

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34419

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07356

研究課題名(和文) 多発性硬化症のウイルスモデルのTh17/Treg細胞の役割は病期によって異なるか

研究課題名(英文) Does the role of Th17/Treg cells differ depending on the disease stage?

研究代表者

角田 郁生 (TSUNODA, Ikuo)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：00261529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：従来、多発性硬化症(MS)では、IL-17産生型ヘルパーT細胞(Th17)は増悪に、制御性T細胞(Tregs)は抑制に働くと考えられてきた。我々はMSのウイルスモデルであるタイラーウイルス誘導性脱髄疾患を用いてTh17には1)炎症の増悪、2)抗ウイルス免疫の抑制、3)神経保護作用の3つの、またTregsには1)炎症の抑制、2)抗ウイルス免疫の抑制の2つの善玉・悪玉双方の役割があることを解明した。これにより将来的にヒトMSの免疫調整治療には個々の症例のTh17・Tregsの役割に基づいて治療方針をたてるべきであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In multiple sclerosis (MS), it has been proposed that IL-17-producing T helper (Th)17 cells are detrimental, and regulatory T cells (Tregs) are protective. Using a viral model for MS, Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-induced demyelinating disease (TMEV-IDD), we aimed to clarify the roles of Th17 cells and Tregs. Using methods to increase the numbers of Th17 cells or Tregs ("gain-of-function" approach), we found that Th17 cells have three roles: 1) exacerbation of inflammation, 2) suppression of anti-viral immunity, and 3) neuroprotection and that Tregs have two roles: 1) suppression of inflammation and 2) suppression of anti-viral immunity. Therefore, Th17 cells and Tregs may play either beneficial or detrimental roles in MS, depending on the causes or disease course. These findings can be used for future tailor-made treatment of MS, in which Th17 cells and Tregs should be modulated depending on the conditions of patients with MS.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス 多発性硬化症 免疫学 自己免疫 動物モデル 神経ウイルス学 Tリンパ球 トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

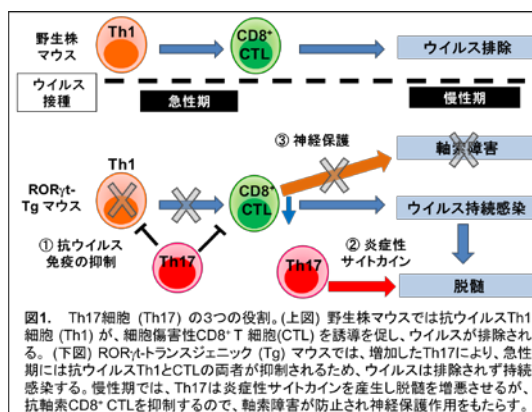
(1) 多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) は、中枢神経系に炎症性脱髄と軸索障害を中心とする病変が時間的・空間的に多発し様々な神経症状を呈する疾患で、全世界で200万人以上、日本では約1万人の患者が存在する。MSの原因は不明なため根治療法は確立されていないが、1) 自己免疫、2) 環境因子、特にウイルス感染、3) 遺伝的要因の3つが発症に関わると提唱されている。これらの説は主に動物モデルによって支持されており、自己免疫モデルとしては実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)、ウイルスモデルとしてはタイラーウイルス (Theiler's murine encephalomyelitis virus, TMEV) が頻用されている。両モデルはいずれも T 細胞を中心とする炎症反応が病変形成に関わっているため混同されがちだが、その病態は異なる。これまで我々は脱髄が先行する EAE に対し、TMEV モデルでは軸索障害が脱髄に先行し、ウイルスの持続感染が病変形成に必須であること等を証明してきた (Tsunoda et al. *Am J Pathol*, 2007, *J Neuroimmune Pharmacol* 2010, Sato, Tsunoda et al., *BMC Neurology*, 2015)。

(2) 古典的にヘルパー T (Helper T, Th) 細胞サブセットには、インターフェロン (IFN)- $\gamma$  を産生する Th1 細胞と、インターロイキン (IL)-4 を産生する Th2 細胞とが知られ、それぞれ炎症の増強と抑制に働くとされてきた。ところがでは、炎症性サイトカイン IL-17 を産生する Th17 細胞と、抑制性サイトカイン TGF- $\beta$  および IL-10 を産生する制御性 T 細胞 (regulatory T cells, Tregs) が、特に EAE を中心とする自己免疫モデルで、それぞれ炎症の増強と抑制に関与するとして重要視されている (Martinez, Tsunoda et al., *Future Virol*, 2012)。またヒト MS 症例においても、Th17 が症状増悪に、Tregs が症状抑制に働いており、これらの調整がすべての MS 治療に有効であるとする報告も多い。

これらの報告においては、以下 2 点の問題 が指摘できる。結果の多くは 1) 自己免疫モデルの EAE において得られたものであること (両細胞の働きは、MS ウイルスモデルのみならず、一般のウイルス感染においてすら十分に明らかにされていない)。また、2) Th17 あるいは Tregs を抑制する (ロス・オブ・ファンクション) ことによって得られたものであること。

2. 研究の目的

ウイルス感染におけるウイルス排除には、Th1 により誘導される CD8<sup>+</sup> 細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) の産生が



重要である。その一方で、過剰に活性化された CTL は、TMEV モデルやヒト MS では、軸索障害に働くことが想定されている。一方で Th17 は、ウイルス感染においては Th1 細胞と CTL の働きを抑制する可能性が示唆されている。我々のこれまでの研究成果と上記の背景から、TMEV モデルにおける Th17 細胞には次の 3 つの役割があると想定した (図1)。

- ① 抗ウイルス性 Th1 と CTL を抑制し、ウイルスの持続感染を誘導する
- ② 炎症性サイトカインの産生などにより炎症性脱髄を増悪させる
- ③ 抗軸索 (自己免疫) CTL を抑制することで軸索障害を防ぎ、神経保護作用を示す

また Tregs には次の 2 つの相反する役割が想定された。

- ① 急性期においては、抗ウイルス性免疫反応を抑制し、ウイルス感染を増悪させる
- ② 慢性期においては、中枢神経内での過剰な炎症を抑え、炎症性脱髄を抑制する

そこで我々は、TMEV モデルを用い、Th17 あるいは Tregs を 増加させる (ゲイン・オブ・ファンクション) ことにより、両細胞の ウイルスモデルでの役割を自己免疫モデルと比較対照し、サイトカイン Luminex、マイクロアレイ、RNA-seq 等を駆使した網羅的実験結果をデータサイエンス講座との共同研究による バイオインフォマティクス的手法を用いることで、上記の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

Th 細胞は特異的トランスクリプション・ファクターの発現により、各サブセットへの分化が誘導される。そこで我々は Th17 細胞の分化に必要な ROR $\gamma$ t を高発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。この Tg マウスは Th17 細胞の増加があり、これに TMEV を感染させることで、Th17 細胞のゲイン・オブ・ファンクションの影響を検証した。Tregs は *ex vivo* で培養増殖させたものを TMEV 感染急性期と慢性期に投与し Tregs 増加

の病期特異的役割を検討した。さらに、我々は Th1, Th2 細胞のそれぞれの分化に必要な T-bet, Gata3 を高発現させた Tg マウスを作製し、Th1 と Th2 のゲイン・オブ・ファンクションの影響を Th17 のものと対照した。

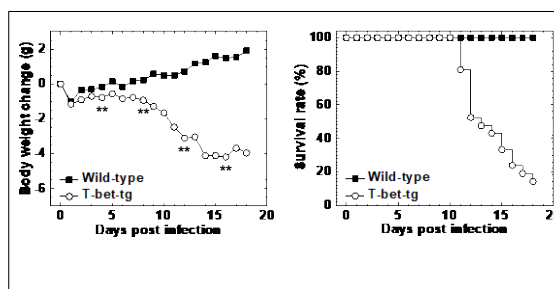
#### 4. 研究成果

(1) Th17 細胞と Tregs のゲイン・オブ・ファンクションの影響は TMEV と EAE と異なる。  
 ① ROR $\gamma$ t Tg マウスに TMEV を感染させると、野生型マウスに比し、ウイルスの持続感染と脱髄病変の拡大がみられるが、**軸索障害はむしろ軽減する**。② 自己免疫モデルの EAE では、Th17 優位の ROR $\gamma$ t-Tg マウスでは症状悪化するが、Th1 優位の T-bet-Tg マウスや Th2 優位の GATA3-Tg マウスでは軽症化する。③ Tregs を TMEV モデルに投与すると、**急性期投与では Tregs が抗ウイルス免疫を抑制**するため、TMEV 感染を増悪させる。**慢性期投与では Tregs は抗ウイルス免疫を抑えず、中枢神経の炎症を抑制**するため、脱髄病変の抑制に働く。上記をこれまでの報告と合わせて Th サブセットの役割を要約すると以下ようになる。即ち、各 Th サブセットは関与する反応が自己免疫か抗ウイルス免疫かにより善玉・悪玉の役割を担う。MS では自己免疫とウイルス感染の両者が脱髄に関与する可能性があり、個々の症例で免疫反応の調整治療を行うときに考慮する必要がある。

#### 自己免疫・ウイルス免疫における Th 細胞

免疫反応	悪玉	抑制	善玉
自己免疫	炎症性 Th1/Th17	ト	Th2/Treg
	脱髄抗体 Th2/Th17	ト	Th1/Treg
抗ウイルス免疫	Th17, Treg	ト	Th1, CD8T
	Treg	ト	抗体, Th2/Th17

(2) Th サブセットのゲイン・オブ・ファンクションの更なる影響をみるために Th1 偏移 T-bet Tg マウスと Th2 偏移 Gata3 Tg マウスに TMEV を感染させた。Gata3 Tg マウスでは抗ウイルス免疫も正常で、野生株マウスと違いは認められなかったが、T-bet Tg マウスでは致死性の感染となった (図 2)。



致死の原因は炎症性 Th1 細胞の増加によるものではなく、感染によってリンパ系組織の萎縮 (特に T 細胞の枯渇) が誘導され抗ウイルス免疫が阻害されたためであった (図 3)。

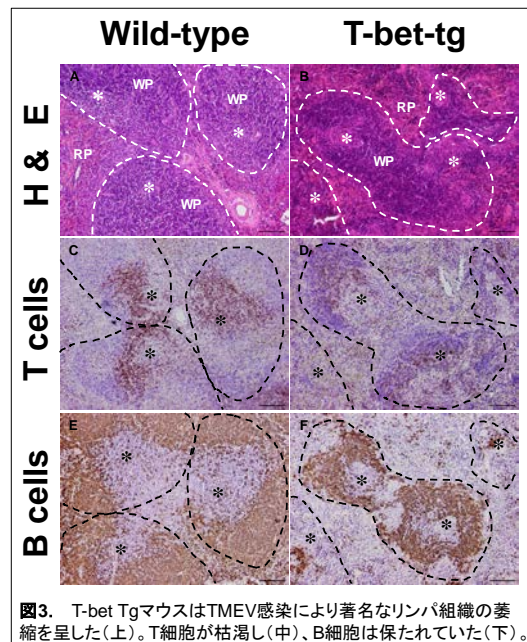


図3. T-bet TgマウスはTMEV感染により著名なリンパ組織の萎縮を呈した(上)。T細胞が枯渇し(中)、B細胞は保たれていた(下)。

免疫関連因子のゲイン・オブ・ファンクション遺伝子変異はヒトでも報告されており、これによる免疫異常と重篤な感染症も報告されているが、本研究はこれらのヒト病態の解明に繋がるものである。

#### 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 8 件)

- Choi J, Cooper ML, Staser K, Ashami K, Vij KR, Wang B, Marsala L, Niswonger J, Ritchey J, Alahmari B, Achilefu S, Tsunoda I, Schroeder MA, and DiPersio JF. Baricitinib-induced blockade of interferon gamma receptor and interleukin-6 receptor 2 for the prevention and treatment of graft-versus-host disease. *Leukemia*, 査読有, in press, DOI: 10.1038/s41375-018-0123-z
- Omura S, Sato F, Martinez NE, Range T, Ekshyyan L, Minagar A, Alexander JS, and Tsunoda I. Immunoregulation of Theiler's virus-induced demyelinating disease by glatiramer acetate without suppression of anti-viral immune response. *Arch Virol*, 査読有, Vol.163, 2018, pp1279-1284, DOI: 10.1007/s00705-018-3729-6

- ③ Sato F, Kawai E, Martinez NE, Omura S, Park A-M, Takahashi S, Yoh K, and Tsunoda I. T-bet, but not Gata3, overexpression is detrimental in a neurotropic viral infection. *Sci. Rep.* 査読有、Vol. 7, No. 1, 2017, p10496, DOI: 10.1038/s41598-017-10980-0
- ④ Tsunoda I. Lymphatic system and gut microbiota affect immunopathology of neuroinflammatory diseases, including multiple sclerosis, neuromyelitis optica and Alzheimer's disease *Clin Exp Neuroimmunol*, 査読有、Vol. 8, No. 3, 2017, pp177-179, DOI: 10.1111/cen3.12405
- ⑤ Park A-M, Omura S, Fujita M, Sato F, and Tsunoda I. *Helicobacter pylori* and gut microbiota in multiple sclerosis versus Alzheimer's disease: 10 pitfalls of microbiome studies. *Clin Exp Neuroimmunol*, 査読有、Vol. 8, No. 3, 2017, pp215-232, DOI: 10.1111/cen3.12401
- ⑥ Fujita M, Omura S, Sato F, Park AM, and Tsunoda I. Influx and efflux of immune cells in the central nervous system. *Anat Physiol* 査読有, Vol. 7, No. 4, 2017, p274, DOI: 10.4172/2161-0940.1000274
- ⑦ Tsunoda I, Sato F, Omura S, Fujita M, Sakiyama N, and Park A-M. Three immune-mediated disease models induced by Theiler's virus: Multiple sclerosis, seizures, and myocarditis. *Clin Exp Neuroimmunol*, 査読有、Vol. 7, No. 4、2016、pp. 330-345, DOI: 10.1111/cen3.12341
- ⑧ Tsunoda I, Omura S, Sato F, Kusunoki S, Fujita M, Park A-M, Hasanovic F, Yanagihara R, and Nagata S. Neuropathogenesis of Zika virus infection: Potential roles of antibody-mediated pathology. *Acta Med Kindai Univ*, 査読有, Vol. 41, No. 2, 2016, pp37-52, [http://www.med.kindai.ac.jp/medical\\_convention/magazine/files/acta/acta41\\_2\\_037.pdf](http://www.med.kindai.ac.jp/medical_convention/magazine/files/acta/acta41_2_037.pdf)

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① 角田郁生。免疫病理学、バイオインフォマティクスによる多発性硬化症動物モデル

ルの研究。第47回神戸ラボ全体研究会議、2017年11月24日、神戸バイオテクノロジー研究・人材育成センター（兵庫県・神戸市）

- ② Omura S, Sato F, Park A-M, Fujita M, Alexander JS, Kilgore CSR, Cvek U, and Tsunoda I. Bioinformatics analyses identified phase-specific heart biomarkers and blood surrogate markers for a mouse model of viral myocarditis. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, 2017年10月26日、Osaka International Convention Center (大阪府・大阪市)
- ③ 尾村誠一、佐藤文孝、藤田貢、朴雅美、J. Steven Alexander、Phillip C.S.R. Kilgore、Urska Cvek、角田郁生。次世代シーケンシングを用いたウイルス性脳脊髄炎モデルの解析；リンパ管分子発現低下が免疫細胞の中枢神経内停滞に関連する。第22回日本神経感染症学会総会・学術大会、2017年10月13日、北九州国際会議場（福岡県・北九州市）
- ④ 佐藤文孝、川合英一郎、ニコラス・マルチネス、尾村誠一、藤田貢、朴雅美、崎山奈美江、高橋智、楊景堯、角田郁生。転写因子T-bet過剰発現は神経向性ウイルス感染を増悪させる。第29回日本神経免疫学会、2017年10月6日、札幌市教育文化会館（北海道・札幌市中央区）
- ⑤ Sato F, Omura S, Park A-M, Fujita M, Stokes KY, and Tsunoda I. Viral infection activates myelin-specific T cells, triggering MS-like CNS inflammatory demyelination. XXIII World Congress of Neurology, 2017年9月16日、国立京都国際会館（京都府・京都市）
- ⑥ Omura S, Sato F, Martinez NE, Park A-M, Cvek U, Minagar A, Alexander JS, and Tsunoda I. Bioinformatics analysis determined the CNS and peripheral lymphoid surrogate biomarker candidates between two distinct EAE models for progressive multiple sclerosis. XXIII World Congress of Neurology, 2017年9月16日、国立京都国際会館（京都府・京都市）
- ⑦ Omura S, Sato F, Martinez NE, Park A-M,

Fujita M, Kilgore PCSR, Cvek, U, Trutschl M, Minagar A, Alexander JS, and, Tsunoda I. Computational analysis determined the homogeneities and heterogeneities between two distinct EAE models for progressive multiple sclerosis. 7th Sendai Conference 2017, 2017年7月8日、Tkp ガーデンシティ仙台 (宮城県・仙台市)

⑧ Sato F, Legaux KN, Creason TG, Omura S, Park A-M, Fujita M, Stokes KY and Tsunoda I. An RNA virus triggers inflammatory demyelination in the central nervous system by activating anti-myelin autoimmune T cells. 7th Sendai Conference 2017, 2017年7月8日、Tkp ガーデンシティ仙台 (宮城県・仙台市)

⑨ 佐藤文孝, Nicolas Martinez, Fridrik Karlsson, 尾村誠一, 朴雅美, 藤田貢, Matthew Grisham, 角田郁生. タイラーウイルス誘導性脳脊髄炎モデルにおける制御性T細胞の役割. 第27回日本サイトメトリ学会学術集会 2017年6月10日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

⑩ 角田郁生, 尾村誠一, 佐藤文孝, 朴雅美, 藤田貢. 多発性硬化症の遺伝子プロファイル主成分分析PCAによるリンパ管バイオマーカーの同定. 第90回日本産業衛生学会 アレルギー・免疫毒性研究会 2017年5月21日 東京ビッグサイトTFTビル (東京都・江東区)

⑪ 角田郁生, 佐藤文孝, 尾村誠一, 崎山奈美江, 朴雅美, 藤田貢. ウイルス感染によって誘発される炎症性脱髄と軸索変性のメカニズム。 第21回日本神経感染症学会総会・学術大会、2016年10月21日、金沢東急ホテル (石川県・金沢市)

⑫ 尾村誠一, 佐藤文孝, J Steven Alexander, Phillip C. S. R. Kilgore, Urska Cvek, Marjan Trutschl, 角田郁生. 進行性多発性硬化症モデルでは血管接着分子の発現増加、BBB/リンパ管分子の発現減少が病因に相関する。 2016年9月29日、長崎ブリックホール (長崎県・長崎市)

[図書] (計 3 件)

① Sato F, Omura S, Martinez NE and Tsunoda I. Elsevier, Neuroinflammation (2nd edition)、2018、in press.

② 角田郁生、中外医学社、<シリーズ>神経内科 Clinical Questions & Pearls 中枢性脱髄疾患、2018、pp115-120

③ Sato F, Omura S, Jaffe SL, and Tsunoda I. Elsevier Inc., Multiple Sclerosis: A Mechanistic View、2016、pp. 41-69.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

以下の講座のホームページで本研究課題に関する学会発表・研究の進捗を情報発信した。

<http://tsunodalaboratory.blog.fc2.com/blog-entry-271.html>

<http://tsunodalaboratory.blog.fc2.com/blog-entry-263.html>

<http://tsunodalaboratory.blog.fc2.com/blog-entry-262.html>

<http://tsunodalaboratory.blog.fc2.com/blog-entry-261.html>

<http://tsunodalaboratory.blog.fc2.com/blog-entry-260.html>

<http://tsunodalaboratory.blog.fc2.com/blog-entry-257.html>

<http://tsunodalaboratory.blog.fc2.com/blog-entry-251.html>

<http://tsunodalaboratory.blog.fc2.com/blog-entry-245.html>

<http://tsunodalaboratory.blog.fc2.com/blog-entry-220.html>

<http://tsunodalaboratory.blog.fc2.com/blog-entry-221.html>

<http://tsunodalaboratory.blog.fc2.com/blog-entry-224.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角田 郁生 (TSUNODA, Ikuo)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：00261529

(2) 研究協力者

尾村 誠一 (OMURA, Seiichi)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：80462480