M and Kawachi I. Neuropsychiatric presentation of neuromyelitis optica spectrum disorders. The 62nd. Annual meeting of the American Academy of Neurology. Tronto, Canada. 2010年4月.
- ⑥ 河内泉, 西澤正豊: 新規 T 細胞系列と多発性硬化症・NMO. 第22回日本神経免疫学会学術集会, 招待講演 2010年3月.
- ⑦ 河内泉: 自然免疫機構からみた多発性硬化症. 第1回関東MS研究会, 招待講演 2010年3月.
- ⑧ Kawachi I, Nishizawa M. A potential plasticity of human IL-17-producing T cells and its reflection on pathogenicity of multiple sclerosis. 第39回日本免疫学会, 大阪, 2009年12月.
- ⑨ Kawachi I, 19名中1番. Pathological and immunological profiles of a limited form of neuromyelitis optica with myelitis. International Symposium New aspects of Neuromyelitis optica (NMO). Awaji, Japan. 2009年10月.
- ⑩ Kawachi I, Yanagawa K, Nishizawa M. Homogeneity of pathogenesis and heterogeneity of treatment response through long-term courses of neuromyelitis optica. The 25th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS). Dusseldorf, German. 2009年10月.
- ⑪ Kawachi I, Nishizawa M. Phenotypic features of T cells expressing RORγt in multiple sclerosis. The 9th Annual Meeting of the Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS). San Francisco, USA. 2009年6月.
- ⑫ Kawachi I, Nishizawa M. The Distinct Lineage: Double Negative T Cells Expressing IL -17 in MS. Keystone symposia "Multiple sclerosis". Santa Fe, USA. 2009年2月.
- ⑬ Kawachi I, Yanagawa K, Nishizawa M. Phenotypic and functional features of T cells expressing RORγt in multiple sclerosis. 第38回日本免疫学会, 京都, 2008年12月.
- ⑭ Kawachi I, Musashi Arakawa, Kaori Yanagawa, Masatoyo Nishizawa. The distinct lineage: Double negative T cells expressing IL-17 in multiple sclerosis. The 9th International Congress of Neuroimmunology. Fort Worth, USA. 2008年10月.
- ⑮ Kawachi I, Musashi Arakawa, Kaori Yanagawa, Masatoyo Nishizawa. Identification of double negative T cells expressing IL-17 in multiple sclerosis. World Congress on Treatment and Research in Multiple Sclerosis (WCTRIMS). Montreal, Canada. 2008年9月.

[その他]

ホームページ: 新潟大学脳研究所神経内科. 多発性硬化症基礎研究紹介. http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~neuroweb/laboratory/research_basic_005.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河内 泉 (KAWACHI IZUMI)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：40432083

(2)研究分担者

豊島 靖子 (TOYOSHIMA YASUKO)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：20334675

(3)連携研究者

なし