

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293234

研究課題名(和文) 腸管免疫による自己免疫制御法の開発

研究課題名(英文) Gut immunity in the regulation of 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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患の発症と進展には遺伝的要因に加え環境要因が重要である。近年、環境要因の一つとして腸内環境が注目されている。髄鞘蛋白であるMOGに特異的に反応するT細胞受容体のトランスジェニックマウスを用い、腸管に存在する自己応答性T細胞が実験的自己免疫性脳脊髄炎をLAG3分子を介して抑制することを見出した。また、自然リンパ球として腸管粘膜に豊富に存在するMAIT細胞に注目し、様々な免疫疾患において末梢血中の頻度が低下し、活性化状態が疾患活動性と相関することを明らかにした。潰瘍性大腸炎では炎症病変局所にMAIT細胞が集積し、疾患活動性と細胞頻度が相関しており病態への関与が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：As accumulating studies indicate that gut resident T cells may be the key player regulating the extraintestinal autoimmunity, we used myelin antigen specific T cell receptor transgenic mice and found that gut intraepithelial autoreactive CD4+T cells suppress autoimmune inflammation in the CNS in LAG3 dependent manner. We also revealed the involvement of mucosal associated invariant T (MAIT) cells, a member of innate-like lymphocytes found abundantly in the mucosal tissue. MAIT cell frequency decreased in the peripheral blood of various inflammatory diseases such as arthritis, ulcerative colitis (UC) and systemic lupus erythematosus (SLE). The activation status of MAIT cells was correlated with disease activity of UC and SLE as well as plasma levels of IL-18. Furthermore, MAIT cells increased in the inflamed mucosa and their frequency was correlated with clinical and endoscopic disease activity in UC patients, suggesting their contribution to the pathogenesis of inflammatory disorders.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫 腸管免疫 自己応答性T細胞 自然リンパ球 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患の発症と進展には、遺伝的要因に加えて環境因子による影響が大きい。環境要因として近年腸管における免疫調節が注目されている。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と共存するなど独特な環境にある。腸管における免疫調節については、免疫組織の発達はもとより、Th17 細胞や制御性 T 細胞などの増殖や機能調節にも関与することが報告されている。また近年、免疫応答調節における腸内細菌叢の重要性が明らかとなり、免疫疾患との関連も注目されている。我々は、多発性硬化症における腸内細菌叢解析の研究に先鞭をつけ、腸管局所の疾患によらずに腸内細菌叢は健常人と比較して有意な差があることを見出した (PLoS One 2015)。また、腸管での免疫調節には、腸管粘膜に豊富に存在する、iNKT 細胞、Mucosal Associated Invariant T (MAIT)細胞、NK 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞をはじめ、新たに同定された Innate lymphoid 細胞などの自然リンパ球が重要な役割を担うことが想定される。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 (Nature 2001, Nat. Immunol.2006 他。) 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 (Nat. Immunol, 2006)、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 (Arthritis Rheum.2005,2012)。さらに iNKT 細胞については EAE、関節炎をともに抑制するような合成リガンドの作製に成功し、現在多発性硬化症治療薬の医師主導治験を開始している。このように、腸管での免疫調節の機序を明らかにすることは、自己免疫制御の新たな治療や予防法の開発につながる。最近我々は、自己反応性 T 細胞が腸管で機能調節をうける機序を検証するモデルとして、髄鞘蛋白である Myeline Oligodendrocyte Glycoprotein(MOG)反応性の脳炎惹起性 T 細胞 (2D2-T 細胞) の T 細胞受容体 (TCR) トランスジェニックマウスにおいて、腸管在住の 2D2-T 細胞 (2D2-IEL) を移入すると、能動的に誘導した EAE が抑制されることを見出した。2D2-IEL は、in vitro の抑制実験において、野生型 C57BL6 マウスの脾臓 CD4⁺細胞の増殖を抑制し、制御性の機能を持つことが明らかとなった。これらの結果は、腸管においては、自然リンパ球のみならず自己反応性 T 細胞の機能も調節されていることを示唆する。

2. 研究の目的

本研究では腸管在住の自己反応性 T 細胞の病

態抑制機構を動物モデルを用いて解明するとともに、腸管での機能制御に重要な因子を明らかにする。また、関節リウマチ (RA) などの関節炎や、全身性エリテマトーデス (SLE) について、自然リンパ球の役割を明らかにし、自己免疫病態の制御・予防につながる研究を目指す。

3. 研究の方法

自己反応性 T 細胞の腸管での制御に関する研究では、髄鞘蛋白である MOG 反応性の脳炎惹起性 T 細胞 (2D2-T 細胞) の T 細胞受容体のトランスジェニックマウスである 2D2 を用いて、腸管での機能調節について解析した。腸管在住 T 細胞を EAE マウスに移入すると脳内に侵入することを見出しているので、脳内に浸潤した 2D2-T 細胞、腸管在住 2D2-IEL、脾臓 2D2-T 細胞について網羅的に遺伝子発現の比較を行い、抑制機序に寄与する分子を検索した。抑制に関与することが想定される分子を見出したら、in vivo ならびに in vitro で抑制効果を検討した。また、腸管におけるリンパ球機能調節因子について検討した。

自然リンパ球については、これまで我々は、iNKT 細胞について自己免疫病態に与える影響を研究してきたが、今回は特に MAIT 細胞に注目し、関節炎ならびに SLE における MAIT 細胞の動態についてフローサイトメトリーを用いて検討した。

4. 研究成果

自己反応性 T 細胞の腸管での制御について研究を行った。髄鞘蛋白である MOG に特異的に反応する T 細胞受容体のトランスジェニックマウス (2D2) における腸管在住の 2D2-IEL と、脾臓抗原に特異的に反応する T 細胞受容体のトランスジェニックマウス (KRN) の腸管在住の KRN-IEL を用いて、in vitro においてエフェクター T 細胞の増殖を抑制することから、自己応答性の T 細胞は腸管において制御性の機能を獲得することを明らかにした。2D2-IEL を分離し、マウスに移入後に実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導すると、病態が軽減した (図 1)

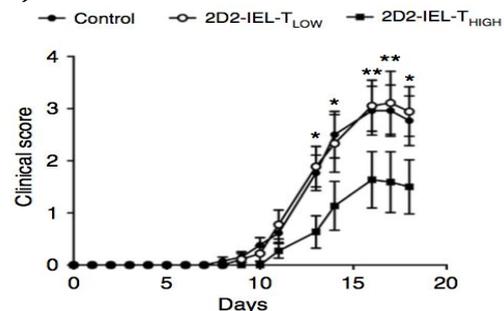


図 1 : 文献 2 から引用

KRN-IEL は EAE を抑制しないことから、病態抑制は抗原特異的抑制であることがわか

った。中枢神経に浸潤した 2D2-IEL において発現していた抑制性の分子として、LAG3、CTLA4、TGFβ がみられた。In vitro におけるエフェクター T 細胞の増殖抑制実験において、抗 LAG3 抗体、抗 TGFβ 抗体、抗 CTLA4 抗体は 2D2-IEL による増殖抑制を阻害したが、抗 IL-10 抗体は阻害しなかったことから、LAG3、TGFβ、CTLA4 が 2D2-IEL による抑制に関与すると考えられた。中枢神経内に浸潤した細胞では腸管の 2D2-IEL に比較して、LAG3 の発現が最も上昇していた。EAE において 2D2-IEL と抗 LAG3 抗体を同時に投与すると、2D2-IEL による病態抑制がみられなかったことから、in vivo においても 2D2-IEL による病態抑制に LAG3 が重要であることが明らかとなった。(図 2)

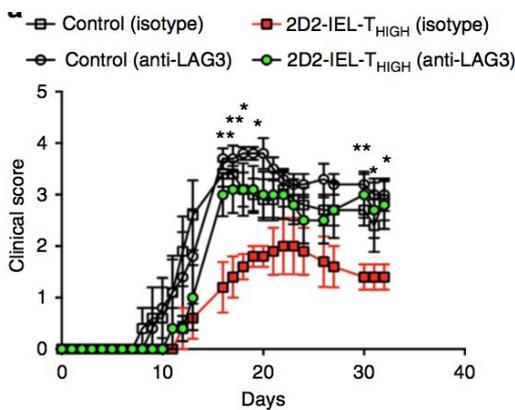
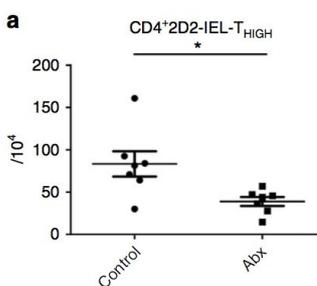


図 2 : 文献 2 から引用

2D2-IEL は、食餌中に抗生剤投与や AhR リガンドを添加する影響を受けることから、腸内環境により調節されることが示唆された。(図 3)



Abx:抗生剤投与群 図 3 : 文献 2 から引用

また、2D2-IEL を B6 マウスに投与すると、腸管において増殖がみられることから、腸内に MOG と交差する抗原が存在することが示唆された (Nat Commun 2016)。MAIT 細胞については、MAIT 細胞は RA や強直性脊椎炎(AS)などの関節炎、潰瘍性大腸炎(UC)などの炎症性腸疾患、SLE の血中で減少していた (J.Gastroenterol. Hepatol 2016, J Rheum 2016, Arthritis Res Ther 2017)。(図 4)

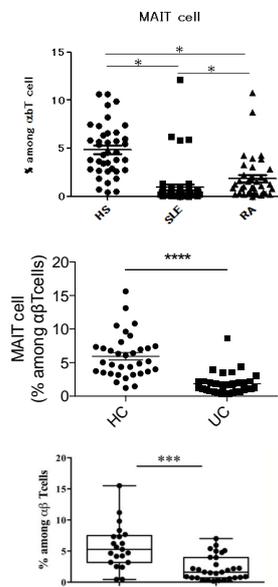


図 4

UC、AS、SLE では疾患活動性と MAIT 細胞の CD69 の発現が相関していた。UC、SLE においては、IL-18 濃度が CD69 の発現と相関がみられた。(図 5)

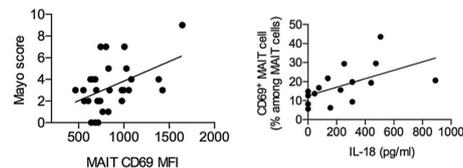


図 5 : 文献 1 から引用

UC では腸粘膜局所に MAIT 細胞の集積がみられた。UC 患者の通常粘膜では、T 細胞の 10~15%程度が MAIT 細胞であったが、活動性の高い粘膜では、20~25%程度まで上昇していた。疾患活動性を表す Mayo score、内視鏡的活動性を表すスコアである UCEIS と細胞集積が相関しており、病態への関与が強く示唆された。MAIT 細胞の役割を明らかにするためには、動物モデルを使用した検討が必要と考え、MAIT 細胞の存在しない MR1 欠損マウスを用いて、SLE ならびに腸炎モデルを誘導した。現在これらの病態解析を行い、MAIT 細胞が病態に与える役割について検討中である。自己免疫疾患における腸内環境の変化として腸内細菌叢解析を進めているが、まず先行する多発性硬化症に有意差を認められた菌が産生する代表的な代謝産物である短鎖脂肪酸の自己免疫モデルに対する効果を検討した。短鎖脂肪酸を飲水に混入して投与したところ、多発性硬化症モデルならびにコラーゲン誘導関節炎では病態が軽快したが、抗体誘導性関節炎では病態が悪化したことから、短鎖脂肪酸は T 細胞が病態形成に重要な病態の抑制に関与することが示唆された (PLoS One 2017)。他の研究グループから

RA で増加が報告されているプレボテラは多発性硬化症では減少しており、疾患により腸内細菌叢には異なる異常があることが推測される。したがって今後SLEならびにRA,ASについては腸内細菌叢の解析を進めていくことが重要であると考えられる。また、そこで同定された疾患に特徴的な菌については、MAIT細胞などの自然リンパ球や自己応答性T細胞にどのような作用を及ぼすか、また疾患病態にどのような影響を与えるかについては動物モデルを用いて検討していく必要があると考えられた。

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13件)

Miho Mizuno, Daisuke Noto, Naoko Kaga, Asako Chiba, Sachiko Miyake. The dual role of short fatty acid chains in the pathogenesis of autoimmune disease models. *PLoS One*.12(2):e0173032, 2017, 査読有, DOI:10.1371/journal.pone.0173032

Asako Chiba, Naoto Tamura, Kazunori Yoshikiyo, Goh Murayama, Mie Kitagaichi, Ken Yamaji, Yoshinari Takasaki, Sachiko Miyake. Activation status of mucosal-associated invariant T cells reflects disease activity and pathology of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*.19(1)58, 2017, 査読有, DOI:10.1186/s13075-017-1257-5

Hayashi E, Chiba A, Tada k, Haga K, Kitagaichi M, Nakajima S, Kusaoi M, Sekiya F, Ogasawara M, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y, Miyake S. Involvement of Mucosal-associated Invariant T cells in Ankylosing Spondylitis. *Journal of Rheumatology*.43(9):1695-1703, 2016, 査読有, DOI:10.3899/jrheum.151133

Kadowaki A, Miyake S, Saga R, Chiba A, Mochizuki H, Yamamura T. Gut environment-induced intraepithelial autoreactive CD4+ T cells suppress central nervous system autoimmunity via LAG-3. *Nature Communications*. 7:11639,2016, 査読有, DOI:10.1038/ncomms11639

Haga K, Chiba A, Shibuya T, Osada T, Ishikawa D, Kodani T, Nomura O, Watanabe S, Miyake S. MAIT cells are activated and accumulated in the

inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 31(5):965-72, 2016, 査読有, DOI:10.1111/jgh.13242

[学会発表](計85件)

Asako Chiba, Goh Murayama, Mie Kitagaichi, Naoko Tamura, Ken Yamaji, Yoshinari Takasaki, Sachiko Miyake. Activation Status of Mucosal-Associated Invariant T Cells Sensitively Reflects Disease Activity of Systemic Lupus Erythematosus. 2016 ACR/ARHP Annual Meeting, Washington, DC, USA, November 15, 2016

Miyake S. Gut microbiota and autoimmunity. The 13th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity, Kyoto, 12 October, 2016

Atsushi Kadowaki, Ryoko Saga, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura. Gut Intraepithelial Autoreactive CD4+T Cells Influenced by Environment Suppress Central Nervous System Autoimmunity Via LAG-3. FOCIS 2016, Boston, USA, June 22-25, 2016

Asako Chiba, Ken Yamaji, Naoto Tamura, Yoshinari Takasaki, Sachiko Miyake. Hyperactivated State of Mucosal Associated Invariant T Cells Due to Activation Potency of Monocytes in Systemic Lupus Erythematosus. 2015 ACR/ARHP Annual Meeting, San Francisco, USA, November 10, 2015

Eri Hayashi, Asako Chiba, Mie Kitagaichi, Ken Yamaji, Naoto Tamura, Yoshinari Takasaki, Sachiko Miyake. Involvement of IL-17-producing MAIT cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. ACR 2014, Boston Convention and Exhibition Center, Boston, USA, November 18, 2014

[図書](計3件)

J.Ludovic Croxford, Sachiko Miyake. Animal Models for the Study of Neuroimmunological Disease. *Neuroimmunological Diseases* Susumu Kusunoki, ed, Springer, Japan, 33-54, 2016

Asako Chiba, Miyake S. Basic

techniques for studies of iNKT cells and MAIT cells. Arthritis Research Shunichi Shiozawa, ed, Springer, London, 75-84, 2014

三宅幸子:免疫系のしくみと働き. 新版臨床免疫学第3版. 山田俊幸、大戸齊、渥美達也、三宅幸子、山内一由編, 南江堂, 東京, 1-25, 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 自己免疫疾患の診断方法、自己免疫疾患の診断用バイオマーカー、及び自己免疫疾患の予防又は治療剤

発明者: 山村隆、三宅幸子、服部正平、森田英利

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2015-167839

出願年月日: 平成 27 年 8 月 27 日

国内外の別: 国内

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

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

千葉 麻子 (Chiba, Asako)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 40532726