

学 位 論 文 題 名

Induction of Circulating Myelin Basic Protein and Proteolipid Protein-specific Transforming Growth Factor- β 1-secreting Th3 T Cells by Oral Administration of Myelin in Multiple Sclerosis Patients

（ミエリン蛋白を経口投与された多発性硬化症患者におけるミエリン塩基性蛋白およびプロテオリピッドプロテイン特異的 TGF- β 1 分泌性Th 3 T細胞の促進）

学位論文内容の要旨

はじめに

多発性硬化症（multiple sclerosis, 以下MS）は、中枢神経系central nervous system (CNS)におけるリンパ球の浸潤と脱髄を特徴とする慢性炎症性疾患である。その病因はいまだ明かではないが、MSは中枢神経のミエリン蛋白を認識するTh1T細胞によって引き起こされる自己免疫疾患と考えられている。実験的脳脊髄炎（experimental autoimmune encephalomyelitis, 以下EAE）は、ミエリン塩基性蛋白（myelin basic protein, 以下MBP）、プロテオリピッドプロテイン（proteolipid protein, 以下PLP）を認識する活性化T細胞によって引き起こされる自己免疫性中枢性疾患で、病理学的にMSに類似する。EAEでは、interleukin-2(IL-2), interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), lymphotoxinを分泌する活性化されたCD4+ミエリン特異的T細胞がCNSに移行し病気を引き起こすと考えられている。その緩解にはinterleukin-4(IL-4), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)の分泌が関連すると言われている。抗原の経口投与はsystemic immune reactionsを抑制するトレランスを誘導するために古くから用いられている。この方法はarthritis, uveitis, diabetesやMSの動物モデルであるexperimental autoimmune diseasesを抑制することが可能である。経口トレランスによる抗原特異的な抑制に関しては、3つのメカニズムが提唱されている。最初の2つは、high doseの抗原投与により、強力なT細胞受容体シグナルが抗原特異的な細胞に届くことにより抗原特異的な細胞がdeletionかanergyとなるというものである。対照的に、頻回のlow doseの抗原投与は、IL-4, IL-10, TGF- β 1を分泌するregulatory T cellを誘発する。Low doseのMBPを経口投与されたmiceのmesenteric lymphnodesから分離されたT細胞クローンは、encephalitogenicなCD4+Th1T細胞クローンと、T cell receptor usage, MHC class II restrictionそして epitope recognitionにおいてstructurally identicalであったが、IL-4, IL-10, TGF- β 1を分泌していた。そしてこのクローンは、MBP, PLPによって誘導されたEAEを抑制した。我々は以前に、二重盲検法により、1年以上にわたりMBP, PLPを含むミエリン蛋白を服用した30名のMS患者においてside effects やtoxicityがなく、MBP反応性T細胞の頻度が、非服用群に比べ減少していることを報告した。臨床的には、特にDR2陰性の男性患者群の再発の頻度が減少する傾向を示した。本研究では、MS患者に対するミエリン蛋白の経口投与が、IL-4, TGF- β 1を分泌するMBP, PLP特異的T細胞を誘導するか、またTh1タイプの感作がproliferation, IFN- γ の測定により認められるかどうかを検討した。

方法

対象はPhase I, Oral Myelin Trialの17例の増悪緩解型のMS患者で、2年以上におよび連日経口で、300mgの牛ミエリン蛋白を摂取した。myelin非投与の17例の増悪緩解型MS患者を比較対照群とした。患者の末梢血よりFicoll法を用いて、peripheral blood mononuclear cellsを分離し、 1×10^7 /mlとなるように、RPMI 1640に2mMのL-glutamine, 100U/100mg/mlのpenicillin/streptomycin, 10%のautologous serumを加えた培養液

で調整した。1wellあたり、 2×10^5 のPBMCを、抗原MBP, PLP, tetanus toxoid(TT)とともに96穴のプレートで培養した。1週間後に凍結乾燥したautologous PBMCをirradiationの後antigen presenting cells(APC)として用い、最初と同じ抗原にて再刺激をした。培養9日目に、mediaを交換し、IL-2, IL-4を加えた。14日目に、同一のwellから、新たに4つのwellをつくり、2つには、抗原とともにirradiateしたAPCを、別の2つには抗原を加えていないirradiateしたAPCを加えて再刺激した。24時間後、各wellからsupernatantをとりだしIL-4, IFN- γ 測定用に凍結乾燥し、serum free mediaを加えた。さらに72時間後に再度supernatantを、TGF- β 1測定用にとりだし凍結乾燥した。培養しているT cellには、media, ^3H -thymidineを加え、18時間後にuptakeを測定した。cytokine(IL-4, IFN- γ , TGF- β 1)は、ELISAにて測定した。

結果

stimulation index >3 , delta CPM >500 のT cell lineを、positive lineとした。ひとつのplateあたりの、positive T cell linesを%にてあらわし、治療群、非治療群で比較検討した。治療を受けたMS群からのMBP, PLP特異的T細胞のfrequencyは、非治療群MSにくらべ低い傾向を示したものの、統計的有意差には至らなかった。一方TTに対するT細胞のfrequencyは、治療群、非治療群で差を認めなかった(MBP: myelin treated 1.3 ± 0.5 , nontreated 3.4 ± 2.5 , PLP: myelin treated 3.7 ± 1.0 , nontreated 7.6 ± 3.6)。MBP, PLP, TTに対する抗原特異的T細胞から分泌されたcytokine(IL-4, IFN- γ , TGF- β 1)産性細胞のrelative frequencyを、治療群、非治療群で比較検討した。治療を受けたMS群では、非治療MS群にくらべ、TGF- β 1を分泌するMBP特異的T細胞が著しく増加しているのを認めた(myelin treated 9.9 ± 2 , nontreated 1.3 ± 0.5 , $p < 0.001$)。また、IL-4を分泌するMBP特異的T細胞も、治療群で増加を認めたが、統計的有意差には至らなかった(myelin treated 6.5 ± 2.7 , nontreated 1.3 ± 0.7 , $p < 0.099$)。IFN- γ を分泌するMBP特異的T細胞は、治療群、非治療群で差を認めなかった(myelin treated 5.0 ± 2.5 , nontreated 6.4 ± 1.8)。PLPに関してはMBPと同様、治療を受けたMS群でTGF- β 1を分泌するPLP特異的T細胞が、非治療群MSにくらべ著しく増加しているのを認めた(myelin treated 9.5 ± 2.2 , nontreated 1.1 ± 0.7 , $p < 0.003$)。IL-4を分泌するPLP特異的T細胞は、両群で差を認めなかったが、IFN- γ を分泌するPLP特異的T細胞が、治療群で低下している傾向が認められた(myelin treated 6.1 ± 2.5 , nontreated 13.7 ± 7.4 , $p < 0.264$)。TGF- β 1を分泌するT細胞がmyelin antigen specificかどうかを調べるため、TTをcontrol antigenとして用いた。両群で、cytokine(IL-4, IFN- γ , TGF- β 1)を分泌するT細胞のfrequencyは差を認めなかった(TGF- β 1; myelin treated 1.9 ± 1.2 , nontreated 2.0 ± 1.2 , IL-4; myelin treated 1.0 ± 0.5 , nontreated 0, IFN- γ ; myelin treated 39.8 ± 12.1 , nontreated 65.8 ± 6.3)。治療群の中で、2人の患者が高いIL-4 secreting T cellのfrequencyを示した。その両患者のIL-4 secreting T cellのうちいくつかは、同時にTGF- β 1を分泌していたが、IFN- γ の分泌は、認められなかった。TGF- β 1 secreting T cellのほとんどは、CD4 $^{+}$ Th3 cell typeと考えられた。MBP反応性TGF- β 1 secreting T cellとPLP反応性TGF- β 1 secreting T cellのfrequencyは、患者個人個人で大きなvariationがあった。しかし、MBP vs. PLP reactive TGF- β 1 secreting T cellのrelative frequencyには相関が認められた。

考察

この研究は、長期にわたるmyelinの経口投与が、MS患者におけるMBP, PLPreactive T cellsのfrequencyや、cytokine secretion patternに影響を及ぼすかどうかを調べる目的で行われた。今回我々は、myelin treated MS patientsにおけるTGF- β 1 secreting T cellのfrequencyが、TTに対しては変化を認めないもののMBP, PLPに対して著しく上昇しているのを示した。このdataは、autoimmune diseaseを持つ個人においてantigen specific immunotherapyによってもたらされたcytokine deviationを示しており、我々が以前に示した、経口でMBPを摂取していたmiceでMBP specific TGF- β 1 secreting T cellの増加を認めたことと矛盾しない。

結論

MS patientsにおけるoral administration of myelinが、MBP and PLP-specific TGF- β 1-secreting T cellのfrequencyの増加をもたらした。この結果は、oral tolerization with MBPの後のanimalにおけるthe cytokine secretion profile of regulatory T cellsと矛盾しない。これらのantigen-specific regulatory T cellsが、中枢神経系へのhomingに際し、bystander suppressionとして定義されるmechanismによって、進行しているantigen nonspecific fashionなautoimmune immune responseをTGF- β 1のsecretingによって抑制すると予想される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 代 邦 雄

副 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 皆 川 知 紀

学 位 論 文 題 名

Induction of Circulating Myelin Basic Protein and Proteolipid Protein-specific Transforming Growth Factor- β 1-secreting Th3 T Cells by Oral Administration of Myelin in Multiple Sclerosis Patients

(ミエリン蛋白を経口投与された多発性硬化症患者におけるミエリン塩基性蛋白およびプロテオリピッドプロテイン特異的 TGF- β 1 分泌性Th 3 T細胞の促進)

抗原の経口投与は systemic immune reactions を抑制するトレランスを誘導するために古くから用いられている。この方法は arthritis, uveitis, diabetes や MS の動物モデルである experimental autoimmune diseases を、IL-4, IL-10, TGF- β 1 を分泌する regulatory T cell を誘発することにより抑制することが可能である。

多発性硬化症 (multiple sclerosis, 以下MS) は、中枢神経系におけるリンパ球の浸潤と脱髄を特徴とする慢性炎症性疾患である。その病因はいまだ明かではないが、MS は中枢神経の myelin を認識する Th1T 細胞によって引き起こされる自己免疫性疾患と考えられている。本研究では、MS 患者に対する myelin の経口投与が、IL-4, TGF- β 1 を分泌する MBP, PLP 特異的 T 細胞を誘導するか、また Th1 タイプの感作が proliferation, IFN- γ の測定により認められるかどうかを検討した。

3 4 例の増悪緩解型の MS の患者(17 例は 2 年以上にわたり連日 myelin の経口投与を受けており、他の17 例は myelin 非投与群である比較対照群)から MBP, PLP, TT(tetanus toxoid) specific な 4,860 の short term T cell lines を樹立した。治療を受けた MS 群では、非治療 MS 群にくらべ、TGF- β 1 を分泌する MBP, PLP 反応性 T 細胞が著しく増加しているのを認めた (MBP $p < 0.001$, PLP $p < 0.003$)。一方、MBP もしくは PLP 反応性に IFN- γ を分泌している T 細胞や TT反応性にTGF- β 1を分泌している T 細胞の頻度は、治療を受けた MS 群、非治療 MS 群において変化を認めなかった。

これは、抗原特異的にTGF- β 1を分泌するTh 3 T細胞が、抗原の経口投与によっ

て誘導され得る事を示した。自己抗原の経口投与が、標的臓器に集積して局所での炎症を抑えるTh 3 T細胞を誘導すると予想され、自己免疫性疾患の治療につながる可能性を示した。

公開発表にあたり副査の皆川教授より、正常者における TGF- β 1分泌性 Th 3 T 細胞の有無、局所における IFN- γ の産生とその抑制のメカニズムなど、また副査の小野江教授より oral tolerance が Th1 T細胞を抑制するメカニズム、IL-4, TGF- β 1を出している細胞について、MS における DR2 と oral tolerance との関連について、さらに岩淵助手より血中の各種抗体価, oral tolerance の効果に影響を及ぼす各種 factor、bovine myelin の安全性、加えて小笠原助教授より in vitro において Th3 T 細胞が Th1T 細胞を抑制するかどうか、oral tolerance の治療効果の継続性などについても質問があった。最後に主査の田代教授より oral tolerance の臨床における応用についての質問があった。何れの質問に対しても、申請者はスライドによる補足説明、文献的考察、現在進行中の実験結果など、豊富な知識に基づいて概ね妥当な回答を行った。

MS における myelin の経口投与については、多施設臨床試験が現在進行中であり、今後 oral tolerance の役割の解明に寄与することが出来ると期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有すると判定した。