

1 細胞遺伝子発現解析を用いた新規多発性硬化症増悪因子の探索

東京大学定量生命科学研究所分子免疫学研究分野 助教 杉浦 大祐

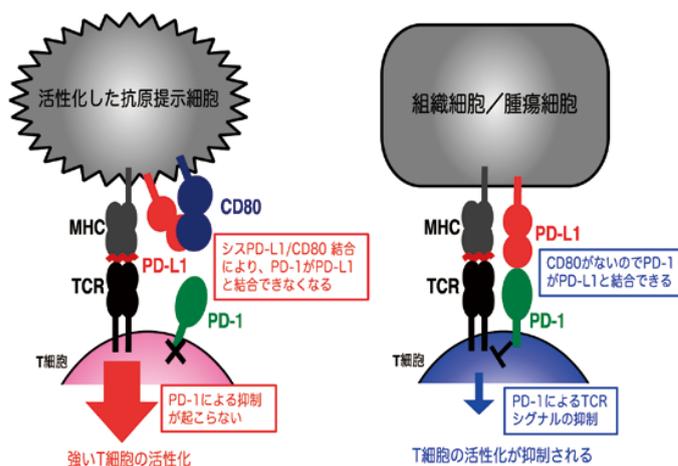


背景

多発性硬化症（MS）は中枢性脱髄疾患の一つで特定疾患に認定されている指定難病である。神経のミエリン鞘が破壊され脳、脊髄、視神経などに病変が起こり、視力障害、運動障害、感覚障害、認知症、排尿障害などさまざまな神経症状が再発と寛解を繰り返すことが知られている。免疫細胞が誤って正常な自己組織を攻撃することによって生じる「自己免疫疾患」の一つであると考えられているが、MSの発症原因は未だに完全に明らかになってはいないため、病態のより詳しい理解と、それに基づいた新たな治療法が求められている。

T細胞の活性化は、細胞表面に発現するT細胞受容体による刺激に加えて、様々な興奮性もしくは抑制性の補助受容体を介した刺激によって厳密に制御されている。我々は最近、CD28およびCTLA-4のリガンドとして知られるCD80が、抗原提示細胞上でPD-1のリガンドであるPD-L1と隣り合わせに結合（シス結合）すること、CD80がPD-L1にシス結合するとPD-1がPD-L1に結合できなくなることで、その結果PD-1による抑制が回避され、T細胞が適切に活性化されることを見出した。これにより、T細胞が抗原提示細胞に活性化される段階においては、CD80が興奮性補助受容体CD28を活性化する一方で、PD-L1とシス結合することによりPD-1による抑制シグナルを制限し、強く免疫応答を誘導することができるという巧妙なメカニズムが明らかになった（図1）。

図 1



実験方法・結果

PD-1による抑制シグナルが制限されると、本来抑制されているべき自己組織特異的な免疫応答が活性化し、自己免疫疾患の原因になる可能性が考えられた。そこで、シス結合が自己免疫疾患の発症に与える影響を明らかにするために、CD80とPD-L1がシス結合できない遺伝子改変ノックインマウスを作成し検討したところ、ノックインマウスでは、免疫した抗原に対するT細胞応答が減弱しており、MSのマウスモデルであるMOG₃₅₋₅₅ペプチドによって誘導される実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の

症状が軽減することが明らかにした (図2)。さらにこのノックインマウス由来のT細胞は、EAEの発症に重要な役割を果たすIL-17の産生が低下しており、T細胞の活性化段階において、病原性T細胞がPD-1によって強い活性化抑制を受け、病態の進行が抑制されていると考えられた。

この結果をさらに発展させ、ノックインマウスを利用して、PD-1による抑制を受けた場合に発現量が変化している分子をより詳細に解析することができれば、その中に今まで報告されていない新規のEAE増悪因子を見出すことが可能となると考えられた。そのため、このモデルで抗原特異的病原性T細胞を正確に解析する方法の検討を行った。EAEモデルで誘導されるMOG₃₅₋₅₅ペプチド特異的なCD4陽性T細胞を検出するため、野生型およびノックインマウスをMOG₃₅₋₅₅ペプチドで免疫後にMHCクラスII-tetramerで染色を行い、フローサイトメーターで解析を行った。我々は、T細胞上に抑制性免疫補助受容体であるLAG-3が発現していると、LAG-3がMHCクラスII-tetramerと抗原特異性非依存的に結合してしまうことを見出しているため、より厳密にペプチド特異的なT細胞をMHCクラスII-tetramerで検出するために、LAG-3に対する阻害抗体を添加して染色を行った。免疫7日後にマウスのリンパ節および脾臓から細胞を調製し、MHCクラスII-tetramerで染色したところ、リンパ節および脾臓においてMOG₃₅₋₅₅ペプチド特異的なCD4陽性T細胞を検出することができた。MOG₃₅₋₅₅ペプチド特異的なCD4陽性T細胞は脾臓よりもリンパ節で多く検出されたが、これはex vivoでMOG₃₅₋₅₅ペプチドを用いて再刺激を行うと、脾臓由来細胞よりもリンパ節由来の細胞の方がIFN-gやIL-17といったサイトカインをより多く産生するという実験結果と一致していた。また、リンパ節においてノックインマウスでは野生型マウスと比べてMOG₃₅₋₅₅ペプチド特異的なCD4陽性T細胞の割合が少ない傾向が認められた (図3)。今回確立した実験方法をもとに、ノックインマウスと野生型マウスよりMOG₃₅₋₅₅ペプチド特異的なCD4陽性T細胞を単離し、1細胞遺伝子発現解析を行うことで、従来注目されていなかったEAE増悪因子を同定することが可能になると期待される。

謝 辞

最後になりましたが、今回このような研究機会を頂いた難病医学研究財団ならびに支援を賜りました方々に深く感謝申し上げます。今後、難病の克服に向け、より一層研究に励んで参ります。

図2

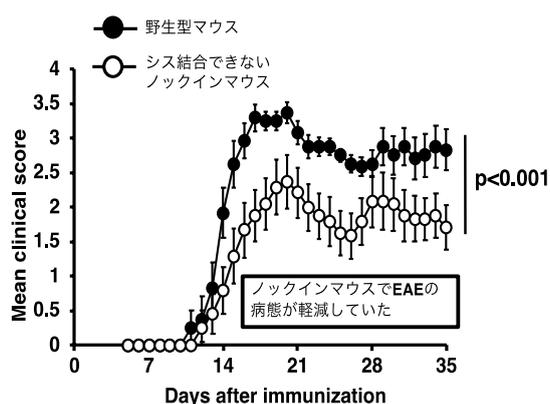


図3

