

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07895

研究課題名(和文) 中枢神経系の自己免疫疾患における非下垂体性プロラクチンの意義

研究課題名(英文) Functional significance of non-pituitary prolactin on autoimmune diseases in the central nervous system

研究代表者

大木 伸司 (Oki, Shinji)

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 疾病研究第六部・室長

研究者番号：50260328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プロラクチン(以下PRL)は下垂体ホルモンの一種であるが、免疫細胞等が産生する異所性PRLの挙動は未知であり、自己免疫疾患の病態形成との関係も不明である。我々はこれまでに、二次進行型MS(SP-MS)の病態形成に密接に関わるEomes陽性ヘルパーT(Th)細胞のCNSでの生成に、抗原提示細胞が異所性に産生するPRLが重要な役割を果たすことを見出した。本研究では、マウスおよびヒトの系を用いて、抗原提示細胞を含む免疫細胞が産生する異所性PRLが、Eomes陽性Th細胞の誘導を介して、中枢神経系の自己免疫疾患にいかに関与を及ぼすか、について多角的な解析を行ない、重要な知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロラクチン(以下PRL)は下垂体ホルモンの一種であるが、免疫細胞等が産生する非ホルモン性の異所性PRLの挙動は未知であり、自己免疫疾患の病態形成における役割も不明である。本研究の学術的意義は、中枢神経疾患に伴う慢性炎症が引き金となってCNS内に集積する種々の免疫細胞が、異所性PRLを介してEomes陽性Th細胞の生成、およびこれに起因する中枢神経系の自己免疫疾患に及ぼす効果を明らかにした点にある。局所的に産生される異所性PRLの役割を明らかにすることで、中枢神経疾患の病態解明と治療法開発に資する複数の結果を得ることに成功している。

研究成果の概要(英文)：As prolactin (PRL) is well known as a pituitary hormone produced by anterior lactotroph, a role of ectopic PRL secretion by immune cells on the pathogenesis of autoimmune diseases are not clarified yet. We have previously demonstrated that ectopic secretion of PRL by antigen presenting cells (APC) play a crucial role for the development of Eomes-positive helper T cells (Eomes+ Th cells), intimately associated with the pathogenesis of secondary progressive multiple sclerosis (SP-MS). In this study, we aimed to perform comprehensive analysis how APC-derived ectopic PRL affects autoimmune diseases in the CNS via induction of Eomes+ Th cells. Employing a set of experimental structure, we obtained some important results that explain the role of ectopic PRL.

研究分野：病態神経免疫学

キーワード：プロラクチン 下垂体 抗原提示細胞 自己免疫疾患 Eomes陽性Th細胞 自己反応性Th細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

長年にわたる多発性硬化症(MS)およびその動物モデルである実験的自己免疫性能脊髄炎(EAE)の解析から、再発寛解型 MS(RR-MS)の原因となる自己反応性ヘルパーT(Th)細胞の制御因子 NR4A2 を T 細胞特異的に欠損させたマウス(NR4A2cKO マウス)が新たな未知病態を発症することを見出し、その病原性細胞として転写因子 Eomes を発現するユニークな Th 細胞(Eomes 陽性 Th 細胞)を同定した。さらに神経変性を伴い、RR-MS 患者の一部が移行するす治性の二次進行型 MS(SP-MS)の患者における同細胞の挙動を解析したところ、健常者や RR-MS 患者と比較して、SP-MS の末梢血中および脳脊髄液中の Eomes 陽性 Th 細胞頻度が有意に高いことを明らかにした (Nat Commun 2015)。従って遅れて発症するこの後期 EAE 病態を、世界初の SP-MS マウスモデルとして確立することに成功した。これまで autonomous な神経変性が病態形成に中心的な役割を果たすと予想され、有効な治療法が確立していなかった SP-MS における獲得免疫系の関与が初めて明らかとなった。同マウスモデルの詳細な解析を通じて得られた一連の結果から説明される新たな病態機序を提唱し、現在この新たな病態機序に基づく SP-MS 新規治療法の開発研究が精力的に進められている。SP-MS に相当する後期 EAE 病態に関わる Eomes 陽性 Th 細胞の生成は、RR-MS 相当の初期病態の有無に関わらず遅れて生じることから、Eomes 陽性 Th 細胞の生成には、一定期間継続する持続的な慢性炎症環境が必要であると考えられた。さらに初期の急性炎症に伴って CNS 内に集積する免疫細胞は Th 細胞にとどまらず、獲得免疫系の機能制御に深く関わる B 細胞や樹状細胞などの抗原提示細胞(APC)も浸潤し、CNS 内で Th 細胞と相互作用すると考えられる。とくに SP-MS とそのモデルマウスでは髄膜周囲に異所性のリンパ濾胞様構造が形成されることから、このようなリンパ濾胞様構造は Th 細胞と APC の相互作用のプラットフォームを提供すると予想される。そこで CNS に浸潤した抗原提示細胞の Eomes 発現誘導能を詳細に解析した結果、抗原提示細胞が産生する異所性 PRL が、CNS 内における Eomes 陽性 Th 細胞の生成に重要な役割を果たすことを明らかにした(PNAS 2019)。マウス脳脊髄液中の PRL は、EAE 発症に伴って顕著に増加する一方で、同マウス由来下垂体の PRL 遺伝子発現は、EAE の観察期間を通じて低値にとどまることから、EAE マウス脳脊髄液中の PRL の貯留は、浸潤した抗原提示細胞に由来するものと考えられた。PRL は、刺激条件に応じて様々な免疫細胞が産生し、総じて免疫応答を活性化する働きをするが、これらはいずれも *in vitro* の解析系を中心に得られた知見であり、*in vivo* における系統的な解析はなく、その生理的あるいは病理的意義は不明である。さらに慢性炎症に伴って抗原提示細胞が産生する PRL には病態形成との未知の連関も考えられる一方で、何らかの原因で産生が亢進した下垂体由来 PRL が、自己免疫病態の形成過程に関わる可能性も排除はできないことから、異所性 PRL の新しい役割とその作用機序を明らかにすることは、自己免疫疾患の病態機序解明のために極めて重要な知見を与えることが期待される

### 2. 研究の目的

後期 EAE と SP-MS は、先行する自己免疫病態から一定の期間を経て生じることから、炎症環境下で PRL 産生が、CNS 内での Eomes 陽性 Th 細胞の生成と中枢神経病態の形成に重要な役割を果たすことが予想される。とくに抗原提示細胞由来の PRL は、Th 細胞の Eomes 発現を誘導することで Eomes 陽性 Th 細胞の生成を促進し、後期 EAE と SP-MS を引き起こすことが示されており、特定の免疫細胞 (抗原提示細胞) が慢性炎症環境下で PRL 産生能を獲得し、特定の T 細胞 (Eomes 陽性 Th 細胞) の生成を誘導することで、特定の疾患 (SP-MS/後期 EAE) の病態形成に関わることが陽々となっている。本球では、自己免疫疾患における PRL の包括的な役割を明らかにし、病態機序の全容解明を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、病態形成に関わる PRL の役割を、組織、細胞サブセット、および自己免疫病態ごとに解析する体制で臨むことにより、一連のカスケードの全容解明を目指す。

#### ① 免疫細胞由来 PRL vs 下垂体由来の PRL

PRL 受容体欠損 (PRLRKO) マウスあるいは対照マウスの T 細胞を移植した RAG2KO マウスに EAE を誘導し、Eomes 陽性 Th 細胞の生成と後期 EAE 病態を解析した。マウスに甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) を投与し、下垂体由来の PRL 産生を亢進させた後に EAE を誘導し、下垂体由来の PRL の役割を評価した。

## ② 他の自己免疫疾患におけるプロラクチンの作用

多様な自己免疫疾患が、高 PRL 血症を高頻度に合併することが知られている。そこで SLE のモデルマウスである BXS<sup>B</sup>-Yaa マウスや MRL<sup>-lpr</sup> マウスの発症前後に PRL 阻害剤 (bromocriptine や L-dopa など) を投与し、病態への影響と T 細胞の挙動を解析した。血清中 PRL 濃度を経時的に定量し、病態との相関を解析するとともに、下垂体および各種免疫細胞の PRL 産生を定量し、病態との相関を調べた。

## ③ 自己反応性 Th 細胞に対する作用

我々は、NR4A2 が自己反応性 Th 細胞の制御因子であることを明らかにしており (EMBO Mol Med 2022)、この自己反応性 T 細胞の生成過程に、PRL が極めて重要な役割を果たす可能性を示すデータを得ている。そこで、NR4A2 が制御する自己反応性 T 細胞の生成に対する PRL の作用機序を分子レベルで解析した。

## ④ MS 患者サンプルを用いた解析

下垂体性 PRL と非下垂体性 PRL は遺伝子の発現制御領域が異なり (図参照)、非下垂体性エンハンサー領域内の SNPs(rs1341239)は PRL の発現量に影響を与える。そこで当院受診の MS 患者あるいは NCNP トランスレーショナルメディカルリサーチセンターに保管されている DNA サンプルを用いて、健常者、RR-MS 患者、および SP-MS 患者の各 SNPs の頻度を比較し、非下垂体性 PRL と MS 病態との相関を解析する。

# 4. 研究成果

## ① 免疫細胞由来 PRL vs 下垂体由来の PRL

PRLRKO マウスの繁殖効率が予想をはるかに下回ったことから、一連の EAE 解析を実施するのに必要十分な個体数が確保できなかったことは誤算であった。代わりに、PRLR ヘテロマウスを用いて同様の実験を行ったところ、Eomes 陽性 Th 細胞の生成と後期 EAE 病態の軽度低下を認めた。引き続き PRLRKO マウスを用いた実験を継続している。一方、マウスに TRH を投与すると、確かに下垂体由来の PRL 産生は亢進したが、同時に抗原提示細胞由来の PRL 産生も亢進し、差別化を測ることができなかった。Eomes 陽性 Th 細胞の生成は TRH 投与により有意に亢進したが、EAE 病態の程度は有意な差を認めず、下垂体由来の PRL は EAE 病態に部分的に影響する可能性が考えられた。

## ② 他の自己免疫疾患におけるプロラクチンの作用

BXS<sup>B</sup>-Yaa マウスの発症前に PRL 阻害剤である bromocriptine を投与すると、自己抗体産生をはじめとする自己免疫病態が改善し、病原性 T 細胞の頻度も低下した。同マウスの血清中 PRL 濃度は、経時的に増加したが、発症前後に顕著な変動を示すことはなかった。同様に BXS<sup>B</sup>-Yaa マウスに L-dopa を投与した場合も、類似の効果が得られた。

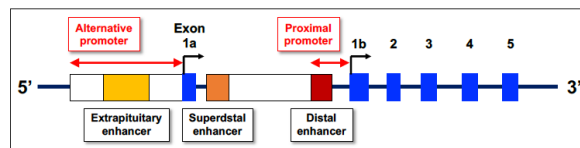
## ③ 自己反応性 Th 細胞に対する作用

NR4A2 が自己反応性 Th 細胞の制御因子であることを明らかにしており (EMBO Mol Med 2022)、期間内にこれを発表することができた。この自己反応性 T 細胞の生成過程における PRL の役割を明らかにしするために、上記の BXS<sup>B</sup>-Yaa マウスに TRH を投与し、自己反応性 T 細胞の頻度を定量したところ、有意な増加が認められた。一方、②に記載した bromocriptine を投与したマウスでは、自己反応性 T 細胞頻度が減少した。現在、EAE マウスを用いて同様の解析を進めている。

## ④ MS 患者サンプルを用いた解析

非下垂体性エンハンサー領域 (図参照) 内の SNPs による PRL 発現の違いが、MS の発症に与える影響を評価するために、当院受診の患者から IC 取得後にゲノムシーケンシングを行い、SNPs(rs1341239)の両アリルを保有するサンプルの取得を勧めたが、残念ながら調べた約 80 例はすべてドミナントアリルであった。その後、NCNP トランスレーショナルメディカルリサーチセンター由来の DNA サンプルを用いて同様の検討を行なったが、こちらも全てドミナントアリルであることが判明した。引き続き解析を進めているが、残念ながらこの解析については知見を得ることができなかった。

我々は、様々な自己免疫疾患モデルマウスを用いて、免疫細胞と下垂体に由来する PRL が、自己免疫疾患の発症と病原性 Th 細胞の生成に与える影響を解析し、抗原提示細胞をはじめとする免疫細胞由来の異所性 PRL が、自己免疫病態の形成に重要な役割を果たすことを明らかにした。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Fumio Takahashi, Chenyang Zhang, Hirohiko Hohjoh, Ben Raveney, Takashi Yamamura, Nobuhiro Hayashi, Shinji Oki	4. 巻 22(5)
2. 論文標題 Immune-mediated neurodegenerative trait provoked by multimodal derepression of long-interspersed nuclear element-1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.104278	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 Inoue Yukiko U., Morimoto Yuki, Yamada Mayumi, Kaneko Ryosuke, Shimaoka Kazumi, Oki Shinji, Hotta Mayuko, Asami Junko, Koike Eriko, Hori Kei, Hoshino Mikio, Imayoshi Itaru, Inoue Takayoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 An Optimized Preparation Method for Long ssDNA Donors to Facilitate Quick Knock-In Mouse Generation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1076 ~ 1076
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10051076	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 Raveney Ben J. E., Sato Wakiro, Takewaki Daiki, Zhang Chenyang, Kanazawa Tomomi, Lin Youwei, Okamoto Tomoko, Araki Manabu, Kimura Yukio, Sato Noriko, Sano Terunori, Saito Yuko, Oki Shinji, Yamamura Takashi	4. 巻 118
2. 論文標題 Involvement of cytotoxic Eomes-expressing CD4+ T cells in secondary progressive multiple sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2021818118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2021818118	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 Chenyang, Raveney Ben, Takahashi Fumio, Yeh Tzu-wen, Hohjoh Hirohiko, Yamamura Takashi, Oki Shinji	4. 巻 12
2. 論文標題 Pathogenic Microglia Orchestrate Neurotoxic Properties of Eomes-Expressing Helper T Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 868 ~ 868
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells12060868	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 Raveney Ben JE, El Darawish Yosif, Sato Wakiro, Arinuma Yoshiyuki, Yamaoka Kunihiro, Hori Shohei, Yamamura Takashi, Oki Shinji	4. 巻 14
2. 論文標題 Neuropilin 1 ( <span style="font-family: monospace;">&lt;scp&gt;NRP1&lt;/scp&gt;</span> ) expression distinguishes self reactive helper T cells in systemic autoimmune disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 e15864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/emmm.202215864	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7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大木伸司、張 晨陽、北條浩彦、Ben Raveney、山村 隆、林 宣宏、高橋文緒
2. 発表標題 神経変性疾患の病態形成に関わる免疫依存性神経細胞障害の分子機序
3. 学会等名 第33回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋文緒、山村 隆、大木伸司
2. 発表標題 免疫依存性神経細胞障害におけるレトロトランスポゾンLINE-1活性化の意義
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yeh Tzu-wen, Zhang Chenyang, Ben Raveney, Fumio Takahashi, Marco Prinz, Takashi Yamamura, Shinji Oki
2. 発表標題 Induction of Eomes-expressing Th cells via upregulation of type I interferon
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinji Oki, Ben Raveney, Fumio Takahashi, Takashi Yamamura, Chenyang Zhang
2. 発表標題 Disease-associated microglia as a pathogenic hub in immune cell-mediated neurodegeneration.
3. 学会等名 第64回 日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fumio Takahashi, Chenyang Zhang, Hirohiko Hohjoh, Ben Raveney, Takashi Yamamura, Nobuhiro Hayashi, Shinji Oki
2. 発表標題 Pathogenic mechanism of immune-mediated neurotoxicity and its relevance to neurodegenerative diseases.
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大木伸司、張 晨陽、山村 隆
2. 発表標題 神経変性病態における免疫依存性神経細胞障害機序の解明
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大木伸司、張 晨陽、山村 隆
2. 発表標題 神経変性病態に伴う慢性炎症環境の分子機序の解明
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2020年

## 〔図書〕 計4件

1. 著者名 大木伸司	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 12
3. 書名 創薬研究者・アカデミア研究者が知っておくべき最新の免疫学とその応用技術	

1. 著者名 大木伸司	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 7
3. 書名 実験医学増刊 Vol.39 No.15 神経免疫 メカニズムと疾患	

1. 著者名 大木伸司	4. 発行年 2021年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 7
3. 書名 臨床免疫・アレルギー科 第76巻第5号	

1. 著者名 大木伸司	4. 発行年 2020年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 7
3. 書名 臨床免疫・アレルギー科	

## 〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 自己免疫疾患阻害剤	発明者 大木 伸司、ベン・ レイバニー、山村 隆	権利者 国立研究開発法 人国立精神・神 経医療研究セン
産業財産権の種類、番号 特許、願2021-015868	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

二次進行型多発性硬化症の診療に有用な免疫学的バイオマーカーを確立  
<https://www.ncnp.go.jp/topics/2021/20210309p.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------