

2023年10月11日

国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター (NCNP)

## 再発しない多発性硬化症の分子基盤を解明

多発性硬化症 (MS) は再発を繰り返しながら悪化していく難治性の自己免疫疾患ですが、発病時の病態は重症であっても、その後は再発しないケースもあります。頻回の再発のために高度の障害を残すケースもあるなかで、なぜ一部の患者さんは再発しないのかという基本的な疑問について、これまで明確な答は用意されていませんでした。今回、国立精神・神経医療研究センター (NCNP) 神経研究所免疫研究部の研究グループは、マウスの実験で、MS のモデル自己免疫性脳炎 (EAE) が再発を繰り返して慢性化するか、または再発しないかを決定する原因を探索しました。研究の結果、EAE の誘導に使うペプチドと主要組織適合抗原クラス II 分子 (MHC class II) の結合安定性がきわめて重要な要因であることを明らかにしました。研究成果は「Journal of Autoimmunity」オンライン版に2023年9月14日 (日本時間) に掲載されました。

筆頭著者である林幼偉 (りん・ようい) 研究員は、髄鞘 (ミエリン) 抗原であるプロテオリピッド PLP 139-151 (図 1) を EAE の誘導のためにマウスに接種すると、再発寛解型 MS に似た再発性の脳脊髄炎 (EAE<sup>1)</sup>) が誘導されるのに対して、PLP139-151 と 12 個のアミノ酸が共通している PLP136-150 ペプチドを接種すると、最初に強い麻痺症状が起きるが、再発しない脳脊髄炎を誘導できることを確認し (図 2)、一見同じように見える、この二種類のペプチドの何に違いがあるのか解析を進めました。林研究員は、PLP136-150 の方が PLP139-151 よりも自己免疫性炎症を抑制する抗原特異的な制御性 T 細胞<sup>2)</sup> を強く誘導するために、病気の再発が起らないことを免疫学的手法で証明しました。さらに共同研究者の櫻庭俊博士 (量子化学技術研究開発機構) は、PLP136-150 と PLP139-151 の MHC class II 結合能に関する動的構造解析の結果、PLP136-150 に比べて PLP139-151 の MHC class II 分子への結合が不安定であることを詳細な in silico 解析で明らかにしました。

これらの結果は、ペプチドと MHC class II の結合が安定しているほど、抗原特異的制御性 T 細胞が誘導されて再発が起らなくなることを支持するものです。PLP136-150 と PLP139-151 両ペプチドは MHC class II に同じアミノ酸を使って結合していると想定されるにもかかわらず (図 1)、それぞれの MHC class II 結合安定性が大きく異なることは予想外の結果でしたが、それは MHC class II がペプチドを結合する溝 (MHC groove) の外にはみ出たアミノ酸配列がペプチドと MHC 間の水素結合に影響を与えるからであることもわかりました。また研究チームは、強い炎症抑制能を有する制御性 T 細胞を同定するマーカー (CD69 陽性, CD103 陽性, CD25 強陽性) も同定しました。

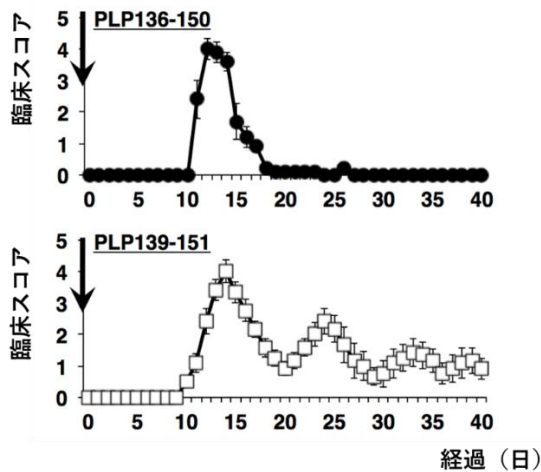
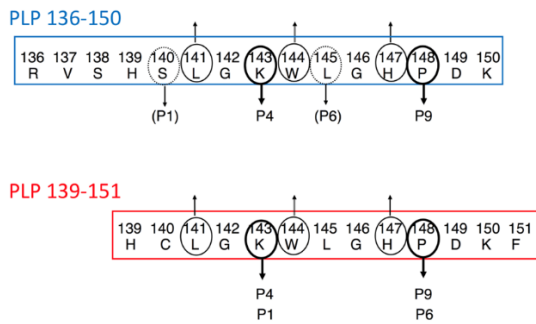


図 1 PLP136-150 と PLP139-151 の配列

PLP136-150 と PLP139-151 それぞれのアミノ酸配列を示します。上向きの矢印は、T 細胞抗原受容体 (T cell receptor ; TCR) に向かって側鎖を伸ばし TCR によって認識されることを示します。下向きの矢印は主要組織適合抗原 (MHC) class II 分子に向かい、MHC のアミノ酸結合ポケット (P1, P4, P6, P9) に結合することを示します。PLP136-150 と PLP139-151 は、TCR および MHC class II に結合するアミノ酸配列を共有しているため、研究を開始した当時は、二つのペプチドで誘導される

図 2 PLP136-150 と PLP139-151 で誘導される EAE の違い

PLP136-150 で EAE を誘導すると (上パネル)、麻痺症状が出て 10 日以内に回復しました。一方、PLP139-151 で誘導した EAE では麻痺症状は何度も再発するという経過を示しました。

## ■研究の背景

EAE の症状や臨床経過は、誘導に用いるペプチドとマウス種類の組み合わせによって異なります。例えば B6 マウスに MOG 35-55 ペプチドを接種すると進行的で回復に乏しい麻痺症状の EAE が誘導されます。一方で、SJL/J マウスに PLP139-151 ペプチドを接種すると、最初の麻痺症状は回復しても再発を繰り返します。PLP が EAE を誘導することを最初に証明したのは、当センターの前身である国立武蔵療養所神経センターの田平武博士の研究チームですが<sup>\*1,2</sup>、米国で多数のペプチドライブラリーのスクリーニングにより PLP139-151 の EAE 誘導能が発見されたのに対して<sup>\*3</sup>、田平研では酵素分解で得られた蛋白断片を使って PLP136-150 が EAE を誘導することを報告しました<sup>\*4</sup>。両者はほとんど同じ配列のように見えたが、PLP136-150 で誘導した EAE はまったく再発しないことが我々の研究室で確認され、その理由は不明なままに時間が過ぎていきました。マウスの違いや誘導条件の違いではなく、ペプチド配列の微妙な違いに原因があるのだろうと考えられました。ただ、PLP136-150 と PLP139-151 は T 細胞抗原受容体 (TCR) および MHC class II には同じアミノ酸を使って結合すると推定され (図 1)、片方のペプチドだけが再発性の EAE を起こすことが理解できませんでした。しかし再発性の病気を起こすペプチドと、一時的で再発しない病気を誘導するペプチドの研究は、自己免疫疾患の慢性化の理解に役立つだけでなく、ペプチドの免疫原性 (免疫反応の誘導しやすさ) を理解する上でも興味深く、我々は研究を継続しました。

### PLP136-150 は制御性 T 細胞を誘導する

PLP136-150 で誘導した EAE が回復したあと、もう一度 PLP ペプチドで EAE を誘導しようとしても決して EAE は起こりません (図 3A)。しかし PLP139-151 で誘導した EAE の回復期には、PLP ペプチド接種によって強い EAE が誘導されました。PLP136-150 で誘導された EAE が再発しないことや、EAE の再誘導に抵抗性を示すことは、強力な免疫制御系が作用していることが示唆されました。そこで制御性 T 細胞 (Treg) に着目して研究を進めました。PLP136-150 で EAE を誘導してから、Treg を除去する作用のある抗 CD25 抗体を投与し、約 1 週間後に PLP136-150 を接種したところ、今度は EAE がみごとに誘導されました (図 3B)。この結果は PLP136-150 で免疫すると、制御性 T 細胞が強力に誘導されることを示唆しました。

PLP136-150 によって CD69 と CD103 を発現する Treg が誘導されやすいこと、CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> Treg には強力な EAE 抑制活性のあることなどを確認しました。さらに我々は抗原特異的な Treg を同定する技術・試薬 (PLP ペプチドを結合する MHC class II デキストラマー; PLP139-151/I-As dextramer) を米国の研究者 (ネブラスカ大学 Jay Reddy 教授) に提供していただき、PLP139-151 特異的 T 細胞の数を評価しました。PLP136-150 または PLP139-151 で EAE を誘導して約 1 か月後にリンパ節からリンパ球やリンパ芽球を分離して解析したところ、PLP136-150 で EAE を誘導した場合に CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 制御性 T 細胞中の PLP 特異的 T 細胞の数が有意に増加しており (図 4)、PLP136-150 には抗原特異的な Treg を誘導する能力が強いことがわかりました。つぎに PLP136-150 と PLP139-151 のペプチド量を 10 分の 1 に減量して EAE を誘導したところ、この suboptimal な条件では、PLP136-150 において EAE 誘導能が強いことがわかりました。EAE を誘導する抗原特異的 T 細胞の誘導能においても、また抗原特異的 Treg の誘導能においても、PLP136-150 は PLP139-151 よりも優れており、抗原特異的 Treg の誘導によって EAE の再発がみられなくなることが推測されました。

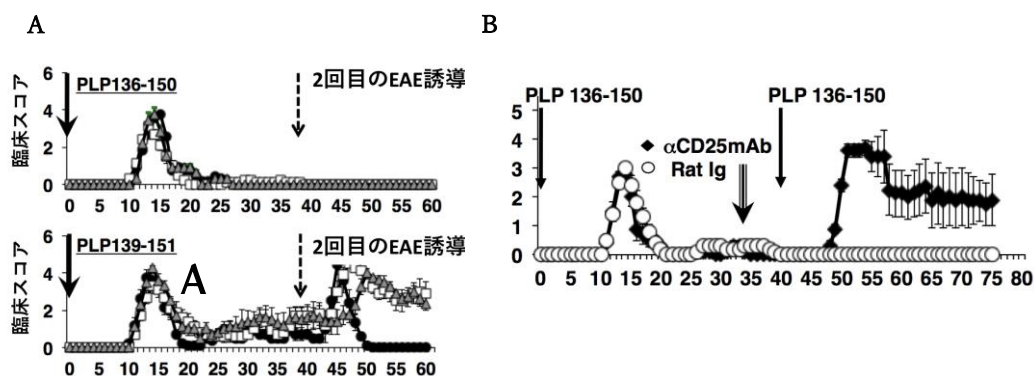


図 3 PLP136-150 誘導 EAE : 制御性 T 細胞を除くと二度目の EAE が誘導できる

PLP136-150 で EAE を誘導すると (パネル A)、2 回目の EAE 誘導ができなくなりますが、PLP139-151 で EAE を誘導した場合には 2 回目の EAE 誘導で強い病気が起こりました。その理由を探るために、制御性 T 細胞のマーカーである CD25 に対する抗体 (anti-CD25 mAb) を投与してから、day 40 に PLP136-150 で免疫したところ、EAE の再誘導が可能でした。これらの結果をもとに、我々は PLP136-150 には EAE の再発や EAE の再誘導を阻む制御性 T 細胞を誘導する性質があると推測しました。

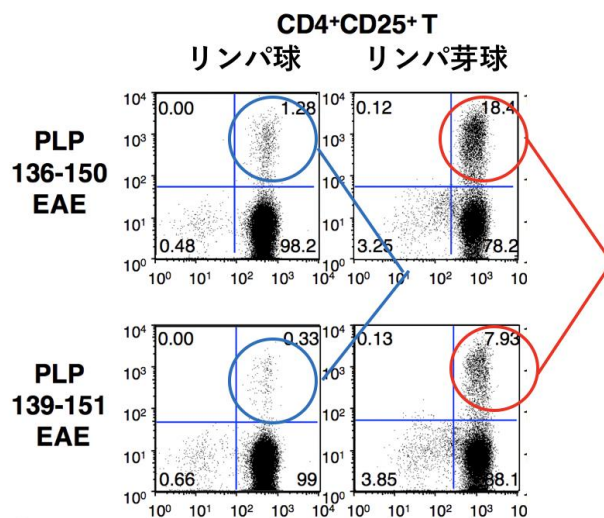


図4 PLP136-150 誘導 EAE では抗原特異的 Treg が誘導

PLP136-150 または PLP139-151 で EAE 誘導操作を行い、1 か月後に所属リンパ節からリンパ球とリンパ芽球を分離して、フローサイトメーター解析を行いました。○で囲ったリンパ球集団は、PLP139-151/I-As デキストラマーに反応性の抗原特異的 Treg です。リンパ球 (左パネル)、リンパ芽球 (右パネル) のいずれにおいても、上段 (PLP136-150 EAE) の抗原特異的 Treg が増加していることがわかります (代表例)。

### PLP139-151 の MHC class II への結合は不安定である

SJL/J マウスの MHC class II である I-As 分子と PLP ペプチドの結合安定性に関する解析は櫻庭俊博士によって実施されました。分子動態と replica exchange with solute tempering (REST) の数学的計量計算により、PLP ペプチド/I-As 分子複合体の溶液中における構造変化に関するシミュレーションを実施しました。解析の結果、PLP136-150 ペプチドは MHC class II の溝 (MHC groove) で安定したポジションを維持しているのに対して、PLP139-151 は溝からしばしば飛び出す不安定なポジションにあることがわかりました (図5)。またペプチドの N 末端は MHC class II の溝の外に飛び出した残基 (flanking residues) であることが確認されました。動的構造解析により PLP136-150 が I-As に安定して結合しているメカニズムの詳細が解明されました。

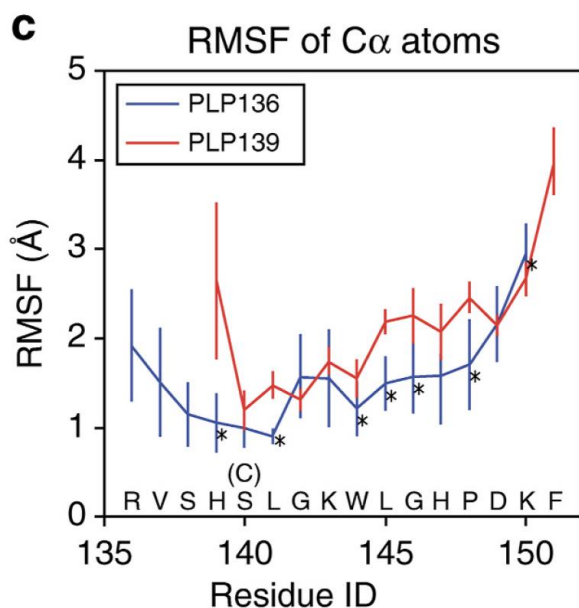


図5 PLP136-150 と PLP139-151 の個々のアミノ酸残基の MHC class II 結合安定性

PLP 各残基の Cα 原子結合安定性を、平均的位置からのゆらぎ (Root-mean-square Fluctuation; MSF) で示しています。PLP136-150 (青) と PLP139-151 (赤) で TMSF に関する有意差のある残基には \* をつけていますが、PLP139-151 は半分以上のアミノ酸残基において、ゆらぎが大きく、MHC class II 結合が不安定であることが示唆されます。

## ■まとめと今後の展望

PLP136-150 は SJL マウスの MHC class II 分子である I-As に安定して結合することにより、免疫原性を強く発揮することがわかりました。PLP136-150 で SJL マウスを感作すると、脳炎惹起性の抗原特異的 T 細胞も強く誘導されますが、強い活性を有する CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>Treg が優先的に誘導されることにより、EAE は再発しなくなり、EAE の再誘導も困難になると考えられます。逆に MHC class II に安定して結合できないペプチドで自己免疫病が誘導されると、病気は慢性化して難治化すると考えられます。MHC class II 分子に安定して結合するペプチドを合成するには、MHC class II の溝に結合するアミノ酸だけに配慮するのではなくて、溝の外の flanking residues の修飾も重要であることもわかりました。

さまざまな免疫病や悪性腫瘍に対するペプチド医薬の開発において、今回の知見が活用されることが期待されます。MS を予防するワクチンに関する議論もあるなかで、我々も安全かつ有効なペプチド療法の開発に向けて研究を継続して参りたいと考えています。

## ■用語解説

### 1) EAE (Experimental autoimmune encephalomyelitis:自己免疫性脳脊髄炎)

EAE は MS の動物モデルとして、病気の研究や治療法の開発に利用されています。脳や脊髄に存在する EAE 誘導活性を持つミエリン塩基性蛋白や PLP などのタンパク質またはそれらに由来するペプチドをマウスやラットに接種することによって誘導できます。接種された抗原に反応する T 細胞が誘導され、それが脳内に浸潤して、EAE を発症します。今回の研究では、PLP の合成ペプチド (PLP136-150 と PLP139-151) と結核菌死菌含有アジュバントの混和物を、SJL/J マウスの皮下に接種して誘導しました。

### 2) 制御性 T 細胞 (regulatory T cells, Treg)

免疫反応や炎症反応を抑制する能力を持った T 細胞で、坂口志文教授によって発見されました。CD4 陽性 CD25 陽性の T 細胞で、転写因子 Foxp3 を発現します。その由来によって中枢性 Treg (胸腺由来) と末梢性 Treg (末梢リンパ組織由来) に分類されます。また特定の抗原に反応する抗原特異的 Treg と抗原非特異的 Treg に分かれます。

## ■引用文献

- \*1 Endoh, M., T. Tabira, T. Kunishita, K. Sakai, T. Yamamura, and T. Taketomi: DM-20, a proteolipid apoprotein, is an encephalitogen of acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis in mice. *J Immunol* 137:3832-3835, 1986
- \*2 Satoh, J., K. Sakai, M. Endoh, F. Koike, T. Kunishita, T. Namikawa, T. Yamamura, and T. Tabira: Experimental allergic encephalomyelitis mediated by murine encephalitogenic T cell lines specific for myelin proteolipid apoprotein. *J Immunol* 138:179-184, 1987
- \*3 Tuohy, V.K., Z. Lu, R.A. Sobel, R.A. Laursen, and M.B. Lees. Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice. *J Immunol* 142: 1523-1527, 1989
- \*4 Endoh, M., T. Kunishita, J. Nihei, M. Nishizawa, and T. Tabira. Susceptibility to proteolipid

apoprotein and its encephaloitogenic determinants in mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 92: 433-438, 1990

#### ■原論文情報

- ・ 論文名： Harnessing autoimmunity with dominant self-peptide: Modulating the sustainability of tissue-preferential antigen-specific Tregs by governing the binding stability via peptide flanking residues
- ・ 著者： Lin, Y., S. Sakuraba, C. Masikamany, J. Reddy, Y. Tanaka, S. Miyake, and T. Yamamura
- ・ 掲載誌： Journal of Autoimmunity
- ・ URL： <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2023.103094>
- ・ DOI： 10.1016/j.jaut. 2023.103094

#### ■助成金

本研究成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって行われました。

- ・ 日本医療研究開発機構（AMED）難治性疾患実用化研究事業
- ・ 日本学術振興会・科学研究費補助金
- ・ 国立精神・神経医療研究センター・精神・神経疾患研究開発費

#### ■お問い合わせ先

##### 【研究に関する問い合わせ】

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 免疫研究部  
部長 山村 隆  
E-mail: [yamamura\(a\)ncnp.go.jp](mailto:yamamura(a)ncnp.go.jp)  
TEL:042-341-2711  
FAX:042-346-1753

##### 【報道に関するお問い合わせ】

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター  
総務課広報室  
〒187-8551 東京都小平市小川東町 4-1-1  
E-mail: [ncnp-kouhou\(a\)ncnp.go.jp](mailto:ncnp-kouhou(a)ncnp.go.jp)  
TEL:042-341-2711（代表）  
FAX:042-344-6745

※E-mail は上記アドレス(a)の部分を変えた上でご使用ください。