

目 次

1. 平成18年度医学助成金贈呈者（若手研究者）の研究テーマ	
イ. Latency-associated peptide（LAP）陽性調節性T細胞を標的とした多発性硬化症の 画期的な治療法開発に関する研究	
九州大学病院神経内科 助手 越 智 博 文	1
ロ. Innate T 細胞を介した粘膜免疫と神経免疫連関の解析	
新潟大学脳研究所神経内科 河 内 泉	5
ハ. MS患者末梢血NK細胞のCD11c発現上昇とそれに伴う機能変化のメカニズム解析	
国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 荒 浪 利 昌	11
2. 「平成19年度医学助成について」のおしらせ	17
3. 寄付者ご芳名	18
4. 日本MS協会役員名	19
5. 医学顧問団リスト	21
6. あとがき	25

Latency-associated peptide (LAP) 陽性調節性T細胞を標的とした多発性硬化症の 画期的な治療法開発に関する研究

九州大学病院神経内科 助手 越 智 博 文

【緒 言】

多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) は中枢神経系に炎症性脱髄病巣が多発する難病で、中枢神経の髄鞘抗原に対する自己反応性T細胞による自己免疫疾患と考えられている。これまでの研究により IFN- γ などの炎症性サイトカインを産生するTh1細胞が病態の悪化に関与することが明らかとなっている。また最近では、IL-17を産生するいわゆるTh17細胞が炎症惹起に関与していることが報告されている。一方生体内では、自己反応性T細胞に拮抗的に作用し免疫寛容を維持する方向に作用する、いわゆる免疫調節細胞が存在することが知られ、MSのように再発と寛解を繰り返し、免疫調整の微妙なバランスの上に成り立っているような病態では、免疫調節細胞を標的とした治療が有効と考えられる。これまでに、CD25^{high}調節性T細胞やNK細胞、CD1d拘束性NKT細胞などの免疫調節細胞のMS病態における役割が検討され、①MS患者ではCD25^{high}調節性T細胞の免疫調節機能が低下している、②MS寛解期にはIL-5を大量に産生し、CD95分子を弱く発現したNK細胞 (NK2細胞) の割合が増加している、③MS寛解期にはCD4 NKT細胞のIL-4産生能が著明に亢進している、ことなどが報告されている。また最近、MR1拘束性NKT細胞がMSの動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) の発症を抑制することが報告され、新たな免疫調節細胞として注目されている。

我々は、TGF- β がMS寛解維持や様々な免疫調整薬による治療効果発現に関与していることから、TGF- β に着目して新たな免疫調節細胞の同定を試み、細胞膜上にTGF- β を発現したLAP(latency-associated peptide)陽性CD4 T細胞に免疫調節性機能があることをマウスで明らかにした¹⁾。マウスLAP陽性CD4 T細胞は、T細胞抗原受容体を介した刺激によりIL-10やTGF- β を産生し免疫調節性機能を発揮することができる。さらに、T細胞抗原受容体に対するモノクローナル抗体 (抗CD3抗体) を経口投与することで、LAP陽性CD4 T細胞の免疫調節性機能を高め、EAEを抑制できることが明らかとなった。そこで本研究では、ヒトMSの病態制御におけるLAP陽性T細胞の役割を明らかにし、その免疫調節性機能を高めることでMSの病態を制御することを目的とした。

【方 法】

1. 使用したマウス：6～8週齢の雌SJLマウスと雌NODマウスを使用した。
2. 経口投与に用いた抗体：ハムスター抗マウスCD3抗体 (クローン：145-2C11) あるいは対照免疫

グロブリンとしてハムスターIgGを1日1回、5日間連続経口投与を行った。

3. EAEの誘導：完全フロインド・アジュバンドとともに50 μ gのPLP139-151ペプチドをSJLマウスに免疫することでEAEを誘導した。またNODマウスでは、150 μ gのMOG35-55ペプチドで免疫を行った。EAEの重症度は、0：障害無し、1：尻尾の脱力、2：後脚の脱力あるいは不完全麻痺、3：後脚の完全麻痺、4：四肢麻痺、5：瀕死ないしは死亡、の6段階で評価した。
4. 細胞培養：細胞培養液は10% FCS-DMEMを用いた。丸底96ウェルプレートを用いて 0.5×10^6 cells/wellの濃度で細胞培養を行い、細胞増殖反応は $[^3\text{H}]$ thymidineの取り込みで評価した。
5. ELISA：培養上清中のサイトカイン濃度はELISAにて測定した。培養液は無血清培地（X-VIVO 20）を使用した。
6. 細胞増殖抑制活性の測定：調節性T細胞の細胞増殖抑制活性は、調節性T細胞が濃度依存性にLAP陰性CD25陰性CD4 T細胞の細胞増殖反応を抑制する程度で評価した。
7. 経口抗CD3抗体の用量依存性効果：抗CD3抗体をSJLマウスに1日1回（5 μ g/日、50 μ g/日、500 μ g/日）、5日間連続経口投与を行った。最終投与翌日に、腸間膜リンパ節よりリンパ節細胞を分離し、T細胞抗原受容体刺激に対する増殖反応を検討した。PLP139-151ペプチドに対する細胞増殖反応は、PLP139-151ペプチド免疫10日後に、所属リンパ節よりリンパ節細胞を分離して検討した。また、最終投与2日後に50 μ gのPLP139-151ペプチドを完全フロインド・アジュバンドとともに免疫しEAEの誘導を行い、経口抗CD3抗体がEAEに及ぼす容量依存性効果を検討した。
8. LAP陽性CD4 T細胞の経時的免疫動態：5 μ g/日の抗CD3抗体を5日間連続経口投与したSJLマウスより、LAP陽性CD4 T細胞を経時的（最終投与翌日、3日後、5日後）に腸間膜リンパ節と脾臓より分離し、サイトカイン産生能と細胞増殖抑制能を検討した。
9. ヒトにおけるLAP陽性CD4 T細胞の検討：健常人の血液より末梢血単核球を分離し、抗CD4抗体と抗LAP抗体で染色、フローサイトメトリーにて解析した。

【結 果】

1. 経口抗CD3抗体の用量依存性効果

- (1) EAEに及ぼす効果：5 μ g/日の抗CD3抗体を経口投与したSJLマウスでは、対照免疫グロブリンを投与したマウスに比べEAEの重症度が有意に低下した（ 1.7 ± 0.5 vs 3.0 ± 0.3 ; $P < 0.001$ ）。また発症も有意に遅れた（ 12.7 ± 1.5 日 vs 9.8 ± 0.8 日; $P = 0.001$ ）。しかし、50 μ g/日あるいは500 μ g/日の経口投与を受けたマウスでは、明らかな抑制効果を認めなかった。500 μ g/日の経口投与を受けたマウスでは、むしろ重症度が高くなる傾向を認めた（重症度： 3.6 ± 0.2 ）。同様に、5 μ g/日の低容量抗CD3抗体はNODマウスのEAEも有意に抑制したが（重症度： 2.0 ± 0.7 vs 3.0 ± 0.4 ; $P = 0.003$ ）、50 μ g/日では明らかな臨床効果を認めなかった。
- (2) 細胞増殖反応に及ぼす影響：抗CD3抗体を経口投与したマウスから、最終投与翌日に腸間膜リンパ節細胞を分離し、T細胞抗原受容体に対する細胞増殖反応を検討した。5 μ g/日の抗CD3抗体を経口投与したマウスでは細胞増殖反応が低下したが、50 μ g/日の経口投与を受けたマウスでは

対照群に比べ明らかな変化がなく、500 μ g/日の経口投与を受けたマウスでは、逆に細胞増殖反応が亢進した。PLP139-151ペプチドを免疫後、同ペプチドに対する細胞増殖反応を所属リンパ節で検討したが、同様の結果であった。つまり5 μ g/日の抗CD3抗体を経口投与したマウスでは細胞増殖反応が低下し、500 μ g/日ではむしろ亢進を認めた。

- (3) LAP陽性CD4 T細胞に及ぼす効果：抗CD3抗体を経口投与することで、LAP陽性CD4 T細胞の免疫調節性機能の亢進が認められるが、その主体はLAP陽性CD25陰性CD4 T細胞の機能亢進による。そこで、経口抗CD3抗体がLAP陽性CD25陰性CD4 T細胞の機能に及ぼす用量依存性効果を検討した。5 μ g/日の抗CD3抗体を経口投与したマウスから分離したLAP陽性CD25陰性CD4 T細胞は、LAP陰性CD25陰性CD4 T細胞の細胞増殖反応を濃度依存性に効率良く抑制したが、500 μ g/日の抗CD3抗体を経口投与したマウスから分離したLAP陽性CD25陰性CD4 T細胞は、むしろLAP陰性CD25陰性CD4 T細胞の細胞増殖反応を亢進させた。さらに、LAP陽性CD25陰性CD4 T細胞のサイトカイン産生能を検討した。5 μ g/日の抗CD3抗体を経口投与したマウスでは、LAP陽性CD25陰性CD4 T細胞からのIL-4、IL-10、TGF- β の産生亢進が認められたが、50 μ g/日あるいは500 μ g/日の経口投与を受けたマウスでは、これらのサイトカイン産生の亢進は顕著でなく、むしろIFN- γ の産生亢進が顕著であった。また、LAP陰性CD25陰性CD4 T細胞からのIL-2産生が、500 μ g/日の経口投与を受けたマウスでは亢進していた。

2. LAP陽性CD4 T細胞の経時的免疫動態

LAP陽性CD25陰性CD4 T細胞からのIL-4、IL-10、TGF- β の産生能は、腸間膜リンパ節では投与後1～3日目、脾臓では3～5日目がピークでありその後は徐々に低下した。細胞増殖抑制活性も同様の動態を示した。免疫後は所属リンパ節内でLAP陽性細胞が増加、抑制性サイトカイン産生能とともに細胞増殖抑制能の亢進を認めた。

3. ヒトにおけるLAP陽性CD4 T細胞の検討

健常人において、末梢血LAP陽性CD4 T細胞の割合をフローサイトメトリー法にて測定したが、全CD4 T細胞に対する割合が1%未満であった。

【考 察】

抗CD3抗体を経口投与することで、LAP陽性調節性T細胞が腸間膜リンパ節で誘導される。誘導されたLAP陽性調節性T細胞は、その後全身へ循環し、炎症病巣の所属リンパ節内でその免疫調節性機能を発揮すると考えられる。

経口抗CD3抗体は、LAP陽性調節性T細胞の機能強化を介してEAEの発症を抑制する。加えて、経口抗CD3抗体はEAE急性期の治療にも有効であり、EAE寛解期にはLAP陽性CD4 T細胞が増加し、免疫調節性機能を発揮することから²⁾、EAE急性期でも経口抗CD3抗体がLAP陽性調節性T細胞の機能を強化することが考えられる。

経口抗CD3抗体療法をヒトへ応用する準備として、経口投与量の設定を行った。SJLマウスを用いて5 μ g/日、50 μ g/日、500 μ g/日で検討したが、*in vivo/in vitro*の効果とも低容量の5 μ g/日が最も効

果的であった。10倍量の50 μ g/日では効果が明らかでなく、100倍量の500 μ g/日ではむしろ逆効果となった。NODマウスでも同様に、低容量で最も治療効果が高く、マウスの検討では治療域が比較的狭い可能性が示唆された。高容量の抗CD3抗体を経口投与した場合、調節性T細胞のみならず、病原性T細胞までもが活性化されることがその一因として考えられた。ヒト末梢血ではLAP陽性CD4 T細胞の割合が低いことが示唆されたこととあわせて、今後は、*in vitro*でLAP陽性CD4 T細胞を選択的に刺激・活性化させることが重要であると考えられた。

【結 論】

LAP陽性調節性T細胞は、特定の抗原によらず広くT細胞抗原受容体を介した刺激で誘導・活性化されることから、自己免疫疾患の治療標的として有力な候補であると考えられる。経口抗CD3抗体療法は、疾患の発症抑制のみならず、急性期の治療にも応用できる可能性が考えられる。今後はLAP陽性調節性T細胞を標的とした選択的免疫細胞療法の開発が望まれる。現在、LAP陰性CD25陰性CD4 T細胞からLAP陽性調節性T細胞が誘導できないか検討を行っている。

【研究協力者】

吉良 潤一

九州大学大学院医学研究院・教授

【参考文献】

1. Ochi H et al. Oral CD3-specific antibody suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing CD4⁺ CD25⁻ LAP⁺ T cells. Nat Med. 12(6): 627-35, 2006.
2. Zhang X et al. Recovery from experimental allergic encephalomyelitis is TGF-beta dependent and associated with increases in CD4⁺LAP⁺ and CD4⁺CD25⁺ T cells. Int. Immunol. 18(4): 495-503, 2006.



Innate T細胞を介した粘膜免疫と神経免疫連関の解析

新潟大学脳研究所神経内科 河 内 泉

【緒 言】

Innate T (*i*T) 細胞は、多様性の限定されたsemi-invariant TCR鎖を有し、多様性の少ない抗原を認識することで、瞬時に独自の機能を発揮する一群の細胞である。Conventional T細胞群とは異なり、a) MHC class Ib分子に拘束される、b) メモリー活性化マーカーを発現し、瞬時に刺激に反応する、c) 特定組織に分布する、d) auto-reactivityを有する、e) 自然免疫と獲得免疫の橋渡しをすることで免疫バランス制御機能を発揮することが示唆されている¹。1) TCR mV α 14/hV α 24を有すCD1d拘束性NKT (NKT/mV α 14iT/hV α 24iT) 細胞²、2) TCR mV α 19/hV α 7.2を有すMR1拘束性mucosal-associated invariant T (MAIT/mV α 19iT/hV α 7.2iT) 細胞^{3, 4, 5, 6} 3) TCR $\gamma\delta$ を有する一部の $\gamma\delta$ T細胞は、*i*T細胞群に属すると考えられ、CD4⁻CD8⁻ double-negative T (DNT) 分画の主体を構成すると考えられる。*i*T細胞のひとつMAIT/hV α 7.2iT は、通常、粘膜組織に局在するという特徴を有するにも関わらず^{5, 6} 多発性硬化症 (MS) の中枢神経脱髄巣にも浸潤している⁷ ことから、MSの病態形成に深く関与している可能性が強く示唆されている。

MSは、中枢神経に活性化ミエリン反応性リンパ球が浸潤する自己免疫疾患である。しかし、健常者の末梢血にもミエリン反応性T細胞が存在すること、一卵性双生児内で疾患動態が一致しないことから、発症機転には環境要因が必須であると考えられている。本症のモデル動物であるミエリン塩基性蛋白特異的T細胞受容体トランスジェニックマウス脳脊髄炎はコロニー依存性に自然発症が誘導されることに加え、近年、日本において、クローン病、サルコイドーシス、アトピー性疾患と共に、通常型MS (CMS) の有病率が上昇しているという疫学は、自己免疫疾患の発症機転に環境要因、中でも衛生状態の改善がいかに重要かを裏付けるものである。衛生状態の改善が、腸管の巨大な常在細菌叢プールを変化させ、結果、粘膜免疫応答がダイナミックに変化し、中枢神経系自己免疫疾患の発症及び病態を修飾するという仮説は極めて合理的であり、興味深いストーリーである。特に、粘膜免疫応答の中でも自然免疫と獲得免疫の橋渡しをする*i*T細胞 (特にMAIT/mV α 19iT/hV α 7.2iT) は、腸管局所で表現型を変え、中枢神経系に移動し、その病態機序に関与している可能性がある。以上から、自己免疫性疾患を考える時、自然免疫 (粘膜免疫/常在細菌叢プール・*i*T) —獲得免疫のパラダイムを読み解くことが重要である。そこで、我々はまず*i*T細胞を多く含むDNT分画に注目し、多発性硬化症における特徴を抽出することで、その免疫調節もしくは免疫修飾機構を解析する試みをした。

【対象・方法】

対象は再燃寛解型MS患者 (6 名)、他の炎症性神経疾患患者 (5 名)、健常者 (10名) とした。対象者から末梢血を採取し、単核球 (PBMC) を分離し、フローサイトメーターを使用し、細胞表面分子 (CD

3、CD4、CD8、各種ケモカイン受容体)、細胞内分子 (IFN- γ 、IL-17、Foxp3) の描出を試みた。実際には、末梢血単核球をPMA、Ionomycinと共に培養し、更に培養最終(4時間)、Monensinを添加する。一定時間培養後、細胞を洗浄し、細胞表面抗原染色を行う。その後、定法に則り、細胞内分子を染色し、FACSAria (BD) を用いて測定、FACSDiva (BD) で解析した。DNT分画の描出に関しては、CD3⁺CD4⁻CD8⁻細胞群を使用した。

【結 果】

今回の実験系で得られた結果は以下の通りである。

- 1) PBMC CD4陽性分画では、Foxp3陽性細胞頻度に差を見出すことができなかった (図1)。
- 2) PBMC CD4陽性分画では、IL-17産生細胞頻度に差を見出すことができなかった (図1)。
- 3) PBMC DNT分画では、IL-17産生細胞頻度はMS群で高値であった (図2)。対照的に、IFN- γ 産生細胞頻度はMS群で低値であった (図2)。

【考 察】

最近、マウス実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) の発症機序を探る上で、新しい細胞系列の存在が明らかになっている。すなわち古典的CD4エフェクター細胞であるT_H1及びT_H2に加え、新しいCD4細胞系列T_H17 (IL-17産生CD4系列) の存在である。長い間、サイトカイン産生及びケモカイン受容体発現パターンから、EAEではT_H1細胞が中枢神経組織に炎症、脱髄巣を形成すると信じられてきた。しかし、IFN- γ 受容体欠損マウス、IL-12p35欠損マウスの解析より、T_H1/IFN- γ 系列のみでは病態機序を説明できないという矛盾も指摘されていた。Cuaらは、IL-12により誘導されたproteolipid protein peptide (PLP) 特異的T_H1細胞の受動免疫ではEAEを発症しないが、IL-23により誘導されたPLP特異的T_H17細胞の受動免疫で重度のEAEを発症することを示した⁸。以上より、マウスではIL-23及びIL-17産生細胞こそが「EAE発症の鍵」となる細胞群であることが想定されている⁹。

今回、我々のヒトを対象とした実験系では、CD4陽性分画において末梢血のレベルで多発性硬化症に特異的なIL-17産生細胞分画を描出することができなかった。しかし、今回解析に使用した検体は末梢血であることから、病変局所である中枢神経脱髄巣でのT_H17の存在を否定するものではない。更に、T_H17の描出にあたり、単一刺激ではなく、様々な刺激モジュールを検討する必要があると考える。今後は、T_H17にヒトホモログは存在するのか、もし存在した場合、ヒトホモログではどのような表現型を有するのか、ヒトでの基礎的な解析が重要であり、その上で多発性硬化症をはじめとする自己免疫疾患への応用を図るべきだと考える。

DNT分画に眼を移してみると、MS末梢血では、IL-17産生細胞頻度が高いことが確認できる (図2)。DNT分画は、 $\gamma\delta$ T細胞、MAIT/hV α 7.2iT、NKT/hV α 24iTなどのiT細胞を多く含む分画であることから、MS患者の末梢血にはIL-17を分泌する活性型iT細胞が多く存在する可能性が示唆される。特に、「マウスIL-17は、DNT分画で初めて確認された」という歴史的事実は注目に値する^{9, 10}。最近、 $\gamma\delta$ T細胞、 $\alpha\beta$ iT細胞にIL-17を産生する亜群の存在、並びにIL-23による分泌誘導の報告が複数の施設

からなされている¹¹。以上から、IL-17産生*i*T細胞は自己免疫疾患への関与など特殊な機能を発揮する亜群であることが推測される。

*i*T細胞は、メインストリームT細胞に比較し、頻度から考えると、稀な細胞群ではあるが、一方で、クローンとして考えると、大きな割合を占める重要な細胞群である。*i*T細胞の代表的な細胞は、CD1d拘束性NKT (NKT/mV α 14iT/hV α 24iT) である。NKT/mV α 14iT/hV α 24iTは、NK レセプターと共に、マウスではV α 14J α 18遺伝子、ヒトではV α 24J α Q遺伝子でコードされる均一なTCR を発現しており、MHC class Ib 分子に属すCD1d 分子に拘束されている。糖脂質である α -Galactosylceramideが外来性リガンドとして発見されて以来、ヒト及びマウスにおいて、感染免疫制御、アレルギー制御、自己免疫疾患における制御、抗腫瘍効果等の重要な役割を担っていることが次々と明らかになっている¹²。第二の*i*T細胞群は、MAIT細胞である。Porcelli らは、ヒトDNT分画に、CD1d拘束性NKT細胞に特異的なV α 24-J α Q遺伝子転写産物の他に、invariant V α 7.2-J α 33遺伝子転写産物を発見し、第二のinvariant TCRを有す細胞群 (MAIT 細胞) の存在を示唆した³。その後、ヒトではV α 7.2-J α 33 遺伝子、マウスではV α 19-J α 33 遺伝子にコードされるinvariant なTCR α 鎖を有する細胞群が、ヒト末梢血DNT分画に1/7.5、CD8 α α 分画 に1/50、マウスリンパ節DNT分画に1/56の頻度で存在することが追試された⁴。その細胞群は、ヒト腸管へのホーミングレセプターである α 4 β 7を有していること、マウス腸管lamina propria (LP) に、リンパ節の10倍の頻度で分布していることから、消化管特異的な分布を示すことが確認され、腸管粘膜に親和性を有する細胞という意味で mucosal-associated invariant T (MAIT) /mV α 19iT/hV α 7.2iTと命名された(5)。特筆すべきは、 β 2-microglobulin依存性、transporters associated with antigen processing (TAP) 非依存性に、MHC class Ibに属すMR1分子によって拘束されることである⁵。更に、その選択及び増殖には、B細胞と正常細菌叢が必要である⁵。また、我々の検討により、MAIT/mV α 19iTは活性メモリー型で、TCR刺激によりIL-4、IL-5、IL-10を産生し、腸管lamina propriaに多数局在するユニークな*i*T細胞であることが確認されている⁶。以上のように、MAIT/mV α 19iTは、様々な点において、NKT/mV α 14iTと類似な特徴を有することから、粘膜に局在するMAIT細胞もNKT細胞と同様に免疫バランス制御に働いていることが強く推測される。実際、ヒト自己免疫疾患であるMSの病変組織において、V α 7.2-J α 33転写産物、すなわちMAIT細胞の集簇が確認され、自己免疫疾患への関与が強く疑われている⁷。

*i*T細胞は感染刺激により爆発的に炎症性サイトカインを標的臓器で産生し得る細胞群である。従って、MAIT/mV α 19iT/hV α 7.2iTは病変局所でT_H17と連動して組織炎症増悪に傾ける悪化因子として働いている可能性がある。一方で、TCR刺激により免疫抑制機能を持つIL-10を大量に産生する能力を有することから、中枢神経系内でT_H17システムを能動的に抑制調節しうる細胞群である可能性もある。CD1d分子に対して α -Galactosylceramide、OCHなどのリガンドが発見され、リガンドの種類によりtype 1 (IFN- γ) バイアス、type 2 (IL-4) バイアスに偏倚し得ることを考えると、MR1分子に関しても同様に、リガンドの種類に応じて、MR1拘束性V α 19iT細胞のサイトカイン産生能、免疫調整能を変化し得るものと推測する。すなわち状況に応じて、type 1、type 2、type 17 (IL-17)、調節

性T細胞 (IL-10、TGF- β) と巧みに姿を変えることが想像される。現時点では、MR1分子に関して、MR1拘束性iT細胞ハイブリドーマを反応することを証明した確実で正確なリガンドは発見されていないが、MR1拘束性iT細胞が腸管粘膜に豊富に存在することから、腸管常在細菌叢由来物質こそがリガンド供給源であると強く推測する。MR1拘束性iT細胞を免疫調節に向かわせるか、免疫賦活に向かわせるか (IL-17誘導) の大きな鍵は、腸管内でのiT細胞の表現型の変化が重要であり、「常在細菌叢の中に含まれる免疫調節因子 (リガンド) と賦活因子 (リガンド)」を明らかにすることが、将来、ヒトMS治療に応用する時に重要になってくるものであろうと推測する。

近年、多発性硬化症をはじめとする自己免疫疾患、アレルギー疾患は増加しており、その発症機序及び制御性分子の解明が望まれている。自己免疫疾患を考えると、自然免疫 (粘膜免疫/常在細菌叢プール・iT及び樹状細胞) - 獲得免疫のパラダイムを読み解くことが重要である (図3)。樹状細胞及びiT細胞をはじめとした自然免疫系列とのネットワーク機構を詳細に検討することにより、粘膜免疫を修飾する経口ワクチン、プロバイオテックスがMSの重要な治療手段として開発されてくると推測する。

【結 論】

多発性硬化症 (MS) におけるCD4⁺CD8⁻ double-negative T細胞分画には、IL-17を産生する特殊な細胞群が存在する。IL-17産生に特化した活性化iTが、免疫動態を修飾し、MSを疾患誘導もしくは調節している可能性がある。今後、細胞系列の同定に加え、同細胞がどのようにMS病理を形成するのか、その詳細な病態機序の解明が必要である。

【研究協力者】

新潟大学脳研究所神経内科 助教授 田中恵子

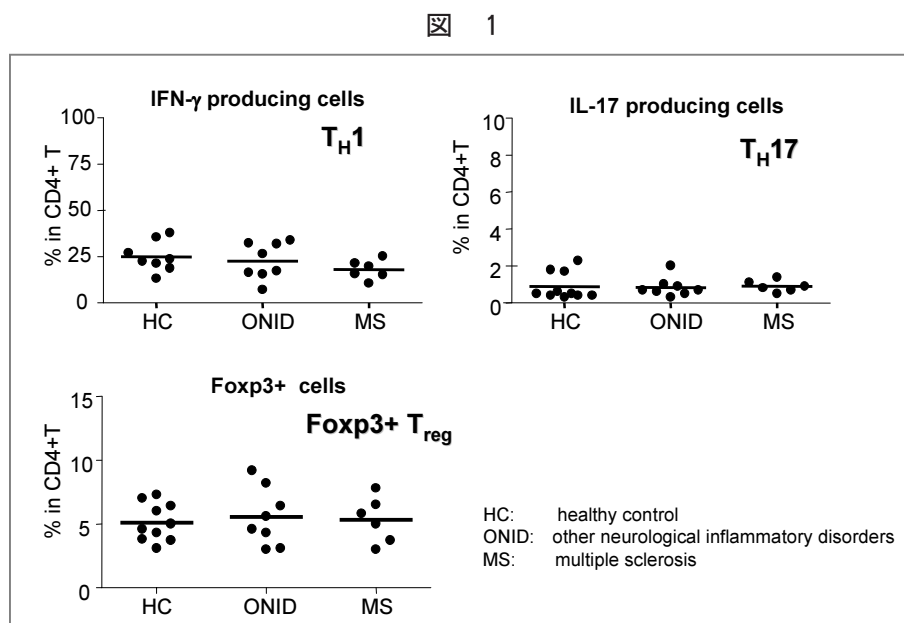
新潟大学脳研究所神経内科 教授 西澤正豊

【参考文献】

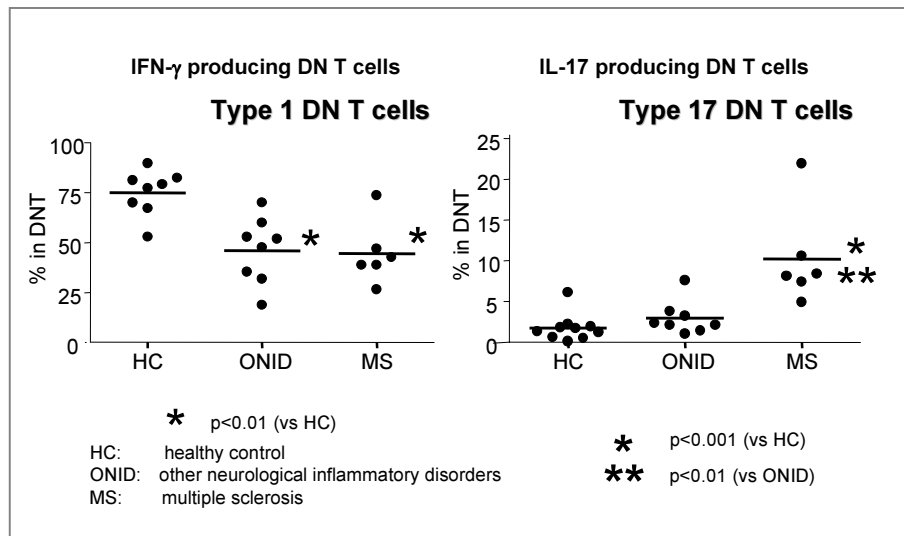
1. Bendelac A, et al. Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. Nat Rev Immunol 1:177-186, 2001.
2. Kronenberg M, et al. Regulation of immunity by self-reactive T cells. Nature 435:598-604, 2005.
3. Porcelli S, et al. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4⁺8⁻ α/β T cells demonstrates preferential use of several V β genes and an invariant TCR α chain. J Exp Med 178:1-16, 1993.
4. Tilloy F, et al. An invariant T cell receptor α chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted α/β T cell subpopulation in mammals. J Exp Med 189:1907-1921, 1999.
5. Treiner E, et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells

- by MR1. Nature 422:164-169, 2003.
6. Kawachi I, et al. MR1-restricted $V\alpha 19i$ mucosal-associated invariant T cells are innate T cells in the gut lamina propria that provide a rapid and diverse cytokine response. J Immunol 176:1618-1627, 2006.
 7. Illes Z, et al. Accumulation of $V\alpha 7.2-J\alpha 33$ invariant T cells in human autoimmune inflammatory lesions in the nervous system. Int Immunol 16:223-230, 2004.
 8. Langrish CL, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. J Exp Med 201:233-240, 2005.
 9. Steinman L. A brief history of T_H17 , the first major revision in the T_H1/T_H2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. Nat Med 13:139-145, 2007.
 10. Kennedy J, et al. Mouse IL-17: a cytokine preferentially expressed by $\alpha\beta TCR^+CD4^-CD8^-$ T cells. J Interferon Cytokine Res 16:611-617, 1996.
 11. Stark MA, et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. Immunity 22:285-294, 2005.
 12. Taniguchi M, et al. The regulatory role of $V\alpha 14$ NKT cells in innate and acquired immune response. Annu Rev Immunol 21:483-513, 2003.

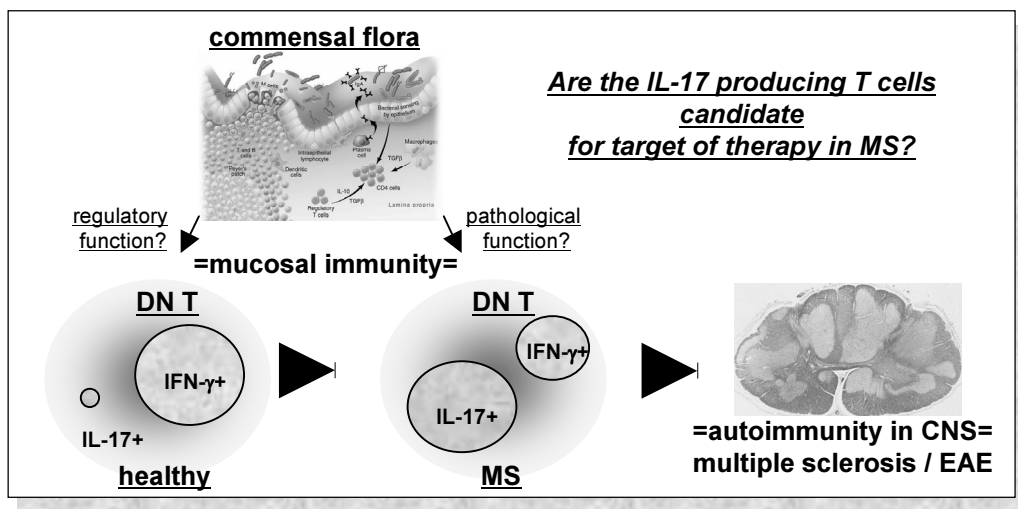
Figure legend



末梢血 $CD4^+$ T細胞における T_H1 , T_H17 , $Foxp3^+T_{reg}$ 系列の出現頻度



末梢血CD4⁻CD8⁻double negative T (DNT) 細胞におけるIFN- γ ⁺T, IL-17⁺T細胞の出現頻度



粘膜免疫と神経免疫連関（仮説）

MS患者末梢血NK細胞のCD11c発現上昇とそれに伴う機能変化のメカニズム解析

国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 荒 浪 利 昌

【緒 言】

多発性硬化症（MS）は、中枢神経系に炎症性脱髄性病巣が時間的、空間的に多発する疾患で、若年成人に好発する。多彩な神経症状を示し、多くの例で再発と寛解を繰り返すが、その病因は中枢神経の髄鞘蛋白に対する自己免疫反応であると考えられている。末梢リンパ組織において活性化された自己反応性CD4陽性ヘルパーT細胞は、中枢神経系に浸潤し、ミエリン塩基性蛋白などのミエリン蛋白に特異的に反応して活性化され、IFN- γ 、TNF- α など様々な炎症性サイトカインを産生する。中でもIFN- γ を産生する、Type1 ヘルパーT細胞（Th1細胞）が、病原性T細胞として中心的な役割を果たしていると考えられている⁽¹⁾。

これに対して、自己反応性T細胞に対して抑制的に働く免疫細胞の存在が知られており、制御性細胞と呼ばれている。制御性細胞は、炎症性サイトカインに拮抗的に働く、IL-4、IL-10、TGF- β 1などの制御性サイトカインを産生し、自己反応性Th1細胞の反応を抑制すると考えられている。

MSの動物実験モデルである、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）を用いて、様々な制御性細胞と制御メカニズムが研究されてきた。CD4陽性CD25陽性T細胞、ナチュラルキラー（NK）T細胞、B細胞などが重要な制御性細胞として報告されている⁽²⁻⁵⁾。そのような中で、当研究室では、以前からNK細胞の重要性を報告している。この細胞は、腫瘍細胞やウイルス感染細胞に対して細胞傷害活性を示す、リンパ球である。また、様々な免疫反応において、迅速なサイトカイン産生のソースとして働き、免疫反応の方向性を左右する細胞としても重要であることが知られている。EAEについても、当研究室から、NK細胞を除去したマウスではEAEが重症化することを報告し、MSにおける、制御性細胞としてのNK細胞の可能性を示した⁽⁶⁾。

近年ヒトNK細胞が、試験管内実験系において、サイトカイン産生能の異なるtype1およびtype2 NK細胞へと分化しうることが報告された⁽⁷⁾。IFN- γ 産生性のtype1 NK細胞は、IL-12により誘導され、IL-5、IL-13産生性type2 NK細胞はIL-4により分化が誘導される。我々は寛解期MS患者より分離したNK細胞が、健常者のそれに比べて、高いIL-5産生能を持ち、IL-12レセプター β 2鎖の発現が低い、という特徴を有する事を見出した⁽⁸⁾。このような特徴は、type2 NK細胞のそれに合致し、我々はこれを寛解期MSにおけるtype2 NK細胞偏倚として提唱した。このtype2 NK細胞偏倚は、MSの再発時には消失していることから、NK細胞が自己反応性Th1細胞に対して制御性細胞として働き⁽⁹⁾、寛解期の維持に関与し、また制御性細胞としてのNK細胞の機能低下が、再発の一因となりうると考えている。

最近マウスにおいて樹状細胞（DC）マーカーである、CD11cを発現するNK細胞が、特異な機能を持つ、新たなNK細胞サブセットとして同定された⁽¹⁰⁾。この細胞は、bitypic NK/DC細胞と呼ばれ、抗

原提示能と細胞傷害活性を併せ持ち、自己免疫マウスモデルにおいて制御性細胞として働くことが示唆された。しかしこれまで、ヒト自己免疫疾患における、CD11c陽性NK細胞の機能は不明であった。本研究において我々は、MS寛解期におけるCD11c陽性NK細胞の細胞表面分子の表現型、機能解析を行い、MSの病態における、この細胞の役割を検討した⁽¹⁾。

【対象・方法】

- (1) 対象として、健常者10例と再発寛解型MS患者25例の末梢血単核球を用いた。全てのMS患者は、採血の時点で最低1ヶ月間免疫抑制剤（ステロイド、IFN- β ）投与を受けていないことを条件とした。本研究は、国立精神・神経センター倫理委員会の承認を受けており、また、全ての患者から書面によるインフォームドコンセントを得た上で採血を行った。
- (2) 比重遠心分離法により末梢血単核球（PBMC）を分離後、蛍光色素標識抗CD3、CD56、CD11c抗体で染色し、CD3陰性CD56陽性NK細胞上のCD11c発現をフローサイトメトリーにより測定した。
- (3) CD11c発現上昇のメカニズムを明らかにするため、サイトカインによるNK細胞刺激実験を行った。健常者PBMCから磁気ビーズを用いてNK細胞を精製し（純度>95%）、様々なサイトカイン存在下で3日間培養後、CD11c発現量を解析した。
- (4) 健常者、MS患者の精製NK細胞より全RNAを抽出後、定量的RT-PCR法により、IFN- γ 、IL-5およびそれぞれの発現に重要な転写因子T-bet、GATA-3のmRNA量を定量し、Type2 NK細胞偏倚を評価した。全てのmRNA発現量は、内部コントロールとしての β -アクチン量で標準化した。
- (5) CD11c^{low} MS 13名、CD11c^{high} MS 10名について、採血後、最初の再発までの日数を120日間追跡し、Kaplan-Meierの生存率に倣い、寛解率を算出した。2群間の有意差の統計学的検定は、Logrankテストで行った。
- (6) 寛解期と再発期のペアサンプル（n=6）におけるNK細胞CD11c発現量をフローサイトメトリーにより比較し、MSの疾患経過とCD11c発現量の変化の関連性を評価した。

【結 果】

- (1) MS寛解期のNK細胞では、健常者に比べ、CD11c発現量（平均蛍光強度、MFI）の有意な増加が認められた（ $p<0.01$ ）（図1）。MS寛解期は、健常者MFIの、（平均値+2x 標準偏差）を正常上限とすると、CD11c^{low} MSおよびCD11c^{high} MSに分けられた。
- (2) NK細胞の代表的活性化マーカーである、HLA-DR発現を解析したところ、CD11c^{high} MSのNK細胞において、健常者、CD11c^{low} MSのNK細胞に比べて、有意な発現増加が認められた。
- (3) MSの疾患活動性との関連が示唆される種々のサイトカインのうち、IL-15単独或はIL-12とIL-18の同時刺激のみが、NK細胞CD11cの有意な発現上昇（ $p<0.01$ ）を誘導した。
- (4) CD11c^{low} MSのNK細胞では、Type2 NK細胞偏倚（IL-5およびGATA-3発現上昇）が認められたが、CD11c^{high} MSでは認められなかった。
- (5) CD11c^{high} MSは、4ヶ月間の寛解率が、CD11c^{low} MSに比べ有意に低いことが判明した（ $p<0.01$ ）

(図2)。

- (6) 寛解期に発現が上昇した CD11cは、再発時には有意に低下しており、NK細胞CD11cがMSの病態に従って、ダイナミックに変動することを示唆する。

【考 察】

- (1) CD11c発現上昇のメカニズムについては、NK細胞活性化マーカー発現が、CD11c^{high} MSにおいて有意に増強していること、またIL-15、IL-18、IL-12によってCD11c発現上昇が誘導されたことから、自己免疫反応の増強に伴って産生が増加した、これら炎症性サイトカインの刺激により、CD11c^{high} MSのNK細胞におけるCD11c発現上昇が誘導された可能性が考えられる。
- (2) 上記の炎症性サイトカインの、NK細胞IL-5 mRNA発現に対する影響を解析したところ、これらの炎症性サイトカインによりNK細胞のIL-5発現は有意に低下した。このことから、炎症性サイトカインの刺激により、NK細胞CD11cの発現上昇とType2 NK細胞偏倚の消失が誘導された可能性が考えられた。
- (3) 重要なことに、このようなNK細胞の変化とMSの臨床経過の間に強い関連が見出された。すなわち、Type2 NK細胞偏倚を示すCD11c^{low} MSに比べて、Type2 NK細胞偏倚が認められないCD11c^{high} MSの再発率が有意に高いことが判明した。CD11c^{high} MSのNK細胞におけるType2 NK細胞偏倚の消失が、この群の早期の再発の一因となっている可能性が示唆された。

【結 論】

NK細胞CD11cは、MSの病態に従って、ダイナミックに変動し、寛解期の疾患活動性を反映することが示唆される。このような特徴から、MSの病勢評価、治療方針決定などに有用なバイオマーカーの一つとなり得ると考えられる。

【研究協力者】

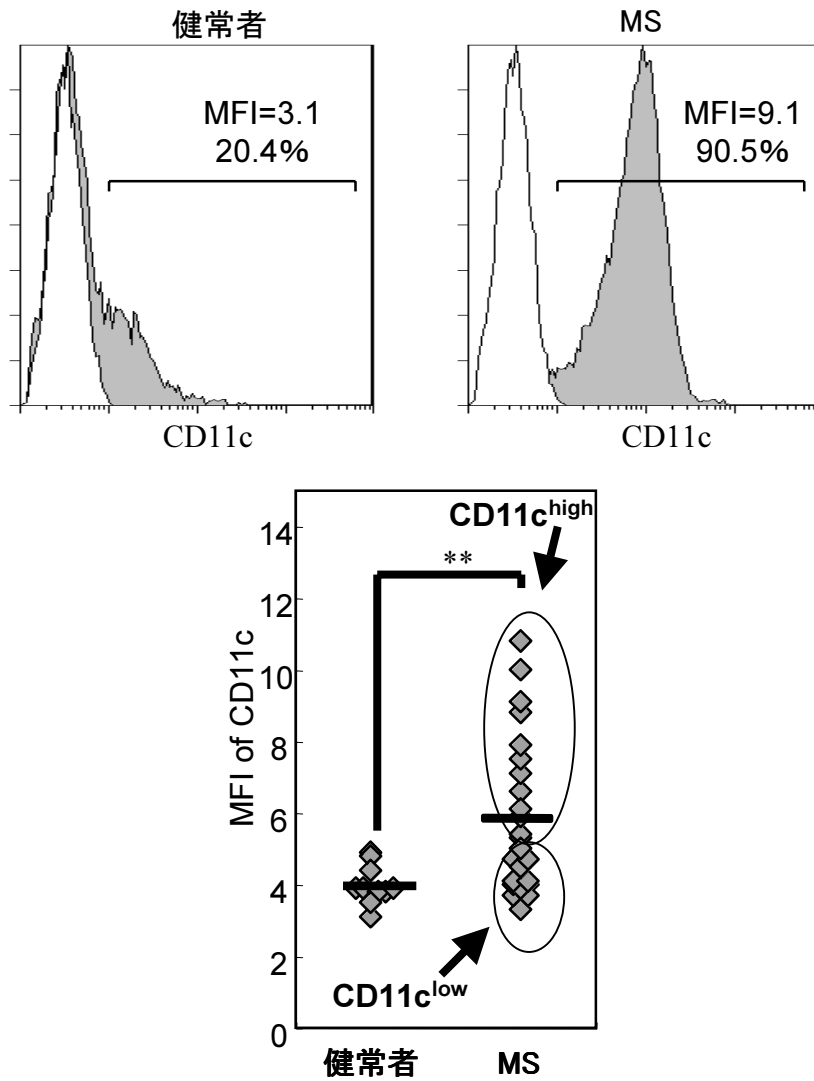
山村隆 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 部長

【参考文献】

1. Sospedra, M., et al. Immunology of multiple sclerosis. Annu. Rev. Immunol. 23:683-747. 2005.
2. McGeachy, M. J., et al. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. J. Immunol. 175:3025-3032. 2005.
3. Miyamoto, K., et al. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. Nature 413:531-534. 2001.

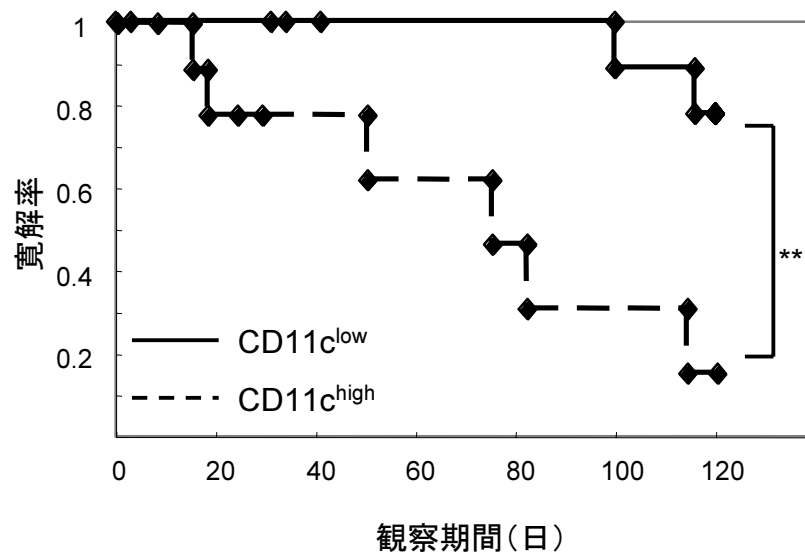
4. Croxford, J. L., et al. Invariant V(alpha)19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat Immunol* 7:987-994. 2006.
5. Fillatreau, S., et al. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 3:944-950. 2002.
6. Zhang, B., et al. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J Exp Med* 186:1677-1687. 1997.
7. Peritt, D., et al. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J. Immunol.* 161:5821-5824. 1998.
8. Takahashi, K., et al. Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 107:R23-29. 2001.
9. Takahashi, K., et al. The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain.* 127:1917-1927. 2004.
10. Homann, D., et al. CD40L blockade prevents autoimmune diabetes by induction of bitypic NK/DC regulatory cells. *Immunity.* 16:403-415. 2002.
11. Aranami, T., et al. Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. *J Immunol.* 177:5659-5667. 2006.

図1 健常者とMSのNK細胞CD11c



上段は、健常者とMSの末梢血NK細胞上のCD11c発現代表例。下段は、健常者10例、MS寛解期25例の比較。CD11c発現量に基づく、MS寛解期の2群を示す。* * $p < 0.01$. 文献11を一部改変。

図2 MS 2 群の寛解率



MS 2 群 (n=13 in CD11c^{low}、n=10 in CD11c^{high}) の臨床経過を120日間追跡し、寛解率を Kaplan-Meireの生存率に従い算出した。* * p<0.01. 文献11を一部改変。



「平成19年度医学助成について」のお知らせ

日本多発性硬化症協会は下記の要領で医学助成を行います。

- (1) 助成対象は多発性硬化症（MS）に関する基礎または臨床研究とします。
- (2) 助成金は合計100万円とし、件数については2件以内とします。
（但し、金額及び件数については、本協会の財政等の状況を踏まえ、適宜見直しを行います。）
- (3) 応募資格
MS の基礎または臨床研究に従事する若手研究者を対象とします。
- (4) 応募方法
応募者は所定の申請書に必要事項をコンピューターかワープロで記入し（手書きの場合は楷書のこと）、下記の事務局へ郵送して下さい。申請書は事務局へご請求ください。
〒111-0042 東京都台東区寿4-1-2
私書箱 東京浅草28
日本多発性硬化症協会事務局
問い合わせ先 電話（03）3847-3561（月及び水曜日）、FAX（03）3842-0289
- (5) 申請受付期間
平成19年7月1日から31日までとします。
- (6) 審査方法及び通知
選考委員会で審査のうえ、9月初めにその結果を申請者に書面により通知いたします。
- (7) 平成19年度助成金交付日
9月1日以降可及的速やかに行います。

寄付者ご芳名

日本MS協会の活動は下記の方々のご支援により行なわれています。

(平成18年度賛助会員及び寄付者)

(アイウエオ順、敬称略)

法 人	個 人
-----	-----

財団法人 化学及血清療法研究所	荒 井 好 民
杏 林 製 薬 株 式 会 社	和 泉 国 夫
株式会社国際コミュニケーションズスクール	菊 地 清 明
株式会社三栄コーポレーション	木 全 ミ ッ
第一アスヒオファーマ株式会社	中 西 康 晴
帝 人 フ ァ ー マ 株 式 会 社	坂 野 尚 美
東 京 電 力 株 式 会 社	堀 井 功
東 北 電 力 株 式 会 社	水 谷 裕 之
株 式 会 社 ニ フ コ	山 村 道 子
日本シェーリング株式会社	横 尾 與 蔵
バイオジェン・アイデック・ジャパン株式会社	西 村 康
株 式 会 社 ユ ア テ ッ ク	

あ　と　が　き

今年度平成18年度の医学助成プログラムには、10名もの応募がありました。例年の応募者数を考えますと、応募者倍増と言うことになりますが、それは田平武先生（国立長寿医療センター所長）が、募集を日本神経免疫学会のホームページで呼び掛けてくださったお陰と大いに感謝しています。今後ともお願いしたいと思います。

医学助成受賞者は従来なら毎年2名のところ、審査の結果、1位が1名、2位が成績点数同点タイの2名ということで、2位2名の順位は付けられず、つまり受賞対象者は1位と2位で計3名ということになり、応募者数も多かったことでもあり、今回は例外的に1名増やして成績上位2位までの3名の受賞者とし、今号のニュースレターに受賞者3名の調査研究実績報告書を載せている次第です。

当方の医学顧問の先生方は総勢41名でしたが、定年、高齢化、又はその他の理由で、医学顧問を辞めたいとの声を聞くようになりましたので、糸山泰人先生（東北大学医学部神経内科教授、当方医学顧問団代表兼理事）の指示を得ながら、昨年8月から10月に掛けて医学顧問先生方の見直しを行ないました。その結果、従来からの顧問先生のうち、これからも顧問として継続可能者25名、不可能者16名と分かりました。一方、MSに関しての医学顧問として活躍できる神経内科の新しい先生方を推薦紹介してもらいましたところ、14名の推薦があり、幸いにもこの14名全員が顧問になって頂けたわけで、見直し後は合計39名の医学顧問団になっております。

事務局　西　村　康