

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07433

研究課題名(和文) MS疾患モデルでのTh17/CD8+ T細胞間の新規コミュニケーションと併用療法

研究課題名(英文) Interactions between Th17 and CD8+ T cells in animal models of multiple sclerosis

研究代表者

佐藤 文孝 (Sato, Fumitaka)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：30779327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト多発性硬化症(MS)の中樞神経系(CNS)病理像と同様にヘルパーT(Th)17細胞とCD8+T細胞の浸潤を伴うタイラーウイルス誘導性脳脊髄炎(TMEV-IDD)を用い、MS病態の解明を行った。Th17細胞を増強するとTMEV-IDDが軽減し、かつCD8+T細胞関連の遺伝子発現がCNS内で減少した。またこの一連の研究を通して、IgA抗体がCNS内に沈着しているのを見出した。近年、IgA産生B細胞の浸潤がMSでも報告されており、本成果からMS病態におけるTh17細胞-CD8+T細胞-IgA抗体による新規のコミュニケーションが明らかとなり、新たな治療法の開発へつながる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の臨床・基礎研究より、多発性硬化症(MS)はヘルパーT(Th)17細胞が疾患の原因であると提唱されている。しかしながら、Th17細胞機能阻害薬はMS治療において十分な効果を認めていない。その原因として、MS病態にはTh17細胞だけでなく、CD8+T細胞や他の免疫反応が関与していると思われる。MS動物モデルを用いた本研究では、Th17細胞の増強が病態に影響を及ぼすと同時に、CNS内でのCD8+T細胞やIgA抗体の動態も変化することを示した。Th17細胞-CD8+T細胞-IgA抗体間のコミュニケーションを報告した研究は極めて少なく、今後のMS治療法の確立に新しい光明を投じる可能性を示唆した。

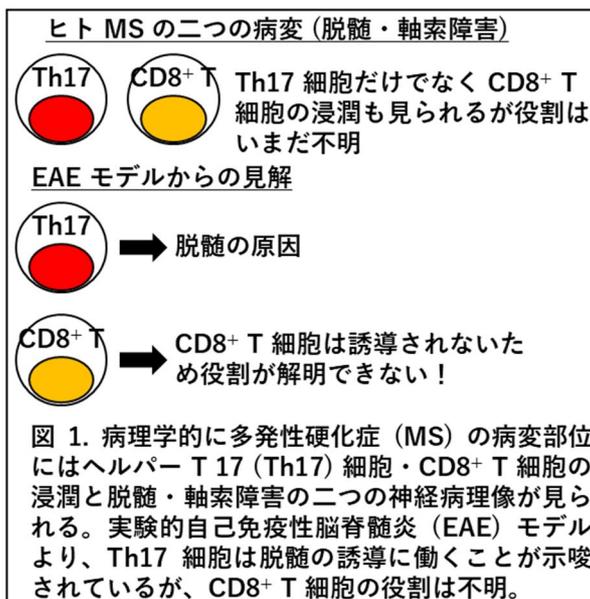
研究成果の概要(英文)：Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated disease in the central nervous system (CNS). Although helper T (Th) 17 cells have been suggested to play pathogenic roles in MS, the precise pathomechanisms are unclear. We have used a viral model of MS, Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection in mice, in which we can see infiltration of Th17 and CD8+ T cells in the CNS that resembles MS neuropathologically. In this study, using the viral model, we aimed to determine the pathogenesis of MS by treating mice with a Th17 modulator, curdlan. Compared with control mice, curdlan-treated mice had significantly less severe clinical signs with decreased levels of CD8+ T cells and granzyme B in the CNS. We also found lower levels of IgA deposition in the CNS demyelinating lesions in curdlan-treated mice. Since IgA-producing B cells have been detected in the CNS of MS patients, our findings suggest the novel interactions among Th17, CD8+ T-cell, and IgA responses in MS.

研究分野：神経免疫学

キーワード：動物モデル Th17細胞 ピコルナウイルス科 IgA

### 1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (MS) は中枢神経系に脱髄と軸索障害の二つの病変を特徴とする慢性炎症性疾患であり、いまだ原因不明の難病である。病理学的に MS 病変部位には T 細胞浸潤が観察されており、かつ免疫を修飾する疾患修飾薬によりある程度の治療効果が認められることから、MS 病態の中心は T 細胞であると考えられている。近年、T 細胞の中でも、ヘルパー T (Th) 細胞サブセットの一つであるインターロイキン 17 (IL-17) を産生する Th17 細胞が MS の原因であると提唱されている。この背景には、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) 等を用いた臨床研究より、Th17 細胞関連遺伝子が MS の疾患感受性遺伝子として報告され、かつ実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を用いた基礎研究より、Th17 細胞関連の遺伝子欠損マウスや中和抗体を用いた Th17 細胞の機能抑制 (ロス・オブ・ファンクション) 実験により症状および脱髄が軽減することなどが挙げられる。しかしながら、EAE ではヒト MS 病変部位に顕著に浸潤している CD8<sup>+</sup> T 細胞が誘導されないため、Th17 細胞のロス・オブ・ファンクションによる CD8<sup>+</sup> T 細胞への影響を観察することができない (図 1)。近年の IL-17 阻害剤を用いた MS 治療で十分な効果が認められないことから、MS 病変部位では Th17 細胞と CD8<sup>+</sup> T 細胞の間に相互作用があると考えられる。



### 2. 研究の目的

近年、Th 細胞と CD8<sup>+</sup> T 細胞はお互いに抑制しあうことが示唆されていることから、ヒト MS 病変部位では Th17 細胞と CD8<sup>+</sup> T 細胞との間に相互作用があり、その片方のみを抑制する単独治療では効果が不十分であると考えられる。そこで、Th17 細胞と CD8<sup>+</sup> T 細胞間のコミュニケーションを明らかにし、MS 病変形成における新たな Th17 細胞と CD8<sup>+</sup> T 細胞の役割を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

Th17 細胞の役割を従来の視点とは逆方向から評価するため、Th17 誘導剤である“カードラン”を用いて、Th17 細胞の機能増強 (ゲイン・オブ・ファンクション) 実験を (1) MS 自己免疫モデルである EAE と (2) MS ウイルスモデルであるタイラー脳脊髄炎ウイルス (TMEV) で行った。

(1) SJL/J マウスにミエリンプロテオリピッド蛋白 (PLP) を完全フロイントアジュバント (CFA) に混合して皮下注射し、EAE を誘導した。PLP 感作の前日に、実験群にはカードランを一匹あたり 5 mg 腹腔内投与し、コントロール群にはリン酸緩衝生理食塩水を腹腔内投与した。EAE 症状のピーク時に EAE マウスから CNS を採取し、病理学的解析を行った。また、EAE 発症時およびピーク時に EAE マウスから鼠経リンパ節・血清を採取し、免疫学的解析を行った。

(2) SJL/J マウスにカードランを一匹あたり 5 mg 腹腔内投与した。カードラン投与の翌日に TMEV を脳内接種し、TMEV 誘導性脳脊髄炎 (TMEV-IDD) を誘導した。TMEV 感染から 5 週間後に CNS を採取して病理学的解析を、脾臓を採取して免疫学的解析をそれぞれ行った。

### 4. 研究成果

(1) コントロール群の EAE マウスはこれまでの報告と一致して、再発と寛解を繰り返す再発寛解型の EAE を発症した一方、カードラン投与群では 73% の EAE マウスが発症後から寛解することなく進行型の経過をたどり、致死的となった (図 2)。EAE 症状と一致して、ルクソール・ファスト・ブルー染色を用いた炎症性脱髄病変の解析において、カードラン投与群はコントロール群に比べて脱髄および血管周囲の炎症が増悪していた。しかしながら、軸索障害には両群間に差が見られなかった。免疫染色法を用いて浸潤している免疫細胞の種類を検討したところ、カードラン投与群では脱髄病変部位に T 細胞だけでなく好中球の浸潤も見られた。Th17 細胞が産生する IL-17 は好中球の遊走を促進することが知られていることから、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) にて Th 細胞サブセット関連のサイトカインを測定した。予想通り、カードラン投

与群はコントロール群よりも IL-17 が亢進し、かつ Th1 細胞が産生する炎症性サイトカインであるインターフェロン (IFN- $\gamma$ ) も増加していた。また、カードラン投与群の CNS 内において Th 細胞や好中球の浸潤を促すケモカイン/ケモカインレセプターの発現が増強していた。一方、血清中の抗 PLP 抗体価は両群で同程度であった。次に、EAE 発症後にカードランを投与することで EAE 症状にどのような影響を及ぼすかを検討した。PLP 感作後 21 日目にカードランを投与された 73% のマウスにおいて、再発時に進行型の病型を示し、致死的となった。この研究成果は、これまでの報告と一致して EAE では Th17 細胞が悪玉であることを支持した。

(2) EAE モデルとは対照的に、TMEV-IDD モデルではカードラン投与により症状が軽減することを見出した。そこで、ルクソール・ファスト・ブルー染色を用いた炎症性脱髄病変の解析を行ったが、カードラン投与群はコントロール群と同程度の病理像を示した。一方、免疫染色法により軸索障害を検討したところ、カードラン投与群はコントロール群よりも軸索障害が減少していた。軸索障害には CD8<sup>+</sup> T 細胞が関与していることが報告されていることから、カードラン投与による Th17 細胞の機能増強により CD8<sup>+</sup> T 細胞の機能が抑制されたことが示唆された (図 3)。この仮説を検証するため、CNS 内の CD8<sup>+</sup> T 細胞ならびにグランザイム B 遺伝子の発現量を比較検討したところ、カードラン投与群においてどちらの遺伝子も発現が低下していた。この研究成果は、MS において Th17 細胞が善玉として働く可能性を示唆した。

上記の一連の研究を通して、EAE ではカードラン投与群において CNS 内での IgA 遺伝子の発現が増加していた一方、TMEV-IDD ではカードラン投与群において IgA 遺伝子の発現が低下していたことを見出した。また、TMEV-IDD モデルでは IgA 抗体が脱髄病変部位に沈着していた (図 4)。本来、IgA 抗体は粘膜組織で重要な役割を果たしているが、CNS 内での IgA 抗体の役割はいまだ不明である。しかしながら、近年、MS 患者の CNS 内に IgA 抗体産生 B 細胞が浸潤していることが報告されている。そこで、Th17 細胞と IgA 抗体の両者を増強することが知られているアルカリゲネス属菌由来のリピド A を TMEV-IDD モデルに投与し、IgA 抗体の役割を検討した。リピド A 投与群は非投与群に比べて、TMEV 感染急性期における発症率が有意に低下した。また、16S rRNA シークエンシングを用いて糞便中の腸内細菌叢を比較検討したところ、多様性がリピド A 投与群において非投与群よりも低下していた。さらに、主成分分析 (PCA) を用いて属レベルでの解析を行ったところ、第一主成分軸上でリピド A 投与群と非投与群を分けることができた。そこで、第一主成分軸に強く寄与している因子 (腸内細菌) のランク付け (因子負荷量の算出) を行った結果、*Alistipes* 属や *Muribaculaceae* 科の細菌 (以前は S24-7 として知られていた) などの腸内細菌が分布の違いに関与していることを見出した。この研究成果は、リピド A 投与により Th17 細胞や IgA 抗体が増強されたことにより腸内細菌叢が変化し、TMEV 感染急性期での症状に影響を及ぼしたことを示唆した。

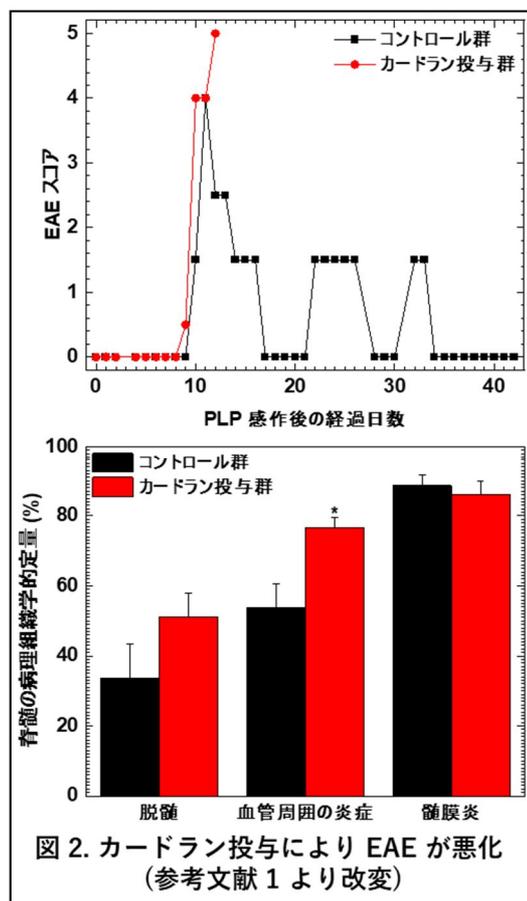


図 2. カードラン投与により EAE が悪化 (参考文献 1 より改変)

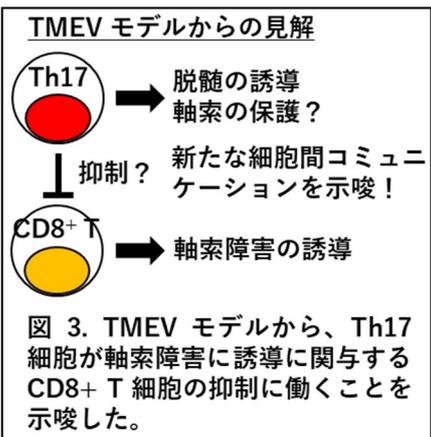


図 3. TMEV モデルから、Th17 細胞が軸索障害に誘導に関与する CD8<sup>+</sup> T 細胞の抑制に働くことを示唆した。

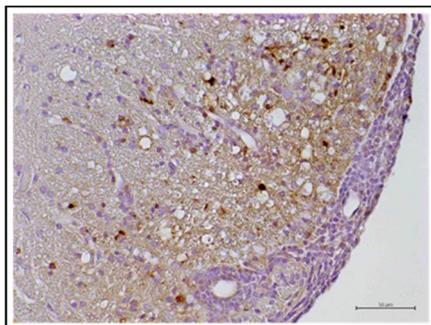


図 4. TMEV-IDD モデルの脱髄病変部位における IgA 抗体の沈着

参考文献: Sato et al., Curdlan, a microbial  $\beta$ -glucan, has contrasting effects on autoimmune and viral models of multiple sclerosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2022, 12:805302. Doi: 10.3389/fcimb.2022.805302.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Khadka Sundar, Omura Seiichi, Sato Fumitaka, Tsunoda Ikuo	4. 巻 24
2. 論文標題 Adjuvant Injections Altered the Ileal and Fecal Microbiota Differently with Changes in Immunoglobulin Isotypes and Antimycobacterial Antibody Responses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24032818	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Park Ah-Mee, Khadka Sundar, Sato Fumitaka, Omura Seiichi, Fujita Mitsugu, Hashiwaki Kazuki, Tsunoda Ikuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Bacterial and fungal isolation from face masks under the COVID-19 pandemic	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-15409-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato Fumitaka, Nakamura Yumina, Katsuki Aoshi, Khadka Sundar, Ahmad Ijaz, Omura Seiichi, Martinez Nicholas E., Tsunoda Ikuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Curdlan, a Microbial $\alpha$ -Glucan, Has Contrasting Effects on Autoimmune and Viral Models of Multiple Sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 805302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2022.805302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Khadka Sundar, Omura Seiichi, Sato Fumitaka, Nishio Kazuto, Kakeya Hideaki, Tsunoda Ikuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Curcumin $\alpha$ -D-Glucuronide Modulates an Autoimmune Model of Multiple Sclerosis with Altered Gut Microbiota in the Ileum and Feces	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 772962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2021.772962	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Omura Seiichi, Sato Fumitaka, Park Ah-Mee, Fujita Mitsugu, Khadka Sundar, Nakamura Yumina, Katsuki Aoshi, Nishio Kazuto, Gavins Felicity N. E., Tsunoda Ikuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Bioinformatics Analysis of Gut Microbiota and CNS Transcriptome in Virus-Induced Acute Myelitis and Chronic Inflammatory Demyelination; Potential Association of Distinct Bacteria With CNS IgA Upregulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.01138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Park Ah-Mee, Khadka Sundar, Sato Fumitaka, Omura Seiichi, Fujita Mitsugu, Hsu Daniel K., Liu Fu-Tong, Tsunoda Ikuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Galectin-3 as a Therapeutic Target for NSAID-Induced Intestinal Ulcers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 550366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.550366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Khadka Sundar, Pandit Roshan, Dhital Subhash, Baniya Jagat Bahadur, Tiwari Surendra, Shrestha Bimal, Pandit Sanjeet, Sato Fumitaka, Fujita Mitsugu, Sharma Mukunda, Tsunoda Ikuo, Mishra Shrawan Kumar	4. 巻 27
2. 論文標題 Evaluation of Five International HBV Treatment Guidelines: Recommendation for Resource-Limited Developing Countries Based on the National Study in Nepal	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathophysiology	6. 最初と最後の頁 3~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathophysiology27010002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計14件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 佐藤 文孝, 中村 優美和, 森口 幸太, 朴 雅美, 桑原 基, 尾村 誠一, スンダル・カドカ, イジャーズ・エフマド, 楠 進, 角田 郁生
2. 発表標題 Roles of anti-glycolipid antibodies in different animal models of multiple sclerosis with distinct clinical courses
3. 学会等名 第51回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 スندگان・カドカ, 尾村 誠一, 佐藤 文孝, イジャーズ・エフマド, 角田 郁生
2. 発表標題 Complete Freund's adjuvant treatment changed the ileal and fecal microbiota differently with altered immunoglobulin isotype and anti-tuberculosis antibody responses
3. 学会等名 第51回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 イジャーズ・エフマド, 佐藤 文孝, 尾村 誠一, スندگان・カドカ, 朴 雅美, フェリシティー・ギャピンス NE, 角田 郁生
2. 発表標題 Platelets play a detrimental role in an animal model of viral myocarditis
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 角田 郁生, 朴 雅美, 尾村 誠一, 堀田芙美香, 城玲央奈, スندگان・カドカ, イジャーズ・エフマド, 森口幸太, 佐藤文孝
2. 発表標題 バリア (腸管バリア、BBB) 破綻を伴うCNS免疫性疾患における脳内の「菌の定着 colonization」データの注意点
3. 学会等名 第34回日本神経免疫学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森口 幸太, 中村 優美和, 朴 雅美, 佐藤 文孝, 桑原 基, スندگان・カドカ, 尾村 誠一, イジャーズ・エフマド, 楠 進, 角田 郁生
2. 発表標題 異なる病型を示す多発性硬化症の動物モデルにおける抗糖脂質抗体の検討
3. 学会等名 第34回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朴雅美, 尾村誠一, 佐藤文孝, 角田 郁生
2. 発表標題 マウス胃のピロリ菌慢性感染は脳に神経炎症と遺伝子発現変化を誘導する
3. 学会等名 第41回日本認知症学会学術集会/第37回日本老年精神医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 文孝, 尾村誠一, 朴雅美, Sundar Khadka, 中村優美和, 甲木蒼紫, 西尾和人, Felicity N.E. Gavins, 角田郁生
2. 発表標題 Distinct bacteria in the gut associate with IgA levels in the central nervous system in picornavirus-induced acute and chronic myelitis models.
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村優美和, 朴雅美, 佐藤 文孝, 桑原基, Sundar Khadka, 尾村誠一, Ijaz Ahmad, 楠進, 角田郁生
2. 発表標題 多発性硬化症の自己免疫およびウイルスモデルでは抗糖脂質抗体が再発寛解型モデルにのみ関与する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 文孝, 尾村誠一, 朴雅美, Sundar Khadka, 中村優美和, 甲木蒼紫, 西尾和人, Felicity N.E. Gavins, 角田郁生
2. 発表標題 Potential roles of IgA in the central nervous system in a viral model of multiple sclerosis.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sundar Khadka, 尾村誠一, 佐藤 文孝, 西尾和人, 掛谷秀昭, 角田郁生
2. 発表標題 Curcumin monoglucuronide (CMG) suppresses autoimmune model of multiple sclerosis via altered gut microbiota.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾村誠一, Sundar Khadka, 佐藤 文孝, 中村優美和, 西尾和人, 掛谷秀昭, 角田郁生
2. 発表標題 Curcumin monoglucuronide (CMG) treatment alters the gut microbiota, regulating an autoimmune model for multiple sclerosis.
3. 学会等名 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies & the 2nd International Symposium on Chemical Communication (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 文孝, Sundar Khadka, 尾村誠一, 朴雅美, 藤田貢, 中村優美和, 西尾和人, 掛谷秀昭, 角田郁夫
2. 発表標題 プロドラッグ型クルクミンCMGによる実験的自己免疫性脳脊髄炎の抑制と小腸細菌叢変化
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 朴雅美, 尾村誠一, 佐藤文孝, 藤田貢, 角田郁生
2. 発表標題 ガレクチン-3は腸内細菌叢に影響し, NSAIDsによる小腸潰瘍の増悪因子として働く
3. 学会等名 第24回腸内細菌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角田郁生、尾村誠一、佐藤文孝、崎山奈美江、Sundar Khadka、中村優美和、朴雅美、藤田貢
2. 発表標題 タイラーウイルスによる急性灰白脳脊髄炎・多発性硬化症動物モデル：分子相同性から腸内細菌叢まで
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

近畿大学医学部微生物学講座：業績集 <a href="http://www.med.kindai.ac.jp/microbio/nihongopublication.html">http://www.med.kindai.ac.jp/microbio/nihongopublication.html</a> researchmap <a href="https://researchmap.jp/">https://researchmap.jp/</a> ORCID <a href="https://orcid.org/">https://orcid.org/</a> ResearchGate <a href="https://www.researchgate.net/">https://www.researchgate.net/</a> Loop <a href="https://loop.frontiersin.org/">https://loop.frontiersin.org/</a> 近畿大学医学部微生物学講座：業績集 <a href="http://www.med.kindai.ac.jp/microbio/nihongopublication.html">http://www.med.kindai.ac.jp/microbio/nihongopublication.html</a> researchmap <a href="https://researchmap.jp/">https://researchmap.jp/</a> ORCID <a href="https://orcid.org/">https://orcid.org/</a> ResearchGate <a href="https://www.researchgate.net/">https://www.researchgate.net/</a> Loop <a href="https://loop.frontiersin.org/">https://loop.frontiersin.org/</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
英国	ブルネル大学		