

学位論文題名

Immunoregulatory function mediated by Toll-like receptor 9 in B cells in multiple sclerosis

(多発性硬化症の B 細胞における Toll-like receptor 9 と
免疫調節性機能に関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

多発性硬化症(Multiple sclerosis: MS)は脱髄を主体とした中枢神経系の炎症性疾患であり、中枢神経の複数の部位に病変が存在し(空間的多発性)、また増悪と寛解を繰り返す(時間的多発性)ことを特徴とする。中枢神経髄鞘を標的とした自己免疫疾患と考えられているが詳細な病態は解明されておらず、免疫学的機序のほか、遺伝的要因や環境要因など様々な角度から病態の研究が行われている。

近年、本邦では MS の有病率が大きく上昇しており、それに伴い、従来日本人に多いとされてきた視神経脊髄型 MS から欧米人と同様な病像を呈する、いわゆる通常型 MS へと臨床像が変化しつつある。このように本邦における MS の臨床像はここ数年で大きく変化しつつある。MS における自己免疫動態は Th1 細胞、Th17 細胞系列が疾患増悪に関連するとして獲得免疫を中心に解析されてきたが、このような変化の一因に MS の自己免疫動態における自然免疫の影響が示唆されている。古くから MS の発症や再燃に関わる因子のひとつに微生物感染が挙げられており、その一因として分子相同性や Toll-like receptor (TLR) を介したシグナル伝達の関与が推測されている。

TLR は自然免疫における病原体認識分子であるが、その機能は自然免疫にとどまらず獲得免疫もダイナミックに誘導することから近年注目されているレセプターである。自己免疫疾患における TLR の機能は疾患増悪と寛解のいずれにも働くことが報告されており、その詳細な作用機序は不明であるが、最近自己免疫性脳脊髄炎において TLR9 が免疫調節性機能を誘導する可能性が報告された。TLR9 は B 細胞と形質細胞様樹状細胞に発現し、非メチル化 DNA (CpG DNA) がリガンドとして同定されている。

一方、B 細胞の液性免疫機能は古くから知られているが、近年 B 細胞のもつ免疫調節性機能が注目されている。その免疫調節の機序として B 細胞より産生される interleukin (IL)-10 の重要性が指摘され、MS では B 細胞の IL-10 産生が低下していることが報告されている。B 細胞の免疫調節性機能に関わる因子として、樹状細胞の関与や、B 細胞に発現する TLR、B 細胞受容体、CD40 が報告されている。

このような背景から MS の B 細胞における TLR9 を介した免疫調節性機能の可能性について検討することを研究課題とした。

【対象と方法】

再発寛解型 MS 患者 36 例(再発期 6 例、寛解期 30 例で寛解期症例は未治療 10 例、イン

ターフェロン(IFN) β -1a 治療 10 例、IFN β -1b 治療 10 例) と健常者 10 例を対象とした。対象者の末梢血を採取し、Flow cytometry を利用し CD19 陽性 B 細胞表面における CD27、CD80、CD86 と B 細胞内における TLR9 の発現を測定した。また、単核球を分離したのち、磁気ビーズで CD19 陽性 B 細胞を分離、0.25 μ M の CpG DNA (ODN2006) で 24 時間刺激し、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて上清中の IL-10、IL-12(p40)、tumor necrosis factor (TNF)- α 、Lymphotoxin (LT) - α を測定した。統計解析は全群間におけるサイトカイン産生と B 細胞の抗原発現を一元配置分散分析(Analysis of Variance :ANOVA)ならびに Turkey-Kramer 検定を用いて行い、相関解析に関しては Spearman の相関解析を使用した。なお、本研究は北海道大学病院自主臨床研究審査委員会で承認され、対象者より文書で同意を頂いた。

【結果】

今回得られた知見は以下のとおりである。

- (1) CpG DNA 刺激による B 細胞の IL-10 産生は MS 群で有意に低かった。
- (2) CpG DNA 刺激による B 細胞の IL-12 (p40) 産生は再発期 MS 群で有意に高かった。
- (3) CpG DNA 刺激による B 細胞の TNF- α 、LT- α 産生は各群で有意差がなかった。
- (4) IFN 治療群と非治療群では CpG DNA 刺激による B 細胞のサイトカイン産生に有意な差を認めなかった。
- (5) memory B 細胞における TLR9 の Mean Fluorescence Intensity (MFI) は MS 群で有意に低かった。
- (6) memory B 細胞における TLR9 の MFI と B 細胞の IL-10 産生に有意な正の相関を認めた。

【考察】

今回の結果から、MS 患者では TLR9 を介した B 細胞のサイトカイン産生に調節障害があり、TLR9 を介した B 細胞の IL-10 産生の低下は memory B 細胞における TLR9 発現の低下に起因する可能性が考えられた。naive B 細胞と memory B 細胞はいずれも TLR9 を介して IL-10 産生を誘導しうるが、CpG DNA は一般に TLR9 が高発現している memory B 細胞へ直接的に作用し細胞分化を強く誘導することが報告されている。今回の結果と併せ、MS の memory B 細胞における TLR9 発現の低下が IL-10 産生の低下に影響している可能性が考えられた。また、TLR9 刺激による B 細胞産生性 IL-10 は Th17 細胞の機能を抑制することが報告されており、TLR9 を介した B 細胞への刺激が T 細胞などを含む MS の免疫動態に影響している可能性が考えられた。

【結論】

MS では TLR9 を介した B 細胞の IL-10 産生が低下し、B 細胞による免疫調節性機能が低下している可能性が示唆された。また、TLR9 を介した B 細胞の IL-10 産生の低下は memory B 細胞における TLR9 発現の低下に起因する可能性が考えられた。

今後は MS の形質細胞様樹状細胞における TLR9 の機能解析や、B 細胞における TLR9 と BCR、CD40 との相互作用の解析を研究課題と考えている。MS における TLR をはじめとした自然免疫に関する病態は未解明の部分が多く、また治療ターゲットの一つになり得る可能性を十分に秘めていることから、今後更なる研究を推し進める予定である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 田 晋
副 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 清 野 研 一 郎
副 査 教 授 佐 々 木 秀 直

学 位 論 文 題 名

Immunoregulatory function mediated by Toll-like receptor 9 in B cells in multiple sclerosis

(多発性硬化症の B 細胞における Toll-like receptor 9 と
免疫調節性機能に関する研究)

近年、本邦では多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)の有病率が大きく上昇している。それに伴い、本邦における MS の臨床像は、従来日本人に多いとされてきた視神経脊髄型 MS から欧米人と同様な病像を呈する、いわゆる通常型 MS へとシフトしつつある。MS における免疫動態は獲得免疫を中心に解析されてきたが、このような変化は自然免疫の影響が示唆され、特に分子相同性や Toll-like receptor (TLR) の関与が推測されている。

自己免疫疾患における TLR の機能は疾患増悪と寛解のいずれにも働くことが報告されているが、最近自己免疫性脳脊髄炎において TLR9 が免疫調節性機能を誘導する可能性が報告された。TLR9 は B 細胞と形質細胞様樹状細胞に発現し、CpG DNA がリガンドとして同定されている。一方、近年 B 細胞のもつ免疫調節性機能が注目されており、その機序として B 細胞産生性 interleukin (IL)-10 の重要性が指摘されている。

このような背景から MS の B 細胞における TLR9 を介した免疫調節性機能の可能性について検討することを研究課題とした。MS 患者 36 例を対象に CpG DNA で B 細胞を刺激し、そのサイトカイン産生を検討したところ、MS 患者では IL-10 産生が有意に低く、IL-12 産生が有意に高いことが判明した。また、MS 患者の memory B 細胞では TLR9 発現強度が有意に低く、さらに memory B 細胞における TLR9 発現強度と B 細胞からの IL-10 産生には強い相関が存在した。これらの結果から MS では TLR9 刺激による B 細胞性 IL-10 産生が低下しており、B 細胞による免疫調節性機能が低下している可能性が示唆された。

審査では MS の有病率上昇について MRI による診断技術の向上など、有病率上昇の修飾因子の可能性について問いがあった。発表者は 2006 年 Houzen らの論文を引用し、疫学調査のデザインについて触れ、MRI などの診断技術向上によるのではなく、真の有病率上昇が考えられることを説明した。また、衛生仮説についてその概要の問いがあった。発表者は従来の Th1-Th2 パラダイムでは衛生環境が改善することにより Th1 から Th2 偏倚が誘導さ

れることでアレルギー性疾患が増えている点を説明した。また MS は潰瘍性大腸炎などと同様に Th1 優位の疾患と考えられてきたが、近年 Th17 の病態への関与が報告されていることに触れ、衛生仮説は前述の Th1 から Th2 へのシフトのみではなく、IL-10 や TGF- β 産生低下により自己免疫疾患全体の増加に影響している可能性を説明した。今回提示した MS では TLR9 を介した B 細胞由来の IL-10 産生が低下している一方で IL-12 産生が上昇している結果について、その機序を求める問いがあった。発表者は TLR9 受容体を介した後の、下流シグナル伝達の差異を可能性に挙げた。また、B 細胞由来の IL-10 は MS 群全体で低下している一方で、IL-12 産生は再発期 MS 群でのみ上昇している結果に注目し、疾患活動性も影響している可能性を挙げた。MS では衛生仮説の他にも感染が発症や再燃の誘導因子になる知見を冒頭で紹介したが、MS において CD27 陽性 memory B 細胞における TLR9 発現が低下するという実験結果は過去の知見と相反すると解釈できる点について推測を求める問いもあった。発表者はまず、今回の実験モデルについて、本来であれば CD27 陽性 memory B 細胞を抽出してサイトカイン産生能を評価することが妥当であるが、実際には memory B 細胞を抽出することは大量の末梢血を必要とすることから困難であり、B 細胞の抽出にとどまっている点について触れた。その上で、MS の memory B 細胞における TLR9 発現の低下は何らかの feedback 機構が関与している可能性を示した。最後に、本研究の臨床への応用について問いがあった。発表者は今回の結果が MS の初発、いわゆる clinically isolated syndrome から MS への移行を占う因子になる可能性に触れた。さらに、近年 TLR は腸管免疫にも関連するとの報告が相次いでおり、食生活の欧米化や衛生環境の変化が腸管免疫を介して MS 発症に影響しているという仮説を提唱し、今回の結果が MS の予防に一石を投じる可能性についても説明した。

この論文は、MS における自然免疫と免疫調節性機能の重要性を示した点、また MS の臨床像の変化を免疫学的機序の観点から考察している点で高く評価され、今後の MS 病態の更なる解明に寄与することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。