

厚生科学研究費補助金
脳科学研究事業

多発性硬化症の発症機構解明と治療法の開発

(H12-脳-013)

平成 13 年度 研究報告書

主任研究者 山村 隆

平成 14 年 (2002) 3 月

目 次

- I. 平成 13 年度総括研究報告 1~6
多発性硬化症の発症機構解明と治療法の開発
国立精神・神経センター神経研究所
主任研究者 山村 隆
- II. 分担研究者報告 7~17
1. NKT 細胞を標的とした多発性硬化症治療法の開発 7~13
国立精神・神経センター神経研究所 三宅幸子
2. 炎症性脱髄性疾患における転写調節因子の発現 14~17
兵庫医科大学医学部総合内科 岡 伸幸
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 18~19

I. 平成 13 年度総括研究報告

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

多発性硬化症の発症機構解明と治療法の開発に関する研究

主任研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部 部長

研究要旨 本研究事業では、多発性硬化症（MS）患者の予後を向上させるために、1) MSの疾患活動性の評価や予後推測に有用なマーカーの同定、2) NK細胞、NKT細胞の異常から見たMS免疫病態の把握、3) MSの遺伝素因の解析、4) NKT細胞を標的とする治療開発の研究を継続している。本年度は、課題2)に関連してMSの寛解期にCD4⁺NKT細胞がIL-4を大量に産生しTh2に偏倚していること、NKT細胞は全体としてTh2に偏倚していることなどを明らかにした。昨年度NK細胞がNK2に偏倚して寛解の維持に関与していることを証明したが、一連の研究の結果、NK2細胞とCD4⁺NKT細胞がMSの再発抑制、寛解の維持に大きな役割を果たすことがわかった。MS研究のみならず自己免疫疾患の研究全体に新しい局面を開いた画期的な成果と考えられる。また分担研究者との共同で、MSの動物モデルに対して治療効果を発揮するNKT細胞の糖脂質リガンドOCHの開発に成功した（Nature 413: 531-534, 2001）。OCHはMSや関節リウマチの治療への応用が期待され、研究成果の厚生行政や医療へのインパクトはきわめて大きい。

分担研究者

三宅 幸子 国立精神・神経センター
神経研究所免疫研究部 室長

岡 伸幸 兵庫医科大学総合内科
(神経内科) 講師

脂質を認識し、T細胞抗原受容体にはinvariant V α 24J α Q鎖を発現するユニークなリンパ球である。NKT細胞は大量のIL-4やIFN- γ を産生し、免疫調節に重要な役割を担うとされており、I型糖尿病や全身性硬化症などの自己免疫疾患の末梢血においてその減少が確認されている。我々は以前SSCP法により、MSの寛解期にNKT細胞が著明に減少することを明らかにした（Illes et al. J. Immunol. 164: 4375, 2000）。

CD1d拘束性NKT細胞はその表面抗原発現により、CD4⁺CD8⁻ (double-negative; DN)とCD4⁻に分類される。自己免疫との関連について、これまでの研究は主としてDN NKT細胞に焦点が向けられていたが、

A. 研究目的

本研究では多発性硬化症（MS）患者の予後を向上させるために、最新技術を駆使してMSの病態機構解明と治療法開発に関する基礎研究を行っている。本年は、特に患者NKT細胞の免疫調節能に関する研究において大きな進展があったので、これを中心に報告する。NKT細胞はCD1d拘束性に α -galactosylceramide (α -GC)などの糖

最近 CD4⁺ NKT 細胞に注目が集まっている。山村の研究室とハーバード大学の Brenner 教授の研究室の共同研究により、CD4⁺ NKT 細胞は IL-4 や IL-13 など Th2 サイトカインの産生能を持つが、DN NKT 細胞は Th2 サイトカインは産生できず主に炎症性サイトカインを産生することが明らかになった (J.Exp. Med. 195:625, 2002)。同じような研究成果が別の研究室からも報告され、CD4⁺ NKT 細胞研究の重要性が認識されてきたところである。今回の研究の目的は、MS (寛解期、再発期) における末梢血 NKT 細胞を CD4⁺ NKT 細胞と CD4⁻ CD8⁻ (double negative, DN) NKT 細胞のサブタイプに分類、その数値・機能的変化を解析することにある。

B. 研究方法

対象は再発寛解型 MS 患者 39 名、健常対照者 15 名である。寛解の認定には、3 ヶ月以上自覚症状や理学所見の悪化を認めず、MRI 画像上造影効果を認めないことを判断基準とし、ステロイド剤、免疫抑制剤の投与されている症例は除外した。

各検体より末梢血リンパ球分画内の NKT (V α 24⁺ V β 11⁺)、CD4⁺ NKT、DN NKT 細胞頻度を Flow cytometry を用いて測定。また、CD1d-tetramer を用いて、末梢血中の CD1d 拘束性 T 細胞頻度を測定した。NKT 細胞の機能解析には、 α -GC を用い in vitro にて NKT enriched culture を誘導し、培養開始 20~30 日目に cell sorter にて NKT 細胞を分取。 α -GC による再刺激によ

り NKT 細胞の増殖反応 (methyl-³H 取り込み) を評価し、Dynabeads CD3/CD28 T cell expander 刺激によりサイトカイン (IL-4、IFN- γ) 産生能を評価した。

C. 研究結果

1) MS における末梢血 NKT 細胞の減少:

MS 寛解期において末梢血 DN NKT (V α 24⁺ V β 11⁺) 細胞頻度 (MS: 0.007 \pm 0.002%, Control: 0.065 \pm 0.026%, $p < 0.005$)、 α -GC 刺激後 DN NKT 細胞頻度 (培養 7 日目, MS: 0.65 \pm 0.13 %, Control: 4.12 \pm 1.81 %, $p < 0.01$) の減少を認めた。一方、末梢血 CD4⁺ NKT 細胞頻度については有意な減少を認めなかった (MS: 0.005 \pm 0.002%, Control: 0.013 \pm 0.006%, $p = 0.18$)。CD1d テトラマーを使った解析においても、MS 寛解期において CD1d 拘束性細胞の減少を認めた (MS: 0.076 \pm 0.046%, Control: 0.294 \pm 0.120%)。

2) α -GC 刺激に対する NKT 細胞の反応:

in vitro において α -GC の刺激で NKT 細胞は 200~300 倍に増加したが、MS 群と対照群でその増加率に相違は認めなかった。培養開始 7 日目に NKT 細胞頻度を測定、末梢血と同様に MS 寛解期における NKT 細胞の減少を認めた ($p < 0.005$)。DN NKT 細胞、CD4⁺ NKT 細胞ともに有意な減少を示したが、DN NKT 細胞の減少がより顕著であった (DN NKT; $p < 0.01$ 、CD4⁺ NKT; $p < 0.05$)。また、MS 症例において NKT 細胞は減少するものの、CD4⁺ NKT

細胞が DN NKT 細胞に比して相対的に優位となり、対照群との相違がより明瞭となった。in vitro にて増加した NKT 細胞は、 α -GC に特異的に反応し、末梢血と同様の機能を有すること確認した。

3) NKT 細胞のサイトカイン産生：

培養開始後 20~30 日に、セル・ソーターで CD4⁺ NKT 細胞および DN NKT 細胞を分離し、そのサイトカイン産生能を評価した。MS 群、対照群に関わらず、CD4⁺ NKT 細胞は DN NKT 細胞に比べて IL-4 をより多く産生するパターンを示した。MS 寛解期では DN NKT 細胞の IL-4、IFN- γ 産生が共に減少する傾向にあり、その一方、CD4⁺ NKT 細胞は IL-4 をより多く産生し ($p < 0.01$)、相対的に Th2 偏倚を示した。CD4⁺ NKT 細胞が IL-4 産生能に優れることが最近報告されているが (Gumperz et al. J. Exp. Med. 195: 625, 2002; Lee et al. J. Exp. Med. 195: 637, 2002)、MS では CD4⁺ NKT がさらに高い IL-4 産生能を発揮することが明らかになった。

D. 考察

過去の研究では、1 型糖尿病における DN NKT 細胞減少とその Th1 偏倚の病態への関与が示されるなど、DN NKT 細胞の機能分析が中心になされてきた。今回我々は、CD4⁺ NKT 細胞の数的、機能的解析を加えることにより、MS において見られる NKT 細胞の変化は、MS 病態を促進させるものではなく、むしろ病態の増悪に抑制的に働

くような性質のものであることを示唆した。昨年度、我々は MS の寛解期には NK 細胞が IL-5 を大量に産生する NK2 細胞様の表現型を示すこと、NK2 細胞が Th1 細胞の誘導や活性化を抑制することを示した。NK 細胞の NK2 偏倚、CD4⁺ NKT 細胞の Th2 偏倚、ともに MS の寛解維持に有利に働く変化であり、NK、NKT 細胞が寛解期の MS 患者にとって有利な機能的偏倚を遂げていることは明白である。

分担研究者三宅との共同で開発した糖脂質リガンド OCH (分担研究者報告参照) には、NKT 細胞の IL-4 産生を誘導することによって EAE を治療する効果がある。来年度以降は、ヒト NKT 細胞が OCH に反応して IL-4 を産生するか、また OCH に反応するのは CD4⁺ NKT 細胞に限られるのかなどの疑問に答える必要がある。

E. 結論

MS 寛解期では、DN NKT 細胞が減少し、そのサイトカイン産生は減少する。一方、Th2 偏倚した CD4⁺ NKT 細胞は数的に DN NKT よりも相対的優位の状態になり、かつ Th2 偏倚する。その結果、NKT 細胞全体としては Th2 にシフトする。以上の結果から、CD4⁺ NKT 細胞が MS の免疫調節に重要な働きを果たすことは確実である。今後は、我々の開発した NKT 細胞の糖脂質リガンド OCH (Nature 413:531, 2001) が、NKT 細胞の IL-4 産生能を促進させて MS を制御できるかどうか、研究の焦点となる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

a. 雑誌

- 1) Takahashi K. Miyake S. Kondo T. Terao K. Hatakenaka M. Hashimoto S. and Yamamura T. Natural killer type 2 (NK2) bias in remission of multiple sclerosis. **J. Clin. Invest.** 107:R23-R29, 2001
- 2) Miyamoto K. Miyake S. and Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. **Nature** 413:531-534, 2001
- 3) Maeda M. Lohwasser S. Yamamura T. and Takei F. Regulation of NKT cells by Ly49: analysis of primary NKT cells and generation of NKT cell line. **J. Immunol.** 167: 4180-4186, 2001
- 4) Miyamoto K. Oka N. Kawasaki T. Miyake S. Yamamura T. and Akiguchi I. New cyclooxygenase-2 inhibitors for treatment of experimental autoimmune neuritis. **Muscle and Nerve** 25:280-282, 2002
- 5) Gumperz J.E. Miyake S. Yamamura T. and Brenner M.B. CD1d tetramer staining reveals functionally distinct subsets of human CD1d-restricted NKT cells. **J. Exp. Med.** 195: 625-636, 2002
- 6) 宮本 勝一、三宅 幸子、河野 直子、山村 隆：P0+マウスにおける胸腺内 P0 発現低下と実験的自己免疫性神経炎(EAN)感受性の亢進。神経免疫学 9:225-228, 2001
- 7) 長山成美、三宅幸子、山村 隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における NK 細胞/NK-LAK 細胞の体内動態および疾患抑制性の検討。神経免疫学 10:104-105,

2002.

- 8) 宮本勝一、三宅幸子、水野美歩、岡他幸、山村 隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の治療における選択的 COX-2 阻害剤の効果。神経免疫学 10: 106-107, 2002
- 9) 林 幼偉、三宅幸子、山村 隆：CD4+CD25+T 細胞による実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の調節。神経免疫学 10: 108-109, 2002

b. 単行本

- 1) 山村 隆：多発性硬化症。先端医療シリーズ 14「神経・筋疾患の最新医療」(杉田秀夫、福内靖男、柴崎浩監修)，先端医療技術研究所(東京)，pp153-157, 2001
- 2) 宮本 勝一、山村 隆：糖脂質による NKT 細胞活性化を介した実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の治療。別冊・医学のあゆみ。21世紀の神経免疫学, pp63-66, 2001
- 3) 山村 隆：臓器特異的自己免疫病の NK/NKT 細胞による調節。別冊・医学のあゆみ、免疫疾患-state of arts (今西二郎、淀井淳司、渡長博、山本一彦編)，医歯薬出版、2002

c. 総説

- 1) 山村 隆、高橋 和也：多発性硬化症と NK 細胞-NK2 細胞による寛解維持機構。医学のあゆみ 198: 394-397, 2001
- 2) 山村 隆：多発性硬化症の治療。最近の動向。脳と神経 53: 703-794, 2001
- 3) 三宅 幸子、河野 直子、山村 隆：Cblファミリーによる免疫調節機構の解析。神経免疫学 9: 189-196, 2001
- 4) 三宅 幸子、宮本 勝一、山村 隆：NKT 細胞の新規リガンドによる多発性硬化症モデルの抑制。細胞工学 20:1666-1667, 2001
- 5) 三宅 幸子、宮本 勝一、山村 隆：NKT 細胞の新規リガンドによる多発性硬化症モデルの抑制。実験医学 20:76-78, 2001

- 6) 山村 隆: 多発性硬化症の動物モデル-実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE). Current Insights in Neurological Science (印刷中) 2002
- 7) 三宅幸子, 山村 隆: NKT細胞と実験的自己免疫性脳脊髄炎. *Mebio* (印刷中)、2002

2. 学会発表

a. 国際学会

- 1) Takahashi, K., S. Miyake, T. Kondo, K. Terac, M. Hatakenaka, S. Hashimoto, and T. Yamamura: Type 2 cytokine bias of natural killer cells defines remission of multiple sclerosis. *Experimental Biology* 2001, Orlando, Florida, April 3, 2001
- 2) Miyamaoto, K., S. Miyake, M. Schachner, and T. Yamamura: Higher susceptibility of heterozygous P0 knockout mice to P0-induced experimental autoimmune neuritis (EAN): Lower P0 expression in the thymus may be a cause. *Experimental Biology* 2001, Orlando, Florida, April 4, 2001
- 3) Takahashi, K., S. Miyake, T. Kondo, and T. Yamamura: Natural killer type 2 (NK2) bias in remission of multiple sclerosis. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 1st Annual Meeting, Boston, USA, May 7, 2001
- 4) Takahashi, K., S. Miyake, T. Kondo, and T. Yamamura: NK type 2 bias in remission of multiple sclerosis: insights into the regulation of pathogenic autoimmune T cells. VIth International Congress of Neuroimmunology. Edinburgh, Scotland, UK, Sept 5, 2001
- 5) Araki, M., T. Kondo, Zs. Illes, and T. Yamamura: Differential changes of CD4+ versus CD4+CD8+ NKT cells in remission of multiple sclerosis. VIth International

Congress of Neuroimmunology. Edinburgh, Scotland, UK, Sept 5, 2001

- 6) Miyake, S., K. Miyamoto, and T. Yamamura: A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 bias of natural killer T cells. The 7th International Workshop on antibodies and autoimmunity. Awaji Island, Sept 28, 2001

b. 国内学会

- 1) 宮本勝一、三宅幸子、Melitta Schachner、山村 隆: P0+マウスにおける胸腺内 P0 発現低下と実験的自己免疫性神経炎 (EAN) 感受性の亢進. 第 42 回日本神経学会総会、東京、2001 年 5 月 11 日
- 2) 近藤晋之、高橋和也、幸原伸夫、高橋洋一、山崎峰雄、山村 隆: 日本人那須-Hakola 病の遺伝子解析. 第 42 回日本神経学会総会、東京、2001 年 5 月 12 日
- 3) 宮本勝一、三宅幸子、河野直子、山村 隆: P0+マウスにおける胸腺内 P0 発現低下と実験的自己免疫性神経炎 (EAN) 感受性の亢進. 第 12 回日本末梢神経学会、大阪、2001 年 8 月 25 日
- 4) 高橋和也、三宅幸子、山村 隆: Natural killer (NK) 2 細胞による Th1 細胞の抑制. 日本臨床免疫学会総会、大阪、2001 年 12 月 10 日
- 5) 宮本勝一、三宅幸子、山村 隆: 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における COX-2 阻害剤の効果. 日本臨床免疫学会総会、大阪、2001 年 12 月 10 日
- 6) 三宅幸子、長山成美、宮本勝一、千葉麻子、山村 隆: NK-LAK 細胞移行による自己免疫疾患の治療効果の検討. 日本臨床免疫学会総会、大阪、2001 年 12 月 10 日
- 7) 長山成美、三宅幸子、山村 隆: 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における NK 細胞/NK-LAK 細胞の体内動態および疾患抑制性の検討. 第 14 回日本神経免疫学会学術集会、東京、2002 年 2 月 8 日

- 8) 富本勝一、三宅幸子、水野美歩、植田
 幸、山村 隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎
 (EAE)の治療における選択的 COX-2 阻害
 剤の効果。第 14 回日本神経免疫学会学術
 集会、東京、2002 年 2 月 8 日
- 9) 林 幼偉、三宅幸子、山村 隆：
 CD4+CD25+T 細胞による実験的自己免疫
 性脳脊髄炎(EAE)の調節。第 14 回日本神経
 免疫学会学術集会、東京、2002 年 2 月 8
 日

c. 招待講演

- 1) 山村 隆：NK/NKT による EAE の制御。第 8
 回東京免疫フォーラム、2001 年 4 月 10 日。東
 大医科研講堂
- 2) Yamamura, T. : Natural killer type 2 (NK2)
 bias in remission of multiple sclerosis. Major
 Symposia. Immunomodulation/Innate
 Immunity. FOCIS (Federation of Clinical
 Immunology Societies) 1st Annual Meeting,
 Boston, USA, May 7, 2001
- 3) 山村 隆：多発性硬化症に対する新しい免疫
 療法。NK/NKT 細胞をめぐって。第 42 回神経
 学会総会。シンポジウム S9 神経・筋難病の
 新しい治療戦略。2001 年 5 月 13 日、東京
- 4) Yamamura T: Regulation of autoimmune
 encephalomyelitis by NK and NKT cells. The
 7th International workshop on autoantibodies
 and autoimmunity. Awaji-Island, Japan, 27
 September 2001
- 5) Yamamura, T., and K. Takahashi: Regulation
 of multiple sclerosis by NK cells: Is type 2 bias
 of NK cells playing a role? International
 Symposium on NK/NKT cells and
 autoimmunity. -for understanding of multiple
 sclerosis and self-tolerance. Supported by
 Japan MS Society. Kodaira, December 14,
 2001
- 6) Araki, M., T. Kondo, and T. Yamamura: An
 unexpected alteration of NKT cells in multiple
 sclerosis: A remarkable polarization of CD4+

NKT cells towards secreting IL-4.

International Symposium on NK/NKT cells
 and autoimmunity. -for understanding of
 multiple sclerosis and self-tolerance.
 Supported by Japan MS Society. Kodaira,
 December 14, 2001

- 7) Fazekas, G., T. Yamamura, H. Hara, and T.
 Tabira: Effects of immunostimulatory
 oligonucleotides on the activation of
 lymphocyte populations and on the induction
 of experimental autoimmune
 encephalomyelitis. International Symposium
 on NK/NKT cells and autoimmunity. -for
 understanding of multiple sclerosis and self-
 tolerance. Supported by Japan MS Society.
 Kodaira, December 14, 2001
- 8) Mivake, S., K. Miyamoto, and T. Yamamura: A
 synthetic glycolipid prevents autoimmune
 encephalomyelitis by inducing Th2 bias of
 natural killer T cells. International
 Symposium on NK/NKT cells and
 autoimmunity.-for understanding of multiple
 sclerosis and self-tolerance. Supported by Japan
 MS Society. Kodaira, December 14, 2001
- 9) 山村 隆：シンポジウム「疾患モデルと治療
 法の開発」自己免疫性脳脊髄炎に対する NKT
 細胞脂質リガンド療法。第 14 回日本神経
 免疫学会学術集会。2002 年 2 月 8 日、東京

II. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
出願中（糖脂質による自己免疫病治療）
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究者報告

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

「NKT細胞を標的とした多発性硬化症治療法の開発」

分担研究者 三宅 幸子 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部部長
研究要旨

NKT細胞を刺激して、多発性硬化症（MS）の実験モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）を抑制できる α ガラクトシルセラミド（ α GC）誘導体 OCH の合成に成功した。OCH は、 α GC のスフィンゴシン鎖を短縮した誘導体である。OCH は、NKT細胞を刺激して IL-4 を優位に産生させ、Th2 優位の免疫応答を引き起こすことにより EAE 疾患抑制効果があることが明らかとなった。IL-4 に対する中和抗体を同時投与すると OCH の EAE 抑制効果は消失し、IL-4 ノックアウトマウスに誘導した EAE にも OCH の抑制効果がみられないことから、OCH の EAE 抑制には、IL-4 が重要であることがわかった。以上の結果から、NKT細胞の適切な活性化が、新しい MS 治療戦略となることが明かとなった。

A. 研究目的

これまで、我々は多発性硬化症（MS）の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）において、NKT細胞が重要な調節機構を持つことを報告してきた（*J.Immunol.* 166:662, 2001）。そこで、これらの調節性細胞の疾患抑制作用を解明することにより、新しい治療法を開拓することを目的として、以下の実験に着手した。

B. 研究方法

CS7BL6J マウスに髄鞘蛋白である Myelin oligodendrocyte glycoprotein 由来 MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを免疫し、EAE を誘導した。NKT細胞を刺激する α GC の誘導体を合成し、EAE の治療効果のあるものをスクリーニングした。EAE 治療効果が NKT細胞によるものかどうかを確認するため、NKT ノックアウトマウス、CD1 ノックアウトマウスにも EAE を誘

導し、合成した α GC 誘導体の治療効果を検討した。また α GC 誘導体投与個体の病理学的検索、血清中の抗 MOG 抗体のアイソタイプ測定を行った。これらの α GC 誘導体をマウスに投与し、ELISA にて血清中のサイトカインを測定した。また、これらの α GC 誘導体による *in vitro* における脾細胞増殖反応、サイトカイン産生能を検討した。 α GC 誘導体の作用機序を検討するため、抗 IL-4 抗体（11B11）をプロテイン G カラムを用いて精製し、 α GC 誘導体投与時に抗体（1 mg/mice）の同時投与を行った。また、IL-4 ノックアウトマウスに EAE を誘導し、 α GC 誘導体の EAE 抑制効果について検討した。

C. 研究結果

NKT細胞については、これまで抗 B72 抗体存在下で α GC を加えた抗原提示細胞を移入することによって、IL-4 優位のサイトカイン

産生をおこし、疾患を抑制できることを示してきた。今回はさらに臨床応用を考え、 α GC 誘導体を合成した(図1)。NH は、糖鎖の2位の水酸基をアミノ基に置換した誘導体である。34D は、フィトスフィンゴシンの3位、4位の水酸基を削除した誘導体である。OCH は、スフィンゴシン鎖を短縮した誘導体である。

これらの α GC 誘導体を、未処置マウスに投与後、経時的に血清中のサイトカインを測定した(図2, 上段)。 α GC 投与では、IL4、IFN γ 両者の上昇がみられた。このサイトカインの上昇は NKT ノックアウトマウスではみられず、NKT 細胞依存性であることが確認された。NH は、投与後もほとんどサイトカインの上昇はみられず、NKT 細胞活性化の作用は弱いと考えられた。34D を投与すると、IL4、IFN γ 両者の上昇がみられたが、いずれも α GC 投与と比較すると、サイトカインの上昇は軽度であった。一方、OCH を投与すると、IL4 の選択的上昇がみられた。低容量の α GC 投与でも、B6 マウスにおいては IL4 の選択的上昇がみられることはなく、OCH は α GC とは質的に異なるシグナルを伝えていると、考えられた(図2 下段)。In vitro でこれらの誘導体に対する脾細胞の反応を検討すると、サイトカイン産生については、in vivo 投与での結果と同様の傾向がみられ、OCH 添加により IL4 が優位に産生された(図3, 右パネル)。増殖刺激を検討すると、OCH では α GC の1/10程度の増殖刺激能があることがわかった(図3, 左パネル)。

これらの誘導体の EAE の抑制効果につい

て検討した。EAE 誘導時に、 α GC 誘導体を腹腔に投与したところ、OCH 投与群で、優位に EAE が抑制された(図4, 左パネル)。この抑制効果は、経口投与でもみられた(図4, 中央パネル)。OCH の EAE 抑制効果は、NKT ノックアウトマウスではみられず、NKT 細胞を介した作用であることがわかった。(図4, 右パネル)。また、CD1 ノックアウトマウスに EAE を誘導して、 α GC 誘導体を投与したが、疾患抑制効果はみられず、NKT 細胞を介した作用であることを確認した。病理学的検索を行ったところ、OCH 投与群では病変への浸潤細胞の減少を認めた。

病因自己抗原への免疫応答を検討するために、血清中の抗 MOG 抗体のアイソタイプを測定した(図5)。OCH 投与群では、コントロール群や α GC 投与群と比較して IgG1/IgG2a 比の上昇が認められ、免疫応答が Th2 に偏倚していることがわかった。EAE の抑制効果が IL4 によるものかどうかを検討するために、抗 IL4 抗体を α GC 誘導体と同時に投与すると EAE の抑制効果が消失した(図6, 中央パネル)。また、IL4 ノックアウトマウスに EAE を誘導して α GC 誘導体を投与したが、EAE の抑制効果はみられず、 α GC 誘導体の疾患抑制効果は、IL4 依存性であることが明らかとなった(図6, 右パネル)。

D. 考察

NKT 細胞に IL4 を優位に産生させ、Th2 優位の反応をおこせる α GC 誘導体 OCH の合成に成功した。また、この作用を通じて、 α GC 誘導体の経口投与により、自己抗原で

ある MOG に対する反応を Th2 に偏倚させることによって EAE を抑制できることがわかった。OCH は、ペプチドの altered peptide のように、NKT 細胞に α GC とは異なる刺激を伝えていると考えられる。今後はこのシグナルの違いについての解析が重要である。また、OCH 反応性の細胞の VP 鎖が α GC と同様に、VP 8 鎖を発現しているのか、異なる T 細胞受容体の組み合わせとなっているかについても検討が必要である。

このように NKT 細胞を適切に刺激すると疾患予防的にはたらくことから、今後 NKT 細胞を標的とした MS の再発の予防に有効な治療法の開発が期待できる。今回の誘導体は、 α GC のスフィンゴシン鎖を短くしたものであるが、今後さらに新しい誘導体をスクリーニングすることにより、さらに EAE 抑制効果の高いリガンドが導かれる可能性が考えられる。また、 α GC 誘導体が関節炎や自己免疫性糖尿病などの、他の自己免疫疾患にも効果があるかどうか、今後の重要な検討課題である。

E. 結論

NKT 細胞を刺激し、Th2 サイトカインを選択的に産生させることによって、EAE を抑制できる α GC 誘導体の合成に成功した。以上のことより、NKT 細胞を有効な方法で刺激することにより、EAE を抑制できることがわかった。今後、これらの免疫調節細胞を介した MS の治療法の開発が期待される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

I 論文発表

1. Miyake S*, Miyamoto K*, Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 of natural killer T cells. *Nature* Vol. 413 : 531-534, 2001
2. Gumpertz J, Miyake S, Yamamura T and Brenner MB. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 of natural killer T cells. *J.Exp. Med.* (in press)
3. Miyamoto K, Oka N, Kawasaki T, Miyake S, Yamamura T, and Akiyoshi I. New cyclooxygenase-2 inhibitors for treatment of experimental autoimmune neuritis. *Muscle & Nerve* Vol.25 : 280-282, 2002
4. 三宅幸子、宮本勝一、山村隆：NKT 細胞の新規リガンドによる多発性硬化症モデルの抑制：細胞工学, 20(12) 1666-1667, 2001
5. 三宅幸子、宮本勝一、山村隆：NKT 細胞の新規リガンドによる多発性硬化症モデルの抑制：実験医学, 20(1) 76-78, 2001
6. 三宅幸子：NKT 細胞：医学のあゆみ別冊 (印刷中)
7. 三宅幸子、山村隆：NKT 細胞と実験的自己免疫性脳脊髄炎：Mebio, (印刷中)
8. 三宅幸子：Cbl による免疫調節機構；*Immunology Frontier*, 11:73-79, 2001
9. 三宅幸子：Cbl と自己免疫疾患；炎症と免疫, 9 : 463-470, 2001

10. 三宅幸子: Cbl と自己免疫疾患; リウマチ科, 26: 260-267, 2001
11. 三宅幸子: Cbl による免疫調節機構; 臨床免疫, (印刷中)

II 学会発表

1. Kazuya Takahashi, Sachiko Miyake, Takayuki Kondo, Takashi Yamamura. NK type 2 bias in remission of multiple sclerosis: insights into the regulation of pathogenic autoimmune T cells.

VIIth international neuroimmunology congress, Edinburgh, Scotland, September 5, 2001

2. Kazuya Takahashi, Sachiko Miyake, Takayuki Kondo, Takashi Yamamura. NK type 2 (NK2) bias in remission of multiple sclerosis. FOCIS 1st annual meeting, Boston, MA, May 5, 2001

3. Kazuya Takahashi, Sachiko Miyake, Takayuki Kondo, Keiji Terao, Megumi Hatakenaka, Shuji Hashimoto, and Takashi Yamamura. Type 2 cytokine bias of natural killer cells defines remission of multiple sclerosis. Experimental Biology 2001, Orlando, FL, April 3, 2001

4. Katsuchi Miyamoto, Sachiko Miyake, Melitta Schachner and Takashi Yamamura. Higher susceptibility of heterozygous PO knockout mice to PO-induced experimental autoimmune neuritis (EAN): lower PO expression in the thymus may be a cause. Experimental Biology 2001, Orlando, FL, April 3, 2001

5. Sachiko Miyake, Katsuchi Miyamoto and Takashi Yamamura. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 bias of natural killer T cells. The 7th international workshop on autoantibodies and autoimmunity. September 26-29, 2001, Awaji

island, Japan

6. Sachiko Miyake. Regulatory cells in autoimmune diseases: A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 bias of natural killer T cells. International symposium on NK/NKT cells and autoimmunity, Dec.14, 2001, Tokyo

1. 三宅幸子: Cbl ファミリーによる免疫調節機構, 第45回日本リウマチ学会, 平成13年, 5月14-16日, 東京

2. 高橋和也, 三宅幸子, 山村隆: Natural Killer (NK) 2細胞によるTh1細胞の抑制, 第29回日本臨床免疫学会, 平成13年12月11-13日, 大阪

3. 三宅幸子, 長山成美, 宮本勝一, 千葉麻子, 山村隆: NK-LAK細胞移入による自己免疫疾患の治療効果の検討, 第29回日本臨床免疫学会, 平成13年12月11-13日, 大阪

4. 宮本勝一, 三宅幸子, 山村隆: 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)におけるCOX-2阻害剤の効果, 第29回日本臨床免疫学会, 平成13年12月11-13日, 大阪

5. 三宅幸子, 宮本勝一, 山村隆: 新規NKT細胞糖脂質リガンドMMYによる実験的自己免疫性脳脊髄炎の抑制, 第31回日本免疫学会, 平成13年12月11-13日, 大阪

6. 宮本勝一, 三宅幸子, 山村隆: FO+/-マウスにおける胸腺内PO発現低下と実験的自己免疫神経炎感受性の亢進, 第31回日本免疫学会, 平成13年12月11-13日, 大阪

7. 長山成美, 三宅幸子, 山村隆: 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)におけるNK細胞/NK-LAK細胞の体内動態および疾患抑制性の検討, 第14回日本神経免疫学会,

平成14年2月7-8日、東京

8. 宮本勝一、三宅幸子、水野美歩、岡仲幸、山村隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の治療における選択的COX-2阻害剤の効果、第14回日本神経免疫学会、平成14年2月7-8日、東京
9. 林幼偉、三宅幸子、山村隆：CD4⁺CD25⁻T細胞による実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の調節、第14回日本神経免疫学会、平成14年2月7-8日、東京
10. 山村隆、宮本勝一、三宅幸子：自己免疫性脳脊髄炎に対するNKT細胞糖脂質リガンド療法、第14回日本神経免疫学会、平成14年2月7-8日、東京

II. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
1. 実用新案登録
なし
2. その他
なし

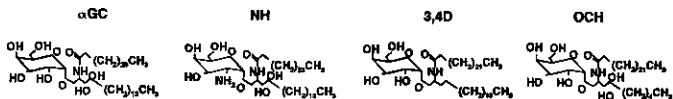


図1 α GCの合成誘導体の構造

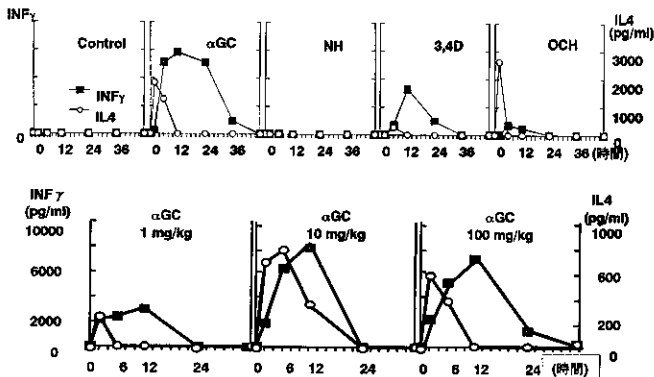


図2 α GC誘導体投与による血清サイトカインの変動

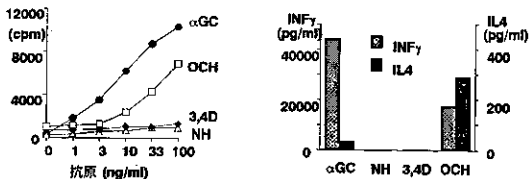


図3 α GC誘導体による脾細胞の増殖反応とサイトカイン産生能の測定

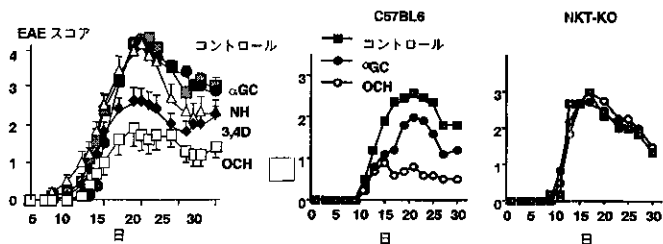


図4 α GC誘導体投与によるNKT細胞依存性EAE抑制効果

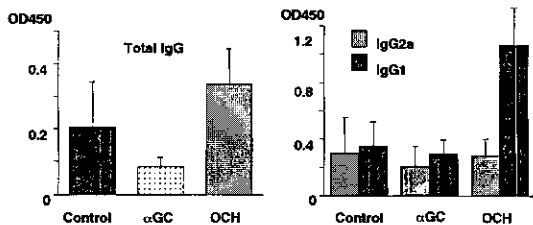


図5 抗MOG抗体アイソタイプの測定

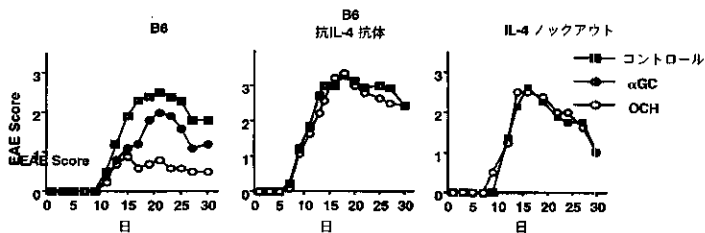


図6 α GC誘導体投与によるIL-4依存性EAE抑制効果

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

炎症性脱髄性疾患における転写調節因子の発現

分担研究者 岡 伸幸 兵庫医科大学医学部総合内科 講師

研究要旨 NF- κ Bは脱髄に関与するTNF- α やIL-1 β により活性化され、一方各種炎症性サイトカイン、ケモカイン、matrix metalloproteinases や接着分子の誘導にも関与し、炎症反応の中心的な役割を果たす。一方 cAMP-responsive element binding protein(CREB)は β -neuregulinなどの軸索からのシグナルによって活性化—リン酸化を受け、シュワン細胞の再生増殖に関与するといわれる。本研究は炎症性ニューロパチーでこれら転写因子の発現を検討した。その結果、NF- κ Bは、活動性脱髄を示すCIDP、急性の軸索変性を呈する神経内鞘のマクロファージの核に陽性であったが、コントロールでは陰性であった。p CREB は、CIDP と軸索再生群でコントロール群に比し有意に神経内鞘内の陽性細胞が多く、また急性軸索変性群でも増加傾向にあった。転写調節因子 NF- κ Bは炎症性ニューロパチーの免疫機序に関与し、各種炎症性分子の誘導に関わっていると考えられる。また pCREB は effector としてのマクロファージ活性化に関わるほか、主としてシュワン細胞に発現し、神経再生に関連すると考えられた。

A. 研究目的

Guillain-Barré 症候群や慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)などの免疫性ニューロパチーにおいて、脱髄の局面ではマクロファージが主導的な役割を果たす。マクロファージは抗原提示細胞として作動し、また炎症惹起性サイトカインの分泌によって炎症をひきおこし、effector として髄鞘に作用し脱髄をおこす。転写調節因子 NF- κ B は炎症、免疫、再生機序などで重要な役割をもつ。これは脱髄に関与する TNF- α や IL-1 β により活性化され、一方各種炎症性サイトカイン、ケモカイン、matrix metalloproteinases や接着分子の誘導にも関与し、炎症反応の中心的な役割を果たす。また NF- κ B と同様に炎症などに広く

関与するといわれる転写調節因子 cAMP-responsive element binding protein(CREB)は、神経系においては β -neuregulinなどの軸索からのシグナルによって活性化—リン酸化を受け、シュワン細胞の再生増殖に関与するといわれる。CIDPの病態には、脱髄と再生の両方が関わると考えられ、本研究は炎症性ニューロパチーでこれら転写因子の発現を検討した。

B. 研究方法

一般病理所見上活動性の脱髄を示すCIDP5例、血管炎による急性期の軸索障害性ニューロパチー5例、軸索変性からの回復期の神経再生の活発な5例、一般病理性的に正常所見のコントロール5例につい

て、生検腓腹神経組織を用いて、活性化 NF- κ B、リン酸化活性化 CREB(pCREB) に対する抗体(SantaCruz 社)により免疫組織学的に検討した。細胞種の同定のために、CD3, CD68, S100(すべて DAKO 社)に対する抗体を用い蛍光2重染色を行った。

生検にあたってはインフォームドコンセントを行い、個人情報と秘密厳守のもとで生検標本を研究に用いることについて同意を取得した。

C. 研究結果

NF- κ B は、パラフィン標本で良好な結果が得られた。活動性脱髄を示す CIDP、急性の軸索変性を呈する神経内鞘のマクロファージの核に陽性であったが、コントロールでは陰性であった。

pCREB(図)は新鮮凍結切片を用いた。脱髄と再生の両所見をしめす CIDP と軸索変性後の神経再生の活発な群でコントロール群に比して有意に(p<0.01)神経内鞘の陽性細胞が多く認められた。急性軸索変性においても神経内鞘に陽性細胞を認めた。2重染色の結果、これらの陽性細胞の多くはシュワン細胞と考えられ、一部がマクロファージと一致した。コントロールや慢性の軸索変性では、ほとんど陽性細胞を認めなかった。

D. 考察

NF- κ B は炎症性ニューロパチーのマクロファージに発現していた。これは、中枢神経では多発性硬化症の炎症巣における foamy macrophage に NF- κ B が認められたことと符合する所見である。マクロファージにおける NF- κ B の活性化は、そのほか HIV 脳症、動脈硬化症、慢性関節リウマチで報告されている。

NF- κ B は免疫性脱髄性神経炎において多様な役割を果たす。まず VCAM1, E-selectin などの接着分子を誘導し、白血

球の神経内鞘への浸潤を促す。また matrix metalloproteinase の産生をもたらし、浸潤細胞の遊走を容易にする。さらに effector としてのマクロファージにフリーラジカルや TNF- α の産生を増強させ脱髄をひきおこす。このように様々な局面で NF- κ B が関与すると考えられ、本研究の結果もこれを支持する所見である。

一方、もうひとつの転写調節因子として活性化型 CREB(pCREB)の発現をみたところ、神経再生の活発な例のシュワン細胞に多く発現していた。また CIDP でもシュワン細胞に発現がみられ、脱髄とともに神経再生が同時に進んでいることに対応すると考えられた。さらに急性軸索変性においてマクロファージの一部にも発現しており、effector としてのマクロファージの活性化にも関与が示唆された。

E. 結論

転写調節因子 NF- κ B は炎症性ニューロパチーの免疫機序に関与し、各種炎症性分子の誘導に関わっていると考えられる。また pCREB はシュワン細胞に主として発現し、神経再生に関連すると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizutani, K., Oka, N., Kusunoki, S., Kajii, R., Mezaki, T., Akiguchi, J. and Shibasaki, H. Sensorimotor demyelinating neuropathy with IgM antibody against gangliosides GD1a, GT1b and GM3. *J. Neurol. Sci.*, 188, 9-11, 2001
- 2) Andorfer, B., Kieseier, B.C., Mathey, E., Armati, P., Pollard, J., Oka, N., Hartung, H. Expression and distribution of transcription factor NF- κ B and inhibitor I κ B in the

inflamed peripheral nervous system. *J Neuroimmunol.* 116, 226-232, 2001

3) Miyamoto K, Oka N, Kawasaki T, Miyake S, Yamamura T, Akiguchi I. New cyclooxygenase-2 inhibitors for treatment of experimental autoimmune neuritis. *Muscle Nerve.*, 25, 280-282, 2002

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

2. 学会発表

1) 川崎照晃、八木秀雄、西谷裕、岡仲幸、秋口一郎、柴崎浩: 細胞周期関連物質 p16mRNA の CMT1A における発現に関する検討 第 42 回日本神経学会総会、東京、2001 年 5 月

2) 岡仲幸、児玉典彦、巖本靖道、川端啓太、西村裕之、武田正中、立花久大: 慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)の臨床像と生検所見の対応 第 42 回日本神経学会総会、東京、2001 年 5 月

3) Kaji R, Kusunoki S, Mizutani K, Oka N, Kohara N, Kimura J, Shibasaki H. Chronic motor axonal neuropathy associated with antibodies against gangliosides. *Peripheral Nerve Society Meeting 2001. Tyrol, Austria. September 8, 2001*

4) Kieseier BC, Oka N, Mathey E, Armati F, Hartung HP. Tumor necrosis factor-converting enzyme is expressed in inflammatory demyelinating diseases of the peripheral nervous system. *Peripheral Nerve Society Meeting 2001. Tyrol, Austria. September 8, 2001*

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし