

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590108

研究課題名(和文)自己免疫疾患の炎症病態形成・維持に関わる細胞間相互作用の研究

研究課題名(英文)Analyses of cellular component involved in heterogeneous inflammatory pathogenesis of autoimmune diseases in the CNS

研究代表者

大木 伸司 (OKI, SHINJI)

独立行政法人国立精神・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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：オーファン核内受容体NR4A2が自己免疫病態に関わるTh17細胞の制御分子であることを明らかにした。Th17細胞は自己免疫応答の引き金となるため、NR4A2欠損マウスの解析を通じて、新規に樹立したNR4A2欠損マウスの解析を行った。中枢神経系に浸潤した炎症性ミエロイド細胞とT細胞との相互作用が、T細胞のNR4A2発現に必須であること、Th17細胞の除去により炎症性ミエロイド細胞の中枢神経系への集積が減弱することを明らかにした。またNR4A2欠損マウスのEAE解析から、Th17細胞非依存性の持続進行型病態の存在が明らかとなり、多様性を示す多発性硬化症の病態を反映する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that NR4A2 influences Th17 differentiation and controls pathogenic Th17 responses in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and multiple sclerosis. The prolonged NR4A2 expression in the central nervous system (CNS) is induced by a particular populations of inflammatory myeloid cells (IMC) isolated from the CNS during EAE and drive differentiation of Th17 cells. EAE symptoms in NR4A2cKO mice are greatly reduced concomitant with reduced infiltration of such IMC. Intriguingly, a late/chronic disease irrelevant of NR4A2-mediated Th17 responses emerged in those animals. A unique CD4+ T cell subset accumulated in CNS shows a typical pathogenic property. A specific marker gene upregulated in this Th cell subset is identified. Treatment with siRNA in vivo suppressed the late/chronic symptoms of EAE. Strikingly, human counterpart of this Th cell subset is remarkably increased in the peripheral blood from a particular subtype of MS patients.

研究分野：免疫

キーワード：自己免疫疾患 多発性硬化症 Th17細胞 NR4A2 細胞間相互作用 炎症性ミエロイド細胞 病態多様性
バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (MS) は、慢性の病態を伴う代表的な炎症性自己免疫疾患の一つであり、中枢神経系 (CNS) に多発性の炎症性病変を呈し、長期にわたって再発と寛解を繰り返す難病である。MS の初期病態形成には、髄鞘に分布するミエリン関連抗原に対する T 細胞依存性の自己免疫応答を介した脱髄が生じる。MS 病態の全容を理解し、有効な治療法への手がかりを得るためには、自己免疫応答と慢性炎症応答の相互作用を、細胞レベルおよび分子レベルで解明することが必須である。また MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)、とくにミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) ペプチドを免疫する C57BL/6 マウスの EAE では、単相性の病態中に自己免疫応答と慢性炎症応答を含む様々な生体応答が混在しており、それぞれの成立機序を詳細に解析することが、治療法開発に有用な研究成果を得るためには重要と考えられる。我々は、オーファン核内受容体 NR4A2 が自己免疫病態に関わる Th17 細胞の制御分子であることを明らかにし、NR4A2 欠損マウスの解析に着手した。Th17 細胞は自己免疫応答の引き金となるため、NR4A2 欠損マウスの解析を通じて、複雑に絡み合う自己免疫応答と非特異的な炎症応答の解明が期待される。

2. 研究の目的

寛解期 MS 患者より採取した末梢血 T 細胞の DNA マイクロアレイ解析から患者末梢血中で健常人に比して有意に発現が亢進するオーファン核内受容体 NR4A2 は、EAE や実験的自己免疫性ブドウ膜炎 (EAU) などの実験的自己免疫モデルの末梢血 T 細胞および標的臓器に浸潤 T 細胞でも発現が亢進し、とくに自己免疫応答に密接に関わるインターロイキン 17 (IL-17) 産生細胞に限って認められる。さらに NR4A2 特異的 siRNA 処理により、*in vitro* の Th17 細胞分化、および *in vivo* の EAE 病態形成が有意に抑制されることから、この分子が Th17 細胞機能の調節を介して自己免疫病態形成に関与することが示唆される。Th17 細胞を含む免疫応答は、主に病態形成初期に誘導され、その後非特異的な炎症を伴う生体応答が遷延化するものと考えられる。よって NR4A2 を操作することにより、複雑に絡み合った自己免疫応答と非特異的な炎症応答を分離して解析することが可能となると考えられた。我々は、オーファン核内受容体 NR4A2 が自己免疫病態に関わる Th17 細胞の制御分子であることを明らかにし、新規に樹立した NR4A2 欠損マウスの解析に着手した。Th17 細胞は自己免疫応答の引き金となるため、本研究では NR4A2 欠損マウスの解析を通じて、複雑に絡み合う自己免疫応答と非特異的な炎症応答の解明を目的とした。

3. 研究の方法

ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) 由来ペプチド (MOG35-55) をフロイント完全アジュバントと混合して得たエマルジョンを、C57BL/6J (B6) マウス皮下に免疫することで、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導した。EAE を発症したマウスから末梢血、リンパ節と脾臓を回収し、分散後フローサイトメーターを用いてヘルパー T 細胞をソーティングした。EAE マウスの脳および脊髄をコラゲナーゼおよび DNase I で処理した後にパーコール密度勾配遠心法で単核球を分画し、浸潤細胞をソーティングした。分離した T 細胞のサイトカイン産生と各種遺伝子発現を、定量 PCR、Suspension Array、Gene Chip、ELISA などを用いて解析した。マウス脾臓から分離したナイーブ T 細胞に、Nucleofector (Amaxa 社) を用いて NR4A2 特異的 siRNA を導入し、*in vitro* の Th17 細胞誘導条件 (IL-6 + TGF- β) 下に固相化抗 CD3 抗体で刺激培養した後の上清中の IL-17 産生を、ELISA 法あるいは細胞内サイトカイン染色法を用いて定量した。さらに同条件で培養した T 細胞における、c-maf、IL-21、IL-23 受容体、および NR4A2 と ROR γ t の発現を、それぞれ定量 PCR 法を用いて経時的に比較した。コラーゲンマトリクスに封入して安定化させた siRNA を、EAE を誘導した B6 マウスに静脈投与して、病態抑制効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、ヒトを対象とする医学系研究に対する倫理指針に基づいて作成した実験計画書をセンター内の倫理委員会提出し、その承認を受けた上で研究を行った。インフォームドコンセントを得た上で、患者あるいは健常人の末梢血を採取した。また本研究においては、あらかじめ当研究所の動物実験規定に沿って作成した実験計画書を提出し、実験動物委員会の承認を受けた実験方法に従って、研究を進めた。

4. 研究成果

NR4A2 は、即時型遺伝子 (immediate early gene) であり、*in vitro* で抗 CD3/CD28 抗体刺激したナイーブ T 細胞では刺激後 2 時間以内に一過性の NR4A2 発現が認められる。一方、EAE マウスにおける自己反応性 T 細胞では、より長時間持続する NR4A2 発現が認められる。その分子基盤は不明である。T 細胞受容体刺激は NR4A2 発現を誘導するが、他にも様々な細胞で認められる NR4A2 発現は、ホルモンや神経伝達分子などの生理活性物質、炎症性メディエーター、感染やストレス負荷を含む多彩な刺激で誘導される。EAE マウスの解析から、発症期 (~day10) の CNS 浸潤 T 細胞で最初の NR4A2 発現誘導がおきることから、標的臓器の環境が持続的な NR4A2 発現に関わる可能性を想定し、CNS への集積が見られるマクロファージ、樹状細胞、好中球などを含む炎症性ミエロイド系細胞 (IMC) の関与を検討した。その結果、EAE マウスの CNS 由来 IMC

との共培養により、抗 CD3 抗体刺激したナイーブ T 細胞の持続的な NR4A2 発現と選択的な IL-17 産生が誘導されることが明らかとなった。MOG ペプチド誘導性 EAE では、自己反応性 T 細胞が純粋なイニシエーターとして自己免疫応答を誘導し、IMC の集積と炎症反応を引き起こすと考えられる。一方上記の結果から、集積した IMC は T 細胞と相互作用することで NR4A2 発現を誘導し、選択的な IL-17 産生細胞への分化を促進する。よって、急性期には MOG ペプチドの免疫により CNS に浸潤した自己反応性 T 細胞が、二次的な IMC の集積を促し、炎症反応の遷延化とともに T 細胞の NR4A2 発現を誘導する。一方寛解期には、比較的短命の IMC は炎症の終息に伴って CNS 内から消失する一方で、NR4A2 陽性 T 細胞は末梢へと移行し、より長期間にわたって自己反応性 T 細胞プールを形成する。さらに自己抗原への再暴露を含む様々な刺激による T 細胞の再活性化により、NR4A2 陽性 T 細胞が CNS に再度浸潤し、これに伴って CNS への IMC の浸潤が誘導され、病態の再発が誘導されると考えられる。さらに、CD4-Cre マウスと NR4A2(f1/f1) マウスを交配して樹立した NR4A2-cKO マウスの解析から、T 細胞の NR4A2 欠損により、EAE 発症時の CNS への IMC の浸潤が有意に抑制された。CNS には様々なミエロイド細胞が浸潤することから、今後 IMC の本体を同定し、炎症ループ形成への関与を解析して行く必要があると考えている(論文投稿準備中)。

さらに NR4A2cKO マウスの EAE では、Th17 細胞機能が顕著に抑制され、初期の EAE 病態が有意に軽症化する一方、EAE 誘導後期に急激な病態形成が認められたことから、MOG ペプチド誘導性の C57BL/6 マウスの単相性 EAE には、NR4A2 依存性の初期病態と NR4A2 非依存性の後期病態の異なる 2 相が併存することが示された。NR4A2cKO の後期 EAE 発症時に中枢神経系に浸潤した細胞群を分離し、GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った結果、Th17 細胞とは全く異なるユニークな T 細胞サブセットと、同サブセットが選択的に発現するマーカー遺伝子の同定に成功した。このマーカー遺伝子に対する siRNA を NR4A2cKO に in vivo 投与したところ、後期 EAE 病態が有意に軽症化したことから、このマーカー遺伝子が後期 EAE 病態の治療標的であることが示された。後期 EAE を発症した NR4A2cKO マウスの中枢神経系より分離したヘルパー T 細胞を移入することにより、EAE 発症前の NR4A2cKO に急性の EAE を誘導することができた。一方、ナイーブ C57BL/6 マウスには EAE が誘導できないことから、EAE 発症前の NR4A2cKO では、炎症性細胞の浸潤をとともなう持続的な炎症環境の維持が、後期 EAE 発症の必要条件であること、およびこのサブセットが後期 EAE の病態に関わる病原性 T 細胞である可能性が示された(論文投稿中)。

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4件)

Shinji Oki; Towards understanding the role of orphan nuclear receptor NR4A2 in Th17 cell-mediated CNS autoimmunity: An experimental approach employing an animal model of multiple sclerosis. *Clin. Exp. Neuroimmunol.* (査読なし) 5, 137-148 (2014)
The Japanese Society for Neuroimmunology
doiなし

大木伸司、山村 隆; 多発性硬化症の動物モデル - 横断的アプローチによる病態解明と治療標的の探索 - 日本臨床 (日本臨床社) (査読なし) 第 72 巻 第 11 号 1935-1940, (2014)
doiなし

Ben Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura; Nuclear Receptor NR4A2 Orchestrates Th17 Cell-Mediated Autoimmune Inflammation via IL-21 Signalling. *PLOS ONE*. (査読あり) 8(2): e56595. (2013)
doi: 10.1371/journal.pone.0056595

Norio Chihara, Toshimasa Aranami, Shinji Oki, Takako Matsuoka, Masakazu Nakamura, Hitaru Kishida, Kazumasa Yokoyama, Yoshiyuki Kuroiwa, Nobutaka Hattori, Tomoko Okamoto, Miho Murata, Tatsushi Toda, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura; Plasmablasts as migratory IgG-producing cells in the pathogenesis of neuromyelitis optica. *PLOS ONE*. (査読あり) 8(12): e83036. (2013)
doi: 10.1371/journal.pone.0083036

[学会発表](計13件)

Ben Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura; NR4A2 modulation during autoimmune inflammation of the central nervous system reduces pathogenic T cell responses and ameliorates clinical disease. The 12th International Congress of Neuroimmunology, Mainz Germany, Nov. 11th-14th, 2014

Ben Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura; NR4A2 controls pathogenic 'switched' Th17 cells in the CNS during autoimmune inflammation. 第 43 回 日本免疫学会総会・学術集会 京都 12 月 10 日-12 日 2014 年

Ben Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura; NR4A2 modulation during

autoimmune inflammation of the central nervous system reduces pathogenic T cell responses and ameliorates clinical disease

6th Congress of the Pan-Asian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (PACTRIMS), Kyoto, Nov. 6th-8th, 2013

Ben Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura: NR4A2 controls distinct populations of Th17, 13th Annual Conference of FOCIS (FOCIS2013), Vancouver, Jun. 20th-23rd, 2013

Ben Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura: NR4A2 controls Th17-mediated autoimmunity

第 42 回 日本免疫学会総会・学術集会 幕張 12月11日-13日 2013年

大木伸司、ベン・レイバニー、山村 隆：病原性 IL-17 産生細胞の NR4A2 発現維持に関わる細胞間相互作用

第 25 回 日本神経免疫学会総会・学術集会 下関 11月27日-29日 2013年

大木伸司、ベン・レイバニー、山村 隆：中枢神経系の炎症性自己免疫病態形成に関わる病原性 T 細胞群の解析

第 41 回 日本臨床免疫学会総会・学術集会 下関 11月27日-29日 2013年

Ben Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura: NR4A2 controls Th17-mediated autoimmunity

12th Annual Conference of FOCIS (FOCIS2012), Vancouver, Jun. 20th--23rd, 2012

Norio Chihara, Toshimasa Aranami, Shinji Oki, Takako Matsuoka, Masakazu Nakamura, Hitaru Kishida, Kazumasa Yokoyama, Yoshiyuki Kuroiwa, Nobutaka Hattori, Tomoko Okamoto, Miho Murata, Tatsushi Toda, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura: Activated Plasmablasts Migrate to the Central Nervous System

12th Annual Conference of FOCIS (FOCIS2012), Vancouver, Jun. 20th--23rd, 2012

Ben Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura: Acute autoimmune inflammation of the central nervous system by IL-17-secreting T cells is controlled by NR4A2

The 10th International Congress of Neuroimmunology, Boston, Nov. 4th-8th, 2012

大木伸司、ベン・レイバニー、山村 隆：中枢神経系の炎症性自己免疫病態形成に関わる IL-17 産生性 T 細胞群の解析 第 24 回 日本神経免疫学会学術集会、Sep, 20th-21st, 2012

Shinji Oki, Ben Raveney, Takashi Yamamura: Acute autoimmune inflammation of the central nervous system by IL-17-secreting T cells is controlled by NR4A2 International Symposium on Glyco-minded Biology of Diseases as a Basis of Pharmaceutical Sciences、Nov.30th-Dec.1st, 2012

Ben Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura : NR4A2 controls Th17-mediated autoimmunity 第 41 回 日本免疫学会総会・学術集会、神戸 Dec. 5th-7th, 2012

〔図書〕(計 1 件)

Shinji Oki, Ben Raveney, Takashi Yamamura; Versatile Orphan Nuclear Receptor NR4A2 as a Promising Molecular Target for Multiple Sclerosis and Other Autoimmune Diseases. In: *Chembiomolecular Science: At the Frontier of Chemistry and Biology*, 2012: Editor M. Shibasaki, M. Iino, H. Osada, Springer, Tokyo, Japan, p.193-200 (2012)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：進行型免疫性脱髄疾患治療剤
発明者：**大木伸司**、北條浩彦、山村 隆
権利者：独立行政法人国立精神・神経医療研究センター
種類：特許
番号：特願 2 0 1 4 - 1 3 5 6 3 0
出願年月日：平成 2 6 年 7 月 1 日
国内外の別：国内

名称：進行型免疫性脱髄疾患治療剤
発明者：**大木伸司**、山村 隆
権利者：独立行政法人国立精神・神経医療研究センター
種類：特許
番号：特願 2 0 1 5 - 6 1 4 2
出願年月日：平成 2 7 年 1 月 1 5 日
国内外の別：国内

取得状況 (計 1 件)

名称：siRNA、この siRNA を発現する組換えベクター、NR4A2 遺伝子発現抑制剤、IL-17 遺伝子発現抑制剤、および、CD4 陽性 T 細胞増殖抑制剤
発明者：**大木伸司**、北條浩彦、三宅幸子、山村隆

権利者：財団法人ヒューマンサイエンス振
興財団
種類：特許
番号：特許第 5098033 号
出願年月日：2008 年 2 月 28 日
取得年月日：2012 年 10 月 05 日
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大木 伸司 (OKI, Shinji)
独立行政法人国立精神・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：5 0 2 6 0 3 2 8

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし