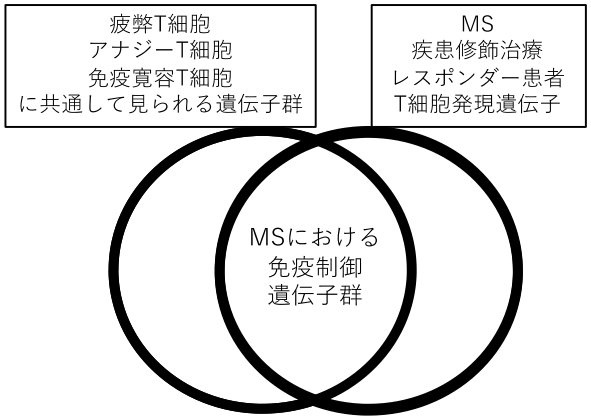
61　神経免疫疾患におけるCysltr1 の免疫寛容機構の解明	千原　典夫

【目的】過剰な免疫応答は自己免疫疾患を招き、過度の免疫抑制は腫瘍の出現を生む。免疫機能の恒常性を維持するためにはその両者の特徴の理解が肝要である。代表的な自己免疫性神経疾患である多発性硬化症（Multiple Sclerosis：MS）では免疫寛容機構の破綻が炎症の継続と神経障害の蓄積を来す。MS はインターフェロンβ、フマル酸ジメチル、フィンゴリモドなどの疾患修飾治療薬の登場によって一部に良好な経過をとる例が認められるが、治療に反応の悪い群では、慢性進行性の経過をとる。一方で、持続的な自己免疫反応の原因の一つとして、T 細胞上に発現する共抑制性受容体の機能異常が指摘されている。そこで、疾患修飾治療によって良好な経過をとる MS 患者から得られた T 細胞亜分画の発現遺伝子の中から最近筆者らが同定した免疫寛容の核となる遺伝子モジュールに含まれる遺伝子群を MS における免疫制御遺伝子群と抽出し、その表面受容体遺伝子の免疫制御機能や転写制御機構について解析を行なっている（下図）。本研究では Cysteinyl Leukotriene Receptor 1（Cysltr1）に注目し MS におけるその機能について解明することを目的とした。

【方法】本研究では以下の方法を用いて、MS における T 細胞上に発現する Cysltr1 を含む表面受容体についてその免疫制御機能の解析を行った。1. MS 治療薬であるインターフェロンβ治療レスポンダー患者末梢血中の $CD4^+$ T 細胞について代表的な共抑制性受容体 Programmed cell death 1（PD-1）と共発現する遺伝子群を抽出するために PD-1 陽性 $CD4^+$ T 細胞と PD-1 陰性 $CD4^+$ T 細胞の両者についてセルソーターを用いて抽出し、それらに発現する遺伝子を RNA-sequence 法を用いて網羅的に解析し、両者の発現変動遺伝子について抽出した。2. $CD4^+$ T 細胞の亜分画の解析を行うため C57BL/6 マウスの脾臓及びリンパ節由来のナイーブ T 細胞に対して各種分化刺激を行い、Cysltr1 の発現を解析した。3. MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）を用いた Cysltr1 の機能解析を行った。

【結果】1. Cysltr1 は寛解期の MS 患者において PD-1 陰性 $CD4^+$ T 細胞と共発現した。インターフェロンレスポンダー患者末梢血から分離した PD-1 陽性 $CD4^+$ T 細胞と PD-1 陰性 $CD4^+$ T 細胞について両者間で 12,610 個の発現変動遺伝子を抽出した。抑制性遺伝子モジュール［1］に含まれる Cysltr1 は MS 患者 $CD4^+$T 細胞において有意差を持って PD-1 陰性細胞に発現が認められた。2. Cysltr1 は Th1 細胞や Th17 細胞に発現が認められた。Th1、Th2、Th17、Th17p、Tr1、iTreg 細胞の分化誘導を行った。Cysltr1 は主に Th1 と Th17、Th17p 細胞で発現が認められ、Tr1 や Treg 細胞ではほとんど発現が認められなかった。3. *Cysltr1* KO マウスは EAE を早期発症した。Cysltr1 がエフェクターT 細胞に発現することからその過剰活性化に対する制御機能を担っているかについて野生型マウスと *Cysltr1* KO マウスに髄鞘抗原（Myelin oligodendrocyte glycoprotein：MOG）を免疫して誘導した EAE では野生型と比して *Cysltr1* KO マウスでより早期の発症が認められた（unpublished data）。

MS における免疫制御遺伝子の検出



61. 神経免疫疾患における Cysltr1 の免疫寛容機構の解明

千原　典夫

神戸大学 医学部附属病院 神経内科

Key words：多発性硬化症，免疫寛容，PD-1，Cysltr1，T 細胞

緒　言

過剰な免疫応答は自己免疫疾患を招き、過度の免疫抑制は腫瘍の出現を生む。免疫機能の恒常性を維持するためにはその両者の特徴の理解が肝要である。代表的な自己免疫性神経疾患である多発性硬化症（Multiple Sclerosis：MS）などの中枢神経の自己免疫疾患では免疫寛容機構の破綻が炎症の継続と神経障害の蓄積を来す。MS は中枢神経内に多発性の炎症性病変を生じる自己免疫疾患で、臨床的には永年にわたって再発と寛解を繰り返すが、徐々に神経変性が進行して車椅子生活を余儀なくされる例も稀ではない。一方で長期間疾患修飾治療薬が奏功する良性 MS 例があり、例えばインターフェロンβ治療で効果が得られた例はレスポンダーとして 10 年を超えて安定した経過をとる。進行性 MS と良性 MS の違いを解明することが治療戦略の上で肝心だが、経時的な組織変化を観察することは難しく、変化する免疫病態の核心に迫るためには何らかの鋳型モデルが必要である。一方で、持続的な自己免疫反応の原因の一つとして、T 細胞上に発現する共抑制性受容体の機能異常が指摘されている。そこで、我々は MS を始めとする免疫性神経疾患においては T 細胞に共抑制性受容体の共発現を誘導することが病勢の抑制に繋がり、その遺伝子発現機構の解明がより病態に沿った治療に繋がるのではないかと考え研究を展開している。

我々は抑制性サイトカイン IL-10 を産生する抑制性 T 細胞（Tr1 細胞）に発現する遺伝子の中に T 細胞の疲弊（疲弊 T 細胞）や免疫寛容状態といった免疫抑制環境において機能不全に陥っている T 細胞に共通して発現する共抑制性受容体群があり、それらが Prdm1 と c-Maf という 2 つの転写因子によって制御されている遺伝子モジュールを見出した［1］。この遺伝子発現プログラムの中から 50 を超える新規の細胞表面受容体の候補遺伝子を同定した。

Cysteinyl Leukotriene Receptor 1（Cysltr1）は気管支喘息において気管支平滑筋収縮に関わるシステイニルロイコトリエン（cys-LTs）の受容体の一つである。Cys-LTs は type2 免疫応答によって好中球や好酸球、肥満細胞、中枢神経内のミクログリアから産生されるエイコサノイドで、Cysltr1 は T 細胞に発現しているが機能的な解析は少なく MS における T 細胞への影響は不明な点が多い。本研究では治療によって良好な経過をとる MS 患者から得られた T 細胞亜分画の発現遺伝子の中から最近筆者らが同定した免疫寛容の核となる遺伝子モジュール［1］に含まれる Cysltr1 に注目し MS におけるその発現と機能について解析を行った。Cysltr1 は寛解期の MS 患者において Programmed cell death1（PD-1）陰性 $CD4^+$ T 細胞と共発現しており、興味深いことに MS 病態において病原性エフェクターT 細胞として知られる Th1 や Th17 細胞での発現が上昇していた。MS 動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の検討も踏まえて Cysltr1 の役割はエフェクターT 細胞における過剰活性化に対する制御機能が考えられた。共抑制性受容体は機能低下 T 細胞に共発現するが、そこから得られた抑制性受容体候補は自己免疫疾患においては、エフェクターT 細胞の機能制御に関わっている場合があり、疾患毎に特徴的な役割と病態に即した治療戦略を構築するためのさらなる研究の積み重ねが必要であると考える。

方　法

本研究では以下の方法を用いて、MS における T 細胞上に発現する Cysltr1 を含む表面受容体についてその免疫制御機能の解析を行った。

1.　MS 患者検体を用いた解析

MS 治療薬であるインターフェロン（IFN）β治療を受け、長期にわたり再発を来さず寛解状態が続いている、IFNβレスポンダー患者末梢血中の $CD4^+$ T 細胞について代表的な共抑制性受容体 PD-1 と共発現する遺伝子群を抽出するために PD-1 陽性 $CD4^+$ T 細胞と PD-1 陰性 $CD4^+$ T 細胞の両者についてセルソーターを用いて抽出し、それらに発現する遺伝子を RNA-sequence 法を用いて網羅的に解析した。発現遺伝子については FPKM 補正を行い、PD-1 陽性 $CD4^+$ T 細胞/PD-1 陰性 $CD4^+$ T 細胞間で認められる発現変動遺伝子について抽出した。

2.　T 細胞分化誘導解析

$CD4^+$ T 細胞の亜分画の解析を行うためナイーブ T 細胞に対して抗原非特異的な刺激として抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体を用いて分化誘導刺激を加えた T helper（Th）0 細胞を基本としてインターロイキン（IL）-12 を加える Th1、IL-4 を加える Th2、IL-6 と Transforming Growth Factor （TGF）-βを加える Th17、IL-6 と IL-1β及び IL-23 を加える pathogenic Th17（Th17p）、IL-27 を加える Tr1、TGF-βを加える induced T regulatory（iTreg）細胞を分化誘導し Cysltr1 の発現を解析した。

3.　動物モデルを用いた機能解析

MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）を用いた Cysltr1 の機能解析を行った。

結　果

1.　Cysltr1 は寛解期の MS 患者において PD-1 陰性 $CD4^+$ T 細胞と共発現した

IFNβレスポンダー患者末梢血から分離した PD-1 陽性 $CD4^+$ T 細胞と PD-1 陰性 $CD4^+$ T 細胞について RNA-sequence 法を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、両者間で 12,610 個の発現変動遺伝子を抽出した。抑制性遺伝子モジュールに含まれる遺伝子群を用いて、得られた発現変動遺伝子と共通の遺伝子群を抽出した（図 1）。本研究で取り上げた Cysltr1 は共通の遺伝子群に含まれ、IFNβレスポンダーMS 患者 T 細胞において有意差を持って PD-1 陰性 $CD4^+$ T 細胞に発現が認められた（図 2）。

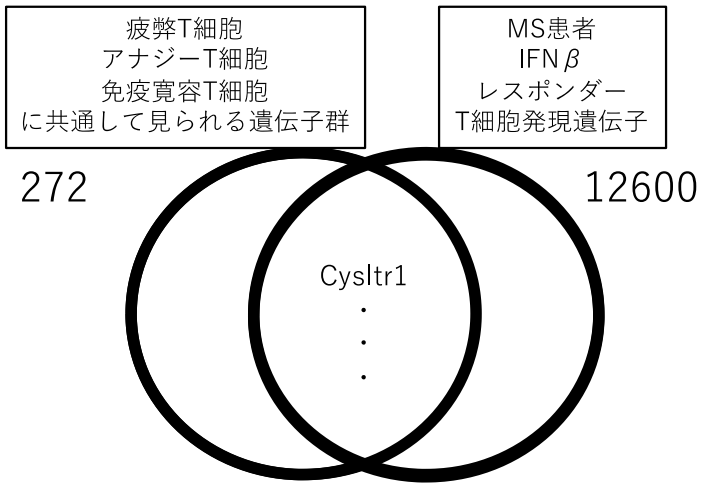


図 1.　MS における免疫制御遺伝子の検出
良好な経過を示す MS 患者（IFNβレスポンダー）から得られた T 細胞での発現遺伝子から複数の免疫抑制環境において機能不全に陥っている T 細胞に共通して発現する遺伝子群に共通するものを抽出した。

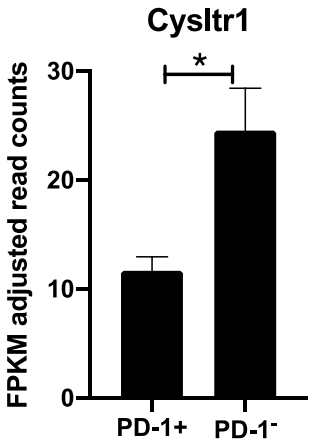


図 2. PD-1 陰性 $CD4^+$ T 細胞は Cysltr1 を発現する
IFNβレスポンダーMS 患者（N＝4）の末梢血の $CD4^+$ T 細胞について RNA-sequence を行い、*Cysltr1* 遺伝子発現量をプロットした。（*：$p < 0.05$, paired t-test）

2. Cysltr1 は Th1 細胞や Th17 細胞に発現が認められた

MS やその動物モデルである EAE においては Th1 細胞や Th17 細胞が病原性を有し、病原性エフェクターT 細胞として知られ、Treg 細胞や Tr1 細胞は病態に対して抑制性機能を持つとされる。IFNβレスポンダー患者において Cysltr1 が PD-1 陰性 $CD4^+$ T 細胞に発現が認められたことから、Cysltr1 は抑制性 T 細胞ではなく、エフェクターT 細胞に発現し過剰活性化に対する免疫制御の役割を有するのではないかと考えた。多様な $CD4^+$ T 細胞の亜分画における Cysltr1 の発現を解析するために、C57BL/6 マウスの脾臓及びリンパ節由来のナイーブ T 細胞を用いて Th1、Th2、Th17、Th17p、Tr1、iTreg 細胞の分化誘導を行った。Cysltr1 は主に Th1 と Th17、Th17p 細胞で発現が認められ、Tr1 や Treg 細胞ではほとんど発現が認められなかった。Cysltr1 は気管支喘息などのアレルギー疾患で Th2 細胞の活性化作用が知られ、Cysltr1 の阻害剤であるモンテルカストは気管支喘息の治療薬として用いられる。興味深いことに今回の研究では Th2 細胞と比して Th1 や Th17 細胞における Cysltr1 発現が高値であった（図 3）。

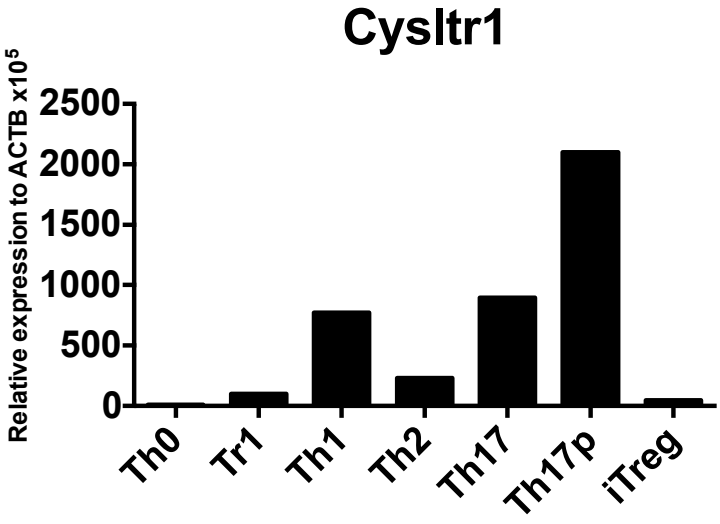


図 3. Cysltr1 は Th1 と Th17 で発現する
ナイーブ T 細胞を各 Th 細胞へ分化誘導し qRT-PCR 法を用いて Cysltr1 と housekeeping gene であるアクチンβ（ACTB）の発現を解析した。図は代表的な発現比率を示している。

3. *Cysltr1* KO マウスは EAE を早期発症する

Cysltr1 がエフェクターT 細胞に発現することからその過剰活性化の制御機能を担っているかについて野生型マウスと *Cysltr1* KO マウスに髄鞘抗原（Myelin oligodendrocyte glycoprotein：MOG）を免疫して誘導した EAE では野生型と比して *Cysltr1* KO マウスでより早期の発症が認められた（unpublished data)。現在詳細な T 細胞機能解析を行なっている。

考　察

T 細胞は我々の免疫システムで重要な役割を果たす白血球の一種で、抗原に対する免疫応答の恒常性の維持に主体的に関与している。長期にわたる抗原刺激や細胞表面受容体を介した複数の細胞外シグナルは、その恒常性を変化させ、宿主の免疫応答に大きな影響を及ぼす。PD-1 などの共抑制性受容体は免疫チェックポイント分子として知られ、その過剰発現は疲弊 T 細胞につながる。疲弊 T 細胞においてはエフェクターT 細胞で見られる細胞傷害性や炎症性サイトカインの産生能が低下し、免疫システムが慢性ウイルス感染や癌と戦う能力を弱める。一方で、自己免疫疾患においてはこれらを介したシグナルの制御不全によって病原性エフェクターT 細胞上に共発現する共刺激性受容体シグナルが強くなるために、制御不全 T 細胞となって慢性的な持続炎症の原因となる可能性がある。筆者は疾患修飾治療薬によって良好な経過をとる MS 患者から得られた T 細胞亜分画の発現遺伝子の中から最近筆者らが同定した免疫寛容の核となる抑制性遺伝子モジュール［1］に含まれる遺伝子群を MS における免疫制御遺伝子候補としてその表面受容体機能と転写制御について研究を展開している。本研究で注目した Cysltr1 は気管支喘息において気管支平滑筋収縮に関わるエイコサノイドである cys-LTs の受容体の一つである。Cys-LTs 合成に必要な 5-lipoxygenase は MS の病変部位に発現していることが知られている［2]。Cysltr1 は T 細胞に発現しており、Cysltr1 の阻害剤である Montelukast は EAE モデルでの中枢浸潤 T 細胞を減少させて軽症化することが報告されている［3］が T 細胞分化における機能的な解析は少ない。本研究の現在までの進捗状況では Cysltr1 が IFNß レスポンダー MS 患者において PD-1 陰性 $CD4^+$ T 細胞と共発現しており、興味深いことに MS 病態において病原性エフェクターT 細胞として知られる Th1 や Th17 細胞での発現が上昇していた。一方で、*Cysltr1* KO マウスを用いた Th1 や Th17 への分化誘導によるそれぞれを特徴づける炎症性サイトカイン IFNγおよび IL-17 の発現量は野生型と比して差がなかった（unpublished data)。これまで　*Cysltr1* KO マウスを用いた EAE は報告されていないが、野生型と比べてより早期の発症が認められたことから Cysltr1 は病原性 T 細胞分化を遅らせるないしその中枢浸潤を抑制する作用があるものと思われる。この結果は上述の Cysltr1 阻害剤治療における結果と相反するが、阻害薬治療は T 細胞プライミング以外の様々なフェーズに影響する可能性があり、必ずしも T 細胞への直接の作用を反映していない可能性がある。一方で、cys-LTs の受容体として Cysltr1 以外に Cysteinyl Leukotriene Receptor 2、GPR99 が知られており［4]、*Cysltr1* KO が T 細胞分化において他の受容体機能に影響を及ぼしている可能性もあり更なる解析が必要である。

腫瘍微小環境や慢性感染症において認められる疲弊 T 細胞では PD-1 発現を特徴とするが、PD-1 はエフェクター T 細胞に発現することが知られており、上述の抑制性遺伝子モジュールにも含まれていない。PD-1 と共発現するその他の共抑制性受容体である T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3（Tim-3)、Lymphocyte-activation gene 3（Lag-3)、T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains（TIGIT）などが PD-1 発現 T 細胞に共発現することでエフェクターT 細胞は疲弊 T 細胞へと分化を進める［5]。Cysltr1 が PD-1 陰性 $CD4^+$ T 細胞で認められ、自己免疫疾患モデルに対して免疫制御に働く可能性を示したことは、Cysltr1 がエフェクターT 細胞の過剰な活性化を制御する機能を有していることを示唆する。一般に共抑制性受容体は機能低下 T 細胞に共発現するが、そこから得られた抑制性受容体候補は自己免疫疾患においては、エフェクターT 細胞の機能制御に関わっている場合があり、必ずしも他の共抑制性受容体との共発現を示していないことから、より汎用性のある抑制性遺伝子モジュールとして用いることができるかもしれない。疾患毎に特徴的な役割と病態に即した治療戦略を構築するためのさらなる研究の積み重ねが必要であると考えた。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、米国ブリガム婦人病院の Vijay K. Kuchroo 教授及び Frank K. Austin 教授である。この場をお借りして深謝申し上げる。

文　献

1) Chihara N, Madi A, Kondo T, Zhang H, Acharya N, Singer M, et al. Induction and transcriptional regulation of the co-inhibitory gene module in T cells. Nature. 2018;558(7710):454-9.
2) Whitney LW, Ludwin SK, McFarland HF, Biddison WE. Microarray analysis of gene expression in multiple sclerosis and EAE identifies 5-lipoxygenase as a component of inflammatory lesions. J Neuroimmunol. 2001;121(1-2):40-8.
3) Wang L, Du C, Lv J, Wei W, Cui Y, Xie X. Antiasthmatic drugs targeting the cysteinyl leukotriene receptor 1 alleviate central nervous system inflammatory cell infiltration and pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol. 2011;187(5):2336-45.
4) Kanaoka Y, Maekawa A, Austen KF. Identification of GPR99 protein as a potential third cysteinyl leukotriene receptor with a preference for leukotriene E4 ligand. J Biol Chem. 2013;288(16):10967-72.
5) Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. Immunity. 2016;44(5):989-1004.