

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390261

研究課題名(和文)腸内細菌依存性制御細胞による自己免疫制御に関する研究

研究課題名(英文)MAIT cells in autoimmune diseases

研究代表者

三宅 幸子 (Miyake, Sachiko)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：50266045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：膠原病をはじめとする自己免疫疾患においてMucosal-Associated Invariant T細胞(MAIT細胞)の動態や機能の解明を目的とした。MAIT細胞T細胞受容体に対するモノクローナル抗体の作製については、バキュロウィルス発現システムを用いTCR蛋白を合成後にマウスに免疫し、候補ハイブリドーマを得たので現在解析中である。また共同研究者から得たヒトMAIT細胞検出抗体を用いて解析し、全身性エリテマトーデス末梢血では、MAIT細胞の頻度が著しく減少していること、細胞増殖の低下とともに細胞死が増加していることを見いだした。自己免疫疾患患者の腸内細菌叢は現在解析中である。

研究成果の概要(英文)：Mucosal associated invariant T (MAIT) cells are restricted by MHC-related molecule -1(MR1) and express an invariant TCR chain. MAIT cells are selected in the thymus in an MR1-dependent manner, but, interestingly, MAIT cells require B cells as well as commensal flora for their peripheral expansion. We demonstrated that MAIT cells contribute to the arthritis severity of collagen induced arthritis and antibody induced arthritis, mostly by augmenting joint inflammation in the effector phase of arthritis. Furthermore, we showed that the frequency of MAIT cells in peripheral blood is reduced in patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis. The proliferative response of MAIT cells upon CD3 stimulation or cytokine stimulation was decreased in addition to the increase of apoptosis in lupus patients. The role of MAIT cells in lupus pathogenesis remains investigated.

研究分野：免疫学

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：MAIT細胞 自己免疫 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

腸管の表面積はテニスコートの約 1.5 倍にもものぼり、そこに存在するリンパ球は 10^{11} 個にもおよぶ最大の免疫組織でもある。また、腸管は常に食物の摂取などを通して外来抗原に接するうえに、500 種以上の 100 兆個にも達する腸内細菌叢（腸内フローラ）と共存するなど独特な環境にある。腸内フローラが、免疫反応に与える影響については、免疫組織の発達はもとより、アレルギー疾患との関連も示唆されてきた。関節炎においては、バンコマイシンなどの抗生剤や *Lactobacillus GG* などのプロバイオティクスを投与すると病態が軽減することが示されている。腸管には、 $\gamma\delta$ T 細胞、iNKT 細胞、Mucosal Associated Invariant T (MAIT)細胞、NK 細胞をはじめ様々な自然リンパ球や免疫制御性細胞が存在している。MAIT 細胞は、ヒト CD4-CD8 の Double Negative (DN)T 細胞を解析する過程で、iNKT 細胞とともにインバリアント $V\alpha 7.2i$ T 細胞受容体 (TCR)をもつ T 細胞として報告され、腸管粘膜固有層やパイエル板に多く存在し、その発生が 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。これまで我々は、iNKT 細胞、MAIT 細胞などの自然リンパ球による自己免疫制御に関する研究を行い、MAIT 細胞については、動物モデルでは実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) では病態抑制細胞として機能するが、関節炎モデルでは iNKT 細胞、MAIT 細胞はともにエフェクターとして機能することを明らかにした。このように、iNKT 細胞、MAIT 細胞は、自己免疫病態にとって病態抑制と病態増悪という相反する機能を併せ持つ細胞であり、

これらの細胞の機能がどのように調節されているかは重要な課題である。これらの細胞の調節因子のひとつとして、腸内細菌が考えられている。腸内細菌の主要な菌の一つである *Bacteroides* は、iNKT 細胞のリガンドとなりうる α -galactosylceramid を産生することが報告されている。また、MAIT 細胞の増殖は腸内細菌に依存することが報告されていたが、近年、腸内細菌の産生するビタミン合成の中間代謝産物がリガンドとなることが明らかにされた。これらのリガンドの量や性質によって iNKT 細胞や MAIT 細胞の数やサイトカイン産生が調節されていることが想定されている。

2. 研究の目的

MAIT 細胞は、腸管に多く存在する自然リンパ球と考えられていたが、2009 年の Lantz らの報告により、ヒト末梢血においても $\alpha\beta$ T 細胞の数%をしめる細胞群であることがわかり、免疫応答に重要であることが示唆された。MAIT 細胞のヒトの自己免疫病態における役割は不明であるため、ヒト MAIT 細胞の検出抗体の作製により、膠原病をはじめとする自己免疫疾患における MAIT 細胞の動態や機能を解明する。また、MAIT 細胞の調節因子として、腸内細菌解析にとりくみ、病因解明や新規治療法開発の基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

まず MAIT 細胞 T 細胞受容体を認識するモノクローナル抗体を作製する。バキュロウィルス発現システムを用いて TCR ($V\alpha 7.2-V\beta 13$) 蛋白を合成し、Balb/c マウスに免疫し、ハイブリドーマを作成する。

膠原病との関連性を確認するため、患者検体の MAIT 細胞の解析を行う。頻度については、 $CD3^+ \gamma\delta TCR-V\alpha 7.2 TCR^+ CD161^{bright}$ 頻細胞を MAIT 細胞としてフローサイトメトリーを用いて測定した。サイトカイン産生については、培養上清を ELISA 法により測定、もしくは細胞内サイトカイン染色を行いフローサイトメトリーを用いて測定した。細胞増殖は、細胞を carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)を用いてラベルし、フローサイトメトリーを用いて検出した。細胞死については、活性化 Caspase3、Fas、7AAD の発現をフローサイトメトリーを用いて測定した。腸内細菌が MAIT 細胞の重要な調節因子となるという仮説に基づき、腸内細菌の 16S RNA 解析ならびにメタゲノム解析を行い、これら自然リンパ球の解析と組み合わせで検討する。疾患による特定の細菌群の変化、MAIT 細胞と関連のみられる細菌の特定を目指す。

4 . 研究成果と考察

MAIT 細胞 T 細胞受容体に対するモノクローナル抗体の作製については、数クローンの候補を得て現在解析中したが、MAIT 細胞の TCR(MAIT-TCR)を強制発現させた CHO 細胞は染色可能であったが、末梢血の MAIT 細胞の検出は困難であった。そこで、ヒト T 細胞系のセルラインである Jurkat 細胞に MAIT-TCR を強制発現させた細胞を作製、その細胞とペプチドを免疫する方法で現在スクリーニング中である。その間、共同研究者から得たヒト MAIT 細胞を検出できる抗体を用いてヒト MAIT 細胞についての検討を行った。MAIT 細胞は、健常人では末梢血 $\alpha\beta T$ 細胞の数パーセントを占める細胞であり、主に CD8 も

しくは $CD4, CD8$ double negative であった。サイトカインは $IFN-\gamma$, $IL-17$ などを産生し、ケモカイン受容体では $CCR5$, $CCR6$ を発現していた。関節リウマチ患者末梢血では、頻度の減少がみられた。さらに全身性エリテマトーデス(SLE)末梢血では、MAIT 細胞の頻度が著しく減少していた。SLE においては、抗 $CD3$ 抗体による細胞増殖の低下、 $IL-15$ による細胞増殖の低下がみられた。さらに、活性化 Caspase3、Fas、7AAD の発現上昇がみられ、細胞死が亢進していることが示唆された。血中 IFN との相関は認めなかった。SLE における細胞増殖の低下、細胞死の亢進は、疾患活動性によらずにみられ、ステロイド投与との相関もなく、その原因については現在検討中である。自己免疫疾患患者の腸内細菌叢の解析については、16S RNA 解析に加え、メタゲノム解析を行っている。現在まだ解析途中であるが、腸疾患でみられるような菌の多様性の消失はみられないものの、特定の菌種における差が示唆されている。今後症例数を増やして健常人と有為差のある菌の特定を行うと同時に、MAIT 細胞頻度と相関のある菌種の同定を行う予定である。また MAIT 細胞はその増殖は腸内細菌に依存しており、腸内細菌の産生するビタミンの中間代謝産物が抗原となることが報告されている。我々は、MAIT 細胞の抗原についても、既報の者に加えて新たな抗原の探索を行っている。MAIT-TCR を強制発現した Jurkat 細胞を用いて、各種細菌への反応を確認するとともに、抗原の精製に取り組んでおり、今後自己免疫動物モデルなどを用いて、MAIT 細胞刺激による病態調節などの研究を進展させる予定である。

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 16件)

1) 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

2) Miyazaki Y, Miyake S, Chiba A, Lantz O, Yamamura T: Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. **Int Immunol** 23(9):529-535, 2011

3) Chiba A, Tajima R, Tomi C, Miyazaki Y, Yamamura T, Miyake S: Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. **Arthritis Rheum** 64(1):153-61, 2011

4) Ichikawa D, Mizuno M, Yamamura T, Miyake S: Gene related to anergy in lymphocytes (GRAIL) regulates cytoskeletal reorganization thorough ubiquitination and degradation of Arp2/3-5 and coronin A. **J Biol Chem** 286(50):43465-74, 2011

5) Chiba A, Tajima R, Tomi C, Miyazaki Y, Yamamura T, Miyake S: Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. **Arthritis Rheum** 64:153-61, 2012

6) Chiba A, Mizuno M, Tomi C, Tajima R, Alloza I, di Penta A, Yamamura T, Koen Vandebroek, Miyake S: A 4-trifluoromethyl analogue of celecoxib inhibits arthritis by suppressing innate immune cell activation. **Arthritis Res Ther** 14:R9, 2012

7) Toba T, Murata K, Futamura J, Nakanishi K, Takahashi B, Takemoto N, Tomino M, Nakatsuka T, Imajo S, Goto M, Yamamura T, Miyake S, Annoura H. Synthesis and biological evaluation of truncated a-galactosylceramide

derivatives focusing on cytokine induction profile. **Bioorg Med Chem** 20:2850-2859, 2012

8) Araki M, Aranami T, Matsuoka T, Nakamura M, Miyake S, Yamamura T. Clinical improvement in a patient with neuromyelitis optica following therapy with the anti-IL-6 receptor monoclonal antibody tocilizumab. **Mod Rheum** Epubb ahead.

9) Sato W, Tomita A, Ichikawa D, Lin Y, Kishida H, Miyake S, Ogawa M, Okamoto T, Murata M, Kuroiwa Y, Aranami T, Yamamura T. CCR2+CCR5+ T cells producing matrix metalloproteinase-9 and osteopontin in the pathogenesis of multiple sclerosis. **J Immunol** 189:5057-5065, 2012

10) Noto D, Sakuma H, Takahashi K, Yamada M, Yamamura T, Miyake S. Development of a culture system to induce microglia-like cells from hematopoietic cells. **Neuropathol Appl Neurobiol** (Epub ahead), 2013

11) Chihara N, Aranami T, Oki S, Matsuoka T, Nakamura M, Kishida H, Yokoyama K, Kuroiwa Y, Hattori N, Okamoto T, Murata M, Toda T, Miyake S, Yamamura T. Plasmablasts as migratory IgG-producing cells in the pathogenesis of neuromyelitis optica. **PLOS one** 8(12):e83036, 2013

12) Di Penta A, Chiba A, Alloza I, Wyssenbach A, Yamamura T, Villoslada P, Miyake S, Vandebroek K. A trifluoromethyl analogue of celecoxib exerts beneficial effects in neuroinflammation. **PLOS one** 8(12):e83119, 2013

13) Araki M, Matsuoka T, Miyamoto K, Kusunoki S, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Aranami T, Yamamura T. Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica: A pilot study. **Neurology, in press**

14) Kamachi F, Harada N, Usui Y, Sakanishi T, Ishii N, Okumura K, Miyake S, Akiba H. OX40

lignad regulates splenic CD8+ dendritic cell-induced Th2 responses in vivo. **Biochem Biophys Res Commun, in press.**

15) akamura M, Matsuoka T, Chihara N, Miyake S, Sato W, Araki M, Okamoto T, Lin Y, Ogawa M, Murata M, Aranami T, Yamamura T. Differential effects of fingolimod on B-cell populations in multiple sclerosis. **Mult Scler, in press.**

[学会発表](計 45件)

- 1) Miyake S. Innate lymphocytes in autoimmune diseases. Autoimmunity Congress Asia. Singapore, 18 November, 2011
- 2) Miyake S. Innate lymphocytes in autoimmune diseases. 8th International Congress on Autoimmunity, Granada, Spain, 10 May, 2012
- 3) Miyake S. MAIT cells in autoimmune diseases. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 12th Annual Meeting, Vancouver, Canada, 20 June, 2012
- 4) Miyake S. Regulation of autoimmune responses in multiple sclerosis. Joint Symposium MPI of Psychiatry and NCNP (Japan), Munich, Germany, 4 October, 2012
- 5) Chiba A, Tamura N, Matsudaira R, Yamamura T, Takasaki Y, Miyake S: Mucosal associated invariant T cells are inactivated by IFN α and reduced in systemic lupus erythematosus. American College of Rheumatology 75th Annual Scientific Meeting, Washington DC, November 13, 2012
- 6) Chiba A, Mizuno M, Tomi C, Tajima R, Alloza I, di Penta A, Yamamura T, Koen Vandebroek, Miyake S: A 4-trifluoromethyl analogue of celecoxib inhibits arthritis by suppressing innate immune cell activation. **Arthritis Res Ther** 14(1):R9, 2012 Miyake S. Gut regulates autoimmunity. Autoimmunity Congress Asia, Hong Kong, 21 October, 2013
- 7) Araki M, Matsuoka T, Aranami T,

Nakamura M, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Yamamura T. Clinical Efficacy of Anti-IL-6 Receptor Monoclonal Antibody Tocilizumab in Patients with Neuromyelitis Optica. PACTRIMS 2013, Kyoto, Japan, 11.7, 2013

- 8) Nakamura M, Matsuoka T, Araki M, Lin Y, Sato W, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Aranami T, Yamamura T. IL-6 Signaling As a Potential Therapeutic Target In Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis with An Increased Plasmablast Frequency. PACTRIMS 2013, Kyoto, Japan, 11.6, 2013
- 9) Kadowaki A, Miyake S, Chiba A, Yamamura T. Myelin Specific T Cells in the Gut Regulate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). PACTRIMS 2013, Kyoto, Japan, 11.6, 2013
- 10) 三宅幸子: 自己免疫疾患における MAIT 細胞. 第 39 回日本臨床免疫学会総会・学術集会 6 学会合同特別シンポジウム、東京、9 月 16 日、2011
- 11) 三宅幸子: 腸管免疫の視点から: 腸管リンパ球と多発性硬化症. 第 23 回日本神経免疫学会総会、東京、9 月 17 日、2011
- 12) 千葉麻子、三宅幸子: マスト細胞の活性阻害を介した関節炎の抑制. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会、神戸、7.19, 2011
- 13) 千葉麻子、田村直人、松平欄、頭山尚子、高崎芳成、山村隆、三宅幸子: 膠原病における Mucosal-associated invariant T 細胞の解析. 第 39 回日本臨床免疫学会総会・学術集会、東京、9.17, 2011
- 14) 山村隆、荒浪利昌、大木伸司、三宅幸子: 多発性硬化症: 自己免疫病仮説の再検証. 第 39 回日本臨床免疫学会総会・学術集会 6 学会合同特別シンポジウム、東京、9.16, 2011
- 15) 千葉麻子、田村直人、松平欄、高崎芳成、山村隆、三宅幸子: 膠原病における Mucosal-associated invariant T 細胞の解析. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、千葉、11.27, 2011

- 16) 三宅幸子 : 自然リンパ球と自己免疫. 第56回日本リウマチ学会, 東京, 4月27日, 2012
- 17) 三宅幸子 : MAIT細胞と自己免疫. 第40回日本臨床免疫学会シンポジウム, 東京, 9月27日, 2012
- 18) 三宅幸子 : 自己免疫と腸管免疫・腸内免疫. 第27回日本臨床リウマチ学会シンポジウム, 神戸, 11月24日, 2012
- 19) Chiba A, Naoto T, Hayashi E, Matsudaira R, Toyama S, Takasaki Y, Miyake S : Mucosal associated invariant T cells in patients with autoimmune diseases. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 4.26, 2012
- 20) 千葉麻子, 田村直人, 松平蘭, 高崎芳成, 山村隆, 三宅幸子 : Mucosal-associated invariant T細胞の抗原非特異的活性化機序の解析, 第40回日本臨床免疫学会, 東京, 9.27, 2012
- 21) NAKAMURA Masakazu, ARANAMI Toshimasa, MIYAKE Sachiko, YAMAMURA Takashi : The effect of fingolimod on B cell subsets in peripheral blood of the patients with multiple sclerosis. 第41回日本免疫学会総会・学術集会, 神戸, 12.5, 2012
- 22) CHIBA Asako, YAMAMURA Takashi, MIYAKE Sachiko : Cytokine mediated activation of Mucosal-associated invariant T cells. 第41回日本免疫学会総会・学術集会, 神戸, 12.7, 2012
- 23) 三宅幸子 : 腸管免疫による自己免疫調節. 第41回日本臨床免疫学会シンポジウム, 下関, 11月28日, 2013
- 24) Nakamura M, Araki M, Lin Y, Sato W, Miyake S, Aranami T, Yamamura T: Multiple sclerosis patients with an increased plasmablast frequency may respond to IL-6R blocking therapy. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.11, 2013
- 25) Chiba A, Tamura N, Yamamura T, Takasaki Y, Miyake S: Reduced cell proliferation and enhanced cell death of MAIT cells in systemic lupus erythematosus. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.11, 2013
- 26) Kadowaki A, Miyake S, Chiba A, Yamamura T: Auto-reactive T cells in the gut regulate autoimmunity. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.12, 2013
- 27) Saika R, Sakuma H, Noto D, Yamamura T, Miyake S: IL-34 induces differentiation of microglia-like cells from bone marrow lineage-negative cells and monocytes. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.11, 2013
- 28) Shimano K, Satoh M, Okuno H, Suzan G, Miyake S, Yamamura T, Ogura H, Iwabuchi K: Atherosclerotic lesion development in MR1/apolipoprotein E-deficient mice. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.11, 2013
- 29) Lin Y, Miyake S, Yamamura T: Dominancy of encephalitogenic peptide itself directs sustainable regulation of a model of multiple sclerosis: autoimmune vaccination. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.12, 2013
- 30) Kamachi F, Harada N, Nishiyama C, Izawa K, Kitaura J, Okumura K, Miyake S, Akiba H. Soluble form of tiM-4 regulates mast cell activation by binding to LMIR5 and TIM-3. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.12, 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅幸子 (MIYAKE, Sachiko)

順天堂大学医学研究科 教授

研究者番号 : 50266045