

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月2日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790816

研究課題名（和文）抗ミッドカインRNAアプタマーによる実験的自己免疫性脳脊髄炎抑制機序の解明

研究課題名（英文）Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by anti-midkine RNA aptamers.

研究代表者

菌部 佳史 (SONOBE Yoshifumi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・COE特任助教

研究者番号：20534845

研究成果の概要（和文）：本研究においては、抗ミッドカインRNAアプタマーによる実験的自己免疫性脳脊髄炎（Experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE）抑制機序の解明を目的として研究を行った。その結果、ミッドカインは制御性樹状細胞において、Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2 を介して IL-12 の産生を誘導させることで、制御性 T 細胞（Treg）の分化を抑制することが明らかとなった。また、EAE マウスに抗ミッドカイン RNA アプタマーを投与したところ、所属リンパ節における制御性樹状細胞及び Treg の数が上昇し、EAE の臨床症状が抑制された。さらにミッドカイン産生細胞について検討したところ、CD4 陽性 T 細胞をはじめとする様々な炎症細胞がミッドカインを産生することが明らかとなった。本研究から、ミッドカインは制御性樹状細胞における IL-12 の誘導を介して、Treg の分化を抑制していることが明らかとなった。したがって、抗ミッドカイン RNA アプタマーによる EAE の抑制メカニズムとして、制御性樹状細胞の誘導を介した Treg の誘導が関与しているものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated how midkine (MK) decreased regulatory CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells (Tregs) in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). DCreg expressed produced significantly less IL-12 compared with conventional DCs. However, MK induced IL-12 production by reducing phosphorylated STAT3 levels via src homology region 2 domain-containing phosphatase-2 in DCreg. Inhibiting MK activity with anti-MK RNA aptamers, which binds to the targeted protein to suppress the function of the protein, increased the numbers of CD11c^{low}CD45RB⁺ DCs and Treg in the draining lymph nodes, and suppressed the severity of EAE, an animal model of multiple sclerosis (MS). Our results also demonstrated that MK was produced by inflammatory cells, and in particular CD4⁺ T cells under inflammatory conditions. Taken together, these results suggest that MK aggravates EAE by suppressing DCreg development, thereby impairing the Treg population. Thus, MK is a promising therapeutic target for various autoimmune diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：多発性硬化症、神経免疫、制御性 T 細胞、樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) は多発性硬化症 (視力低下や四肢の麻痺を引き起こす原因不明の難治性の自己免疫疾患 (厚生労働省指定特定疾患)) の動物モデルである。多発性硬化症の発症機序の解明や治療法の開発は、主として EAE を用いて行われている。髄鞘に対して特異的に反応し、なおかつ、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor-alpha; TNF-alpha) や IL-17 をはじめとする炎症性サイトカインを産生する T 細胞である T Helper Type 1 (Th1) 細胞や Th17 細胞が、血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) を超えて、通常は免疫反応が起こらないとされている中枢神経系に浸潤し、炎症反応を引き起こすことが多発性硬化症の発症に重要な過程であると考えられている。

制御性 T 細胞 (Regulatory T cell: Treg) はヘルパー T 細胞のサブセットの一つである。Treg は炎症性 T 細胞の機能を抑制することで、多発性硬化症だけでなくクローン病や喘息のような自己免疫疾患の動物モデルにおいて臨床症状を抑制する。したがって、Treg を増加させることが多発性硬化症の治療法として非常に有効であると考えられる。

ミッドカインはガンの進展、神経細胞の生存と分化、炎症反応などの現象に関わるヘパリン結合性の成長因子である。我々は、先行研究において、RNA アプタマーを用いてミッドカインを阻害することにより CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 細胞 (Treg) の割合を増加させ、EAE を抑制することを見出した (Wang et al. Proc Natl Acad Sci USA 105: 3915-3920 2008)。その機序として、我々はこれまでに、ミッドカイン存在下において制御性樹状細胞により誘導された Treg の割合が有意に減少することが明らかとなった。これはミッドカインが制御性樹状細胞を抑制する可能性を示しているが、その正確なメカニズムについては、不明である。

2. 研究の目的

ミッドカインの Treg 分化に対する作用を検討し、さらに抗ミッドカイン RNA アプタマーによる EAE の抑制される機序を明らかにすることを目的とし研究を行った。

3. 研究の方法

未成熟樹状細胞及び制御性樹状細胞はそれぞれ、Midkine 存在下または非存在下において、C57BL/6 マウス由来骨髄細胞を GM-CSF (20 ng/ml) 単独及び GM-CSF (20 ng/ml)、IL-10 (20 ng/ml)、TGF-β (20 ng/ml) で 6 日間刺激することにより、未成熟樹状細胞及び制御性樹状細胞を誘導した。さらに、lipopolysaccharide (100 ng/ml) で 24 時間刺

激し成熟化させた。また、MACS ビーズにより精製した BALB/c マウス由来 CD4⁺CD25⁻T 細胞を、マイトマイシン C で処理した C57BL/6 マウス由来樹状細胞と 1:1 の割合でリコンビナント IL-12 (20 ng/ml), anti-IL-12p40 Abs (C17.8: 20 μg/ml) 及び SHP-2 阻害剤 (NSC87877) の存在下または非存在下において共培養し、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg の割合をフローサイトメトリーにより検討した。

さらに、抗ミッドカイン RNA アプタマーを 15 mg/kg で隔日投与した EAE マウスにおける制御性樹状細胞の動態についてフローサイトメトリーにより検討した。EAE マウスの所属リンパ節から CD11b⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD11c⁺陽性細胞を MACS ビーズにより単離し、ミッドカインの発現に関して RT-PCR 及び Western blotting により検討した。

なお、本実験は動物実験委員会の承認の下に遂行された。

4. 研究成果

ミッドカインで刺激された制御性樹状細胞における Treg 分化抑制効果は抗 IL-12 中和抗体を加えることにより抑制された。また、制御性樹状細胞により誘導される Treg の分化はリコンビナント IL-12 を加えることにより有意に抑制された。骨髄細胞をミッドカインで刺激することにより、脱リン酸化酵素である Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2 (SHP-2) が誘導された。ミッドカインで刺激された制御性樹状細胞におけるリン酸化 STAT3 の抑制、IL-12 の誘導、Treg 分化抑制のそれぞれの効果が、SHP-2 の阻害剤を加えることによりキャンセルされた。これらの結果から、ミッドカインは制御性樹状細胞において SHP-2 を介して IL-12 の産生を誘導し、Treg 分化の抑制を引き起こすものと考えられる。

また、PBS 投与群と比較して、RNA アプタマーを投与したマウスの所属リンパ節における CD11c^{low}CD45RB⁺樹状細胞の数及び制御性 T 細胞 (Regulatory T cell: Treg) の数は有意に増加した。一方で、EAE の発症に関与する IFN-γ 及び IL-17 産生 T 細胞の数は RNA アプタマー投与群において有意に減少した。さらに、EAE におけるミッドカイン産生細胞について検討したところ、マクロファージ、CD4 及び CD8 陽性 T 細胞がミッドカインを産生することが明らかとなった。さらに、CD4 陽性 T 細胞サブセット (Th1, Th2, Th17, Th9, Treg) ごとにミッドカインの発現について検討したところ、Th1 においてミッドカインの発現が最も誘導されることが明らかとなった。

したがって、CD4 陽性 T 細胞などの炎症細胞により産生されたミッドカインは、制御性樹状細胞の分化の抑制を介して Treg の分化

を抑制し、EAE の臨床症状を悪化させることが明らかとなった。ミッドカインを抑制することが自己免疫疾患の治療戦略として有効であることが示唆された。

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)

1. Parajuli B, Sonobe Y, Kawanokuchi J, Doi Y, Noda M, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A, Immunoglobulin G₁ immune complex upregulates interferon- γ induced nitric oxide production via ERK1/2 activation in murine microglia. *J Neuroimmunol* 244(1-2) 57-62 2012. (査読有り)

2. Sonobe Y, Li H, Jin S, Kishida S, Kadomatsu K, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A, Midkine inhibits inducible regulatory T cell differentiation by suppressing the development of tolerogenic dendritic cells. *J Immunol* 188(6) 2602-2611 2012. (査読有り)

3. Li E, Jin S, Sonobe Y, Ma D, Li H, Kawanokuchi J, Mizuno T, Suzumura A, The gap-junction inhibitor Carbenoxolone suppresses the differentiation of Th17 cells through inhibition of IL-23 expression in antigen presenting cells. *J Neuroimmunol* 240-241: 58-64 2011. (査読有り)

4. Mizuno T, Doi Y, Mizoguchi H, Jin S, Noda M, Sonobe Y, Takeuchi H, Suzumura A, Interleukin-34 selectively enhances the neuroprotective effects of microglia to attenuate oligomeric amyloid- β neurotoxicity. *Am J Pathol* 179: 2016-2027 2011. (査読有り)

5. Takeuchi H, Mizoguchi H, Doi Y, Jin S, Noda M, Liang J, Li H, Zhou Y, Mori R, Yasuoka S, Li E, Parajuli B, Kawanokuchi J, Sonobe Y, Sato J, Yamanaka K, Sobue G, Mizuno T, Suzumura A, Blockade of gap junction hemichannel suppresses disease progression in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's disease. *PLoS One* 6: e21108 2011. (査読有り)

6. Yasuoka S, Kawanokuchi J, Parajuli B, Jin S, Doi Y, Noda M, Sonobe Y, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A, Production and

functions of IL-33 in the central nervous system. *Brain Research* 1385: 8-17 2011. (査読有り)

7. Zhou Y, Sonobe Y, Akahori T, Jin S, Kawanokuchi J, Noda M, Iwakura Y, Mizuno T, Suzumura A, IL-9 promotes Th17 cell migration into the central nervous system via CC chemokine ligand-20 produced by astrocytes. *J Immunol* 186: 4415-4421 2011. (査読有り)

8. Hashiba N, Nagayama S, Araya S, Inada H, Sonobe Y, Suzumura A, Matsui M, Phenytoin at optimum doses ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis via modulation of immunoregulatory cells. *J Neuroimmunol* 233: 112-119 2011. (査読有り)

9. Li H, Sonobe Y, Tabata H, Liang J, Jin S, Doi Y, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A, Tumor necrosis factor- α promotes granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-stimulated microglia to differentiate into competent dendritic Clin Exp Neuroimmunol cell-like antigen-presenting cells. 2: 1-11 2011. (査読有り)

10. Noda M, Doi Y, Liang J, Kawanokuchi J, Sonobe Y, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A, Fractalkine attenuates excitotoxicity via microglial clearance of damaged neurons and antioxidant enzyme heme oxygenase-1 expression. *J Biol Chem* 286: 2308-2319 2011. (査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

1. 藪部佳史, 脳の innate immunity の視点から: 樹状細胞の役割 第 23 回日本神経免疫学会学術集会 平成 23 年 9 月 17 日 京王プラザホテル (東京)

2. 藪部佳史, 周妍, 赤堀友彦, 金世杰, 川ノ口潤, 野田万理子, 水野哲也, 錫村明生, IL-9 はアストロサイトの CCL-20 産生を介して Th17 の中枢神経への移行を誘導する. 第 23 回日本神経免疫学会学術集会 平成 23 年 9 月 15 日 京王プラザホテル (東京)

3. Sonobe Y, Li H, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A, Midkine exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis through suppressing expansion of regulatory dendritic cell. 10th

International Congress of
Neuroimmunology 2010.10.28. Barcelona,
Spain.

4. Sonobe Y, Li H, Takeuchi H, Mizuno T,
Suzumura A, Midkine exacerbates
experimental autoimmune
encephalomyelitis through suppressing
expansion of regulatory dendritic cell.
Neuroimmunology Kyoto Conference 2010
2010.8.19. ホテル京都ガーデンパレス (京
都)

[図書] (計 0 件)

[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]

ホームページ等

<http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/dhnc2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菌部佳史 (SONOBE Yoshifumi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・COE特
任助教

研究者番号：20534845

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし